

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Демин Михаил Валерьевич

**Изучение мутационного статуса гена фосфотрансферазы
цитомегаловируса и вируса герпеса человека 6, выделенных от
реципиентов гемопоэтических стволовых клеток**

1.5.10 – Вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель (консультант):
Кандидат биологических наук,
Тихомиров Дмитрий Сергеевич

Москва – 2024

Диссертация подготовлена на кафедре вирусологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

- Научный руководитель (консультант)** – *Тихомиров, Дмитрий, Сергеевич – кандидат биологических наук*
- Официальные оппоненты** – *Кюрегян Карен Каренович – доктор биологических наук, профессор РАН, ФБУН "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Роспотребнадзора, заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов*
- Балашов Дмитрий Николаевич – доктор медицинских наук, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, заведующий отделением трансплантации гемопоэтических стволовых клеток № 2, врач-гематолог*
- Гараев, Тимур, Мансурович – кандидат биологических наук, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики*

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. в __ часов __ минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: https://dissovet.msu.ru/dissertation/шиифр_совета/номер_страницы/

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.В. Комарова

Оглавление

1. Введение.....	4
1.1 Актуальность темы исследования и ее разработанность	4
1.2 Цель и задачи исследования	6
1.3 Объект исследования.....	6
1.4 Научная новизна исследования.....	7
1.5 Теоретическая и практическая значимость работы	8
1.6 Личный вклад автора.....	8
1.7 Методы и методология исследования.	9
1.8 Положения, выносимые на защиту	10
1.9 Степень достоверности и апробация результатов.....	10
1.10 Структура и объем диссертации	12
2. Обзор литературы.	13
2.1 Семейство <i>Herpesviridae</i>	13
2.2 Подсемейство <i>Betaherpesvirinae</i>	21
2.2.1 Характеристика ЦМВ.....	21
2.2.2 Характеристика ВГЧ-6	33
2.3 β -герпесвирусы у реципиентов гемопоэтических стволовых клеток	39
2.4 Противовирусные препараты прямого действия.....	43
2.5 Устойчивость к противовирусным препаратам.....	47
2.6 Методы выявления мутаций в ДНК герпесвирусов.....	55
3. Материалы и методы.	59
3.1 Дизайн исследования.....	59

3.2 Материалы	63
3.3 Методы.....	66
4. Результаты и обсуждение.....	74
4.1 Определение частоты выявления ЦМВ и ВГЧ-6 у пациентов с иммунодефицитами	74
4.2 Поиск мутаций устойчивости к действию противовирусных препаратов в гене <i>UL97</i> ЦМВ и <i>U69</i> ВГЧ-6.....	76
4.3 Анализ динамики возникновения мутаций в гене <i>UL97</i>	83
4.4 Разработка прототипа тест-системы для идентификации мутаций в гене <i>UL97</i> ЦМВ	98
5. Заключение.	105
6. Выводы.	107
7. Список литературы.	108

Список однобуквенных сокращений названий аминокислот.

A - аланин

C - цистеин

D - аспарагиновая кислота

E - глутаминовая кислота

F - фенилаланин

G - глицин

H - гистидин

I - изолейцин

K - лизин

L - лейцин

M - метионин

N - аспарагин

P - пролин

Q - глутамин

R - аргинин

S - серин

T - треонин

V - валин

W - триптофан

Y - тирозин

1. Введение.

1.1 Актуальность темы исследования и ее разработанность

Betaherpesvirinae, или β -герпесвирусы – это подсемейство вирусов, которое входит в семейство герпесвирусов *Orthoherpesviridae*. Подсемейство включает пять родов, но только вирусы из родов *Cytomegalovirus* (вирус герпеса человека 5-го типа, или цитомегаловирус (ЦМВ) и *Roseolovirus* (вирус герпеса человека типа 6А, вирус герпеса человека типа 6В (ВГЧ-6), вирус герпеса человека 7-го типа (ВГЧ-7) являются антропонозами. У иммунокомпрометированных пациентов (например, реципиенты органов и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК)), при реактивации ЦМВ и ВГЧ-6 могут наблюдаться серьезные вирусные инвазии отдельных органов и целых систем организма (Piret, & Voivin, 2014). Таким образом, реципиенты органов или ГСК представляют собой особую группу пациентов и уязвимы для инфекционных осложнений, среди которых может быть и активная репликация герпесвирусов (Ramanan, & Razonable, 2013). Вероятность появления симптомов вирусного поражения при отсутствии своевременной противовирусной терапии достигает 80%. Такая ситуация описана как для ЦМВ (Takenaka et al, 2015), так и для ВГЧ-6 (Rossi et al, 2001). Развитие инфекций, вызванных этими вирусами, увеличивает тяжесть течения основного гематологического заболевания, а у реципиентов стволовых кроветворных клеток повышает вероятность как развития острой и хронической «РТПХ», так и отторжения трансплантата и летального исхода. Существенное влияние этих вирусов на тяжесть клинической картины осложнения у реципиентов алло-ГСК обуславливает актуальность проведения противовирусной профилактики и терапии. На сегодняшний день известно несколько препаратов, способных подавить размножение β -герпесвирусов: ацикловир, ганцикловир и их пролекарства с большей биодоступностью – валацикловир и валганцикловир. Данные лекарственные средства являются

аналогами нуклеозидов (Chen et al, 2019) и зарегистрированы для клинического применения на территории Российской Федерации. Учитывая критическую роль противовирусной терапии в лечении вирусного инфекционного осложнения, угрозу представляет ситуация, когда вирус приобретает устойчивость к действию препаратов прямого действия. Устойчивость вируса чаще всего связана с мутациями в геноме и была описана как для ЦМВ, так и для ВГЧ-6. В связи с этим, представляется актуальным исследование, направленное на поиск ассоциированных с устойчивостью мутаций в геномах вирусов, выделенных из клинического материала, реципиентов Алло-ГСК. Также актуальным является поиск оптимального диагностического подхода к идентификации таких мутаций у других пациентов с опухолевыми заболеваниями системы крови.

Активное изучение мутаций, ассоциированных с устойчивостью к противовирусным препаратам, началось в 1990-х годах. При этом большинство исследовательских групп было сосредоточено на поиске мутаций в геноме ЦМВ (Wolf et al., 1995). Большинство найденных мутаций ассоциированы с устойчивостью именно к ганцикловиру и его производным (Chou, 2020). Этот факт, скорее всего, объясняется более долгим сроком использования ганцикловира в качестве противовирусного препарата и его повсеместным распространением в мире (Kotton et al., 2018). Тем не менее были найдены и описаны мутации, приводящие к устойчивости и к цидофовиру, фоскарнету, марибавиру и летермовиру (Chou, 2008). На данный момент описано более 100 мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов (Chou, 2020) в геноме ЦМВ, и это число растет с каждым годом. Для ЦМВ определены не только сами мутации, но и их относительная эффективность противодействия противовирусным препаратам (Chou et al., 2017). Для ВГЧ-6 информации куда меньше: описано менее 50 мутаций (Piret & Voivin, 2014), к тому же, не существует данных относительно эффективности этих мутаций.

Несмотря на наличие молекулярных исследований, существует крайне мало работ, рассматривающих, как возникновение устойчивости влияет на течение инфекций у пациентов с гемобластозами, в частности у реципиентов Алло-ГСК, хотя диагностика таких мутаций и поиск методов противодействия представляются актуальными для науки и практической медицины (Chaer et al., 2016).

1.2 Цель и задачи исследования

Определить спектр, частоту встречаемости и молекулярно-биологическую характеристику мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию ганцикловира, в ДНК ЦМВ и ДНК ВГЧ-6

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Оценить актуальность изучения мутационного статуса геномов ЦМВ и ВГЧ-6 путем анализа частоты выявления ДНК данных вирусов у пациентов с иммунодефицитом различного генеза.
- 2) Провести поиск мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, в участках генов вирусной фосфотрансферазы ЦМВ и ВГЧ-6 (*UL97* и *U69*) в образцах ДНК
- 3) Оценить влияние выявленных мутаций на характер течения вирусной инфекции.
- 4) Разработать прототип тест-системы для определения мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию ганцикловира, на основе аллель-специфичной ПЦР.

1.3 Объект исследования

Объектами исследования являлись участки гена вирусной фосфотрансферазы у ЦМВ и ВГЧ-6, в которых возможно появление мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, а

также клинико-лабораторные данные реципиентов алло-ГСК, результаты рутинных вирусологических исследований и записи в базах данных.

1.4 Научная новизна исследования

Впервые в России проведены исследования мутационного статуса генов вирусной фосфотрансферазы вирусов ЦМВ у взрослых больных гемобластозами и реципиентов алло-ГСК. Кроме того, аналогичные исследования проведены и для ВГЧ-6.

Секвенированы участки гена вирусной фосфотрансферазы вирусов ЦМВ и ВГЧ-6, где, согласно литературным данным, сосредоточены наиболее часто встречаемые мутации устойчивости к действию противовирусных препаратов. Обнаружены ранее описанные мутации в гене *UL97* ЦМВ: C592G, C603W, del600. Для ВГЧ-6 показано отсутствие мутаций в исследованном участке гена *U69*.

Проанализирован большой массив клиническо-лабораторных данных реципиентов, у которых выявлены мутантные штаммы ЦМВ. Оценена динамика возникновения мутации. Динамика идентификации мутации соотнесена с клинико-лабораторными данными: вирусная нагрузка, режим противовирусной терапии, клиническое течение.

Доказано, что появление мутации вызывает рост вирусной нагрузки и влияет на течение инфекции у пациента. Показана необходимость разработки и/или усовершенствования подходов к лечению активной вирусной инфекции у реципиентов алло-ГСК при обнаружении мутации устойчивости к действию противовирусных препаратов в геноме вируса.

Впервые в мировой практике разработан прототип тест-системы для идентификации мутаций C592G и C603W на основе аллель-специфичной ПЦР.

Показана эффективность использования такой системы для решения задач по сбору статистических данных и для рутинной диагностической практики.

1.5 Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования расширяют представления о распространенности мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, у вирусов ЦМВ и ВГЧ-6, показывают их влияние на особенности течения инфекции, клиническую картину.

Практическая значимость заключается в определении наиболее часто встречаемых мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, в образцах реципиентов алло-ГСК. Также предложен диагностический алгоритм для своевременной идентификации мутационного штамма, который в свою очередь позволяет скорректировать терапевтическую тактику. Прототип разработанной тест-системы на основе АС-ПЦР позволяет быстро проводить скрининг на наличие наиболее распространенных мутаций (в рамках данного исследования – С603W и С592G), что расширяет диагностический потенциал, доступный в рутинной клинической практике.

1.6 Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в работе с литературными данными, планировании и проведении экспериментальной части исследования, анализе и обработке полученных результатов. Автор внес вклад в подготовку научных публикаций по материалам диссертационной работы и представлял результаты исследований на конференциях. Автором написаны диссертация и автореферат к ней. Имена соавторов указаны в опубликованных работах. Участие соавторов отражено в тексте диссертации и автореферата. Вклад автора в представленную работу определяющий.

1.7 Методы и методология исследования.

Для исследования были использованы ДНК ЦМВ и ВГЧ-6, выявленных в образцах клинического материала с помощью набора реагентов «АмплиСенс CMV/EBV/HHV 6» производства ООО «ИнтерЛабСервис» и приборов Rotor Gene Q (QIAGEN), RG-6000 (Corbett Research). В качестве клинического материала были исследованы образцы периферической крови, аспирата костного мозга, мочи, кала, бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛ), ликвора и биоптатов различных органов и тканей. Выделение нуклеиновых кислот проводили из 100 мкл материала, прошедшего преаналитическую обработку, с помощью наборов реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» или «АмплиПрайм ДНК-сорб-В», согласно прилагаемым инструкциям.

Для секвенирования проводили подбор праймеров к участкам генов *UL97* ЦМВ и *U69* ВГЧ-6, в которых ранее отмечали высокую частоту мутаций, ассоциированных с устойчивостью (Chou, 2015), с помощью онлайн сервиса Benchling. Очистку продуктов амплификации проводили, используя набор Cleanup Standard согласно инструкции производителя (Евроген). Секвенировали участки генов *UL97* ЦМВ и *U69* ВГЧ-6 на генетическом анализаторе «НАНОФОР 05» (ООО «Синтол»). Нуклеотидные и предсказанные аминокислотные последовательности выравнивали с помощью программы Benchling, с помощью этого же программного обеспечения осуществляли поиск мутаций в секвенированных последовательностях гена *UL97* ЦМВ.

Для разработки тест-системы на основе аллель-специфичной ПЦР (АС-ПЦР) для определения наличия актуальных мутаций в гене *UL97* ЦМВ использовали онлайн-сервиса Benchling для подбора праймеров и зондов. Для проведения ПЦРс детекцией продуктов в режиме реального времени использовали реагенты от компании ООО «Синтол».

1.8 Положения, выносимые на защиту

- 1) У реципиентов алло-ГСК герпесвирусная инфекция может быть вызвана устойчивыми к действию противовирусных препаратов штаммами бетагерпесвирусов.
- 2) При появлении в геноме бетагерпесвируса мутации устойчивости к действию ганцикловира возрастает вирусная нагрузка, ухудшается ответ на терапию.
- 3) Величина фактора резистентности мутации может оказывать влияние на уровень вирусной нагрузки у реципиентов алло-ГСК на фоне противовирусной терапии.
- 4) Метод АС-ПЦР может быть использован для разработки тест-системы, позволяющей определять наличие конкретных мутаций резистентности быстро и массово.
- 5) Такая тест-система может быть использована для подтверждения наличия наиболее распространенных или опасных мутаций в геноме вируса, выделенного от пациента с гемобластозом.
- 6) Частота выявления ЦМВ и ВГЧ-6 у больных гемобластозами выросла за наблюдаемый период. Вклад ВГЧ-6 в структуру инфекционных осложнений вырос по сравнению с ЦМВ.

1.9 Степень достоверности и апробация результатов

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, обеспечивается и подтверждается корректной постановкой цели и задач исследования, обоснованным применением современных лабораторных методик и адекватных методов описательной статистики, большим массивом проанализированных клинико-лабораторных данных и собранных экспериментальных данных, анализом широкого круга литературных источников, содержащих результаты исследований отечественных

и зарубежных авторов по рассматриваемой проблеме. Диагностику и идентификацию вирусных штаммов и подбор праймеров и зондов проводили, используя современные общепринятые методы, средства и протоколы анализа. Биоинформационную обработку данных проводили с помощью свободно распространяемого программного обеспечения: Benhcling, BLAST и др. Последовательности вирусных геномов, определенные независимо, были идентичны друг другу.

По материалам диссертации опубликовано 6 экспериментальных и 1 обзорные статьи в журналах, индексируемых в RSCI, WoS, Scopus или входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Апробация основных результатов диссертации проведена в 2023 году в рамках защиты научно-квалификационной работы, подготовленной соискателем при обучении в аспирантуре биологического факультета МГУ. Результаты работы были представлены соискателем на конференциях: «Современные подходы к профилактике, диагностике и лечению несостоятельности/отторжения трансплантата и других осложнений при трансплантации аллогенных органов и гемопоэтических стволовых клеток» Москва 02.03.2023г. (устный доклад), на конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность — 2022» Москва 27-28 апреля 2022 г. (устный доклад), VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инфекции и инфекционная безопасность в гематологии и службе крови» С.-Петербург 14-15.04.2022 г. (устный доклад), VI Всероссийской научно-практической онлайн-конференции с международным участием «Инфекции и инфекционная безопасность в гематологии и службе крови» С.-Петербург 9.10.2020 г. (устный доклад).

1.10 Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста и состоит из следующих основных разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы». Работа содержит список цитируемой литературы, состоящий из 117 источников, и включает 13 рисунков и 8 таблиц.

2. Обзор литературы.

2.1 Семейство *Herpesviridae*

Согласно современной таксономической классификации вирусов, порядок *Herpesvirales* подразделяют на три семейства: *Alloherpesviridae* (вирусы рыб и амфибий), *Malacoherpesviridae* (вирусы двустворчатых моллюсков) и *Orthoherpesviridae*, куда входят вирусы млекопитающих, птиц и рептилий. В семейство *Orthoherpesviridae* входят крупные вирусы, содержащие двухцепочечную молекулу ДНК длиной от 124 до 295 тысяч пар азотистых оснований. Вирион обладает рядом отличительных особенностей: нуклеиновая кислота упакована в икосаэдрический капсид, составленный из 161 капсомера, который окружен белками тегумента и липидной мембраной клеточного происхождения, в которую встроены вирусные гликопротеиды. Можно выделить четыре ключевые особенности членов данного семейства:

1) Они кодируют большой набор ферментов, вовлеченных в метаболизм нуклеиновых кислот (тимидинкиназа, тимидилатсинтетаза, рибонуклеотидредуктаза), синтез ДНК (ДНК-полимераза, хеликаза, праймаза) и в процесс созревания белков (киназы).

2) Транскрипция вирусных генов, синтез вирусной ДНК и сборка нуклеокапсида происходит в ядре зараженной клетки. В цитоплазме вирус созревает, приобретая тегумент и липидную оболочку.

3) Литическая инфекция зачастую сопровождается разрушением инфицированной клетки.

4) Герпесвирусы способны находится в клетках латентно, экспрессируя только латентные гены, что отчасти обеспечивает сохранность в организме хозяина в течение его жизни.

По другим параметрам представители этого семейства могут сильно различаться. Некоторые могут заражать широкий круг клеток хозяина, быстро размножаться и приводить к быстрому разрушению инфицированных клеток, например, вирус простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ-1,2). У других а репликативный цикл оказывается куда длиннее, например, у ЦМВ. Существенные различия также обнаруживаются в механизмах клеточного контроля, уходе от иммунного ответа и клиническом проявлении вирусной инфекции, вызванной вирусом (Davison et al, 2002). Так ВГЧ-6 сохраняется в организме, преимущественно путем встраивания генома в теломерные участки хромосом клеток хозяина. Такой же механизм был описан и для ВЭБ, но в отличие от него, ВГЧ-6 способен к полногеномному встраиванию в теломеры.

Представители семейства широко распространены в природе. Почти для каждого вида животных находится соответствующий герпесвирус, зачастую вид могут заражать несколько разных представителей этого семейства. Количество идентифицированных на сегодняшний день герпесвирусов превышает 200 представителей.

В конце 1970-х, еще до расшифровки последовательностей ДНК, герпесвирусы объединяли в семейство *Herpesviridae*, которое в свою очередь делилось на три подсемейства (*Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammapherpesvirinae*). В основе классификации лежали биологические особенности вирусов, известные на тот момент. Однако данные, полученные в ходе исследования нуклеотидных последовательностей, лишь подтвердили правильность предложенной классификации (Pellet, & Roizmann, 2007). *Alphaherpesvirinae* характеризуется широким кругом хозяев, коротким репродуктивным циклом, быстрым распространением в культуре, разрушением инфицированных клеток и установлением латентной формы в основном в сенсорных ганглиях. Представители данного подсемейства заражают млекопитающих (род

Simplexvirus и род *Varicellovirus*) и птиц (род *Mardivirus* и род *Itovirus*), кроме того, к *Alphaherpesvirinae* относятся вирусы рептилий, которые, однако, пока не объединены в какой-либо род. *Betaherpesvirinae* отличается ограниченным количеством организмов-хозяев, репродуктивный цикл может быть длинным, более 7 дней, а инфекция в культуре клеток развивается медленно. Кроме того, инфицированные клетки часто увеличиваются в размере (цитомегалия), латентная форма может устанавливаться в лимфоретикулярных клетках, клетках почек и других тканей, кроме того, возможна интеграция вирусного генома в цепь ДНК хозяина. Подсемейство включает в себя род *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus*, *Proboscivirus*, *Proboscivirus* и *Roseolovirus* (см. таблицу 1). Наконец, *Gammapherpesvirinae* в выборе хозяев ограничены семейством или порядком, а репликация *in vitro* возможна в лимфобластоидных клетках, также в некоторых случаях литическая инфекция развивается в эпителиальных клетках и фибробластах. Вирусы данной группы чаще всего специфически заражают Т-, или В-лимфоциты. Подсемейство на сегодняшний день включает четыре рода: *Lymphocryptovirus*, *Macavirus*, *Percavirus*, и *Rhadinovirus*.

Таблица 1. Современная таксономия вирусов порядка Herpesvirales, сравнение с предыдущей таксономией по Bradley (2008)

Таксон	Предыдущее таксономическое положение	Современное таксономическое положение	Новые названия отдельных видов вирусов (примеры)
Порядок Семейство	- <i>Herpesviridae</i>	<i>Herpesvirales</i> <i>Orthoherpesviridae</i>	-
Подсемейство Род	<i>Alphaherpesvirinae</i> <i>Simplexvirus</i>	<i>Alphaherpesvirinae</i> <i>Simplexvirus</i>	<i>Simplexvirus</i> <i>humanalpha1</i>
Род	<i>Varicellovirus</i>	<i>Varicellovirus</i>	<i>Varicellovirus</i> <i>humanalpha3</i>

Род	<i>Mardivirus</i>	<i>Mardivirus</i>	<i>Mardivirus anatalpha1</i>
Род	<i>Iltovirus</i>	<i>Iltovirus</i>	<i>Iltovirus gallidalpha1</i>
Род		<i>Scutavirus</i>	<i>Scutavirus chelonidalpha5</i>
Подсемейство	<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Betaherpesvirinae</i>	
Род	<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Cytomegalovirus humanbeta5</i>
Род	<i>Muromegalovirus</i>	<i>Muromegalovirus</i>	<i>Muromegalovirus muridbeta1</i>
Род	<i>Roseolovirus</i>	<i>Roseolovirus</i>	<i>Roseolovirus humanbeta6a/b</i>
Род		<i>Proboscivirus</i>	<i>Proboscivirus elephantidbeta1</i>
Род		<i>Quwivirus</i>	<i>Quwivirus caviidbeta2</i>
Подсемейство	<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Gammaherpesvirinae</i>	
Род	<i>Lymphocryptovirus</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	<i>Lymphocryptovirus humangamma4</i>
Род	<i>Rhadinovirus</i>	<i>Rhadinovirus</i>	<i>Rhadinovirus humangamma8</i>
Род		<i>Macavirus</i>	<i>Macavirus alcelaphinegamma1</i>
Род		<i>Percavirus</i>	<i>Percavirus equidgamma2</i>
Род		<i>Patagivirus</i>	

Род		<i>Manticavirus</i>	<i>Patagivirus vesperilionidgamma3</i> <i>Manticavirus phascolarctidgamma1</i>
Род		<i>Bossavirus</i>	<i>Bossavirus delphinidgamma1</i>
Семейство	<i>Ictalurvirus</i>	<i>Alloherpesviridae</i>	
Род		<i>Ictalurvirus</i>	<i>Ictavirus ictaluridallo1</i>
Род		<i>Batravirus</i>	<i>Batravirus ranidallo1</i>
Род		<i>Cyivirus</i>	<i>Cyivirus anguillidallo1</i>
Род		<i>Salmovirus</i>	<i>Salmovirus salmonidallo1</i>
Семейство		<i>Malacoherpesviridae</i>	
Род		<i>Aurivirus</i>	<i>Aurivirus haliotidmalaco1</i>
Род		<i>Ostreavirus</i>	<i>Ostreavirus ostreidmalaco1</i>

Геном вирусов представлен линейной двуцепочечной молекулой ДНК, которая при выходе из нуклеокапсида в ядро клетки сразу замыкается в кольцо. Длина молекулы находится в пределах от 124 до 295 тысяч пар оснований (п.о.). Самый маленький геном содержит *Simian varicella virus* (SVV), а самый большой *Koi herpesvirus* (Aoki et al, 2007) . Содержание пар азотистых оснований G+C также разнится в зависимости от вируса от 31% до 77%.

Все вирусы, входящие в семейство *Herpesviridae*, характеризуются наличием трех высококонсервативных участков генома, которые были

унаследованы от общего предка, несмотря на то что некоторые потомки в ходе эволюции утратили несколько генов.

Большинство высококонсервативных участков генома кодируют белки, которые участвуют в репликации вирусной ДНК, её упаковке, или являются структурными белками. Анализ геномов позволяет говорить о существенной роли таких механизмов как замена нуклеотидов, дупликация, рекомбинация, генетическая перестановка и захват генов хозяина в ходе эволюции данного семейства. Остальные же гены консервативны лишь внутри подсемейства или родов (Davison et al, 2003a).

Интересная особенность геномов герпесвирусов заключается в устройстве их генетической последовательности (см. рисунок 1). Длинные повторы (больше 100 п.о.) терминальной последовательности могут находиться в различных участках генома. На основе схемы строения геномы могут быть разделены на шесть типов, именуемые буквами латинского алфавита (от А до F).

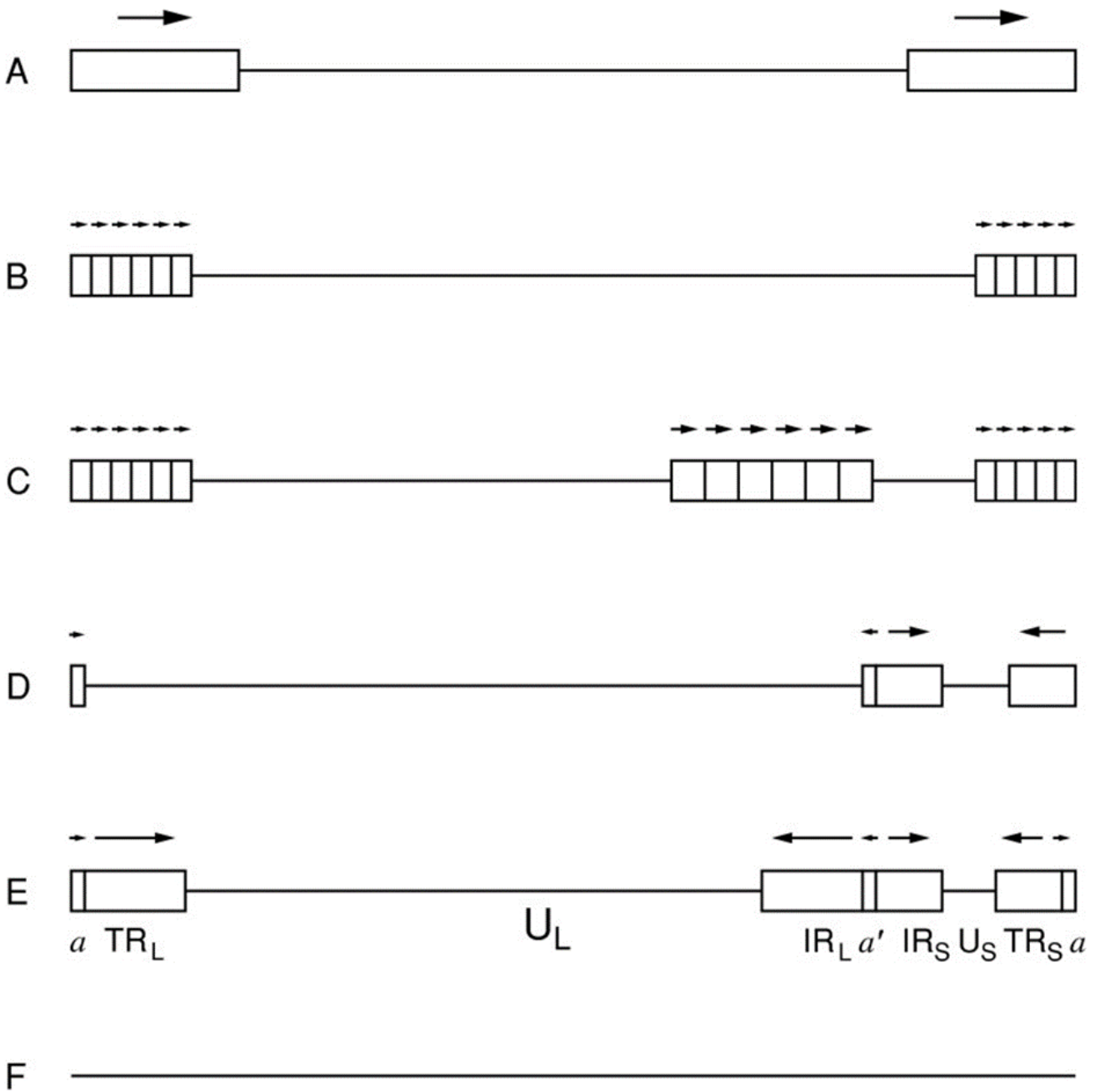


Рисунок 1. Классы герпесвирусных геномов по Pellet (2007) (пояснения в тексте)

К группе А относятся геномы, обладающие однонаправленными концевыми повторами на разных концах генома. В группе В на обоих концах имеется несколько однонаправленных концевых повторов. Группа С отличается меньшим количеством повторов, чем группа В. Геном группы D содержит внутренний инвертированный повтор, разделяющий геном на два фрагмента. Учитывая, что меньший фрагмент (S) может менять свое направление по

отношению к большому (L), экстракт ДНК содержит две эквимолярные популяции. В группе E, оба конца имеют внутренние инвертированные повторы, что приводит к появлению двух компонентов, фланкированных повторами. При экстрагировании такая ДНК имеет 4 эквимолярные популяции. Наконец, в группе F терминальные последовательности неидентичны и не образуют каких-либо внутренних повторов.

