

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии  
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

Юрлов Кирилл Иванович

**РОЛЬ ГЕРПЕСВИРУСОВ В ТЕЧЕНИИ И ИСХОДЕ ХРОНИЧЕСКИХ  
ГЕПАТИТОВ, ПРОСТАТИТОВ И COVID-19**

1.5.10. Вирусология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
профессор  
Куш Алла Александровна

Москва – 2024

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ .....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	15
1.1 Герпесвирусы человека .....	15
1.1.1 Общие сведения о герпесвирусах человека .....	15
1.1.2 Структура и репликация герпесвирусов .....	18
1.1.3 Латентная герпесвирусная инфекция .....	21
1.1.4 Реактивация герпесвирусов .....	24
1.2 Заболевания, вызываемые герпесвирусами человека .....	26
1.3 Хронические и острые воспалительные заболевания человека .....	29
1.3.1 Хронические воспалительные инфекционные заболевания. Хронические гепатиты.....	30
1.3.2 Хронический простатит/синдром хронической тазовой боли .....	32
1.3.3 Мужское бесплодие.....	33
1.3.4 Коронавирус SARS-CoV-2 и COVID-19 .....	35
1.4 Противовирусные соединения в отношении герпесвирусов человека .....	37
1.4.1 Зарегистрированные соединения, обладающие противовирусной активностью в отношении цитомегаловирусной инфекции.....	37
1.4.2 Кандидатные соединения для борьбы с герпесвирусными инфекциями... 39	
1.4.2.1 Фуллерены. Характеристика и противовирусные свойства.....	39
1.4.2.2 Дисперсный фуллерен C <sub>60</sub> .....	41
1.4.2.3 Гетеродимеры против ЦМВИ.....	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	45
2.1 Дизайн исследования .....	45

2.2 Основные реактивы.....	46
2.3 Пациенты .....	47
2.3.1 Клинические материалы .....	49
2.3.2 Дифференциальная диагностика вирусного гепатита .....	50
2.3.3 Обследование пациентов с хроническим гепатитом С .....	50
2.3.4 Анализ уровня цитокинов в образцах эякулята .....	51
2.4 Анализ ДНК герпесвирусов человека методом ПЦР в реальном времени в клинических образцах от пациентов и в клеточной культуре .....	51
2.5 Анализ противовирусной активности изученных соединений.....	53
2.5.1 Клеточная культура .....	53
2.5.2 Вирус .....	53
2.5.3 Определение инфекционной активности вируса .....	54
2.5.4 Производные фуллерена C <sub>60</sub> .....	54
2.5.5 Дисперсный фуллерен dC <sub>60</sub> .....	55
2.5.6 Гетеродимеры .....	56
2.5.7 Определение цитотоксических свойств соединений.....	58
2.5.8 Определение противовирусной активности соединений .....	58
2.5.9 Иммуноцитохимическое окрашивание клеток культуры .....	60
2.5.10 Изучение влияния dC <sub>60</sub> на адсорбцию ЦМВ на клеточной мембране.....	61
2.5.11 Изучение влияния фуллерена dC <sub>60</sub> на экспрессию вирусных белков в лечебной схеме воздействия.....	63
2.5.12 Выявление белков методом иммуноблоттинга в клеточной культуре .....	63
2.5.13 Измерение концентрации белков в пробах для электрофореза по методу Брэдфорда .....	64

2.5.14 Анализ мРНК вирусных и клеточных генов методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в культуре клеток .....	65
2.6 Статистическая обработка результатов .....	66
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	67
3.1 Влияние ГВЧ на течение и прогноз гепатитов разной этиологии .....	67
3.1.1 Распространённость герпесвирусов человека среди больных с гепатитами .....	67
3.1.2 Анализ клинико-лабораторных данных .....	69
3.1.3 Сравнительный анализ частоты выявления герпесвирусов в различных биологических материалах от больных гепатитом С .....	72
3.2 Герпесвирусы в хронических воспалительных заболеваниях урогенитального тракта мужчин .....	80
3.2.1 Обнаружение герпесвирусов при ХП/СХТБ и действие противовирусной терапии .....	80
3.2.2 Влияние ГВЧ-инфекций на цитокиновый профиль спермоплазмы мужчин с ХП/СХТБ .....	87
3.2.3 Ассоциация герпесвирусов с мужским бесплодием .....	89
3.3 Сравнительный анализ ДНК герпесвирусов человека в аутопсийных образцах от умерших пациентов с подтверждённым диагнозом COVID-19, с разной степенью повреждения органов .....	94
3.4 Цитотоксические и противовирусные свойства соединений .....	100
3.4.1 Цитотоксические свойства производных фуллерена C <sub>60</sub> и дисперсного фуллерена dC <sub>60</sub> .....	100
3.4.2 Противовирусные свойства производных фуллерена C <sub>60</sub> и дисперсного фуллерена dC <sub>60</sub> .....	101
3.4.3 Механизм действия дисперсного фуллерена dC <sub>60</sub> против цитомегаловирусной инфекции <i>in vitro</i> .....	105

3.4.3.1 Влияние дисперсного фуллерена dC <sub>60</sub> на адсорбцию ЦМВ на клеточной мембране.....	105
3.4.3.2 Влияние дисперсного фуллерена dC <sub>60</sub> на экспрессию генов ЦМВ <i>UL122</i> и <i>UL54</i> .....	106
3.4.3.3 Влияние фуллерена dC <sub>60</sub> на содержание вирусных белков в клетках, зараженных ЦМВ .....	107
3.4.3.3.1 Иммуноцитохимический анализ влияния dC <sub>60</sub> на содержание вирусных белков.....	107
3.4.3.3.2 Анализ влияния dC <sub>60</sub> на содержание вирусных белков методом иммуноблотинга .....	109
3.4.4 Противовирусные свойства гетеродимеров в отношении цитомегаловирусной инфекции.....	110
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	112
ВЫВОДЫ .....	126
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	131
Приложение А Названия, формулы и молекулярная масса производных фуллерена C <sub>60</sub> .....	151

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности**

Герпесвирусы человека (ГВЧ) – 9 представителей семейства *Orthoherpesviridae*, широко распространены в человеческой популяции, антитела к ГВЧ определяют у 40-100% населения, в зависимости от региона и социально-экономического статуса страны. У большинства иммунокомпетентных лиц герпесвирусные инфекции (ГВИ) протекают бессимптомно, в то время как у лиц, имеющих сниженный иммунитет, они приводят к системным заболеваниям с тяжелыми осложнениями и высокой смертностью [47, 122, 136]. Хронические воспалительные заболевания (ХВЗ) как инфекционной, так и неинфекционной природы, представляют серьезную проблему здравоохранения, так как они являются одними из основных причин смерти среди населения во всем мире [1]. Роль ГВЧ в ХВЗ изучена недостаточно, имеющиеся данные противоречивы. В связи с этим в работе изучены ГВЧ при двух широко распространенных и социально значимых ХВЗ: хронических вирусных гепатитах, а также при абактериальном хроническом простатите/синдроме хронической тазовой боли (ХП/СХТБ категории IIIA).

Основными этиологическими агентами хронических гепатитов являются вирусы гепатитов (А, В, С, Д, Е). Согласно опубликованным данным, парентеральными гепатитами, вызываемыми вирусами гепатита В (ВГВ) и гепатита С (ВГС) суммарно страдают приблизительно 400 млн. человек во всем мире, и от 1 до 4 млн. человек ежегодно умирают [157]. Количество пациентов с хроническими гепатитами, несмотря на успехи терапии гепатита С, увеличивается, и это создает условия развития цирроза печени и гепатоклеточной карциномы. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) отмечает, что этому способствуют недостаточно эффективное лечение гепатита В и отсутствие вакцины против гепатита С. Работы, направленные на выяснение роли ГВЧ в воспалительных заболеваниях печени, отрывочны и противоречивы [32, 34, 176]. В последнее время появляются данные о том, что инфекции, вызываемые вирусом Эпштейна-Барр

(ВЭБ) и цитомегаловирусом (ЦМВ) у иммунокомпетентных хозяев могут приводить к гепатиту, тяжесть которого варьирует от бессимптомного течения до развития острой печеночной недостаточности [16, 34]. Тем не менее, вопрос о том, могут ли ГВЧ влиять на хронические заболевания печени, остается спорным. Поэтому изучение распространения ГВЧ у пациентов с гепатитами различной этиологии, а также оценка влияния ГВЧ на тяжесть заболевания и его исходы является актуальной проблемой.

Мнения исследователей относительно роли ГВЧ при абактериальных хронических заболеваниях урогенитального тракта мужчин расходятся, неоднозначна также оценка влияния на репродуктивную функцию мужчин. В связи с этим в работе изучено распространение и вирусная нагрузка ВЭБ, ЦМВ и вирусами герпеса человека 6А и 6В (ВГЧ-6А/6В) в материалах из урогенитального тракта мужчин: в эякуляте, в секрете предстательной железы и в уретре у пациентов с ХП/СХТБ. Серьезной медицинской и социальной проблемой является бесплодие, которым страдают около 8-15% семейных пар [7]. Среди причин бесплодия одно из первых мест занимают ХВЗ урогенитального тракта. Мужское бесплодие составляет около 50% всех случаев бесплодия [7]. Лечение ХВЗ урогенитального тракта и их последствий, в том числе – мужского бесплодия, крайне затруднено и часто неэффективно. Выяснение ассоциации мужского бесплодия с ГВИ является актуальной задачей, так как открывает перспективы разработки противовирусных схем лечения, что может повысить мужскую фертильность и улучшить качество жизни населения и демографическую ситуацию в стране.

ГВЧ обнаруживают не только у больных ХВЗ, но также и у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями. Примером является короновиральная инфекция-19 (coronavirus disease 2019 (COVID-19)), вызываемая коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)). Вирус быстро мутирует, что позволяет ему избегать защитного действия разработанных вакцин и лечебных средств. Особенно опасен SARS-CoV-2 для пожилых людей и пациентов с сопутствующими заболеваниями. В ряде работ описано присутствие ГВЧ у пациентов с COVID-19 [66, 71]. Показано,

что у пациентов с COVID-19 в критическом состоянии наблюдается реактивация ГВЧ разных типов [153]. Однако влияние сопутствующих ГВИ на течение и исход COVID-19 пока недостаточно изучено. В связи с этим изучение влияния ГВИ на течение COVID-19 является актуальной задачей.

Арсенал существующих препаратов против ГВИ обладает рядом существенных недостатков: неэффективность в случае появления ГВЧ с мутациями, обеспечивающих устойчивость к применяемым препаратам. Помимо этого, существующие препараты обладают широким спектром побочных действий, что особенно критично при лечении пациентов из группы риска (беременные; новорожденные; лица на иммуносупрессивной терапии; инфицированные вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ)).

В настоящее время ведется разработка новых препаратов против ГВИ, сохраняющих противовирусные свойства при мутациях вируса и обладающих низкой токсичностью. Одними из таких соединений являются фуллерены и их производные. Особый интерес привлекает дисперсный фуллерен  $C_{60}$  (далее  $dC_{60}$ ), обладающий низкой токсичностью. Исследование показало способность  $dC_{60}$  подавлять инфекцию вирусом простого герпеса 1 типа *in vitro* и *in vivo* [100]. Представляется актуальным изучение противовирусных свойств  $dC_{60}$  в отношении других ГВЧ и механизма противовирусного действия  $dC_{60}$  в зараженных клетках.

ГВЧ вызывают серьезные оппортунистические инфекции у пациентов, инфицированных ВИЧ на стадии синдрома приобретённого иммунного дефицита (СПИД). ВИЧ-1 вызывает реактивацию ГВЧ, о чем свидетельствует обнаружение активной формы ЦМВ-инфекции (ЦМВИ) у 29,08% пациентов с диагностированной ВИЧ-инфекцией и в большинстве случаев является причиной смерти ВИЧ-инфицированных [115, 174, 178]. Разработка новых терапевтических средств, которые одновременно направлены на подавление ВИЧ-1 и ЦМВ, может способствовать более эффективному лечению пациентов с сочетанными вирусными инфекциями. К преимуществам таких соединений двойного действия относятся удобство применения и пролонгированное

высвобождение активных веществ, что, обычно, приводит к меньшей токсичности, чем комбинация исходных препаратов [43, 137].

### **Цель исследования**

Оценить роль герпесвирусных инфекций при хронических гепатитах, воспалительных заболеваниях урогенитального тракта мужчин и при COVID-19, а также изучить противовирусные свойства дисперсного фуллерена  $C_{60}$  и гетеродимеров в отношении ЦМВИ.

### **Задачи исследования:**

1. Изучить влияние герпесвирусов ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6 на течение хронических гепатитов.
2. Провести анализ распространения и уровень ДНК ГВЧ в клинических материалах из урогенитального тракта (УГТ) мужчин с абактериальным ХП и нарушениями фертильности и оценить действие противовирусной терапии на проявление симптомов ХП и фертильность.
3. Определить частоту встречаемости и концентрацию ДНК ГВЧ в аутопсийных материалах из органов пациентов, умерших с подтверждённым диагнозом COVID-19.
4. Изучить действие дисперсного фуллерена  $dC_{60}$  и производных фуллерена  $C_{60}$  в отношении ЦМВИ и влияние  $dC_{60}$  на жизненный цикл ЦМВ в фибробластах человека, инфицированных ЦМВ *in vitro*.
5. Определить способность гетеродимеров проявлять противовирусную активность в отношении ЦМВ в клеточных культурах.

### **Научная новизна**

Обнаружено присутствие ДНК ГВЧ в биоптатах печени пациентов с вирусными гепатитами В и С, а также в печени пациентов с неустановленной причиной хронического гепатита. Показано ухудшение клинического состояния и более частое развитие цирроза печени у больных с гепатитами в сочетании с инфекцией ГВЧ по сравнению с пациентами без ГВЧ.

Показана высокая частота распространения ДНК ГВЧ в УГТ пациентов с абактериальным хроническим простатитом (ХП/СХТБ ША), в том числе

ассоциированным с бесплодием. Впервые установлено, что противовирусные препараты валацикловир и интерферон альфа-2b значительно снижают концентрацию или вызывают элиминацию ДНК ГВЧ из УГТ и восстанавливают фертильность у значительной части больных ХП/СХТБ IIIA.

Впервые обнаружены ГВЧ: ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6, а также вирус простого герпеса (ВПГ) и вирус Варицелла-Зостер (ВЗВ) в аутопсийных материалах из 5 органов (печень, легкие, лимфоузлы, селезенка и головной мозг) у пациентов с летальным исходом COVID-19. Установлена высокая концентрация ДНК ГВЧ в аутопсийных материалах, что указывает на возможную роль реактивации ГВЧ в исходе COVID-19.

Впервые показаны противовирусные свойства дисперсного фуллерена  $dC_{60}$  и изучены механизмы противовирусного действия  $dC_{60}$  в модельной клеточной системе ЦМВИ *in vitro*.

Впервые установлена противовирусная активность гетеродимеров в отношении ЦМВ *in vitro*.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость работы заключается в том, что обнаруженная высокая частота встречаемости и высокое содержание ДНК герпесвирусов у пациентов с острыми и хроническими воспалительными заболеваниями разной этиологии указывает на возможную реактивацию герпесвирусов, ассоциацию с более тяжелым течением болезни и с риском развития летальных исходов.

Результаты диссертационной работы свидетельствуют о необходимости включения в алгоритмы обследования пациентов с гепатитами разной этиологии, пациентов с хроническими простатитами ХП/СХТБ IIIA и пациентов с тяжелым течением острого респираторного заболевания COVID-19 количественного анализа ДНК ГВЧ и, в случае обнаружения ДНК в высоких концентрациях, использования противовирусной терапии.

Показана перспективность дисперсного фуллерена  $dC_{60}$ , а также гетеродимеров для разработки на их основе новых препаратов для терапии ЦМВИ.

## **Внедрение полученных результатов в практику**

Результаты работы внедрены в диагностический и терапевтический алгоритм ведения пациентов с хронической герпесвирусной инфекцией в Медицинском научном центре общества с ограниченной ответственностью "Скрин Доктор" (ООО МНЦ «Скрин Доктор»). Работа проводится в соответствии со стандартами оказания медицинской помощи Департамента здравоохранения г. Москвы.

Основные научные положения, выводы и рекомендации диссертационной работы внесены в учебный курс аспирантов, обучающихся по направлению подготовки «1.5.10. Вирусология» в Федеральном государственном бюджетном учреждении "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Оптимизирован и внедрен в лабораторную практику ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России метод определения цитотоксичности производных фуллерена C<sub>60</sub>. Значения трех параметров цитотоксичности внесены в базу данных РФ (свидетельство о государственной регистрации базы данных № RU2019620936, 2019).

## **Методология и методы исследования**

Методологической основой исследования послужили современные подходы к анализу теоретических и прикладных проблем вирусологии и применение комплекса экспериментальных методов вирусологии. В работе использованы также методы иммунологии, иммуноцитохимии, актуальные методы молекулярной биологии и методы прикладной статистики.

## **Основные положения, выносимые на защиту**

1. ГВЧ увеличивают тяжесть течения гепатитов разной этиологии по клиническим, гистологическим, вирусологическим и биохимическим показателям, а также усложняет лечение гепатитов.

2. ГВЧ могут быть этиологическими факторами, в том числе единственными, хронического абактериального простатита ХП/СХТБ IIIA. Препараты,

специфичные в отношении ГВИ, улучшают качество жизни и повышают фертильность мужчин с ХП/СХТБ IIIA, инфицированных ГВЧ.

3. ГВЧ обнаружены в аутопсийных материалах из печени, легких, лимфоузлов, селезенки и головного мозга у большинства пациентов, скончавшихся с подтверждённым диагнозом COVID-19, что может указывать на негативное влияние ГВЧ на исход заболевания у больных COVID-19.

4. Дисперсный фуллерен dC<sub>60</sub> характеризуется низкой цитотоксичностью по сравнению со стандартными препаратами против ГВИ и обладает противовирусными свойствами в отношении ЦМВИ в микробицидной, профилактической и терапевтической схемах воздействия в модельной системе ЦМВИ *in vitro*.

5. Гетеродимерные конъюгаты, состоящие из производных азидотимидина (AZT) и 1-[ω-(фенокс)алкил]урацила, эффективно подавляют инфекционную активность ЦМВ в культуре клеток человека.

### **Степень достоверности результатов**

Достоверность полученных результатов обусловлена использованием достаточного объема фактического материала, применением адекватных поставленным задачам методов исследования и использованием современных методов статистической обработки экспериментальных данных. Надежность результатов была обеспечена статистической обработкой полученных результатов при уровне значимости <0,05.

### **Апробация работы**

Апробация диссертации состоялась 6 февраля 2024 года на научной конференции Совета по предварительной экспертизе диссертационных работ по проблемам «Молекулярная биология» и «Общая вирусология и инфекционные болезни» подразделения «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Протокол №49).

Основные результаты работы были представлены на следующих научных мероприятиях: «Конгресс с международным участием Гармонизация подходов в фармацевтической разработке» – Москва, Российский университет дружбы

народов, 2018, «Молекулярная диагностика и биобезопасность 2022», – Москва, 2022, «XVI Всероссийский съезд национального альянса дерматологов и венерологов и косметологов» – Москва, 2023, «XV Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского» – Москва, 2023.

### **Личный вклад автора**

Основной объем исследований выполнены автором лично. Материалы для исследования предоставлялись сотрудниками Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ») д.м.н. Кистенёвой Л.Б., к.м.н. Хлоповой И.Н. и сотрудником Академии постдипломного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Федерального научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико биологического агентства» (Академия постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России) д.м.н. Ковалыком В.П. Электронномикроскопические исследования сперматозоидов проведены сотрудницей Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова" (ФГБНУ «МГНЦ») д.б.н. Брагиной Е.Е.. Дифференциальная диагностика вирусных гепатитов и генотипирование вирусов были выполнены сотрудником ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава РФ Самохваловым Е.И. Оценка степени фиброза печени у больных хроническим гепатитами была проведена сотрудницей ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» Келли Е.И. Самостоятельно проведен анализ и интерпретация полученных результатов; лично или при непосредственном участии автора подготовлены публикации по материалам исследования. Суммарное личное участие автора в работе составляет не менее 70%.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности 1.5.10.**

#### **«Вирусология»**

Основные научные положения диссертации соответствуют пунктам 6, 10, 11 паспорта научной специальности 1.5.10. «Вирусология».

### **Публикации**

По результатам диссертационной работы опубликовано 14 работ: 9 статей, в том числе 6 статей в журналах, рекомендуемых ВАК, 5 статей в scopus, 3 статьи в зарубежных журналах, 4 тезисов докладов в сборниках материалов российских и международных конференций, а также оформлено свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2019620936 «Цитотоксические свойства производных фуллерена  $C_{60}$ », дата государственной регистрации в Реестре баз данных 03 июня 2019 г.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 154 страницах и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение, выводы, перечень условных обозначений, библиографический список литературы, включающий 178 источников, в том числе 17 отечественных и 161 зарубежных, а также 1 приложение. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 34 рисунками.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Герпесвирусы человека

#### 1.1.1 Общие сведения о герпесвирусах человека

Некоторые описания поражений гениталий, напоминающих поражения, вызванные вирусом простого герпеса, были обнаружены на шумерских табличках (датированных 3-м тысячелетием до н. э.) и на папирусе Эберса (около 1500 г. до н. э.). В Древней Греции Гиппократ описал поражения, предположительно вызванные ВПГ, и назвал их герпесом (от греческого слова «herpein» – ползать), что соответствовало характеру распространения поражений. Первым автором, описавшим заболевание с поражениями, характерными при опоясывающем герпесе, был Цельсий. Геродот был первым, назвавшим это заболевание лихорадочным герпесом, проявляющимся лихорадкой, небольшими волдырями во рту и язвами на губах. Джон Астрик, врач короля Людовика XIV, опубликовал книгу «de Morbis Veneris Libri Sex», в которой он написал о генитальном герпесе после изучения венерического заболевания у французских проституток, а в 1896 году Фурнье написал о диагностике и лечении генитального герпеса [141].

Вирусы герпеса включают более 200 представителей семейства *Orthoherpesviridae*, которые заражают почти всех позвоночных и некоторых беспозвоночных [26]. В 2021 г. принята новая таксономия вирусов, согласно которой герпесвирусы относятся к семейству *Orthoherpesviridae* [55]. Девять вирусов герпеса, относящихся к 3 подсемействам (альфа-, бета- и гамма-герпесвирусы), заражают людей. ГВЧ различаются строением генома, тканевым тропизмом, характером цитопатического действия, локализацией латентных вирусов в разных клетках (Таблица 1). К альфа-герпесвирусам относятся вирусы простого герпеса типов 1 и 2 (ВПГ-1 и ВПГ-2) и вирус ветряной оспы, другое название – Варицелла-Зостер вирус. К бета-герпесвирусам относятся цитомегаловирус человека и вирусы герпеса человека типов 6А, 6В и 7. К гамма-

герпесвирусам относятся вирус Эпштейна-Барр и вирус, ассоциированный с саркомой Капоши (ВГЧ-8). Основными особенностями подсемейства альфа-герпесвирусов являются короткий репродуктивный цикл, способность быстро распространяться между клетками и эффективно лизировать инфицированные клетки, а также переходить в латентное состояние в сенсорных нервных ганглиях. Члены подсемейства бета-герпесвирусов имеют длительный репликационный цикл с медленным прогрессированием инфекции в клеточных культурах. Бета-герпесвирусы поражают клетки различного происхождения и могут сохраняться в латентном состоянии в незрелых гемопоэтических клетках костного мозга, в зрелых лейкоцитах. Вирусы подсемейства гамма-герпесвирусов вызывают литические инфекции в эпителиальных и эндотелиальных клетках и устанавливают латентность в В-клетках, в том числе в В-клетках памяти. ГВЧ характеризуются неодинаковым патогенезом и вызывают различные заболевания [141]. Гамма-герпесвирусы обладают онкогенным потенциалом, ассоциируются с несколькими типами рака, и недавние исследования убедительно доказали роль ВЭБ при рассеянном склерозе, красной волчанке, артрите [29, 30, 149].

**Таблица 1** – Общие сведения о девяти вирусах человека семейства *Orthoherpesviridae* [101]

Подсемейство	Обозначение вируса	Диаметр вириона, нм	Размер генома, т.п.н.	Преимущественный тропизм	Локализация латенции
Альфа	ВПГ-1 (HHV-1) ВПГ-2 (HHV-2)	186-225	152-155	Эпителий	Сенсорные ганглии и ганглии черепно-мозговых нервов
	ВЗВ (HHV-3)	150-200	125	Эпителий	Сенсорные ганглии и ганглии черепно-мозговых нервов
Гамма	ВЭБ (HHV-4)	180-200	172	Эпителий, В-клетки	В-клетки, В-клетки памяти
Бета	ЦМВ (HHV-5)	230-260	236	Моноциты, лимфоциты, эпителий	Гемопоэтические стволовые клетки CD34+, моноциты CD14+, Т-лимфоциты
	ВГЧ-6А (HHV-6А) ВГЧ-6В (HHV-6В)	160-200	170	Т-клетки	Т-клетки, моноциты, эпителий
	ВГЧ-7 (HHV-7)	160-200	145	Т-клетки	Т-клетки, моноциты
Гамма	ВГЧ-8 (HHV-8)	100	165-170	Моноциты, лимфоциты, эпителий	Фибробласты и эндотелиальные клетки

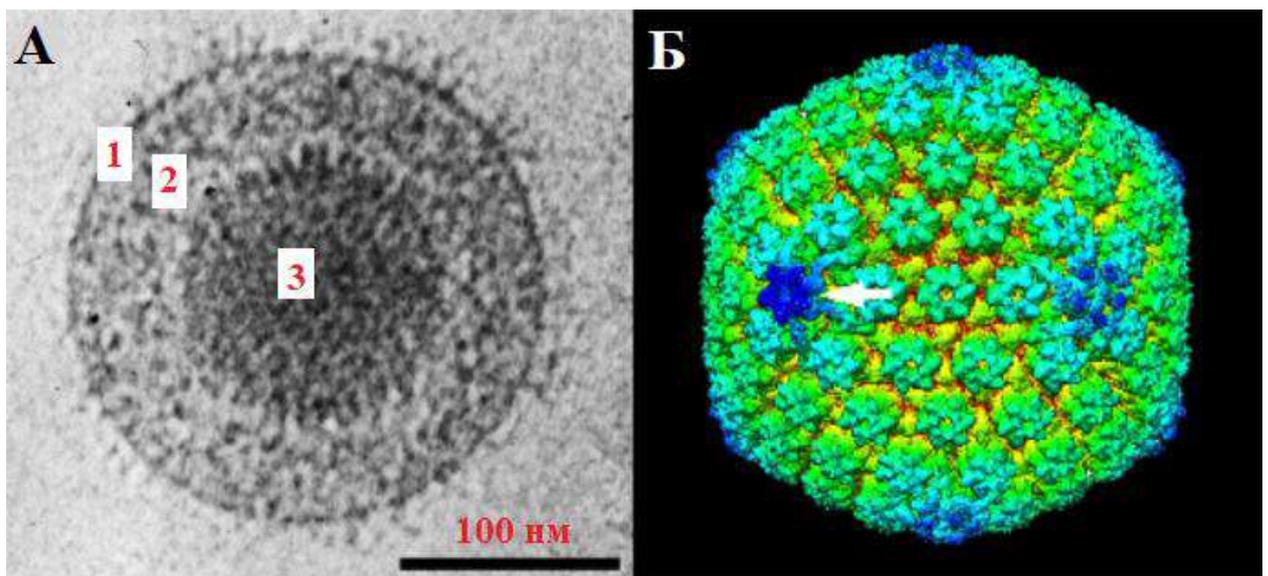
Вирусы герпеса повсеместны, во всем мире люди являются носителями того или иного вида ГВЧ, нередко и нескольких видов и/или нескольких штаммов одного вида. ГВЧ пожизненно остаются в организме хозяина в состоянии латенции с периодическими циклами реактивации, которые могут происходить в результате различных воздействий, точная причина которых в настоящее время до конца не изучена. ГВЧ способны поражать разные органы и системы человека, при этом в большинстве случаев не имеют специфических дифференцирующих симптомов и могут протекать как бессимптомно, так и с развитием тяжелых состояний и осложнений, приводящих к смерти. Наиболее подвержены им лица с ослабленным

иммунитетом, пациенты с хроническими заболеваниями, беременные женщины, реципиенты органов, ВИЧ-инфицированные [45, 146, 147].

ГВЧ представляют собой относительно крупные вирусы, содержащие линейную двухцепочечную геномную ДНК и двуслойную липопротеиновую оболочку [60]. Общая характеристика ГВЧ представлена в Таблице 1.

### 1.1.2 Структура и репликация герпесвирусов

Представители семейства *Orthoherpesviridae* имеют сферические вирионы с оболочкой и характерными сложными структурами, состоящими из симметричных и несимметричных компонентов (Рисунок 1).

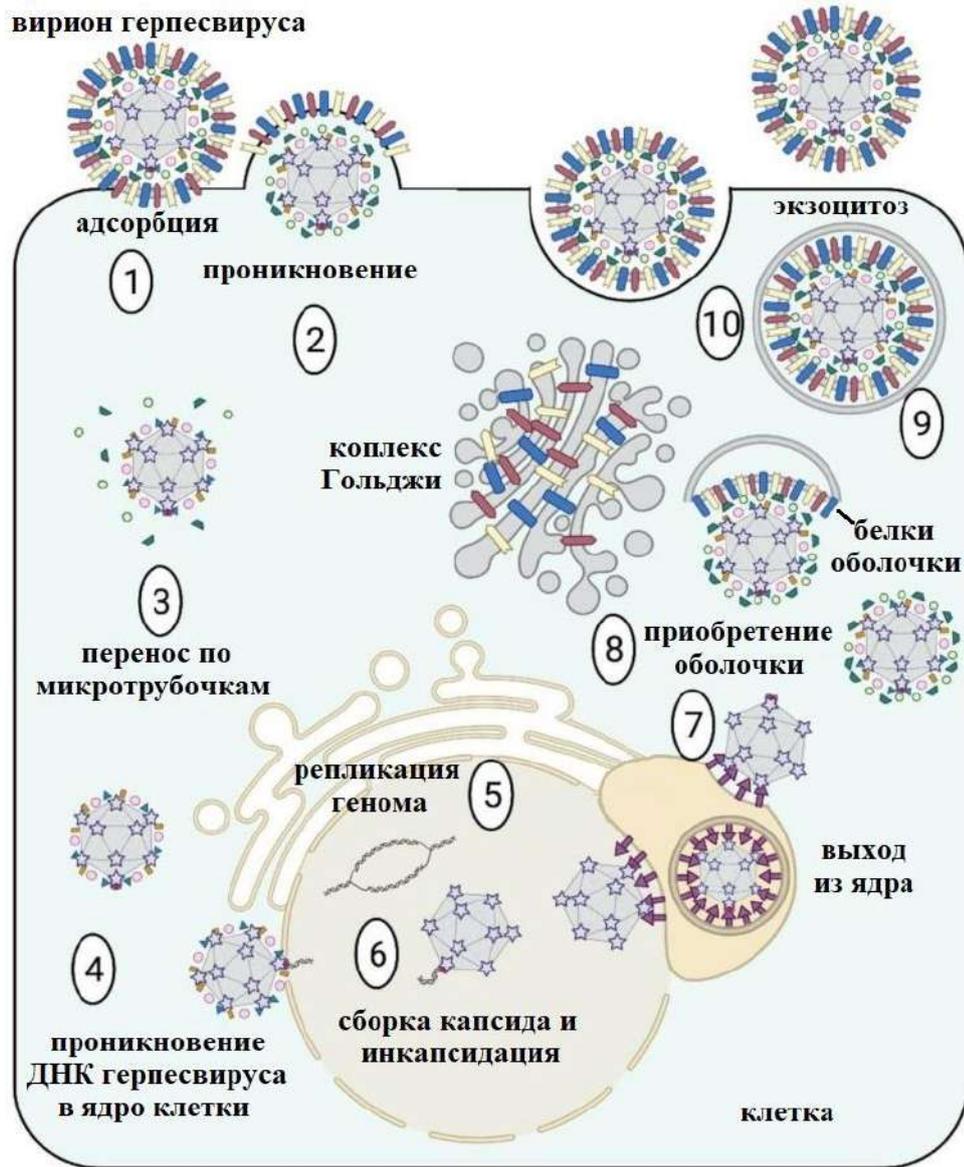


**Рисунок 1** – Изображение структуры вириона и капсида герпесвирусов на примере ВПГ-1. (А) Электронно-крио-микроскопическое изображение вириона, показывающее капсид (3), тегумент (2) и оболочку (1). (Б) Трехмерная реконструкция изображения капсида, показывающая гексоны, пентоны и портал – структуру, предназначенную для входа вирусной ДНК в капсид и выхода из него (стрелка). Рисунок адаптирован из статьи D. Gatherer и соавт. [72].

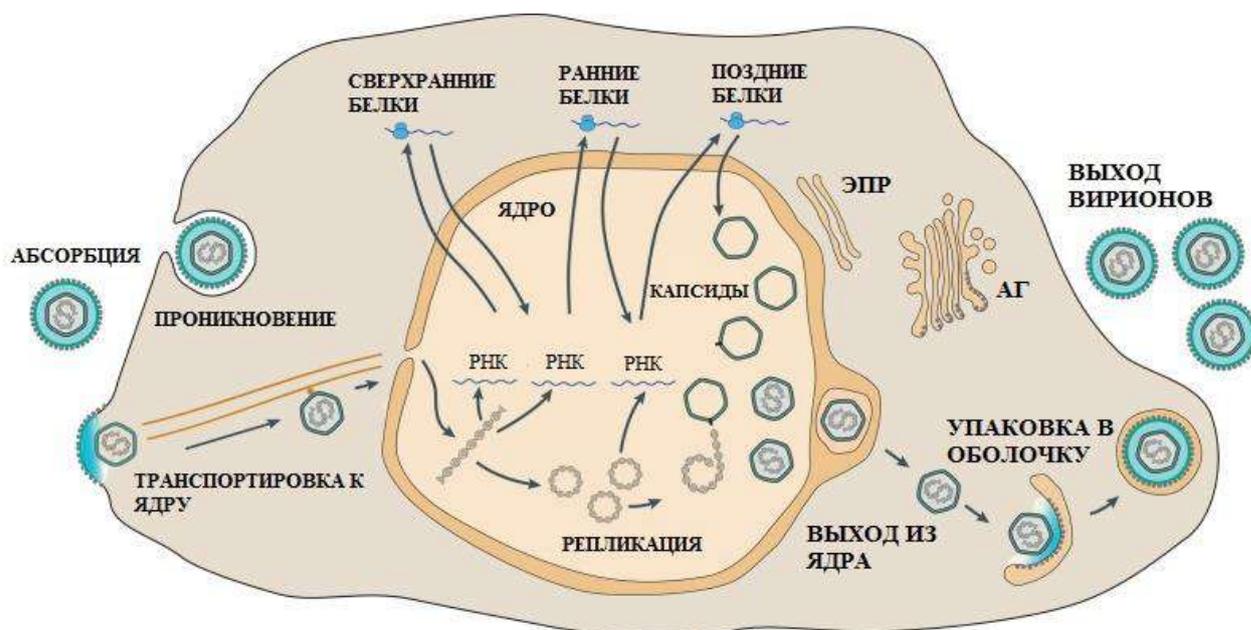
Линейные двухцепочечные ДНК-геномы ГВЧ размером 125-241 т.п.н. содержат 70-170 генов, из которых 43 были унаследованы от предкового вируса герпеса. Отмечают, что вирусы герпеса эволюционировали совместно со своими

хозяевами и высоко адаптированы к ним. Вирионы состоят из ядра, капсида, тегумента и оболочки. Ядро содержит вирусную ДНК, упакованную в сложный икосаэдрический капсид  $T = 16$  диаметром 1250 Å, содержащий капсомеры, расположенные в виде гексонов и пентонов, а также одного портала. ДНК-содержащий капсид, или нуклеокапсид, встроен в белковый слой, известный как тегумент, который, в свою очередь, окружен липидной оболочкой, полученной от клетки-хозяина. Вирусная оболочка содержит гликопротеины, которые образуют сеть шипов и опосредуют прикрепление вируса и проникновение в клетку [121].

Литическая инфекция включает прикрепление путем взаимодействия белков оболочки вириона с рецепторами клеточной поверхности с последующим проникновением через слияние мембран на поверхности клетки. Другой путь проникновения в клетку – эндоцитоз. Точные детали стратегии репликации при литической инфекции могут различаться от вируса к вирусу в зависимости от подсемейства, к которому принадлежит вирус, и типа инфицированной клетки-хозяина, но есть много общего [60]. Схематическое изображение жизненного цикла герпесвирусов представлено на Рисунках 2 и 3.



**Рисунок 2** – Схематическое представление жизненного цикла герпесвирусов. Для проникновения в клетку-мишень вирион прикрепляется к специфическим рецепторам клеточной мембраны (1) и сливается с ней, высвобождая капсид, окруженный белковым слоем (тегументом), в цитоплазму (2). Капсид проникает в ядро посредством переноса по микротрубочкам (3), прикрепляется к ядерной поре и высвобождает геномную ДНК в ядро (4). В ядре геномная ДНК реплицируется (5). Вновь образованные геномы упаковываются в капсиды совместно с белками тегумента (6) и проникают через ядерную оболочку в цитоплазму (7). Капсиды приобретают липидную оболочку (8), включающую белки, полученные из комплекса Гольджи (9). Для выхода из клетки зрелые вирионы используют экзоцитарный путь (10) или передачу непосредственно от клетки к клетке. Рисунок адаптирован из статьи Е.В. Draganova и соавт. [60].



**Рисунок 3** – Схематическое представление кинетического каскада транскрипции вирусных генов после попадания ДНК-генома в ядро инфицированной клетки при литической репликации. Рисунок адаптирован из статьи D. Gatherer и соавт. [72].

После проникновения генома ГВЧ в ядро транскрипция происходит в виде кинетического каскада: вначале сверхранние гены кодируют регуляторные белки, затем ранние гены кодируют комплекс репликации ДНК и множество белков, участвующих в модификации метаболизма клетки-хозяина и иммунных реакций, после этого экспрессируются поздние гены, кодирующие структурные белки вириона [49].

### 1.1.3 Латентная герпесвирусная инфекция

Альтернативой литической инфекции и последующей гибели клеток является латентная инфекция, при которой вирус переходит в «спящее» состояние внутри организма-хозяина с периодической реактивацией, приводящей к литической инфекции или к ограниченному производству вирионов или к его отсутствию (абортивная инфекция). Молекулярные механизмы, участвующие в латентной инфекции, а также клетки, поддерживающие латентную инфекцию, различаются у представителей разных подсемейств и до конца не изучены. В связи

с этим латенцию альфа-герпесвирусов изучают как правило в первичных нейронах или в нейрональных клеточных линиях; латенцию бета-герпесвирусов – в миелоидных клетках, латенцию гамма-герпесвирусов – в лимфоидных клетках. Были проведены интенсивные исследования латенции ВПГ-1 [129, 145], ЦМВ [48, 63], ВЭБ [91, 94], ВЗВ [59], ВГЧ-6 [134], однако механизмы, с помощью которых устанавливается и поддерживается латентное состояние, а также происходит реактивация этих вирусов, остаются изученными лишь частично. Для определения латентности и дифференциации ее от персистирующей или abortивной инфекции были выдвинуты три критерия латенции: 1) присутствие (сохранение) вирусного генома, 2) ограниченная экспрессия вирусных генов без образования вирусных частиц и 3) способность к реактивации – вступлению в литический цикл [168].

Во время литической фазы ГВЧ практически превращает инфицированную клетку в «фабрику по производству вирусов», перенаправляя все клеточные процессы на синтез вирусных белков и ДНК. Напротив, во время латентной фазы производство частиц отсутствует, а экспрессия вирусных генов ограничена минимумом. Бета- и гамма-герпесвирусы разработали стратегию сохранения своих латентных геномов в делящихся клетках (гемопоэтических предшественниках или лимфоидных клетках соответственно). Геномы сохраняются в виде кольцевых молекул – эписом, прикрепленных к клеточным хромосомам с помощью вирусных и клеточных белков. С другой стороны, альфа-герпесвирусы переходят в латентное состояние в терминально дифференцированных неделящихся нейронах, поэтому в этом случае отсутствует риск потери вирусного генома и, следовательно, также нет необходимости привязывать эписому к клеточному хроматину. Среди ГВЧ исключением в отношении сохранения латентного генома в виде эписомы являются ВГЧ-6 А/В, которые способны встраиваться в хромосомы хозяина в области теломер. Вирусы герпеса, которые устанавливают латентность в пролиферирующих клетках, дублируют свои скрытые эписомы в ядре один раз за клеточный цикл, синхронно с клеточной репликацией в фазе S [102, 158].

Геномы ГВЧ внутри вирусной частицы уплотняются с помощью спермина, но не содержат нуклеосом. Напротив, латентные геномы вирусов герпеса полностью хроматинизированы, аналогично клеточной ДНК [102, 158].

Как следствие, транскрипционная активность вирусного латентного хроматина может регулироваться модификациями гистонов и их изменениями с использованием тех же механизмов, как в случае клеточного хроматина [36].

Давно показано, что латентная инфекция ВПГ-1/2 ограничена транскриптами, ассоциированными с латентностью (latency-associated transcripts (LATs)) [143]. LATs не требуются для установления латентности, но они участвуют в репрессии литических генов, а также ингибируют апоптоз латентно инфицированных клеток. Известно, что LATs включают короткие некодирующие рибонуклеиновые кислоты (РНК) – sRNA1 и sRNA2 и длинные некодирующие РНК. Кроме того, 7 микроРНК, кодируемых ВПГ-1, экспрессируются в латентном состоянии, подавляют транскрипцию литических генов и влияют на репликацию вируса в клетках [68]. Было показано, что реактивация ВПГ является довольно частой и спонтанной. Накопились данные о том, что в латентном состоянии могут экспрессироваться некоторые литические гены. При анализе латенции ВПГ было установлено, что транскрипцию LATs и структуру хроматина латентного генома регулирует литический белок ICP0 (полипептид 0 клеток, инфицированных вирусом герпеса человека) [154]. Изучение других ГВИ позволило определить гены, экспрессия которых ассоциируется с латентным состоянием. Для ЦМВ известны несколько «латентных» генов, среди которых *UL138* и *US28* [50]. Наиболее сложно регулируется латенция при ВЭБ-инфекции. В клетках разных типов ВЭБ устанавливает латенцию с помощью набора разных генов, и формы/степени латенции характеризуются как латенция 0, I, II или III [39].