Все герпесвирусы также содержат на одном конце генома цис-сигнальные последовательности необходимые для упаковки ДНК в капсид и расщепления конкатемеров, образующихся в ходе репликации вирусной ДНК.

2.2 Подсемейство *Betaherpesvirinae*

2.2.1 Характеристика ЦМВ

ЦМВ (*Cytomegalovirus humanbeta5*) был впервые описан в 1930-х годах, когда проводились исследования цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) у новорожденных. В инфицированных клетках человека отмечали характерные включения, получившие название «совиный глаз», а сами клетки заметно увеличиваются в размерах (цитомегалия), откуда вирус и получил свое название (Weller et al, 1957). Однако, в качестве инфекционного агента, вызывающего данное заболевание, ЦМВ был идентифицирован лишь в 1950-х годах (Weller et al, 1957).

Как и у всех герпесвирусов, геном ЦМВ запакован в икосаэдрический капсид, который окружен плотным тегументом, в свою очередь окруженным липидной оболочкой, которая носит название суперкапсид. Липидный конверт при этом покрыт множеством гликопротеинов, которые участвуют в проникновении вируса в клетку (см. рисунок 2).

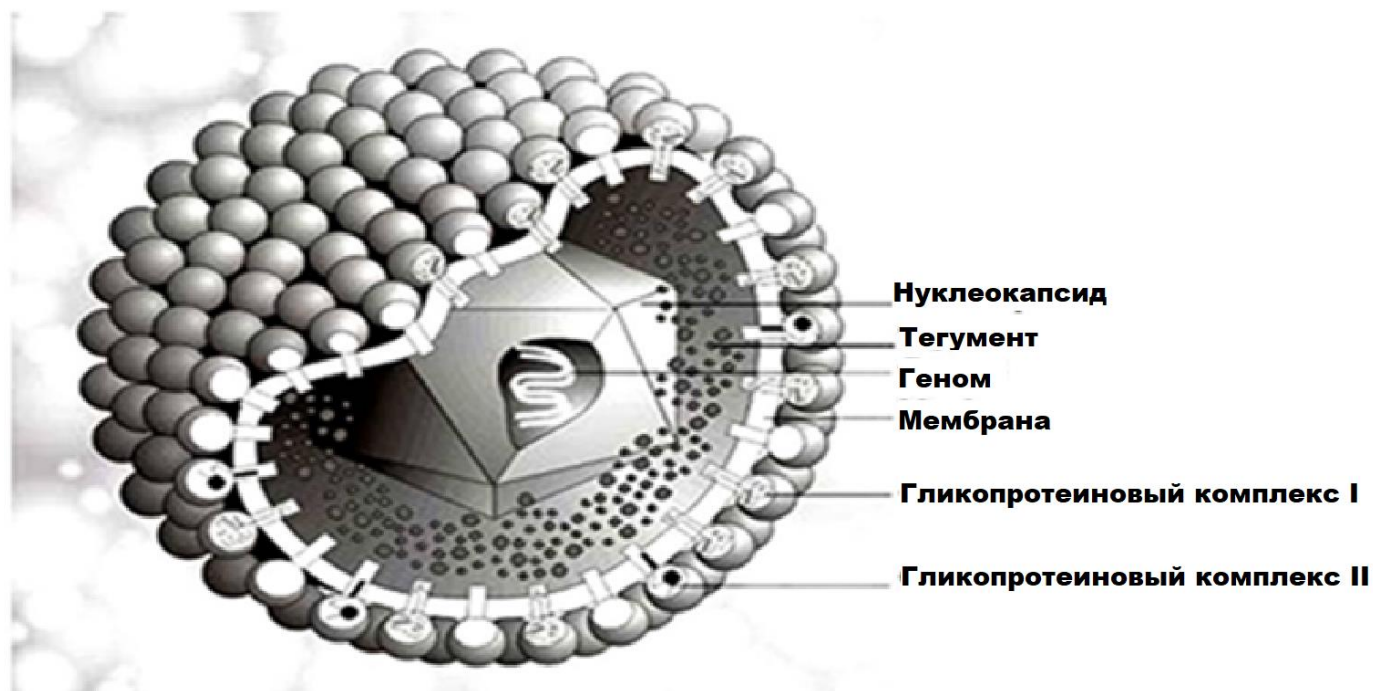


Рисунок 2. Строение вирусной частицы ЦМВ по Tomtishen (2012).

Геном ЦМВ больше, чем у представителей альфа и гамма *Herpesviridae*, поэтому геном в капсиде ЦМВ зафиксирован в более напряженном состоянии. Кроме того, геному ЦМВ свойственна высокая степень организации, которая достигается упаковкой генома через портальный комплекс (Bhella et al, 2000).

ЦМВ обладает сложной сетью тегумента. Большинство белков тегумента играют важные роли на ранних этапах заражения, являясь ферментами, необходимыми для развития вирусной инфекции (Roby, & Gibson, 1986).

Помимо основных, вирион ЦМВ включает компоненты, не присущие другим вирусам. Одним из них являются две молекулы РНК, гибридизированные с сайтом начала репликации молекулы ДНК. Роль данных молекул скорее всего заключается в инициации репликации, путем запуска работы РНКазы и удаления ДНК:РНК-гибрида, что в свою очередь ведет к формированию праймера в форме открытой молекулы ДНК и маленького фрагмента РНК.

Структура генома ЦМВ у высших приматов, в том числе человека, относятся к классам E (см. рис. 1), в котором два уникальных участка (U1 & U2) фланкированы прямыми повторами (TR1 & IR1; TR2 & IR2) (Weststrate et al, 1980). Копия концевой участка с прямым повтором размером примерно 300-600 п.о. находится на стыке между участками IR1 и IR2, причем имеет инвертированное направление (Tamashiro, & Spector, 1986). В геноме также выявлена инверсия сегментов, что приводит к наличию четырех изомеров, различающихся во взаимной ориентации уникальных участков U1 и U2 в эквимольном количестве. Считается, что класс E возник после дупликации терминальной последовательности внутри генома. Причины, приведшие к таким изменениям, остаются неизвестны.

Полные последовательности генома ЦМВ были получены в результате выполнения нескольких исследований (Dunn et al, 2003) (Dolan et al, 2004).

Первым штаммом, для которого получена нуклеотидная последовательность, был AD169 (Chee et al, 1990). Все изученные на сегодня штаммы имеют мутации хотя бы в одном гене, которые приводят к разным последствиям: делеции, смещению рамки считывания или образованию стоп-кодонов (Davison et al, 2003b). Структура дикого типа ЦМВ, который содержит 165 генов, 12 из которых подвергаются сплайсингу, что нечасто встречается у представителей герпесвирусов.

Геном ЦМВ содержит 40 из 43 коровых генов, которые были унаследованы *Alpha*, *Beta* и *Gammaherpesviridae* от общего предка. Эти гены расположены в центральной части генома. ЦМВ, таким образом, обходится без генов, кодирующих тимидинкиназу, и малую субъединицу рибонуклеотидредуктазы, а также гомолог протеина, что связывается с ori_{Lyt} (точка начала репликации). Кроме того, 4 гена данного вируса гомологичны генам *Gammaherpesviridae* UL49: BFRF2 (*Lymphocryptovirus*), ORF66 (*Rhadinovirus*), UL79 (BVLF1 и ORF18), UL87 (BcRF1 и ORF24) а также UL92 (BDLF4 и ORF31). Эти гены, вероятно, возникли в линии вирусов, разделившейся на *Gamma*- и *Betaherpesviridae*, отделившись ранее от *Alphaherpesviridae*. Существует также гипотеза, что *Alphaherpesviridae* возникли в результате удаления ряда генов, которые были присущи общему предку всех семейств.

Геном содержит также 27 специфичных для ЦМВ генов, причем последовательность около 22 генов консервативна. К наиболее вариабельным можно отнести ген UL146, кодирующий СХС-хемокин, участвующий в вирусной диссеминации (Murphy, & Shenk, 2008).

Важным отличием ЦМВ является его пантропность. Для репликации вирус может использовать фибробласты, эндотелиальные и эпителиальные клетки, моноциты и макрофаги, гладкомышечные клетки, клетки стромы, нейроны,

нейтрофилы и гепатоциты (Sinzger, & Jahn, 1996). Возможное объяснение такого широкого спектра пермиссивных клеток это присутствие во всех типах клеток универсального рецептора, с которым вирусные гликопротеины взаимодействуют. Другое объяснение говорит о наличии широкого спектра белков, интегрированных в вирусный суперкапсид и способные взаимодействовать с рецепторами различных классов клеток. Промежуточный вариант, при котором вирус связывается и с рецептором, который экспрессируется почти всеми клетками, и со специфичными рецепторами конкретной клетки, тоже возможен.

Вход вирусной частицы в клетку происходит в пять этапов: (1) Взаимодействие со специфичными рецепторами клеточной поверхности (2) Слияние суперкапсида с клеточной мембраной и выход нуклеокапсида в цитоплазму, либо напрямую (фибробласты), либо посредством эндоцитоза (эндотелиальные клетки) (3) Перемещение нуклеокапсида по элементам цитоскелета к ядру (4) Взаимодействие нуклеокапсида с ядерными порами (5) Проникновение генома вируса в ядро (см. рисунок 3).

Белки текумента после проникновения в цитозоль не следуют за нуклеокапсидом, а локализуются там, где осуществляют свои функции: подавление иммунного ответа на уровне клетки, поддержание цикла репликации и другие (Tandon, & Mocarski, 2012).

Считается, что одним из основных клеточных компонентов, участвующих в проникновении ЦМВ, является протеогликан клеточной поверхности – гепаран-сульфат (Boyle, & Compton, 1998). Исследование на клеточных культурах выявили критическую роль данного рецептора в начале процесса инфицирования. После связывания происходит запуск каскада реакций, ведущих к проникновению и усилению связи с другими клеточными рецепторами.

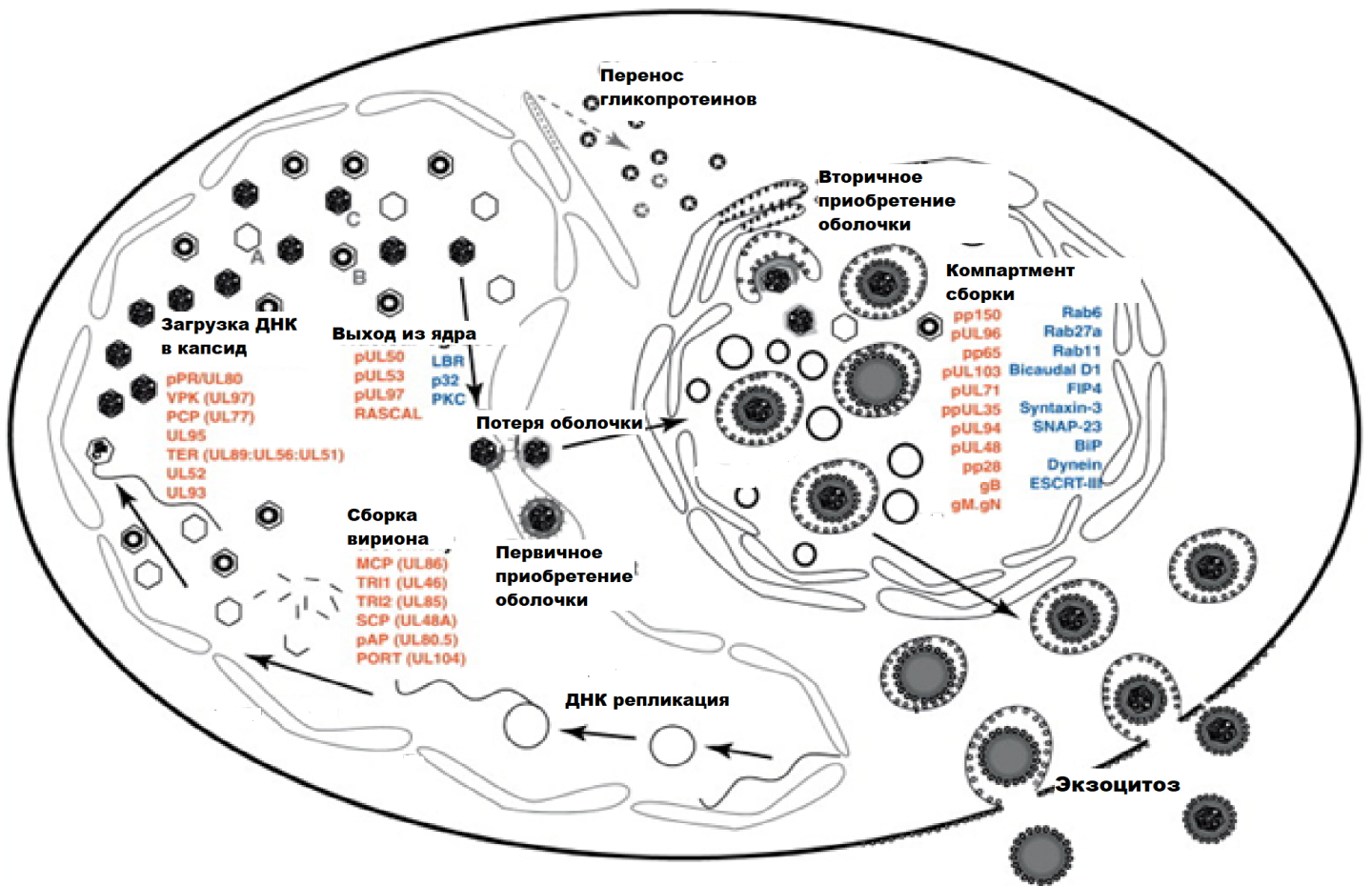


Рисунок 3. Общая схема репликации ЦМВ по Tandon (2012) (пояснения в тексте). Красным цветом обозначены участвующие в процессе вирусные белки, синим-клеточные белки.

Первичное связывание вируса и клетки происходит при взаимодействии вирусных гликопротеинов gB и gM с гепаран-сульфатом и не требует дополнительных рецептор-узнающих молекул. Последующие события происходят благодаря действию вирусных гликопротеинов gB, gH, gL, которые

консервативны для ЦМВ. Тримеры gB и гетеротримеры gH:gL, взаимодействуя с клеточными рецепторами, завершают этап прикрепления и запускают процесс слияния мембран вместе с выходом нуклеокапсида и тегумента в цитоплазму.

В первую очередь, проникновение вируса запускает каскад сигналов, приводящих к увеличению размера (цитомегалии). Кроме того, наблюдается появление ядерных и клеточных включений, характерных для более поздних этапов инфекции (Albrecht et al, 1980). Инфекция сопровождается двумя последовательными волнами морфологических изменений. Первая волна, происходящая спустя несколько часов после инфекции, является ответом на непосредственное проникновение вируса. Вторая проходит на пике транскрипционной и трансляционной активности, примерно через 24 часа после проникновения.

После проникновения генома в ядро вирусные гены начинают экспрессироваться в определённом порядке. Первыми выступают преддранние гены (IE) или α -гены, за ними идут ранние (E) или β -гены, последними идут поздние гены (L) или γ -гены. Преддранние гены начинают экспрессироваться незамедлительно после проникновения вирусной ДНК в ядро и не требуют действия других вирусных генов. Ранние гены, в основном, кодируют белки необходимые для репликации ДНК и подавления иммунных реакций клетки, в то время как поздние гены отвечают за синтез структурных вирусных белков. Данная схема экспрессии называется каскадом экспрессии вирусных генов. Продукты преддранних (IE) генов перестраивают клеточные процессы максимально оптимально для начала и поддержания экспрессии вирусных генов, причем инициация экспрессии зависит от клеточного цикла и связана с действием белка клеточного апоптоза p53.

Экспрессия ранних генов определяется двумя факторами: для её начала требуется *de novo* синтез белков, кодируемых предранними генами, и клеточных белков необходимых для транскрипции. Кинетика транскрипции ранних генов разнообразна: некоторые начинают экспрессироваться уже через 8 часов после инфекции, в то время как другие неактивны вплоть до начала репликации вирусной ДНК. Третья кинетическая группа характеризуется тем, что продукт транскрипции не аккумулируется в клетке на ранних этапах инфекции, а проявляет себя уже на поздних этапах.

Можно выделить две группы продуктов, получаемых в ходе экспрессии ранних генов. Первая группа, это белки, участвующие непосредственно в синтезе вирусной ДНК, упаковке и выходе. Ко второй группе относятся те, что изменяют клеточное пространство таким образом, чтобы оно благоприятствовало дальнейшей инфекции. К генам, связанным с репликацией относят: pUL54 (вирусная ДНК-полимераза), ppUL44-polymerase processivity factor, ppUL57-SSB белок и три белка, составляющих комплекс хеликаза\праймаза: pUL70, pUL102, и pUL105 (Smith, & Pari, 1995).

В ходе подготовки к репликации ранние гены вируса запускают целый ряд сигнальных каскадов, которые в итоге приводят к амплификации клеточных генов, ответственных за синтез и пролиферацию ДНК.

После синтеза вирусной ДНК происходит разрезание молекулы ДНК на сегменты, соответствующие размеру генома, и упаковка в капсиды.

Продукты поздних генов контролируют сборку капсида, проникновение ДНК в капсид, созревание вириона и структуры под названием «плотное тельце», а также выход вируса из клетки. К тому времени как поздние гены начинают работать в полную мощность, в клетке наблюдаются заметные изменения: появляются крупные включения в ядре, в которых содержится реплицирующая

ДНК и капсиды, и включения в цитоплазме, в которых происходит обретение нуклеокапсидом суперкапсида и выход из клетки (Tandon, & Mocarski, 2012).

Общие закономерности сборки капсида характерны для всех герпесвирусов и, вероятно, появились в ходе эволюции аппарата, используемого бактериофагами, в том числе T4. Процесс начинается с упаковки вирусной ДНК в пустой капсид и заканчивается получением суперкапсида и выходом из клетки путём транспортировки в везикулах. Три типа капсидов образуются в ядре клетки: (а) капсиды, в которых отсутствуют и каркасные белки, и ДНК; (б) капсиды с каркасными белками, но без ДНК; (в) полноценные нуклеокапсиды, в ходе созревания которых вирусная ДНК заменила белки каркаса. Белки тегумента начинают добавляться уже в ядре и их количество постепенно продолжает нарастать по ходу развития вириона.

Процесс сборки начинается со взаимодействия моноцитарного хемотаксического протеина (MCP) и протеазного комплекса (pPR-AP:pAP) в цитоплазме, после чего они транспортируются в ядро. И pPR-AP, продукт гена UL80, и предшественник белка сборки (assembly protein precursor, pAP), продукт гена UL80.5, транскрибируются независимо. Комплекс MCP:pPR-AP:pAP, оказавшись внутри ядра, проходит через протеолитическую обработку, что приводит к формированию частиц прокапсида и высвобождению PR, pAP, и AP, которые необходимы для образования капсида и правильной укладки ДНК. Протеазная активность приводит к высвобождению MCP, инактивации протеазы и замене белков каркаса вирусной ДНК (Tandon, & Mocarski, 2012).

Один из двенадцати пентонов в структуре сформированного капсида состоит полностью из продукта гена UL104, самособирающегося додекамера. Данный пентон формирует канал, через который вирусная ДНК попадает в капсид. Загрузка ДНК происходит благодаря комплексу терминазы

(TER1:TER2), взаимодействующему с продуктом гена UL104. Молекулярная машина терминазы узнает свободные концы и загружает в капсид молекулу ДНК, длина которой соответствует полному геному ЦМВ. Точное определение длины молекулы возможно благодаря рас-элементам, находящимся в начале и в конце генома.

Регуляция всех изложенных процессов осуществляется фосфорилированием с помощью киназы, кодируемой вирусным геном UL97, и поддерживается рядом клеточных киназ, которые зависят от клеточного цикла. После формирования нуклеокапсида происходит присоединение самого проксимального к капсиду белка тегумента (pp150;UL32), который стабилизирует его при выходе в цитоплазму из ядра (Goldberg et al, 2011).

Созревание вириона включает двухстадийное обретение суперкапсида и выход готовой вирусной частицы из клетки. Транслокация нуклеокапсида из ядра в цитоплазму осуществляется комплексом NEC (herpesvirus-conserved nuclear egress complex). Комплекс располагается на внутренней стороне ядерной мембраны, и здесь осуществляется отделение полноценных капсидов, содержащих ДНК, от капсидов типа (а) и (б), скорее всего, за счет взаимодействия белков тегумента, которые ассоциированы с С-капсидами. NEC состоит из белка NEC1 и NEC2, которые взаимодействуют с ядерной ламиной. Комплекс способствует выходу нуклеокапсида, рекрутируя ядерные и вирусные протеинкиназы, чья активность ведёт к разрушению сети ламины и позволяет вирусной частице выйти из ядра. После обретения первичной оболочки и её последующей потери, нуклеокапсиды, связанные с белками pp53/NEC2, доставляются в цитоплазму. По достижении цитоплазмы нуклеокапсид направляется к местам, где происходит обретение конечной оболочки. Все важнейшие шаги в созревании вируса, которые происходят в цитоплазме, от тегументации до высвобождения частицы, связаны со специализированным

местом, называемом компартментом сборки (assembly compartment, AC). Последний представляет собой видоизмененный секреторный аппарат клетки, который нарушает морфологию клеточного ядра, что приводит к приобретению последним почкообразной формы, а клетка принимает характерный при ЦМВИ вид «совиного глаза». Комплекс включает в себя цис- и транс-аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, компоненты системы ERGIC (Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment) и эндосомы. Все перечисленные компоненты формируют компактный цилиндрический массив элементов, прилегающий к ядру. Внутри данного комплекса происходит присоединение элементов тегумента, которые, вместе с комплексом гликопротеинов gM:gN способствуют приобретению суперкапсида (Alwine, 2012).

После приобретения оболочки вирионы выбрасываются за пределы клетки с помощью экзоцитоза. Используя экзоцитозный аппарат клетки, вирионы и плотные тельца (лишенные капсида скопления белков тегумента) транспортируются во внеклеточное пространство, однако ЦМВ является первым герпесвирусом, для которого существуют доказательства вирусного контроля данного процесса, ppUL103 влияет на перенос везикул после приобретения вирусной оболочки (Ahlqvist, & Mocarski, 2011).

Подобно другим герпесвирусам, после первичного инфицирования ЦМВ сохраняется в латентном состоянии в организме на протяжении всей жизни. Первое доказательство латентности ЦМВ было показано на лейкоцитах, которые продолжали переносить ЦМВ, несмотря на отсутствие у вируса вирулентности. Вирус устанавливает латентную форму в определённых клетках хозяина, избегая элиминации иммунной системой. До разработки метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) точное местонахождение вируса в латентной фазе оставалось неизвестным. С помощью ПЦР вирусная ДНК была найдена в моноцитах

периферической крови (CD3-негативных) здоровых серопозитивных индивидуумов (Taylor-Wiedeman et al, 1994).

ДНК ЦМВ при латентной инфекции также была найдена в CD34+ клетках-предшественницах в костном мозге (Mendelson et al, 1996). Данные клетки в дальнейшем дифференцируются в моноциты, В-клетки, Т-клетки и полиморфоядерные лейкоциты. Однако на сегодняшний день нет данных литературы, подтверждающих наличие ДНК ЦМВ в В- и Т-лимфоцитах, а так же в полиморфоядерных лейкоцитах в латентный период инфекции. Вирусная ДНК была найдена, тем не менее, в CD14+ моноцитах, мегакариоцитах и дендритных клетках.

Вирусный геном, изолированный из моноцитов крови, мигрирует в виде кольцевой плазмиды в агарозном геле, что указывает на эписомальную форму вирусной ДНК в латентной фазе (Bolovan-Fritts et al, 1999). Отсутствие экспрессии предранних генов свидетельствует о том, что вирус находится в истинно латентной фазе в организме (Taylor-Wiedeman et al, 1994).

Так же есть данные, согласно которым репликация вируса не происходит в моноцитах, и становится возможной только, когда те дифференцируются в клетки макрофагов (Sinclair, & Sissons, 2006).

Активная ЦМВИ может представлять серьезную опасность в первую очередь для беременных, причем на любом сроке гестации. Инфицирование плода в первый триместр беременности наиболее опасно, особенно в случае первичной инфекции у матери. Такая ситуация наблюдается у 1% - 4% серонегативных матерей в течение беременности, передача вируса плоду при этом происходит в 30% - 40% случаев (Vorpana et al, 2001). Реактивация ЦМВИ наблюдается у 10-30% серопозитивных матерей, но трансмиссия плоду происходит лишь у 1-3% из них. При внутриутробной инфекции у 5-10% детей

развиваются необратимые повреждения центральной нервной системы, включающие потерю слуха, зрения, энцефалит, поражение крупных ганглиев, что в свою очередь может привести к тяжелым неврологическим повреждениям, детскому церебральному параличу и даже летальному исходу (Vorrapa et al, 2001). ЦМВ также приобретается перинатально, что в 30% случаев протекает со смазанной клинической картиной вирусного поражения (Ljugman, 2010). В настоящее время доказано, что другим вариантом первичной ЦМВИ у иммунокомпетентных лиц может быть инфекционный мононуклеоз, имеющий благоприятное течение. Крайне редко первичная ЦМВИ может проявляться в виде острого респираторного синдрома (Britt, 2008).

Снижение иммунной активности организма может привести к реактивации эндогенного вируса из латентного состояния. До разработки высокоактивной антиретровирусной терапии активная ЦМВИ наблюдалась у 25% ВИЧ-инфицированных и зачастую была одной из главных причин смерти в исходе СПИДа. В целом, прогрессия ВИЧ-инфекции совпадает с прогрессией ЦМВИ (Gerna et al, 1998).

На сегодняшний день не существует эффективной вакцины против вируса, а его устойчивость к действию противовирусных препаратов, приобретаемая в ходе мутационного процесса и медикаментозного лечения, делает эту инфекцию опасной для индивидуумов с ослабленным иммунитетом: пациентов со СПИДом, больных с онкологическими и онкогематологическими заболеваниями, реципиентов органов и тканей. Среди последних особую группу составляют реципиенты алло-ГСК. У данной категории пациентов ЦМВ может вызывать тяжелые трудно-купируемые инфекционные осложнения, представляющие угрозу не только для результатов трансплантации и, как следствие, лечения основного гематологического заболевания, но и для жизни больного. Трансплантация от серопозитивных доноров серонегативным реципиентам

приводит к первичному инфицированию, что в свою очередь вызывает осложнения в посттрансплантационном периоде вплоть до отторжения трансплантата. У серопозитивных больных после трансплантации тоже может наблюдаться ЦМВИ, как реактивация и/или повторное инфицирование. Опасность представляет трансплантация не только от серопозитивного донора серонегативному реципиенту, но и обратная ситуация, так как в этом случае реципиент на какое-то время остается без собственных CD8⁺ Т-клеток памяти, которые заменяются донорскими клетками, наивными в отношении вируса. Таким образом, пациент оказывается в ситуации, в которой организму нечего противопоставить вирусу, при его реактивации, что клинически напоминают ситуацию первичной инфекции.

2.2.2 Характеристика ВГЧ-6

Вирус герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6) был открыт в 1986 году при исследовании пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями. На сегодняшний день известно, что ВГЧ-6 не является отдельным вирусным видом, а представляет собой группу схожих вирусных видов, которые носят названия - ВГЧ-6А и ВГЧ-6В. В целом, геномы этих видов совпадают практически на 90% (Isegawa et al., 1999). Подтипы ВГЧ-6 отличаются своим клеточным тропизмом, взаимодействием с сигнальными путями иммунной системы, эпидемиологией.

Структура вириона ВГЧ-6 схожа со структурой вириона ЦМВ: вирион представлен икосаэдрическим капсидом, внутри которого заключена двуцепочечная молекула ДНК (до 170 тысяч пар нуклеотидов), текументом, который окружает капсид, и липидной оболочкой, которая содержит вирусные белки и гликопротеины (Biberfeld et al, 1987).

Геном ВГЧ-6 состоит из центрального уникального сегмента, обозначаемого буквой U, и двух сегментов прямых повторов (DRR и DRL), которые находятся справа и слева от уникального сегмента (Domínduez et al, 1999). Участки DR состоят из 25-29 пар нуклеотидов, представляющих собой уникальную последовательность, консервативной последовательности *pac1* и *pac2*, набора гетерогенных длинных концевых повторов (TLR), кодирующей последовательности и последовательности нуклеотидов, напоминающую теломерные последовательности млекопитающих. Данные сегменты считаются необходимыми для хромосомной интеграции вируса и установления латентности (Wallaschek et al, 2016).

Открытые рамки считывания кодирующих последовательностей находятся на обоих цепочках генома и не перекрывают друг друга. Центральная часть генома консервативна и имеет сходство у всех герпесвирусных подсемейств (коровые гены). Кластер генов, специфичный для бетагерпесвирусов находится слева от этого участка, а гены, специфичные для ВГЧ-6, фланкируют его. Консервативные домены ВГЧ-6 генетически схожи с ЦМВ, хотя есть ряд генов ЦМВ, которые не были обнаружены у ВГЧ-6 (Domínduez et al, 1999). При этом, ВГЧ-6А имеет около девяти открытых рамок считывания, которые не обнаруживаются у ВГЧ-6В, в свою очередь у ВГЧ-6В также обнаружили около 9 рамок считывания, которые не характерны для генома ВГЧ-6А (Domínduez et al, 1999).

Проникновение в клетку ВГЧ-6 осуществляется через взаимодействие с клеточным рецептором CD46, который находится на поверхности всех человеческих ядросодержащих клеток. При этом ключевую роль в процессе слияния вирусной и клеточной мембраны играют вирусные гликопротеины gH и gB. Вирус проникает внутрь посредством эндоцитоза, после чего происходит

удаление липидного слоя и транспорт вирусного капсида в ядро клетки (Seya et al, 1990).

Герпесвирусные гены, в целом, подразделяют на латентные и литические, при этом литические гены в свою очередь делятся на непосредственно ранние (IE), ранние (E) и поздние (L). IE гены отвечают за регуляцию экспрессии генов, E гены кодируют ферменты необходимые для репликации ДНК, а L гены кодируют белки вириона.

ВГЧ-6 кодирует несколько ферментов, которые играют важную роль в синтезе нуклеиновых кислот: рибонуклеотидредуктазу, фосфотрансферазу, щелочную экзонуклеазу и урацил-ДНК-гликозилазу. Для ВГЧ-6 литическая репликация ДНК инициируется в сегменте oriLyt, который подобен oriLyt альфа-герпесвирусов и заметно отличается от сегментов ЦМВ и гаммагерпесвирусов. Сегменты инициации репликации расположены между 5' концом U41 и 3' концом U42. Минимальная длина сегмента oriLyt имеет около 300 пар нуклеотидов, а полностью функциональный oriLyt насчитывает около 800 пар нуклеотидов. Важный элемент вблизи центра сегмента oriLyt состоит из двух палиндромных последовательностей, OBP-1 и OBP-2, которые распознаются белком OBP (Ori Binding Protein). Белок закодирован в гене U73. Основные сайты связывания для OBP это последовательность длиной около 30 п.н., содержащие большое количество АТ (Dewhurst et al, 1994). Репликация происходит по принципу катящегося кольца, в результате образуются замкнутые в кольцо молекулы, которые пакуются в капсид. Сигнал к упаковке находится между DRR и DRL.

Созревание и выход вириона, включают себя процесс последовательного обретения мембраны, удаления мембраны и повторного обретения липидного слоя. Все это происходит по мере перемещения вириона из ядра к поверхности

клетки. Репликация ДНК и сборка капсидов происходят в ядре; капсиды, содержащие ДНК, появляются примерно через 3 дня после заражения. Примечательно, что в цитоплазме наблюдается большое количество неразвитых, тегументированных нуклеокапсидов. В некоторых исследованиях в цитоплазме наблюдались частицы, не имеющие ни тегумента, ни оболочки (Torrìsi et al, 1999). Поскольку вирусные гликопротеины gB, gH-gL и gQ1 отсутствуют в плазматической мембране клеток, выход вируса путем почкования непосредственно из цитоплазмы маловероятен. Эти гликопротеины сосредоточены в цитоплазматических структурах, известных как кольцевые пластинки, которые могут соответствовать внутриклеточным мембранам, связанным с эндосомами, где происходит окончательное обволакивание вирионов. Вирионы ВГЧ-6 накапливаются в мультивезикулярных телах (MVB), которые содержат многочисленные зрелые вирионы и небольшие экзосомальные везикулы. Мембраны MVB могут сливаться с плазматической мембраной, что приводит к высвобождению зрелых вирионов и экзосомных частиц. Кроме экзоцитоза, зрелые вирионы могут высвобождаться путем лизиса клеток (Torrìsi et al, 1999).

Розеолювирусная инфекция, вызываемая ВГЧ-6, оказывает глубокое воздействие на клетки хозяина, включая нарушение организации хроматина, прекращение синтеза клеточной ДНК в инфицированной клетке, генерализованную стимуляцию синтеза белка в клетке-хозяине и др (Braun et al, 1997).

ВГЧ-6 широко распространен в популяции, причем горизонтальное заражение обычно происходит в младенческом возрасте. ДНК ВГЧ-6 обнаруживается в слюне, мазках из горла и слизистой носа детей и их матерей, а также других здоровых взрослых, что позволяет предположить горизонтальное заражение через слюну и носовые выделения. ВГЧ-6 также обнаруживается в

женских половых путях и на шейке матки беременных женщин на поздних стадиях беременности, что указывает на возможность передачи инфекции новорожденным во время вагинальных родов. В то время как большинство случаев заражения ВГЧ-6 происходит горизонтальным путем, примерно 1% населения приобретает геном ВГЧ-6 через клетки зародышевой линии, которые наследуют от родителей (Daibata et al, 1999). Известно, что вирус способен пожизненно персистировать в организме преимущественно посредством интеграции в теломерные участки хромосом клеток хозяина, причем интеграция не сайтоспецифична. Таким образом, она может произойти в половых клетках. При слиянии гамет, содержащих интегрированный вирус, образуется организм, где каждая клетка несёт копию генома вируса. У таких индивидуумов интактный геном ВГЧ-6 интегрирован в теломеру хромосомы, причем копии этой хромосомы присутствуют в каждой клетке организма. Хотя ДНК ВГЧ-6 была обнаружена у плодов и в крови новорожденных, что указывает на возможность внутриутробной передачи, большинство случаев врожденной передачи ВГЧ-6 можно отнести либо к генетической передаче хромосомно интегрированного ВГЧ-6 от родителей, либо к трансплацентарной передаче от матерей с хромосомно интегрированной ВГЧ-6 (Hall et al, 2008).

Исследования показали, что первичная инфекция ВГЧ-6 может приводить к детской розеоле или протекать без клинических симптомов, сыпи или лихорадки. Было также показано, что детская розеола вызывается ВГЧ-6В, и степень репликации вируса у младенцев пропорциональна тяжести заболевания (Ward et al, 2005). В большинстве случаев детская розеола также ассоциируется с другими симптомами, включая диарею, кашель, увеличение лимфатических узлов и выпячивание родничков. У взрослых первичная инфекция может приводить к мононуклеозо-подобному и гемофагоцитарному синдрому.

Поскольку вирусы герпеса сохраняются в организме хозяев после первичной инфекции и могут реактивироваться, они являются потенциально опасными патогенами для людей с ослабленным иммунитетом. Также возможны экзогенные реинфекции другими вирусными штаммами, которые могут способствовать развитию заболевания у таких пациентов (Agut, 2011).

2.3 β -герпесвирусы у реципиентов гемопоэтических стволовых клеток

Реципиенты органов или ГСК представляют собой особую группу пациентов, которые уязвимы для инфекционных осложнений, и активная репликация герпесвирусов может быть их причиной (Ramanan, & Razonable, 2013). Трансплантацию ГСК, как правило, применяют в качестве этапа лечения у пациентов с опухолевыми заболеваниями системы крови – гемобластозами. В качестве трансплантата могут выступать как собственные кроветворные клетки, собранные у пациента на фоне ремиссии заболевания (аутологичные), так и аллогенные, источником которых является донор, частично или полностью совместимый по человеческому лейкоцитарному антигену I (HLA-I). В первом случае не требуется дополнительная иммуносупрессия, а потому не возникает иммунологической несовместимости, что способствует более быстрому выходу из аплазии после проведения процедуры. В случае применения аллогенных клеток возможно множество негативных последствий, таких как первичное неприживание, несостоятельность либо гипофункция трансплантата, отсроченное восстановление кроветворения, а в более позднем периоде развитие реакции «РТПХ», возникновение многочисленных инфекционных осложнений в посттрансплантационном периоде. На вероятность развития этих осложнений влияет множество факторов, среди которых можно выделить степень совместимости донора и реципиента, интенсивность режима кондиционирования перед трансплантацией и развитие инфекционных инфекций, в том числе вызванных β -герпесвирусами (Панкратова et al, 2010). Важным аспектом при аллогенной трансплантации также является серостатус пациента и донора. Наибольшую опасность в этом случае представляет трансплантация ГСК серопозитивного донора серонегативному реципиенту (Kotton, 2010). Если в качестве метода заготовки трансплантата была выбрана эксфузия костного мозга, то в этом случае вероятность первичного инфицирования вирусом реципиента

близка к 100%, поскольку в этом случае высока вероятность попадания в трансплантат латентно инфицированных клеток. Вероятность появления симптомов вирусного поражения при отсутствии своевременной противовирусной терапии в этом случае повышается до 80%. Такая ситуация описана как для ЦМВ (Takenaka et al, 2015), так и для ВГЧ-6 (Rossi et al, 2001). Развитие инфекций, вызванных ЦМВ и ВГЧ-6, увеличивает тяжесть течения основного гематологического заболевания, а у реципиентов ГСК повышает вероятность как развития острой и хронической «РТПХ», так и отторжения трансплантата и летального исхода.

Частота реактивации латентного ЦМВ у реципиентов стволовых клеток в различных работах колеблется в достаточно широких пределах (от 9% до 50%). Так, в исследовании, опубликованном английскими авторами (Zaia, 2002), она составляла 17%. В отечественном исследовании реактивация ЦМВ после трансплантации алло-ГСК (алло-ТГСК) была выявлена в 51,8% случаев (Балашов et al, 2010). Несмотря на то, что частота подобных осложнений за последние 30 лет заметно сократилась, противовирусная профилактика для реципиентов после процедуры зачастую не проводится из-за токсичности противовирусных препаратов, способных в том числе угнетать костномозговое кроветворение и влиять на процесс приживления кроветворной ткани. Причиной уменьшения частоты развития ЦМВИ стали: проводимая противовирусная профилактика, разработка и внедрение новых противовирусных препаратов, не допускающих приобретение ЦМВ при трансфузиях компонентов донорской крови и алло-ТГСК.

Наиболее частые проявления ЦМВИ после алло-ТГСК – это поражение дыхательных путей, поражение желудочно-кишечного тракта, или провоцирование «РТПХ» (Ljungman et al, 2002). Лабораторная диагностика в

этом случае заключается в выявлении вируса методом ПЦР в материале, полученном из локуса поражения (очага инфекции).

В исследовании, проведенном в одном из Шведских госпиталей на протяжении 20 лет, частота развития ЦМВИ у пациентов после алло-ТГСК составила 8.6% (Ljungman, 1996). У 21 из 33 больных с ЦМВИ наблюдалась пневмония, у 3 была и пневмония, и поражение ЖКТ, у 6 наблюдались только поражение ЖКТ. Кроме того, наблюдались случаи гепатита, энцефалита и ретинита. Широкое использование противовирусной терапии перед трансплантацией привело к снижению частоты развития ЦМВИ в течение первых 3-4 месяцев после ТГСК до 5%(Ljungman, 1996). Однако на данный момент, ЦМВИ, развивающаяся в том числе и через 100 и более дней после трансплантации, остается проблемой для реципиентов алло-ГСК. Кроме поражения органов дыхания и слизистых оболочек ЖКТ, активная ЦМВИ влияет на приживание трансплантата и восстановление показателей кроветворения. Кроме серостатуса донора и реципиента на течение ЦМВИ может оказывать влияние гистосовместимость донора и реципиента: трансплантация от донора, частично совместимого по HLA, оказывается более рискованной, чем трансплантация от полностью совместимого. Интересным является то, что в случае необходимости выполнения трансплантации пациенту, у которого есть идентичный близнец, трансплантация алло-ГСК от последнего не показана, несмотря на полную совместимость по HLA, поскольку в этом случае не проявляется эффект «трансплантат-против-опухоли». Кондиционирование, предшествующее трансплантации, оказывает сильное влияние на Т-клетки реципиента, а после проведения трансплантации, иммуносупрессия, вызывающая лимфопению или нарушение функции Т-клеток, может спровоцировать развитие ЦМВИ.

Для ВГЧ-6 у пациентов после ТГСК на сегодняшний день доступно меньше данных, но известно, что бессимптомная реактивация ВГЧ-6 является распространенным явлением после трансплантации аллогенного костного мозга или гемопоэтических клеток. На фоне ВГЧ-6 инфекции были зафиксированы случаи угнетения костного мозга, энцефалита, снижения нейрокогнитивных способностей, гастродуоденита, колита, пневмонита, сыпи и острой «РТПХ» (Braun et al., 1997; De Bolle et al., 2004; Hentrich et al., 2005; Volin et al., 2004). ДНК ВГЧ-6 чаще обнаруживалась у реципиентов алло-ГСК с тяжелой «РТПХ» (92%), чем у реципиентов с умеренной (55%) или легкой «РТПХ» (22%), что позволяет предположить, что наличие ДНК ВГЧ-6 может быть фактором, определяющим тяжесть течения «РТПХ». Инфекция, ассоциированная с ВГЧ-6, также проявлялась пневмонией, причем инфицированными клетками были в основном внутриальвеолярные макрофаги и лимфоциты. При этом мониторинг и использование противовирусных препаратов для профилактики заболеваний, ассоциированных с ВГЧ-6, не содержатся в официальных практических руководствах (Ljungman, 2010).

Суммируя вышесказанное, можно заключить, что наиболее благоприятной считается трансплантация ГСК от серонегативного донора серонегативному реципиенту. Однако, учитывая крайне широкую распространённость этих вирусов, вероятность подбора такой пары «донор – реципиент» часто не представляется возможной. Поэтому проведение профилактики и, в случае возникновения клинических проявлений инфекции, лечения препаратами прямого противовирусного действия является крайне актуальным.

2.4 Противовирусные препараты прямого действия

Профилактическая противовирусная терапия проводится в раннем посттрансплантационном периоде в момент наибольшей клеточной деплеции, когда вероятность возникновения любых инфекционных осложнений, в том числе и вирусной природы, максимальна. В более отдалённом периоде такая терапия чаще не проводится, поскольку используемые для этого препараты обладают достаточно выраженным токсическим и миелосупрессивным действием. Однако вероятность развития инфекции в этот период времени сохраняется, несмотря на восстановление показателей периферической крови на фоне донорского кроветворения (Britt, 2008).

Подход к противовирусной терапии включает в себя применение лекарственных средств, напрямую или опосредованно подавляющих вирусную репродукцию, чаще всего путём блокировки процесса репликации вирусного генома. На сегодняшний день известно несколько препаратов, способных подавить размножение β -герпесвирусов. В первую очередь это вещества, влияющие на работу вирусной ДНК-полимеразы (Cameron et al, 2009), такие как ацикловир, ганцикловир и их пролекарства с большей биодоступностью – валацикловир и валганцикловир. Данные лекарственные средства являются аналогами нуклеозидов (Chen et al, 2019) и зарегистрированы для клинического применения на территории Российской Федерации. Как в России, так и во всём мире лечение инфекций, вызываемых ЦМВ, ВГЧ-6, проводится в большинстве случаев с помощью ганцикловира и валганцикловира (Орлова et al, 2021). По сравнению с α -герпесвирусами (вирусами простого герпеса 1-го и 2-го типа и вирусом Варицелла–Зостер), средство вирусных ферментов β -герпесвирусов (ЦМВ, ВГЧ-6 и ВГЧ-7) к ацикловиру и другим тимидинкиназозависимыми противогерпетическим агентам выражено в меньшей степени (Орлова et al, 2021), на чём и основан подход к их терапии. Согласно существующим рекомендациям,

профилактика ЦМВ-инфекции производится ганцикловиром и валганцикловиром, в то время как рекомендаций для проведения профилактики инфекций, вызванных ВГЧ-6, на данный момент не существует (Ward et al, 2019).

Кроме этих лекарств, в мировой практике также используют и другие препараты: нуклеотидный аналог – цидофовир (зарегистрирован в РФ в 2022 году) и аналог пирофосфата – фоскарнет (Krishna et al, 2019). Их использование в первую очередь обусловлено возможным развитием устойчивости у ЦМВ и ВГЧ-6 к действию ганцикловира и валганцикловира (Manichanh et al, 2001). Эти препараты не получили столь широкого распространения, как ганцикловир, что связано с явно выраженной нефротоксичностью. На территории РФ эти препараты не зарегистрированы для клинического применения. В мировой практике цидофовир и фоскарнет рекомендовано назначать при тяжёлых жизнеугрожающих герпесвирусных инфекциях, а также в случаях формирования доказанной устойчивости к ацикловиру и ганцикловиру (Ward, & Clark, 2009).

Ограниченное число препаратов с прямым противовирусным действием определяет необходимость поиска лекарств с альтернативным принципом действия. Среди них следует отметить летермовир и марибавир. Механизм их действия отличается от ранее упомянутых препаратов, поскольку их непосредственной мишенью не является вирусная ДНК-полимераза. Летермовир блокирует действие продукта гена ЦМВ *UL56*, который представляет собой субъединицу терминального комплекса (Goldner et al, 2011). Данный комплекс ферментов участвует в упаковке ДНК вируса в капсид и обеспечивает правильное формирование новых вирионов (Neuber et al, 2017). Терминальный комплекс не имеет аналогов в человеческой клетке, что теоретически делает применение этого препарата безопасным (Piret, & Voivin, 2019). Летермовир был одобрен для профилактики ЦМВ-инфекции в некоторых странах (Lin et al, 2019). Тем не менее

масштабных исследований эффективности этого препарата не проводилось, что не позволяет выработать единые стандарты для его использования.

Марибавир в данный момент одобрен для использования только в США (Avery et al, 2021). Действие препарата основано на подавлении активности продукта гена ЦМВ *UL97* (Williams et al, 2003), который представляет собой фосфотрансферазу, фосфорилирующую человеческие и вирусные белки, участвующие в жизненном цикле вируса. Показано, что марибавир конкурирует с аденозинтрифосфатом (АТФ) за сайты связывания в вирусной фосфотрансферазе (Shannon-Lowe, & Emery, 2010). Данная вирусная киназа также принимает участие в перемещении вновь синтезированных незрелых вирусных частиц в цитоплазму через ламину ядра (Sharma et al, 2015). В экспериментах *in vitro* в культуре клеток марибавир подавляет репликацию ЦМВ примерно в 10 раз эффективнее, чем ганцикловир.

Поскольку марибавир подавляет активность вирусной фосфотрансферазы, его действие снижает эффективность ганцикловира, который фосфорилируется преимущественно этим ферментом (Chou et al, 2007). Таким образом, одновременное назначение этих препаратов противопоказано. Совместное действие марибавира с другими препаратами (фоскарнет, цидофовир, летермовир), напротив, оказывает синергический эффект (O'Brien et al, 2018).

Ещё одним важным свойством марибавира является отсутствие у него выраженного миелосупрессивного действия, что повышает привлекательность применения этого препарата у реципиентов ГСК. Принципы действия описанных препаратов подробно представлены на рисунке 4. Мишенью марибавира выступает вирусная фосфотрансфераза, мишенью ганцикловира, цидофовира и фоскарнета – вирусная ДНК-полимераза, а мишенью летермовира является вирусный терминальный комплекс.

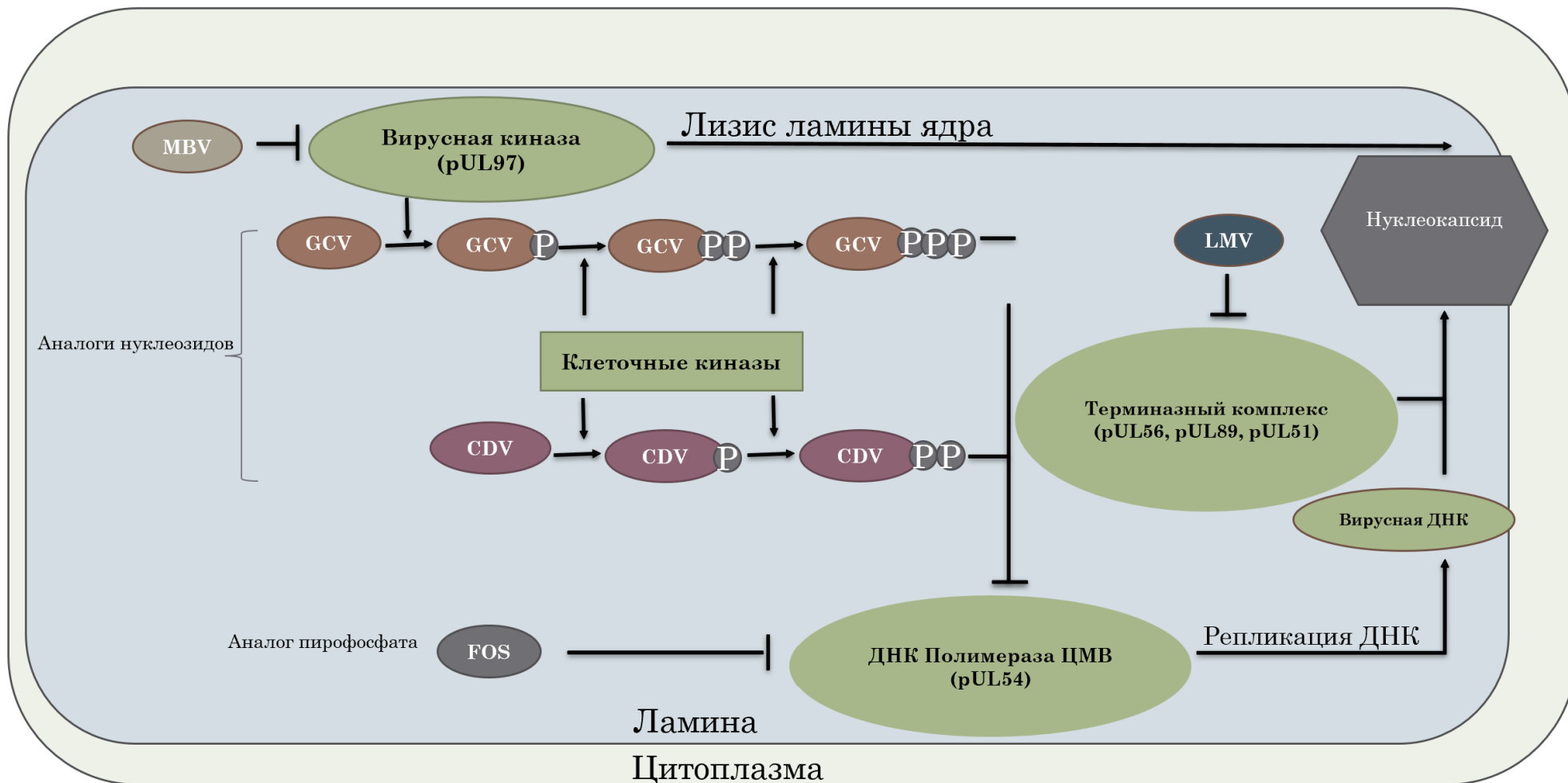


Рисунок 3. Принципы действия противовирусных препаратов на жизненный цикл ЦМВ: MBV – марибавир, GCV – ганцикловир, CDV – цидофовир, FOS – фоскарнет, LMV – летермовир.

2.5 Устойчивость к противовирусным препаратам

Когда речь идёт об устойчивости вирусов герпетической группы к действию противовирусных препаратов, это обусловлено способностью того или иного лекарственного средства эффективно ингибировать вирусную репликацию. При этом подавление процесса репродукции вируса может быть реализовано через различные механизмы: нарушение синтеза вирусной ДНК *de novo*, нарушение транспорта и созревания компонентов вирионов внутри клетки и прочее. Учитывая, что лекарственные противогерпетические препараты первого ряда, используемые в настоящее время, являются ингибиторами ДНК-полимеразы, то наиболее часто на практике наблюдается устойчивость, связанная с мутациями, приводящими к неспособности того или иного препарата ингибировать репликацию вирусного генома. Устойчивость ЦМВ к действию ганцикловира обусловлена возникновением мутаций в гене вирусной фосфотрансферазы ЦМВ *UL97*, которая отвечает за первый этап фосфорилирования ганцикловира, что обеспечивает вирусную специфичность самого препарата (Giaever, 1992). В основном мутации, потенциально приводящие к устойчивости процесса вирусной репликации к действию препаратов, локализуются в кодонах 460, 520 и 590–607 этого гена, причём относительно небольшое число мутаций отвечает за более чем 80% случаев доказанной устойчивости к ганцикловиру (Kleiboeker et al, 2014). Предполагается, что мутационный процесс в данной локализации приводит к изменению специфичности вирусной фосфотрансферазы к субстрату (ганцикловиру), при этом не затрагивая другие её функции. Были обнаружены мутации и в других кодонах, но они встречаются крайне редко, хоть и приводят к эффективной устойчивости к ганцикловиру.