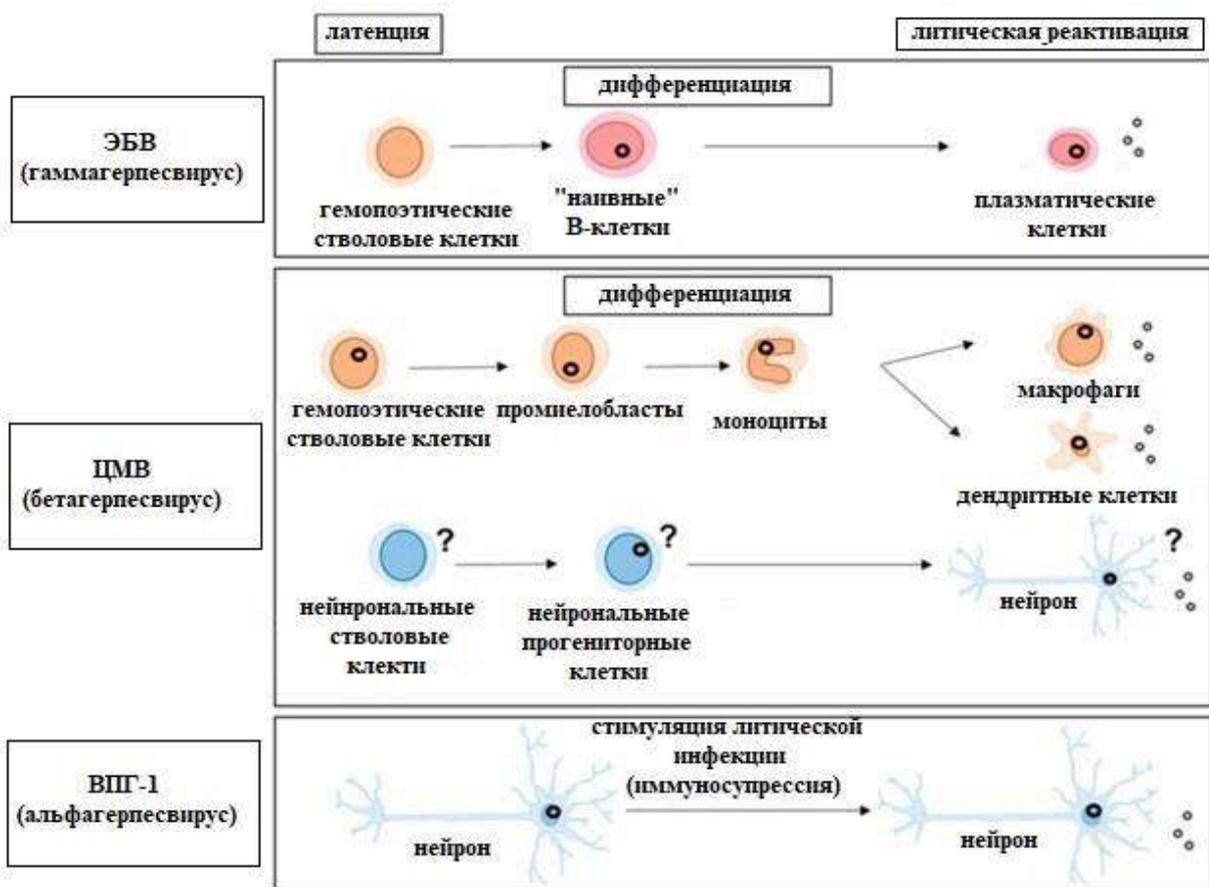
Если ранее полагали, что при переходе в латентное состояние все литические гены подавляются, а экспрессируются только латентные гены, данные последних лет показали, что во всех латентных ГВИ экспрессируется и часть литических генов. Эти наблюдения меняют взгляд на ГВИ-инфекцию, предлагаются гипотезы, объясняющие механизмы появления и функционирования литических

транскриптов в латентном состоянии инфекции, однако пока ни одна из гипотез не получила подтверждения [168].

#### 1.1.4 Реактивация герпесвирусов

Герпесвирусы всех трех подсемейств могут периодически реактивироваться, вызывая симптоматическую рецидивирующую инфекцию. Они также могут бессимптомно передаваться новым хозяевам. Реактивация и повторное вхождение в литический цикл могут быть вызваны широким спектром физиологических факторов и факторов окружающей среды. На Рисунке 4 схематически представлены латентно инфицированные ГВЧ 3-х подсемейств и их переключение на литическую форму инфекции. Индукторами литической реактивации гамма-герпесвирусов (ВЭБ и ВГЧ-8), могут быть другие вирусы или бактерии, которые могут действовать посредством активации Toll-подобных рецепторов, В-клеточных рецепторов, а также цитокинов, вырабатываемых во время инфекции [35, 82]. Латентный ЦМВ может реактивироваться из латентного резервуара CD34+/CD33+ клеток, а также CD14+ моноцитов в результате дифференцировки в макрофаги и дендритные клетки, стимулируемой провоспалительными цитокинами (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4, GM-CSF) [142]. Реактивация ЦМВ может иметь серьезные клинические последствия у пациентов с ослабленным иммунитетом, таких как инфицированные ВИЧ или проходящие иммуносупрессивную терапию после трансплантации. Отмечают, что заражение клеток, инфицированных герпесвирусом, другим патогеном может индуцировать реактивацию герпесвируса. Например, литическая репликация ЦМВ была обнаружена у реципиентов аллотрансплантата вследствие реактивации другого бета-герпесвируса – ВГЧ-7 [41]. Частота клинической реактивации у альфа-герпесвирусов различна. Симптоматическая реактивация ВПГ-1 и ВПГ-2 может возникать неоднократно и в основном у молодых людей, в то время как клиническая реактивация ВЗВ обычно происходит один раз в жизни и в основном поражает пожилых людей [95]. Известно, что стимулами реактивации ВПГ и ВЗВ могут служить локальные

повреждения нерва, солнечные лучи и УФ излучение, которые вызывают нарушения регуляции иммунной системы. К реактивации альфа-герпесвирусов могут приводить также гормональные изменения, психологический стресс и усталость, что коррелирует с иммуносупрессией и со снижением контроля CD8+ Т-клеток за латентно инфицированными нейронами [173]. Имеющиеся данные показывают, что частота реактивации ГВЧ ассоциируется с генетическими различиями инфицированного организма [52]. Изучение генетики хозяина поможет предсказать, какие группы населения подвергаются более высокому риску реактивации вируса и осложнений, вызванных рецидивирующей инфекцией.



**Рисунок 4** – Схематическое представление латенции и реактивации герпесвирусов. Рисунок адаптирован из статьи M. Weidner-Glunde и соавт. [168].

Приведенные выше данные показывают, что многие стимулы реактивации ГВЧ определены, однако знания о точных механизмах и условиях, приводящих к переключению латентной инфекции на литическую, недостаточны. Такие знания

необходимы для разработки новых терапевтических стратегий, нацеленных на латентные вирусы.

После литической инфекции герпесвирусы устанавливают латентный период в основном в делящихся клетках (за исключением альфа-герпесвирусов), в течение которого вирусный геном сохраняется в виде эписомы и привязан к клеточному хроматину; литическая реактивация гамма-герпесвирусов и бета-герпесвирусов может происходить при получении стимула для терминальной дифференцировки. ВЭБ (гамма-герпесвирус) инфицирует В-клетки и остается латентным в них и в В-клетках памяти, в которых может активироваться и дифференцироваться в плазматические клетки, что индуцирует литическую реактивацию. ЦМВ (бета-герпесвирус) устанавливает латентность в недифференцированных клетках миелоидного ряда и активируется при дифференцировке в макрофаги и дендритные клетки. Возможно, но пока не доказано, что ЦМВ может находиться в латентном состоянии в недифференцированных нейрональных клетках и проходить литический цикл в нейронах после дифференцировки. ВПГ-1 (альфа-герпесвирус) устанавливает латентность в сенсорных нейронах, и литическая реактивация индуцируется при получении стимула [168].

## **1.2 Заболевания, вызываемые герпесвирусами человека**

**ВПГ-1 и ВПГ-2** вызывают заболевания, для которых характерны рецидивирующие высыпания в виде сгруппированных пузырьков и язв. ВПГ-1 чаще всего является причиной лабиального (орального) герпеса, в то время как ВПГ-2 – генитального. Они передаются при прямом контакте с биологическими жидкостями инфицированного человека. ВПГ-1/2 могут поражать лицо и рот (орофациальный герпес), половые органы (генитальный герпес) или кожу рук и других частей тела. Серьезные заболевания возникают, когда инфекция поражает глаза (герпетический кератит) или проникает в центральную нервную систему, повреждая мозг (герпетический энцефалит). Люди со сниженным иммунитетом, такие как новорожденные дети, реципиенты трансплантатов или ВИЧ-

инфицированные, склонны к серьезным осложнениям при инфекции ВПГ-1/2. ВПГ-инфекции также связаны с когнитивным дефицитом при биполярном расстройстве и болезни Альцгеймера, хотя эти заболевания часто являются генетически обусловленными. ВПГ-1/2, как и другие ГВЧ, никогда не элиминирует из организма и присутствует в нём на протяжении всей жизни хозяина [51, 112].

**Варицелла-Зостер вирус (ВЗВ)** является возбудителем двух различных заболеваний: генерализованной везикулярной кожной сыпи, известной как ветряная оспа, и локализованной дерматомной кожной сыпи, известной как опоясывающий герпес (опоясывающий лишай). За первичной инфекцией (ветряной оспой) следует латентное течение в ганглионарных нейронах. Реактивация вируса приводит к репликации вируса, которая вызывает опоясывающий лишай в тканях, иннервируемых вовлеченными нейронами, воспаление и гибель клеток – процесс, который может привести к постоянной боли в нервных корешках (постгерпетическая невралгия). Патогенез постгерпетической невралгии неизвестен, и ее трудно лечить. Кроме того, могут развиваться другие осложнения, такие как миелит, паралич черепно-мозговых нервов, менингит, инсульт, ретинит и заболевания желудочно-кишечного тракта, такие как язва, панкреатит и гепатит. ВЗВ является единственным вирусом герпеса человека, против которого имеются вакцины [73].

**Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ)** – возбудитель широкого спектра заболеваний, включая инфекционный мононуклеоз, заболевания полости рта, заболевания, связанные с функциональными нарушениями иммунитета, рассеянный склероз, системные аутоиммунные заболевания [175]. ВЭБ вызывает также различные злокачественные гематологические новообразования и эпителиальные раки [90]. Также известны заболевания, при которых ВЭБ поражает Т-клетки и НК-клетки и индуцирует образование Т- и НК-клеточных лимфом [27, 70, 84].

Заражение **цитомегаловирусом (ЦМВ)** чаще всего происходит в раннем возрасте. У новорожденных детей ЦМВ может вызывать гепато-спленомегалию, дистресс синдром, лихорадку. ЦМВИ является основной причиной потери слуха и зрения, инвалидности у детей [118]. У иммунокомпетентного здорового хозяина

первичная ЦМВИ обычно протекает бессимптомно, хотя она может проявляться как неспецифическое лихорадочное заболевание или синдром, подобный инфекционному мононуклеозу, характеризующийся лимфаденопатией и лимфоцитозом. После первичной инфекции ЦМВ переходит в латентное состояние в широком спектре клеток, включая эндотелиальные, эпителиальные, гладкомышечные клетки и фибробласты, где вирус может реплицироваться и переноситься моноцитами периферической крови. На клиническую картину ЦМВИ большое влияние оказывает состояние иммунитета хозяина. Так, снижение ЦМВ-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток при снижении иммунитета, например, при ВИЧ-инфекции или у реципиентов трансплантатов органов или кроветворных стволовых клеток, может привести к репликации вируса, литической инфекции и вызвать серьезные осложнения и даже смерть [151].

**Вирусы герпеса человека 6А и 6В (ВГЧ-6А и ВГЧ-6В)** инфицируют Т-клетки. Как ВГЧ-6А, так и ВГЧ-6В обладают теломероподобными повторами в концевых областях своих геномов, что позволяет интегрироваться вблизи теломеры хромосом хозяина и переходить в латентное состояние без образования эписомы. Примерно у 1% людей интеграция ВГЧ-6 в клетки зародышевой линии позволяет вирусному геному передаваться от одного поколения к другому. ВГЧ-6А и ВГЧ-6В являются нейротропными. В подавляющем большинстве случаев реактивация после трансплантации происходит с ВГЧ-6В. У пациентов с воспалительными заболеваниями нервной системы, такими как рассеянный склероз, ДНК и матричная РНК (мРНК) ВГЧ-6А обнаруживаются чаще, чем ВГЧ-6В. ВГЧ-6А был идентифицирован в 72 % детских глиальных опухолей. ВГЧ-6В выявляется у пациентов с эпилепсией [19].

Вирусы герпеса человека 7 и 8 типов (ВГЧ-7 и ВГЧ-8) не изучались в настоящей работе. В то же время известно, что эти вирусы связывают с рядом заболеваний человека. Так, ВГЧ-7 ассоциируется с такими заболеваниями как внезапная и рецидивирующая экзантема, синдром хронической усталости [22]. Наличие ВГЧ-8 ассоциируется с целым рядом злокачественных и незлокачественных заболеваний, которые развиваются у реципиентов органов на

фоне иммуносупрессивной терапии. Наиболее часто присутствие ВГЧ-8 обнаруживают в злокачественных саркомах Капоши у больных, инфицированных ВИЧ-1 [40].

Таким образом, ГВЧ способны поражать различные органы и ткани организма и являются этиологическими агентами ряда тяжелых заболеваний человека.

### **1.3 Хронические и острые воспалительные заболевания человека**

Воспалительные реакции организма бывают острыми, ограниченными во времени, и хроническими, которые могут длиться много месяцев и даже лет. Воспалительные заболевания называют системными, так как они затрагивают многие различные органы. Причинами ХВЗ могут быть многочисленные факторы внешней среды, а также факторы внутренней среды организма, возникающие при нарушениях метаболических и физиологических процессов. Во многих случаях факторы, ответственные за возникновение ХВЗ остаются до конца не изученными. ХВЗ могут иметь как инфекционную природу, так и неинфекционную. К последним относятся сердечно-сосудистые заболевания, хронические респираторные заболевания (хроническая обструктивная болезнь легких, бронхиальная астма), сахарный диабет, онкологические заболевания. Эти заболевания занимают одно из первых мест в мире по смертности [1]. Хронические инфекционные заболевания возникают вследствие заражения патогенами различной природы – бактериальной, вирусной, грибковой. Отмечают, что у ХВЗ неинфекционной и инфекционной природы много сходных характеристик. При воспалениях в функционально различных органах выявлены общие клеточные и молекулярные механизмы, которые приводят к изменениям структуры органов, к фиброзу и некрозу [61].

Диагностика и мониторинг ХВЗ часто недостаточно эффективны, так как проводится с использованием только ограниченных и неспецифических тестов, таких как С-реактивный белок и скорость оседания эритроцитов. Это не позволяет

дифференцировать физиологически близкие заболевания различной этиологии. Например, авторы [61] указывают, что такие опасные ХВЗ как псориаз, псориатический артрит, другие разновидности псориаза, спондилоартрит, ревматоидный артрит, язвенный колит и болезнь Крона имеют сходные патофизиологические процессы, но для успешного лечения необходимо определять и учитывать их клинико-патологические особенности [172].

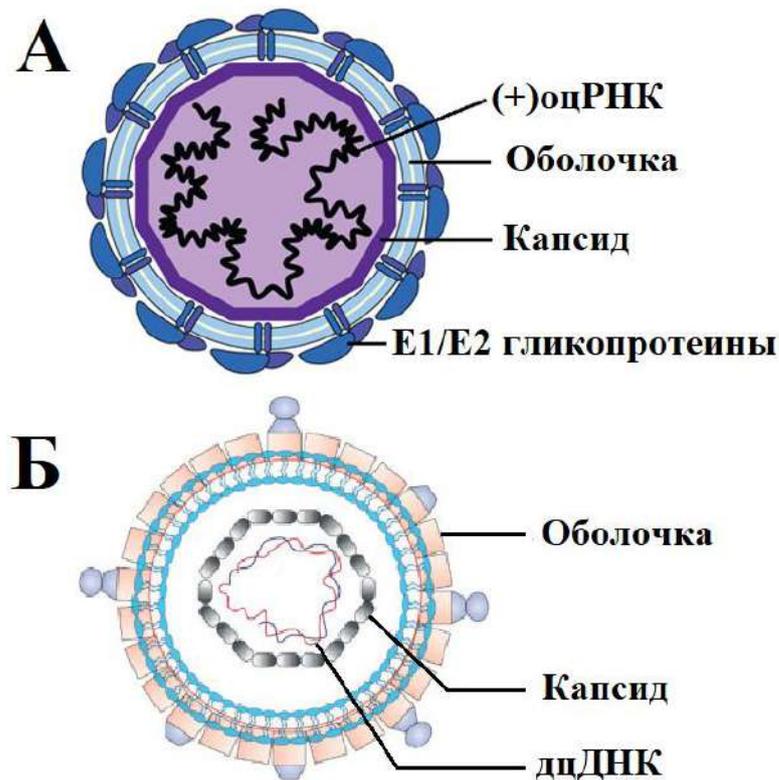
Одним из широко распространенных хронических заболеваний, инфекционная природа которого не установлена, является абактериальный хронический простатит. Однако многие вопросы как по этиологии, так и по лечению этого заболевания, пока не решены.

### **1.3.1 Хронические воспалительные инфекционные заболевания.**

#### **Хронические гепатиты**

Острые и хронические заболевания печени широко распространены и являются серьезной глобальной проблемой современного здравоохранения [83, 140]. Наиболее частой причиной развития гепатитов являются гепатотропные вирусы гепатитов А, В, С, D и E. Причинами воспалительных заболеваний печени, помимо вирусов гепатита могут являться аутоиммунные заболевания, алкогольная интоксикация, жировой гепатоз, некоторые лекарственные препараты и другие, негепатотропные вирусы. Одними из этих вирусов могут быть герпесвирусы человека – ГВЧ [176]. В настоящий момент, роль ГВЧ в воспалительных заболеваниях печени недостаточно изучена, а имеющиеся работы немногочисленны и противоречивы. Раньше считалось, что ГВЧ не играют роли в воспалительных заболеваниях печени [85], но в последнее время появляется все больше работ, которые указывают на роль герпесвирусов в воспалительных заболеваниях печени [78, 135]. Из 20 патогенов, передаваемых через кровь, наиболее распространенными и значимыми патогенами являются три: ВГВ, ВГС и ВИЧ [156]. Хроническими гепатитами В и С (ХГВ и ХГС) совокупно страдают около 360 миллионов человек во всем мире и от 1 до 4 миллионов человек ежегодно

умирают от последствий этих инфекций [2, 53]. ВГВ и ВГС различаются по структуре (геном ВГВ представлен ДНК, тогда как ВГС – РНК) и механизмам репликации (Рисунок 5). Структура ВГВ стабильна, он остается жизнеспособным и инфекционным при попадании на поверхности до 1 недели. Геном ВГВ встраивается в геном клетки-мишени, увеличивая нестабильность генома хозяина, чего не происходит при ВГС-инфекции. С 1981 г. Для профилактики ВГВ используются вакцины. Вакцины против ВГС не существует, хотя вызываемая им инфекция остается серьезной проблемой здравоохранения. Оба вируса вызывают острую и хроническую инфекции, но в клиническом течении и иммунном ответе на эти вирусы существуют значительные различия. Во время острой фазы гепатита В пациенты могут испытывать симптомы, и более чем у 95% иммунокомпетентных взрослых индивидуумов инфекция проходит спонтанно, и у пациентов развивается защитный иммунитет [162]. Однако в некоторых случаях (до 20%) острая инфекция переходит в хроническую. При гепатите С острая инфекция протекает бессимптомно и в 70-80% случаев развивается хронический гепатит С [169]. Несмотря на значительные различия в структуре и жизненном цикле ВГВ и ВГС оба вируса способствуют развитию цирроза печени и используют общие молекулярные пути для индукции рака печени.



**Рисунок 5** – Строение вирионов ВГС (А) и ВГВ (Б). (+)оцРНК – одноцепочечная РНК положительной направленности; дцДНК – двухцепочечная ДНК. Рисунок адаптирован из статей С. Herrscher и соавт. и G. Ligat и соавт. [81, 109].

### 1.3.2 Хронический простатит/синдром хронической тазовой боли

Хронический простатит/синдром хронической тазовой боли является одним из широко распространенных урологических заболеваний. Согласно общепринятой классификации простатита Национального института здравоохранения США, хронический простатит (ХП) подразделяется на четыре категории в зависимости от его клинических проявлений и этиологической причины: категория I – острый бактериальный простатит; категория II – хронический бактериальный простатит; категория III – ХП/СХТБ и категория IV – бессимптомный воспалительный простатит [98]. ХП/СХТБ III является наиболее распространенным, на его долю приходится 90-95% случаев простатита, он подразделяется на ХП/СХТБ категория IIIА (с признаками воспаления) и ХП/СХТБ IIIВ (без признаков воспаления). Для ХП характерны: хроническая, повторяющаяся

боль, дискомфорт в области таза, частое мочеиспускание, дизурия, неполное опорожнение и боль при эякуляции. У некоторых пациентов также наблюдаются головокружение, усталость, потеря памяти и даже психические симптомы, такие как депрессия и беспокойство [138].

Патофизиология ХП/СХТБ ША неясна, поэтому поиск причин заболевания составляют важную задачу. Имеющаяся стандартная терапия направлена, главным образом, на облегчение клинических симптомов и улучшение качества жизни пациентов с ХП/СХТБ ША [44]. Тем не менее, побочные эффекты, возникающие в результате приема этих препаратов, такие как ортостатическая гипотензия, желудочно-кишечные реакции и другие, делают затруднительным их долгосрочное применение, что приводит к отказу пациентов от терапии. Таким образом, симптомы ХП/СХТБ не могут эффективно контролироваться, и терапевтический эффект, если и развивается, то кратковременный. На данный момент эффективного лечения ХП/СХТБ ША не существует [128]. Важнейшим последствием ХП, в том числе ХП/СХТБ ША, является мужское бесплодие.

### **1.3.3 Мужское бесплодие**

Одним из важных и часто встречающихся последствий ХВЗ урогенитального тракта мужчин, включая ХП/СХТБ ША, является бесплодие – состояние, при котором пара не может зачать ребёнка после регулярного незащищенного полового акта в течение 12 месяцев при отсутствии известной репродуктивной патологии. Проблема бесплодия всегда была основной проблемой репродуктивной медицины, оно является специфическим заболеванием, и в связи с широкой распространенностью, его следует рассматривать как социальное заболевание [159]. Бесплодие, согласно имеющимся данным, затрагивает 72,4 миллиона человек во всем мире. По оценкам ВОЗ, около 9% супружеских пар во всем мире имеют проблемы с фертильностью, при этом на долю мужского фактора приходится 50% случаев. Г.С. Лебедев с соавторами анализировали статистические данные по бесплодию в РФ за 2000-2018 годы и сообщили, что по данным

официальной статистики в 2018 году было зарегистрировано 47886 мужчин, страдающих бесплодием, что составляет 0,11% от мужского населения РФ. Эти данные почти в 100 раз ниже мировых данных. Такие различия объясняются авторами рядом проблем здравоохранения в России, например, отсутствием национальной государственной программы, направленной на решение проблем бесплодия, неадекватной регистрацией случаев мужского бесплодия в регионах, особенно в учреждениях частного медицинского сектора [7].

Многие генетические факторы и образ жизни связаны с мужским бесплодием, однако этиология мужского бесплодия остается неопределенной более чем у 50% пациентов, которые впоследствии классифицируются как страдающие идиопатическим мужским бесплодием [21, 37, 152].

На данный момент представлено немало данных, доказывающих отрицательное влияние вирусных инфекций на мужскую фертильность за счет влияния на жизнеспособность и подвижность сперматозоидов (гепатиты В и С, SARS-CoV-2, вирус папилломы человека (ВПЧ)) и на мужские репродуктивные органы – яички и придатки яичек (вирус Коксаки, вирус эпидемического паротита, ВИЧ, вирус Зика, ВПЧ, вирус гриппа) [161]. Роль таких вирусов как ВИЧ и вируса паротита в развитии мужского бесплодия доказана, однако влияние герпесвирусов человека на мужскую фертильность до конца не изучена.

Мнения исследователей относительно роли герпесвирусов в этиологии мужского бесплодия расходятся, в ряде работ показано негативное влияние ГВЧ на мужскую фертильность [20, 103], в других работах исследователи предполагают отсутствие влияния ГВЧ на качество спермы [6, 12, 13, 125].

Jahromi B.N. с соавторами, показали негативное влияние ЦМВ на качество спермы [89], в то время как Behboudi E. с соавторами указывают на отсутствие влияния ГВЧ 1-5 типов на качество спермы [167]. Науменко В.А. и соавторы впервые обнаружили интрагаметное заражение сперматозоидов человека ГВЧ [125].

Тем не менее, влияние герпесвирусов на качество спермы и репродуктивную функцию человека до сих пор остается спорным. Лишь в немногих исследованиях,

посвященных обнаружению герпесвирусов человека в эякуляте, показана связь между присутствием ГВЧ и нарушениями качества спермы, снижением рождаемости, сокращением шансов на беременность. Несмотря на отсутствие доказательств связи между присутствием герпесвирусов в сперме и нарушением репродукции, важно признать, что риск передачи вирусной инфекции через сперму существует, и этот вопрос нуждается в дальнейших исследованиях.

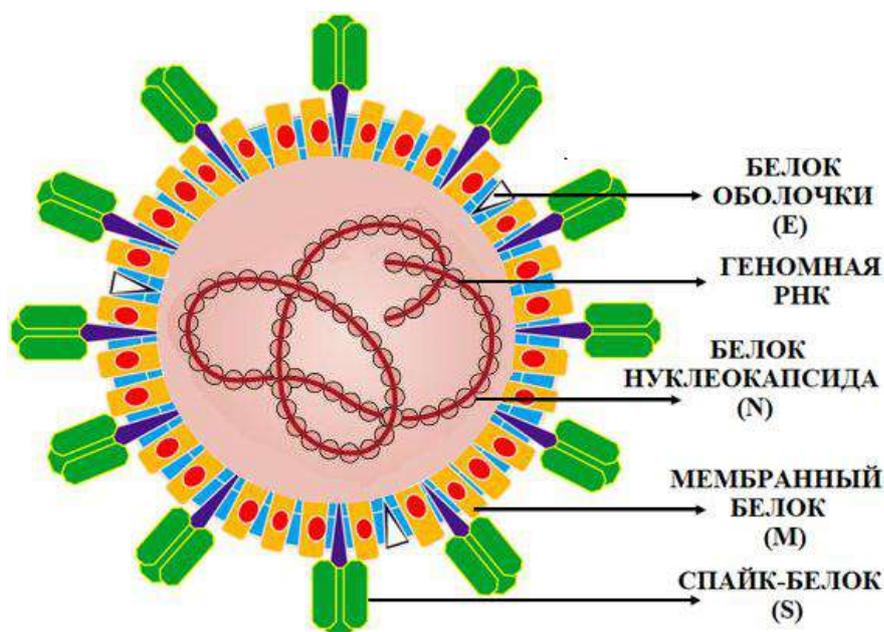
### 1.3.4 Коронавирус SARS-CoV-2 и COVID-19

Коронавирусы, представители семейства *Coronaviridae*, являются группой вирусов, поражающих многих животных, также они могут вызывать легкие и тяжелые респираторные заболевания у людей. В 2002 и 2012 годах, два высокопатогенных коронавируса зоонозного происхождения, коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома-1 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-1 (SARS-CoV-1)) и коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)), были обнаружены у людей. SARS-CoV-1 и MERS-CoV вызывают респираторные заболевания с тяжёлыми осложнениями и нередко со смертельными исходами. Накопление мутаций, возникающих в результате репликации вируса, является естественным процессом, вызывающим появление новых вариантов SARS-CoV и создающим серьезные проблемы современного общественного здравоохранения [54].

В конце 2019 года новый коронавирус SARS-CoV-2 вызвал вспышку необычной вирусной пневмонии в Китае. Это новое коронавирусное заболевание, получившее название COVID-19, быстро распространилось по всему миру. SARS-CoV-2 превзошел SARS и MERS как по количеству инфицированных, так и по охвату районов эпидемии, вызвав пандемию [58].

Геном коронавирусов представлен одноцепочечной положительной РНК размером от 26,2 до 31,7 кб. Вирионы состоят из белков: спайкового (S), мембранного (M), белка оболочки (E), белка нуклеокапсида (N). Белки S, M и E

встроены в вирусную оболочку, в то время как белок N образует нуклеокапсид [106] (Рисунок 6).



**Рисунок 6** – Изображение структуры вириона SARS-CoV-2. Рисунок адаптирован из статьи G. Ligat и соавт. [99].

Все возрастные группы населения восприимчивы к инфицированию SARS-CoV-2, но клинические проявления различаются в зависимости от возраста и сопутствующих заболеваний. У пожилых людей (старше 60 лет) с сопутствующими заболеваниями SARS-CoV-2 с большей вероятностью вызывает тяжелое респираторное заболевание, требующее госпитализации, в то время как у большинства молодых людей и детей заболевания протекают в легкой форме или бессимптомно [77, 114, 170].

Значительную роль в борьбе с COVID-19 сыграли вакцины, которые были созданы чрезвычайно быстро и существенно снизили тяжесть течения болезни и уменьшили количество летальных исходов. Роль сопутствующих оппортунистических заболеваний в тяжести течения и исходе COVID-19 интенсивно изучается, однако, в этой проблеме много нерешенных вопросов.

Одним из таких вопросов является участие ГВЧ в клиническом течении и в исходе заболевания.

## **1.4 Противовирусные соединения в отношении герпесвирусов человека**

### **1.4.1 Зарегистрированные соединения, обладающие противовирусной активностью в отношении цитомегаловирусной инфекции**

**Ацикловир** был первым препаратом, эффективно подавляющим герпесвирусы, особенно ВПГ-1/2. Ацикловир также одобрен для профилактики инфекции ЦМВ в Европейском союзе [144].

**Ганцикловир и валганцикловир.** Ганцикловир (ГЦВ) – это нуклеозидный аналог, который после фосфорилирования в форме трифосфата избирательно ингибирует ДНК-полимеразу. Дозировка ГЦВ ограничена цитотоксичностью, которая может вызывать нейтропению, тромбоцитопению, а исследования на животных показали, что ГЦВ может приводить к временному или необратимому бесплодию [104]. В настоящее время приоритетным способом лечения активной ГВИ у лиц с ослабленным иммунитетом является внутривенное лечение валганцикловиром (ВГЦВ). ВГЦВ является L-валиловым эфиром ГЦВ, превращающийся в ГЦВ под действием эстераз. ВГЦВ менее токсичен, чем ГЦВ [120].

**Фоскарнет и цидофовир** – препараты второй линии, которые избирательно ингибируют вирусную ДНК-полимеразу. Фоскарнет известен своей нефротоксичностью, это может привести к метаболическим изменениям, а также к гематологическим нарушениям и язвам половых органов. Цидофовир – нефротоксичен и вызывает нейтропению, метаболический ацидоз и гипотонию (гипотензию) глазного яблока [104].

**Летермовир (Prevymis™)** одобрен в июле 2017 г. Управлением по контролю за качеством продуктов и лекарств США (Food and Drug Administration) (FDA)) в качестве нового средства для профилактики цитомегаловирусной инфекции и

заболеваний у взрослых ЦМВ-серопозитивных реципиентов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Новый противовирусный препарат имеет 50% эффективную концентрацию более чем в 400 раз ниже, чем ГЦВ. Важно отметить, что летермовир, по-видимому, сочетается с одобренными в настоящее время противовирусными препаратами против ЦМВ [108].

**Марибавир**, разработанный компанией GlaxoSmithKline, пероральное анти-ЦМВ-соединение, нацелен на вирусную киназу pUL97. Однако, совместное применение марибавира и ГЦВ/ВГЦВ не рекомендуется, поскольку первый является ингибитором фермента pUL97, необходимого для фосфорилирования/активации ганцикловира. Одним из преимуществ марибавира является то, что он проявляет меньшую гематотоксичность и нефротоксичность по сравнению с ГЦВ и ВГЦВ [104].

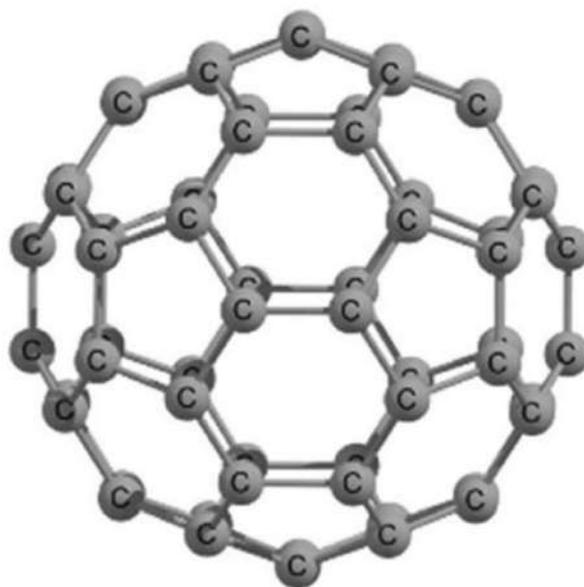
**Пассивная иммунизация иммуноглобулином к ЦМВ (IgCMV)** одобрена FDA для профилактического лечения ЦМВИ в сочетании с ГЦВ у реципиентов трансплантата легких с высоким риском. Иммуноглобулиновая терапия ЦМВ может быть особенно эффективна при осложнениях, при устойчивости и плохой переносимости ВГЦВ. Однако, IgCMV-препараты имеют ряд существенных недостатков: высокая токсичность, риск инфицирования пациента вирусами и прионами, циркулирующими в крови донора плазмы, и неспособность воздействовать на латентную ЦМВИ и предотвращать реактивацию ЦМВ [148].

Таким образом, имеющиеся на данный момент препараты против ГВЧ, в том числе против ЦМВИ, имеют существенные недостатки, такие как токсичность, появление резистентных к ним штаммов вируса. Особую проблему представляет отсутствие препаратов против ЦМВИ, разрешённых для терапии беременных и детей, поэтому поиск новых противовирусных соединений с низкой токсичностью и высокой эффективностью является актуальной задачей. Одной из молекулярных платформ для разработки таких препаратов являются фуллерены.

## 1.4.2 Кандидатные соединения для борьбы с герпесвирусными инфекциями

### 1.4.2.1 Фуллерены. Характеристика и противовирусные свойства

Фуллерены представляют собой полые кластеры атомов углерода. Впервые фуллерен был обнаружен в 1985 году, его синтезировали Kroto с соавт. в процессе испарения графита с помощью лазера. Структурой, которую они предложили, чтобы лучше всего описать стабильную конфигурацию этого 60-углеродного атома, был многоугольник с 60 вершинами и 32 гранями, напоминающая футбольный мяч. С тех пор было обнаружено множество фуллеренов более высокого порядка, таких как  $C_{70,76, 84, 90, 94}$  или фуллеренов более низкого порядка, таких как  $C_{28}$  и  $C_{36}$ . Среди них наиболее распространенным и стабильным типом остается фуллерен  $C_{60}$  (Рисунок 7).



**Рисунок 7** – Структура фуллерена  $C_{60}$ . Рисунок адаптирован из статьи E. Alipour и соавт. [24].

Вскоре после открытия  $C_{60}$  исследователи начали изучать его физические и химические свойства, а также перспективы его применения, но производство  $C_{60}$  было ограниченным и дорогостоящим. Только в 1990 году был введен метод

Кретшмера-Хаффмана, который позволил начать массовое производство фуллерена. Впоследствии фуллерен нашел свое применение в химии, физике, в материаловедении. Однако немодифицированный фуллерен обладал плохой растворимостью в воде, что делало его непригодным для использования в медицине. Для повышения его растворимости в воде и биодоступности предложено много способов модификации структуры фуллерена, которые можно классифицировать по двум основным категориям:

1 – Фуллерены, структура которых остается неизменной, к ним относятся: инкапсуляция и образование суспензии.

2 – Химически модифицированные фуллерены, которые получают путем добавления аминокислот, стероидов, гидроксильных групп, карбоксильных групп и т.д. Эти модификации помогли исследователям изучить биологическое применение фуллерена, что является важной главой в истории фуллерена [124].

Фуллерены обладают многообещающими перспективами для применения в медицине и косметологии. Фуллерены являются перспективными средствами доставки терапевтических препаратов, они проявляют низкую токсичность и способность оставаться в системе кровообращения в течение нескольких часов, что увеличивает их шансы на доставку препарата к органу-мишени [23]. Кроме того, фуллерены имеют перспективы применения в борьбе с аллергическим воспалением, воспалением, вызванным артритом. Фуллерены могут использоваться для ослабления патогенеза астмы, в качестве потенциальной терапии рассеянного склероза и т.д. [58]. Фуллерены имеют перспективны применения и в дерматологии, благодаря антиоксидантной активности [79].

Однако среди многочисленных химически синтезированных производных фуллерена, некоторые могут оказывать и негативные эффекты, например, повреждать липидные мембраны [130]. Также модифицированные фуллерены  $C_{60}$  могут обладать высокой токсичностью, кроме того, фуллерены плохо выводятся из организма и могут накапливаться в нём [164].

Водорастворимые производные фуллерена широко известны своими выраженными антиоксидантными, противоопухолевыми, антибактериальными,

нейропротекторными, и противовирусными свойствами. Профиль биологической активности производных фуллерена зависит от типов присоединенных функциональных групп и их расположения на поверхности. Первое сообщение о противовирусной активности фуллеренов относится к 1993 году. Было обнаружено, что производные фуллеренов обладают анти-ВИЧ-активностью, блокируя его ферменты, поскольку объемные фуллерены хорошо помещаются в активные центры протеазы ВИЧ [87].

Также важным свойством фуллерена является способность генерировать синглетный кислород при освещении в видимой области. Несколько исследовательских групп анализировали возможности использования фотоактивированного фуллерена и некоторых его производных в качестве противовирусных агентов. Водная суспензия фуллерена использовалась в качестве фотосенсибилизатора для инактивации оболочечного вируса гриппа H1N1 в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов. При облучении в течении 2 часов наблюдались повреждение поверхностной оболочки и потеря поверхностных гликопротеинов вируса [87]. Показана принципиальная возможность использования фуллеренов для дистанционной инактивации вирусов и бактерий [98].

#### 1.4.2.2 Дисперсный фуллерен C<sub>60</sub>

Основным препятствием для использования фуллеренов в медицине является нерастворимость в водных средах. Среди приемлемых путей получения водорастворимых фуллеренов является получение водных нанодисперсий кристаллического фуллерена. Однако получение водорастворимых производных фуллерена сталкивается со значительными физико-химическими проблемами приготовления, дорогостоящими синтезами, агрегацией в растворах. Кроме того, возникают проблемы со стандартизацией. Разработка оригинального метода получения дисперсного фуллерена C<sub>60</sub> (патент № RU2462474C2, 2010 год). снимает значительную часть этих проблем. Дисперсный фуллерен C<sub>60</sub> (dC<sub>60</sub>) лишён важного

недостатка модифицированных фуллеренов – он обладает низкой цитотоксичностью. Кроме того, dC<sub>60</sub> показал высокую противовирусную активность в отношении вируса простого герпеса 1 типа, превосходящую противовирусную активность ацикловира [100]. В связи с этим представляло интерес изучить способность dC<sub>60</sub> воздействовать на герпесвирусную инфекцию другой этиологии, а именно ЦМВИ.

### 1.4.2.3 Гетеродимеры против ЦМВИ

С начала эпидемии СПИДа коинфекции ВИЧ с другими патогенами стали серьезной клинической проблемой, приводящей к инвалидности и смерти. В частности, ЦМВИ относится к числу наиболее распространенных оппортунистических инфекций у людей, живущих с ВИЧ. Хотя ЦМВ широко распространён, у иммунокомпетентных людей он протекает бессимптомно или с незначительными проявлениями (лёгкая слабость, субфебрилитет (температура 37,1-38,0°C), дискомфорт в мышцах, першение в горле, иногда насморк, увеличение лимфатических узлов шеи, увеличение и болезненность слюнных желёз) [111]. Однако у людей, инфицированных ВИЧ, ЦМВ ассоциируется с более высоким риском тяжелых осложнений, таких как цереброваскулярные и сердечно-сосудистые заболевания и является основной причиной смерти [107]. Более того, ЦМВ вносит значительный вклад в активацию иммунитета, что вызывает нарушение регуляции иммунной системы [69, 160]. ЦМВ, распространённость которого среди людей, инфицированных ВИЧ, достигает 90-100%, ассоциируется с повышенным уровнем воспалительных заболеваний разной этиологии. Известно, что ЦМВ усугубляет течение СПИДа. Эти наблюдения позволяют предположить, что меры, направленные на подавление ЦМВ, могут быть эффективной стратегией борьбы с ВИЧ-инфекцией у людей, коинфицированных ЦМВ [75].

Разработка препаратов двойного действия, сочетающих активность против обоих вирусов, может быть полезной для лиц, инфицированных и ВИЧ, и ЦМВ. Одним из способов создания лекарств с двойной активностью является создание

конъюгатов - молекул, которые подавляют соответствующие патогены. Эти конъюгаты представляют собой пролекарство исходных препаратов и могут обладать определенными преимуществами, например, пролонгированным высвобождением активных веществ, что, обычно, приводит к меньшей токсичности, чем комбинация исходных препаратов [43, 137].

В связи с этим представляло интерес изучить противовирусную активность в отношении ЦМВ гетеродимерных конъюгатов на основе AZT и производных 1-[ $\omega$ -(фенокси)алкил]урацила - эффективных ингибиторов репликации ЦМВ [96].

**Заключение.** Анализ данных литературы показал, что ГВЧ поражают различные органы и ткани, являются этиологическими агентами ряда тяжелых заболеваний человека и могут быть причиной смерти. В то же время роль ГВЧ в воспалительных заболеваниях как инфекционной, так и неинфекционной природы, остается недостаточно изученной. Одной из глобальных нерешенных проблем медицины являются гепатиты, которые могут вызываться не только вирусами гепатитов А-Е, но также негепатотропными вирусами, в том числе ГВЧ. Данные о присутствии ГВЧ в печени и других органах больных хроническими гепатитами немногочисленны, сведения о влиянии ГВЧ на патогенез гепатитов и риск развития терминальных стадий болезни практически отсутствуют. Важной социально значимой проблемой является также широко распространенный абактериальный ХП, лечение которого часто оказывается безуспешным. Этиология и терапия ХП являются предметом дискуссий, влияние герпесвирусов на качество спермы и репродуктивную функцию до сих пор остается спорным. Пандемия COVID-19 индуцировала многочисленные исследования, которые показали негативную роль сопутствующих заболеваний на течение и исход этого острого респираторного заболевания. В ряде работ показана коинфекция коронавируса SARS-CoV-2 – возбудителя COVID-19 и герпесвирусов, относящихся к разным подсемействам. Однако об участии ГВЧ в клиническом течении, эффективности терапии и в исходе заболевания мнения исследователей расходятся. Этому способствуют: отсутствие в большинстве работ при обнаружении ГВЧ данных сравнительного количественного анализа геномной вирусной ДНК; отсутствие сведений о

присутствии разных видов ГВЧ, относящихся к 3 подсемействам семейства герпесвирусов (*Orthoherpesviridae*), а также о связи присутствия ДНК ГВЧ с клиническими признаками заболевания.

В связи с этим в диссертационной работе проведено изучение ГВЧ 3-х подсемейств ГВЧ, выполнен количественный анализ ДНК обнаруженных ГВЧ и сопоставлены полученные результаты с клиническими и лабораторными показателями обследованных пациентов. Это позволило обнаружить широкое присутствие ГВЧ в организмах больных хроническими воспалительными заболеваниями печени и урогенитального тракта, показать реактивацию ГВЧ у значительной части пациентов с COVID-19, оценить эффективность специфической противогерпетической терапии при ХП и ассоциацию ГВЧ с тяжестью заболевания гепатитами и исходом COVID-19.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Дизайн исследования

Работа состоит из четырех частей. На Рисунке 8 схематически представлены сведения о каждой из четырех частей. Первая часть (I) направлена на выяснение инфицированности ГВЧ больных гепатитами и определение связи герпесвирусных инфекций с состоянием больных. Вторая часть (II) посвящена изучению вклада ГВЧ в хронические воспалительные заболевания урогенитального тракта мужчин – хронические простатиты/синдром хронических тазовых болей ША и оценке результатов специфического противовирусного лечения. Третья часть (III) содержит данные сравнительного количественного анализа ДНК ГВЧ в органах пациентов с летальным исходом COVID-19 и в органах пациентов, скончавшихся от неинфекционных заболеваний для определения роли ГВЧ в исходе COVID-19.

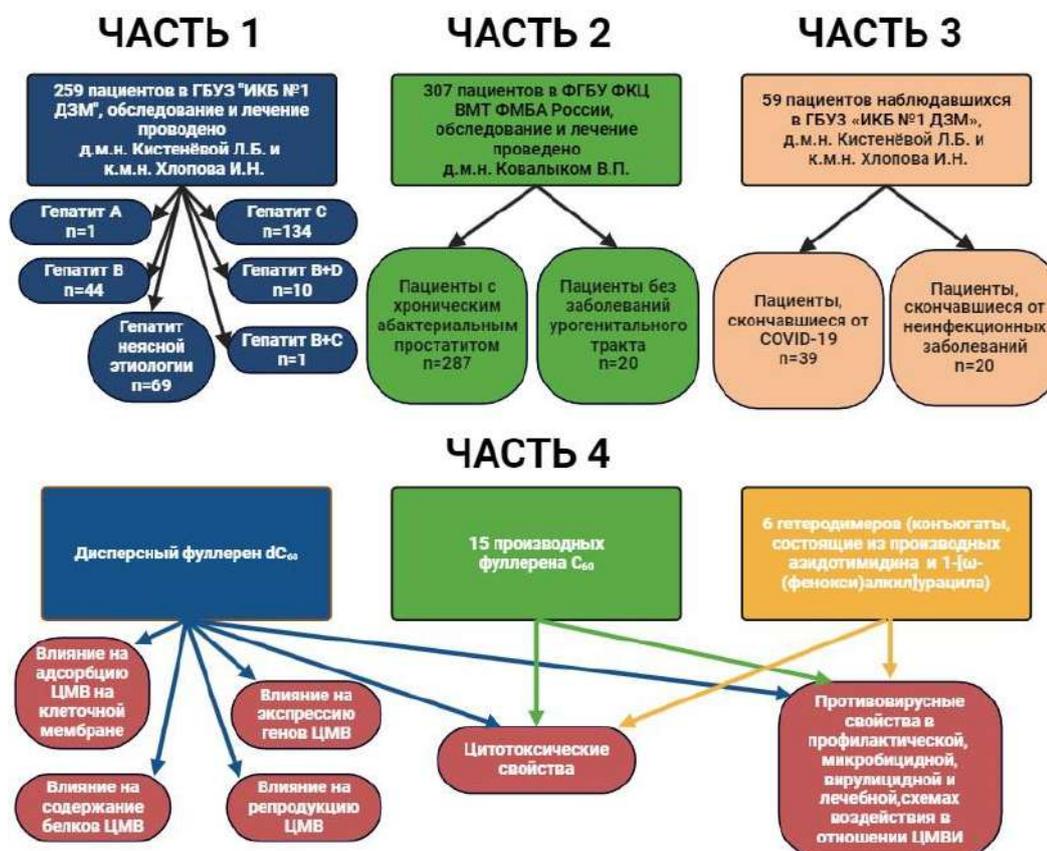


Рисунок 8 – Дизайн исследования.

## 2.2 Основные реактивы

Список основных реактивов и препаратов, использованных в работе, а также фирмы-производители:

Антитела к IE1-p72 (sc-69834), Santa Cruz Biotechnology (США);

Антитела к pp65 (ab31624), Abcam (Великобритания);

Антитела к gB (MA5-29954), Invitrogen (США);

Антитела к  $\beta$ -актину (CC10028), Cell Applications (США);

Антимышинные иммуноглобулины, меченные пероксидазой хрена (ab6789), Abcam (Великобритания);

Бычий сывороточный альбумин (A9647-100G), Merck Sigma-Aldrich (США);

Гентамицин (A011п), ПанЭко (Россия);

Гетеродимеры двойной направленности, ФГБУ «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта» РАН (Россия);

Диаминобензидин (1371GR010), ПанЭко (Россия);

Зелёночувствительная рентгеновская фото пленка Super HR-U, Fuji (Япония);

Лизирующий буфер (SB-G2038-100ML), Servicebio Technology (Бельгия);

Маркёр молекулярного веса белков (26616), Thermo Fisher Scientific (США);

Набор для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В» (K1-2-100), ИнтерЛабСервис (Россия);

Набор реагентов для выявления ДНК ВПГ-1 и ВПГ-2 в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (R-V8-F(RG,iQ)), ИнтерЛабСервис (Россия);

Набор реагентов для выявления ДНК ВЗВ в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (R-V61-50-F(RG)), ИнтерЛабСервис (Россия);

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса (CMV), герпеса 6 типа (HHV6) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (R-V48-S (RG, iQ, Mx)), ИнтерЛабСервис (Россия);

Набор реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией (R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt)), ИнтерЛабСервис (Россия);

Набор реагентов для одновременного выявления ДНК вируса гепатита В (HBV) и РНК вируса гепатита D (HDV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией (R-V56 (RG,iQ,Mx,Dt)), ИнтерЛабСервис (Россия);

Производные фуллерена C<sub>60</sub>, ФГБУН ФИЦ ПХФ и МХ РАН (Россия);

Реагент Бредфорда (B6916-500ML), Merck (Германия).

Среда DMEM (C420п), ПанЭко (Россия);

Сыворотка эмбриональная телячья (1.1.8.1.), БиолоТ (Россия);

Фуллерен dC<sub>60</sub>, ФГБУ ГНЦ “Институт иммунологии” ФМБА России (Россия).

Химопсин (2.1.25.1.), БиолоТ (Россия);

Шприцевой фильтр 0,22 мкм (SLGP05010), Merck (Германия);

DEAE-декстран гидрохлорид (D9885-10G), Merck Sigma-Aldrich (США);

L-глутамин, ПанЭко (Москва).

### 2.3 Пациенты

В исследование влияния ГВЧ на течение и прогноз вирусных гепатитов и гепатитов неуточнённой этиологии были включены 259 пациентов с предварительным диагнозом острого или хронического гепатита, находившихся на обследовании и лечении в ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» в 2018-2020 годах. Материалы от пациентов были предоставлены сотрудниками ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» д.м.н. Кистенёвой Л.Б. и к.м.н. Хлоповой И.Н. У всех пациентов были взяты образцы периферической крови после их информированного согласия. Было проведено также ретроспективное исследование клинических материалов, полученных от 97 пациентов с ХГС и от 21 пациента с острым гепатитом С (ОГС), наблюдавшихся в

ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» в период 2003-2005 годах. Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» в 2017 г, протокол от 15 декабря 2021 г. №6.

Возраст пациентов варьировался от 18 до 71 лет со средним возрастом  $45,1 \pm 15,1$  лет, доля мужчин составляла 59%. Диагностика гепатитов, оценка тяжести заболевания, а также лечение пациентов проводилось в соответствии с директивными документами Минздрава России, а также в соответствии Рекомендациями Европейской ассоциации по изучению печени [4, 65]. Все больные вирусным гепатитом получали базисные и противовирусные препараты. Базисная терапия включала детоксикацию и применение гепатопротекторных средств, противовирусная терапия включала применение нуклеозидных ингибиторов при вирусном гепатите В и противовирусных препаратов прямого действия при вирусном гепатите С. Пациенты с диагнозами аутоиммунный, алкогольный, токсический гепатиты и стеатогепатит были исключены. До начала исследования от каждого пациента было получено информированное письменное согласие. Процедуры исследования были выполнены в соответствии с Декларацией Хельсинки (World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects).

В исследование влияния ГВЧ на заболевания урогенитального тракта мужчин были включены 287 пациентов с хроническим простатитом ХП/СХТБ IIIA, у 23 из которых диагностировали бесплодие, а также 20 мужчин без заболеваний урогенитального тракта. Материалы от пациентов были предоставлены сотрудником Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России д.м.н. Ковальком В.П. Пробы из УГТ мужчин (секрет предстательной железы (СПЖ), мазки из уретры, эякулят) и цельная кровь отбирались после информированного согласия пациентов и сразу после отбора доставлялись в лабораторию. Выделение ДНК и постановка ПЦР в реальном времени выполнялись сразу при поступлении проб. Процедуры исследования были одобрены локальным этическим комитетом Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, протокол от 25 декабря 2020 г. № 21.

В исследование влияния ГВЧ на течение COVID-19 были включены посмертные остаточные клинические материалы от 59 пациентов, находившихся на лечении в ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» в 2021-2023 годах. Из них у 39 скончавшихся пациентов был подтвержден диагноз COVID-19 и у 20 умерших пациентов не были обнаружены маркеры SARS-CoV-2 и признаки COVID-19. Аутопсийные образцы были предоставлены сотрудниками ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» д.м.н. Кистенёвой Л.Б. и к.м.н. Хлоповой И.Н. Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» в 2017 г, протокол от 15 декабря 2021 г. №6.

### **2.3.1 Клинические материалы**

Образцы периферической крови (ПК) после забора от больных с ХГС и ОГС сразу доставлялись в лабораторию. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), выделяли в градиенте фикола (Ficoll-Paque, “Pharmacia”, Швеция). Архивные материалы (МКПК и образцы пункционной биопсии печени), полученные из коллекции лаборатории клеточной инженерии подразделения «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамали» Минздрава России, хранились при  $-20^{\circ}\text{C}$  без повторных циклов замораживания-размораживания. Все пациенты были обследованы стандартными клинико-биохимическими и инструментальными методами.

Пробы из УГТ мужчин (СПЖ, мазки из уретры, эякулят) и цельная кровь сразу после отбора доставлялись в лабораторию. Выделение ДНК и постановка ПЦР в реальном времени выполнялись сразу при поступлении проб.

Аутопсийные материалы были получены из головного мозга, печени, селезёнки, лимфоузлов и лёгких от 39 пациентов с летальным исходом COVID-19. Сходным образом были получены аутопсийные образцы от 20 пациентов, умерших без COVID-19 (группа сравнения). Образцы сразу замораживались и хранились при  $-70^{\circ}\text{C}$  без размораживания до исследования.

### 2.3.2 Дифференциальная диагностика вирусного гепатита

Дифференциальная диагностика вирусных гепатитов и генотипирование вирусов гепатитов были выполнены сотрудником ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава РФ Самохваловым Е.И. на основании общепринятых эпидемиологических, вирусологических и клинико-лабораторных критериев, а также исключения других этиологических факторов согласно национальным стандартам и рекомендациям ВОЗ [3, 17].

Серологическое определение маркеров вирусных гепатитов А, В, С, Д и Е - анти-HAV-IgM, HBsAg, HBeAg, анти-HCV IgG, анти-HB core IgM и IgG, анти-HDV IgM и IgG, анти-HEV-IgM проводили с использованием коммерческих тест-систем методами иммунофлюоресцентного анализа (ИФА) и хемилюминесценции (Roche Cobas e8000 602, Roche Diagnostics, Швейцария). Присутствие ДНК ВГВ, РНК ВГС и вируса гепатита Д определяли методом ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени с использованием наборов (R-V56(RG,iQ,Mx,Dt) и R-V1-Mod(RG,iQ,Mx,Dt), Интерлабсервис, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

### 2.3.3 Обследование пациентов с хроническим гепатитом С

Обследование пациентов было выполнено сотрудниками ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» д.м.н. Кистенёвой Л.Б. и к.м.н. Хлоповой И.Н.

Спектр антител к отдельным белкам ВГС и его активность определяли с помощью тест-системы "ИФА-анти-ВГС-спектр" ("Диагностические системы", Нижний Новгород).

РНК ВГС определяли с помощью "nested"-варианта ПЦР с использованием праймеров из 5'-нетранслируемого региона ВГС [105]. Генотип ВГС определяли по методу Ohno [131].

Концентрацию core-белка в сыворотке крови определяли с использованием сэндвич-версии ELISA (Roche Cobase 8000 602, Roche Diagnostics, Швейцария).

Присутствие белков ВГС в гепатоцитах изучали путем непрямого иммунопероксидазного окрашивания с использованием смеси МКА к core-белку, NS3, NS4 (смесь антител к NS4А и к NS4В) и NS5А. Срезы печени окрашивали, как описано ранее [14], с незначительными модификациями: в качестве субстрата вместо 3-амино-9-этилкарбазола использовали тетрагидрохлорид 3,3-диаминобензидина. Для интерпретации результатов учитывали количество окрашенных клеток и интенсивность окрашивания.

Функциональную активность печени оценивали по уровню аминотрансфераз в сыворотке крови – аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ). Морфологические изменения в печени оценивали в баллах по модифицированной системе Knodell с определением индекса гистологической активности (ИГА) и индекса фиброза (ИФ) [76].

#### **2.3.4 Анализ уровня цитокинов в образцах эякулята**

Уровень цитокинов в эякуляте изучали методом ИФА с использованием наборов ИФА для обнаружения интерлейкина 1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ), интерлейкина 6 (ИЛ-6), фактора некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) и интерферона  $\gamma$  (ИНФ- $\gamma$ ) («Вектор-Бест», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя до и после лечения. Чувствительность определения уровня цитокинов: 0,5 пг/мл (ИЛ-6), 1 пг/мл (ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$ ) и 2 пг/мл (ИНФ- $\gamma$ ).

#### **2.4 Анализ ДНК герпесвирусов человека методом ПЦР в реальном времени в клинических образцах от пациентов и в клеточной культуре**

Выделение ДНК осуществляли с использованием наборов реагентов «ДНК-сорб-В» или «РИБО ПРЕП» (Интерлабсервис, Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию ПЦР проводили, используя набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вирусов ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-

6A/B в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL. Выявление и количественное определение ДНК вируса Эпштейна – Барр, цитомегаловируса и вируса герпеса 6-го типа (R-V48-S(RG,iQ,Mx)), Интерлабсервис, Россия). Ген  $\beta$ -глобина использовался в качестве эндогенного внутреннего контроля. Аналитическая чувствительность тест-системы составляла 5 копий/ $10^5$  клеток (цельная кровь, МКПК, образцы биоптатов) или 400 копий/мл (эякулят, соскоб из уретры, СПЖ, сыворотка). В связи с отсутствием сертифицированных наборов для количественного определения ВПГ и ВЗВ использовали наборы для качественного определения ДНК ВПГ-1,2 и ВЗВ (АмплиСенс® HSV I, II-FL. Выявление ДНК вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов FRT (R-V8-F(RG,iQ)); АмплиСенс® VZV-FL. Выявление ДНК вируса Варицелла – Зостер (R-V61-50-F(RG)), Интерлабсервис, Россия). Для реакции использовали 10 мкл выделенной ДНК. Программа ПЦР представлена в Таблице 2.

**Таблица 2** – Программа ПЦР в реальном времени

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Удержание температуры	95	15 мин	-	1
Циклирование 1	95	5 с	-	5
	60	20 с	-	
	72	15 с	-	
Циклирование 2	95	5 с	-	40
	60	20 с	-	
	72	15 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	

## 2.5 Анализ противовирусной активности изученных соединений

### 2.5.1 Клеточная культура

Использованная в работе клеточная линия фибробластов лёгкого эмбриона человека (ФЛЭЧ) была получена из банка клеточных культур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ. Для пассирования ФЛЭЧ использовали минимальную среду Игла в модификации Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)), с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2 mM L-глутамина и 50 мкг/мл гентамицина. Клетки инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при +37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Пассирование производили раз в 2-3 дня, после того как монослой был полностью сформирован. Деагрегация клеточного монослоя проводилась с использованием раствора Версена, содержащего 0,1 мг/мл химопсина.

Клеточная культура не была контаминирована внеклеточными и внутриклеточными микроорганизмами.

### 2.5.2 Вирус

Использованный в работе штамм ЦМВ AD169 был получен из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ. Нарработку вируса производили путем пассирования на культуре клеток ФЛЭЧ. Заражение ФЛЭЧ производили с инфекционной множественностью (ИМ) 0,1 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на клетку. Клетки с вирусосодержащей жидкостью (ВСЖ) инкубировали в течение 1 часа при +37°C. После инкубации отбирали ВСЖ и вносили поддерживающую среду (DMEM с 2% ЭТС). Инфицированные клетки инкубировали при +37°C до появления признаков цитопатогенного действия (ЦПД). После достижения 90% ЦПД в монослое производили сбор вирусосодержащей жидкости. Для этого культуральные флаконы замораживали при -70°C и оттаивали при комнатной температуре. Далее, для избавления от фрагментов клеточного дебриса, вирусосодержащую жидкость

центрифугировали при 11000 g., +4°C в течение 15 мин. Надосадочную жидкость отбирали, замораживали и хранили при -70°C. Затем определяли инфекционную активность вируса в полученной вирусосодержащей жидкости как описано ниже.

### 2.5.3 Определение инфекционной активности вируса

Определение инфекционной активности вируса проводили с помощью метода «чёрных» бляшек. Для этого выращивали монослой ФЛЭЧ в 48-луночных планшетах, готовили десятикратные разведения образца вируса в среде DMEM ( $10^3$ - $10^6$ ) и вносили в лунки в объёме 100 мкл. Производили инкубацию в течение часа при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Спустя час отбирали ВСЖ, промывали клетки PBS, и наносили 200 мкл агара (6,25 мл ddH<sub>2</sub>O, 25 мл DMEM, подогретой до 42°C, 0,75 мл 7,5% бикарбоната натрия, 0,5 мл DEAE-декстран гидрохлорида (100 мг/мл), 17,5 мл подогретого до 42°C 2% раствора глюкозы и в конце – 50 мкл обработанного L-1-Тозиламид-2-фенилэтил хлорметилкетонотрипсина (1 мг/мл)). Дожидались затвердевания агара и помещали планшет в термостат с температурой 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Далее производили фиксацию клеток добавлением 100 мкл 3,7% формальдегида на агар при комнатной температуре в течение 20 минут. Отбирали формальдегид и удаляли агар с помощью шпателя [91]. Клетки, содержащие вирусные белки (бляшки) выявляли иммуноцитохимическим методом с использованием смеси мышиных моноклональных антител к вирусным белкам pp65 и IE1-p72. Титр вируса выражали в количестве БОЕ, содержащихся в 1 мл неразведенной ВСЖ. Титр *de novo* полученного вируса составлял  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  БОЕ/мл.

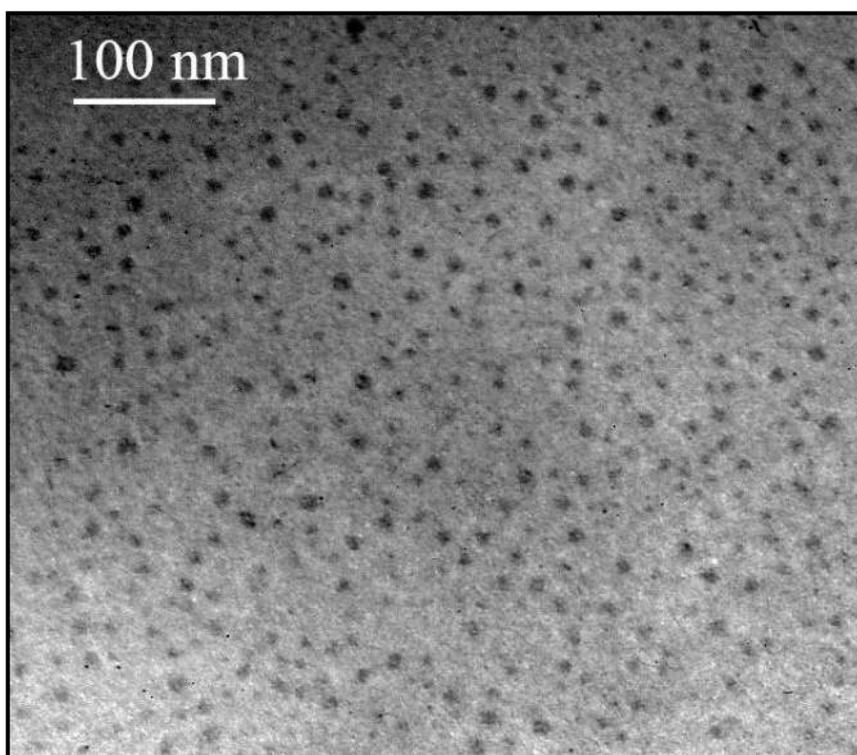
### 2.5.4 Производные фуллерена C<sub>60</sub>

Из Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии РАН было получено 15 производных фуллерена C<sub>60</sub> в сухом виде. В Приложении А приведены формулы этих соединений. Соединения

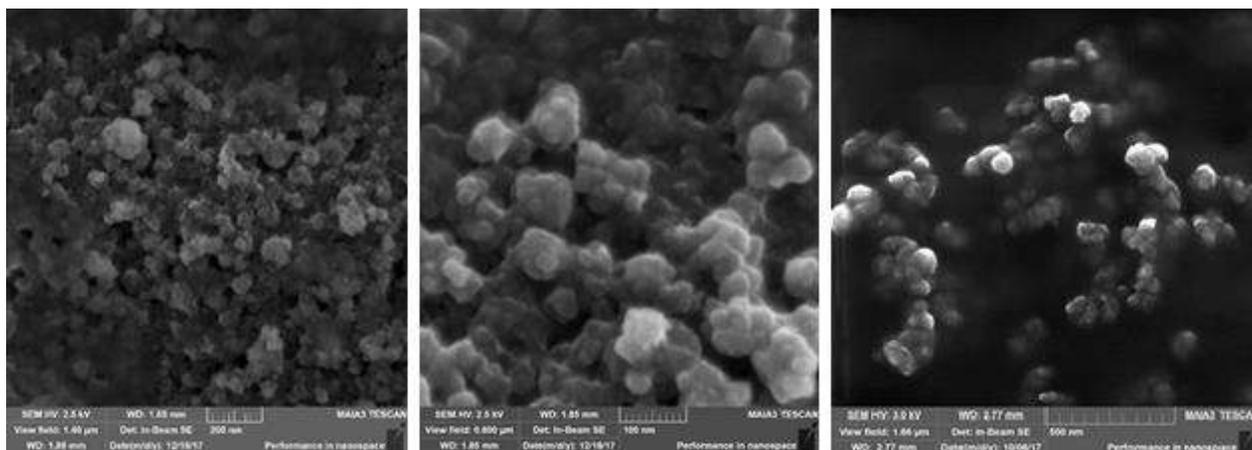
растворяли в физиологическом растворе, концентрация составляла 5 мг/мл. Далее растворы фильтровали через шприцевой фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

### 2.5.5 Дисперсный фуллерен dC<sub>60</sub>

Дисперсный фуллерен dC<sub>60</sub> был предоставлен ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России. На Рисунках 9 и 10 представлены электронные микрофотографии дисперсного фуллерена dC<sub>60</sub>, полученные с помощью электронного микроскопа.



**Рисунок 9** – Электронная микрофотография dC<sub>60</sub> (2D), полученная в лаборатории электронной микроскопии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» РАМН.



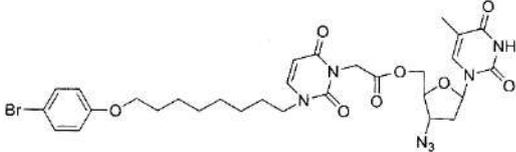
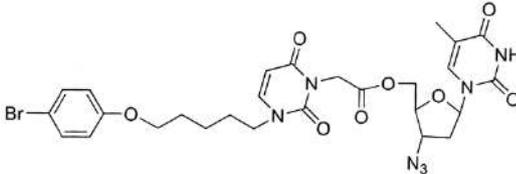
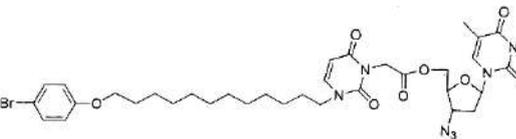
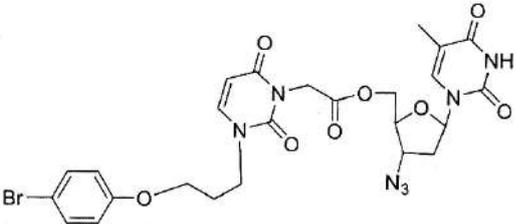
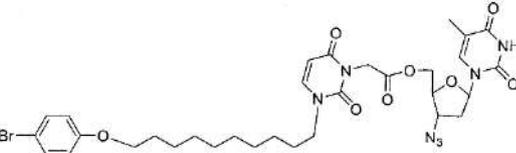
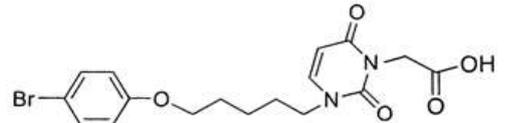
**Рисунок 10** – Электронные микрофотографии  $dC_{60}$  (3D), полученные в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

На способ получения аддуктов фуллерена  $C_{60}$  был получен патент (№ RU2462474C2, 2010 год). Водный раствор фуллерена  $dC_{60}$  получали новым запатентованным диализным/ультрафильтрационным методом, описанным в патенте (№ RU2630561C2, 2015 год). Сведения о трёх параметрах цитотоксичности производных фуллерена  $C_{60}$  содержится в базе данных (свидетельство о государственной регистрации базы данных № RU2019620936, 2019).

### 2.5.6 Гетеродимеры

Гетеродимеры, состоящие из азидотимидина и производных 1-[ $\omega$ -(фенокси)алкил]урацила были синтезированы и предоставлены сотрудниками Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук. В Таблице 3 приведены формулы изученных соединений. Соединения были растворены в DMSO, концентрация составляла 7-13 мг/мл.

Таблица 3 – Названия, формулы и молекулярная масса гетеродимеров

№	Шифр	Структура	Молекулярная масса
1	LN-116		702.55
2	LN-128		660.47
3	LN-129		758.66
4	LN-133		632.42
5	LN-138		730.61
6	Z-492		403.27

### 2.5.7 Определение цитотоксических свойств соединений

Для определения цитотоксических свойств производных фуллерена  $C_{60}$ , дисперсного фуллерена  $dC_{60}$  и гетеродимеров готовили пробы с возрастающими десятикратными разведениями. Для соединений использовали концентрации 1000, 100, 50, 25 и 5 мкг/мл, для фуллерена  $dC_{60}$  – 500, 125 и 5 мкг/мл. Разведения вносили в объеме 500 мкл на монослой ФЛЭЧ, выращенных в 48-луночных планшетах (Costar, США). Цитотоксичность определяли по влиянию на жизнеспособность клеток, которую оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего. Острую цитотоксичность ( $ОЦД_{50}$ ) определяли спустя 24 часа после внесения веществ, хроническую цитотоксичность ( $ЦД_{50}$ ) – на третьи сутки (72 ч), максимально переносимую цитотоксическую дозу (МПД) – спустя семь суток после внесения веществ. Цитотоксичность определяли путем вычисления процентного отношения количества жизнеспособных клеток к общему количеству клеток в лунке. Значения  $ОЦД_{50}$ ,  $ЦД_{50}$  и МПД рассчитывали методом линейной регрессии с использованием пакета документов Microsoft Excel.

### 2.5.8 Определение противовирусной активности соединений

Для определения противовирусной активности соединений были использованы четыре схемы воздействия: микробицидная, профилактическая, вирулицидная и терапевтическая [100].

Для выполнения всех четырех схем воздействия использовали клетки ФЛЭЧ, выращенные в 48-луночных планшетах (Costar, США). Использовали следующие схемы опытов.

Микробицидная схема. На монослой клеток вносили 200 мкл среды DMEM, содержащей производные фуллерена  $C_{60}$  и  $dC_{60}$  в концентрациях 10 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,1 мкг/мл и инкубировали в течение 1 часа при  $+37^{\circ}C$ . Затем, не отбирая вещество, вносили 200 мкл суспензии вируса в концентрации 150 БОЕ/мл и инкубировали 1 час при  $+37^{\circ}C$ , 5%  $CO_2$ . ВСЖ отбирали, монослой клеток

промывали чистой средой DMEM 3 раза и вносили поддерживающую среду (2% DMEM). Данная схема моделирует микробицидное действие при экстренной профилактике *in vivo*.

Профилактическая схема. На клеточный монослой вносили 500 мкл поддерживающей среды DMEM, содержащей соединения в концентрациях 10 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, и инкубировали в течение 1 часа при +37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Затем отбирали разведения веществ, клетки промывали чистой средой DMEM 3 раза и заражали 100 мкл ЦМВ с ИМ 150 БОЕ/мл в течение 1 часа при +37°C, 5% CO<sub>2</sub>. После инкубации монослой клеток промывали чистой средой DMEM 3 раза и вносили поддерживающую среду DMEM. Данная схема моделирует профилактическое действие *in vivo*.

Вирулицидная схема. Вирус инкубировали совместно с соединениями в концентрациях, перечисленных выше, в течение 1 часа при +37°C. Затем инкубационную смесь вносили на монослой клеток и инкубировали в течение часа при +37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Далее смесь отбирали, промывали монослой клеток 3 раза и вносили поддерживающую среду. Данная схема моделирует вирулицидное действие *in vivo*, которое характеризует вируснейтрализующую активность соединения.

Терапевтическая схема. Монослой клеток заражали 100 мкл ЦМВ с ИМ 150 БОЕ/мл. После адсорбции вируса в течение 1 часа при +37°C, 5% CO<sub>2</sub> монослой клеток промывали чистой средой DMEM 3 раза и вносили по 500 мкл разведений исследуемых соединений в различных концентрациях непосредственно после адсорбции вируса. Данная схема моделирует терапевтическое действие *in vivo*.

Оценка противовирусной активности соединений. Спустя 5 суток после постановки опытов по схемам, перечисленным выше, определяли активность соединений по отношению к ЦМВ. В каждом варианте опыта подсчитывали общее количество клеток и количество клеток, содержащих вирусные белки, в 10 лунках 48-луночной панели, определяли среднее значение на лунку и стандартное отклонение среднего значения, различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Оценку проводили по изменению количества ЦМВ-инфицированных

клеток в культуре, обработанной веществами, по сравнению с контрольной (не обработанной, но инфицированной ЦМВ). Для этого проводили иммуноцитохимическое окрашивание клеток, обработанных и не обработанных соединениями. Использовали мышинные МКА к сверххранному IE1-p72 и раннему pp65 белкам ЦМВ, а в качестве вторичных – антивидовую сыворотку, конъюгированную с пероксидазой хрена. Окрашенные препараты клеток исследовали в световом микроскопе AxioCamMRC 5, Zeiss, (Германия) при увеличении 400х.

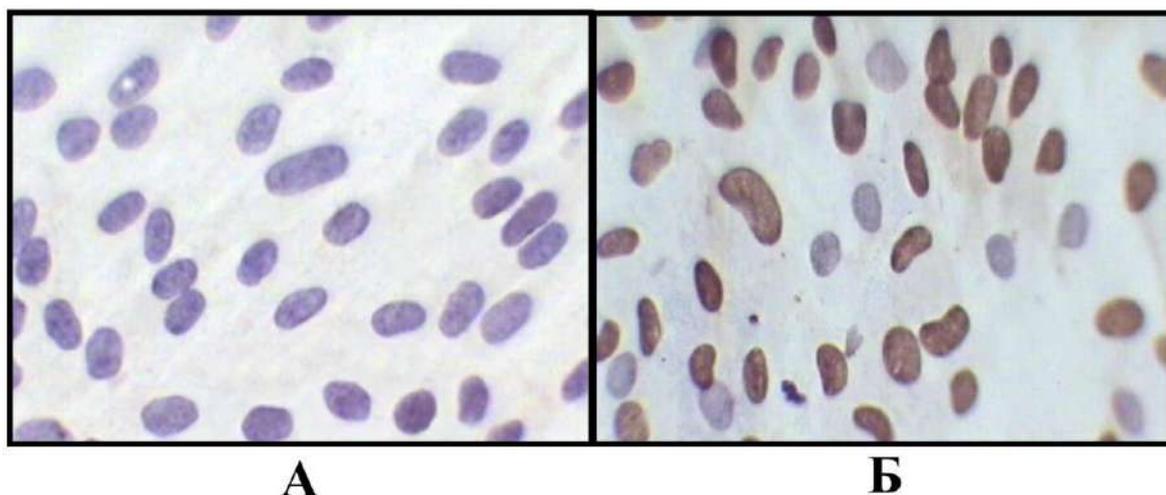
Для характеристики противовирусной активности определяли 50% ингибирующие дозы (ИД<sub>50</sub>) для каждого из соединений, которые являются концентрациями соединений, приводящих к уменьшению количества клеток, содержащих вирусные белки на 50% по отношению к контрольным, не обработанным клеткам. Для вычисления ИД<sub>50</sub> строили графики зависимости снижения количества инфицированных клеток (в процентах) от концентраций соединений. Значения ИД<sub>50</sub> рассчитывали методом линейной регрессии с использованием пакета документов Microsoft Excel. Химиотерапевтический индекс (ХТИ) рассчитывали, как отношение ЦД<sub>50</sub> к ИД<sub>50</sub>. Согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (глава 32, страница 532), соединения обладают противовирусной активностью, если ХТИ равен или более 8 [11].

Для характеристики противовирусных свойств определяли также влияние dC<sub>60</sub> на активность ЦМВ (титр) в культуральной жидкости и репродукцию вирусной ДНК методами, описанными в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [11].

### **2.5.9 Иммуноцитохимическое окрашивание клеток культуры**

Для идентификации инфицированных клеток с монослоя клеток отбирали культуральную среду, однократно промывали PBS, вносили метанол и фиксировали в течение 30 минут при -20°C. Затем, промывали PBS три раза в

течение 5 минут и инкубировали с антителами к вирусным белкам (к сверхраннему IE1-p72 в разведении 1:30 и к раннему pp65 в разведении 1:30) в течении часа при +37°C, затем промывали PBS пять раз в течение 5 минут. После отмывки вносили вторичные антитела (антимышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена) в разведении 1:125, инкубацию проводили в течение часа при +37°C, далее клетки промывали PBS пять раз по 5 минут. Затем вносили субстрат, содержащий 0,5 мг/мл диаминобензидина и 0,037% пероксида водорода. Под контролем микроскопа дожидались появления окраски, реакцию останавливали промыванием монослоя клеток дистиллированной водой. Далее, с помощью светового микроскопа, производили подсчёты окрашенных бляшек – скоплений инфицированных клеток (Рисунок 11).

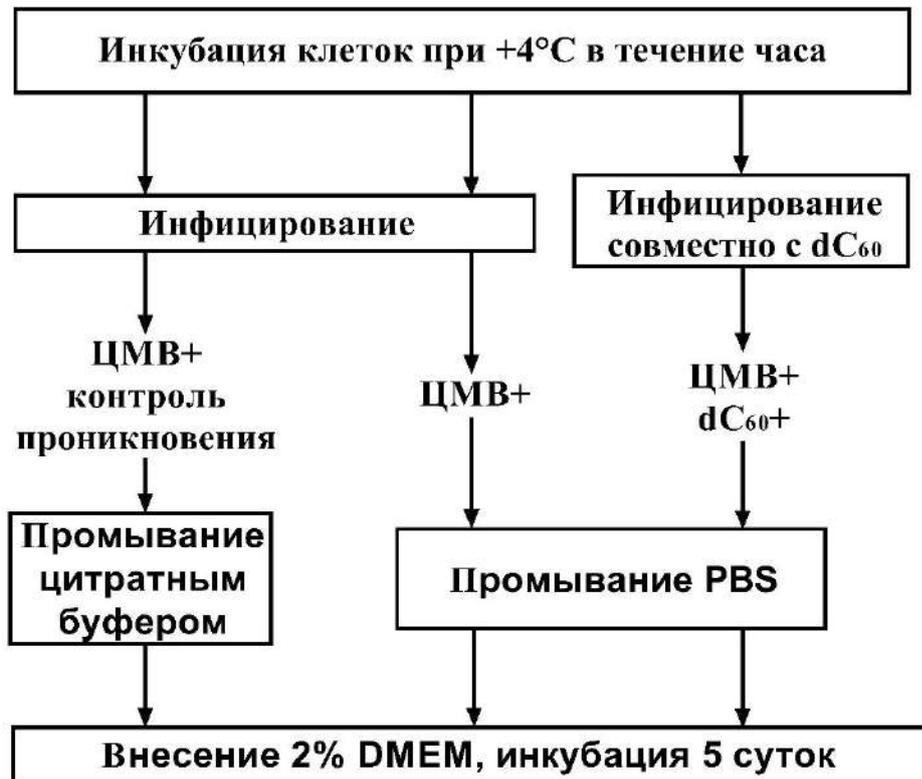


**Рисунок 11** – Иммуноцитохимическое окрашивание клеток на вирусные белки ЦМВ. Контрольные, не инфицированные ФЛЭЧ (А). Инфицированные ФЛЭЧ, содержащие вирусные белки (Б). Коричневая окраска соответствует локализации белков ЦМВ. Фиолетовый цвет – окрашенные гематоксилином ядра клеток.

#### 2.5.10 Изучение влияния dC<sub>60</sub> на адсорбцию ЦМВ на клеточной мембране

Предварительно охлаждённый при +4°C в течение 1 часа монослой ФЛЭЧ в 48-луночном культуральном планшете инфицировали ЦМВ с ИМ 30 БОЕ/лунка в

присутствии dC<sub>60</sub> в концентрации 500 мкг/мл. После инкубации в течение 2 ч при +4°C (период адсорбции вируса) клетки промывали охлаждённым PBS для удаления dC<sub>60</sub> и не связавшихся вирусных частиц и вносили поддерживающую среду (2% DMEM). В клетки из контрольной группы, не обработанные dC<sub>60</sub>, вносили цитратный буфер (pH 3,0), для инактивации вирусных частиц, чтобы убедиться в том, что в результате инкубации при +4°C происходит только адсорбция вируса, но не происходит его проникновение. Затем промывали холодным PBS и вносили 2% DMEM. После инкубации при +37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение пяти суток детектирование инфицированных клеток проводили методом «черных» бляшек. На Рисунке 12 представлена схема опыта [133].



**Рисунок 12** – Схема опыта по изучению влияния dC<sub>60</sub> на адсорбцию ЦМВ на ФЛЭЧ.

### **2.5.11 Изучение влияния фуллерена dC<sub>60</sub> на экспрессию вирусных белков в лечебной схеме воздействия**

Монослой ФЛЭЧ в 48-луночном планшете заражали 200 мкл ЦМВ с инфекционной активностью 600 БОЕ/мл. После адсорбции вируса в течение 1 часа при +37°C монослой клеток промывали чистой средой и вносили dC<sub>60</sub> в концентрации 500 мкг/мл в 2% DMEM. После инкубации в течение 5 суток при +37°C клетки окрашивали иммуноцитохимическим методом на вирусные белки – IE1-p72, pp65 и gB.