В многочисленных клинических исследованиях у пациентов с ЦМВ-ретинитом показана достаточно высокая частота возникновения устойчивых

вирусных штаммов и описана частота их появления (Chou, 2001). Одно из таких исследований, проведённое в институте Джонса Хопкинса, показало, что устойчивые штаммы выявляются в 3% случаев при первичном обследовании пациентов с ЦМВ-поражениями органов зрения. Среди пациентов, находящихся под наблюдением один год и получающих противовирусную терапию ганцикловиром, частота выявления таких штаммов достигает уже 27%(Chou, 2001). Схожие данные были опубликованы для фоскарнета и цидофовира(Jabs et al, 1998). Показано, что у 12% ЦМВ-положительных реципиентов алло-ГСК обнаружен мутантный вирусный штамм(Yu et al, 2021).

В литературе одним из основных факторов риска появления мутаций в ДНК ЦМВ называют длительное использование противовирусных препаратов в субоптимальных дозах(Chou, 2015). К дополнительным факторам риска развития лекарственной устойчивости ЦМВ относят: трансплантация после Т-клеточной деплеции(Eckle et al, 2002), иммуносупрессия и возникновение «РТПХ» (Wolf et al, 1998), которые способствуют развитию оппортунистических инфекций. В этих случаях у пациентов нарушено нормальное функционирование иммунных клеток, что может способствовать неконтролируемой репликации вируса и отбору наиболее приспособленного мутантного штамма, а это, в свою очередь, ведёт к возникновению лекарственной устойчивости вируса.

Ганцикловир и цидофовир, (после внутриклеточных превращений с образованием ганцикловиртрифосфата и цидофовирдифосфата) а также фоскарнет ингибируют вирусную ДНК-полимеразу, которая является продуктом вирусного гена *UL54*. Мутации в гене *UL54* могут приводить к нечувствительности работы полимеразы к этим веществам. Нередко наблюдается феномен кросс-резистентности к двум и даже одновременно к трём препаратам(Chou, 2020). Данные литературы свидетельствуют, что мутации в гене *UL54* обычно возникают после длительного применения противовирусных

средств на фоне уже возникших мутаций в гене *UL97* (Chou et al, 2007), что способствует отбору вирусных штаммов, нечувствительных к препаратам. Кодоны, в которых возникают мутации, группируются главным образом в экзонуклеазном (кодоны 395–545) и каталитическом (кодоны 809–987) доменах фермента. Мутации, приводящие к устойчивости к фоскарнету (аналогу пирофосфата), располагаются в каталитических сайтах вирусной ДНК-полимеразы (Campos et al, 2017). У большинства штаммов с кросс-резистентностью к ганцикловиру и цидофовиру мутации идентифицируются в экзонуклеазном домене вирусной ДНК-полимеразы. Механизм устойчивости в данном случае объясняется изменением в структуре экзонуклеазного домена полимеразы. Это изменение приводит к снижению чувствительности этого домена к аналогу нуклеозида (ганцикловиртрифосфата или цидофовирдифосфата). При включении в растущую цепь ДНК такого аналога (положение $N + 1$) нарушается структура остова ДНК в позициях $N + 1$ и $N + 2$. Вирусная ДНК-полимераза стремится устранить напряжение, но её экзонуклеазный домен недостаточно эффективно удаляет встроенный аналог, что ведёт к остановке всего процесса (Chen et al, 2014). У штаммов, несущих мутации в экзонуклеазном домене, это напряжение не приводит к остановке синтеза растущей цепи ДНК.

Клинические исследования эффективности препарата марибавир показали, что мутации, возникающие в *UL97*, могут приводить к устойчивости и к этому препарату (Chou, & Marousek, 2008). Были зафиксированы случаи кросс-резистентности, когда мутации приводили к единовременной невосприимчивости процесса вирусной репликации и к ганцикловиру, и к марибавиру (Houldcroft et al, 2016). Практически все описанные на данный момент мутации, ассоциированные с устойчивостью к марибавиру, находятся недалеко от кодонов 353, 397, 409 и 411, рядом с АТФ-связывающим доменом

фермента. Причём участки гена, в которых локализуются эти мутации, не пересекаются с теми участками, где возникают мутации, обеспечивающие вирусу устойчивость к действию ганцикловира.

В работах, посвящённых изучению устойчивости к летермовиру, показано, что регионы возникновения мутаций, отвечающих за устойчивость к действию данного препарата, в основном локализуются в гене *UL56*. Описаны мутации резистентности, локализующиеся также в генах *UL89* и *UL51*. Все эти гены кодируют ферменты, входящие в комплекс вирусной терминазы. Кодоны, в которых возникают мутации, в случае *UL56* ограничиваются положениями 25 и 229–369. Возникающие мутации мало влияют на жизненный цикл вируса, при этом появление сразу трёх мутаций ведёт к заметному повышению устойчивости к летермовиру (Chou et al, 2018). Число описанных мутаций в генах *UL89* и *UL51* мало, как и степень их изученности. В *UL89* известно несколько мутаций, расположенных в кодонах 320–360; для *UL51* описана мутация в кодоне 91 (Piret, & Voivin, 2019). Сведения о мутациях, описанных в литературе, показаны в табл. 2 (Chou, 2020).

Таблица 2. Мутации устойчивости к противовирусным препарат и их локализация в геноме цитомегаловируса

Препарат	Локализация (ген)	Мутации, ассоциированные с лекарственной резистентностью
Ганцикловир	<i>UL97</i>	K359E, K359Q, L405P, M460V, M460I , C518Y, H520Q , A591V, C592G , A594V , A594T, A594E, A594G, A594P, A594S, L595S , L595F , L595W, E596del E596G, E596Y, K599T, L600del, L600del2, C603W , C603R, C603S, C607Y, C607F, I610T, A613V

Марибавир	<i>UL97</i>	L337M, V353A, L397R, H411L, T409M , H411Y , H411N
Ганцикловир + марибавир	<i>UL97</i>	F342Y, F342S, V356G, D456N, V466G, C480F, C480R P521L, Y617del
Ганцикловир + цидофовир	<i>UL54</i>	D301N, E303D, E303G, N408D, N408K, N408S, N410K, F412V, F412C, F412L, F412S, D413E, D413A, D413N, D413Y, K488R, K500N, L501I, T503I, A505V, K513E, K513N, K513R, D515Y, L516R, L516P, L516W, I521T, P522A, P522S, C524del, V526L, C539G, C539R, A543P, L545S, L545W, I726T, I726V, A987G
Ганцикловир	<i>UL54</i>	P829S, L957F
Цидофовир	<i>UL54</i>	D542E, K805Q
Фоскарнет	<i>UL54</i>	N495K, T552N, S585A, F595I, T700A, V715A, V715M, E756D, E756Q, T838A, M844T, V946L
Фоскарнет + ганцикловир	<i>UL54</i>	S290R, Q578L, D588N, E756K, L776M, L776, V787A, V787L, L802M, A809V, T821I, M844V, E951D
Фоскарнет + ганцикловир + цидофовир	<i>UL54</i>	Q578H, L773V, V787E, V812L, T813S, A834P, G841A G841S, D981del2
Летермовир	<i>UL56</i>	C25F, S229F, V231A, V231L, N232Y, V236A, V236L, V236M, L241P, T244K, L254F, L257I, L257F, K258E, F261L, F261C, Y321C, C325F, C325Y, C325R, C325W,

		L328V, M329T, A365S, N368D, R369M, R369G, R369S, R369T, N320H, D344E, T350M, M359I, P91S
--	--	--

Примечание. Жирным шрифтом выделены наиболее частые мутации согласно *Chou (2020)*.

У реципиентов органов и тканей активная ВГЧ-6 инфекция клинически может проявляться довольно разнообразно: лихорадкой и (или) сыпью, реже поражением ЦНС в виде энцефалита, поражением печени, органов дыхания, угнетением костномозгового кроветворения, поражением ЖКТ (Bolle De et al, 2005). Также описаны случаи синергизма ВГЧ-6 и ЦМВ. Согласно данным некоторых авторов, активная репликация ВГЧ-6 может увеличивать скорость реактивации ЦМВ и усугублять тяжесть течения ЦМВ-болезни путём прямого взаимодействия и (или) модуляции иммунного ответа хозяина (Humar et al, 2000). Хотя исследования *in vitro* подтверждают потенциальную устойчивость ВГЧ-6 к противовирусным препаратам, в нескольких случаях описано появление лекарственно-устойчивых изолятов в клинической практике. Например, устойчивый к ганцикловиру ВГЧ-6 мутант был выделен от пациента со СПИДом, который получал длительную терапию по поводу активной ЦМВ-инфекции (Manichanh et al, 2001). Также описан случай обнаружения резистентного к ганцикловиру изолята ВГЧ-6 у реципиента ГСК. Пациент скончался, а выделенный изолят оказался в 100 раз устойчивее к ганцикловиру, чем дикий тип, что, в свою очередь, могло повлиять на исход (Isegawa et al, 2009). К. Baldwin и соавт. описали случай развития энцефалита у реципиента печени, вызванного изолятом ВГЧ-6, устойчивым к ганцикловиру, но чувствительным к фоскарнету (Baldwin, 2011). Тем не менее, в отличие от ЦМВ, крупных исследований, позволяющих составить картину о частоте встречаемости устойчивых мутантов ВГЧ-6, особенно у реципиентов ГСК, не проводилось. В связи с этим сбор

данных, способных показать частоту и степень опасности возникновения мутаций в геноме ВГЧ-6, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, представляется крайне актуальной задачей.

На данный момент объём информации касательно устойчивости ВГЧ-6 к действию противовирусных препаратов намного меньше, чем для ЦМВ. Однако мутации, приводящие к такой резистентности, уже описаны. Нечувствительность репликации ВГЧ-6 к ганцикловиру часто опосредована мутациями в вирусных генах *U69* и (или) *U38*, являющихся аналогами генов ЦМВ *UL97* и *UL54* и кодирующих соответственно вирусную фосфотрансферазу и вирусную полимеразу. Например, мутация M318V, расположенная в поддомене VIb фосфотрансферазы *U69*, была идентифицирована в клиническом образце крови, взятом от ВИЧ-положительного пациента с ВГЧ-6 инфекцией (Manichanh et al, 2001). Две (L201I и L213I) и три (P462S, A565V и A975V) мутации были обнаружены соответственно в генах *U69* и *U38* в геноме вируса, выделенного от реципиента ГСК (Isegawa et al, 2009). Мутация Y479H в гене *U69* была обнаружена в изоляте, выделённом из крови реципиента трансплантата почки, получавшего ганцикловир для подавления активной ЦМВ-инфекции (Bounaadja et al, 2013). Некоторые мутации у ВГЧ-6 были открыты путём экстраполяции аналогичных мутаций в геноме ЦМВ ввиду сходства генов, например, в гене *U38* – мутации A591D, C592G, L595S, A606D и C607Y (Safronetz et al, 2003). Предполагается, что мутации в генах ВГЧ-6 приводят к тем же последствиям, что и в случае с ЦМВ: изменение сайтов связывания с лекарственными аналогами нуклеозидов и пирофосфатом, что в конечном счёте приводит к снижению эффективности препаратов. Известные мутации устойчивости ВГЧ-6 представлены в табл. 3.

Таблица 3. Мутации устойчивости и их локализация в геноме вируса герпеса человека типа б.

Препарат	Локализация (ген)	Мутации, ассоциированные с лекарственной резистентностью
Ганцикловир	<i>U69</i>	L201I, L213I, M318V, A447D, C448G, L450S, A462D, P462S, C463Y
Фоскарнет	<i>U38</i>	F292S, T435R, H507Y, C525S
Ганцикловир	<i>U38</i>	A565V, A591D, C592G, L595S, A606D, C607Y, A961V, A975V
Ганцикловир + фоскарнет + цидофовир	<i>U38</i>	R798I

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что возникновение мутаций в геномах β -герпесвирусов, снижающих эффективность противовирусной терапии, не является редким событием в клинической практике. При этом если для ЦМВ был собран довольно большой массив данных, позволяющий составить представление о частоте возникновения и локализации мутаций устойчивости, то для ВГЧ-6 данные ограничены. Эта проблематика представляется крайне актуальной, учитывая распространённость ВГЧ-6 и наличие описанных случаев активной инфекции, вызванной устойчивым вирусом, закончившихся летальным исходом. Актуальным вопросом, наряду с поиском, идентификацией и описанием мутаций устойчивости для обозначенных вирусов, является разработка методик быстрой и эффективной диагностики подобных мутаций (например, на основе ПЦР). Применение подобных методик может способствовать оперативному получению дополнительной информации для корректировки и повышения эффективности противовирусной терапии.

2.6 Методы выявления мутаций в ДНК герпесвирусов

Устойчивость вирусов к действию противовирусных препаратов может быть выявлена разными способами, в частности с помощью генотипических методов или определения концентрации противовирусного агента, необходимого для ингибирования репликации вируса *in vitro*. Для определения устойчивости репликации ЦМВ к действию противовирусных препаратов в культуре клеток можно использовать такие методы, как флуоресцентная микроскопия (Agut et al, 1989) и проточная цитофлуориметрия (Manichanh et al, 2000), обнаружение ДНК путём гибридизации (Clercq et al, 2001).

Поиск мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, целесообразно проводить при повышении (или сохранении на высоком уровне) у пациента вирусной нагрузки на фоне длительной неэффективной противовирусной терапии (Kotton et al, 2018). Для поиска мутаций могут применяться различные лабораторные методы, среди которых наибольшее значение имеют ПЦР и секвенирование. Для эффективного проведения последнего рекомендуется использовать образцы вирусной ДНК, выделенной из клинического материала инфицированного пациента с высокой вирусной нагрузкой – более 1000 копий геном-эквивалента (ГЭ) или международных единиц (МЕ) на 1 мл образца, если он представлен биологической жидкостью, либо на 10^5 ядросодержащих клеток, если образец представлен цельной кровью или другим клеточным материалом. При исследовании образцов с более низкой концентрацией вирусной ДНК существует риск неудачи при проведении секвенирования (Sahoo et al, 2013). Процесс репликации и, соответственно, мутагенеза ЦМВ может происходить не только в крови, но и в других тканях организма благодаря пантропности вируса. Это, в свою очередь, означает, что формирование лекарственной устойчивости в разных локусах может отличаться (Andrei et al, 2019). Литературные данные об

исследованиях, посвящённых чувствительности вирусных штаммов, изолированных из различных локусов, к действию противовирусных препаратов, в настоящее время отсутствуют. Однако это не исключает возможности такой селекции штаммов внутри одного организма.

Наиболее часто используемым методом идентификации мутаций в геноме ЦМВ является секвенирование по Сэнгеру, при котором проводят секвенирование амплифицированных участков генов *UL97* или *UL54*, где потенциально могут возникать мутации устойчивости (Lurain et al, 2001) (Castor et al, 2007). На первом этапе с помощью ПЦР клонируют участок гена, где расположено превалирующее число ранее описанных мутаций. Чаще всего исследуются кодоны *UL97* 440–670, *UL54* 300–1000 и *UL56* 229–369. После этого проводится непосредственно секвенирование полученных продуктов амплификации. Преимущество этого метода заключается в возможности его стандартизации. Основным его недостатком является относительно высокая стоимость и невозможность идентификации минорных мутантных субпопуляций вируса, составляющих менее 20% от общего пула. Несмотря на то, что метод достаточно давно известен, его применение для идентификации мутаций резистентности не входит в стандарты обследования при диагностике ЦМВ инфекции. В связи с этим разработка и развитие других методов для идентификации мутаций является крайне актуальной задачей.

На данный момент разработаны методы поиска мутаций с помощью секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing – NGS), но высокая стоимость и отсутствие стандартизации пока не позволяют говорить о возможности повсеместного использования данного метода.

Другими методами выявления мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью, являются полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

(ПДРФ-анализ) и ПЦР в реальном времени в различном исполнении (Göhring et al, 2015). Оба метода позволяют выявлять известные мутации, приводящие к устойчивости к действию противовирусных препаратов.

ПДРФ-анализ основан на узнавании эндонуклеазами рестрикции определенных сайтов в продуктах ПЦР гена *UL97* и их разрезании. Мутации могут приводить к увеличению количества этих сайтов рестрикции или наоборот к их потере. Анализ размеров образующихся фрагментов путём геле-электрофореза позволяет обнаружить мутантные штаммы. Преимущество метода заключается в скорости, экономичности и простоте исполнения. Однако ПДРФ-анализ способен помочь в определении лишь известных мутаций в этом гене, которые приводят к увеличению или потере сайтов рестрикции, но не в детекции новых или произвольных мутаций (Voivin et al, 1996). Кроме того, он неприменим для гена *UL54*, для которого не обнаружены сайты рестрикции (Göhring et al, 2015).

Методы, основанные на ПЦР в реальном времени, для выявления специфических мутаций в основном прибегают к анализу кривой плавления продуктов амплификации, и построены на основе использования гибридационных проб (Göhring et al., 2008), (Zhou et al, 1999), или молекулярных биконов (Yeо et al, 2005). Преимущество таких подходов заключается в скорости и возможности стандартизировать метод. К недостаткам можно отнести относительно сложный дизайн праймеров и возможность детекции лишь уже известных мутаций.

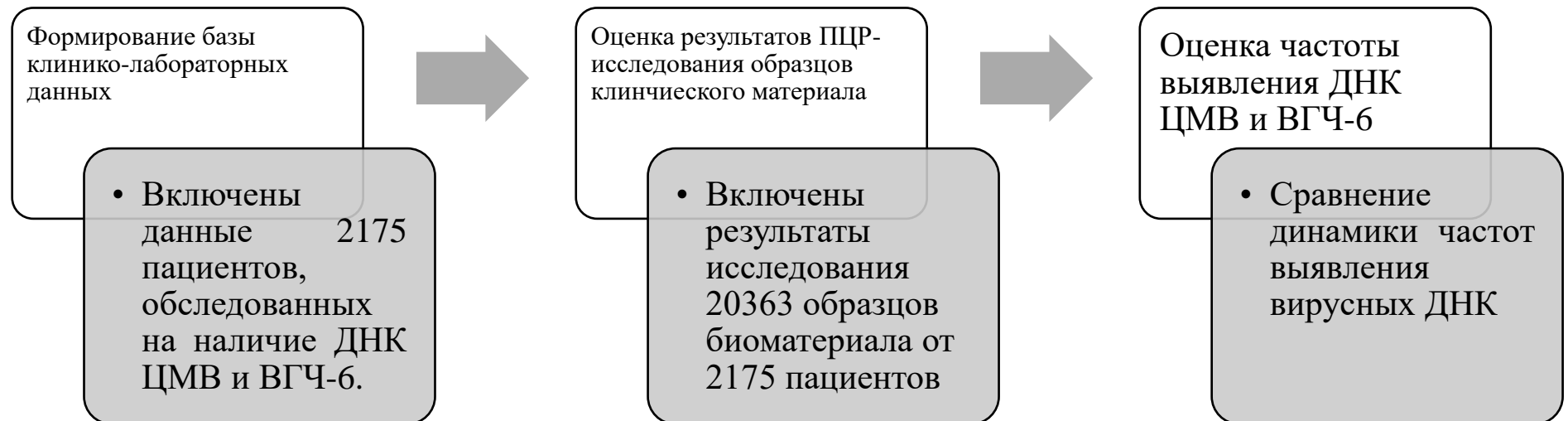
Для определения заранее известных мутаций можно АС-ПЦР. Этот метод используется для анализа однонуклеотидных полиморфизмов. Классический вариант АС-ПЦР предполагает использование двух аллель-специфичных праймеров, в которых 3'-концевой нуклеотид комплементарен полиморфному

нуклеотиду, и общего третьего праймера (Wu et al, 1989). Данный метод представляется довольно простым и незатратным для идентификации наиболее часто выявляемых мутаций герпесвирусов и имеющих клиническое значение и был выбран, наряду с более информативным секвенированием по Сэнгеру, для проведения исследований в рамках данной диссертационной работы.

3. Материалы и методы.

3.1 Дизайн исследования

Этап 1 направлен на определение частоты выявления ЦМВ и ВГЧ-6 среди пациентов с гемобластозами для подтверждения актуальности проводимого исследования.



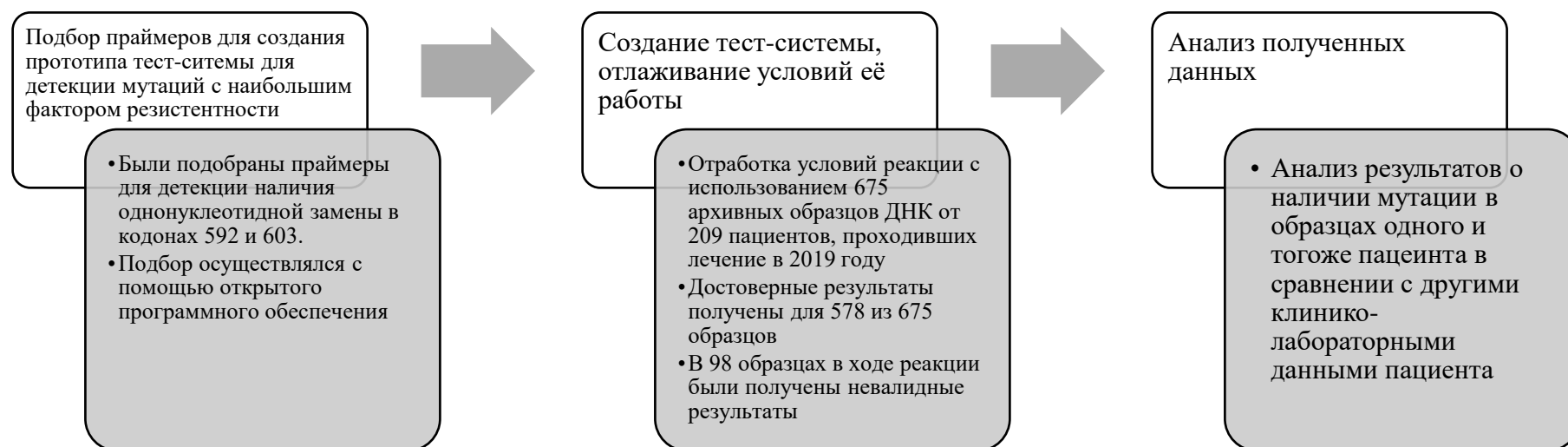
Этап 2 направлен на поиск мутаций устойчивости к действию противовирусных препаратов в генах *UL97* ЦМВ и *U69* ВГЧ-6 вирусов, выделенных из материала реципиентов алло-ГСК.



Этап 3 направлен на оценку динамики возникновения мутаций в геноме вирусов, выделенных из образцов реципиентов алло-ГСК.



Этап 4 направлен на создание и оценку эффективности тест-системы на основе АС-ПЦР для поиска конкретных мутаций устойчивости к действию противовирусных препаратов в геноме ЦМВ.



3.2 Материалы

В рамках исследования на разных этапах были использованы результаты вирусологических исследований. Всего в исследование включены результаты исследования 20 363 образцов биоматериала от 2 172 пациентов (муж/жен 1075/1097, от 17 до 91 года, медиана возраста – 46 лет).

В качестве клинического материала были исследованы образцы периферической крови, аспирата костного мозга, мочи, кала, бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛ), ликвора и биоптатов различных органов и тканей.

Для определения спектра мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, у реципиентов алло-ГСК были исследованы клиничко-лабораторные данные 438 реципиентов алло-ГСК. Среди 438 пациентов, получивших такой вид лечения, проведён поиск лиц, у которых наблюдались признаки резистентной формы ЦМВИ и ВГЧ-6 инфекции. В качестве таких признаков выбраны:

- Более 1 месяца положительных результатов определения ДНК ЦМВ (при условии регулярного мониторинга не меньше 1 раза в 2 недели)
- Вирусная нагрузка в образцах более 10 000 копий ГЭ
- Раннее выявление ДНК ЦМВ (до 30 дней) после ТГСК
- Неэффективность противовирусной терапии

Таким образом, в дальнейшее исследование были включены результаты тестирования образцов 90 реципиентов алло-ГСК, для которых выполнялось два и более вышеуказанных условий (49 реципиентов с признаками резистентной ЦМВИ и 41 с признаками резистентной ВГЧ-6-инфекции). Для поиска мутаций

применяли метод секвенирования по Сенгеру по стандартной методике согласно инструкции производителя (Thermo Fisher Scientific), для чего были получены ампликоны, содержащие вирусные нуклеотидные последовательности, соответствующие участкам генов *UL97* ЦМВ и *U69* ВГЧ-6, методом ПЦР.

После изучения карты белка, закодированного в гене *UL97*, подбирали праймеры, позволяющие секвенировать фрагмент с 551 по 708 кодоны, где наблюдается наибольшая плотность мутаций, приводящих к возникновению резистентности (рисунок 4). Для гена *U69* был выбран аналогичный регион.

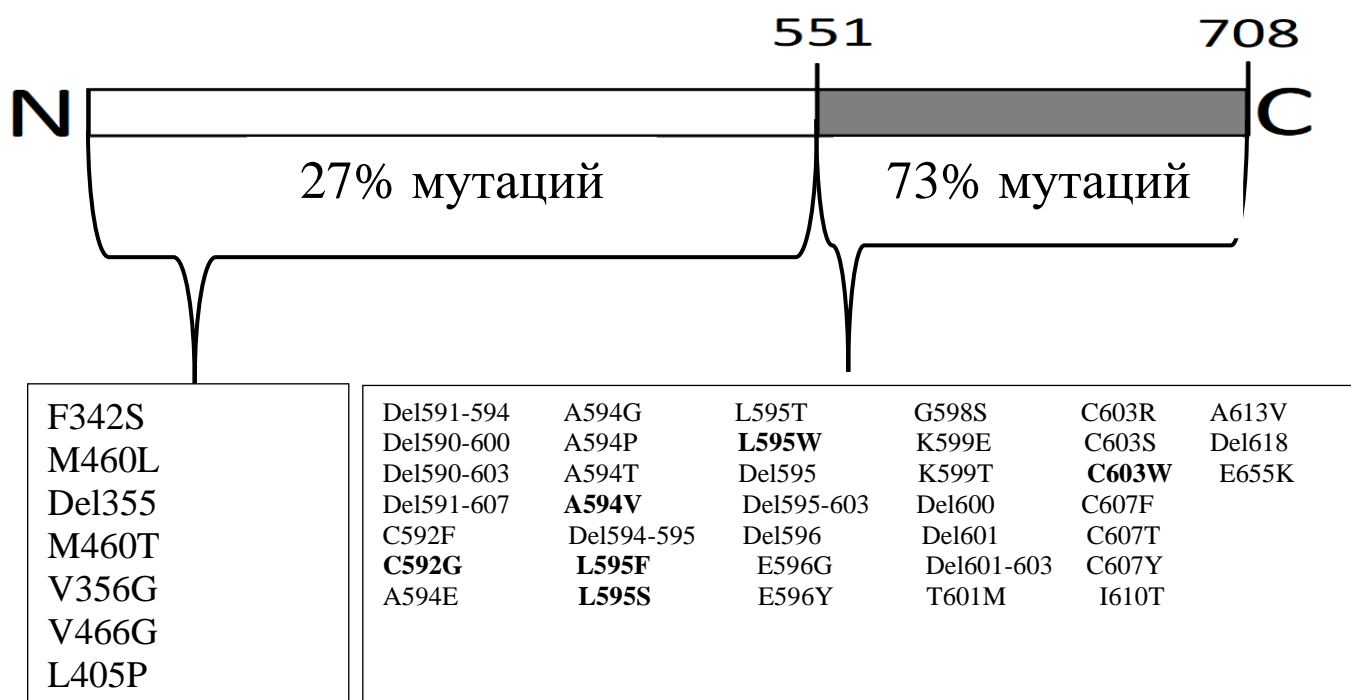


Рисунок 4 Схема белка *UL97*. Темной полосой с позиции 551 до 708 отмечен участок, выбранный для секвенирования в рамках исследования. Под схемой гена перечислены ранее описанные мутации, ассоциированные с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, жирным шрифтом отмечены наиболее часто встречающиеся.