### **2.5.12 Выявление белков методом иммуноблоттинга в клеточной культуре**

Монослой ФЛЭЧ однократно промывали PBS. Лизирование монослоя ФЛЭЧ проводили лизирующим буфером при +4°C. В лизатах клеток измеряли концентрацию белка по методу Бредфорда, фосфатно-солевым буферным раствором довели концентрацию белка в пробах до 1 мг/мл. Далее производили пробоподготовку путём смешивания лизатов клеток с буфером для нанесения образцов, в котором содержался SDS и 2-меркаптоэтанол, в соотношении 1:2.

Электрофорез (ЭФ) белков проводили в полиакриламидном геле с применением буферной системы для SDS-электрофореза по Лэммли. Использовали ячейку для электрофореза Mini-PROTEAN 3, (Bio-Rad, cat № 165-330, США). Для концентрирования белков проводили ЭФ в течение 30 минут при напряжении 40 вольт в 4% концентрирующем геле, далее проводили разделение белков в 12% разделяющий геле в течение 1,5 часов при напряжении 130 вольт. Для контроля молекулярной массы использовали маркер (14,4-116 кДа) (Thermo Fisher Scientific, cat № 26610, США).

Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (0.45 мкм, «Schleicher&Schuell», Германия) осуществляли в мини ячейке MiniTrans-Blot (Bio-Rad, cat № 170-3930, США) в течение часа при напряжении 100 В. С помощью

окрашивания мембраны 2% раствором PonceauS в течение 30 мин контролировали эффективность переноса белков.

После переноса инкубировали мембраны в блок-буфере (PBS с 5% сухого обезжиренного молока, 0,1% Tween-20) в течение 1,5 часов при комнатной температуре. После блокировки мембрану трижды промывали в PBS с 0,1% Tween-20 и наносили на неё блок-буфер с МКА к белкам ЦМВ или к клеточным белкам и инкубировали в течение 1,5 часов при комнатной температуре. В работе использовали МКА к вирусным белкам IE1-p72, pp65, gB и клеточному белку –  $\beta$ -актину. Далее производили отмывку не связавшихся МКА в PBS с 0,1% Tween-20 5 раз по 5 мин. Затем инкубировали мембрану с поликлональными кроличьими анти-мышинными иммуноглобулинами, меченными пероксидазой хрена (1:250) при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем мембрану отмывали в PBS с 0,1% Tween-20 5 раз по 5 мин. Для выявления образовавшегося комплекса антиген-антитело использовали набор реагентов для хемилюминесцентного анализа ULTRA SENSITIVE® Enhanced Horseradish Peroxidase-DAB In Situ Detection System (Bio-Rad, США). Для детекции сигнала хемилюминесценции использовали зеленочувствительную рентгеновскую фотопленку. Пленку проявляли с использованием проявителя и фиксажа фирмы ВИПС-МЕД (Россия) согласно методике фирмы-производителя. Полученные данные обрабатывали с помощью программы ImageJ (United States Department of Health and Human Services, версия 1.52, 2020 год).

### **2.5.13 Измерение концентрации белков в пробах для электрофореза по методу Брэдфорда**

Для определения концентрации белка в пробах готовили стандартные растворы бычьего сывороточного альбумина с концентрациями 1,4, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 мг/мл и образец, не содержащий белка.

В лунки 96-луночного планшета вносили по 5 мкл стандартных и опытных образцов, добавляли по 250 мкл реагента Брэдфорда, затем инкубировали в течение

30 минут. Измерение оптической плотности проводили на спектрометре Sunrise (Tecan Austria GmbH, Австрия) при длине волны 595 нм [33].

По графику зависимости оптической плотности от концентрации стандартных образцов белка рассчитывали содержание белка в опытных образцах методом линейной регрессии с использованием пакета документов Microsoft Excel.

#### **2.5.14 Анализ мРНК вирусных и клеточных генов методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в культуре клеток**

Тотальную РНК выделяли из клеток с использованием реагента Тризол (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и чистоту препаратов РНК определяли с помощью спектрофотометра (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, MA, США). Реакцию синтеза комплементарной ДНК проводили, используя один микрограмм суммарной РНК и обратную транскриптазу MultiScribe (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) в соответствии с инструкциями производителя. Продукт реакции хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Дизайн праймеров выполняли с использованием карты генома ЦМВ штамма AD169 и следующего программного обеспечения: программы Vector NTI8, сервиса Themfold Web Server (University at Albany) и Primer-BLAST (NSBI). В качестве референсного гена использовали ген *GAPDH*. В качестве условной единицы при определении уровня содержания целевых мРНК использовали отношение сигнала целевой мРНК к сигналу *GAPDH*. Статистическую значимость различий между средними значениями определяли с помощью двухстороннего критерия Стьюдента. В Таблице 4 приведены использованные праймеры для генов ЦМВ и программа амплификации.

**Таблица 4** – Праймеры, использованные в работе

Гены	Праймеры	Условия амплификации для ПЦР	
		Температура отжига, °С	Время отжига, сек
ЦМВ <i>UL122</i>	F: AGTCTGGGAGACCCGCTGTTTC R:GATTCTATGCCGCACCATGTCC	57	20
ЦМВ <i>UL54</i>	F:GATGTCCTTAGAGAGCACCGACG R: AAGAAGTACGGCGTGCCACG	64	20
<i>GAPDH</i>	F:TCCTCTGACTTCAACAGCGACACC R:TTCGTTGTCATACCAGGAAATGAGC	65	20

## 2.6 Статистическая обработка результатов

Категориальные переменные, такие как пол и частота выявления различных характеристик, были проверены с использованием теста Манна-Уитни, парного теста Уилкоксона, точных тестов  $\chi^2$  и Фишера. Возраст, продолжительность болезни, уровни АЛТ и АСТ в сыворотке, а также концентрация core-белка ВГС в сыворотке крови, представлены в виде средних  $\pm$  стандартные ошибки средних (SEM) и проанализированы с использованием двуххвостого t-критерия Стьюдента. Для проверки на нормальность распределения концентрации ДНК ГВЧ использовали тест нормальности Колмагорова. Подсчет средних значений и стандартных ошибок проводили с использованием пакета STATISTIKA 12.6 (StatSoft Inc., Tulsa, США). Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

Для создания графиков использовалось программное обеспечение Prism 7 (GraphPad7, San Diego, США).

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **3.1 Влияние ГВЧ на течение и прогноз гепатитов разной этиологии**

#### **3.1.1 Распространённость герпесвирусов человека среди больных с гепатитами**

Совместно с сотрудниками клинического отдела ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» д.м.н. Кистеневой Л.Б. и к.м.н. Хлоповой И.Н. нами было изучено распространение 3-х ГВЧ (ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6) среди 259 пациентов, находившихся на стационарном и амбулаторном лечении в ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» в 2018-2020 гг. с установленными диагнозами «вирусные гепатиты А, В, С и D», а также с предварительным диагнозом «гепатит неясной этиологии». Определение ДНК ГВЧ методом количественной ПЦР проводили в периферической крови, результаты представлены в Таблице 5.

**Таблица 5** – Частота выявления герпесвирусов в периферической крови у пациентов с поражениями печени различной этиологии

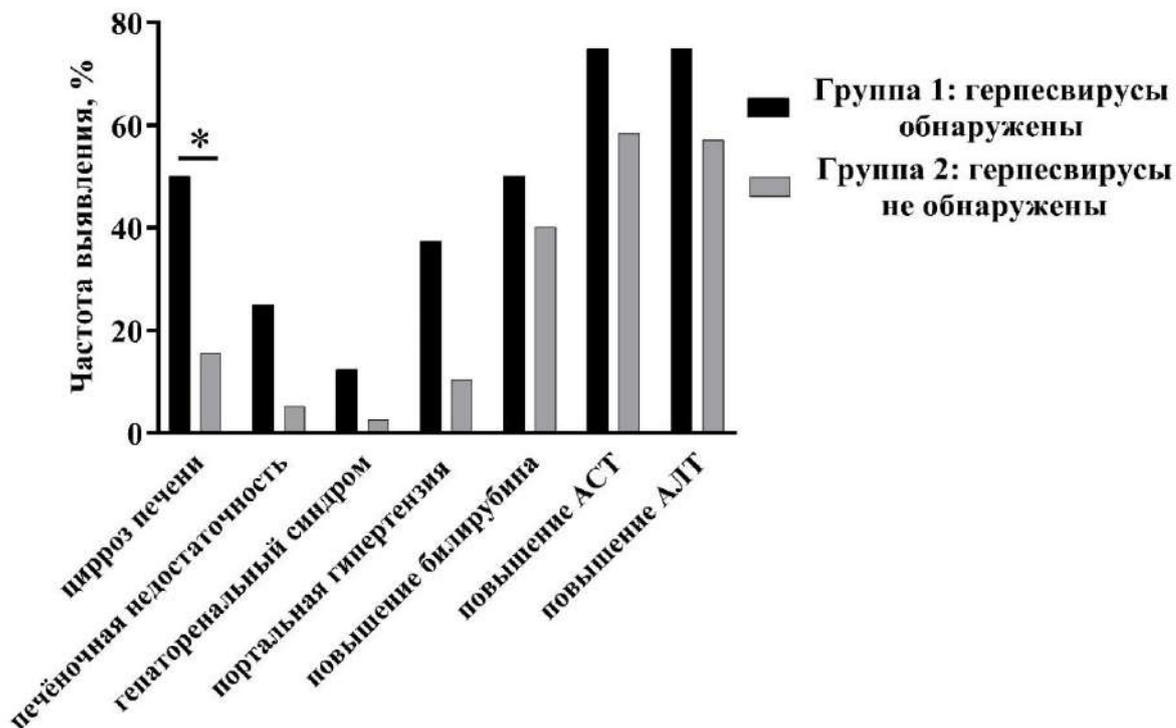
Диагноз	Число пациентов, n	Число пациентов с герпесвирусами (%)				Частота выявления 3-х ГВЧ (%)
		ЦМВ	ВГЧ-6	ВЭБ	ВГЧ-6 + ВЭБ	
Вирусный гепатит А	1	0	0	0	0	0
Вирусный гепатит В (острый и хронический)	44	0	3 (6,8%)	4 (9,0%)	0	7/44 (15,9%)
Вирусный гепатит В (острый и хронический) с гепатитом дельта	10	0	0	0	0	0
Вирусный гепатит С (острый и хронический)	134	3 (2,2%)	3 (2,2%)	10 (7,5%)	1 (0,7%)	17/134 (12,7%)
Хронический гепатит В+С	1	0	0	0	0	0
Гепатит неясной этиологии	69	3 (4,3%)	0	4 (5,8%)	0	7/69 (10,1%)
Всего	259	6 (2,3%)	6 (2,3%)	18 (6,9%)	1 (0,4%)	31/259 (12,0 %)

Герпесвирусы были обнаружены у 12% пациентов, частота выявления ГВЧ 4, 5 и 6 типов несколько различалась, однако различия не достигали статистической значимости ( $p > 0,05$ ). ГВЧ не были обнаружены при гепатите А, при гепатит В с гепатитом дельта и при сочетанной инфекции гепатиты В+С. По-видимому, это объясняется тем, что количество обследованных пациентов с данными диагнозами было слишком мало (1 или 10 пациентов). Чаще всего в периферической крови выявлялся геном ВЭБ – в 58,1% из всех образцов ПК, содержащих анализируемые

герпесвирусы. Анализ ассоциаций этиологического фактора гепатита с маркерами различных представителей герпесвирусов показал, что острый и хронический гепатит С были чаще ассоциированы с ВЭБ, гепатит В – с ВЭБ и ВГЧ-6, гепатит неясной этиологии – с ВЭБ и ЦМВ. Представляет интерес, что при гепатите неясной этиологии ГВЧ определены в ПК у 7 из 69 пациентов, что по частоте встречаемости (10,1%) статистически значимо не отличалось от таковой при вирусных гепатитах ( $p > 0,05$ ).

### **3.1.2 Анализ клинико-лабораторных данных**

Сравнительный анализ клинических и лабораторных показателей был проведен сотрудниками клинического отдела ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» д.м.н. Кистеневой Л.Б. и к.м.н. Хлоповой И.Н. у 85 пациентов, поступивших в 2020 году. Эти пациенты представляли случайную выборку из всех 259 обследованных пациентов. У 8 пациентов были обнаружены ГВЧ (группа 1), у 77 пациентов отсутствовали маркёры герпесвирусных инфекций (группа 2) (Рисунок 13).

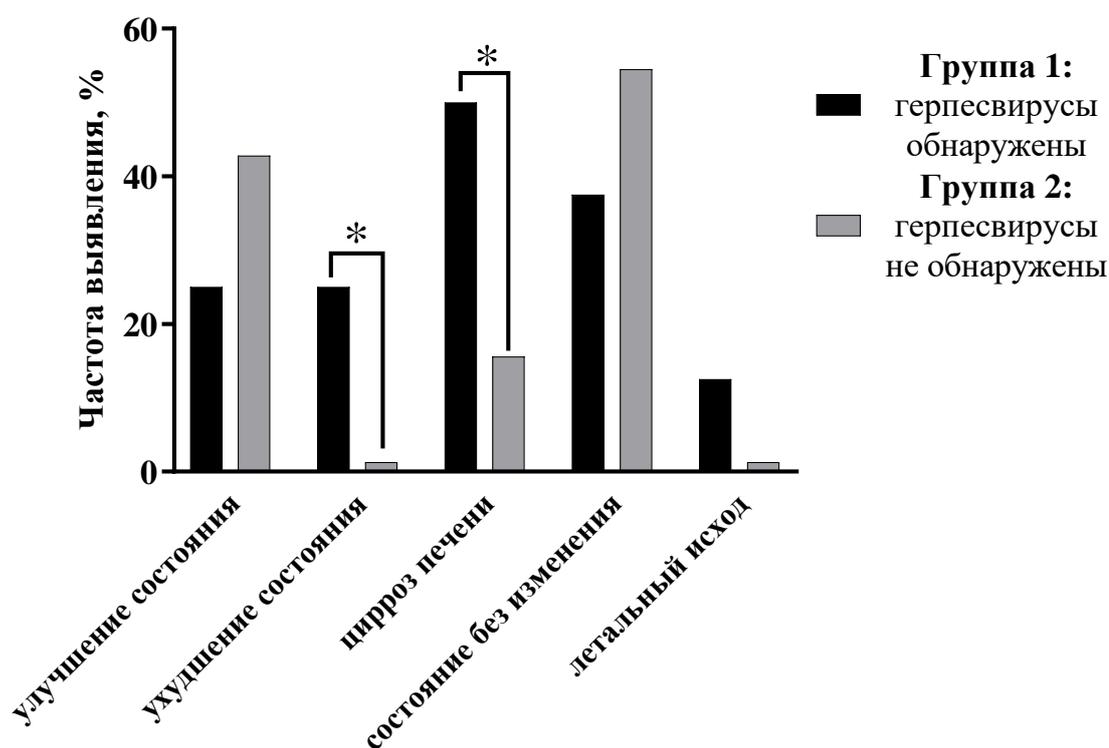


**Рисунок 13** – Клинические и лабораторные данные у пациентов с вирусным гепатитом и гепатитом неустановленной этиологии при коинфекции герпесвирусами и без неё. По горизонтали – изученные клинические признаки и изменения уровней билирубина и ферментов печени АЛТ – аланинаминотрансферазы и АСТ – аспартатаминотрансферазы. По вертикали – количество пациентов, %. \* –  $p < 0,05$ .

Анализ клинического течения гепатита у пациентов с сопутствующей ГВИ (1-я группа) и без нее (2-я группа) выявил более тяжелое развитие гепатита в 1-й группе. Синдромы, осложняющие прогрессирование гепатита, такие как декомпенсация печени, гепаторенальный синдром и портальная гипертензия чаще диагностировались у пациентов группы 1 по сравнению с группой 2, однако различия не достигали статистической значимости. Повышение уровней билирубина, АЛТ и АСТ (более чем в два раза превышающее верхнюю границу нормы) чаще наблюдалось у пациентов группы 1, но также не достигало статистической значимости. Важными являются данные о статистически значимых различиях, обнаруженных по количеству больных с циррозом печени. Он был диагностирован у каждого второго пациента с гепатитом в сочетании с герпесвирусной инфекцией и реже – у 15,6% пациентов без герпесвирусной

инфекции ( $p < 0,05$ ). Цирроз печени является конечным патологическим следствием различных хронических заболеваний печени.

Все пациенты с вирусными гепатитами получали базовое и противовирусное лечение. Изменения состояния пациентов в течение заболевания сравнивали в 2-х группах: с ДНК ГВЧ в ПК (группа 1) и без ДНК ГВЧ (группа 2). Данные представлены на Рисунке 14.



**Рисунок 14** – Клиническое состояние у пациентов с вирусным гепатитом и гепатитом неустановленной этиологии при коинфекции герпесвирусами (группа 1,  $n=8$ ) и без неё (группа 2,  $n=77$ ). \* –  $p < 0,05$ .

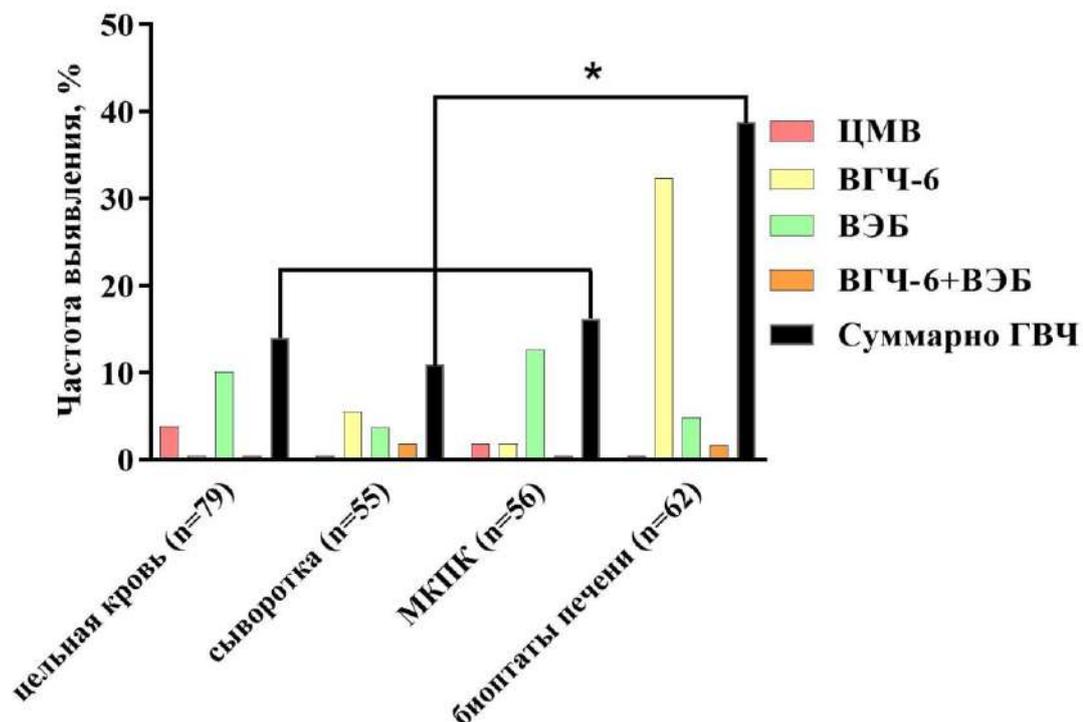
Признаки улучшения состояния – нормализация уровня ферментов печени, билирубина, купирование астенического синдрома и нормализация размеров печени и селезенки, были отмечены у 25% пациентов в группе 1 и у 42,8% в группе 2. Ухудшение состояния (усиление симптомов некроза печени и печеночной недостаточности, а также повышение уровня печеночных ферментов) наблюдалось у 25% пациентов с сопутствующей герпесвирусной инфекцией и только у 1,3% без

герпесвирусной инфекции ( $p < 0,05$ ). Тяжелое прогрессирование хронического вирусного гепатита С у одного пациента, у которого в ПК были обнаружены ДНК ВГЧ-6 и ДНК ВЭБ (из группы 1), привело к летальному исходу. Летальный исход был также зарегистрирован у одного из 77 пациентов из группы 2.

Полученные результаты демонстрируют, что ГВЧ негативно влияют на течение вирусных гепатитов, ухудшая ответ на терапию гепатитов, увеличивая тяжесть клинического течения заболевания и способствуя развитию цирроза печени.

### **3.1.3 Сравнительный анализ частоты выявления герпесвирусов в различных биологических материалах от больных гепатитом С**

Более половины обследованных пациентов (134 из 259) были инфицированы ВГС и имели диагнозы ХГС или ОГС. В связи с этим была более подробно исследована эта группа пациентов. Были изучены свежеполученные образцы цельной ПК или сыворотки крови от 134 пациентов, находившихся на лечении в ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ», а также архивные материалы от 118 пациентов. Архивные материалы были представлены образцами МКПК и биопсии печени, которые длительно хранились при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Сравнительная частота обнаружения ДНК ГВЧ в различных биологических материалах у пациентов с гепатитом С приведена на Рисунке 15.



**Рисунок 15** – Сравнительный анализ частоты выявления ГВЧ в различных биологических материалах от больных вирусным гепатитом С. Частота выявления ГВЧ в биоптатах печени суммарно статистически значимо отличалась от таковой в других материалах ( $p < 0,005$ ). МКПК – мононуклеарные клетки периферической крови. \* –  $p < 0,05$ .

Герпесвирусы реже всего выявлялись в сыворотке крови (суммарно – в 10,9%) и чаще всего в биоптатах печени (в 38,7%). Частота обнаружения герпесвирусов в биоптатах печени была статистически значимо выше, чем в других материалах ( $p < 0,005$ ). В цельной крови и в МКПК у пациентов с ХГС чаще двух других ГВЧ встречался ВЭБ, в биоптатах печени – ВГЧ-6.

### 3.1.4 Демографические и клинические показатели больных хроническим гепатитом С

Для сравнения характеристик пациентов с ХГС, от которых были получены архивные материалы (биопсия печени, МКПК), пациенты были разделены на две группы, в зависимости от присутствия ГВЧ. Результаты анализа демографических и клинических данных пациентов полученные сотрудниками клинического отдела

ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» д.м.н. Кистеневой Л.Б. и к.м.н. Хлоповой И.Н. и приведены в Таблице 6.

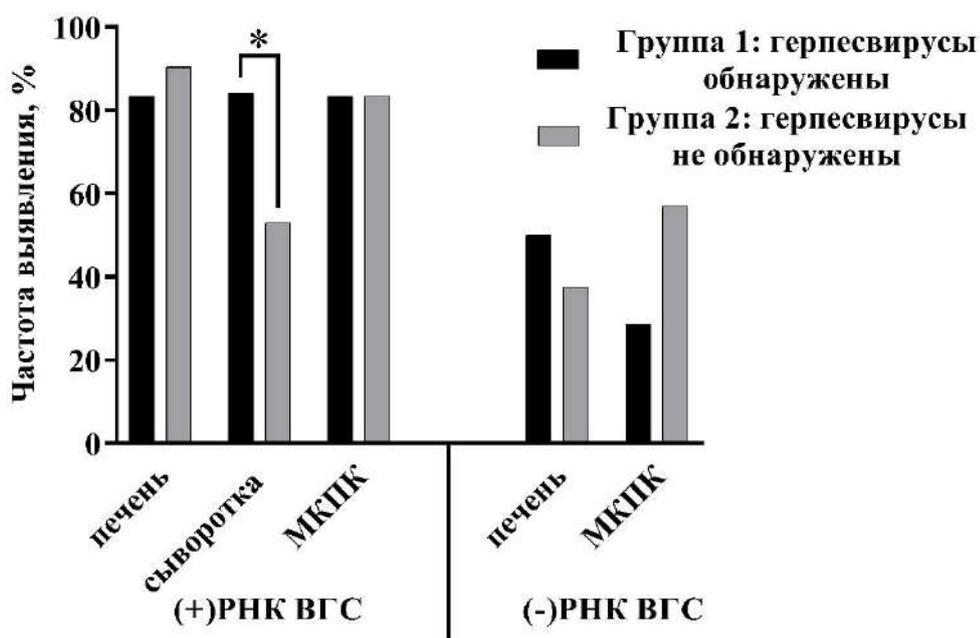
**Таблица 6** – Сравнительный анализ демографических и клинических показателей пациентов с ХГС, инфицированных и неинфицированных ГВЧ

Параметры	Группа 1: герпесвирусы обнаружены (n=30)	Группа 2: герпесвирусы не обнаружены (n=67)	Значимость различий, p
Возраст (годы)	31,5±2,2	30,1±1,5	p>0,05
Пол – число женщин (%)	<b>7/30 (23,3%)</b>	<b>32/67 (47,8%)</b>	<b>p=0,02</b>
Длительность заболевания (месяцы)	60,6±13,6	65,0±15,4	p>0,05
Внутривенное употребление наркотиков	13/30 (43,3%)	21/67 (31,3%)	p>0,05
Показатель активности гепатита (IF≥3)	7/30 (23,3%)	7/67 (10,4%)	p>0,05

Из представленных данных следует, что пациенты в 2-х группах не различались по возрасту, длительности заболевания и употреблению наркотиков внутривенным способом. Статистически значимые различия были обнаружены по полу: среди пациентов с ГВИ (группа 1) было больше мужчин по сравнению со группой 2, в которой герпесвирусы не были обнаружены (p<0,05). Кроме того, следует отметить, что между пациентами с ХГС, инфицированными и не инфицированными ГВЧ, не были выявлены различия по длительности заболевания, что имеет значение при сравнительной оценке тяжести течения, последствий гепатита и влияния герпесвирусных инфекций.

### 3.1.5 Вирусологические и серологические показатели больных вирусным гепатитом С

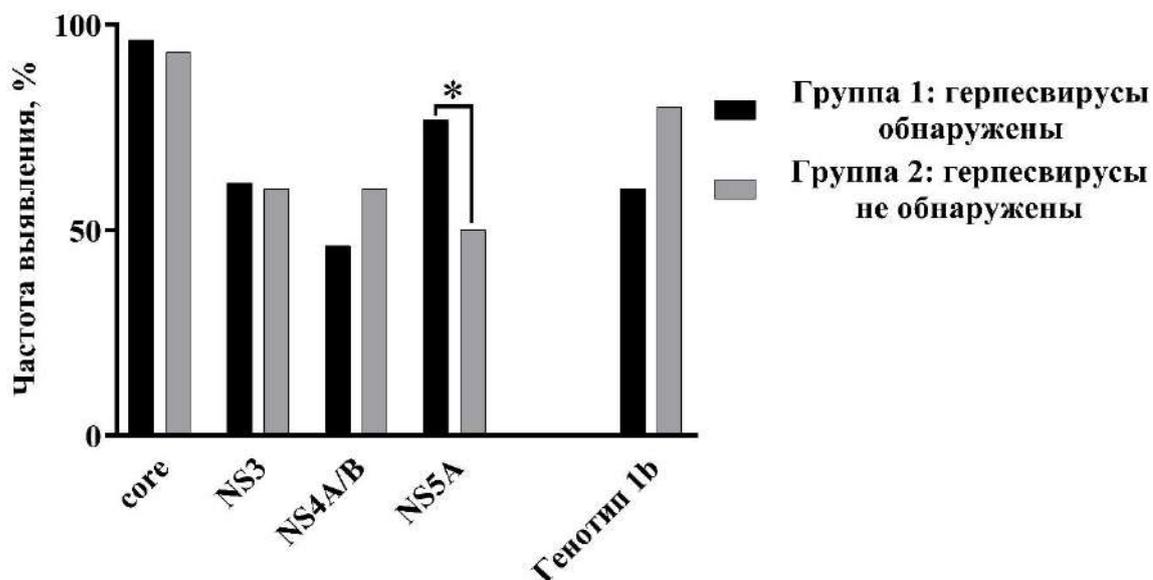
Представляло интерес определить в сыворотке крови, МКПК и в биоптатах печени присутствие геномной РНК ВГС (плюс-нити РНК) и репликативной формы (минус-нитями РНК ВГС). Данные ОТ-ПЦР представлены на Рисунке 16.



**Рисунок 16** – Частота выявления геномной РНК ВГС (плюс-нити) и репликативной РНК (минус-нити) в образцах, содержащих и не содержащих ДНК ГВЧ. \* –  $p < 0,05$ .

Между пациентами первой и второй групп были обнаружены статистически значимые различия в частоте выявления РНК ВГС в сыворотках крови: у пациентов с ГВЧ (в группе 1) частота встречаемости вирусной геномной РНК превышала частоту встречаемости у пациентов, не инфицированных ГВЧ в группе 2 ( $p < 0,05$ ).

Далее была изучена частота обнаружения антител к вирусным белкам ВГС в сыворотке крови и распространение генотипа ВГС 1b (Рисунок 17).

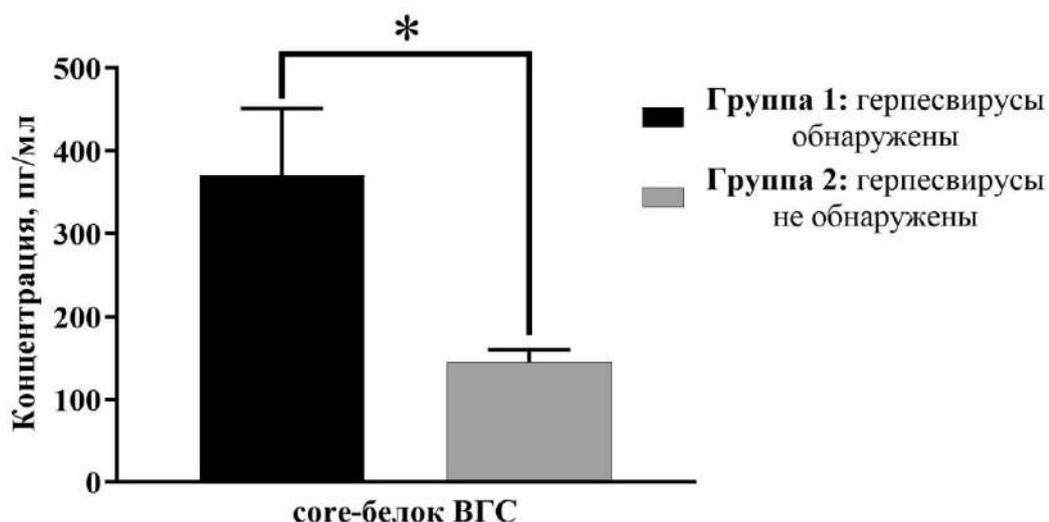


**Рисунок 17** – Частота обнаружения антител к вирусным белкам ВГС и РНК ВГС генотипа 1b в сыворотках крови пациентов в зависимости от выявления ДНК ГВЧ. \* –  $p < 0,05$ .

Результаты сравнения показали, что частота встречаемости ВГС генотипа 1b статистически значимо не различались между группами ( $p > 0,05$ ). Этот, как считается, наиболее агрессивный вирус в обеих группах встречался у большинства обследованных пациентов с ХГС.

При сравнении спектра антител к белкам ВГС в сыворотках крови пациентов с ХГС было обнаружено, что в группе 1 антитела к белку NS5A ВГС выявлялись статистически значимо чаще, чем в группе 2 ( $p < 0,05$ ).

Была изучена также концентрация core-белка ВГС в сыворотках крови пациентов с ХГС. Результаты анализа, представленные на Рисунке 18, показали, что средняя концентрация core-белка в сыворотке крови пациентов с ГВЧ (группа 1) была приблизительно в 3 раза выше по сравнению с пациентами в группе 2, не инфицированных ГВЧ.



**Рисунок 18** – Концентрации core-белка ВГС в сыворотке пациентов в зависимости от выявления ДНК ГВЧ. \* –  $p < 0,05$ .

### **3.1.6 Гистологические показатели у больных хроническим гепатитом С в зависимости от обнаружения ДНК герпесвирусов в клетках печени и крови**

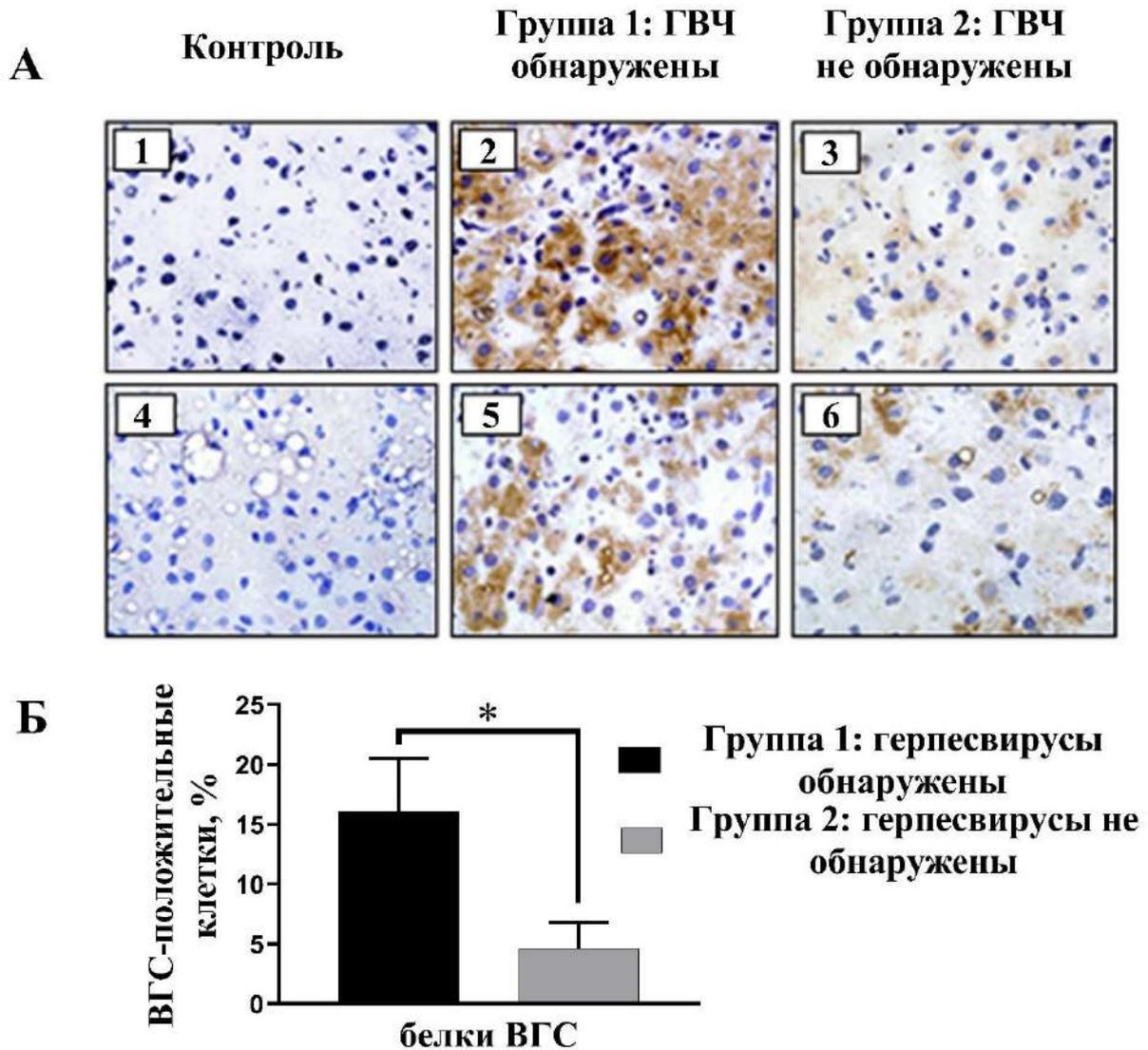
Проведён анализ активности гепатита у пациентов с ХГС, о которой судили по показателям уровней ферментов печени (аминотрансфераз), индексу гистологической активности и степени фиброза. Данные предоставлены сотрудницей ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» Келли Е.И. Данные приведены в Таблице 7.

**Таблица 7** – Сравнительный анализ показателей активности гепатита у больных хроническим гепатитом С в зависимости от обнаружения ДНК герпесвирусов в клетках печени и крови

Параметры		Группа 1: ГВЧ обнаружены (n=30)	Группа 2: ГВЧ не обнаружены (n=67)	Значимость различий, p
Активность аминотрансфераз	уровень АСТ (мкмоль/мин. л)	39,5±3,2	63,3±7,0	p>0,05
	уровень АЛТ (мкмоль/мин. л)	56,2±13,8	45,3±10,1	p>0,05
	постоянно нормальный уровень АЛТ (<40 мкмоль/мин. л)	8/30 (26,7%)	35/67 (52,2%)	<b>p=0,03</b>
Индекс фиброза ≥3		7/30 (23,3%)	7/67 (10,4%)	p>0,05

Средние показатели активности аминотрансфераз (АЛТ и АСТ) статистически значимо не различались в группах пациентов, однако пациентов с постоянно нормальным уровнем АЛТ в группе 2 было в два раза больше, чем в группе 1 (p<0,05). Количество пациентов с показателем индекса фиброза, составляющим 3 и более, в присутствии ГВЧ в 2 раза превышало таковой у пациентов без ГВЧ, хотя различие не достигало статистической значимости (p>0,05). Эти данные можно расценивать как негативное влияние ГВЧ на показатель активности важного фермента печени, что может отражаться на развитии воспалительного процесса в органе.

Для сравнительного анализ частоты выявления белков ВГС в гепатоцитах пациентов с ХГС, инфицированных и не инфицированных ГВЧ, проводили иммуногистохимическое окрашивание моноклональными антителами криостатных срезов из образцов биоптатов печени от 12 пациентов из группы 1 и от 32 пациентов из группы 2. Репрезентативные изображения приведены на Рисунке 19.



**Рисунок 19** – Сравнительный анализ частоты выявления белков ВГС в гепатоцитах пациентов с ХГС, инфицированных и не инфицированных ГВЧ. (А) Иммуногистохимическое выявление белков ВГС в криостатных срезах печени с использованием смеси МКА к core белку, белкам NS3, NS4A/B и NS5A: 1 – МКА к HBsAg (отрицательный контроль); 4 – пациент со стеатогепатитом (отрицательный контроль); 1-3, 5, 6 – пациенты с ХГС. Коричневое окрашивание – локализация белков ВГС, синее окрашивание – ядра клеток, докраска гематоксилином. Увеличение  $\times 400$ . (Б) Количество клеток печени, содержащих белки ВГС, у пациентов с ХГС, в зависимости от выявления ГВЧ. \* –  $p < 0,05$ .

Статистическая обработка данных иммуногистохимического окрашивания показала увеличение доли гепатоцитов, содержащих белки ВГС, у пациентов из первой группы по сравнению со второй группой. Более интенсивное окрашивание

клеток наблюдалось также у пациентов первой группы. Представляет интерес более интенсивное окрашивание цитоплазмы (Рисунок 19 А2 и А5) в группе 1 (пациенты, инфицированные ГВЧ) по сравнению с группой 2 (не инфицированные ГВЧ пациенты) (Рисунок 19 А3 и А6). В контрольных образцах (Рисунок 19 А1 и А4) иммунореактивности не наблюдалось.

Таким образом, кратко суммируя результаты проведенных исследований, можно констатировать, что коинфекция герпесвирусами у пациентов с ХГС статистически значимо увеличивает тяжесть течения хронического гепатита по гистологическим, биохимическим и вирусологическим показателям.

### **3.2 Герпесвирусы в хронических воспалительных заболеваниях уrogenитального тракта мужчин**

#### **3.2.1 Обнаружение герпесвирусов при ХП/СХТБ и действие противовирусной терапии**

Работа проводилась совместно с врачом дерматовенерологом, д.м.н., сотрудником Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России Ковальком В.П. В исследование было включено 287 пациентов с диагнозом ХП/СХТБ ША. В исследование не включали пациентов с неврологической болью, патологией желудочно-кишечного тракта, миофасциальной тазовой болью и бактериальным простатитом.

В пробах из уrogenитального тракта пациентов методом ПЦР в реальном времени выявляли ДНК 3-х ГВЧ - ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6. У 103 пациентов (35,9%) в клинических материалах были обнаружены ГВЧ, у 184 пациентов ГВЧ обнаружены не были. Анализ трех проб от каждого из 103 ГВЧ-положительных пациентов показал, что частота определения ГВЧ составила в пробах эякулята 11,6%, в СПЖ – 22%, в соскобе из уретры – 24%. Концентрации ДНК ГВЧ, превышавшие клинически значимые 1000 копий на  $10^5$  клеток, обнаружены у 29% пациентов. Это свидетельствует о реактивации ГВЧ в УГТ части мужчин с ХП. В качестве

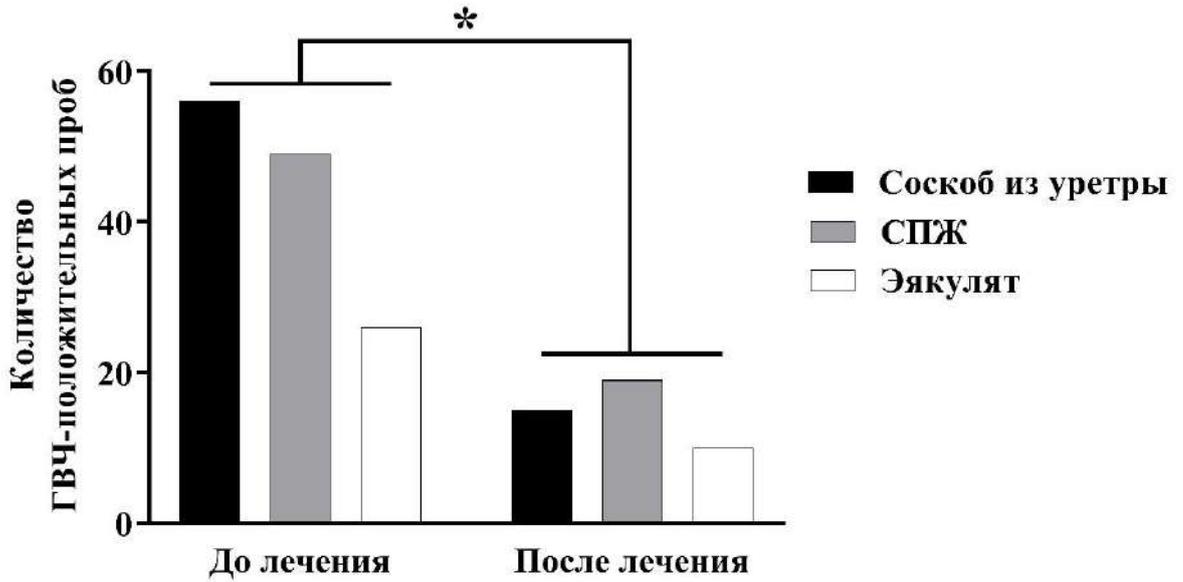
контроля обследовали 20 здоровых мужчин. Ни у одного из мужчин ДНК ГВЧ в эякуляте не была обнаружена. Стандартная терапия, включающая антибиотики, часто не приводит к положительному результату. Поэтому, для поиска эффективного лечения пациентов с ХП/СХТБ, инфицированных ГВЧ, пациентов разделили на 3 группы:

Группа 1 – 64 пациента с хроническим абактериальным простатитом, инфицированных ГВЧ, получавших терапию валацикловиром и интерфероном альфа-2b;

Группа 2 – 39 пациентов с хроническим абактериальным простатитом, инфицированных ГВЧ, получавших терапию интерфероном альфа-2b, тамсулозином, диклофенаком;

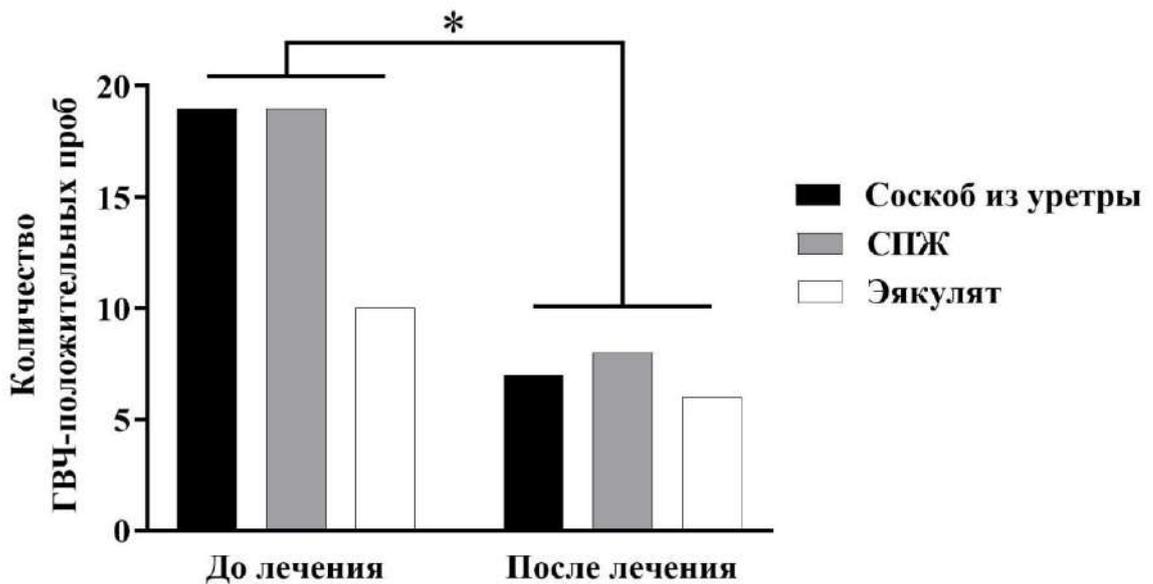
Группа 3 – 184 пациентов с хроническим абактериальным простатитом с отрицательными результатами вирусологических тестов, получавшие стандартную терапию – антибиотик левофлоксацин, блокатор альфа-адренорецепторов тамсулозин и противовоспалительный препарат диклофенак.

От пациентов первой группы был получен 131 образец, содержащий вирусную ДНК, от пациентов второй группы – 48 образцов. У пациентов группы 1 после терапии ДНК ГВЧ была определена в 44 образцах, снижение отмечено во всех урогенитальных материалах, суммарно оно составило 66% и было статистически значимо ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 20).



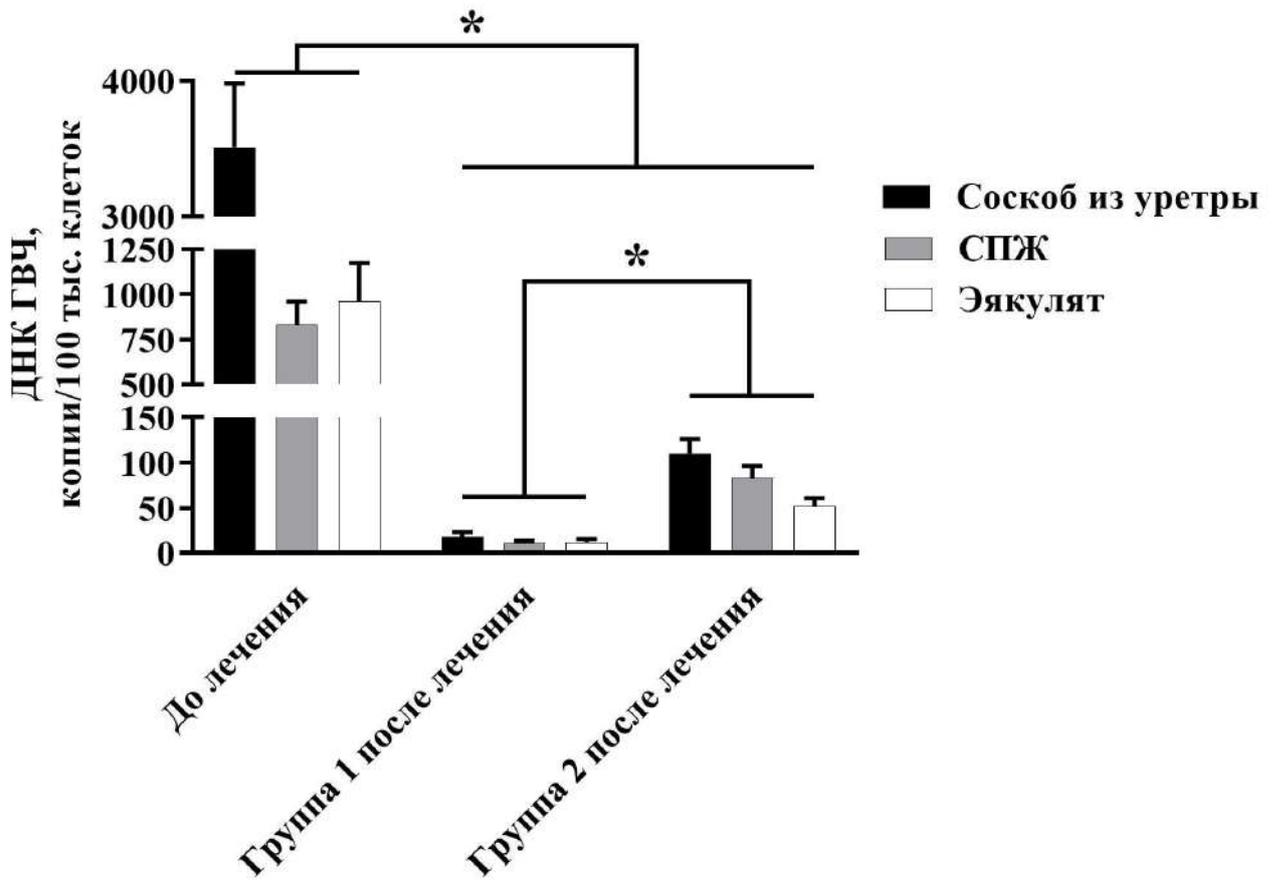
**Рисунок 20** – Количество ГВЧ-положительных проб от пациентов группы 1 до и после лечения. СПЖ – секрет предстательной железы. \* –  $p < 0,05$ .

У пациентов из группы 2 после терапии количество проб, содержащих вирусную ДНК суммарно снизилось на 56% – до 21 и было отмечено также во всех материалах ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 21).



**Рисунок 21** – Количество ГВЧ-положительных проб от пациентов группы 2 до и после лечения. СПЖ – секрет предстательной железы. \* –  $p < 0,05$ .

Терапия валацикловиром и интерфероном альфа-2b привела к элиминации ГВЧ из 66,4% проб ( $p < 0,05$ ), а терапия интерфероном  $\alpha 2\beta$ , тамсулозином и диклофенаком – из 57,1% проб ( $p < 0,05$ ). Таким образом, обе схемы лечения оказались эффективными и принципиально не отличались по изменению частоты встречаемости ГВЧ в пробах. Различия были выявлены путем количественного анализа вирусной нагрузки (Рисунок 22).



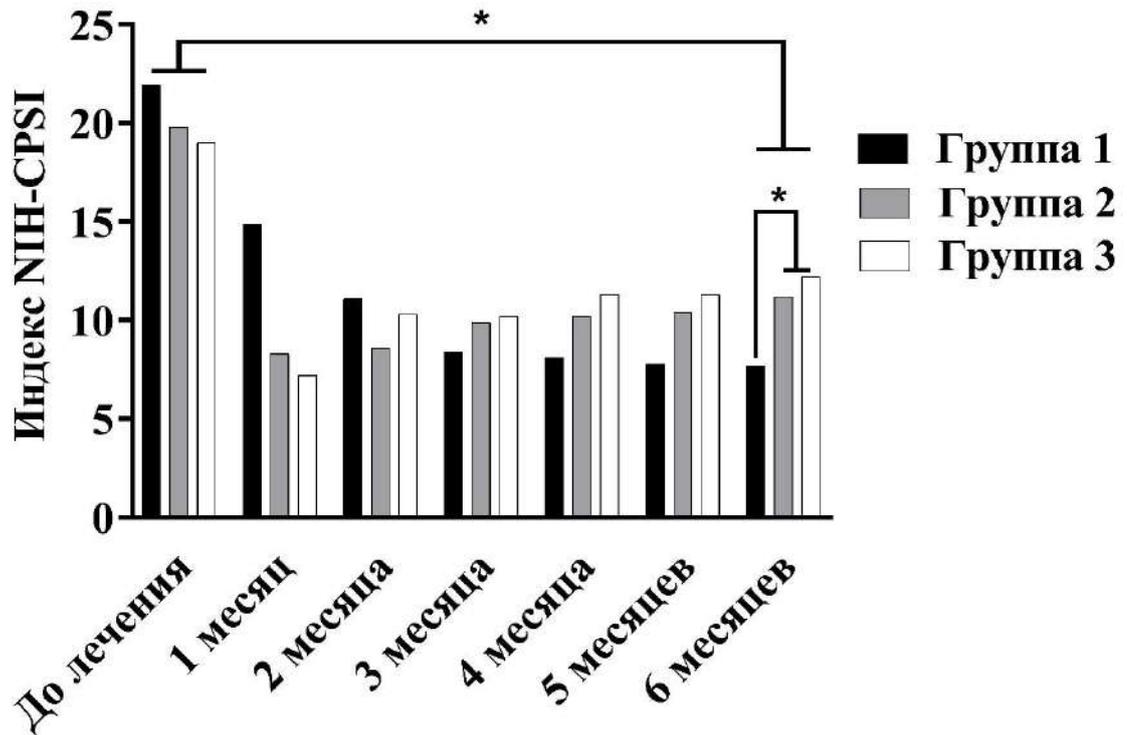
**Рисунок 22** – Концентрации ДНК ГВЧ у пациентов 1 и 2 групп до и после лечения. СПЖ – секрет предстательной железы. \* –  $p < 0,05$ .

До начала терапии средние концентрации вирусной ДНК не отличались в пробах из уrogenитального тракта у пациентов первой и второй групп, поэтому на Рисунке 23 группы приведены суммарные данные по пациентам обеих групп до лечения. Наибольшая концентрация вирусной ДНК обнаруживалась в соскобе из уретры (более 3500 копий/ $10^5$  клеток). В результате терапии вирусная нагрузка в

обеих группах уменьшилась в 10-100 раз, при этом снижение оказалось более выраженным у пациентов из группы 1, получавших терапию валацикловиром и интерфероном альфа-2b.

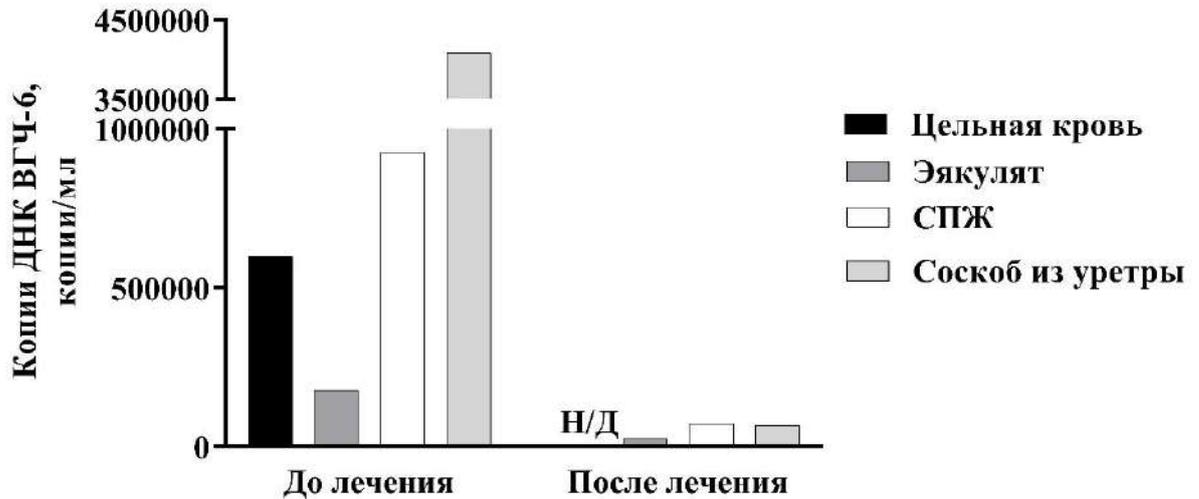
Изменения вирусной нагрузки были статистически значимы до- и после лечения в обеих группах. Следует отметить, что использование валацикловира позволило статистически значимо уменьшить концентрацию ДНК ГВЧ в группе 1 по сравнению с группой 2 ( $p < 0,05$ ).

Одним из важных показателей эффективности лечения является динамика клинических симптомов, которую определяли, подсчитывая индекс симптомов по шкале NIH-CPSI (National institute of health chronic prostatitis symptom index), разработанной в Национальном институте здравоохранения США и принятой во всем мире для определения индекса симптомов хронического простатита. После проведенной терапии (спустя 3 месяца после начала лечения) все три группы имели схожую эффективность лечения ( $p > 0,05$ ) (Рисунок 23). Представляет интерес то, что пациенты из группы 1 имели лучшие результаты через 6 месяцев после начала терапии:  $7,7 \pm 2,4$  балла по шкале NIH-CPSI, что достоверно меньше ( $p < 0,05$ ), чем в группах 2 и 3 ( $11,2 \pm 4,2$  и  $12,2 \pm 3,9$  балла, соответственно). Положительным показателем эффективности лечения является статистически значимое снижение количества симптомов заболевания, которое оценивается по сумме баллов.



**Рисунок 23** – Динамика показателей индекса симптомов простатита по шкале NIH-CPSI до, в течение и после курса терапии.

Важные данные были получены при обследовании пациента О. (условное обозначение) с синдромом хронической тазовой боли ХП/СХТБ ША. Лабораторные исследования, проведённые в ФГБУ ФКЦ ВМТ ФМБА России, показали отсутствие возбудителей бактериальных инфекций в УГТ. При исследовании проб из УГТ (эякулят, СПЖ, соскоб из уретры) и цельной крови на ДНК ГВЧ (ВПГ-1, ВПГ-2, ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6) был обнаружен чрезвычайно высокий уровень вирусной нагрузки ВГЧ-6. Так, в соскобе из уретры концентрация ДНК ВГЧ-6 была больше 3,5 млн. копий ДНК/10<sup>5</sup> клеток (Рисунок 24).



**Рисунок 24** – Концентрация ДНК ВГЧ-6 в пробах до и после лечения. СПЖ – секрет предстательной железы. Н/Д – не изучено.

Пациент получил противовирусную терапию, включающую валацикловир и интерферон альфа-2b. К окончанию терапии наблюдалось уменьшение боли, симптомов дизурии, улучшение клинических и лабораторных показателей. В последующие годы симптомы ХП/СХТБ имели легкую степень тяжести и не вынуждали пациента обращаться за медицинской помощью. Результаты показали, что у пациента единственным вероятным этиологическим агентом ХП/СХТБ являлся ВГЧ-6, который подавлялся в результате специфической противогерпесвирусной терапии.

Таким образом, полученные данные показывают негативную роль ГВЧ в абактериальном ХП/СХТБ и необходимость включения в диагностические алгоритмы обследования мужчин с ХП/СХТБ анализа уrogenитальных проб на ГВЧ и, в случае их выявления, использование курса терапии противовирусными химическими препаратами в сочетании с интерфероном альфа-2b.

### **3.2.2 Влияние ГВЧ-инфекций на цитокиновый профиль спермоплазмы мужчин с ХП/СХТБ**

Для анализа цитокинов использовали спермоплазму (семенная жидкость – компонент эякулята), которая была получена от 29 пациентов с ХП/СХТБ ША без сопутствующих бактериальных инфекций. На первом этапе исследования был проведён анализ проб из урогенитального тракта (эякулят, СПЖ, мазки из уретры) на наличие геномов 3-х ГВЧ: ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6. В зависимости от выявления вирусных ДНК пациенты были разделены на 3 группы:

Группа 1 – пациенты с ХП/СХТБ, инфицированные ГВЧ (n=10), получавшие терапию валацикловиром и интерфероном альфа-2b.

Группа 2 – пациенты с ХП/СХТБ, не инфицированные ГВЧ (n=9), получавшие терапию антибиотиком левофлоксацином, тамсулозином и диклофенаком.

Группа 3 – практически здоровые мужчины, проходившие профилактическое обследование - контрольная группа (n=10).

Клиническая эффективность лечения оценивалась с помощью шкалы NIH-CPSI.

В спермоплазме пациентов были изучены концентрации 4-х цитокинов, участвующих в воспалительных процессах, в том числе при вирусных инфекциях. Результаты анализа до и после терапии представлены в Таблице 8.

**Таблица 8** – Сравнительный анализ концентрации цитокинов в спермоплазме пациентов с ХП/СХТБ до и после терапии

		Концентрация цитокинов в спермоплазме, пг/мл		
		Группа 1	Группа 2	Группа 3
ИЛ-1 $\beta$	До лечения	23,9	44,1*#	22,1
	После лечения	24,7	25,6#	
ИЛ-6	До лечения	28,7*#	31,4*	12,4
	После лечения	14,1#	24,7	
ФНО- $\alpha$	До лечения	24,6	35,1*#	16,7
	После лечения	19,1	21,8#	
ИФН- $\gamma$	До лечения	7,4*#	26,6	23,8
	После лечения	21,2#	24,2	

Примечание: \* –  $p < 0,05$  – статистически значимые различия концентрации цитокинов до лечения по сравнению с группой контроля (тест Манна-Уитни); # –  $p < 0,05$  – статистическая значимые различия показателей в группах до и после лечения (парный тест Уилкоксона); ИФН- $\gamma$  – интерферон гамма.

Группа 1 (пациенты с ХП/СХТБ, инфицированные ГВЧ) до лечения в сравнении с группой контроля характеризовалась более высоким уровнем ИЛ-6 и сниженным уровнем ИФН- $\gamma$ .

Группа 2 (пациенты с ХП/СХТБ без герпесвирусных инфекций) до лечения в сравнении с группой контроля характеризовалась более высокими уровнями ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$ , при этом уровень ИФН- $\gamma$  не отличался от контрольной группы.

После завершения терапии наблюдали следующие изменения концентрации цитокинов:

- уровень ИЛ-1 $\beta$  снизился в группе пациентов с ХП/СХТБ без ГВЧ-инфекций;

- уровень ИЛ-6 снизился до близких к нормальным значениям в группе пациентов с ГВЧ-инфекциями;
- уровень ФНО- $\alpha$  снизился до нормальных значений в группе пациентов с ХП/СХТБ без ГВЧ-инфекций.
- уровень ИФН- $\gamma$  увеличился в группе пациентов с ГВЧ-инфекциями и не изменился в группе пациентов с ХП/СХТБ без ГВЧ-инфекций.

Таким образом, ГВЧ-инфекция у пациентов с ХП/СХТБ сопровождалась повышением уровня провоспалительного цитокина ИЛ-6 и снижением уровня противовоспалительного и противовирусного цитокина ИФН- $\gamma$ . Вирус-специфическая терапия этих пациентов приводила к нормализации уровней цитокинов: снижению исходно высокого уровня ИЛ-6 и повышению сниженного уровня ИФН- $\gamma$ . Стандартное лечение мужчин с ХП/СХТБ без ГВЧ с включением антибиотика приводило к снижению противовоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$ , однако их уровень оставался повышенным по сравнению с контрольным.

### **3.2.3 Ассоциация герпесвирусов с мужским бесплодием**

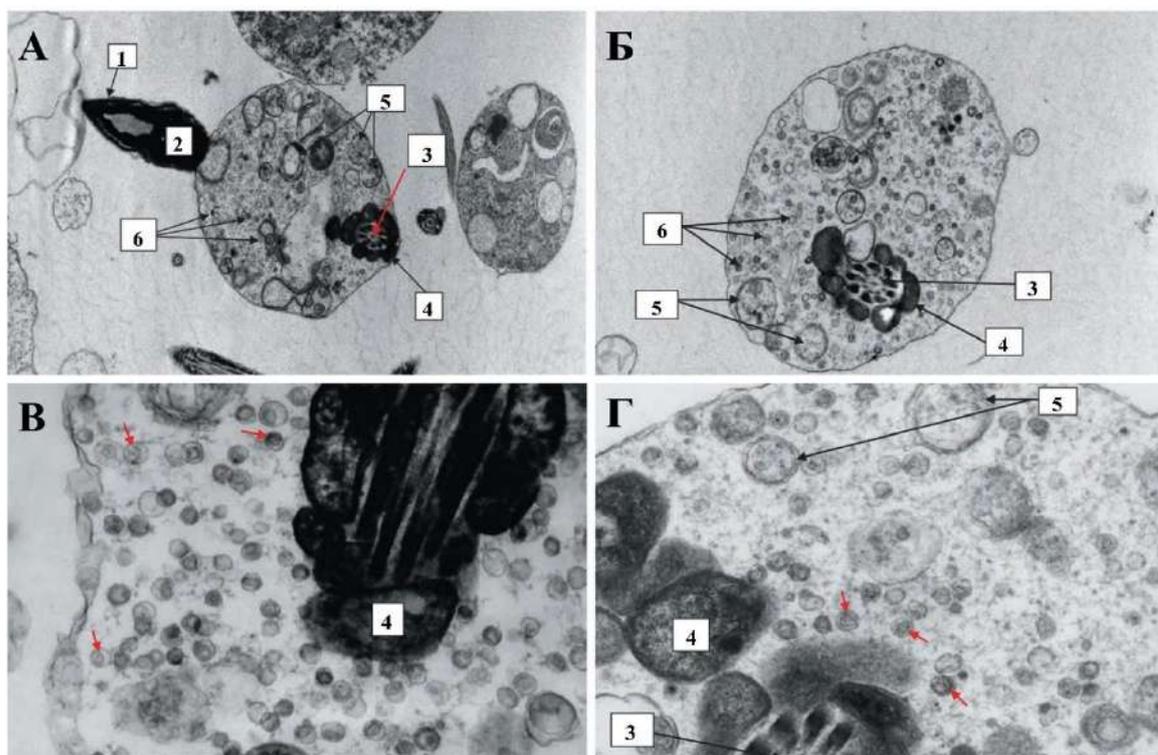
В исследование влияния ГВЧ на мужскую фертильность было включено 287 мужчин с ХП/СХТБ, у 23 из которых было диагностировано бесплодие. Работа проводилась совместно с врачом дерматовенерологом, д.м.н., сотрудником Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России Ковальком В.П. Электронномикроскопические исследования сперматозоидов выполнены сотрудницей "Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова" д.б.н. Брагиной Е.Е.

На первом этапе исследования был проведён анализ проб из уrogenитального тракта (СПЖ, мазки из уретры) на наличие геномных ДНК ГВЧ (ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6А/В). Было выявлено, что пробы от 103 пациентов содержат ДНК исследуемых ГВЧ (группа 1), 184 пациента не были инфицированы ГВЧ (группа 2).

У 8 пациентов из группы 1 было диагностировано бесплодие (7,8%), среди пациентов без маркёров герпесвирусных инфекций бесплодие наблюдалось у 15 (8,2%) ( $p>0,05$ ).

Пациенты из группы 1 получали лечение валацикловиром и интерфероном альфа-2b, а пациенты из группы 2 получали стандартную терапию, включающую антибиотик левофлоксацин, тамсулозин и диклофенак. После завершения противовирусной терапии ДНК ГВЧ обнаружались у 5 из 8 пациентов с бесплодием из группы 1, медианная вирусная нагрузка у них снизилась суммарно в трёх материалах из УГТ с 1770 до 48 копий на  $10^5$  клеток.

Помимо обнаружения ДНК ГВЧ методом количественной ПЦР эффективность противовирусной терапии оценивали также с помощью количественного морфологического анализа методом электронной микроскопии в опытах, совместных с д.б.н. Брагиной Е.Е. На Рисунке 25 представлены изображения сперматозоидов, в которых были обнаружены капсиды ГВЧ, локализованные в ядре или в цитоплазме мужской гаметы (Рисунок 25 А и Б соответственно).



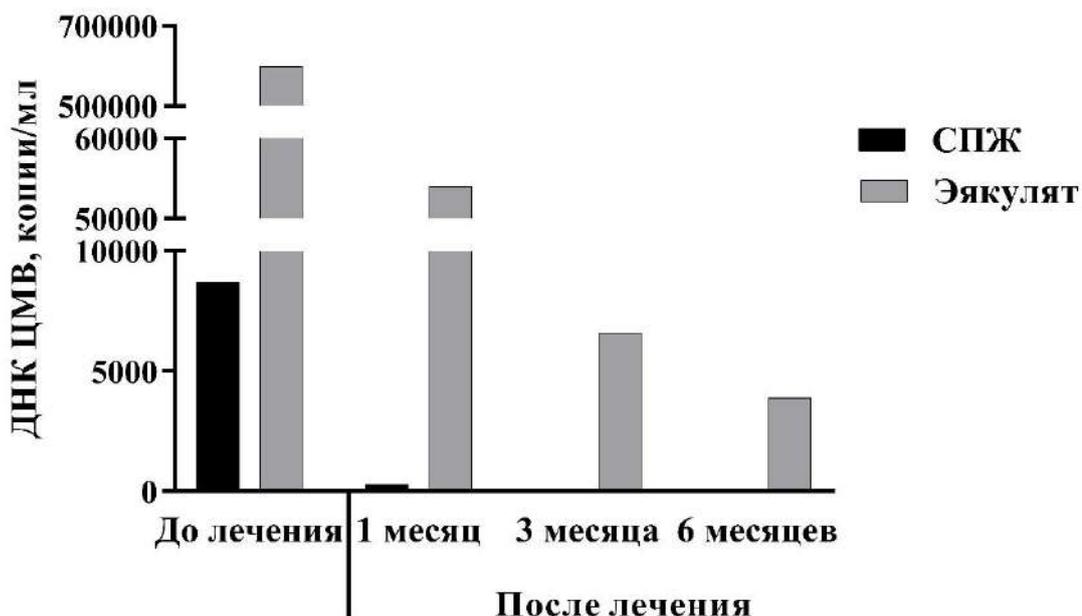
**Рисунок 25** – Электронные микрофотографии сперматозоидов. А – продольный срез сперматозоида. Б – поперечный срез через средний отдел жгутика сперматозоида. В – фрагмент среднего отдела жгутика сперматозоида. Г – фрагмент среднего отдела жгутика сперматозоида. 1 – акросома сперматозоида, 2 – хроматин, 3 – поперечный срез через аксонему жгутика, 4 – митохондрии, 5 – аутофагосомы, 6 – вирусные капсиды в ядре (А) и в цитоплазме (Б). Электронномикроскопические исследования сперматозоидов выполнены сотрудницей "Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова" д.б.н. Брагиной Е.Е.

Были изучены сперматозоиды 11 пациентов с бесплодием, у 8 из которых были обнаружены капсиды ГВЧ. После завершения терапии у 4 из 8 пациентов вирусные капсиды не выявлялись, ещё у 3-х пациентов количество сперматозоидов, содержащих капсиды ГВЧ, снизилось более чем в 2 раза (с 12% до 5% инфицированных гамет в эякуляте).

Самый важный результат терапии состоял в том, что в течение 6 месяцев после окончания терапии наблюдалось наступление беременности у 6 супруг из 8 пар с бесплодием из группы 1 (75%) и только у 4 из 10 пар из группы 2 (40%) ( $p < 0,05$ ).

Один из пациентов (условное обозначение - ПР) был обследован в динамике более подробно. Работа проведена совместно с врачом-дерматовенерологом, д.м.н. Ковальком В.П. На протяжении 6 лет у супруги пациента не наступала беременность несмотря на отсутствие у неё патологий, препятствующих беременности. Так как причину бесплодия установить не удалось, был поставлен диагноз – идиопатическое бесплодие. Было проведено изучение эякулята, выполненное в «Медико-генетическом научном центре имени академика Н.П. Бочкова». Спермиологический анализ выявил значительные отклонения в спермограмме от нормы. Нам были предоставлены пробы из уrogenитального тракта данного пациента (эякулят, секрет предстательной железы – СПЖ, соскоб из уретры). Количественный ПЦР анализ определил ДНК-геном ЦМВ в СПЖ и в эякуляте в исключительно высоких концентрациях: 8700 копий/мл и 598440 копий/мл соответственно. Бактериальных инфекций и ДНК ВПГ-1/2, ВЭБ, ВГЧ-6А/В в уrogenитальных материалах обнаружено не было.

Пациенту назначили противовирусную терапию, включающую прием валацикловира в течение 3 месяцев и свечи с интерфероном альфа-2b 1 месяц. Спустя месяц после начала терапии наблюдалась нормализация показателей спермы, значительно снизилась вирусная нагрузка – в СПЖ до 300, в эякуляте до 54000 копий/мл. После окончания терапии (через 3 месяца) ДНК ЦМВ обнаруживалась только в эякуляте (6060 копий/мл), спустя 6 месяцев концентрация ДНК ЦМВ в эякуляте снизилась до 3900 копий/мл, что составляет 0,6% от исходного количества до начала специфического противовирусного лечения (Рисунок 26).



**Рисунок 26** – Концентрация ДНК ЦМВ в пробах до лечения и в динамике лечения. СПЖ – секрет предстательной железы.

Спустя 6 месяцев после проведенного лечения у супруги пациента наступила первая беременность, завершившаяся рождением здорового ребенка. Спустя 3 года наступила вторая беременность, разрешившаяся также рождением здорового ребенка.

Результаты исследования на примере пациента ПР показывают, что ГВЧ (в данном случае – ЦМВ) могут играть важную роль в мужском бесплодии. В совокупности с данными по пациентам с ХП/СХТБ, инфицированных ГВЧ, это указывает на необходимость включения в диагностические алгоритмы обследования мужчин с бесплодием анализа урогенитальных проб на ГВЧ и, в случае их выявления, использование курса терапии специфическими противовирусными химиопрепаратами и препаратами, содержащими интерферон альфа-2b. В результате противовирусной терапии наблюдается снижение количества ГВЧ или их элиминация из урогенитального тракта и сперматозоидов и восстановление мужской фертильности.

### 3.3 Сравнительный анализ ДНК герпесвирусов человека в аутопсийных образцах от умерших пациентов с подтверждённым диагнозом COVID-19, с разной степенью повреждения органов

Проведено исследование клинических образцов от 39 пациентов, умерших пациентов с подтверждённым диагнозом COVID-19 (группа 1) и от 20 пациентов, умерших от неинфекционных заболеваний (группа сравнения), у которых РНК SARS-CoV-2 и симптомы COVID-19 обнаружены не были (группа 2). Работа проводилась совместно с сотрудниками клинического отдела ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» д.м.н. Кистеневой Л.Б. и к.м.н. Хлоповой И.Н. У всех пациентов в группе 1 была обнаружена ДНК ГВЧ хотя бы в одном органе. Значительно чаще обнаруживалась ДНК ВЭБ и ВГЧ-6 – у 95% и 85% пациентов, соответственно, в то время как ДНК ЦМВ, ВЗВ и ВПГ – у 28%, 5% и 21% пациентов, соответственно ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 27). Частота выявления ДНК ГВЧ в органах пациентов группы 2 также была высокой и составляла: ВЭБ и ВГЧ-6 85% и 100%, соответственно, ДНК ЦМВ, ВЗВ и ВПГ – 35%, 0% и 25%, соответственно. Различия в частоте обнаружения ГВЧ между группами оказались незначимыми ( $p > 0,05$ ).

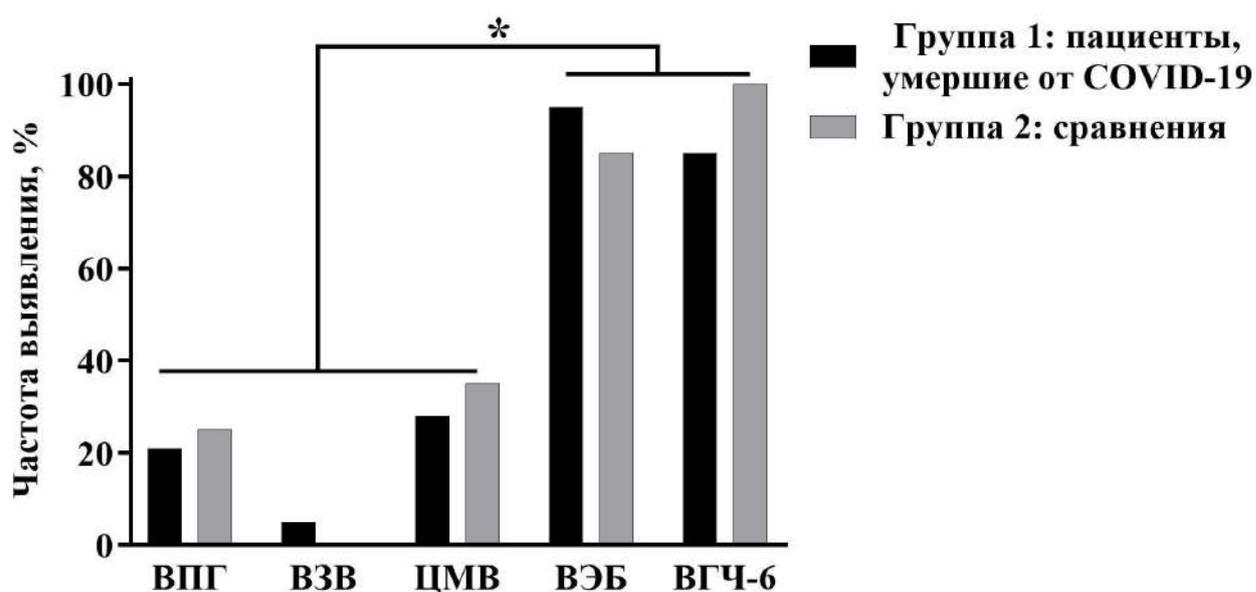


Рисунок 27 – Частота обнаружения ДНК ГВЧ в аутопсийных материалах у пациентов с летальным исходом COVID-19 (группа 1) и умерших без COVID-19 (группа 2). \* –  $p < 0,05$ .

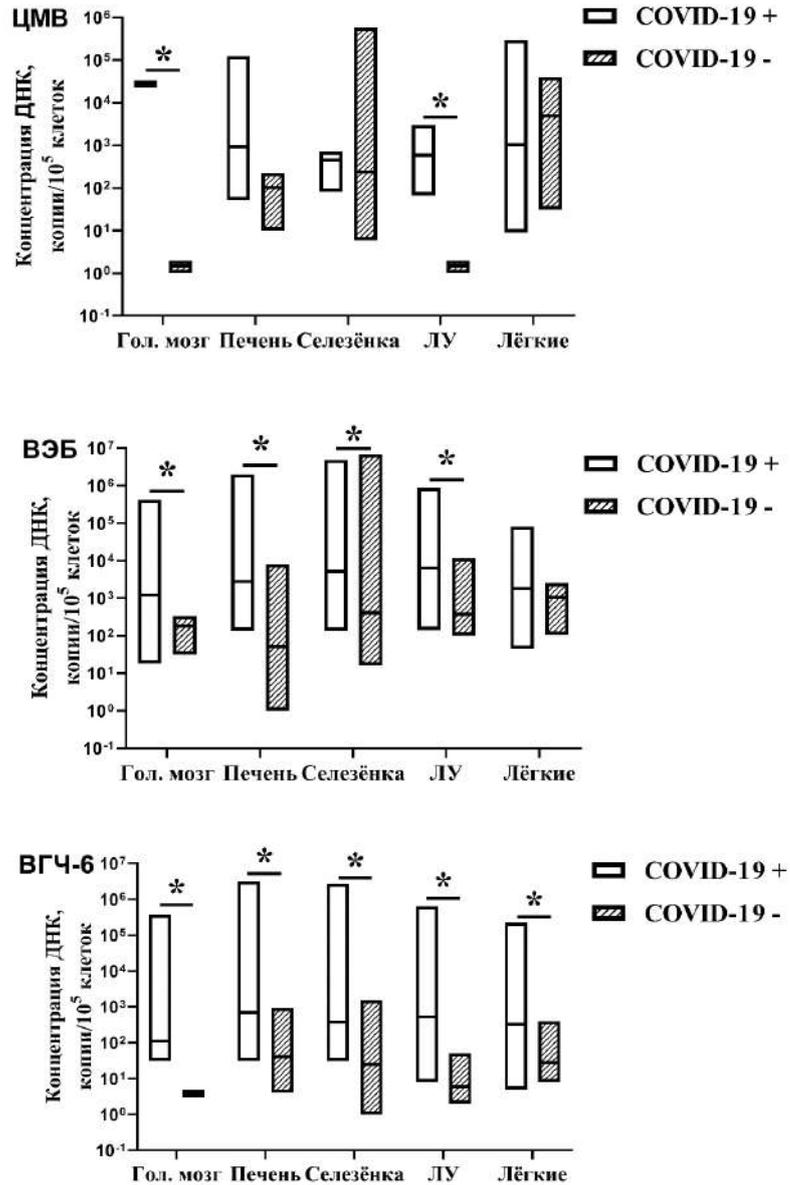
Представляло интерес сравнить распределение ГВЧ в органах пациентов. Анализ частоты обнаружения ДНК ГВЧ показал (Таблица 9), что у пациентов с летальным исходом COVID-19 достоверно чаще по сравнению с группой 2 ( $p < 0,05$ ) в легких содержался геном ВЭБ, в лимфоузлах – ЦМВ, а в образцах головного мозга – ВГЧ-6. У пациентов из группы сравнения в селезенке чаще обнаруживался геном ВГЧ-6 ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 9** – Сравнительный анализ частоты обнаружения ГВЧ в органах у пациентов с летальным исходом COVID-19 (группа 1) и у пациентов с летальным исходом без COVID-19 (группа 2)

Органы, количество образцов		Частота обнаружения ДНК ГВЧ (%)*				
		ВПГ1/2	ВЗВ	ВЭБ	ЦМВ	ВГЧ-6
Легкие	Группа 1 (n=39)	6 (15)	1 (3)	<b>30 (77)**</b>	6 (15)	16 (41)
	Группа 2 (n=19)	4 (22)	0	<b>5 (26)**</b>	6 (32)	7 (37)
Печень	Группа 1 (n=37)	3 (8)	0	18 (49)	6 (16)	25 (68)
	Группа 2 (n=20)	2 (10)	0	9 (45)	3 (15)	17 (85)
Лимфоузлы	Группа 1 (n=35)	4 (11)	0	33 (94)	<b>7 (18)**</b>	13 (37%)
	Группа 2 (n=17)	2 (12)	0	15 (88)	<b>0**</b>	7 (41)
Селезенка	Группа 1 (n=36)	2 (6)	1 (3%)	24 (67)	3 (8)	<b>10 (28)**</b>
	Группа 2 (n=20)	2 (10)	0	16 (80)	4 (20)	<b>14 (70)**</b>
Головной мозг	Группа 1 (n=38)	6 (16)	0	9 (24)	2 (5)	<b>7 (18)**</b>
	Группа 2 (n=20)	2 (10)	0	2 (10)	0	<b>0**</b>

Примечание: \* – указано количество всех изученных ГВЧ в каждом органе, включая встречавшиеся в одном органе по 2, 3 или 4 ГВЧ, \*\* – значения, статистически значимо различающиеся между группами,  $p < 0,05$ .

Для оценки вирусной нагрузки проведен количественный анализ ДНК ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6, который показал, что в большинстве органов у пациентов с COVID-19 медианные концентрации ДНК ВЭБ и ВГЧ-6 были выше, чем у пациентов в группе сравнения ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 28). Концентрации ДНК ЦМВ в печени, селезенке и в легких, а также ДНК ВЭБ в легких, не различались.



**Рисунок 28** – Концентрации ДНК герпесвирусов в органах пациентов, умерших с подтвержденным диагнозом COVID-19 (COVID +) и в результате соматических неинфекционных заболеваний (COVID -). ЛУ – лимфоузлы. \* –  $p < 0,05$ . Представлены максимальные и минимальные значения, линии обозначают медианные значения концентрации ДНК ГВЧ.

Важные данные получены при сравнении вирусной нагрузки ГВЧ в группах пациентов. Было показано, что у пациентов с COVID-19 количество проб, содержащих более 1000 и более 10000 копий ДНК ГВЧ на  $10^5$  клеток суммарно составляло 52,4%, тогда как в группе сравнения количество проб, содержащих столь же высокие концентрации ДНК ГВЧ, суммарно составляло 16,7% (Таблица 10). Различия между группами высоко значимы.