Далее, для реципиентов, у которых обнаружены мутации, проводили исследования архивных образцов с целью изучению динамики выявления

мутации, определения времени возникновения мутантного штамма и распределения мутантных штаммов в различных локусах. Так у 4 из 49 реципиентов алло-ГСК с признаками резистентной ЦМВИ были обнаружены мутации устойчивости. Из 41 реципиента алло-ГСК с признаками резистентной ВГЧ-6-инфекции ни у одного не были выявлены мутации устойчивости к действию ганцикловира в изучаемом участке гена.

Для 3 из 4 пациентов с мутациями устойчивости к действию ганцикловира в гене *UL97* ЦМВ были доступны архивные образцы ДНК ЦМВ, собранные в период за 6 месяцев до момента обнаружения мутации и 6 месяцев после. Всего включено в исследование 73 архивных образца, для которых проведена детекция вирусной ДНК. Характеристика пациентов представлена в таблице 6.

Далее в ходе исследования была разработана тест-система на основе аллель-специфической ПЦР (АС-ПЦР) для детекции мутаций в кодонах 603 и 592 гена *UL97* ЦМВ, с помощью которой протестировано 675 архивных образцов клинического материала, содержащего ДНК ЦМВ, собранных от 209 пациентов.

3.3 Методы

Преаналитическая обработка периферической крови и аспирата костного мозга

На преаналитическом этапе из образцов периферической крови и аспирата костного мозга выделяли моноклеарную фракцию клеток путём селективного лизиса эритроцитов. Материал, стабилизированный двузамещенной солью ЭДТА, в объёме 250 мкл помещали в эппендорф, после чего проводили лизис эритроцитов с помощью набора «Гемолитик» ООО «ИнтерЛабСервис». После отмывки лейкоциты сразу же использовали для выделения тотальной ДНК.

Преаналитическая обработка другого клинический материал

Бронхоальвеолярная лаважная жидкость (БАЛ), моча и плевральная жидкость. Жидкость в объёме 10 мл помещали в сухую стерильную пробирку и центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин. После центрифугирования удаляли супернатант, оставляя 1 мл жидкости с осадком (при его наличии) и ресуспендировали. Аликвоту в 100 мкл полученной жидкости использовали для выделения ДНК.

Ликвор в объеме 1,5 мл помещали в эппендорф и центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин. После концентрирования убирали большую часть супернатанта, оставляя 100 мкл жидкости с осадком (при его наличии), которую использовали для выделения ДНК.

Биоптаты органов и тканей объёмом примерно 2-5 мм³ измельчали с помощью стерильных ножниц или скальпеля, после чего помещали в эппендорф, добавляли лизирующий раствор из набора «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» ООО «ИнтерЛабСервис», плотно закрывая крышку пробирки парафильмом и термостатировали при 65⁰С в течение 3 часов, перемешивая каждые 20-30 минут.

После термостатирования содержимое центрифугировали 10 минут при 13000 об/мин. Для выделения ДНК использовали 100 мкл надосадочной жидкости

Выделение ДНК из образцов клинического материала, прошедшего преаналитическую обработку

Выделение нуклеиновых кислот проводили из 100 мкл материала, прошедшего преаналитическую обработку, с помощью наборов реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» или «АмплиПрайм ДНК-сорб-В», согласно прилагаемым инструкциям (АмплиПрайм РИБО-преп,).

При использовании набора реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» растворяли клетки и вирусные частицы раствором для лизиса, который содержит хаотропный агент (гуанидин тиоцианат). Далее осаждали ДНК изопропанолом и экстрагировали в раствор согласно инструкции.

Выделение с помощью набора реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» основано на связывании молекул ДНК на частицах силики. Нуклеиновые кислоты, связанные с сорбентом, остаются в пробирке после центрифугирования, в то время как лизированные компоненты клеток и денатурированные белки удаляются вместе с надосадочной жидкостью. Чтобы отделить ДНК от сорбента добавляли раствор для элюции и центрифугировали, причем ДНК оставалась в растворе.

Амплификация ДНК ЦМВ и ВГЧ-6

Для определения наличия и концентрации ДНК ЦМВ использовали набор реагентов «АмплиСенс® CMV/EBV/HHV 6-FL» производства ООО «ИнтерЛабСервис». Амплификация определенного участка вирусной ДНК проводится с помощью специально подобранных праймеров, которые гибридизуются с вирусной ДНК, и служат затравкой для фермента Taq-

полимеразы, реплицирующей выбранный участок ДНК. Олигонуклеотидные зонды с флуоресцентной меткой, присутствующие в реакционной смеси, гибридизуются со специфичным участком ДНК и при удалении их полимеразой испускают световой сигнал, который регистрируется и измеряется в реальном времени.

Подготовка образцов к секвенированию генов *UL97* и *U69*

Для этапа работы, включающего определение мутаций, вызывающих устойчивость вируса, был выбран гены *UL97* ЦМВ и *U69* ВГЧ-6. Для получения нуклеотидной последовательности, были использованы праймеры, комплементарные его участкам генов, в которых сосредоточено большинство известных на данный момент мутаций (см. таблицу 4).

Таблица 4 *Праймеры, использованные для ПЦР и секвенирования при исследовании мутаций, вызывающих устойчивость к противовирусным препаратам. F AMP – прямой праймер, использовавшийся для амплификации; R AMP– обратный праймер, использовавшийся для амплификации; SEQ-праймер, использовавшийся для постановки секвенирования.*

Ген	Праймер	Последовательность (5'-3')
UL97	F AMP	tttgcacgttgcccgacgctat
UL97	R AMP	tatgctggtggtgcgccgaaag
UL97	SEQ	ggattacaacgagcgctg
U69	F AMP	cgtgttgccggattacagcttgt

U69	R AMP	actcggacgactgtagagacgca
U69	SEQ	ggatctgtgcgcccttgctca

Для получения ампликонов для секвенирования использовали модифицированную методику, описанную в литературе (Bela Saraiva de Campos, 2015). ПЦР проводили по следующей методике. Состав реакционной смеси: стерильная дистиллированная вода – 26 μ l, буфер Синтол – 5 μ l, смесь dNTP Синтол – 6 μ l, MgCl₂ Синтол – 5 μ l, Forward праймер (10 μ M) – 1 μ l, Reverse праймер (10 μ M) – 1 μ l, TAQ полимеразы Синтол – 1 μ l, образец ДНК – 5 μ l. Программа амплификации: Предварительный нагрев крышки (hot start ПЦР), 5 минут изначального плавления при 94°C после этого 45 следующих циклов: 98°C 20 сек, 60,4°C 20 сек, 72°C 1 мин, финальная элонгация при 72°C 5 минут.

Сбор амплификационных смесей раундов ПЦР проводили в разных комнатах, амплификацию проводили на приборе Bio-Rad PTC 200.

Препаративный электрофорез в 1.5 % агарозном геле

Образцы с были подвергнуты препаративному электрофорезу для последующего секвенирования. Для проведения электрофореза в 1.5% геле (Agarose Helicon + 5 частей трис-боратного буфера). гель окрашивали бромидом этидия фирмы Biogen (5 μ l/200 ml), в лунки добавляли ~25 μ l образца с добавлением окрашивающего агента для контроля внесения образца. Форез проводили в течение 40 минут при 160 вольт на приборе Owl Easy-cast horizontal gel electrophoresis system B1A e/ph Thermo.

Очистка ДНК из агарозного геля

ПЦР-продукты вырезали из агарозного геля под ультрафиолетовым излучением и очищали, используя набор Cleanup Standard (Евроген). Для

начала взвешивали вырезанный участок и добавляли 3 объема «Связывающего раствора S», но не менее 350 мкл. Инкубировали смесь при 50–55 °С до полного растворения геля, после чего переносили смесь в спин-колонку, установленную в центрифуге Eppendorf MiniSpin. Центрифугировали 30 с. при 10 000 об/мин и удаляли фильтрат. Добавляли 700 мкл «Промывочного раствора» в колонку, центрифугировали 30 с. и удаляли фильтрат, после чего еще центрифугировали 1 мин до полного удаления промывочного раствора. Помещали колонку в новую пробирку, добавляли 30 мкл «Элюирующего раствора» и центрифугировали 1 мин. Полученный продукт до проведения секвенирования хранили при -20⁰С.

Секвенирование

Состав реакционной смеси для секвенирования: 0,5 µl реагента BigDye 1.1 terminator (Thermo Fisher Scientific), 1,75 µl буфера для секвенирования (Thermo Fisher Scientific), 3,5 µl праймера и 4 µl образца ДНК. Доводили до 10 µl деионизованной водой.

Полученную смесь амплифицировали согласно следующей программе амплификации: Предварительный нагрев крышки (hot start ПЦР), 5 минут изначального плавления при 94°С после этого 25 следующих циклов: 96°С 10 сек, 50°С 5 сек, 60°С 4 мин.

Полученные амплификаты очищали с помощью набора BigDye XTerminator™ Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). Добавляли в каждую пробирку по 55 мкл смеси для очистки и вортиксировали на протяжении 16 минут.

После этого переносили смесь вместе с осадком в 96-ти луночную плашку для секвенирования, центрифугировали 5 минут при 13000 об/мин.

Далее проводили амплификацию и секвенирование по Сэнгеру в генетическом анализаторе «нанофор 05» (Синтол).

Анализ данных секвенирования

Полученную последовательность ДНК анализировали с помощью свободно распространяемого программного обеспечения: nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и Benchling (<https://benchling.com>). Поиск мутаций в полученных последовательностях гена *UL97* ЦМВ осуществлялся в программе MRA mutation resistance analyzer (<http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/mitarbeiter/HKestler/mra/app/index.php?plugin=form>). Данная программа сравнивает последовательности нуклеотидов с рефересной последовательностью *UL97* штамма Merlin (GenBank accession No: AY446894.2).

Для быстрого поиска мутаций в гене *U69* ВГЧ-6 была разработана программа аналогичная MRA, в которой использовали рефересную последовательность *U69* (GenBank accession No: NC000898.1).

Следующим этапом работы стала разработка методики на основе АС-ПЦР, для идентификации мутаций в кодонах 603 и 592 гена *UL97* ЦМВ.

Олигонуклеотидные праймеры подбирали с использованием online-программы Benchling R&D Cloud производства компании Benchling. В работе использовались праймеры, указанные в таблице 5, и набор реагентов для проведения ПЦР-РВ производства компании ООО «Синтол». АС-ПЦР проводили с помощью прибора RG-3000 (Corbett Research).

Таблица 5. Используемые в работе праймеры. WT - праймер, совпадающий с последовательностью дикого типа, MT - праймер, совпадающий с последовательностью мутанта, COM - Общий обратный праймер, PROBE – зонд.

Название	Последовательность* 5'→3'
592 F (WT)	TTTAAGCACGCCGGCGCGGCCT
592 F (MT)	TTTAAGCACGCCGGCGCGG CCG
592 R (COM)	GCGTAGCGTGTGCGACACCAGC
592 (PROBE)	(FAM)CGGCGCAAATGAGCTACGGCGCCT(RTQ1)
603 F (WT)	AACGGCAAGCTCACGCACTGC
603 F (MT)	AACGGCAAGCTCACGCACT GG
603 R (COM)	GCGTACGCGACACGAGGACATC
603 (PROBE)	(FAM)CAAATGAGCTACGGCGCCTGTCTCCT(RTQ-1)

* *Жирным шрифтом выделены дискриминирующие нуклеотиды.*

Реакционные смеси объемом 25 мкл содержали: 5 мкл ДНК, 0.1 мкл раствора праймеров с концентрацией 100 пкмоль/мкл зонда с концентрацией 5.0 ОЕ/мл, 0.1 мкл Таq ДНК-полимеразы с концентрацией 5 Е/мкл, 2.5 мкл смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов с концентрацией 2.5 мМ, 2.5 мкл 10-кратного ПЦР буфера, 2.5 мкл раствора MgCl₂ с концентрацией 25мМ. Для анализа наличия мутации в кодоне необходимо было использовать две пробирки: в одну добавляли прямой праймер, совпадающий с нуклеотидной последовательностью

участка гена вируса дикого типа, во вторую прямой праймер, совпадающий с нуклеотидной последовательностью участка гена мутантного штамма. В обе пробирки добавляли обратный праймер и зонд. Соответственно, для исследования одного образца на мутации в двух кодонах требовалось 4 пробирки.

Аmplификацию проводили по следующему протоколу: начальная денатурация (5 мин при 95 °С), далее 50 циклов: денатурация (20 с при 95 °С), отжиг праймеров (20 с при 62 °С) и детекция флуоресцентного сигнала, элонгация (10 с при 72 °С). Анализ результатов АС-ПЦР осуществляли с помощью управляющей программы амплификатора RG-3000.

В качестве контроля использовали образцы ДНК ЦМВ, в которых ранее было показано наличие мутаций методом секвенирования по Сэнгеру.

4. Результаты и обсуждение

4.1 Определение частоты выявления ЦМВ и ВГЧ-6 у пациентов с иммунодефицитами

Для определения актуальности выявления мутаций резистентности оценена динамика частоты выявления положительных результатов определения ДНК ЦМВ и ВГЧ-6 среди пациентов НМИЦ гематологии.

Были проанализированы результаты одномоментного ПЦР исследования на наличие ДНК ЦМВ и ВГЧ-6 в образцах клинического материала пациентов. Данные представлены в таблице 6.

Для оценки частоты выявления положительных результатов ПЦР-исследования была вычислена медиана количества положительных результатов на одного пациента. Показано, что с 2016 года удельная частота выявления ДНК ВГЧ-6 была достоверно выше, чем частота выявления ЦМВ. До 2019 года медиана количества положительных результатов на одного уникального пациента составляла 1 и 2 результата, но начиная с 2019 года этот показатель для ДНК ВГЧ-6 составил 6.

Представленные данные свидетельствуют о большей частоте выявления ВГЧ-6 среди пациентов, а, следовательно, об увеличении его вклада в структуру инфекционных осложнений, что в свою очередь говорит об актуальности исследования ВГЧ-6 наряду с ЦМВ, несмотря на то, что согласно данным литературы ЦМВ считается более актуальным вирусом для пациентов с гематологической патологией.

Таблица 6. Динамика количества положительных сигналов при проведении ПЦР исследований на наличие ДНК вируса ЦМВ и ВГЧ-6 за 2015-2019 гг.

			Положительные результаты определения ДНК ЦМВ		Положительные результаты определения ДНК ВГЧ-6		Есть ли достоверные различия в частоте выявления ЦМВ и ВГЧ-6?
Год	Число обследованных пациентов	Число исследованных образцов клинического материала	Частота выявления среди пациентов, %	Медиана количества положительных результатов ЦМВ на одного пациента	Частота выявления среди пациентов, %	Медиана количества положительных результатов ВГЧ-6 на одного пациента	Величина p
2015	607	1469	14,33	1	16,14	1	0,370
2016	951	3366	16,30	2	25,87	1	<0.001
2017	1065	4312	19,53	2	29,20	1	<0.001
2018	1187	4658	20,30	1	30,33	1	<0.001
2019	1331	6558	18,03	2	32,08	6	<0.001

4.2 Поиск мутаций устойчивости к действию противовирусных препаратов в гене *UL97* ЦМВ и *U69* ВГЧ-6

Второй этап исследования включал поиск мутаций устойчивости к действию противовирусных препаратов в гене вирусной фосфотрансферазы ЦМВ и ВГЧ-6, выделенных из образцов клинического материала реципиентов алло-ГСК. Были выбраны следующие критерии, указывающие на возможную резистентность инфекции, вызванной ЦМВ и/или ВГЧ-6:

- Более 1 месяца положительных результатов определения ДНК вируса (при условии регулярного мониторинга не меньше 1 раза в 2 недели)
- Вирусная нагрузка в образцах более 10 000 копий ГЭ
- Раннее выявление ДНК вируса (до 30 дней) после ТГСК
- Неэффективность противовирусной терапии

В анализ были включены клиничко-лабораторные данные 438 реципиентов алло-ГСК. У 90 из 438 пациентов выполнялись 2 и более критерия (у 49 пациентов для ЦМВ и у 41 – для ВГЧ-6). С целью поиска мутаций резистентности для каждого пациента был исследован образец с наибольшей вирусной нагрузкой.

Мутации в гене *UL97* ЦМВ были обнаружены у 4 из 49 (8,2%) пациентов с признаками резистентной инфекции. Их данные представлены в таблице 7

Таблица 7 Клиничко-лабораторная характеристика реципиентов алло-ГСК с признаками резистентной ЦМВИ, у которых выявлены мутации устойчивости к действию ганцикловира

Шифр пациента	Пол	Возраст, лет	Основной диагноз	Источник трансплантата	Выявленные мутации	Фактор резистентности, выявленной мутации
ПР	М	51	Лимфома из клеток	Неродственный полностью совместимый	C592G	2,9

			мантийной зоны	донор, стволовые кроветворные клетки		
ФС	Ж	64	Острый миелоидный лейкоз	Неродственный частично совместимый донор, стволовые кроветворные клетки	C592G\ C603W	2,9\8
ПД	Ж	37	Острый лимфобластн ый лейкоз	Неродственный полностью совместимый донор, стволовые кроветворные клетки	C607F	1,9
ГС	Ж	43	Миелодиспла стический синдром	Неродственный несовместимый донор, стволовые кроветворные клетки	del600	1,9

Была оценена вирусная нагрузка и продолжительность выявления ДНК ЦМВ у пациентов в зависимости от детекции мутации резистентности к ганцикловиру. Данные представлены на рисунках 5 и 6.

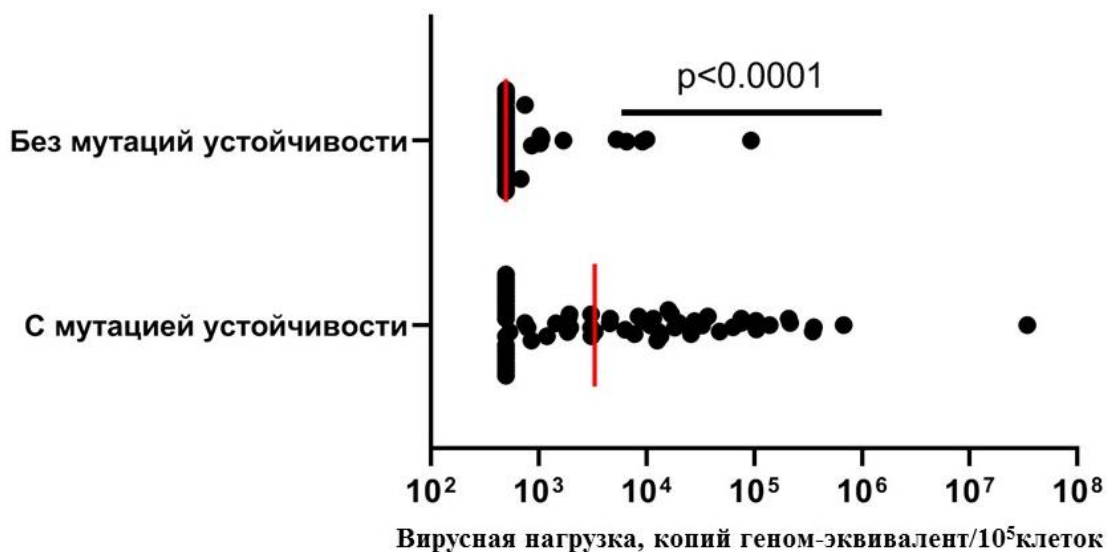


Рисунок 5. Вирусная нагрузка у пациентов-носителей вируса с мутациями, ассоциированными с устойчивостью к ганцикловиру и без них. Красной линией обозначена медиана.

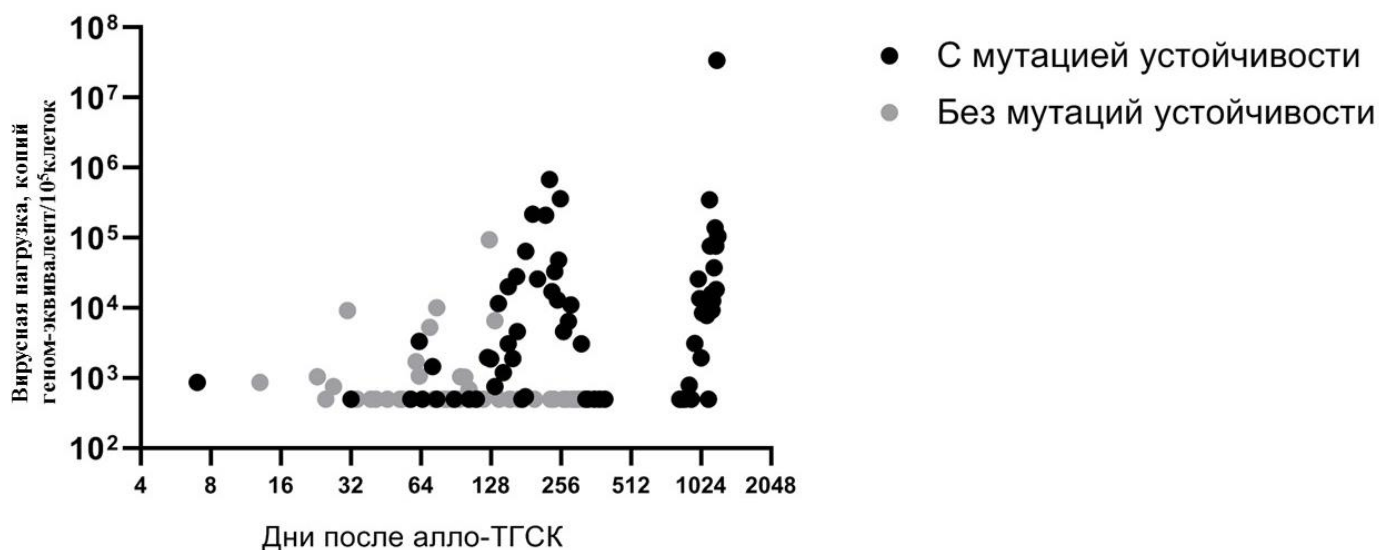


Рисунок 6. Длительность выявления и концентрация вирусной ДНК у пациентов после алло-ТГСК у пациентов-носителей вируса с мутацией устойчивости к ганцикловиру и штамма без мутаций.

Вирусная нагрузка в крови была статистически значимо выше у пациентов, у которых выявлена вирусная ДНК, содержащая мутацию в изучаемом регионе гена ($p < 0.0001$). Также была замечена тенденция, согласно которой у пациентов

с мутантным штаммом ЦМВ вирусная ДНК выявляется в крови на более поздних сроках после алло-ТГСК.

У пациентов, в крови которых выявлен вирус с мутациями устойчивости, более длительно наблюдалась виремия, при этом вирусная нагрузка в большинстве случаев оказывается в области высоких значений.

Все четыре обнаруженных мутаций располагались в нефункциональном регионе белка, участвующего в репликации вирусного генома. Согласно литературным данным, возникновение мутаций в этом регионе ведет к нарушению узнавания ганцикловира как субстрата, но не приводит к нарушению жизненного цикла вируса.

Мутации устойчивости к действию ганцикловира обладают разным потенциалом резистентности. Так, С592G, С607F и del600 в литературе обозначаются как мутации, обладающие низким потенциалом к возникновению устойчивости. В то же время С603W обладает высоким потенциалом и с большей долей вероятности может приводить к возникновению устойчивости вирусной репликации к противовирусным препаратам.

У пациента ПД выявлена мутация С607F с низким фактором устойчивости равным 1.9. Медиана концентрации вирусной ДНК составила 500 копий ГЭ на 10^5 ядросодержащих клеток крови, что считается низкой вирусной нагрузкой. Аналогичная ситуация наблюдалась для пациента ГС с мутацией del600 с низким фактором устойчивости тоже равным 1.9. В образцах ДНК, выделенной из крови пациента ПР, обнаружена мутация С592G (фактор устойчивости 2.9) вирусная нагрузка на момент детекции мутации достигала более высоких показателей (превышала 10^5 ГЭ).

У пациента ФС были исследованы образцы, собранные в разное время – в 2016 г. и в 2017 г., при этом в них выявлены разные мутации (С592G и С603W,

фактор устойчивости 2,9 и 8 соответственно), что говорит о смене штамма вируса, формирующего основную вирусную нагрузку. Согласно данным литературы, при проведении противовирусной терапии в низких (субоптимальных) дозах (по действующему веществу), может наблюдаться отбор мутантных штаммов ЦМВ, что, вероятно, и произошло в наблюдаемом случае.

Полученные данные представляют особый интерес, учитывая, что спектр противовирусных препаратов прямого действия для подавления репликации ЦМВ крайне ограничен, а в Российской Федерации представлен лишь несколькими наименованиями. Это сильно ограничивает возможности терапевтической тактики при возникновении устойчивости к противовирусной терапии, особенно у реципиентов алло-ГСК. Уникальность данной когорты пациентов состоит в том числе в том, что в ранний посттрансплантационный период в организме одновременно функционируют две иммунные системы – донора и пациента. Ранее не описанные сложные взаимодействия между вирусом и двумя иммунными системами могут способствовать отбору штаммов с мутациями резистентности.

У всех реципиентов алло-ГСК, включенных в исследование, до трансплантации в крови были выявлены анamnестические анти-ЦМВ антитела класса G, что указывало на факт инфицирования вирусом еще до процедуры. Таким образом, ни в одном случае не было зафиксировано первичной ЦМВ-инфекции. Появление в организме реципиента устойчивого штамма возможно несколькими путями. В первую очередь, это возникновение мутаций в ходе естественной вирусной эволюции. Также попадание такого штамма возможно в результате реинфекции при трансплантации от донора-носителя, что крайне маловероятно, поскольку большая часть доноров перед заготовкой трансплантата обследуются на наличие в крови ДНК ЦМВ. Также отбору штаммов с мутациями резистентности может способствовать длительная терапия ганцикловиром в

субоптимальных дозах, что является наиболее вероятным сценарием событий в данном случае.

Учитывая, что мутации, даже с низким потенциалом к возникновению устойчивости, следует считать клинически важными, становится очевидным, что своевременное обнаружение мутации в геноме вируса может влиять на характер течения ЦМВИ и, следовательно, на решение врача при выборе противовирусного препарата и его дозы. Мутации в гене *UL97*, приводят к устойчивости, в основном, к действию ганцикловира и его аналогов, но не к другим препаратам.

Исследователи из университета Техаса разработали алгоритм лечения инфекции, вызванной устойчивым штаммом цитомегаловируса, согласно которому, если пациент не отвечает на противовирусную терапию, проводится генотипирование и определение наличия мутаций. В случае обнаружения мутации, в зависимости от ее характера, увеличивается доза ганцикловира или валганцикловира или принимается решение о начале использования другого препарата, отличающегося по механизму подавления вирусной инфекции – как правило, фоскарнета. (Chaer et al, 2016). Также потенциально возможным методом лечения при резистентных к терапии формах ЦМВИ является использование ЦМВ-специфичных лимфоцитов донора. Работа в этом направлении ведется, однако это требует дальнейшего изучения.

Учитывая возрастающую частоту выявления маркеров ВГЧ-6, а, следовательно, роль терапии связанных с ним осложнений, в том числе у реципиентов алло-ГСК, был осуществлен поиск мутаций устойчивости в гене *U69* ВГЧ-6, выделенного из образцов клинического материала этой когорты пациентов. Исследован 41 образец ДНК, выделенной из клинического материала 41 реципиента алло-ГСК с признаками резистентной инфекции. Показано, что ни в одном из случаев не была обнаружена известная и описанная мутация в

изучаемом участке гена *U69*, ассоциированная с устойчивостью к действию противовирусных препаратов. Поскольку для ингибирования репликации ВГЧ-6 используются те же лекарственные средства, что и для ЦМВ, полученные результаты могут указывать низкую частоту мутаций устойчивости к действию ганцикловира по сравнению с ЦМВ. С другой стороны, эти результаты могут говорить о недостаточной изученности устойчивости данного вируса к действию противовирусных препаратов или о локализации мутаций устойчивости в других регионах вирусного генома. Противовирусная терапия, проводимая с использованием лекарств в субоптимальной дозе, может привести к отбору мутантных штаммов, а значит в будущем количество мутаций устойчивости к действию противовирусных препаратов у ВГЧ-6 может возрасти.

Несмотря на отсутствие случаев выявления мутантных штаммов среди доступных для исследования образцов, была разработана компьютерная программа для поиска мутаций в полученных последовательностях участков ДНК. Данная программа может стать актуальным инструментом для других исследователей, чтобы не выполнять поиск мутаций вручную.

4.3 Анализ динамики возникновения мутаций в гене *UL97*

На следующем этапе работы было проведено исследование доступных архивных образцов ДНК ЦМВ, выделенной от трех пациентов-носителей мутантных штаммов, собранных в период за 6 месяцев до момента обнаружения мутации и 6 месяцев после, с целью возможности определения сроков возникновения найденной мутации. Всего в исследование включено 73 архивных образца, для которых проведена детекция вирусной ДНК: 24 от пациента ПР, 22 от пациента ФС и 27 от пациента ПД. Для всех положительных образцов была предпринята попытка секвенирования. Приемлемые результаты секвенирования были получены для 38 образцов: для 11 образцов от пациента ПР, для 14 – от пациента ФС и 3 – от пациента ПГ. Малое количество результатов в последнем случае, вероятно, связано с низкой концентрацией ДНК ЦМВ в исследуемых образцах.

Анализ последовательностей участка гена *U97*, полученных из включённых в исследование образцов, показал, что обладающие потенциалом резистентности мутационные изменения обнаруживались не во всех доступных архивных образцах, а регистрировались лишь в определённые дни взятия материалов на исследование после трансплантации. Далее отдельно рассмотрен каждый клинический случай, для которого удалось получить данные: пациенты ПР, ФС и ПД.

1. Пациент ПР

Клинический диагноз: лимфома из клеток мантийной зоны. Трансплантация алло-ГСК от 18.03.2016 г.

У пациента выявлена описанная ранее в литературе мутация – C592G, обладающая фактором резистентности к ганцикловиру равным 2.9. Впервые она была выявлена у пациента спустя 187 дней после трансплантации и сохранялась в вирусной ДНК на протяжении всего последующего периода наблюдения.

Исследование архивных образцов показало присутствие дополнительной ранее не описанной мутации А628Е неясного значения на протяжении всего срока наблюдения. После появления С592G мутация А628Е не элиминировала. Это свидетельствует о том, что с наибольшей долей вероятности речь идёт об одном вирусном штамме, в котором на фоне уже имеющейся мутации появилась дополнительная.

Из графика на **рис. 7** видно, что появление мутации С592G зафиксировано на фоне роста в крови вирусной нагрузки (ВН) более 10 000 копий ГЭ на 100 000 ядродержащих клеток. Для оценки влияния мутации на резистентность вируса к действию противовирусных препаратов проанализирована противовирусная терапия (ПВТ), проводимая пациенту за время наблюдения (данные истории болезни пациента). Полученные данные представлены на **рис. 8**.

Из **рис. 8** видно, что эффективного снижения значения ВН удалось добиться только на фоне применения фоскарнета, что дополнительно подтверждает наличие проявлений резистентности (отсутствие динамики этого показателя в течение 2 недель на фоне адекватной ПВТ). Данный препарат является структурным имитатором пирофосфат-аниона, который избирательно ингибирует место связывания пирофосфата в вирусных ДНК-полимеразах в концентрациях, не влияющих на активность ДНК-полимеразы человека. Таким образом, наличие мутации в гене *U97* не изменяет степень его активности. наличие мутации в гене *U97* не изменяет степень его активности.

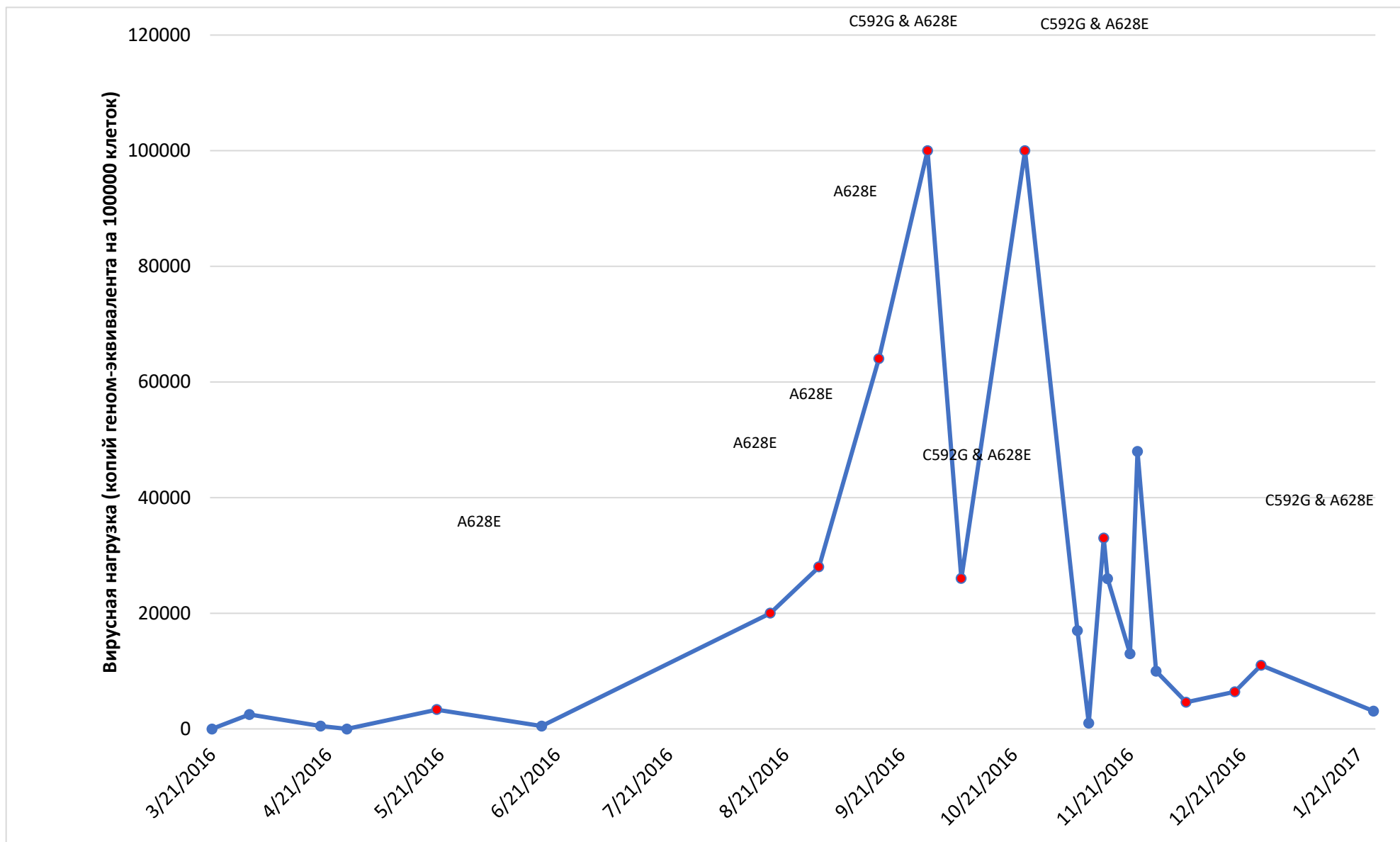


Рисунок 7. Динамика вирусной нагрузки до и после возникновения мутаций у пациента ПР

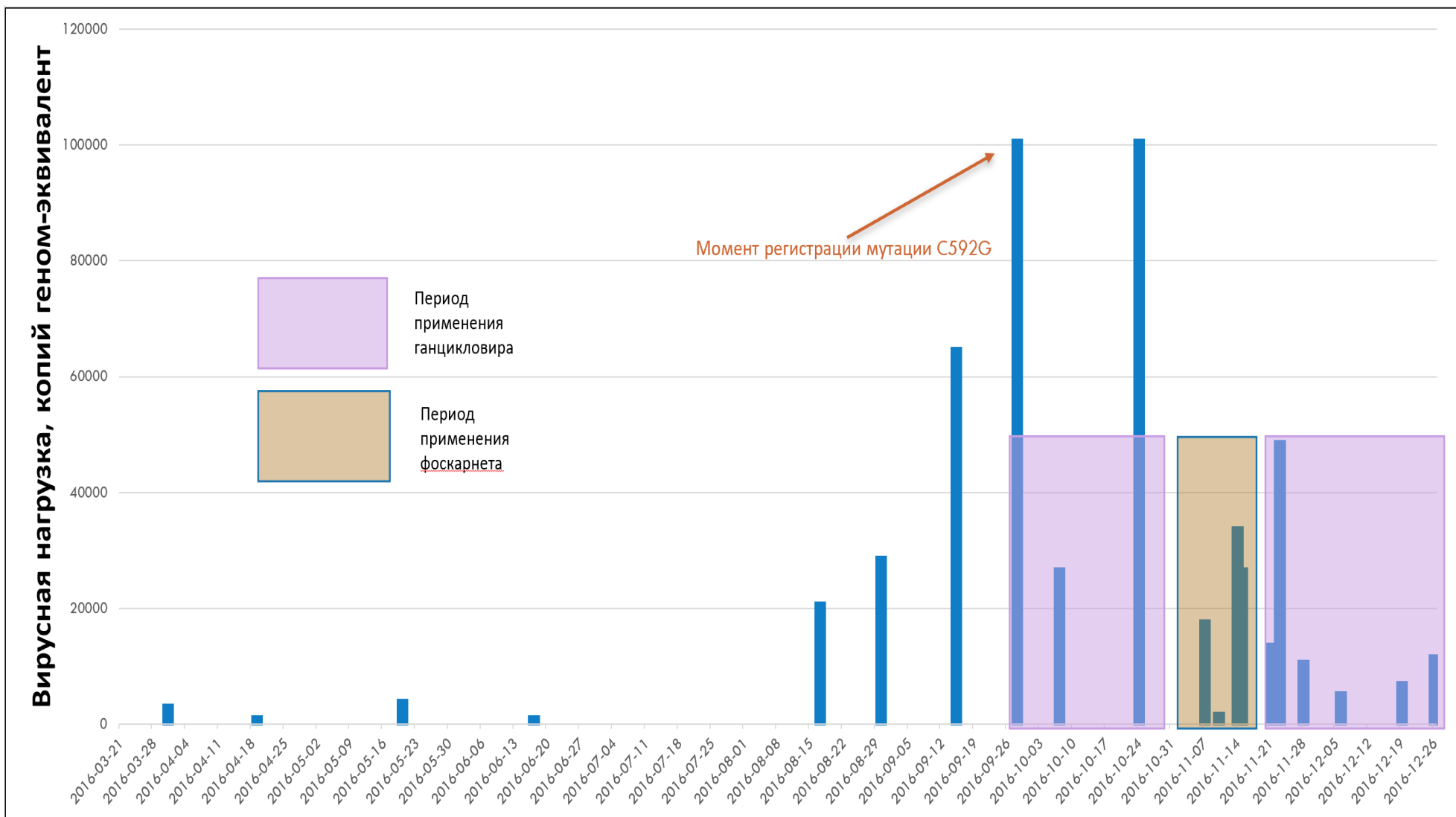


Рисунок 8. Динамика вирусной нагрузки на фоне проводимой противовирусной терапии у пациента ПР (стрелкой указан момент первичной регистрации мутации)

2. Пациент ФС

Клинический диагноз: острый миелоидный лейкоз. Трансплантация алло-ГСК от 21.12.2013 г.

У этого пациента обнаружена ДНК ЦМВ, в которой в разные периоды были зафиксированы 2 ранее описанные в литературе мутации: С592G и С603W. При этом более агрессивная С603W впервые выявлена спустя 1184 дня после трансплантации. На основании изучения архивных образцов установлено, что мутация С592G возникла ещё до начала периода исследования (более 6 месяцев до выявления мутации С603W, см. **рис. 9**). В обозначенной на **рис. 10** временной точке одновременно детектировались обе мутации. Однако позднее мутация С592G перестала определяться с помощью секвенирования по Сенгеру, что может указывать на смену мажорного вирусного штамма в ходе наблюдения и проведения ПВТ (в т.ч. фоскарнетом). Приведённые факты с высокой степенью вероятности позволяют предполагать имевший место процесс селекции штамма под прессингом противовирусных препаратов, что видно на **рис. 10**.

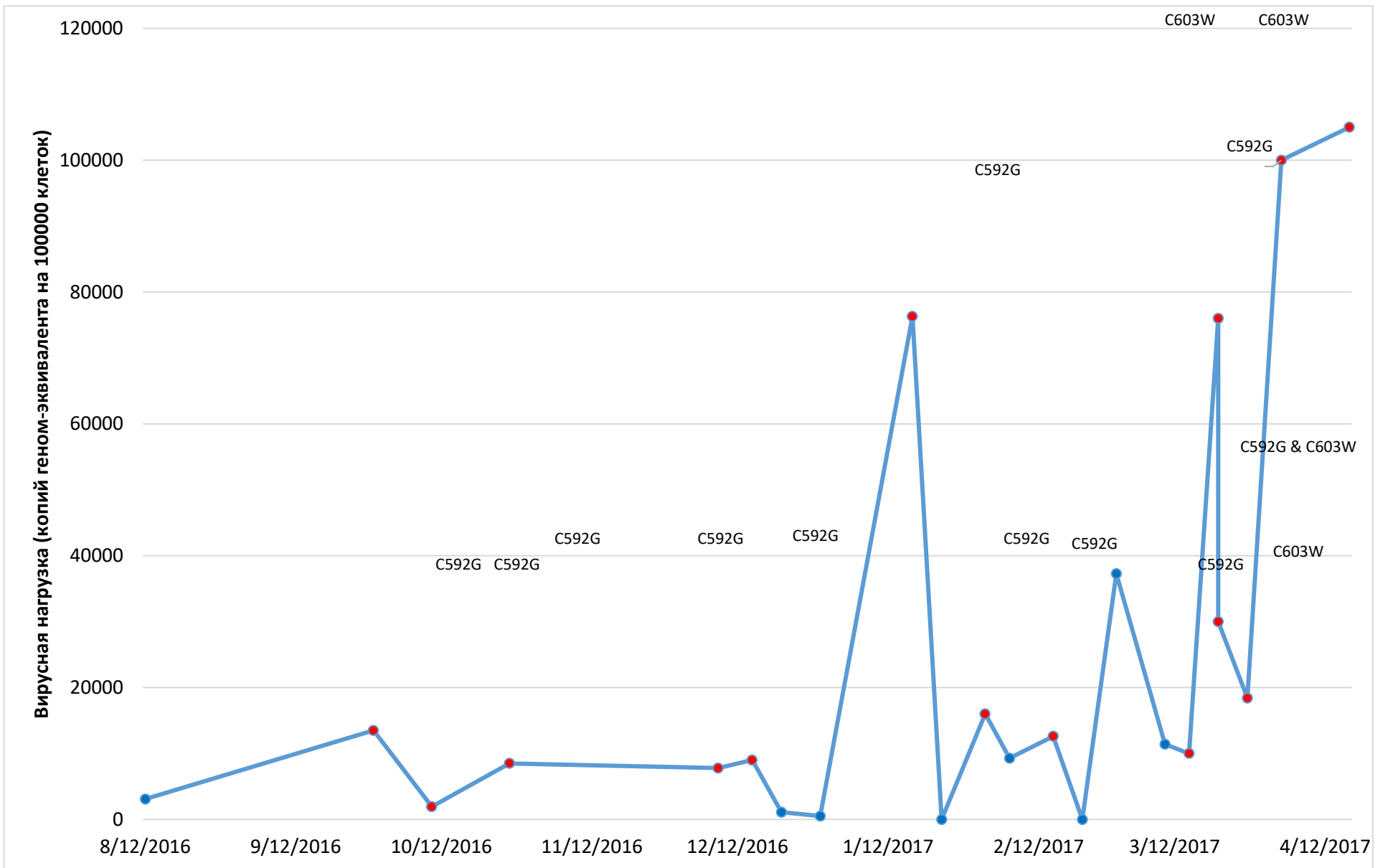


Рисунок 9. Динамика вирусной нагрузки до и после возникновения мутаций у пациента ФС

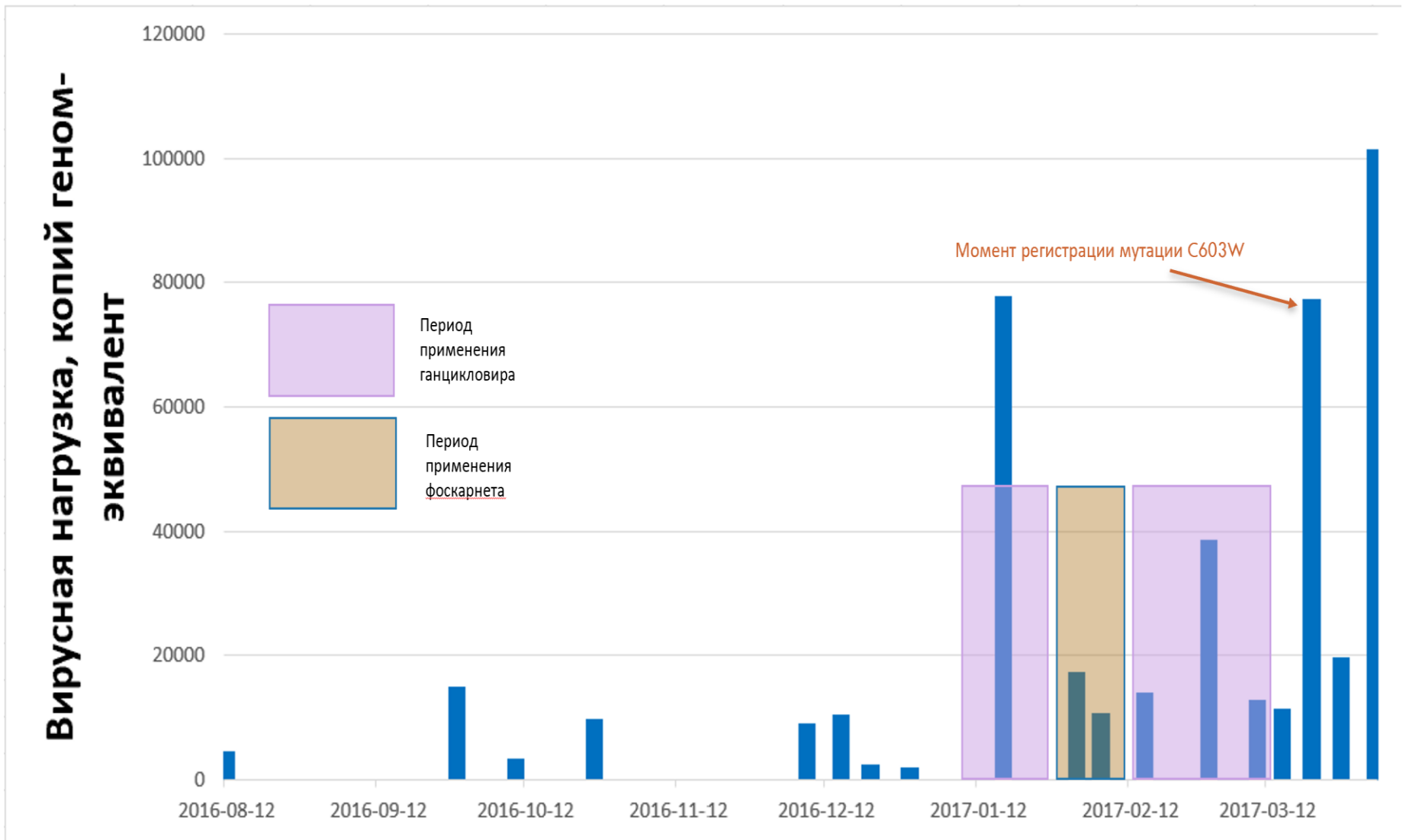


Рисунок 10. Динамика вирусной нагрузки на фоне проводимой противовирусной терапии у пациента ФС (стрелкой указан момент первичной регистрации мутации)

3. Пациент ПД

Клинический диагноз: острый лимфобластный лейкоз. Трансплантация алло-ГСК от 28.06.2017 г.

В данном клиническом случае была обнаружена 1 ранее описанная в литературе мутация – С607F. Исследование архивных образцов показало, что моментом её возникновения можно считать +124 день после трансплантации (см. **рис. 11**).

Анализ проводимой ПВТ в зависимости от ВН и выявление мутационных изменений представлен на **рис. 12**. изменений представлен на **рис. 6**.

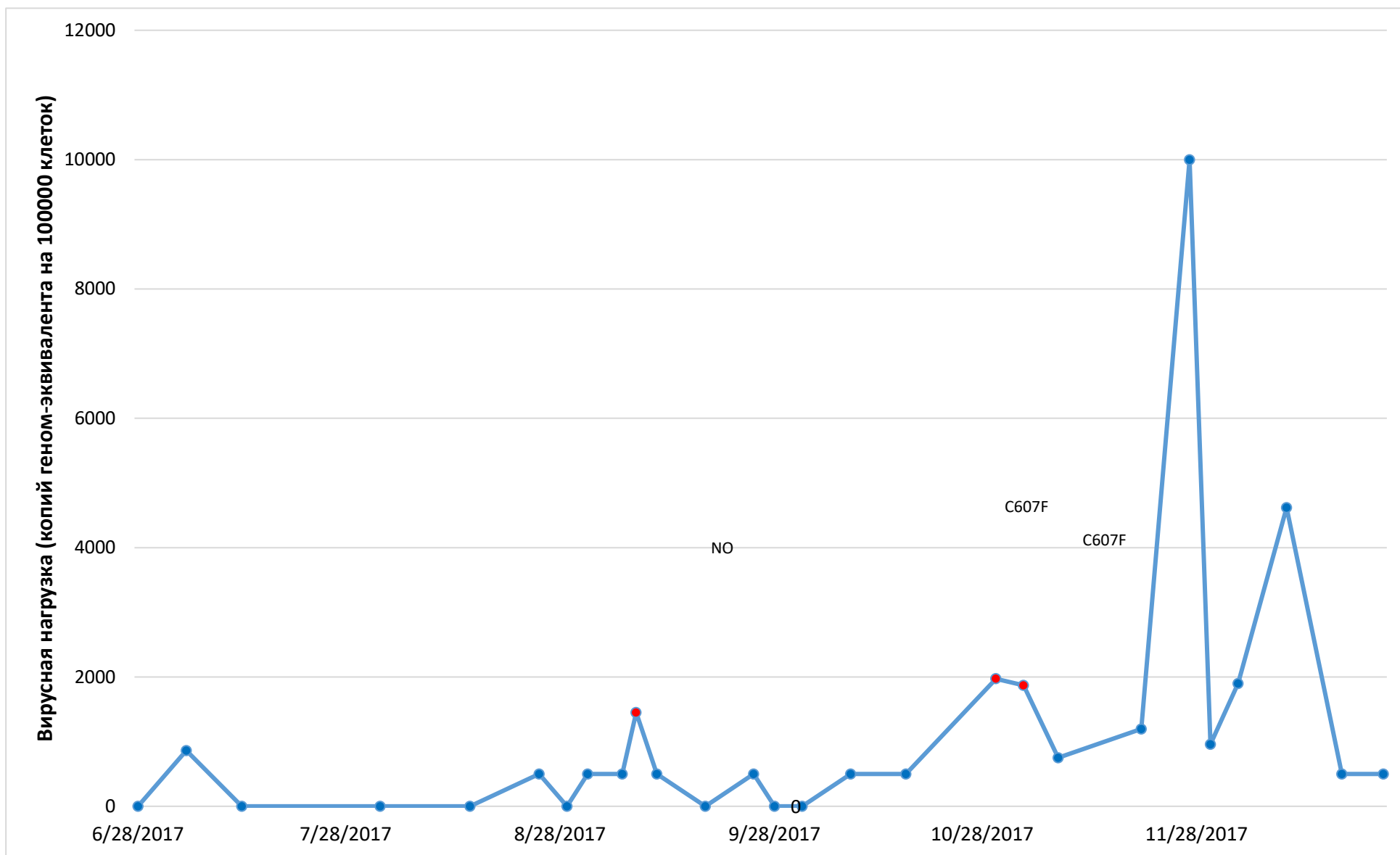


Рисунок 11. Динамика вирусной нагрузки до и после возникновения мутаций у пациента ПД (красными точками обозначены образцы, NO обозначает точку, для которой были получены результаты секвенирования, но мутаций обнаружено не было)