**Таблица 10** – Вирусная нагрузка ГВЧ в органах пациентов, скончавшихся с подтверждённым диагнозом COVID-19, и в органах скончавшихся пациентов без COVID-19

Концентрация ДНК ГВЧ, копии/ $10^5$ клеток	Количество образцов, содержащих ДНК ГВЧ			
	Группа 1 n= 185		Группа 2 n=96	
	n	%	n	%
0	47	25,4	33	34,4
1-1000	41	22,2**	47	49,0**
1001-10000	45	24,3*	10	10,4*
>10000	52	28,1**	6	6,2**

Примечание: \* –  $p=0,002$ ; \*\* –  $p<0,001$ .

Полученные данные указывают на присутствие ГВЧ в клинически значимых количествах в органах пациентов, скончавшихся с подтверждённым диагнозом COVID-19, и свидетельствуют о реактивации у них ГВЧ. В то же время в группе сравнения в 80 из 96 образцов (83%) содержание ДНК ГВЧ было менее 1000 на  $10^5$  клеток. Эти данные позволяют предположить, что у большинства пациентов без COVID-19 ГВЧ, по-видимому, находились в латентном состоянии.

Для оценки влияния ГВЧ на тяжесть течения и неблагоприятный исход COVID-19 сравнивали результаты обнаружения ГВЧ у пациентов с разной степенью повреждения легких, о которой судили по показателям компьютерной томографии (КТ). Анализ данных КТ легких 37 пациентов показал, что у 41% пациентов КТ соответствовала среднетяжелым и тяжелым повреждениям (более

50% поражения объема легких (КТ3, КТ3/4, КТ4)); у 59% – легким и умеренным повреждениям или их отсутствию (0-50% (КТ0, КТ1, КТ2)). В секционных образцах легких ГВЧ были обнаружены у 21 из 37 (56,7%) пациентов: у 10 пациентов с КТ3, КТ3/4, КТ4 и у 11 – с КТ0, КТ1, КТ2. Частота встречаемости ЦМВ, ВЭБ и ВГЧ-6 в группах пациентов с тяжелыми и умеренными повреждениями легких статистически значимо не различалась. Сравнение медианных значений ДНК ВЭБ и ЦМВ также не выявило статистически значимых различий между пациентами с тяжелыми и легкими повреждениями легких. В то же время выявлены различия при сравнении вирусной нагрузки ВГЧ-6 в образцах. Концентрация ДНК ВГЧ-6 у пациентов с КТ3, КТ3/4, КТ4 (медиана 705 копий на  $10^5$  клеток (280 - 223509)) была в 3,1 раза выше по сравнению с пациентами с КТ0, КТ1, КТ2 (медиана 226 копий на  $10^5$  клеток (5 - 537)). Различия статистически значимы ( $p=0,02$ ). Интересные данные получены также при анализе частоты встречаемости ВПГ. ВПГ был обнаружен у 5 из 15 (33%) пациентов с тяжелыми повреждениями легких (КТ3, КТ3/4, КТ4) и только у одного пациента из 22 (4,5%) при легких повреждениях (КТ0, КТ1, КТ2),  $p<0,05$  (ОШ=10, 95% ДИ=1,02; 97,5). Полученные результаты свидетельствуют о том, что тяжелые повреждения легких ассоциированы с присутствием ВПГ и ВГЧ-6.

Одним из патологических проявлений при COVID-19 является плевральный выпот [88]. Плевральный выпот был диагностирован у 11 из 37 пациентов с COVID-19 (30%). Анализ частоты встречаемости всех изученных ГВЧ показал, что статистически значимые различия были выявлены при изучении ВПГ. У пациентов с плевральным выпотом ДНК ВПГ обнаружена в 36% случаев (4 из 11), без плеврального выпота – в 8% случаев (2 из 26),  $p=0,04$  (ОШ=6,9 (95% ДИ=1,03; 45,6)), что свидетельствует об ассоциации ВПГ с нарушениями функции легких. Частота встречаемости других ГВЧ не коррелировала с плевральным выпотом. Изучение вирусной нагрузки 3-х ГВЧ (ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6) у пациентов с плевральным выпотом и без такового показало, что вирусная нагрузка ВЭБ и ЦМВ была выше у пациентов с плевральным выпотом по сравнению с пациентами без него: медианные концентрации ВЭБ составили 2396 против 1114 копий ДНК на  $10^5$

клеток соответственно; ЦМВ – 146629 против 931 копий ДНК на  $10^5$  клеток соответственно, однако статистической значимости различия не достигали. В то же время плевральный выпот ассоциировался с высокими концентрациями ВГЧ-6 в легких. Так, реактивация ВГЧ-6 наблюдалась у 2 из 11 пациентов (18%) с плевральным выпотом (вирусная нагрузка выше 1000 копий на  $10^5$  клеток), но ни у одного из 26 пациентов без гидроторакса. Статистический анализ показал, что появление плеврального выпота ассоциируется с реактивацией ВГЧ-6,  $p=0,026$ .

Важными показателями повреждения печени являются уровни ферментов АЛТ и АСТ. У 36 пациентов с летальным исходом COVID-19 проведен количественный анализ концентраций АЛТ и АСТ в сыворотке крови. Показано, что повышенный уровень АЛТ и АСТ ( $>50$  ед./мл) обнаружен у 19 из 36 пациентов (53%). Сравнивали концентрации ДНК ГВЧ в образцах печени у пациентов с нормальными и высокими показателями активности ферментов. Связь между медианными концентрациями ЦМВ и ВГЧ-6 типа и повышенными уровнями ферментов не обнаружили. Установили, что в образцах печени у 6 из 19 пациентов (32%) с показателями АСТ/АЛТ $>50$  ед./мл выявлялся высокий уровень ДНК ВЭБ: медианные значения составили 19793 (10714 - 2020609) копий на  $10^5$  клеток. Из 17 пациентов, у которых показатели печени были в норме, только у одного пациента (6%) было выявлено более 1000 копий ДНК ВЭБ. Повышение уровня изученных ферментов печени статистически значимо чаще ассоциировалось с активацией ВЭБ,  $p=0,042$ .

Таким образом, у пациентов с летальным исходом COVID-19 присутствие ГВЧ ассоциировалось с тяжелыми повреждениями легких и печени.

### 3.4 Цитотоксические и противовирусные свойства соединений

#### 3.4.1 Цитотоксические свойства производных фуллерена C<sub>60</sub> и дисперсного фуллерена dC<sub>60</sub>

Изучены цитотоксические свойства 15 производных фуллерена C<sub>60</sub>, а также дисперсного фуллерена dC<sub>60</sub> *in vitro*. Рассчитанные значения трёх параметров, характеризующих токсичность 16 соединений, представлены в Таблице 11.

**Таблица 11** – Цитотоксические свойства соединений на основе фуллерена C<sub>60</sub> и дисперсного фуллерена dC<sub>60</sub>

№ п/п	Соединение	Цитотоксичность, мкг/мл		Максимально переносимая доза (МПД), мкг/мл
		Острая (ОЦД <sub>50</sub> )	Хроническая (ЦД <sub>50</sub> )	
1	OKR-314	370	326	5
2	OKR-315	256	242	5
3	OKR-346	258	141	5
4	OKR-347	260	225	5
5	Gi-850k	8351	<b>2959</b>	50
6	Gi-851k	12518	<b>2959</b>	50
7	Gi-742	12518	<b>2518</b>	50
8	Gi-748	2174	444	5
9	Gi-997	5827	<b>1725</b>	25
10	KB-874	269	248	5
11	KB-878	259	206	5
12	Vi 544-2k	1389	<b>1389</b>	25
13	Vi 491	993	615	25
14	Vi 510	1172	647	20
15	Vi 518	523	366	20
16	dC <sub>60</sub>	4500	<b>3300</b>	500

Показано, что низкотоксичными ( $ЦД_{50}$  более 1000 мкг/мл), выделенные ячейки, оказались четыре соединения из серии Gi (Gi-850k, Gi-851k, Gi-742, Gi-997):  $ЦД_{50}$  – 2959, 2959, 2518, 1725 мкг/мл, соответственно, Vi 544-2k - 1389 мг/мл.  $dC_{60}$  показал самую низкую цитотоксичность –  $ЦД_{50}$  3300 мкг/мл. Высокую токсичность проявили пять соединений (OKR-315, OKR-346, OKR-347, KB-874, KB-878), для которых значения  $ЦД_{50}$  были менее 300 мкг/мл. Остальные соединения проявили умеренную цитотоксичность (300-1000 мкг/мл).

### **3.4.2 Противовирусные свойства производных фуллерена $C_{60}$ и дисперсного фуллерена $dC_{60}$**

В следующих сериях экспериментов были изучены противовирусные свойства 16 соединений в отношении ЦМВИ в четырёх схемах: микробицидной, профилактической, вирулицидной и терапевтической.

Для характеристики противовирусной активности определяли  $ID_{50}$  для каждого соединения, которые отражают концентрации соединений, вызывающие уменьшение количества клеток, содержащих вирусные белки, на 50% по отношению к контрольным, не обработанным соединениями клеткам. Для вычисления  $ID_{50}$  строили графики зависимости степени ингибирования вирусной активности от концентраций соединений. Значения  $ID_{50}$  рассчитывали методом линейной регрессии с использованием пакета документов Microsoft Excel. Химиотерапевтический индекс рассчитывали, как отношение  $ЦД_{50}$  к  $ID_{50}$ .

Данные по противовирусной активности соединений приведены в Таблицах 12 и 13.

**Таблица 12** – Противовирусные свойства соединений в вирулицидной и микробицидной схемах в отношении ЦМВИ *in vitro*

№	Соединение	Вирулицидная		Микробицидная	
		ИД <sub>50</sub> , МКГ/МЛ	ХТИ	ИД <sub>50</sub> , МКГ/МЛ	ХТИ
1	OKR-314	3,5	93	4,0	82
2	OKR-315	7	35	2	<b>121</b>
3	OKR-346	9,1	15	1,9	74
4	OKR-347	4,2	50	2,6	87
5	Gi-850k	25	<b>118</b>	66	47
6	Gi-851k	25	<b>118</b>	50	59
7	Gi-742	25,1	<b>100</b>	50	50
8	Gi-748	6,4	69	-	
9	Gi-997	10	<b>173</b>	-	
10	KB-874	6,3	39	3	83
11	KB-878	2,5	82	-	
12	Vi 544-2k	14	<b>111</b>	99	58
13	Vi 491	7,4	83	8,1	76
14	Vi 510	7,5	86	-	
15	Vi 518	-		-	
16	dC <sub>60</sub>	-		56,1	59

Примечание: «-» – соединение не обладает противовирусными свойствами. Значения ХТИ, превышающие 8, выделены серым цветом. Жирным шрифтом выделены значения ХТИ, превышающие 100, для обозначения соединений, обладающих наиболее высокой противовирусной активностью

**Таблица 13** – Противовирусные свойства соединений в лечебной и профилактической схемах в отношении ЦМВИ *in vitro*

№	Соединение	Лечебная		Профилактическая	
		ИД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ	ИД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ
1	OKR-314	4,4	74	4,9	67
2	OKR-315	-		1,4	<b>173</b>
3	OKR-346	-		1,8	78
4	OKR-347	-		1,8	<b>125</b>
5	Gi-850k	-		-	
6	Gi-851k	-		-	
7	Gi-742	-		-	
8	Gi-748	-		-	
9	Gi-997	-		21	82
10	KB-874	-		2,1	<b>118</b>
11	KB-878	20	10	2,1	98
12	Vi 544-2k	-		-	
13	Vi 491	-		-	
14	Vi 510	-		-	
15	Vi 518	69,5	5	-	
16	dC <sub>60</sub>	50	66	28	<b>118</b>

Примечание: «-» – соединение не обладает противовирусными свойствами. Значения ХТИ, превышающие 8, выделены серым цветом. Жирным шрифтом выделены значения ХТИ, превышающие 100, для обозначения соединений, обладающих наиболее высокой противовирусной активностью

Согласно рассчитанным значениям, выраженными вирулицидными свойствами (ХТИ больше или равно 100), обладают пять соединений (Gi-850k, Gi-

851k, Gi-742 Gi-997 и Vi 544-2k) и ещё пять соединений проявляют умеренную вирулицидную активность (ХТИ больше 50, но меньше 100) (ОКР-314, Gi-748, KB-878, Vi 491, Vi 510). Это указывает на способность данных соединений нейтрализовать инфекционную активность ЦМВ *in vitro*. Профилактические свойства *in vitro* проявили соединения ОКР-315, ОКР-347 и KB-874 (ХТИ больше 100). В лечебной схеме умеренные терапевтические свойства (ХТИ 74) проявило соединение ОКР-314. В микробицидной схеме высокие противовирусные свойства показало соединение ОКР-315 (ХТИ 121).

Согласно рекомендациям, представленным в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» было также изучено влияние dC<sub>60</sub> на активность ЦМВ (титр) в культуральной жидкости и репродукцию вирусной ДНК. Показано снижение титра вируса в 631 раз при воздействии dC<sub>60</sub> в концентрации 500 мкг/мл по сравнению с контрольными и снижение концентрации ДНК ЦМВ в культуральной жидкости в 2,1 раза при воздействии dC<sub>60</sub> в концентрации 50 мкг/мл по сравнению с контрольными, не обработанными dC<sub>60</sub> клетками.

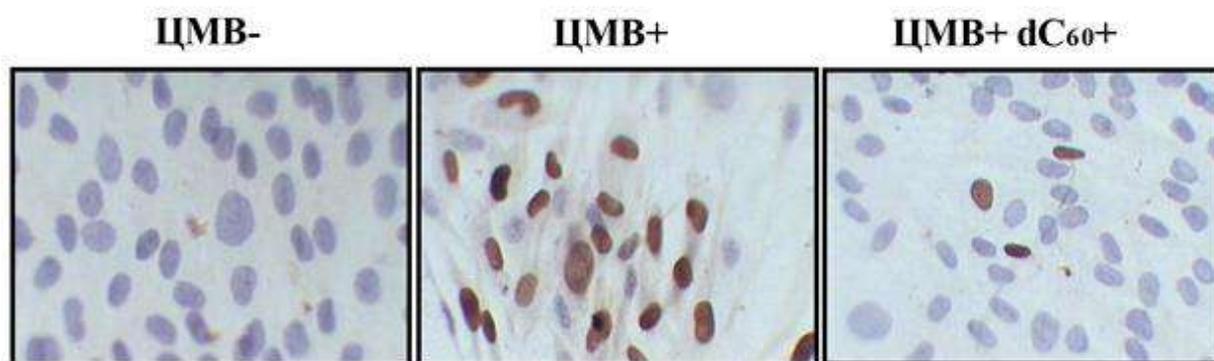
Следует особо отметить, что дисперсный фуллерен dC<sub>60</sub> проявил противовирусные свойства не только в профилактической и микробицидной схемах (ХТИ 118 и 59 соответственно), но также в лечебной схеме (ХТИ 66), в которой большинство химически синтезированных производных фуллерена C<sub>60</sub> оказались неактивными, а также снижал титр ЦМВ более, чем в 600 раз.

### 3.4.3 Механизм действия дисперсного фуллерена dC<sub>60</sub> против цитомегаловирусной инфекции *in vitro*

#### 3.4.3.1 Влияние дисперсного фуллерена dC<sub>60</sub> на адсорбцию ЦМВ на клеточной мембране

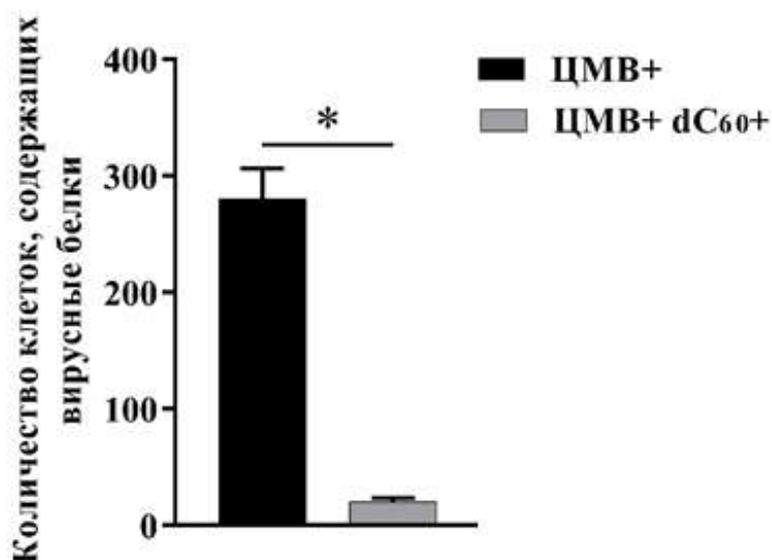
В связи с тем, что dC<sub>60</sub> проявил противовирусные свойства в трёх схемах воздействия, представляло интерес изучить влияние dC<sub>60</sub> на адсорбцию ЦМВ на клеточной мембране.

Влияние на адсорбцию оценивали с помощью иммуноцитохимического окрашивания на сверхранний (IE1-p72) и ранний (pp65) вирусные белки в условиях заражения, приведенных в разделе «Материалы и методы 2.5.11». Результаты приведены на Рисунке 29.



**Рисунок 29** – Иммуноцитохимическое окрашивание клеток моноклональными антителами на белки ЦМВ (IE1-p72 и pp65). Слева представлены неинфицированные клетки (ЦМВ-), в центре инфицированные ЦМВ клетки (ЦМВ+), справа – инфицированные ЦМВ клетки, обработанные dC<sub>60</sub>. Световой микроскоп AxioCamMRc 5, Zeiss, (Германия), увеличение 800х.

Было показано, что в положительном контроле (ЦМВ+) количество клеток, содержащих вирусные белки, составляло 280 клеток на лунку 48-луночной панели. После обработки dC<sub>60</sub> количество клеток, содержащих вирусные белки, составляло 20 клеток, снижение составило 93% (Рисунок 30).



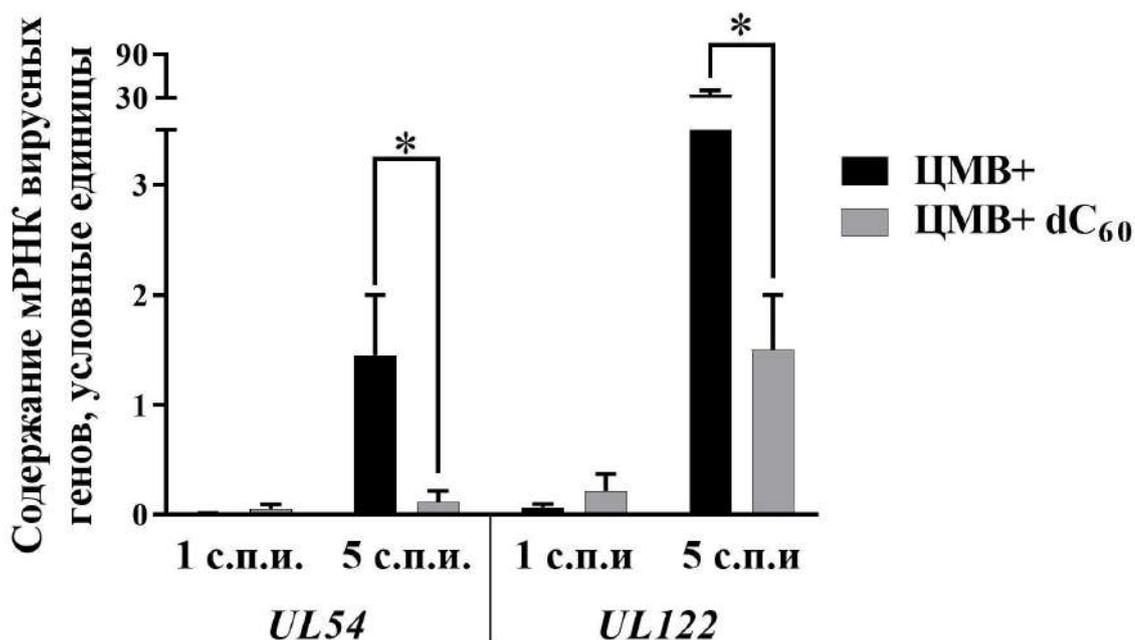
**Рисунок 30** – Влияния dC<sub>60</sub> на адсорбцию ЦМВ на клеточной мембране. Чёрный столбик – количество клеток, содержащих белки ЦМВ в контрольных инфицированных клетках. Серый столбик – количество клеток после обработки dC<sub>60</sub> инфицированных ЦМВ клеток. Количество клеток, содержащих вирусные белки, окрашенные моноклональными антителами, в опыте по изучению По вертикали – среднее количество окрашенных клеток в лунке 48-луночной панели. \* – p<0,05.

На основе полученных данных можно предположить, что одним из возможных противовирусных механизмов действия dC<sub>60</sub> является его влияние на адсорбцию ЦМВ на клеточной мембране, до того, как вирус проник в клетку.

### 3.4.3.2 Влияние дисперсного фуллерена dC<sub>60</sub> на экспрессию генов ЦМВ *UL122* и *UL54*

Представляло интерес изучить влияние dC<sub>60</sub> на экспрессию вирусных генов: *UL122*, кодирующего сверхранний белок IE2-p86, и *UL54*, кодирующего вирусную ДНК-полимеразу. В качестве референсного гена использовали клеточный ген *GAPDH*.

Нами было показано, что dC<sub>60</sub> в концентрации 500 мкг/мл снижает уровень мРНК вирусных генов *UL54* и *UL122* на пятые сутки после инфицирования в 12,1 и 22,7 раз соответственно (Рисунок 31).



**Рисунок 31** – Изменение уровня экспрессии продуктов вирусных генов в инфицированных клетках культуры ФЛЭЧ. По горизонтали: с.п.и. – сутки после инфицирования. По вертикали – содержание мРНК вирусных генов, усл. ед., \* –  $p < 0,05$ .

Таким образом, нами было показано, что dC<sub>60</sub> может влиять на разные стадии ЦМВИ клетки: а) на адсорбцию ЦМВ на клеточной мембране; б) на экспрессию сверхранних вирусных генов (*UL122*) и в) на репликацию вирусной ДНК, ингибируя экспрессию гена ДНК полимеразы *UL54*.

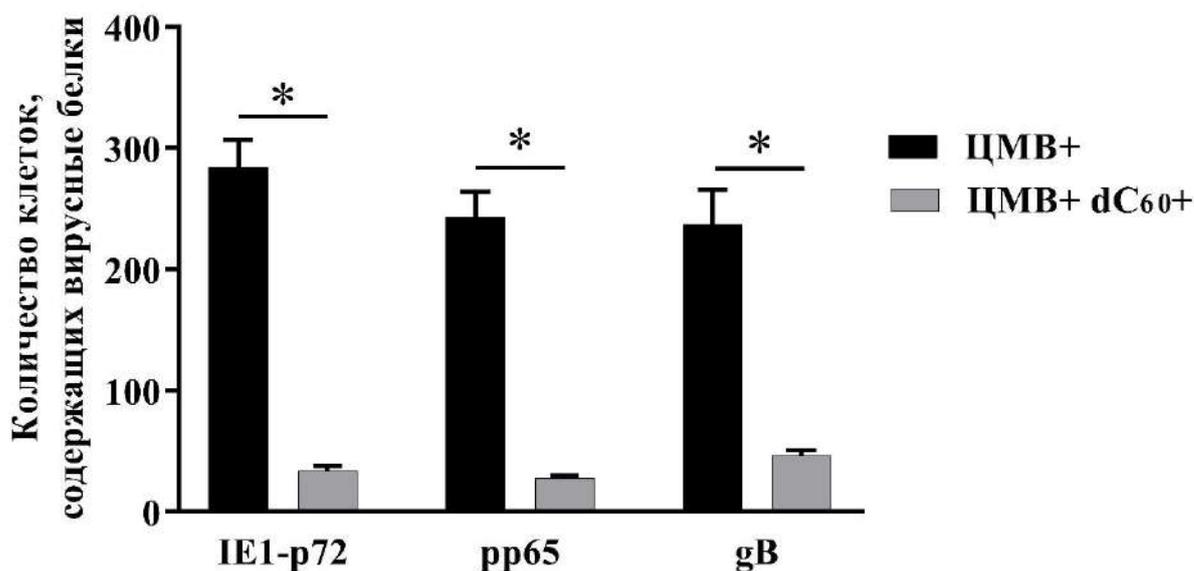
### 3.4.3.3 Влияние фуллерена dC<sub>60</sub> на содержание вирусных белков в клетках, зараженных ЦМВ

#### 3.4.3.3.1 Иммуноцитохимический анализ влияния dC<sub>60</sub> на содержание вирусных белков

При изучении действия dC<sub>60</sub> на адсорбцию и проникновение в клетку (Рисунок 29) была использована смесь моноклональных антител к белкам ЦМВ, затем были проведены опыты по изучению влияния dC<sub>60</sub> на содержание вирусных белков методом иммуноцитохимического окрашивания в культуре клеток с

использованием моноклональных антител к отдельным вирусным белкам сверхраннему (IE1-p72), раннему (pp65) и позднему (gB) в лечебной схеме. Для этого монослой клеток культуры ФЛЭЧ заражали ЦМВ. После адсорбции вируса в течение часа при +37°C монослой клеток промывали и вносили dC<sub>60</sub> в концентрации 500 мкг/мл. В качестве положительного контроля использовали инфицированные клетки, не обработанные dC<sub>60</sub>. Клетки фиксировали и окрашивали на пятые сутки после инфицирования. Подсчёт клеток производили с использованием светового микроскопа AxioCamMRc 5, Zeiss, (Германия).

При окрашивании клеток на вирусные белки (сверхранний IE1-p72, ранний pp65 и поздний gB) показано, что количество клеток, содержащих вирусные белки при обработке dC<sub>60</sub> в концентрации 500 мкг/мл, снизилось в 8,4, 5 и 8,7 раз соответственно, по сравнению с контрольными инфицированными, не обработанными dC<sub>60</sub> клетками (Рисунок 32).

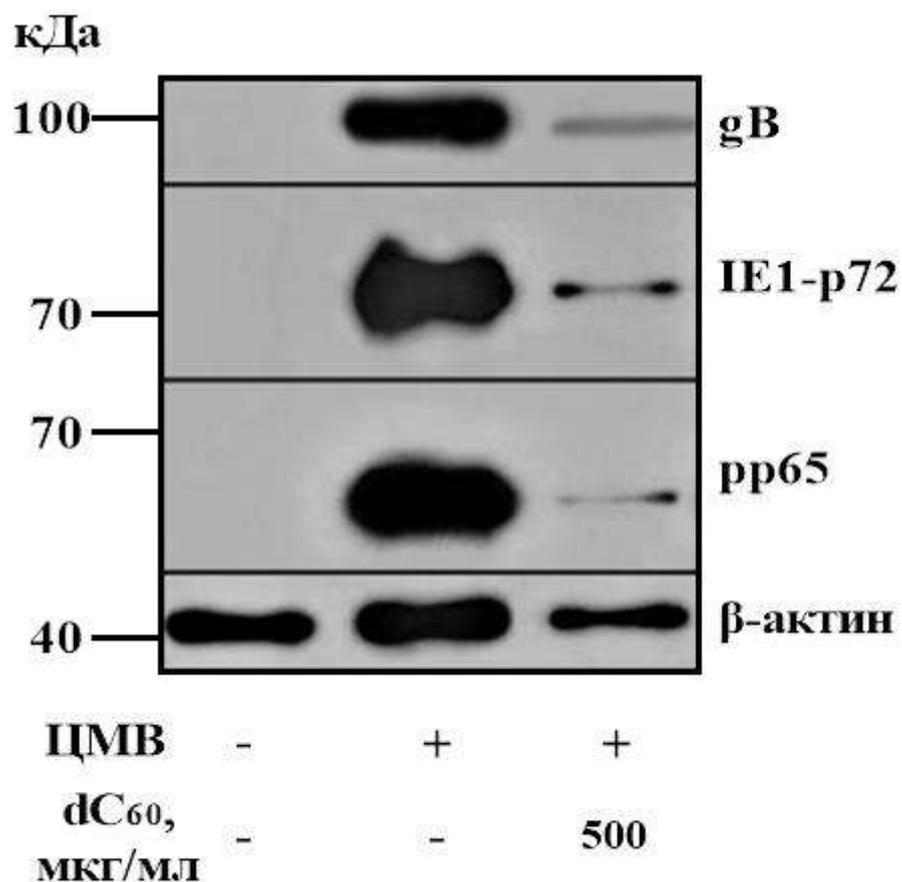


**Рисунок 32** – Изменение количество клеток, содержащих вирусные белки под действием dC<sub>60</sub>. Приведены средние значения на лунку 48-луночной панели (m±STD). \* – p<0,05.

Таким образом, подсчеты показали, что под действием dC<sub>60</sub> не происходит запуск каскада синтеза вирусных белков, ингибирование инфекционного процесса происходит, начиная со сверхранних стадий ЦМВИ.

### 3.4.3.3.2 Анализ влияния dC<sub>60</sub> на содержание вирусных белков методом иммуноблоттинга

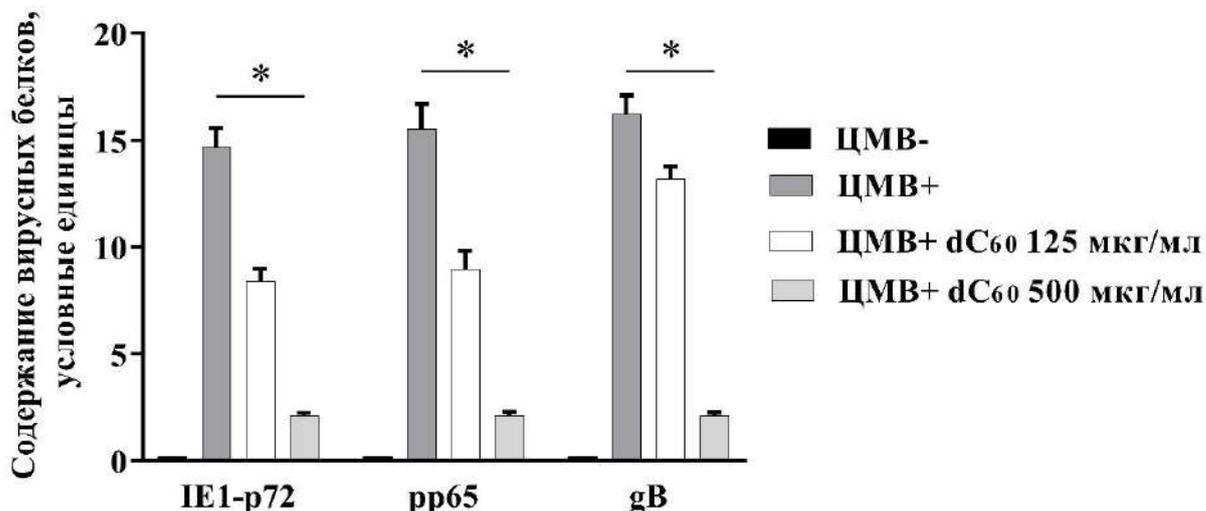
Влияние dC<sub>60</sub> на экспрессию вирусных белков оценивали также методом иммуноблоттинга. Для сравнительного анализа содержания вирусных белков в пробах образцы нормализовали по отношению к референс-белку – β-актину (Рисунок 33).



**Рисунок 33** – Относительное содержание вирусных белков и β-актина в клетках ФЛЭЧ, зараженных ЦМВ и обработанных dC<sub>60</sub>. Слева – молекулярные массы, кДа, справа – обозначения вирусных белков и β-актина.

Компьютерная обработка данных иммуноблоттинга показала, что dC<sub>60</sub> подавляет экспрессию сверхранных, ранних и поздних вирусных белков. В концентрации 500 мкг/мл dC<sub>60</sub> снижал экспрессию IE1-p72, pp65 и gB в 6,9, 7,3 и

7,6 раз, соответственно. Обработка dC<sub>60</sub> в концентрации 125 мкг/мл подавляла экспрессию исследуемых белков в меньшей степени (Рисунок 34).



**Рисунок 34** – Изменение содержания вирусных белков в клетках ФЛЭЧ при ЦМВИ и обработке dC<sub>60</sub>, нормализованное по β-актину. По данным иммуноблоттинга с использованием программы ImageJ V. 1.45s, \* – p<0,05.

Полученные данные методами иммуноцитохимии и иммуноблоттинга свидетельствуют о том, что dC<sub>60</sub> дозозависимо подавляет экспрессию белков 3-х стадий жизненного цикла ЦМВ: сверхраннего, раннего и позднего.

#### 3.4.4 Противовирусные свойства гетеродимеров в отношении цитомегаловирусной инфекции

Ранее было показано, что ряд гетеродимеров, синтезированных в ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, обладают высокими противовирусными свойствами в отношении ВИЧ-1 [95], поэтому представляло интерес изучить противовирусные свойства гетеродимеров в отношении ЦМВИ. Изучена способность 7 соединений подавлять инфекционную активность ЦМВ в четырёх схемах воздействия: микробицидной, профилактической, вирулицидной и терапевтической. В качестве модельной системы использована культура эмбриональных фибробластов

человека, зараженных ЦМВ. Данные по противовирусной активности соединений приведены в Таблице 14.

**Таблица 14** – Цитотоксические и противовирусные свойства гетеродимеров в лечебной и микробицидной схемах в отношении ЦМВИ *in vitro*.

Соединение	ЦД <sub>50</sub> , мкг/мл	Схемы воздействия			
		Лечебная		Микробицидная	
		ИД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ	ИД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ
LN116	432	6,0	72	4,8	90
LN128	114	1,27	90	1,67	68
LN129	192	2,31	83	1,75	<b>110</b>
LN133	219	2,67	82	1,63	<b>134</b>
LN135	265	4,14	64	3,47	76
LN138	133	1,85	72	1,39	96
Z492	1139	8,0	<b>142</b>	9,18	<b>124</b>

Выделены значения ХТИ, превышающие 100. Опыты показали, что выраженными терапевтическими свойствами (в лечебной схеме) (ХТИ  $\geq$  100) обладало одно соединение – Z492, ХТИ составил 142. Это соединение проявило также самую низкую цитотоксичность (ЦД<sub>50</sub> 1139 мкг/мл). Три соединения – LN129, LN133 и Z492 обладали высокими противовирусными свойствами в микробицидной схеме (ХТИ составил 110, 134 и 124, соответственно). Однако ни одно из соединений не показало противовирусных свойств в профилактической и вирулицидной схемах, данные не приведены.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Острые и хронические воспалительные заболевания различных органов и систем организма являются глобальной проблемой здравоохранения. Они имеют много общего, так как влияют на иммунную систему, нарушая её функционирование, либо за счет повышенной реакции на патоген в остром периоде заболевания (например, при заражении коронавирусом SARS-CoV-2), либо напротив, за счет подавления различных звеньев иммунитета при хроническом течении болезни (например, при вирусных гепатитах).

Хронические воспалительные заболевания печени остаются нерешенной проблемой медицины во всем мире. Согласно данным, опубликованным в 2023 г. [55], в 2019 г. 295,9 млн. человек (3,8%) населения были хронически инфицированы вирусом гепатита В и 57,8 млн. (0,8%) – хронически инфицированы вирусом гепатита С. Всего в 2019 г. зарегистрировано более 3 млн. новых случаев ВГВ- и ВГС-инфекций и более 1,1 млн. смертей от вирусных гепатитов. Вирусные гепатиты является основной причиной хронических заболеваний печени, цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [31]. В РФ по данным Роспотребнадзора в 2018 году зарегистрировано 61,9 тыс. случаев хронических вирусных гепатитов, причем в этиологической структуре впервые преобладал ХГС: в 2018 г. его доля составила 77,6 %, доля хронического гепатита В - 21,5 % [10]. Эти данные свидетельствуют о том, что несмотря на введение в практическое здравоохранение препаратов прямого противовирусного действия, излечивающих около 90% больных гепатитом С, ежегодная смертность от вирусных гепатитов остается высокой. Нарушения иммунитета при хронических гепатитах создают условия для реактивации ГВЧ, однако роль герпесвирусных инфекций в хронических воспалительных заболеваниях печени в настоящее время не определена, а имеющиеся данные противоречивы [85, 86, 135].

В связи с этим в нашей работе было изучено распространение ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6 в ПК среди 259 пациентов, находившихся на стационарном и амбулаторном наблюдении в ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ» в 2018-2020 гг. с вирусными гепатитами А, В,

С и D, а также с предварительным диагнозом «гепатит неясной этиологии». Анализ 4-х ГВЧ в настоящей работе показал, что ДНК ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6 суммарно обнаруживаются в ПК как у пациентов с вирусными гепатитами В и С (у каждого 7-ого пациента, 13,5%), так и при гепатите неуточненной этиологии (у каждого 10-го пациента, 10,1%). Важно, что при гепатите неясной этиологии частота обнаружения ГВЧ в ПК статистически значимо не отличалась от таковой при вирусных гепатитах). Из 4-х ГВЧ чаще других в ПК обнаруживали ВЭБ - в 58% образцов. Об обнаружении ВЭБ у пациентов с ХГС сообщали Н. Ghanem и соавторы, которые выявили ДНК ВЭБ у 29% больных с ХГС у 7,7% здоровых лиц в контрольной группе и показали, что уровни ферментов печени АЛТ и АСТ были значительно выше у пациентов, коинфицированных ВЭБ и ВГС, чем у пациентов с моноинфекциями ВЭБ и ВГС [74]. Так как известно, что ВЭБ способен заражать не только В клетки, но и эпителиальные клетки, можно предположить, что ВЭБ может участвовать в воспалении печени либо поражая непосредственно клетки паренхимы органа – гепатоциты, либо воздействуя на клетки и факторы иммунной системы.

Новые результаты были получены при анализе клинических и лабораторных показателей от пациентов с гепатитом С. При гепатите С ГВЧ были обнаружены в 38,7% образцов биоптатов печени, что статистически значимо выше, чем в других органах. В сыворотке крови геномная РНК ВГС встречалась в 1,6 раз чаще и концентрация core-белка ВГС была в 2,5 раза выше у пациентов с ГВЧ, чем в циркуляции у больных гепатитом без ГВЧ. Показано, что core-белок ВГС подавляет противовирусный иммунитет [163], кроме того, показано, что выявление повышенных концентраций core-белка в циркуляции свидетельствуют об активной ВГС инфекции [9, 56]. При коинфекции ВГС и ГВЧ мы в 1,5 раза чаще обнаруживали антитела к неструктурному белку NS5A ВГС в ПК. Ранее было установлено, что антитела к этой области вирусного генома ассоциируются с более тяжелым течением хронического гепатита С [8]. Статистически значимые различия по всем 3-м вирусологическим показателям свидетельствуют о более выраженных неблагоприятных изменениях в клиническом состоянии у больных с коинфекцией.

Особого внимания заслуживают результаты, показавшие, что у пациентов с сопутствующей ГВИ цирроз печени был обнаружен у каждого второго пациента и лишь у каждого шестого пациента с хроническим гепатитом без ГВЧ-инфекции, различия статистически значимы. Так как цирроз является серьезным и часто неизлечимым следствием вирусных гепатитов, этот результат свидетельствует о негативной роли ГВИ на течение и исход хронических гепатитов. Все пациенты с вирусным гепатитом получали лечение базовыми и противовирусными препаратами. Улучшение состояния наблюдалось почти у половины пациентов без ГВИ и лишь у 25% пациентов с сочетанной ГВИ. Ухудшение состояния наблюдалось у 25% пациентов с сопутствующей герпесвирусной инфекцией и только у 1,3% без герпесвирусной инфекции. Это означает, что герпесвирусные инфекции отрицательно влияли на эффективность терапии.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что ГВЧ (ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6А/В) негативно влияют на состояние пациентов с хроническими гепатитами и исход заболевания. На это указывают: 1 – повышенная частота обнаружения геномной РНК ВГС в периферической крови; 2 – значительное увеличение концентрации core-белка ВГС в ПК; 3 – увеличенное количество гепатоцитов, содержащих белки ВГС; 4 – повышенный уровень антител к NS5А ВГС в ПК; 5 – снижение доли пациентов с нормальными уровнями АЛТ; 6 – ухудшение состояния у пациентов с герпесвирусной инфекцией по сравнению с пациентами без герпесвирусов в ПК; 7 – развитие цирроза печени в 3 раза чаще у пациентов с гепатитами, коинфицированных ГВЧ.

Полученные результаты указывают на необходимость включения анализа маркеров ГВЧ в обследование пациентов с вирусными гепатитами и гепатитами неуточнённой этиологии, а при положительных результатах – на целесообразность применения специфической противогерпесвирусной терапии. Это может улучшить эффективность лечения пациентов с хроническими гепатитами и значительно снизить количество летальных исходов.

Другим распространённым и социально значимым хроническим воспалительным заболеванием является хронический простатит – ХП/СХТБ – наиболее распространенное урологическое заболевание среди мужчин со сложной и гетерогенной этиологией. ХП/СХТБ характеризуется болью или дискомфортом в области таза, часто связанным с симптомами мочеиспускания и/или сексуальной дисфункцией, а также с психологическими последствиями [177]. Острый и хронический бактериальный простатит встречается только в 10% случаев простатита, а на долю хронического абактериального простатита ХП/СХТБ ША приходится до 90% случаев [46]. Этиология абактериального простатита до конца не изучена, это осложняет лечение, которое нередко бывает безуспешным. Стандартная схема терапии ХП/СХТБ обычно включает  $\alpha$ -блокаторы, антибиотики и противовоспалительные препараты. В настоящее время в ходе клинических испытаний тестируются такие препараты как прегабалин, пентозанполисульфат, диазепам, баклофен, зафирлукаст, танезумаб и аллопуринол. Испытания проводятся на небольших группах пациентов с ХП/СХТБ и эффективность этих методов остается под вопросом [139]. Данные об участии ГВЧ и вызываемых ими инфекций в развитии ХП/СХТБ пока не доказаны. В нашем исследовании был проведён анализ проб из урогенитального тракта 287 мужчин с диагнозом ХП/СХТБ ША на наличие ДНК ГВЧ - ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6А/6В - методом ПЦР в реальном времени. Из 287 пациентов суммарно ГВЧ были обнаружены у 103 (35,9%). Изучение распространения ГВЧ в образцах спермы от 198 доноров показало присутствие ДНК ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6 в 6,3%, 2,7% и 13,5%, соответственно, суммарно 22,5% [62]. Статистическая обработка показала, что различия между донорами спермы и пациентами с ХП/СХТБ статистически значимы ( $p < 0,05$ ). Для определения роли ГВЧ в ХП/СХТБ мы использовали сравнительный анализ эффективности лечения пациентов с ДНК ГВЧ противовирусными препаратами с эффективностью лечения пациентов без ДНК ГВЧ с использованием стандартной схемы, включавшей антибиотик. В качестве противовирусных препаратов в группе 1 использовали валацикловир и интерферон альфа-2b, в группе 2 – интерферон альфа-2b, тамсулозин и диклофенак.

Стандартная схема для лечения неинфицированных пациентов (группа 3) включала левофлоксацин, тамсулозин и диклофенак.

Результаты терапии оценивали по изменению частоты выявления и концентрации ДНК ГВЧ, а также по индексу симптомов до и после лечения. Было установлено, что в результате терапии концентрация ДНК ГВЧ (вирусная нагрузка) в группах 1 и 2 уменьшилась в 10-100 раз. Снижение вирусной нагрузки оказалось более выраженным у пациентов из группы, получавших терапию валацикловиrom и вифероном. Важно отметить, что пациенты из группы 1 имели также достоверно лучшие результаты через 6 месяцев после начала терапии по шкале симптомов NIH-CPSI, что свидетельствует о снижении тяжести заболевания и повышении качества жизни.

Особый интерес представлял случай с пациентом с ХП/СХТБ, у которого не обнаружили бактериальных инфекций. Пациент обратился с жалобами на жжение в уретре, боль периодического характера в промежности, мошонке, неприятные ощущения при мочеиспускании, во время и после эякуляции. При исследовании проб из урогенитального тракта и цельной крови на ДНК ГВЧ (ВПГ-1, ВПГ-2, ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6) был обнаружен высокий уровень вирусной нагрузки одного из ГВЧ – ВГЧ-6. Пациенту была назначена противовирусная терапия, включающая валацикловир и интерферон альфа-2b. К окончанию терапии наблюдалось уменьшение боли, симптомов дизурии, улучшение клинических и лабораторных показателей. В последующие годы симптомы ХП/СХТБ имели легкую степень тяжести и не вынуждали пациента обращаться за медицинской помощью. Таким образом, у пациента единственным вероятным этиологическим агентом ХП/СХТБ являлся ВГЧ-6.

Одним из последствий ХП/СХТБ является мужское бесплодие, которое оказывает пагубное влияние на социальное здоровье, психологию больного и окружающих, а также на демографические проблемы и экономику. Во всем мире бесплодием страдают примерно 13-15% всех пар детородного возраста, в то время как каждая пятая пара имеет проблемы с фертильностью в течение первого года.

Точная распространенность мужского бесплодия на данный момент неизвестна, однако в некоторых регионах РФ бесплодие достигает 20%, что является критичным [155].

Особый интерес представляет тенденция, наблюдаемая в последние десятилетия к снижению количества сперматозоидов у мужчин во всем мире. Среднее количество сперматозоидов в 1940 году составляло 113 млн/мл, к 1990-м годам снизилось до 66 млн/мл. Эта тенденция наблюдается во всем мире, среднее количество сперматозоидов снизилось на 51,6% в период с 1973 по 2018 год. Еще более важным является то, что темпы снижения количества сперматозоидов увеличились после 2000 года, с 1,16% в год после 1972 года до 2,64% после 2000 года [38, 106].

Многие генетические факторы и образ жизни связаны с мужским бесплодием, однако этиология мужского бесплодия остается неопределенной более чем у 50% пациентов, которые впоследствии классифицируются как страдающие идиопатическим мужским бесплодием [21, 37, 152].

Среди авторов работ, направленных на изучение роли ГВЧ в мужском бесплодии, нет единого мнения о влиянии ГВЧ на фертильность. Одни исследователи указывают на негативную роль ГВЧ в мужской фертильности [6, 12, 13, 126], другие предполагают отсутствие влияния ГВЧ на качество спермы [20, 103]. Например, Jahromi B.N. с соавторами, показали негативное влияние ЦМВ на качество спермы [89], в то время как Behboudi E. с соавторами заявляют об отсутствии влияния ГВЧ 1-5 типов на качество спермы [28]. Naumenko V. с соавторами показали, что ЦМВ обнаруживается в мужских половых клетках, как в образцах спермы, так и в органотипической культуре яичек, и оказывает прямое гаметотоксическое действие [126]. Evdokimov V.V. с соавторами обнаружили корреляцию обнаружения ГВЧ с низкими показателями эякулята при мужском бесплодии, ассоциированном с варикоцеле [5].

Среди обследованных нами пациентов было 18 мужчин с бесплодием, из которых 8 были инфицированы ГВЧ. Пациенты получили терапию, в зависимости

от выявления ГВЧ: пациенты, инфицированные ГВЧ, получили противовирусную терапию с включением валацикловира, неинфицированные пациенты получили стандартную терапию. После проведенной противовирусной терапии у пациентов с ГВЧ вирусная нагрузка снизилась в 37 раз, у половины пациентов капсиды ГВЧ не обнаруживались в сперматозоидах, а у оставшихся пациентов их количество снизилось более чем в 2 раза. В результате противовирусного лечения у 75% пациентов восстановилась фертильность и родились здоровые дети, что статистически значимо выше, чем среди пациентов, не инфицированных ГВЧ (40%).

Особый интерес представляет случай с пациентом, обратившимся по поводу отсутствия беременности у супруги после 6 лет регулярной половой жизни без предохранения. У пациента были выявлены лейкоциты и некрозы половых клеток в эякуляте и обнаружен геном ЦМВ в СПЖ в высоких концентрациях. Пациент получил противовирусную терапию, включающую валацикловир и интерферон альфа-2b. После окончания терапии наблюдалась нормализация показателей спермы, ДНК ЦМВ обнаруживалась только в эякуляте и в значительно меньшей концентрации. Спустя 6 месяцев после проведенного лечения, у супруги пациента наступила первая беременность, завершившаяся рождением здорового ребенка, спустя 3 года – вторая беременность и также рождение здорового ребенка.

Проведенное исследование показало негативную роль ГВЧ в воспалительных заболеваниях УГТ мужчин. В совокупности с ранее полученными данными о снижении качества спермы и внутригаметной локализации ГВЧ у пациентов с ХВЗ УГТ и с бесплодием [6, 12], результаты нашей работы свидетельствуют о необходимости включения анализа урогенитальных проб на ГВЧ в диагностические алгоритмы обследования мужчин с ХП/СХТБ и с бесплодием и, в случае их выявления, использование курса терапии противовирусными химиопрепаратами и препаратами с интерфероном альфа-2b. В результате противовирусной терапии у большинства пациентов наблюдается снижение

количества или элиминация ГВЧ из УГТ, из сперматозоидов и с высокой вероятностью – восстановление мужской фертильности.

COVID-19 – острое воспалительное заболевание респираторного тракта, при котором нередко развивается гиперинфекция и синдром цитокинового шторма, вызывающие тяжелое течение, полиорганную недостаточность и смерть [123]. Для борьбы с цитокиновым штормом в тяжелых случаях COVID-19 применяют иммуносупрессивную терапию. Однако иммунодепрессанты (например, кортикостероиды и блокаторы цитокинов) не только снижают уровни провоспалительных цитокинов, но и повышают риск оппортунистических инфекций [166]. Среди возбудителей оппортунистических инфекций при SARS-CoV-2 инфекции определяют патогены различной природы, в том числе герпесвирусы – ГВЧ [18]. Однако данных о распространении ГВЧ в клинических материалах пациентов с COVID-19, о количестве вирусов разных подсемейств и о концентрации ДНК ГВЧ пока недостаточно. В связи с этим в работе проведен количественный ПЦР анализ геномных ДНК ГВЧ в тканях 5-ти различных органов (в аутопсийных материалах) пациентов, умерших с подтверждённым диагнозом COVID-19. Это создает возможность оценить вклад ГВЧ в критическое течение и исход заболевания.

В настоящей работе у пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 были изучены посмертно полученные материалы. Проведен количественный анализ ДНК представителей всех трех подсемейств ГВЧ: альфа-герпесвирусов – ВПГ-1 и ВЗВ; бета-герпесвирусов – ЦМВ и ВГЧ-6А/6В и гамма-герпесвирусов – ВЭБ. ДНК ГВЧ определяли в жизненно важных органах: головной мозг, печень, легкие, селезенка, лимфатические узлы. Так как известно, что на течение основного заболевания могут оказывать влияние сопутствующие заболевания, создавая более высокий риск тяжелой инфекции, в группу сравнения были включены пациенты, не инфицированные SARS-CoV-2 и скончавшиеся от сердечно-сосудистых, онкологических и других заболеваний неинфекционной природы. Впервые показано, что в разных органах пациентов с летальным исходом встречаются по 2,

3 и даже по 4 ГВЧ из разных подсемейств. Во всех изученных органах чаще других ГВЧ встречались ВЭБ и ВГЧ-6, эти же ГВЧ чаще встречались в органах пациентов из группы сравнения. Реже были выявлены ВЗВ и ВПГ – у 5% и у 20% пациентов соответственно. Схожие данные описаны при изучении аутопсийных материалов от 28 пациентов, скончавшихся от сердечно-легочной недостаточности на фоне декомпенсации атеросклероза [15]. Авторы определили ДНК ГВЧ в образцах коры головного мозга, миокарда, стенки сосудов, печени, почек и легких. Наиболее часто обнаруживали ВГЧ-6 (82%), реже – ВЭБ (58%), ЦМВ и ВПГ-1 (по 17%). Количественных данных в работе не приведено.

Одним из объяснений высокой частоты распространения ВЭБ и ВГЧ-6 может быть их тропизм: ВЭБ заражает преимущественно В-лимфоциты, ВГЧ-6 – Т-лимфоциты. Лимфотропность обеспечивает быстрое распространение вирусов по организму, вхождение в органы и ткани и персистенция в качестве резидентных клеток, где они могут сохраняться в латентном состоянии и реактивироваться. Клинические случаи обнаружения ВПГ-1 и ВЗВ описаны другими авторами, которые наблюдали у больных с тяжелым течением COVID-19 не только типичные кожные проявления на коже, но также вирусемию альфагерпесвирусов, подтвержденную секвенированием вирусных ДНК [67, 171]. Seeble J. et al. сообщили о высоком уровне реактивации ВПГ-1 у пациентов с COVID-19, находившихся на искусственной вентиляции легких [150]. У больных с COVID-19 описаны случаи подтвержденного ВПГ-1 энцефалита [113], конъюнктивита [80], кератитов [117]. Авторы заключили, что реактивация латентных альфагерпесвирусов происходила в результате воспалительных процессов, вызываемых SARS-CoV-2. Масштабное сравнительное исследование ВПГ- и ВЗВ-инфекций было проведено Katz J. и соавторами [93], которые обследовали 889 пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 и 987849 пациентов, находившихся на лечении в стационарах без SARS-CoV-2 инфекции и COVID-19. Анализ показал, что оба альфа-герпесвируса статистически значимо чаще встречались у больных COVID-19, чем у больных с эндокринными заболеваниями, ожирением, диабетом,

сердечно-сосудистыми и неврологическими заболеваниями. Был сделан вывод, что между герпесвирусами и COVID-19 существует сильная связь.

В материалах от 28% пациентов с летальным исходом COVID-19 в нашей работе была обнаружена ДНК ЦМВ. Возможно, именно реактивацией ЦМВ объясняются осложнения, в том числе и фатальные, описанные у больных с COVID-19 в опубликованных работах. Так, при коинфекции SARS-Cov-2 и ЦМВ Oualim S. и соавторы наблюдали ЦМВ-миокардиты [132], Maillet F. и соавторы – проктит [116], Amiya S. и соавторы – фатальную пневмонию [25].

В аутопсийных материалах от большинства скончавшихся пациентов мы наблюдали ДНК ВЭБ и ВГЧ-6. Эти данные можно сопоставить с результатами Simonnet et al., которые обнаружили ДНК ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6 в периферической крови, в среднем, у 85% критически больных COVID-19 [153]. Медианные концентрации ДНК ГВЧ в крови были очень высокими: 8648 МЕ/мл ВЭБ, 4930 МЕ/мл ЦМВ, 11430 МЕ/мл ВГЧ-6. Отметим, что концентрации, превышающие 1000 МЕ/мл вирусной ДНК в ПК, рассматриваются как показатели активной инфекции. Авторы кроме того констатировали, что инфицированные ГВЧ пациенты находились на лечении в среднем на 4 – 15 дней дольше, чем неинфицированные. О высокой частоте (55,2%) коинфекции ВЭБ у пациентов с COVID-19 сообщали также Chen T. и соавторы [42]. Они определили, что коинфекция ВЭБ/SARS-CoV-2 была связана с лихорадкой и усилением воспаления, и заключили, что реактивация ВЭБ может быть связана с тяжестью COVID-19. Присутствие ВГЧ-6 у пациентов с COVID-19 и реактивацию герпесвируса связывали с проявлениями клинических признаков, например, болезни Kawasaki [64, 110]. Таким образом, результаты практически всех приведенных работ показывают, что у пациентов с инфекцией SARS-Cov-2, находящихся в критическом состоянии, происходит реактивация ГВЧ различных подсемейств.

Интересные результаты получены в нашей работе при сравнительном количественном анализе ДНК ГВЧ в аутопсийных материалах от пациентов, скончавшихся от COVID-19, и у пациентов, скончавшихся от других,

неинфекционных заболеваний. Количество проб с высокой концентрацией вирусной ДНК, содержащих более 1000 копий ДНК и даже более 10000 копий на  $10^5$  клеток от пациентов с летальным исходом COVID-19 суммарно составляло 59%. Интересно, что в печени и в селезенке пациентов, умерших с подтвержденным диагнозом COVID-19, были обнаружены ВГЧ-6 в концентрациях, более 1 млн. копий ДНК на  $10^5$  клеток. Согласно существующим данным, такие концентрации ВГЧ-6 наблюдаются у людей, у которых вирусная ДНК интегрирована в геном – в теломерные районы хромосом. Для сохранения своего генома ВГЧ-6 использует эту уникальную форму латенции, так как геномы всех других ГВЧ в латентном состоянии находятся в виде кольцевой эписомы. Интегрированная ДНК ВГЧ-6 способна к реактивации и индукции различных заболеваний. Напротив, концентрации ГВЧ у пациентов группы сравнения были в большинстве случаев низкими. Эти данные позволяют предположить, что у пациентов с летальным исходом COVID-19 наблюдалась реактивация ГВЧ, тогда как у большинства пациентов с другими заболеваниями ГВЧ находились в латентном состоянии.

В подтверждение этого заключения можно привести данные работ, в которых показано, что вакцины против SARS-Cov-2 могут индуцировать реактивацию ГВЧ, что может увеличивать смертность и вносить вклад в развитие постковидного синдрома [119, 127, 165]. Полученные нами данные свидетельствуют о реактивации ГВЧ у большинства (59%) пациентов с летальным исходом COVID-19 и у части пациентов (17%) группы сравнения. Можно предположить, что у большинства пациентов из группы сравнения и у части пациентов, умерших с подтвержденным диагнозом COVID-19, ГВЧ находились в латентном состоянии.

Патогенез COVID-19 характеризуется прежде всего заражением клеток респираторного тракта, поражением легких и развитием тяжелой гипоксии. В последнее время накоплено достаточно данных, свидетельствующих о развитии у больных COVID-19 полиорганной недостаточности – дисфункции многих органов, включая сердце, почки, печень, желудочно-кишечный тракт, эндотелий сосудов.

Представляло интерес, может ли инфекция SARS-CoV-2 быть фактором риска реактивации ГВЧ. В настоящей работе показано, что тяжелые повреждения лёгких ассоциировались с ВГЧ-6-инфекцией, а плевральные выпоты – с ВЭБ- и ЦМВ-инфекциями. Также была показана ассоциация высоких уровней АЛТ и АСТ в крови - ферментов, свидетельствующих о повреждении печени, с ВЭБ-инфекцией. Полученные нами результаты, а также данные опубликованных работ свидетельствуют о реактивации и высоком содержании ГВЧ в органах скончавшихся пациентов, подтверждают данные о полиорганной природе патологических процессов и указывают на вклад ГВЧ в летальный исход COVID-19.

Имеющиеся на данный момент препараты против герпесвирусных инфекций, в том числе против ЦМВИ, имеют ряд недостатков: ограниченный арсенал лекарственных препаратов с близким механизмом действия (ингибирование ДНК-полимеразы), высокая гепатотоксичность и нефротоксичность, появление резистентных штаммов ЦМВ. Особую проблему представляет отсутствие безопасных препаратов против ЦМВИ, разрешённых для терапии беременных, новорожденных и детей. Поэтому поиск новых противовирусных соединений с низкой токсичностью и высокой эффективностью является актуальной задачей. В связи с тем, что ЦМВ усугубляет течение СПИДа и часто является причиной смерти ВИЧ инфицированных пациентов, представляется актуальным поиск противовирусных препаратов двойной направленности, нацеленных на ВИЧ и ЦМВ. В связи с этим были изучены цитотоксические и противовирусные свойства в отношении ЦМВ 15 производных фуллерена  $C_{60}$  и 7 гетеродимеров с потенциально двойной направленностью (против ЦМВ и ВИЧ-1).

Было показано, что низкотоксичными в отношении ФЛЭЧ оказались 5 производных фуллерена  $C_{60}$  (Gi-850k, Gi-851k, Gi-742, Gi-997, Vi 544-2k) и один гетеродимер двойной направленности (Z492). Впервые было показано, что пять производных фуллерена  $C_{60}$  (Gi-850k, Gi-851k, Gi-742, Gi-997, Vi 544-2k) обладают выраженными вирулицидными свойствами и способны нейтрализовать

инфекционную активность ЦМВ *in vitro*. Профилактические свойства *in vitro* проявили три производных фуллерена C<sub>60</sub> (OKR-315, OKR-347, KB-874), а в лечебной схеме воздействия высокими противовирусными свойствами обладал один гетеродимер (Z492). Выраженными микробицидными свойствами обладали три гетеродимера двойной направленности (LN129, LN133, Z492) и одно производное фуллерена C<sub>60</sub> (OKR-315). Таким образом показано, что производные фуллерена C<sub>60</sub> и гетеродимеры двойной направленности ((3'-азидо-3'-дезокситимидин)-2-[3-[ω-(4-бром-фенокси)алкил]-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(6H)-ил]ацетаты) могут стать перспективной основой для создания лекарственных средств, обладающих противовирусной активностью.

Основным препятствием для использования фуллеренов в медицине является практически полная нерастворимость в водных средах. Дисперсный фуллерен dC<sub>60</sub> лишён этого существенного недостатка. Он обладает низкой цитотоксичностью и высокой противовирусной активностью в отношении ВПГ-1, превосходящей противовирусную активность ацикловира. Особенно стоит отметить, что, в отличие от производных фуллерена C<sub>60</sub>, дисперсный фуллерен dC<sub>60</sub>, проявил противовирусную активность не только в профилактической и микробицидной схемах, но также и в лечебной схеме. В связи с тем, что dC<sub>60</sub> низкотоксичен и показал противовирусные свойства в трёх схемах, мы изучили механизм его противовирусного действия в отношении ЦМВИ *in vitro*. Впервые показано, что механизм противовирусного действия dC<sub>60</sub> включает предотвращение адсорбции ЦМВ на клеточной мембране до того, как вирус проникает в клетку. Также было показано, что в клетках, зараженных ЦМВ, dC<sub>60</sub> подавляет экспрессию вирусных генов (*UL122* и *UL54*), а также снижает содержание сверхраннего, раннего и позднего вирусных белков, и этот эффект имеет дозозависимый характер.

Таким образом впервые установлено, что в основе противовирусного действия dC<sub>60</sub> лежит влияние на адсорбцию ЦМВ на мембране клетки-хозяина, а также снижение экспрессии главной сверхранней области генома ЦМВ (major immediate early promoter (MIEP)), определяющей каскадный характер экспрессии

генов, кодирующих сверхранние (IE-p72), ранние (pp65) и поздние (gB) вирусные белки.

## ВЫВОДЫ

1. У больных хроническими гепатитами разной этиологии герпесвирусы (ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6) обнаружены у 12% пациентов в периферической крови и у 38,7% пациентов с гепатитом С в образцах биопсии печени. Показано, что при коинфекции ГВЧ и ВГС в печени в 3 раза увеличивается количество гепатоцитов, содержащих белки ВГС, ухудшается ответ на терапию, и в 3 раза чаще обнаруживается цирроз печени.

2. ДНК герпесвирусов (ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6) обнаружены в урогенитальном тракте (соскоб из уретры, секрет простаты, эякулят) у 103/287 (35,9%) мужчин с абактериальным хроническим простатитом/синдромом хронической тазовой боли (ХП/СХТБ ША) и не обнаружены в эякуляте здоровых мужчин. Специфическая противовирусная терапия снижала уровень или элиминировала ДНК ГВЧ в урогенитальных образцах, статистически значимо снижала индекс клинических симптомов простатита, а также приводила к восстановлению фертильности у 6/8 обследованных мужчин с бесплодием.

3. ДНК герпесвирусов (ВПГ, ВЗВ, ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6) обнаружены в аутопсийных материалах (головной мозг, легкие, печень, селезенка, лимфоузлы) у всех 59 пациентов: 39 пациентов, умерших с подтверждённым диагнозом COVID-19 и 20 пациентов, умерших от неинфекционных заболеваний. При этом количество образцов с концентрацией ДНК ГВЧ, превышающей 1000 копий на  $10^5$  клеток, от пациентов с COVID-19 обнаружено в 3 раза больше (52,4%), чем от пациентов без COVID-19 (16,6%). Реактивация ГВЧ при коинфекции с SARS-CoV-2 ассоциировалась с тяжелыми повреждениями легких и печени и неблагоприятным исходом COVID-19.

4. Впервые показана низкая токсичность и противовирусная активность дисперсного фуллерена  $dC_{60}$  в отношении ЦМВИ в клетках культуры, выражающаяся в снижении уровня мРНК вирусных генов (сверхраннего *UL122* и ДНК-полимеразы *UL54*) более чем в 10 раз и в подавлении синтеза белков ЦМВ

(IE1-p72, pp65 и gB) в 6-8 раз. ХТИ dC<sub>60</sub> в лечебной, профилактической и микробицидной схемах составил 66, 118 и 59, соответственно.

5. Впервые установлена способность гетеродимеров, содержащих производные азидотимидина и 1-[ω-(фенокси)алкил]урацила, подавлять ЦМВИ в клетках человека.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- АЛТ – аланинаминотрансфераза  
АСТ – аспаргатаминотрансфераза  
БОЕ – бляшкообразующая единица  
ВГВ – вирус гепатита В  
ВГС – вирус гепатита С  
ВГЦВ – валганцикловир  
ВГЧ-6А/В – вирусы герпеса человека 6 типа А и В  
ВГЧ-7 – вирус герпеса человека 7 типа  
ВГЧ-8 – вирус герпеса человека 8 типа  
ВЗВ – Варицелла-Зостер вирус  
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека  
ВОЗ – всемирная организация здравоохранения  
ВПГ – вирус простого герпеса  
ВПГ-1 – вирус простого герпеса 1 типа  
ВПГ-2 – вирус простого герпеса 2 типа  
ВПЧ – вирус папилломы человека  
ВСЖ – вируссодержащая жидкость  
ВЭБ – вирус Эпштейна-Барра  
ГВИ – герпесвирусная инфекция  
ГВЧ – герпесвирус человека  
ГЦВ – ганцикловир  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
дцДНК – двухцепочечная ДНК  
ИГА – индекс гистологической активности  
ИД<sub>50</sub> – 50% ингибирующая доза  
ИЛ-1 $\beta$  – интерлейкин 1 $\beta$   
ИЛ-6 – интерлейкин 6

ИМ – инфекционная множественность  
ИФ – индекс фиброза  
ИФА – иммунофлюоресцентный анализ  
ИФН- $\gamma$  – интерферон гамма  
КТ – компьютерная томография  
мРНК – матричная РНК  
МПД – максимально переносимая доза  
МКА – моноклональные антитела  
МКПК – моноклеарные клетки периферической крови  
ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией  
ОЦД<sub>50</sub> – 50% острая цитотоксическая доза  
ПК – периферическая кровь  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
ОГС – острый гепатит С  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
СПЖ – секрет предстательной железы  
с.п.и. – сутки после инфицирования  
СПИД – синдром приобретённого иммунного дефицита  
УГТ – урогенитальный тракт  
ФЛЭЧ – фибробласты легкого эмбриона человека  
ФНО- $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$   
ХВЗ – хронические воспалительные заболевания  
ХГВ – хронический гепатит В  
ХГС – хронический гепатит С  
ХП – хронический простатит  
ХП/СХТБ – хронический простатит/синдром хронической тазовой боли  
ХТИ – химиотерапевтический индекс  
ЦД<sub>50</sub> – 50% хроническая цитотоксическая доза  
ЦМВ – цитомегаловирус человека  
ЦМВИ – цитомегаловирусная инфекция

ЦПД – цитопатическое действие

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

ЭФ – электрофорез

COVID-19 – короновирусная инфекция-19 (coronavirus disease 2019)

DMEM – минимальная среда Игла в модификации Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

FDA – управление по контролю за качеством продуктов и лекарств США (Food and Drug Administration)

LATs – транскрипты, ассоциированные с латентностью (latency-associated transcripts)

МIEP – главный сверхранний промотер ЦМВ (major immediate early promoter)

NIH-CPSI – индекс шкалы симптомов хронического простатита и синдрома тазовых болей у мужчин (ХП-СХТБ) по версии национального института здоровья США (National institute of health chronic prostatitis symptom index)

SARS-CoV-1 – короновирус тяжелого острого респираторного синдрома-1 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-1)

SARS-CoV-2 – короновирус тяжелого острого респираторного синдрома-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2)

MERS-CoV – короновирус ближневосточного респираторного синдрома (Middle East respiratory syndrome coronavirus)

(+)оцРНК – одноцепочечная РНК положительной направленности

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). 10 ведущих причин смерти в мире: официальный сайт. – 2020. – URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (дата обращения: 06.10.2024).
2. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Гепатит С: официальный сайт. – 2023. – URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> (дата обращения: 12.09.2024).
3. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Руководство по тестированию на гепатиты В и С: официальный сайт. – 2017. – URL: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/260130/9789244549988-rus.pdf> (дата обращения: 06.10.2024).
4. ГБУЗ сахалинский областной центр по профилактике и борьбе со СПИДом. Клинические рекомендации "Хронический вирусный гепатит С" (утв. Министерством здравоохранения РФ 29 декабря 2021 г.): официальный сайт. – 2021. – URL: [https://hiv.sakhalin.gov.ru/site\\_get\\_file/1360/Klin%20rek%20HVG%20C.pdf](https://hiv.sakhalin.gov.ru/site_get_file/1360/Klin%20rek%20HVG%20C.pdf) (дата обращения: 06.10.2024).
5. Евдокимов В.В. Диагностика и лечение абактериального ХП/СХТБ III, ассоциированного с герпесвирусами / В.В. Евдокимов, В.П. Ковалык, В.В. Малиновская, А.Н. Шувалов, А.А. Куц // Урология. – 2019. – № 3. – С. 23-30. doi: 10.18565/urology.2019.3.23-30.
6. Климова Р.Р. Вирус простого герпеса и цитомегаловирус в эякуляте мужчин: вирус простого герпеса чаще встречается при идиопатическом бесплодии и коррелирует со снижением показателей спермы / Р.Р. Климова, Е.В. Чичев, В.А. Науменко, З.С. Гаджиева, А.С. Цибезов, А.А. Адиева, Д.К. Львов, Л.Ф. Курило, Л.В. Шилейко, Т.В. Остроумова, Т.М. Сорокина, Ю.А. Гаврилов, Т.Н. Левчук, С.А. Яковенко, С.Г. Васильева, Ю.В. Вознесенская, Е.Ю. Симоненко, А.А. Куц, Г.Т. Сухих // Вопросы вирусологии. – 2010. – Т. 55. – № 1. – С. 27-31.

7. Лебедев Г.С. Мужское бесплодие в Российской Федерации: статистические данные за 2000-2018 годы / Г.С. Лебедев, Н.А. Голубев, И.А. Шадеркин, В.А. Шадеркина, О.И. Аполихин, А.В. Сивков, В.А. Комарова // Экспериментальная и клиническая урология. – 2019. – № 4. – С. 4-12.
8. Масалова О.В. Изменение показателей гуморального и клеточного иммунитета у пациентов с хроническим гепатитом С различной тяжести / О.В. Масалова, А.Г. Абдулмеджидова, К.В. Моргунов, С.В. Грищенко, Т.В. Шкурко, Е.И. Панина, Е.И. Келли, Д.К. Львов, А.А. Куц // Вопросы Вирусологии. – 2003. – Т. 48. – №. 3. – С. 15-19.
9. Масалова О.В. Сравнительный анализ core-белка вируса гепатита С в образцах плазмы и сыворотки крови ВГС-инфицированных доноров крови и больных гепатитом / О.В. Масалова, Т.В. Вишневская, Т.В. Шкурко, Т.А. Гаранжа, Т.А. Туполева, Ф.П. Филатов, Н.П. Блохина, А.А. Куц // Вопросы вирусологии. – 2007. – Т. 52. – №. 4. – С. 11-17.
10. Межрегиональная общественная организация содействия пациентам с вирусными гепатитами. Статистика по гепатитам в России: 2018 год : официальный сайт. – 2019. – URL: <https://protivgepatita.ru/news/news-in-treatment/947--2018> (дата обращения: 12.09.2024).
11. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н. Миронов – М.: Гриф и К, 2012 – 944 с.
12. Науменко В.А. Влияние вируса простого герпеса на сперматогенез / В.А. Науменко, Ю.А. Тюленев, Д.Ю. Пушкарь, А.С. Сегал, В.А. Ковалев, Л.Ф. Курило, Л.В. Шилейко, Р.Р. Климова, С.В. Альховский, А.А. Куц // Урология. – 2011. – № 6. – С. 32-36.
13. Науменко В.А. Герпесвирусы и мужское бесплодие: есть ли связь? / В.А. Науменко, А.А. Куц // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58. – № 3. – С. 4-9.
14. Речкина Е.А. Картирование антигенных детерминант белков вируса гепатита С при помощи технологии фагового дисплея / Е.А. Речкина, Г.Ф. Денисова, О.В. Масалова, Л.Ф. Лидеман, Д.А. Денисов, Е.И. Леснова, Р.И. Атауллаханов, С.В.

Гурьянова, А.А. Куш // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40. – № 2. – С. 357-368.

15. Руженцова Т.А. Герпесвирусные инфекции в формировании острой и хронической патологии: обоснование необходимости своевременной терапии / Т.А. Руженцова, А.А. Гарбузов, А.А. Каниболоцкий, О.Ю. Борисова, Е.А. Воропаева, Е.К. Шушакова, Д.А. Хавкина, П.В. Чухляев, И.Н. Халястов, В.А. Орлова, И.И. Михайлова, Н.О. Калюжная, Н.А. Мешкова, О.И. Слюсар // Инфекционные болезни. – 2023. – Т. 21. – № 4. – С. 64-70. doi: 10.20953/1729-9225-2023-4-64-70.

16. Соломай Т.В. Роль Эпштейна–Барр вирусной инфекции и гепатитов В и С в патологии печени / Т.В. Соломай, Т.А. Семененко, М.Ю. Иванова // Вопросы вирусологии. – 2019. – Т. 64. – № 5. – С. 215-220. doi: 10.36233/0507-4088-2019-64-5-215-220.

17. Ющук Н. Д. Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом С / Н. Д. Ющук // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2013. – № 2. – С. 3-30.

18. Abdoli A. COVID-19-associated opportunistic infections: a snapshot on the current reports / A. Abdoli, S. Falahi, A. Kenarkoohi // Clin Exp Med. – 2022. – Vol. 22. – № 3. – P. 327-346. doi: 10.1007/s10238-021-00751-7.

19. Ablashi D. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses / D. Ablashi, H. Agut, R. Alvarez-Lafuente [et al.]. // Arch Virol. – 2014. – Vol. 159. – № 5. – P. 863-870. doi: 10.1007/s00705-013-1902-5.

20. Afrakhteh H. Relative frequency of hepatitis B virus, human papilloma virus, Epstein-Barr virus, and herpes simplex viruses in the semen of fertile and infertile men in Shiraz, Iran: A cross-sectional study / H. Afrakhteh, N. Joharinia, A. Momen [et al.]. // Int J Reprod Biomed. – 2021. – Vol. 19. – № 8. – P. 699-706. doi: 10.18502/ijrm.v19i8.9617.

21. Agarwal A. Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility / A. Agarwal,

- N. Parekh, M.K. Panner Selvam [et al.]. // *World J Mens Health*. – 2019. – Vol. 37. – № 3. – P. 296-312. doi: 10.5534/wjmh.190055.
22. Agut H. Human Herpesviruses 6A, 6B, and 7 / H. Agut, P. Bonnafous, A. Gautheret-Dejean // *Microbiol Spectr*. – 2016. – Vol. 4. – № 3. – P. 157-176. doi: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0007-2015.
23. Ahlawat J. Application of carbon nano onions in the biomedical field: recent advances and challenges / J. Ahlawat, S. Masoudi Asil, G. Guillama Barroso [et al.]. // *Biomater Sci*. – 2021. – Vol. 9. – № 3. – P. 626-644. doi: 10.1039/d0bm01476a.
24. Alipour E. Fullerene C60 containing porphyrin-like metal center as drug delivery system for ibuprofen drug / E. Alipour, F. Alimohammady, A. Yumashev [et al.]. // *J Mol Model*. – 2019. – Vol. 26. – № 1. – P. 7. doi: 10.1007/s00894-019-4267-1.
25. Amiya S. Fatal cytomegalovirus pneumonia in a critically ill patient with COVID-19 / S. Amiya, H. Hirata, T. Shiroyama [et al.]. // *Respirol Case Rep*. – 2021. – Vol. 9. – № 7. – P. e00801. doi: 10.1002/rcr2.801.
26. Azab W. Initial Contact: The First Steps in Herpesvirus Entry / W. Azab, K. Osterrieder // *Adv Anat Embryol Cell Biol*. – 2017. – Vol. 223. – P. 1-27. doi: 10.1007/978-3-319-53168-7\_1.
27. Bar-Or A. Epstein-Barr Virus in Multiple Sclerosis: Theory and Emerging Immunotherapies / A. Bar-Or, M.P. Pender, R. Khanna [et al.]. // *Trends Mol Med*. – 2020. – Vol. 26. – № 3. – P. 296-310. doi: 10.1016/j.molmed.2019.11.003.
28. Behboudi E. Molecular detection of HHV1-5, AAV and HPV in semen specimens and their impact on male fertility / E. Behboudi, T. Mokhtari-Azad, J. Yavarian [et al.]. // *Hum Fertil (Camb)*. – 2019. – Vol. 22. – № 2. – P. 133-138. doi: 10.1080/14647273.2018.1463570.
29. Bjernevik K. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis / K. Bjernevik, M. Cortese, B.C. Healy [et al.]. // *Science*. – 2022. – Vol. 375. – № 6578. – P. 296-301. doi: 10.1126/science.abj8222.
30. Blog Dental Speed. Herpesvírus humano: tipos, manifestações orais e tratamento. – 2012. – URL: [http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1677-38882012000300004](http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-38882012000300004) (дата обращения: 06.10.2024).

31. Bouacida L. Distribution of HCV genotypes in Belgium from 2008 to 2015 / L. Bouacida, V. Suin, V. Hutse [et al.]. // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13. – № 12. – P. e0207584. doi: 10.1371/journal.pone.0207584.
32. Bouare N. Current management of liver diseases and the role of multidisciplinary approach / N. Bouare // *World J Hepatol*. – 2022. – V. 14. – № 11. – P. 1920-1930. doi: 10.4254/wjh.v14.i11.1920.
33. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal Biochem*. – 1976. – Vol. 72. – № 1-2. – P. 248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
34. Bunchorntavakul C. Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus Infections of the Liver / C. Bunchorntavakul, K.R. Reddy // *Gastroenterol Clin North Am*. – 2020. – Vol. 49. – № 2. – P. 331-346. doi: 10.1016/j.gtc.2020.01.008.
35. Byrne C.M. Increased oral Epstein-Barr virus shedding with HIV-1 co-infection is due to a combination of B cell activation and impaired cellular immune control / C.M. Byrne, C. Johnston, J. Orem [et al.]. // *bioRxiv*. – 2019. – P. 587063. doi: 10.1101/587063.
36. Campbell M. KSHV Topologically Associating Domains in Latent and Reactivated Viral Chromatin / M. Campbell, C. Chantaravong, Y. Yanagihashi [et al.]. // *J Virol*. – 2022. – Vol. 96. – № 14. – P. e0056522. doi: 10.1128/jvi.00565-22.
37. Cannarella R. Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility / R. Cannarella, R.A. Condorelli, L.M. Mongioi [et al.]. // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol. 21. – № 5. – P. 1728. doi: 10.3390/ijms21051728.
38. Carlsen E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years / E. Carlsen, A. Giwercman, N. Keiding [et al.]. // *BMJ*. – 1992. – Vol. 305. – № 6854. – P. 609-613. doi: 10.1136/bmj.305.6854.609.
39. Casco A. EBV Reactivation from Latency Is a Degrading Experience for the Host / A. Casco, E. Johannsen // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15. – № 3. – P. 726. doi: 10.3390/v15030726.
40. Cesarman E. KSHV/HHV8-mediated hematologic diseases / E. Cesarman, A. Chadburn, P.G. Rubinstein // *Blood*. – 2022. – Vol. 139. – № 7. – P. 1013-1025. doi: 10.1182/blood.2020005470.

41. Chapenko S. Co-infection of two beta-herpesviruses (CMV and HHV-7) as an increased risk factor for 'CMV disease' in patients undergoing renal transplantation / S. Chapenko, I. Folkmane, V. Tomsone [et al.]. // *Clin Transplant.* – 2000. – Vol. 14. – № 5. – P. 486-492. doi: 10.1034/j.1399-0012.2000.140507.x.
42. Chen T. Positive Epstein-Barr virus detection in coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients / T. Chen, J. Song, H. Liu [et al.]. // *Sci Rep.* – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 10902. doi: 10.1038/s41598-021-90351-y.
43. Cheng A.V. Signed, Sealed, Delivered: Conjugate and Prodrug Strategies as Targeted Delivery Vectors for Antibiotics / A.V. Cheng, W.M. Wuest // *ACS Infect Dis.* – 2019. – Vol. 5. – № 6. – P. 816-828. doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00019.
44. Clemens J.Q. Urologic chronic pelvic pain syndrome: insights from the MAPP Research Network / J.Q. Clemens, C. Mullins, A.L. Ackerman [et al.]. // *Nat Rev Urol.* – 2019. – Vol. 16. – № 3. – P. 187-200. doi: 10.1038/s41585-018-0135-5.
45. Cohen J.I. Primary Immunodeficiencies Associated with EBV Disease / J.I. Cohen // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2015. – Vol. 390. – № Pt 1. – P. 241-265. doi: 10.1007/978-3-319-22822-8\_10.
46. Coker T.J. Acute Bacterial Prostatitis: Diagnosis and Management / T.J. Coker, D.M. Dierfeldt // *Am Fam Physician.* – 2016. – Vol. 93. – № 2. – P. 114-120.
47. Cole S. Herpes Simplex Virus: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment / S. Cole // *Nurs Clin North Am.* – 2020. – Vol. 55. – № 3. – P. 337-345. doi: 10.1016/j.cnur.2020.05.004.
48. Collins-McMillen D. Molecular Determinants and the Regulation of Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation / D. Collins-McMillen, J. Buehler, M. Peppenelli [et al.]. // *Viruses.* – 2018. – Vol. 10. – № 8. – P. 444. doi: 10.3390/v10080444.
49. Connolly S.A. The structural basis of herpesvirus entry / S.A. Connolly, T.S. Jardetzky, R. Longnecker // *Nat Rev Microbiol.* – 2021. – Vol. 19. – № 2. – P. 110-121. doi: 10.1038/s41579-020-00448-w.
50. Crawford L.B. Hematopoietic stem cells and betaherpesvirus latency / L.B. Crawford // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2023. – Vol. 13. – P. 1189805. doi: 10.3389/fcimb.2023.1189805.

51. Crimi S. Herpes Virus, Oral Clinical Signs and QoL: Systematic Review of Recent Data / S. Crimi, L. Fiorillo, A. Bianchi [et al.]. // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11. – № 5. – P. 463. doi: 10.3390/v11050463.
52. Crosslin D.R. Genetic variation in the HLA region is associated with susceptibility to herpes zoster / D.R. Crosslin, D.S. Carrell, A. Burt [et al.]. // *Genes Immun*. – 2015. – Vol. 16. – № 1. – P. 1-7. doi: 10.1038/gene.2014.51.
53. Cui F. Global reporting of progress towards elimination of hepatitis B and hepatitis C / F. Cui, S. Blach, Manzenigo C. Mingiedi [et al.]. // *Lancet Gastroenterol Hepatol*. – 2023. – Vol. 8. – № 4. – P. 332-342. doi: 10.1016/S2468-1253(22)00386-7.
54. Cui J. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses / J. Cui, F. Li, Z.L. Shi // *Nat Rev Microbiol*. – 2019. – Vol. 17. – № 3. – P. 181-192. doi: 10.1038/s41579-018-0118-9.
55. Current ICTV Taxonomy Release. Taxonomy Browser. – 2022. – URL: <https://ictv.global/taxonomy> (дата обращения: 06.10.2024).
56. Dawson G.J. The potential role of HCV core antigen testing in diagnosing HCV infection / G.J. Dawson // *Antivir Ther*. – 2012. – Vol. 17. – № 7 Pt B. – P. 1431-1435. doi: 10.3851/IMP2463.
57. Dellinger A. Application of fullerenes in nanomedicine: an update / A. Dellinger, Z. Zhou, J. Connor [et al.]. // *Nanomedicine (Lond)*. – 2013. – Vol. 8. – № 7. – P. 1191-1208. doi: 10.2217/nmm.13.99.
58. Deng S.Q. Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China / S.Q. Deng, H.J. Peng // *J Clin Med*. – 2020. – Vol. 9. – № 2. – P. 575. doi: 10.3390/jcm9020575.
59. Depledge D.P. Molecular Aspects of Varicella-Zoster Virus Latency / D.P. Depledge, T. Sadaoka, W.J.D. Ouwendijk // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10. – № 7. – P. 349. doi: 10.3390/v10070349.
60. Draganova E.B. The Ins and Outs of Herpesviral Capsids: Divergent Structures and Assembly Mechanisms across the Three Subfamilies / E. B. Draganova, J. Valentin, E.E. Heldwein // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – № 10. – P. 1913. doi: 10.3390/v13101913.