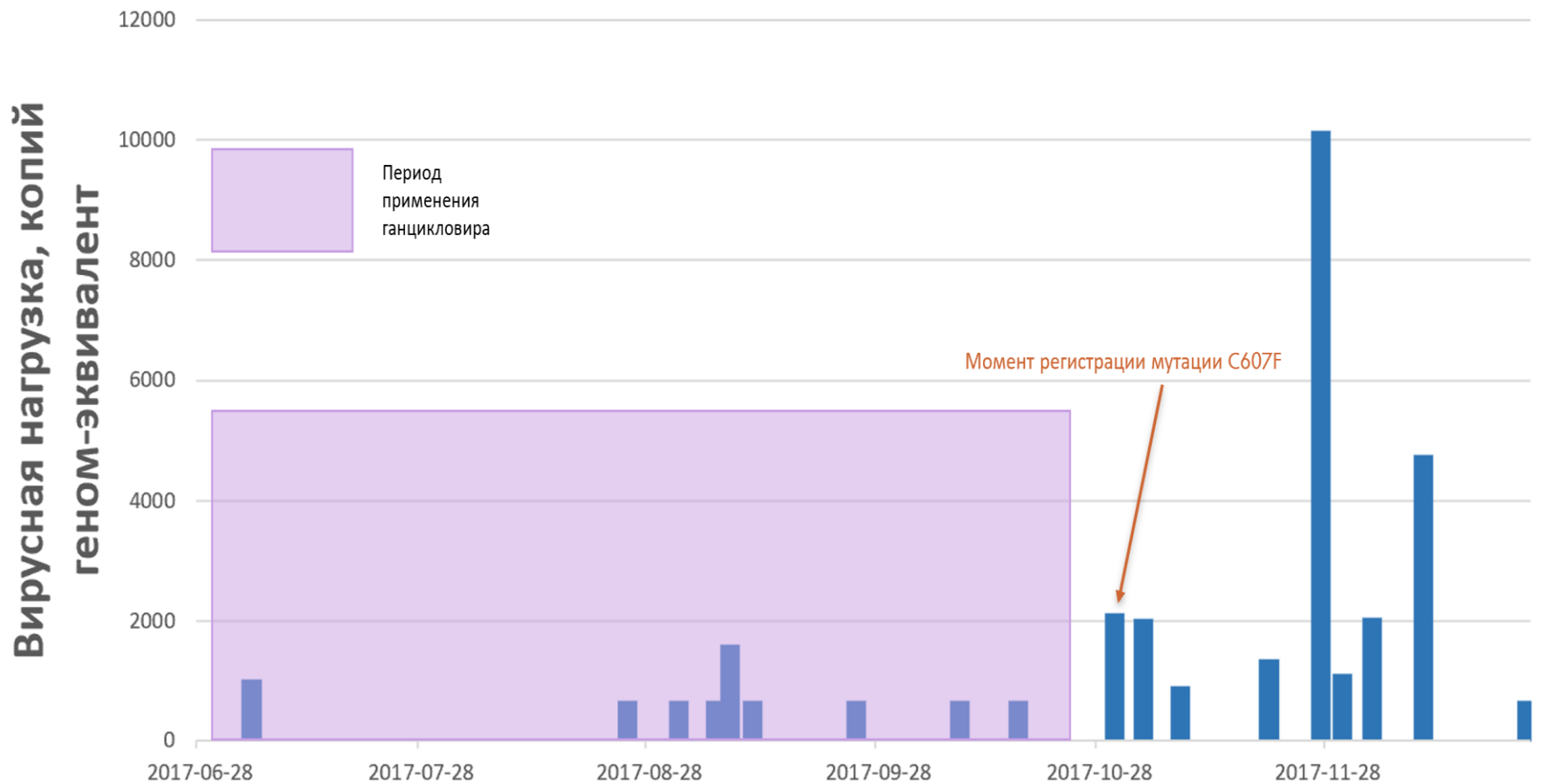


Рисунок 12. Динамика вирусной нагрузки на фоне проводимой противовирусной терапии у пациента ПД (стрелкой указан момент первичной регистрации мутации)

Изучение динамики появления мутантных штаммов показало, что все эпизоды возникновения мутации с высоким показателем фактора резистентности ассоциировались с ростом ВН у пациентов в крови. При этом её существенное повышение либо предшествует моменту регистрации новой мутации, либо совпадает с этой временной точкой. Часто это зависит от даты направления материала на вирусологическое исследование лечащим врачом. Пик ВН детектировался у пациентов в разные периоды: у ФС и ПД он имел место после появления новой мутации, а в случае пациента ПР совпал с моментом её непосредственного обнаружения. В целом наблюдаемые феномены на данном этапе могут быть объяснены как недостаточной чувствительностью выбранного метода, так и взаимовлиянием штаммов в плане репликации каждого из них. В литературе встречается информация о том, что в организме одновременно может присутствовать более 1 штамма ЦМВ (Göhring et al, 2009). При этом используемая для идентификации методика (секвенирование по Сэнгеру), несмотря на точность обнаружения однонуклеотидных замен, предоставляет информацию лишь о преобладающем на момент взятия материала геноме. Возможная причина указанного явления заключается в том, что мутантный штамм появляется в организме до того, как его удаётся зарегистрировать выбранным методом, поскольку секвенирование по Сэнгеру позволяет получать последовательность мажорного штамма. Тем не менее, появляясь раньше момента его обнаружения, мутантный штамм начинает вносить свой вклад в ВН, из-за чего наблюдается её рост. В ходе отбора на фоне проводимой ПВТ мажорным становится штамм, обладающий репликативным преимуществом, а не обладающий устойчивостью к ингибирующему действию препарата элиминируется. После элиминации чувствительного к ганцикловиру штамма резистентный штамм начинает активно реплицироваться, что, очевидно, приводит к наблюдаемым пикам ВН.

Подобная тенденция особенно ярко наблюдается у пациентки ФС. В её случае на протяжении длительного времени регистрировался штамм с мутацией С592G, а в марте 2017 г. в одной из точек вирусологического обследования одновременно зафиксированы 2 мутации – С592G и С603W. После этого наблюдалась постепенная смена с С592G на С603W. Данная последовательность событий, наиболее вероятно, свидетельствует об одновременном присутствии 2 штаммов, несущих по 1 мутации. На **рис. 7** видно, что имели место отдельные эпизоды повышения ВН до появления С603W, однако непосредственно перед обнаружением новой мутации зарегистрировано перманентное увеличение показателя наблюдаемой ВН. Очевидно, что неэффективность противовирусной терапии может быть связана со множеством факторов, относящихся как к состоянию пациента (такие как несостоятельность иммунной системы на фоне донорского кроветворения, наличие инфекционных (бактериальных и грибковых) осложнений, соматическое состояние), так и к свойствам самого вируса. Тем не менее, доказанное наличие мутации, обладающей высоким фактором резистентности (С603W, фактор резистентности 8) к ганцикловиру, однозначно указывает на необходимость пересмотра применения данного препарата в качестве ПВТ в подобной ситуации.

У пациента ПР пик значения ВН совпал с моментом регистрации дополнительной мутации, после чего стали одновременно детектироваться 2 мутации. Данный феномен, вероятно имеет в своей основе не появление нового штамма, становящегося в результате мажорным, а возникновением новой мутации в рамках одного штамма. Таким образом, совпадение пика ВН с временной точкой регистрации вновь возникшей мутации может быть объяснено отсутствием антагонистических взаимодействий между разными вирусными штаммами.

Показаны статистически значимые различия в показателях ВН до и после возникновения мутации на фоне проводимой ПВТ ганцикловиром у исследуемых ПД и ПР. Для пациентки ФС такая зависимость не была доказана. Однако этот факт может быть обусловлен недостаточной выборкой доступных образцов клинического материала, направленных на вирусологическое исследование после появления мутации С603W, поскольку вскоре после её обнаружения пациентка ФС скончалась от резистентного септического шока. Среди выявленных мутаций С603W обладает наибольшим фактором резистентности и ассоциируется, согласно литературным данным, с высокой летальностью. Пациенты ПР и ПД на период наблюдения были живы, что, возможно, связано как с меньшим фактором устойчивости выявленных мутационных изменений, так и с различиями в характере течения основного заболевания и проводимой ПВТ.

В случае пациента ПР клинически значимое появление ЦМВ-ассоциированных инфекционных осложнений совпало с временем возникновения мутации. Впоследствии удалось достичь снижения показателя ВН, применяя комплексную ПВТ: препараты иммуноглобулинов, ганцикловир и фоскарнет, что привело к стабилизации состояния и уменьшению ВН в крови.

У пациента ПД развитие острой ЦМВ-инфекции с гипертермией также имело место на фоне возрастания ВН и появления мутации. Резистентное течение инфекционного процесса констатировано лечащим врачом спустя несколько месяцев после возникновения мутационных изменений. На протяжении всего этого периода осуществлялось лечение валганцикловиром и препаратом иммуноглобулинов. Тем не менее показатели ВН на фоне терапии не достигали столь высоких значений, как у остальных пациентов, включенных в исследование. Это может быть объяснено тем, что среди выявленных мутаций

С607F обладает наиболее низким фактором устойчивости (1,9), что, очевидно, оказывает влияние на характер течения заболевания *in vivo*.

У больной ФС после возникновения второй мутации показатели ВН не снижались на фоне назначения ганцикловира, не был отмечен и клинический эффект. Присоединение к терапии препаратов иммуноглобулинов, согласно клиническим данным истории болезни пациента, способствовало достижению незначительного эффекта и нормализации состояния, но влияния на ВН при этом не отмечено. Несмотря на проводимые лечебные мероприятия, вскоре после обнаружения дополнительной мутации наступила смерть пациентки от резистентного септического шока.

Оценивая в целом данные о состоянии пациентов на протяжении периода наблюдения, дозы вводимых лекарственных средств и показатели ВН, можно утверждать, что при наличии мутаций с высоким фактором резистентности в геноме ЦМВ, применение ганцикловира и его производных не приводит к желаемому эффекту: ответ на терапию либо наступает позже, либо не наступает вовсе, в то время как ВН растёт вместе с ухудшением состояния пациента. Показательно, что чем больше был фактор резистентности обнаруженной мутации, тем хуже были результаты проводимой противовирусной терапии.

Таким образом, продемонстрировано, что выявление мутационных изменений, потенциально приводящих к устойчивости, возможно осуществить еще до непосредственного возникновения клинических проявлений острой ЦМВ-инфекции. Это свидетельствует в пользу необходимости проведения скрининга реципиентов алло-ГСК на наличие мутаций устойчивости к действию ганцикловира в геноме ЦМВ, обладающих высоким фактором резистентности, с целью выявления когорты пациентов, в которой терапия этим препаратом может оказаться малоэффективной. Учитывая высокую нефротоксичность и

миелосупрессивное действие ганцикловира, своевременная идентификация мутаций может существенно повлиять на выбор терапевтической тактики.

4.4 Разработка прототипа тест-системы для идентификации мутаций в гене *UL97* ЦМВ

Учитывая высокую себестоимость секвенирования, в рамках исследования был разработан метод быстрой идентификации мутации в заранее известных кодонах на основе АС-ПЦР. Так как на предыдущем этапе исследования у реципиентов алло-ГСК были обнаружены описанные в литературе мутации С592G и С603W, обладающие достаточно высоким фактором резистентности к ганцикловиру (2.9 и 8 соответственно), была сформирована задача разработать тест-систему, способную детектировать наличие этих двух мутаций, относительно дешёвым и быстрым способом. Подобная тест-система была разработана на основе метода АС-ПЦР. В качестве положительного контроля были использованы образцы ДНК ЦМВ, в которых с помощью метода секвенирования по Сэнгеру, подтверждено наличие этих мутаций.

С помощью разработанной тест-системы были проанализированы архивные образцы ДНК, выделенной из клинического материала 209 пациентов (всего 675 архивных образцов). Достоверные результаты АС-ПЦР были получены для 578 из 675 образцов. В 98 образцах в ходе реакции были получены невалидные результаты, то есть не была зарегистрирована флуоресценция ни для реакционной смеси с праймерами, комплементарными ДНК дикого типа вируса, ни для мутанта. Объяснение этому скорее всего заключается в падении концентрации ДНК ЦМВ в архивном образце в ходе хранения. Кроме того, можно предположить, что в ДНК ЦМВ, выделенной от пациента на момент сбора образца, могла произойти синонимичная замена концевого нуклеотида праймера, в связи с чем белковая последовательность, по сути, остается той же, что и у дикого типа, но АС-ПЦР не проходит, так как праймер не комплементарен концевому нуклеотиду.

Показано, что суммарно у 2.8% (16 из 578) пациентов, образцы ДНК которых были включены в исследование и дали валидные результаты, была обнаружена ДНК вируса с мутацией С603W, а в образцах 0.3% (2 из 578) пациентов – С592G. При этом последняя мутация выявлялась в основном совместно с С603W. Следует отметить, что были выявлены случаи, когда мутации обнаруживались более, чем в одном образце клинического материала одного пациента, собранных в различные моменты времени. Так в клинических образцах 16 пациентов можно было наблюдать динамику детекции мутантного штамма в зависимости от времени и локуса (периферическая кровь, жидкость БАЛ, слюна и т.д.) получения образца. Преобладание частоты обнаружения мутации С603W отражено в работах различных исследовательских групп из Европы, например Lodding et al. (Lodding et al, 2021). Однако, данные из других частей света говорят о противоположной ситуации (Keyvani et al, 2016). Вполне возможно, что частота встречаемости тех или иных мутаций резистентности различается в разных популяциях и изучаемых группах пациентов, в зависимости от профиля заболевания, но актуальным и важным остается возможность использования метода АС-ПЦР для сбора подобной статистики. Другие исследователи использовали довольно дорогостоящие методы поиска мутаций, такие как NGS и секвенирование по Сэнгеру. Но, для популяционных исследований применение данных методов может быть нецелесообразно, что в свою очередь говорит в пользу предлагаемого метода (АС-ПЦР).

Анализ данных, полученных в ходе исследования, показал, что 71% пациентов, в материале которых обнаружен мутантный ЦМВ, являются реципиентами алло-ГСК. Таким образом, можно предположить, что применение предложенного метода может представлять интерес для врачей, оказывающих подобный вид медицинской помощи. Очевидно, что полученные результаты следует интерпретировать совместно с другими клинико-лабораторными

данными (например, динамикой вирусной нагрузки на фоне противовирусной терапии, наличием симптомов инфекционных осложнений), чтобы получить более полную картину о течении ЦМВ-инфекции у пациента и констатировать факт резистентной инфекции, а не просто присутствие штамма, несущего мутацию резистентности, в организме.

Было также показано, что метод позволяет проводить мониторинг детекции мутации, то есть циркуляции мутантного штамма в организме. Для 16 пациентов было возможным провести анализ динамики выявления мутаций, так как у них были доступны несколько образцов, содержащих ДНК ЦМВ, и мутации детектировалась более одного раза. Данные одного из пациентов (шифр пациента ДК) представлены в таблице 8 и на рисунке 13. Для остальных картина была идентичная: рост вирусной нагрузки на фоне появления мутации, и транзиторный характер выявления мутаций в различных локусах поражения. Данный феномен может быть объяснен, скорее всего, конкуренцией между диким и мутантными штаммами вируса на фоне противовирусной терапии. Одновременное существование в организме нескольких вирусных штаммов (особенно у иммунокомпрометированных пациентов) является известным фактом, но до сих пор недостаточно изучено (Puchhammer-Stöckl et al, 2006).

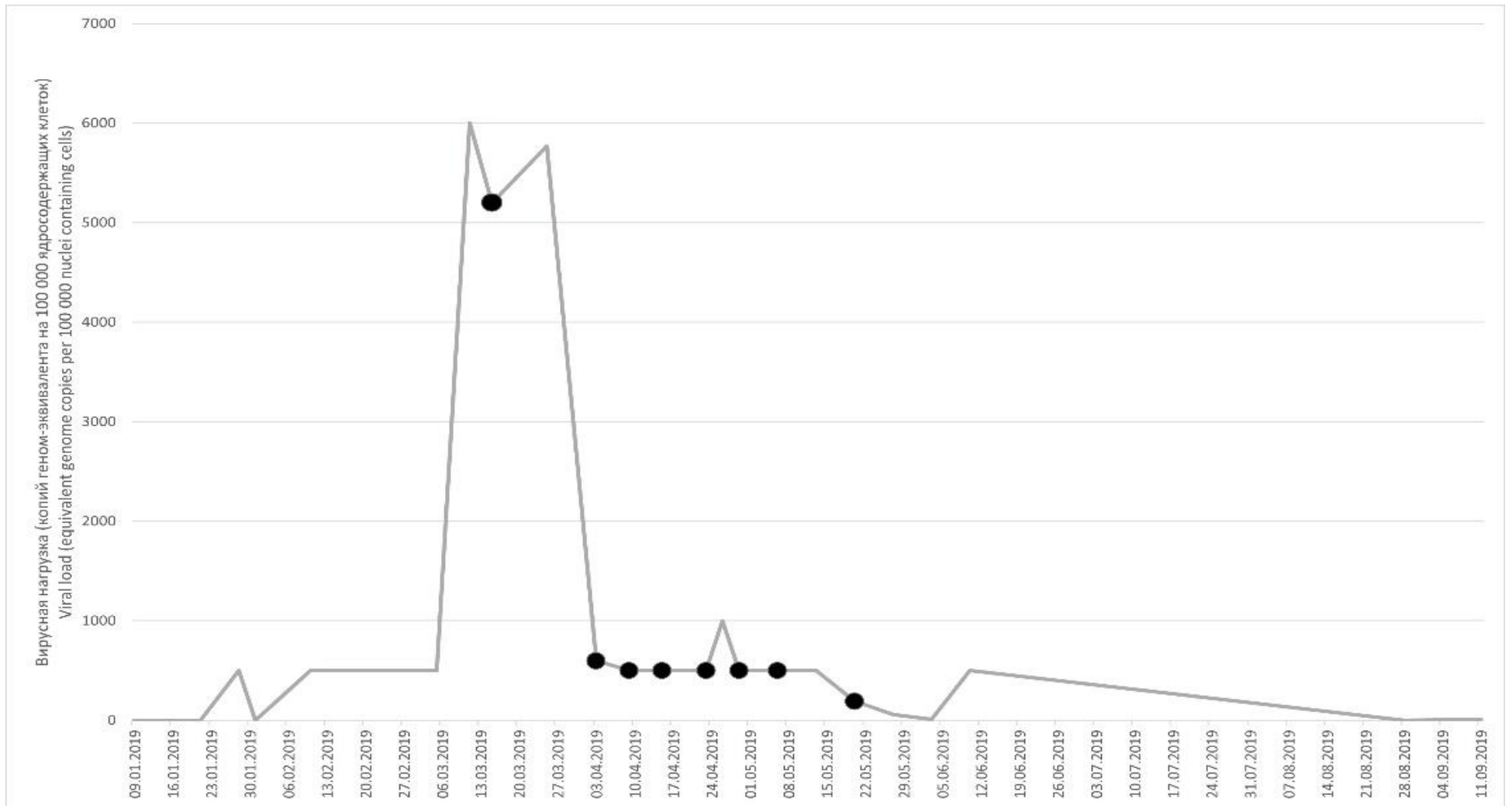


Рисунок 13 Выявление мутантных штаммов на фоне вирусной нагрузки ЦМВ у пациента ДК. Черные жирные точки обозначают моменты выявления мутации S603W в ДНК ЦМВ

Таблица 8. Динамика выявления мутаций у пациента ДК в 2019 году в различном клиническом материале. WT – во временной точке обнаружен дикий тип, MT – во временной точке обнаружен мутант

	Тип клинического материала (компармент)								
	кровь	кровь	моча	кровь	слюна	кровь	кровь	слюна	кровь
Кодон 592	WT	MT	MT	MT	WT	MT	MT	WT	WT
Кодон 603	WT	WT	MT	MT	WT	MT	MT	WT	WT
Дата сбора материала	18.02.19	15.03.19	03.04.19	09.04.19	09.04.19	15.04.19	23.04.19	23.04.19	26.04.19
	Тип клинического материала								
	кровь	кровь	кровь	слюна	кровь	слюна	кровь	кровь	кровь
Кодон 592	MT	MT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
Кодон 603	MT	MT	WT	WT	MT	WT	WT	WT	WT
Дата сбора материала	29.04.19	06.05.19	13.05.19	13.05.19	20.05.19	27.05.19	03.06.19	10.06.19	11.09.19

Помимо динамики выявления мутантного и дикого штаммов без очевидных закономерностей, показано распределение вирусных штаммов по разным компартментам (локусам поражения). Аналогичный феномен был ранее показан в работах других авторов с помощью метода deep sequence (S. Chou et al., 2014; Görzer et al., 2010).

Таким образом, в ходе выполнения исследования был разработан способ, позволяющий проводить детекцию мутаций C592G и C603W в образцах ДНК ЦМВ, выделенных от пациентов с заболеваниями системы крови, преимущественно реципиентов алло-ГСК. Показано, что формат АС-ПЦР позволяет использовать данный способ для быстрого и удобного скрининга конкретных мутаций у большого числа пациентов, а также проводить мониторинг циркуляции мутантных штаммов в организме пациента, в случае его обнаружения.

Учитывая все вышесказанное о диагностике мутаций в участке гена фосфотрансферазы ЦМВ, ассоциированных с устойчивостью к действию ганцикловира, в качестве оптимального предлагается следующий алгоритм при возникновении ЦМВИ у реципиента алло-ГСК: в случае высокой вирусной нагрузки и отсутствия ответа на противовирусную терапию ганцикловиром, провести определение наличия мутации устойчивости к его действию. При обнаружении такой мутации, в зависимости от её фактора резистентности, рассмотреть возможность увеличения дозы ганцикловира, или перехода на валганцикловир или препарат с отличающимся механизмом действия (например, фоскарнет). Следует также продолжить разработку тест-систем на основе ПЦР для быстрой, удобной и дешевой идентификации наиболее распространённых из известных мутаций.

Ограниченность выбора противовирусных препаратов прямого действия в Российской Федерации накладывает ограничения на выбор терапевтической

тактики и потому своевременное обнаружение мутации резистентности может снизить вероятность тяжёлого течения инфекции у пациентов, в том числе у реципиентов алло-ГСК. В этом случае метод АС-ПЦР представляется удобным инструментом вирусной диагностики, который бы позволил получать важную информацию об устойчивости процесса вирусной репликации у пациента, при этом не прибегая к дорогостоящим и трудоемким методам

5. Заключение.

В работе проанализирована частота выявления ДНК ЦМВ и ДНК ВГЧ-6 у пациентов, получивших медицинскую помощь НМИЦ гематологии в 2015-2019 гг., частота встречаемости штаммов ЦМВ и ВГЧ-6 с мутациями в гене вирусной фосфотрансферазы, ассоциированными с устойчивостью к действию ганцикловира у реципиентов алло-ГСК и пациентов, получивших помощь в НМИЦ гематологии в 2019 г. Показано, что частота детекции штаммов ЦМВ, несущих мутации в участке гена вирусной фосфотрансферазы в изученных группах пациентов довольно высока. Были обнаружены следующие ранее описанные в литературе мутации резистентности к действию ганцикловира: С603W (фактор резистентности, ФР=8), С592G (ФР=2,9) del600 (ФР=1,9) и С607F (ФР=1,9). Полученные результаты показали, что наличие мутации и величина ее ФР влияют на вирусную нагрузку и длительность выявления в крови реципиентов ДНК ЦМВ.

У реципиентов алло-ГСК с признаками резистентной ВГЧ-6-инфекции в участке гена вирусной фосфотрансферазы, аналогичном ЦМВ, не были обнаружены мутации устойчивости к действию ганцикловира. Однако, была разработана компьютерная программа, направленная на быстрое определение наличия известных мутаций в гене U69 ВГЧ-6 при вводе последовательности ДНК, полученной методом секвенирования.

Полученные данные для ЦМВ стали отправной точкой для исследования динамики возникновения мутаций у реципиентов алло-ГСК. Изучение динамики появления мутантных штаммов показало, что все эпизоды возникновения в геноме ЦМВ, выделенного от реципиента алло-ГСК, мутации с высоким фактором резистентности ассоциировались с ростом вирусной нагрузки в крови пациента. При этом заметный рост вирусной нагрузки либо предшествует моменту, регистрации новой мутации, либо совпадает с ним.

Показана статистически значимая разница в вирусной нагрузке у пациентов до и после возникновения мутации на фоне проводимой противовирусной терапии ганцикловиром. Анализ клинико-лабораторных данных, взятых из историй болезни пациентов, среди которых: дозы вводимых противовирусных препаратов, показатели вирусной нагрузки, описание течения эпизодов инфекционных осложнений и пр., можно утверждать следующее: при наличии у больного ЦМВ с мутацией, характеризующейся высоким фактором резистентности, противовирусная терапия ганцикловиром и его производными не оказывает желаемого эффекта, а именно – время ответа на терапию либо отложено, либо ответа вовсе не наступает, а вирусная нагрузка растет вместе с ухудшением состояния пациента. Показательно, что чем больше был фактор резистентности обнаруженной мутации, тем хуже были результаты проводимой противовирусной терапии.

Показано, что выявление мутации, потенциально приводящей к устойчивости, может быть осуществлено до непосредственного возникновения клинических проявлений устойчивой ЦМВ-инфекции. Это свидетельствует в пользу необходимости проведения скрининга реципиентов алло-ГСК на наличие мутаций в геноме ЦМВ с целью выявления тех пациентов, для которых терапия ганцикловиром может оказаться малоэффективной. Учитывая высокую нефротоксичность этого препарата, а также его миелосупрессивное действие, своевременная идентификация мутаций может существенно повлиять на выбор терапевтической тактики.

В ходе выполнения исследования была разработана тест-система на основе АС-ПЦР позволяющая идентифицировать мутации с высоким фактором резистентности - С592G, С603W. Использование тест-системы на основе АС-ПЦР может быть целесообразно для получения информации о распространенности тех или иных мутаций в гене UL97 в популяции РФ.

6. Выводы.

- 1) Частота выявления ЦМВ и ВГЧ-6 у больных с гемобластозами за период наблюдения выросла с 14,33% до максимально 20,30% для ЦМВ и с 16,14% до 32,08% для ВГЧ-6. При этом частота выявления ВГЧ-6, начиная с 2016 г. достоверно выше чем для ЦМВ.
- 2) У реципиентов алло-ГСК с признаками резистентных герпетических инфекций частота обнаружения мутаций резистентности к ганцикловиру составила 4 из 49 (8,2%) для ЦМВ и 0 из 41 (0%) для ВГЧ-6. В гене фосфоротрансферазы ЦМВ обнаружены мутации С592G, С603W, С607F и del600. Вирусная нагрузка в крови была выше у пациентов-носителей мутантного штамма.
- 3) Показано, что у реципиентов алло-ГСК появление ЦМВ с мутацией(-ями) устойчивости к ганцикловиру ассоциировано с повышением вирусной нагрузки и ухудшением ответа на противовирусную терапию. Показана связь между величиной фактора резистентности мутации и уровнем вирусной нагрузки на фоне противовирусной терапии. Смена противовирусной терапии (замена ганцикловира на фоскарнет) позволяет получить ответ.
- 4) Разработан прототип тест-системы для определения мутации С592G и С603W в гене *UL97* ЦМВ на основе аллель специфичной ПЦР, с помощью которой определена частота мутаций среди больных, получивших медицинскую помощь в НМИЦ гематологии в 2019 году и у которых была выявлена ДНК ЦМВ, которая составила 2.8% для С603W и 0.3% для С592G. В большинстве случаев С592G выявляется совместно с С603W.

7. Список литературы.

1. Agut H., Collandre H., Aubin J.T., Guétard D., Favier V., Ingrand D., Montagnier L., & Huraux J.M. In vitro sensitivity of human herpesvirus-6 to antiviral drugs // *Res Virol.* 1989. V. 140. № C. P. 219–228.
2. Agut H. Deciphering the clinical impact of acute human herpesvirus 6 (HHV-6) infections // *Journal of Clinical Virology.* 2011. № 52. P. 164–171.
3. Ahlqvist J., & Mocarski E. Cytomegalovirus UL103 Controls Virion and Dense Body Egress // *J Virol.* 2011. V. 85. № 10. P. 5125–5135.
4. Albrecht T., Cavallo T., Cole N., & Graves K. Cytomegalovirus: Development and Progression of Cytopathic Effects in Human Cell Culture. // *Laboratory Investigation; Journal of Technical Methods and Pathology.* 1980. V. 42. № 1. P. 1–7.
5. Alwine J.C. The Human Cytomegalovirus Assembly Compartment: A Masterpiece of Viral Manipulation of Cellular Processes That Facilitates Assembly and Egress // *PLoS Pathog.* 2012. V. 8. № 9.
6. Andrei G., Loon E. Van, Lerut E., Victoor J., Meijers B., Bammens B., Sprangers B., Gillemot S., Fiten P., Opdenakker G., Lagrou K., Kuypers D., Snoeck R., & Naesens M. Persistent primary cytomegalovirus infection in a kidney transplant recipient: Multi-drug resistant and compartmentalized infection leading to graft loss // *Antiviral Res.* 2019. V. 168. № February. P. 203–209.
7. Aoki T., Hirono I., Kurokawa K., Fukuda H., Nahary R., Eldar A., Davison A.J., Waltzek T.B., Bercovier H., & Hedrick R.P. Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. // *J Virol.* 2007. V. 81. № 10. P. 5058–65.

8. Avery R.K., Alain S., Alexander B.D., Blumberg E.A., Chemaly R.F., Cordonnier C., Duarte R.F., Florescu D.F., Kamar N., Kumar D., Maertens J., Marty F.M., Papanicolaou G.A., Silveira F.P., Witzke O., Wu J., Sundberg A.K., & Fournier M. Maribavir for Refractory Cytomegalovirus Infections With or Without Resistance Post-Transplant: Results From a Phase 3 Randomized Clinical Trial // *Clinical Infectious Diseases*. 2021. № Xx Xx. P. 1–12.
9. Baldwin K. Ganciclovir-resistant Human herpesvirus-6 encephalitis in a liver transplant patient: A case report // *J Neurovirol*. 2011. V. 17. № 2. P. 193–195.
10. Bhella D., Rixon F.J., & Dargan D.J. Cryomicroscopy of human cytomegalovirus virions reveals more densely packed genomic DNA than in herpes simplex virus type 1. // *J Mol Biol*. 2000. V. 295. № 2. P. 155–161.
11. Biberfeld P., Kramarsky B., & Salahuddin SZ. Ultrastructural characterization of a new human B-lymphotropic DNA virus (HBLV) isolated from patients with lymphoproliferative disease // *Journal of Natural Cancer Institute*. 1987. № 79. P. 933–941.
12. Boivin G., Chou S., Quirk M.R., Erice A., & Colin Jordan M. Detection of ganciclovir resistance mutations and quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in leukocytes of patients with fatal disseminated CMV disease // *Journal of Infectious Diseases*. 1996. V. 173. № 3. P. 523–528.
13. Bolle L. De, Hatse S., & Verbeken E. Human herpesvirus 6 infection arrests cord blood mononuclear cells in G(2) phase of cell cycle. // *FEBS Lett*. 2004. № 560. P. 25–29.
14. Bolle L. De, Naesens L., & Clercq E. De. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy // *Clin Microbiol Rev*. 2005. V. 18. № 1. P. 217–245.

15. Bolovan-Fritts C.A., Mocarski E.S., & Wiedeman J.A. Peripheral blood CD14(+) cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. // *Blood*. 1999. V. 93. № 1. P. 394–8.
16. Boppana S.B., Rivera L.B., Fowler K.B., Mach M., & Britt W.J. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. // *N Engl J Med*. 2001. V. 344. № 18. P. 1366–71.
17. Bounaadja L., Piret J., Goyette N., & Boivin G. Analysis of HHV-6 mutations in solid organ transplant recipients at the onset of cytomegalovirus disease and following treatment with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir // *Journal of Clinical Virology*. 2013. V. 58. № 1. P. 279–282.
18. Boyle K. a, & Compton T. Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. // *J Virol*. 1998. V. 72. № 3. P. 1826–33.
19. Braun DK., Dominguez G., & Pellett PE. Human herpesvirus 6 // *Clin Microbiol Rev*. 1997. № 10. P. 521–567.
20. Britt W. Manifestations of human cytomegalovirus infection: Proposed mechanisms of acute and chronic disease // *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008. V. 325. P. 417–470.
21. Cameron C.E., Raney K.D., & Götte M. Viral genome replication // *Viral Genome Replication*. 2009. P. 1–636.
22. Campos A.B., Ribeiro J., Pinho Vaz C., Campilho F., Branca R., Campos A., Baldaque I., Medeiros R., Boutolleau D., & Sousa H. Genotypic resistance of cytomegalovirus to antivirals in hematopoietic stem cell transplant recipients from Portugal: A retrospective study // *Antiviral Res*. 2017.

23. Castor J., Cook L., Corey L., & Jerome K.R. Rapid detection directly from patient serum samples of human cytomegalovirus UL97 mutations conferring ganciclovir resistance // *J Clin Microbiol.* 2007. V. 45. № 8. P. 2681–2683.
24. Chaer F. El, Shah D.P., & Chemaly R.F. How i treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients // *Blood.* 2016.
25. Chee M.S., Satchwell S.C., Preddie E., Weston K.M., & Barrell B.G. Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. // *Nature.* 1990. T. 344. № 6268. C. 774–7.
26. Chen H., Beardsley G.P., & Coen D.M. Mechanism of ganciclovir-induced chain termination revealed by resistant viral polymerase mutants with reduced exonuclease activity // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014. V. 111. № 49. P. 17462–17467.
27. Chen S.J., Wang S.C., & Chen Y.C. Antiviral agents as therapeutic strategies against cytomegalovirus infections // *Viruses.* 2019. V. 12. № 1. P. 1–12.
28. Chou S., Marousek G.I., Wechel L.C. Van, Li S., & Weinberg A. Growth and drug resistance phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase region III mutations observed in clinical specimens // *Antimicrob Agents Chemother.* 2007. V. 51. № 11. P. 4160–4162.
29. Chou S. Cytomegalovirus UL97 mutations in the era of ganciclovir and maribavir // *Rev Med Virol.* 2008.
30. Chou S., Ercolani R.J., Sahoo M.K., Lefterova M.I., Strasfeld L.M., & Pinsky B.A. Improved Detection of Emerging Drug-Resistant Mutant Cytomegalovirus Subpopulations by Deep Sequencing // *Antimicrob Agents Chemother.* 2014. V. 58. № 8. P. 4697–4702.
31. Chou S. Approach to drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients // *Curr Opin Infect Dis.* 2015. V. 28. № 4. P. 293–9.

32. Chou S. Advances in the genotypic diagnosis of cytomegalovirus antiviral drug resistance // *Antiviral Res.* 2020. V. 176. № January. P. 104711.
33. Chou S., Ercolani R.J., & Vanarsdall A.L. Differentiated Levels of Ganciclovir Resistance Conferred by Mutations at Codons 591 to 603 of the Cytomegalovirus UL97 Kinase Gene // *J Clin Microbiol.* 2017. V. 55. № 7. P. 2098–2104.
34. Chou S., & Marousek G.I. Accelerated Evolution of Maribavir Resistance in a Cytomegalovirus Exonuclease Domain II Mutant // *J Virol.* 2008. V. 82. № 1. P. 246–253.
35. Chou S., Satterwhite L.E., & Ercolani R.J. New locus of drug resistance in the human cytomegalovirus UL56 gene revealed by in vitro exposure to letermovir and ganciclovir // *Antimicrob Agents Chemother.* 2018. V. 62. № 9.
36. Chou S.W. Cytomegalovirus drug resistance and clinical implications // *Transplant Infectious Disease.* 2001. V. 3. № SUPPL. 2. P. 20–24.
37. Clercq E. De, Naesens L., Bolle L. De, Schols D., Zhang Y., & Neyts J. Antiviral agents active against human // 2001. P. 381–395.
38. Daibata M., Taguchi T., & Nemoto Y. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA // *Blood.* 1999. № 94. P. 1545–1549.
39. Davison A.J., Akter P., Cunningham C., Dolan A., Addison C., Dargan D.J., Hassan-Walker A.F., Emery V.C., Griffiths P.D., & Wilkinson G.W.G. Homology between the human cytomegalovirus RL11 gene family and human adenovirus E3 genes // *Journal of General Virology.* 2003a. V. 84. № 3. P. 657–663.
40. Davison A.J., Dolan A., Akter P., Addison C., Dargan D.J., Alcendor D.J., McGeoch D.J., & Hayward G.S. The human cytomegalovirus genome revisited: Comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome // *Journal of General Virology.* 2003b. T. 84. № 1. C. 17–28.

41. Davison A.J., Dargan D.J., & Stow N.D. Fundamental and accessory systems in herpesviruses // *Antiviral Res.* 2002. T. 56. № 1. C. 1–11.
42. Dewhurst S., Krenitsky DM., & Dykes C. Human herpesvirus 6B origin: sequence diversity, requirement for two binding sites for origin-binding protein, and enhanced replication from origin multimers // *J Virol.* 1994. № 68. P. 6799–6803.
43. Dolan A., Cunningham C., Hector R.D., Hassan-Walker A.F., Lee L., Addison C., Dargan D.J., McGeoch D.J., Gatherer D., Emery V.C., Griffiths P.D., Sinzger C., McSharry B.P., Wilkinson G.W.G., & Davison A.J. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus // *Journal of General Virology.* 2004. V. 85. № 5. P. 1301–1312.
44. Domínduez G., Dambaugh T., & Stamey F. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A // *J Virol.* 1999. № 73. P. 8040–8052.
45. Dunn W., Chou C., Li H., Hai R., Patterson D., Stolc V., Zhu H., & Liu F. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. V. 100. № 24. P. 14223–8.
46. Eckle T., Lang P., Prix L., Jahn G., Klingebiel T., Handgretinger R., Selle B., Niethammer D., & Hamprecht K. Rapid development of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation in the early phase of immune cell recovery // *Bone Marrow Transplant.* 2002. V. 30. № 7. P. 433–439.
47. Gerna G., Zavattoni M., Baldanti F., Furione M., Chezzi L., Revello M.G., & Percivalle E. Circulating cytomegalic endothelial cells are associated with high human cytomegalovirus (HCMV) load in AIDS patients with late-stage disseminated HCMV disease // *J Med Virol.* 1998. V. 55. № 1. P. 64–74.

48. Giaever I. ²»ÉØÍ,ÐÔµÄ © 19 9 2 Nature Publishing Group // Nature. 1992. V. 359. P. 710–713.
49. Göhring K., Mikeler E., Jahn G., Rohde F., & Hamprecht K. Rapid semiquantitative real-time PCR for the detection of human cytomegalovirus UL97 mutations conferring ganciclovir resistance // Antivir Ther. 2008. V. 13. № 3. P. 461–466.
50. Göhring K., Feuchtinger T., Mikeler E., Lang P., Jahn G., Handgretinger R., & Hamprecht K. Dynamics of the emergence of a human cytomegalovirus UL97 mutant strain conferring ganciclovir resistance in a pediatric stem-cell transplant recipient // Journal of Molecular Diagnostics. 2009.
51. Göhring K., Hamprecht K., & Jahn G. Antiviral Drug- and Multidrug Resistance in Cytomegalovirus Infected SCT Patients // Comput Struct Biotechnol J. 2015.
52. Goldberg M.D., Honigman A., Weinstein J., Chou S., Taraboulos A., Rouvinski A., Shinder V., & Wolf D.G. Human Cytomegalovirus UL97 Kinase and Nonkinase Functions Mediate Viral Cytoplasmic Secondary Envelopment // J Virol. 2011. V. 85. № 7. P. 3375–3384.
53. Goldner T., Hewlett G., Ettischer N., Ruebsamen-Schaeff H., Zimmermann H., & Lischka P. The Novel Anticytomegalovirus Compound AIC246 (Letermovir) Inhibits Human Cytomegalovirus Replication through a Specific Antiviral Mechanism That Involves the Viral Terminase // J Virol. 2011. V. 85. № 20. P. 10884–10893.
54. Görzer I., Guelly C., Trajanoski S., & Puchhammer-Stöckl E. Deep sequencing reveals highly complex dynamics of human cytomegalovirus genotypes in transplant patients over time. // J Virol. 2010. V. 84. № 14. P. 7195–7203.
55. Hall CB., Caserta MT., & Schnabel K. Chromosomal integration of juman herpesvirus 6 is major mode for congenital human herpesvirus 6 infection // Pediatrics. 2008. № 122. P. 513–520.

56. Hentrich M., Oruzion D., & Jager G. Impact of human herpesvirus-6 after haematopoietic stem cell transplantation // *Br J Haematol.* 2005. № 128. P. 66–72.
57. Houldcroft C.J., Bryant J.M., Depledge D.P., Margetts B.K., Simmonds J., Nicolaou S., Tutill H.J., Williams R., Worth A.J.J., Marks S.D., Veys P., Whittaker E., & Breuer J. Detection of low frequency multi-drug resistance and novel putative maribavir resistance in immunocompromised pediatric patients with cytomegalovirus // *Front Microbiol.* 2016. V. 7. № SEP. P. 1–11.
58. Humar A., Malkan G., Moussa G., Greig P., Levy G., & Mazzulli T. Human herpesvirus-6 is associated with cytomegalovirus reactivation in liver transplant recipients // *Journal of Infectious Diseases.* 2000. V. 181. № 4. P. 1450–1453.
59. Isegawa Y., Hara J., Amo K., Osugi Y., Takemoto M., Yamanishi K., Fukunaga R., Shibata M., Ohshima A., Horiguchi Y., & Sugimoto N. Human herpesvirus 6 ganciclovir-resistant strain with amino acid substitutions associated with the death of an allogeneic stem cell transplant recipient // *Journal of Clinical Virology.* 2009.
60. Isegawa YI, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, Sunagawa T, Kawanishi K, Sashihara J, Hata A, Zou P, Kosuge H Y.K. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B // *J Virol.* 1999. V. 73. № 10. P. 8053–8063.
61. Jabs D.A., Enger C., Dunn J.P., Forman M., & Hubbard L. Cytomegalovirus retinitis and viral resistance: 3. Culture results // *Am J Ophthalmol.* 1998. V. 126. № 4. P. 543–549.
62. Keyvani H., Saroukalaei S.T., & Mohseni A.H. Assessment of the human cytomegalovirus UL97 gene for immunosuppressed identification of resistance patients to ganciclovir in Iranian // *Jundishapur J Microbiol.* 2016. V. 9. № 5.

63. Kleiboeker S., Nutt J., Schindel B., Dannehl J., & Hester J. Cytomegalovirus antiviral resistance: Characterization of results from clinical specimens // *Transplant Infectious Disease*. 2014. V. 16. № 4. P. 561–567.
64. Kotton C.N. Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation // *Nat Rev Nephrol*. 2010. V. 6. № 12. P. 711–721.
65. Kotton C.N., Kumar D., Caliendo A.M., Huprikar S., Chou S., Danziger-Isakov L., & Humar A. The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. , 2018. 900–931 c.
66. Krishna B.A., Wills M.R., & Sinclair J.H. Advances in the treatment of cytomegalovirus // *Br Med Bull*. 2019. V. 131. № 1. P. 5–17.
67. Lin A., Maloy M., Su Y., Bhatt V., DeRespiris L., Griffin M., Lau C., Proli A., Barker J., Shaffer B., Giralt S.A., Jakubowski A.A., Papadopoulos E.B., Papanicolaou G.A., Seo S.K., & Perales M.A. Letermovir for primary and secondary cytomegalovirus prevention in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients: Real-world experience // *Transplant Infectious Disease*. 2019. V. 21. № 6. P. 1–6.
68. Ljungman P. Molecular monitoring of viral infection after hematopoietic stem cell transplantation // *Int J Hematol*. 2010. № 91. P. 596–601.
69. Ljungman P. Cytomegalovirus infections in transplant patients // *Scand.J.Infect.Dis.Suppl*. 1996. V. 100. № 0300-8878 (Print). P. 59–63.
70. Ljungman P., Griffiths P., & Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. // *Clin Infect Dis*. 2002. V. 34. № 8. P. 1094–7.
71. Lodding I.P., Jørgensen M., Bennedbæk M., Kirkby N., Naegele K., Gustafsson F., Perch M., Rasmussen A., Sengeløv H., Sørensen S.S., Hirsch H.H., & Lundgren J.D. Development and dynamics of cytomegalovirus UL97 ganciclovir resistance mutations

in transplant recipients detected by next-generation sequencing // *Open Forum Infect Dis.* 2021. V. 8. № 10.

72. Lurain N.S., Weinberg A., Crumpacker C.S., & Chou S. Sequencing of cytomegalovirus UL97 gene for genotypic antiviral resistance testing // *Antimicrob Agents Chemother.* 2001. V. 45. № 10. P. 2775–2780.

73. Manichanh C., Grenot P., Gautheret-Dejean A., Debré P., Huraux J.M., & Agut H. Susceptibility of human herpesvirus 6 to antiviral compounds by flow cytometry analysis // *Cytometry.* 2000. V. 40. № 2. P. 135–140.

74. Manichanh C., Olivier-Aubron C., Lagarde J.P., Aubin J.T., Bossi P., Gautheret-Dejean A., Huraux J.M., & Agut H. Selection of the same mutation in the U69 protein kinase gene of human herpesvirus-6 after prolonged exposure to ganciclovir in vitro and in vivo // *Journal of General Virology.* 2001. V. 82. № 11. P. 2767–2776.

75. Mendelson M., Monard S., Sissons P., & Sinclair J. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors // *Journal of General Virology.* 1996. V. 77. № 12. P. 3099–3102.

76. Murphy E., & Shenk T.E. Human cytomegalovirus genome // *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008. T. 325. C. 1–19.

77. Neuber S., Wagner K., Goldner T., Lischka P., Steinbrueck L., Messerle M., & Borst E.M. Mutual Interplay between the Human Cytomegalovirus Terminase Subunits pUL51, pUL56, and pUL89 Promotes Terminase Complex Formation // *J Virol.* 2017. V. 91. № 12.

78. O'Brien M.S., Markovich K.C., Selleseth D., DeVita A. V., Sethna P., & Gentry B.G. In vitro evaluation of current and novel antivirals in combination against human cytomegalovirus // *Antiviral Res.* 2018. V. 158. P. 255–263.

79. Pellet P.E., & Roizmann B. *Field Virology*. 5th edition // New York: Lippencott-Raven. 2007. V. 2. P. 2479–2500.
80. Piret J., & Boivin G. Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus // *Rev Med Virol*. 2014.
81. Piret J., & Boivin G. Clinical development of letermovir and maribavir: Overview of human cytomegalovirus drug resistance // *Antiviral Res*. 2019. V. 163. P. 91–105.
82. Puchhammer-Stöckl E., Görzer I., Zoufaly A., Jaksch P., Bauer C.C., Klepetko W., & Popow-Kraupp T. Emergence of multiple cytomegalovirus strains in blood and lung of lung transplant recipients // *Transplantation*. 2006. V. 81. № 2. P. 187–194.
83. Ramanan P., & Razonable R.R. Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation: A review // *Infect Chemother*. 2013. V. 45. № 3. P. 260–271.
84. Roby C., & Gibson W. Characterization of phosphoproteins and protein kinase activity of virions, noninfectious enveloped particles, and dense bodies of human cytomegalovirus. // *J Virol*. 1986. V. 59. № 3. P. 714–27.
85. Rossi C., Delforge M.L., Jacobs F., Wissing M., Pradier O., Remmelink M., Byl B., Thys J.P., & Liesnard C. Fatal primary infection due to human herpesvirus 6 variant A in a renal transplant recipient // *Transplantation*. 2001. V. 71. № 2. P. 288–292.
86. Safronetz D., Petric M., Tellier R., Parvez B., & Tipples G.A. Mapping ganciclovir resistance in the human herpesvirus-6 U69 protein kinase // *J Med Virol*. 2003.
87. Sahoo M.K., Lefterova M.I., Yamamoto F., Waggoner J.J., Chou S., Holmes S.P., Anderson M.W., & Pinsky B.A. Detection of cytomegalovirus drug resistance mutations by next-Generation sequencing // *J Clin Microbiol*. 2013. V. 51. № 11. P. 3700–3710.

88. Seya T., Hara T., Matsumoto M., Sugita Y., & Akedo H. Complement-mediated tumor cell damage induced by antibodies against membrane cofactor protein (MCP, CD46) // *J Exp Med*. 1990. V. 172. № 6. P. 1673–1680.
89. Shannon-Lowe C.D., & Emery V.C. The effects of maribavir on the autophosphorylation of ganciclovir resistant mutants of the cytomegalovirus {UL}97 protein // *Herpesviridae*. 2010. V. 1. № 1. P. 4.
90. Sharma M., Bender B.J., Kamil J.P., Lye M.F., Pesola J.M., Reim N.I., Hogle J.M., & Coen D.M. Human Cytomegalovirus UL97 Phosphorylates the Viral Nuclear Egress Complex // *J Virol*. 2015. V. 89. № 1. P. 523–534.
91. Sinclair J., & Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus // *Journal of General Virology*. 2006. T. 87. № 7. C. 1763–1779.
92. Sinzger C., & Jahn G. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis // *Intervirology*. 1996. V. 39. № 5–6. P. 302–319.
93. Smith J. a, & Pari G.S. Human cytomegalovirus UL102 gene. // *J Virol*. 1995. V. 69. № 3. P. 1734–1740.
94. Takenaka K., Nishida T., Asano-Mori Y., Oshima K., Ohashi K., Mori T., Kanamori H., Miyamura K., Kato C., Kobayashi N., Uchida N., Nakamae H., Ichinohe T., Morishima Y., Suzuki R., Yamaguchi T., & Fukuda T. Cytomegalovirus Reactivation after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation is Associated with a Reduced Risk of Relapse in Patients with Acute Myeloid Leukemia Who Survived to Day 100 after Transplantation: The Japan Society for Hematopoietic C // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015. V. 21. № 11. P. 2008–2016.
95. Tamashiro J.C., & Spector D.H. Terminal structure and heterogeneity in human cytomegalovirus strain AD169. // *J Virol*. 1986. V. 59. № 3. P. 591–604.

96. Tandon R., & Mocarski E.S. Viral and host control of cytomegalovirus maturation // Trends Microbiol. 2012. T. 20. № 8. C. 392–401.
97. Taylor-Wiedeman J., Sissons P., & Sinclair J. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. // J Virol. 1994. V. 68. № 3. P. 1597–1604.
98. Torrisi MR., Gentile M., & G. C. Intracellular transport and maturation pathway of human herpesvirus 6 // Virology. 1999. № 257. P. 460–471.
99. Volin L., Lautenschlager I., & Juvonen E. Human herpesvirus 6 antigenaemia in allogeneic stem cell transplant recipients: impact on clinical course and association with other beta-herpesviruses // Br J Haematol. 2004. № 126. P. 690–696.
100. Wallaschek N., Gravel A., Flamand L., & Kaufer B.B. The putative U94 integrase is dispensable for human herpesvirus 6 (HHV-6) chromosomal integration // Journal of General Virology. 2016. V. 97. № 8. P. 1899–1903.
101. Ward K.N., Hill J.A., Hubacek P., La Camara R. De, Crocchiolo R., Einsele H., Navarro D., Robin C., Cordonnier C., & Ljungman P. Guidelines from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia for management of HHV-6 infection in patients with hematologic malignancies and after hematopoietic stem cell transplantation // Haematologica. 2019. V. 104. № 11. P. 2155–2163.
102. Ward KN., Andrews NJ., & Verity CM. Human herpesviruses-6 and -7 each cause significant neurological morbidity in Britain and Ireland // Arch Dis Child. 2005. № 90. P. 619–623.
103. Ward K.N., & Clark D.A. Roseoloviruses: Human Herpesviruses 6A, 6B and 7 // Principles and Practice of Clinical Virology: Sixth Edition. 2009. V. 7. P. 223–244.

104. Weller T.H., MacAuley J.C., Craig J.M., & Wirth P. Isolation of Intranuclear Inclusion Producing Agents from Infants with Illnesses Resembling Cytomegalic Inclusion Disease // *Exp Biol Med*. 1957. V. 94. № 1. P. 4–12.
105. Weststrate M.W., Geelen J.L.M.C., & Noordaa J. Van Der. Human cytomegalovirus DNA: Physical maps for the restriction endonucleases BglIII, HindIII and XbaI // *Journal of General Virology*. 1980. V. 49. № 1. P. 1–21.
106. Williams S.L., Hartline C.B., Kushner N.L., Harden E.A., Bidanset D.J., Drach J.C., Townsend L.B., Underwood M.R., Biron K.K., & Kern E.R. In vitro activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides against herpesviruses // *Antimicrob Agents Chemother*. 2003. V. 47. № 7. P. 2186–2192.
107. Wolf D.G., Smith I.L., Lee D.J., Freeman W.R., Flores-Aguilar M., & Spector S.A. Mutations in human cytomegalovirus UL97 gene confer clinical resistance to ganciclovir and can be detected directly in patient plasma. // *Journal of Clinical Investigation*. 1995. V. 95. № 1. P. 257–263.
108. Wolf D.G., Yaniv I., Honigman A., Kassis I., Schonfeld T., & Ashkenazi S. Early Emergence of Ganciclovir-Resistant Human Cytomegalovirus Strains in Children with Primary Combined Immunodeficiency // *Journal of Infectious Diseases*. 1998. V. 178. № 2. P. 535–538.
109. Wu D.Y., Ugozzoli L., Pal B.K., & Wallace R.B. Allele-specific enzymatic amplification of β -globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989. V. 86. № 8. P. 2757–2760.
110. Yeo A.C., Chan K.P., Kumarasinghe G., & Yap H.K. Rapid detection of codon 460 mutations in the UL97 gene of ganciclovir-resistant cytomegalovirus clinical isolates by real-time PCR using molecular beacons // *Mol Cell Probes*. 2005. V. 19. № 6. P. 389–393.

111. Yu U., Wang X., Zhang X., Wang C., Yang C., Zhou X., Li Y., Huang X., Wen J., Wen F., & Liu S. Cytomegalovirus Infection and the Implications of Drug-Resistant Mutations in Pediatric Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: A Retrospective Study from a Tertiary Hospital in China // *Infect Dis Ther.* 2021. V. 10. № 3. P. 1309–1322.
112. Zaia J. a. Prevention and management of CMV-related problems after hematopoietic stem cell transplantation // *Bone Marrow Transplant.* 2002. V. 29. P. 633–638.
113. Zhou L., Harder T.C., Ullmann U., & Rautenberg P. Rapid detection by reverse hybridization of mutations in the UL97 gene of human cytomegalovirus conferring resistance to ganciclovir // *Journal of Clinical Virology.* 1999. V. 13. № 1–2. P. 53–59.
114. Балашов Д.Н., Трахтман П.Е., Скоробогатова Е.В., Скворцова Ю.В., Шипицына И.П., Масчан А.А. факторы риска цитомегаловирусной инфекции у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток // *Онкогематология.* 2010. № 4. С. 20–26.
115. Орлова С.В., Стома И.О., Шмелева Н.П., & Сивец Н.В. современное состояние проблемы герпесвирусных инфекций 6-го и 7-го типов с разными клиническими формами, возможности лечения // *Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение.* 2021. Т. 37. № 2. С. 78–86.
116. Панкратова О.С., Чухловин А.Б., Зубаровская Л.С., Афанасьев Б.В. Частота выявления вирусов группы герпеса и риск типичных осложнений при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток // *Ученые записки СПбГМУ им. И. П. Павлова.* 2010. Т. 17. № 1. С. 6–10.
117. АмплиПрайм РИБО-преп [Электронный ресурс]. URL: <https://www.nextbio.ru/catalog/ruchnaya-extrakciya/amplipraym-ribo-prep/>.