61. Dreesen E. Pharmacodynamic Monitoring of Biological Therapies in Chronic Inflammatory Diseases / E. Dreesen, A. Gils // *Ther Drug Monit.* – 2019. – Vol. 41. – № 2. – P. 131-141. doi: 10.1097/FTD.0000000000000571.
62. Dominguez S. Sex Differences in the Phosphoproteomic Profiles of APP/PS1 Mice after Chronic Unpredictable Mild Stress / S. Dominguez, G. Rodriguez, H. Fazelinia [et al.]. // *J Alzheimers Dis.* – 2020. – Vol. 74. – №. 4. – P. 1131-1142. doi: 10.3233/JAD-191009.
63. Dupont L. Cytomegalovirus latency and reactivation: recent insights into an age old problem / L. Dupont, M.B. Reeves // *Rev Med Virol.* – 2016. – Vol. 26. – № 2. – P. 75-89. doi: 10.1002/rmv.1862.
64. Dursun R. The clinics of HHV-6 infection in COVID-19 pandemic: Pityriasis rosea and Kawasaki disease / R. Dursun, S.A. Temiz // *Dermatol Ther.* – 2020. – Vol. 33. – № 4. – P. e13730. doi 10.1111/dth.13730.
65. European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018 / European Association for the Study of the Liver // *J Hepatol.* – 2018. – Vol. 69. – № 2. – P. 461-511. doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.026.
66. Fathy R.A. Varicella-zoster and herpes simplex virus reactivation post-COVID-19 vaccination: a review of 40 cases in an International Dermatology Registry / R.A. Fathy, D.E. McMahon, C. Lee [et al.]. // *J Eur Acad Dermatol Venereol.* – 2022. – Vol. 36. – № 1. – P. e6-e9. doi: 10.1111/jdv.17646.
67. Ferreira A. COVID-19 and herpes zoster co-infection presenting with trigeminal neuropathy / A. Ferreira, T.T. Romao, Y.S. Macedo [et al.]. // *Eur J Neurol.* – 2020. – Vol. 27. – № 9. – P. 1748-1750. doi: 10.1111/ene.14361.
68. Flores O. Mutational inactivation of herpes simplex virus 1 microRNAs identifies viral mRNA targets and reveals phenotypic effects in culture / O. Flores, S. Nakayama, A.W. Whisnant [et al.]. // *J Virol.* – 2013. – Vol. 87. – № 12. – P. 6589-6603. doi: 10.1128/JVI.00504-13.
69. Freeman M.L. Partners in Crime: The Role of CMV in Immune Dysregulation and Clinical Outcome During HIV Infection / M.L. Freeman, M.M. Lederman, S. Gianella //

Curr HIV/AIDS Rep. – 2016. – Vol. 13. – № 1. – P. 10-19. doi: 10.1007/s11904-016-0297-9.

70. Fugl A. Epstein-Barr virus and its association with disease - a review of relevance to general practice / A. Fugl, C.L. Andersen // BMC Fam Pract. – 2019. – Vol. 20. – № 1. – P. 62. doi: 10.1186/s12875-019-0954-3.

71. Garg R.K. Spectrum of neurological complications following COVID-19 vaccination / R.K. Garg, V.K. Paliwal // Neurol Sci. – 2022. – Vol. 43. – № 1. – P. 3-40. doi: 10.1007/s10072-021-05662-9.

72. Gatherer D. ICTV Virus Taxonomy Profile: Herpesviridae 2021 / D. Gatherer, D.P. Depledge, C.A. Hartley [et al.]. // J Gen Virol. – 2021. – Vol. 102. – № 10. – P. 001673. doi: 10.1099/jgv.0.001673.

73. Gershon A.A. Varicella zoster virus infection / A.A. Gershon, J. Breuer, J.I. Cohen [et al.]. // Nat Rev Dis Primers. – 2015. – Vol. 1. – P. 15016. doi: 10.1038/nrdp.2015.16.

74. Ghanem H. Prevalence of Epstein-Barr virus infection in Hepatitis C / H. Ghanem, S. Shoman, M. Nabil [et al.]. // Egyptian Academic Journal of Biological Sciences G Microbiology – 2014. – Vol. 6. – №. 1. – P. 29-36. doi: 10.21608/eajbsg.2014.16627.

75. Gianella S. Cytomegalovirus and HIV: A Dangerous Pas de Deux / S. Gianella, S. Letendre // J Infect Dis. – 2016. – Vol. 214. – № suppl 2. – P. S67- S74. doi: 10.1093/infdis/jiw217.

76. Goodman Z.D. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases / Z.D. Goodman // J Hepatol. – 2007. – Vol. 47. – № 4. – P. 598-607. doi: 10.1016/j.jhep.2007.07.006.

77. Guan W.J. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China / W.J. Guan, Z.Y. Ni, Y. Hu [et al.]. // N Engl J Med. – 2020. – Vol. 382. – № 18. – P. 1708-1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032.

78. Gupta E. Role of non-hepatotropic viruses in acute sporadic viral hepatitis and acute-on-chronic liver failure in adults / E. Gupta, N. Ballani, M. Kumar [et al.]. // Indian J Gastroenterol. – 2015. – Vol. 34, № 6. – P. 448-452. doi: 10.1007/s12664-015-0613-0.

79. Hashim P.W. Nanoparticles in dermatologic surgery / P.W. Hashim, J.K. Nia, G. Han [et al.]. // *J Am Acad Dermatol.* – 2020. – Vol. 83. – № 4. – P. 1144-1149. doi: 10.1016/j.jaad.2019.04.020.
80. Hernandez J.M. SARS-CoV-2 Infection (COVID-19) and Herpes Simplex Virus-1 Conjunctivitis: Concurrent Viral Infections or a Cause-Effect Result? / J.M. Hernandez, H. Singam, A. Babu [et al.]. // *Cureus.* – 2021. – Vol. 13. – № 1. – P. e12592. doi: 10.7759/cureus.12592.
81. Herrscher C. Hepatitis B Virus Entry into Cells / C. Herrscher, P. Roingard, E. Blanchard // *Cells.* – 2020. – Vol. 9. – № 6. – P. 1486. doi: 10.3390/cells9061486.
82. Hirsiger J.R. Syphilis Reactivates Latent Epstein-Barr Virus Reservoir via Toll-Like Receptor 2 and B-Cell Receptor Activation / J.R. Hirsiger, P.S. Fuchs, P. Hausermann [et al.]. // *Open Forum Infect Dis.* – 2019. – Vol. 6. – № 9. – P. ofz317. doi: 10.1093/ofid/ofz317.
83. Hosseini N. Alcoholic Hepatitis: A Review / N. Hosseini, J. Shor, G. Szabo // *Alcohol Alcohol.* – 2019. – Vol. 54. – № 4. – P. 408-416. doi: 10.1093/alcalc/agz036.
84. Houen G. Epstein-Barr Virus and Systemic Autoimmune Diseases / G. Houen, N.H. Trier // *Front Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 587380. doi: 10.3389/fimmu.2020.587380.
85. Hubscher S.G. Epstein-Barr virus in inflammatory diseases of the liver and liver allografts: an in situ hybridization study / S.G. Hubscher, A. Williams, S.M. Davison [et al.]. // *Hepatology.* – 1994. – Vol. 20. – № 4 Pt 1. – P. 899-907. doi: 10.1002/hep.1840200419.
86. Humar A. An assessment of interactions between hepatitis C virus and herpesvirus reactivation in liver transplant recipients using molecular surveillance / A. Humar, K. Washburn, R. Freeman [et al.]. // *Liver Transpl.* – 2007. – Vol. 13. – № 10. – P. 1422-1427. doi: 10.1002/lt.21266.
87. Innocenzi P. Carbon-based antiviral nanomaterials: graphene, C-dots, and fullerenes. A perspective / P. Innocenzi, L. Stagi // *Chem Sci.* – 2020. – Vol. 11. – № 26. – P. 6606-6622. doi: 10.1039/d0sc02658a.

88. Iqbal B. COVID-19-Related Pleural Diseases / B. Iqbal, N.M. Rahman, R.J. Hallifax // *Semin Respir Crit Care Med.* – 2023. – Vol. 44. – № 4. – P. 437-446. doi: 10.1055/s-0043-1769616.
89. Jahromi B.N. Prevalence of Cytomegalovirus in Semen of Male Partners of Infertile Couples and the Virus Impact on Sperm Parameters / B.N. Jahromi, R. Yaghibi, N. Matlub [et al.]. // *J Reprod Infertil.* – 2020. – Vol. 21. – № 2. – P. 124-129.
90. Kanda T. Epstein-Barr virus strain variation and cancer / T. Kanda, M. Yajima, K. Ikuta // *Cancer Sci.* – 2019. – Vol. 110. – № 4. – P. 1132-1139. doi: 10.1111/cas.13954.
91. Kang M.S. Epstein-Barr virus latent genes / M.S. Kang, E. Kieff // *Exp Mol Med.* – 2015. – Vol. 47. – № 1. – P. e131. doi: 10.1038/emm.2014.84.
92. Karakus U. Propagation and Titration of Influenza Viruses / U. Karakus, M. Cramer, C. Lanz [et al.]. // *Methods Mol Biol.* – 2018. – Vol. 1836. – P. 59-88. doi: 10.1007/978-1-4939-8678-1\_4.
93. Katz J. Herpes simplex and herpes zoster viruses in COVID-19 patients / J. Katz, S. Yue, W. Xue // *Ir J Med Sci.* – 2022. – Vol. 191. – № 3. – P. 1093-1097. doi: 10.1007/s11845-021-02714-z.
94. Kempkes B. Epstein-Barr virus latency: current and future perspectives / B. Kempkes, E.S. Robertson // *Curr Opin Virol.* – 2015. – Vol. 14. – P. 138-144. doi: 10.1007/s11845-021-02714-z.
95. Kennedy P.G. A comparison of herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus latency and reactivation / P.G. Kennedy, J. Rovnak, H. Badani [et al.]. // *J Gen Virol.* – 2015. – Vol. 96. – № Pt 7. – P. 1581-1602. doi: 10.1099/vir.0.000128.
96. Khandazhinskaya A.L. Dual-targeted anti-CMV/anti-HIV-1 heterodimers / A.L. Khandazhinskaya, V. Mercurio, A.A. Maslova [et al.]. // *Biochimie.* – 2021. – Vol. 189. – P. 169-180. doi: 10.1016/j.biochi.2021.06.011/
97. Khattak A.S. Contemporary Management of Chronic Prostatitis / A.S. Khattak, N. Raison, A. Hawazie [et al.]. // *Cureus.* – 2021. – Vol. 13. – № 12. – P. e20243. doi: 10.7759/cureus.20243.
98. Kim J. Photosensitized production of singlet oxygen via C60 fullerene covalently attached to functionalized silica-coated stainless-steel mesh: remote bacterial and viral

inactivation / J. Kim, H. Lee, J.Y. Lee [et al.]. // *Applied Catalysis B: Environmental*. – 2020. – Vol. 270. – P. 118862. doi: 10.1016/j.apcatb.2020.118862.

99. Kirtipal N. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses / N. Kirtipal, S. Bharadwaj, S.G. Kang // *Infect Genet Evol.* – 2020. – Vol. 85. – P. 104502. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104502.

100. Klimova R. Aqueous fullerene C60 solution suppresses herpes simplex virus and cytomegalovirus infections / R. Klimova, S. Andreev, E. Momotyuk [et al.]. // *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures*. – 2020. – Vol. 28. – №. 6. – P. 487-499. doi: 10.1080/1536383X.2019.1706495.

101. Knipe D.M. *Fields Virology sixth edition*. / D.M. Knipe, P.M. Howley – Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, 2582 p.

102. Knipe D.M. Nuclear sensing of viral DNA, epigenetic regulation of herpes simplex virus infection, and innate immunity / D.M. Knipe // *Virology*. – 2015. – Vol. 479. – P. 153-159. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.009.

103. Komijani M. Association of Herpes simplex virus I&II infections with rs187084 SNP of TLR9 and male infertility / M. Komijani, H.R. Momeni, N. Shaykh-Baygloo [et al.]. // *Andrologia*. – 2021. – Vol. 53. – № 9. – P. e14163. doi: 10.1111/and.14163.

104. Krishna B.A. Advances in the treatment of cytomegalovirus / B.A. Krishna, M.R. Wills, J.H. Sinclair // *Br Med Bull*. – 2019. – Vol. 131. – № 1. – P. 5-17. doi: 10.1093/bmb/ldz031.

105. Lanford R.E. Lack of detection of negative-strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and other extrahepatic tissues by the highly strand-specific rTth reverse transcriptase PCR / R.E. Lanford, D. Chavez, F.V. Chisari [et al.]. // *J Virol*. – 1995. – Vol. 69. – № 12. – P. 8079-8083. doi: 10.1128/JVI.69.12.8079-8083.1995.

106. Levine H. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis of samples collected globally in the 20th and 21st centuries / H. Levine, N. Jorgensen, A. Martino-Andrade [et al.]. // *Hum Reprod Update*. – 2023. – Vol. 29. – № 2. – P. 157-176. doi: 10.1093/humupd/dmac035.

107. Lichtner M. Cytomegalovirus coinfection is associated with an increased risk of severe non-AIDS-defining events in a large cohort of HIV-infected patients / M. Lichtner, P. Cicconi, S. Vita [et al.]. // *J Infect Dis.* – 2015. – Vol. 211. – № 2. – P. 178-186. doi: 10.1093/infdis/jiu417.
108. Ligat G. The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: a close-up view / G. Ligat, R. Cazal, S. Hantz [et al.]. // *FEMS Microbiol Rev.* – 2018. – Vol. 42. – № 2. – P. 137-145. doi: 10.1093/femsre/fuy004.
109. Lindenbach B.D. Virion assembly and release / B.D. Lindenbach // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2013. – Vol. 369. – P. 199-218. doi: 10.1007/978-3-642-27340-7\_8.
110. Lino K. Presence and clinical impact of human herpesvirus-6 infection in patients with moderate to critical coronavirus disease-19 / K. Lino, L.S. Alves, J.V. Raposo [et al.]. // *J Med Virol.* – 2022. – Vol. 94. – № 3. – P. 1212-1216. doi: 10.1002/jmv.27392.
111. Lisco A. Semen of HIV-1-infected individuals: local shedding of herpesviruses and reprogrammed cytokine network / A. Lisco, A. Munawwar, A. Introini [et al.]. // *J Infect Dis.* – 2012. – Vol. 205. – № 1. – P. 97-105. doi: 10.1093/infdis/jir700.
112. Lobo A.M. Pathogenesis of herpes simplex keratitis: The host cell response and ocular surface sequelae to infection and inflammation / A.M. Lobo, A.M. Agelidis, D. Shukla // *Ocul Surf.* – 2019. – Vol. 17. – № 1. – P. 40-49. doi: 10.1016/j.jtos.2018.10.002.
113. Lovati C. Diagnosing herpes simplex-1 encephalitis at the time of COVID-19 pandemic / C. Lovati, M. Osio, L. Pantoni // *Neurol Sci.* – 2020. – Vol. 41. – № 6. – P. 1361-1364. doi: 10.1007/s10072-020-04461-y.
114. Lu X. SARS-CoV-2 Infection in Children / X. Lu, L. Zhang, H. Du [et al.]. // *N Engl J Med.* – 2020. – Vol. 382. – № 17. – P. 1663-1665. doi: 10.1056/NEJMc2005073.
115. Lucar O. A Natural Impact: NK Cells at the Intersection of Cancer and HIV Disease / O. Lucar, R.K. Reeves, S. Jost // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1850. doi: 10.3389/fimmu.2019.01850.
116. Maillet F. Cytomegalovirus proctitis as a complication of COVID-19 with immunosuppressive treatments / F. Maillet, A. Pourbaix, D. le Pluart [et al.]. // *IDCases.* – 2021. – Vol. 24. – P. e01111. doi: 10.1016/j.idcr.2021.e01111.

117. Majtanova N. Herpes Simplex Keratitis in Patients with SARS-CoV-2 Infection: A Series of Five Cases / N. Majtanova, P. Kriskova, P. Keri [et al.]. // *Medicina (Kaunas)*. – 2021. – Vol. 57. – № 5. – P. 412. doi: 10.3390/medicina57050412.
118. Manicklal S. The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus / S. Manicklal, V.C. Emery, T. Lazzarotto [et al.]. // *Clin Microbiol Rev.* – 2013. – Vol. 26. – № 1. – P. 86-102. doi: 10.1128/CMR.00062-12.
119. Maple P.A.C. COVID-19, SARS-CoV-2 Vaccination, and Human Herpesviruses Infections / P.A.C. Maple // *Vaccines (Basel)*. – 2023. – Vol. 11. – № 2. – P. 232. doi: 10.3390/vaccines11020232.
120. Markan A. Oral valganciclovir in human immunodeficiency virus-positive patients suffering from cytomegalovirus retinitis at a tertiary care hospital in North India / A. Markan, N. Gupta, M. Dogra [et al.]. // *Indian J Ophthalmol.* – 2022. – Vol. 70. – № 7. – P. 2472-2475. doi: 10.4103/ijo.IJO\_2787\_21.
121. McElwee M. Structure of the herpes simplex virus portal-vertex / M. McElwee, S. Vijayakrishnan, F. Rixon [et al.]. // *PLoS Biol.* – 2018. – Vol. 16. – № 6. – P. e2006191. doi: 10.1371/journal.pbio.2006191.
122. McQuillan G. Prevalence of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 in Persons Aged 14-49: United States, 2015-2016 / G. McQuillan, D. Kruszon-Moran, E.W. Flagg [et al.]. // *NCHS Data Brief.* – 2018. – № 304. – P. 1-8.
123. Mehta P. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression / P. Mehta, D.F. McAuley, M. Brown [et al.]. // *Lancet.* – 2020. – Vol. 395. – № 10229. – P. 1033-1034. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0.
124. Mousavi S.Z. Fullerene nanoparticle in dermatological and cosmetic applications / S.Z. Mousavi, S. Nafisi, H.I. Maibach // *Nanomedicine.* – 2017. – Vol. 13. – № 3. – P. 1071-1087. doi: 10.1016/j.nano.2016.10.002.
125. Naumenko V. Detection and quantification of human herpes viruses types 4-6 in sperm samples of patients with fertility disorders and chronic inflammatory urogenital tract diseases / V. Naumenko, Y. Tyulenev, L. Kurilo [et al.]. // *Andrology.* – 2014. – Vol. 2. – № 5. – P. 687-694. doi: 10.1111/j.2047-2927.2014.00232.x.

126. Naumenko V.A. Detection of human cytomegalovirus in motile spermatozoa and spermatogenic cells in testis organotypic culture / V.A. Naumenko, Y.A. Tyulenev, S.A. Yakovenko [et al.]. // *Herpesviridae*. – 2011. – Vol. 2. – № 1. – P. 7. doi: 10.1186/2042-4280-2-7.
127. Navarro-Bielsa A. COVID-19 infection and vaccines: potential triggers of Herpesviridae reactivation / A. Navarro-Bielsa, T. Gracia-Cazana, B. Aldea-Manrique [et al.]. // *An Bras Dermatol*. – 2023. – Vol. 98. – № 3. – P. 347-354. doi: 10.1016/j.abd.2022.09.004.
128. Nickel J.C. Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: it is time to change our management and research strategy / J.C. Nickel // *BJU Int*. – 2020. – Vol. 125. – № 4. – P. 479-480. doi: 10.1111/bju.15036.
129. Nicoll M.P. The molecular basis of herpes simplex virus latency / M.P. Nicoll, J.T. Proenca, S. Efstathiou // *FEMS Microbiol Rev*. – 2012. – Vol. 36. – № 3. – P. 684-705. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00320.x.
130. Nisoh N. Formation of aggregates, icosahedral structures and percolation clusters of fullerenes in lipids bilayers: The key role of lipid saturation / N. Nisoh, V. Jarerattanachai, M. Karttunen [et al.]. // *Biochim Biophys Acta Biomembr*. – 2020. – Vol. 1862. – № 9. – P. 183328. doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183328.
131. Ohno O. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a / O. Ohno, M. Mizokami, R.R. Wu [et al.]. // *J Clin Microbiol*. – 1997. – Vol. 35. – № 1. – P. 201-207. doi: 10.1128/jcm.35.1.201-207.1997.
132. Oualim S. A misleading CMV myocarditis during the COVID-19 pandemic: case report / S. Oualim, A. Elouarradi, S. Hafid [et al.]. // *Pan Afr Med J*. – 2020. – Vol. 36. – P. 167. doi: 10.11604/pamj.2020.36.167.23922.
133. Paeschke R. DSTP-27 prevents entry of human cytomegalovirus / R. Paeschke, I. Woskobojnik, V. Makarov [et al.]. // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2014. – Vol. 58. – № 4. – P. 1963-1971. doi: 10.1128/AAC.01964-13.

134. Pantry S.N. Latency, Integration, and Reactivation of Human Herpesvirus-6 / S.N. Pantry, P.G. Medveczky // *Viruses*. – 2017. – Vol. 9. – № 7. – P. 194. doi: 10.3390/v9070194.
135. Pischke S. High intrahepatic HHV-6 virus loads but neither CMV nor EBV are associated with decreased graft survival after diagnosis of graft hepatitis / S. Pischke, J. Gosling, I. Engelmann [et al.]. // *J Hepatol*. – 2012. – Vol. 56. – № 5. – P. 1063-1069. doi: 10.1016/j.jhep.2011.12.017.
136. Plotkin S.A. Vaccination against the human cytomegalovirus / S.A. Plotkin, S.B. Boppana // *Vaccine*. – 2019. – Vol. 37. – № 50. – P. 7437-7442. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.02.089.
137. Poorvashree J. Novel drug delivery of dual acting prodrugs of hydroxychloroquine with aryl acetic acid NSAIDs: Design, kinetics and pharmacological study / J. Poorvashree, D. Suneela // *Drug Deliv Transl Res*. – 2017. – Vol. 7. – № 5. – P. 709-730. doi: 10.1007/s13346-017-0420-5.
138. Qin Z. Acupuncture for Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome: A GRADE-assessed Systematic Review and Meta-analysis / Z. Qin, J. Guo, H. Chen [et al.]. // *Eur Urol Open Sci*. – 2022. – Vol. 46. – P. 55-67. doi: 10.1016/j.euros.2022.10.005.
139. Qin Z. Oral pharmacological treatments for chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: A systematic review and network meta-analysis of randomised controlled trials / Z. Qin, C. Zhang, J. Guo [et al.]. // *EClinicalMedicine*. – 2022. – Vol. 48. – P. 101457. doi: 10.1016/j.eclinm.2022.101457.
140. Razavi H. Global Epidemiology of Viral Hepatitis / H. Razavi // *Gastroenterol Clin North Am*. – 2020. – Vol. 49. – № 2. – P. 179-189. doi: 10.1016/j.gtc.2020.01.001.
141. Rechenchoski D.Z. Herpesvirus: an underestimated virus / D.Z. Rechenchoski, L.C. Faccin-Galhardi, R.E.C. Linhares [et al.]. // *Folia Microbiol (Praha)*. – 2017. – Vol. 62. – № 2. – P. 151-156. doi: 10.1007/s12223-016-0482-7.
142. Reddehase M.J. Cellular reservoirs of latent cytomegaloviruses / M.J. Reddehase, N.A.W. Lemmermann // *Med Microbiol Immunol*. – 2019. – Vol. 208. – № 3-4. – P. 391-403. doi: 10.1007/s00430-019-00592-y.

143. Rock D.L. Detection of latency-related viral RNAs in trigeminal ganglia of rabbits latently infected with herpes simplex virus type 1 / D.L. Rock, A.B. Nesburn, H. Ghiasi [et al.]. // *J Virol.* – 1987. – Vol. 61. – № 12. – P. 3820-3826. doi: 10.1128/JVI.61.12.3820-3826.1987.
144. Saijo M. Effects of acyclovir, oxetanocin-G, and carbocyclic oxetanocin-G in combinations on the replications of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Vero cells / M. Saijo, T. Suzutani, I. Yoshida // *Tohoku J Exp Med.* – 1992. – Vol. 167. – № 1. – P. 57-68. doi: 10.1620/tjem.167.57.
145. Sawtell N.M. Alphaherpesvirus Latency and Reactivation with a Focus on Herpes Simplex Virus / N.M. Sawtell, R.L. Thompson // *Curr Issues Mol Biol.* – 2021. – Vol. 41. – № 1. – P. 267-356. doi: 10.21775/cimb.041.267.
146. Schalkwijk H.H. A Herpes Simplex virus 1 DNA Polymerase Multidrug Resistance Mutation Identified in an Immunocompromised Patient - Confirmed by Gene Editing / H.H. Schalkwijk, A. Georgala, S. Gillemot [et al.]. // *J Infect Dis.* – 2023. – Vol. 228. – № 11. – P. 1505-1515. doi: 10.1093/infdis/jiad184.
147. Schnittman S.R. Cytomegalovirus Immunoglobulin G (IgG) Titer and Coronary Artery Disease in People With Human Immunodeficiency Virus (HIV) / S.R. Schnittman, M.T. Lu, T. Mayrhofer [et al.]. // *Clin Infect Dis.* – 2023. – Vol. 76. – № 3. – P. e613-e621. doi: 10.1093/cid/ciac662.
148. Schulz U. CMV Immunoglobulins for the Treatment of CMV Infections in Thoracic Transplant Recipients / U. Schulz, P. Solidoro, V. Muller [et al.]. // *Transplantation.* – 2016. – Vol. 100. – P. S5- S10. doi: 10.1097/TP.0000000000001097.
149. Schwartz M. Rethinking human cytomegalovirus latency reservoir / M. Schwartz, N. Stern-Ginossar // *Ann N Y Acad Sci.* – 2023. – Vol. 1524. – № 1. – P. 30-36. doi: 10.1111/nyas.14994.
150. Seessle J. High rate of HSV-1 reactivation in invasively ventilated COVID-19 patients: Immunological findings / J. Seessle, T. Hippchen, P. Schnitzler [et al.]. // *PLoS One.* – 2021. – Vol. 16. – № 7. – P. e0254129. doi: 10.1371/journal.pone.0254129.
151. Sezgin E. Host Genetics of Cytomegalovirus Pathogenesis / E. Sezgin, P. An, C.A. Winkler // *Front Genet.* – 2019. – Vol. 10. – P. 616. doi: 10.3389/fgene.2019.00616.

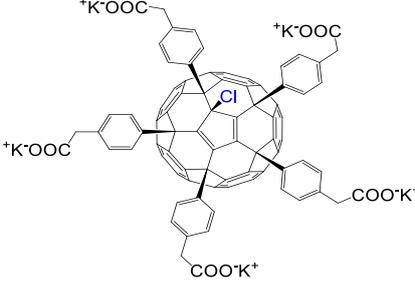
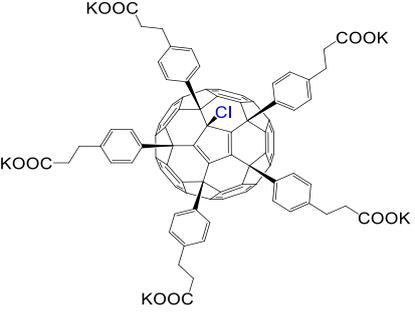
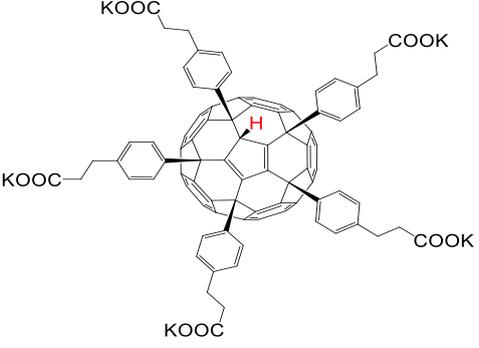
152. Sharma A. Male infertility due to testicular disorders / A. Sharma, S. Minhas, W.S. Dhillon [et al.]. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2021. – Vol. 106. – № 2. – P. e442-e459. doi: 10.1210/clinem/dgaa781.
153. Simonnet A. High incidence of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human-herpes virus-6 reactivations in critically ill patients with COVID-19 / A. Simonnet, I. Engelmann, A.S. Moreau [et al.]. // *Infect Dis Now.* – 2021. – Vol. 51. – № 3. – P. 296-299. doi: 10.1016/j.idnow.2021.01.005.
154. Singh N. Herpes Simplex Virus Latency Is Noisier the Closer We Look / N. Singh, D.C. Tschärke // *J Virol.* – 2020. – Vol. 94. – № 4. – P. e01701- e01719. doi: 10.1128/JVI.01701-19.
155. StatPearls [Internet]. Male Infertility. – 2023. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32965929/> (дата обращения: 06.10.2024).
156. StatPearls [Internet]. OSHA Bloodborne Pathogen Standards. – 2023. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570561/> (дата обращения: 06.10.2024).
157. StatPearls [Internet]. Viral Hepatidities. – 2023. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556029/> (дата обращения: 06.10.2024).
158. Stedman W. ORC, MCM, and histone hyperacetylation at the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent replication origin / W. Stedman, Z. Deng, F. Lu [et al.]. // *J Virol.* – 2004. – Vol. 78. – № 22. – P. 12566-12575. doi: 10.1128/JVI.78.22.12566-12575.2004.
159. Szamatowicz M. Proven and unproven methods for diagnosis and treatment of infertility / M. Szamatowicz, J. Szamatowicz // *Adv Med Sci.* – 2020. – Vol. 65. – № 1. – P. 93-96. doi: 10.1016/j.advms.2019.12.008.
160. Tavenier J. T-cell immunity against cytomegalovirus in HIV infection and aging: relationships with inflammation, immune activation, and frailty / J. Tavenier, J.B. Margolick, S.X. Leng // *Med Microbiol Immunol.* – 2019. – Vol. 208. – № 3-4. – P. 289-294. doi: 10.1007/s00430-019-00591-z.
161. Tirpak F. Exogenous Factors Affecting the Functional Integrity of Male Reproduction / F. Tirpak, H. Greifova, N. Lukac [et al.]. // *Life (Basel).* – 2021. – Vol. 11. – № 3. – P. 213. doi: 10.3390/life11030213.

162. Trepo C. Hepatitis B virus infection / C. Trepo, H.L. Chan, A. Lok // *Lancet*. – 2014. – Vol. 384. – № 9959. – P. 2053-2063. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60220-8.
163. Tu Z. Hepatitis C virus core protein subverts the antiviral activities of human Kupffer cells / Z. Tu, R.H. Pierce, J. Kurtis [et al.]. // *Gastroenterology*. – 2010. – Vol. 138. – № 1. – P. 305-314. doi: 10.1053/j.gastro.2009.09.009.
164. Uo M. Toxicity evaluations of various carbon nanomaterials / M. Uo, T. Akasaka, F. Watari [et al.]. // *Dent Mater J*. – 2011. – Vol. 30. – № 3. – P. 245-263. doi: 10.4012/dmj.2010-039.
165. Vojdani A. Persistent SARS-CoV-2 Infection, EBV, HHV-6 and Other Factors May Contribute to Inflammation and Autoimmunity in Long COVID / A. Vojdani, E. Vojdani, E. Saidara [et al.]. // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15. – № 2. – P. 400. doi: 10.3390/v15020400.
166. Wang F. A bibliometric analysis of inflammatory bowel disease and COVID-19 researches / F. Wang, J. Xie, H. Xiong [et al.]. // *Front Public Health*. – 2023. – Vol. 11. – P. 1039782. doi: 10.3389/fpubh.2023.1039782.
167. Webb K.B. The diagnosis of dioxin-associated illness / K.B. Webb, S.M. Ayres, J. Mikes [et al.]. // *Am J Prev Med*. – 1986. – Vol. 2. – № 2. – P. 103-108.
168. Weidner-Glunde M M. Herpesviral Latency-Common Themes / M. Weidner-Glunde, E. Kruminis-Kaszkiel, M. Savanagouder // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9. – № 2. – P. 125.
169. Westbrook R.H. Natural history of hepatitis C / R.H. Westbrook, G. Dusheiko // *J Hepatol*. – 2014. – Vol. 61. – № 1. – P. S58-S68. doi: 10.3390/pathogens9020125.
170. Wu Z. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention / Z. Wu, J.M. McGoogan // *JAMA*. – 2020. – Vol. 323. – № 13. – P. 1239-1242. doi: 10.1001/jama.2020.2648.
171. Xu R. Co-reactivation of the human herpesvirus alpha subfamily (herpes simplex virus-1 and varicella zoster virus) in a critically ill patient with COVID-19 / R. Xu, Y. Zhou, L. Cai [et al.]. // *Br J Dermatol*. – 2020. – Vol. 183. – № 6. – P. 1145-1147. doi: 10.1111/bjd.19484.

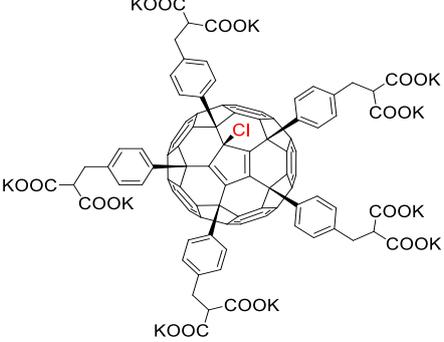
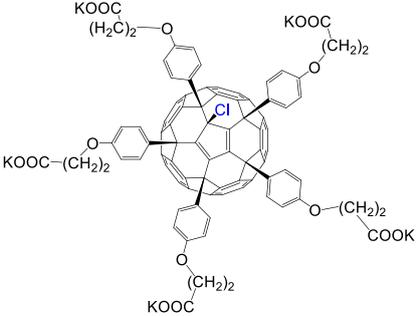
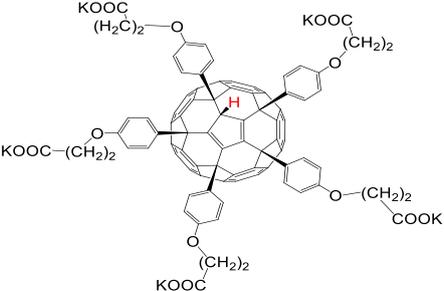
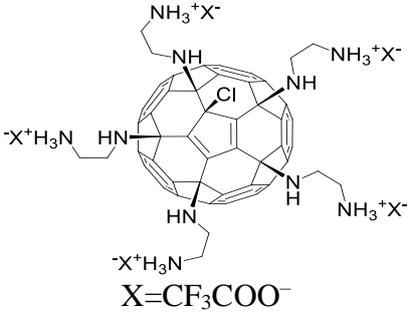
172. Yamamoto T. Similarity and difference between palmoplantar pustulosis and pustular psoriasis / T. Yamamoto // *J Dermatol.* – 2021. – Vol. 48. – № 6. – С. 750-760. doi: 10.1111/1346-8138.15826.
173. Yanez A.A. Neurotrophic Factors NGF, GDNF and NTN Selectively Modulate HSV1 and HSV2 Lytic Infection and Reactivation in Primary Adult Sensory and Autonomic Neurons / A.A. Yanez, T. Harrell, H.J. Sriranganathan [et al.]. // *Pathogens.* – 2017. – Vol. 6. – № 1. – P. 5. doi: 10.3390/pathogens6010005.
174. Yindom L.M. Unexpectedly High Prevalence of Cytomegalovirus DNAemia in Older Children and Adolescents With Perinatally Acquired Human Immunodeficiency Virus Infection / L.M. Yindom, V. Simms, E.D. Majonga [et al.]. // *Clin Infect Dis.* – 2019. – Vol. 69. – № 4. – P. 580-587. doi: 10.1093/cid/ciy961.
175. Yu H. Epstein-Barr Virus History and Pathogenesis / H. Yu, E.S. Robertson // *Viruses.* – 2023. – Vol. 15. – № 3. – P. 714. doi: 10.3390/v15030714.
176. Yurlov K.I. Human Herpesviruses Increase the Severity of Hepatitis / K.I. Yurlov, O.V. Masalova, L.B. Kisteneva [et al.]. // *Biology (Basel).* – 2021. – Vol. 10. – № 6. – P. 483. doi: 10.3390/biology10060483.
177. Zhang K. The efficacy and safety of *Serenoa repens* extract for the treatment of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial / K. Zhang, R.Q. Guo, S.W. Chen [et al.]. // *World J Urol.* – 2021. – Vol. 39. – № 9. – P. 3489-3495. doi: 10.1007/s00345-020-03577-2.
178. Zhao M. Cytomegalovirus (CMV) infection in HIV/AIDS patients and diagnostic values of CMV-DNA detection across different sample types / M. Zhao, C. Zhuo, Q. Li [et al.]. // *Ann Palliat Med.* – 2020. – Vol. 9. – № 5. – P. 2710-2715. doi: 10.21037/apm-20-1352.

## Приложение А

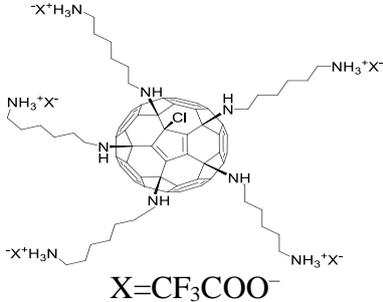
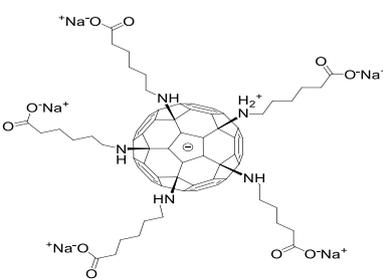
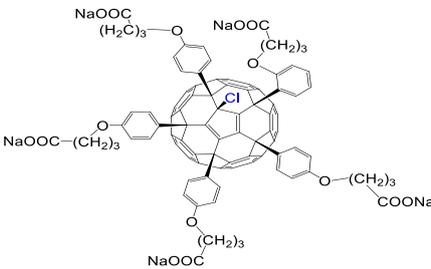
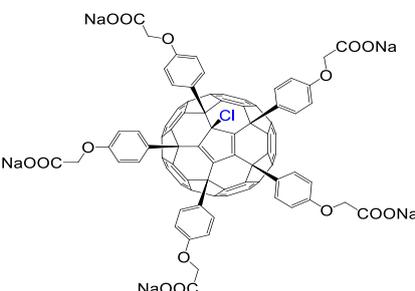
Названия, формулы и молекулярная масса производных фуллерена C<sub>60</sub>Таблица 1 – Названия, формулы и молекулярная масса производных фуллерена C<sub>60</sub>

№	Шифр	Структура	Молекулярная масса
1	ORR-314		1622,25
2	OKR-315		1692.46
3	OKR-346		1657.93

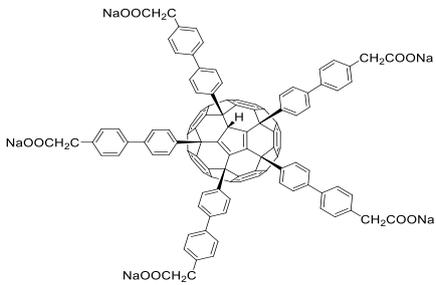
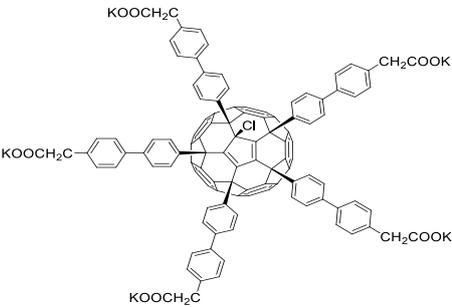
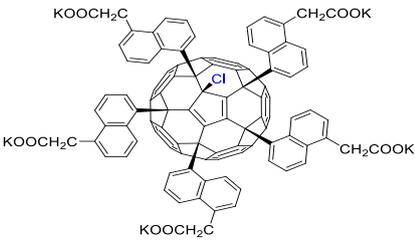
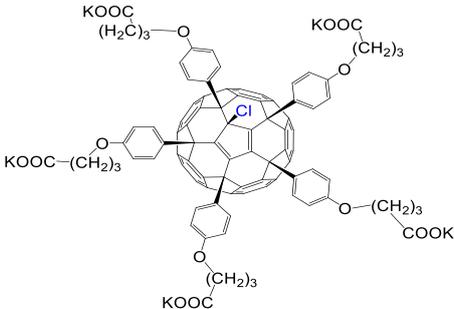
## Продолжение таблицы 1

№	Шифр	Структура	Молекулярная масса
4	OKR-347		1721.98
5	Gi 850k		1772.38
6	Gi 851k		1737.93
7	KB 874	 <p style="text-align: center;"><math>X = \text{CF}_3\text{COO}^-</math></p>	1621,66

## Продолжение таблицы 1

№	Шифр	Структура	Молекулярная масса
8	KB 878	 <p style="text-align: center;"><math>X=CF_3COO^-</math></p>	1902,20
9	Vi 544-2k		1446,7
10	Vi 491		1762,0
11	Vi 510		1621,7

## Продолжение таблицы 1

№	Шифр	Структура	Молекулярная масса
12	Vi 518	 <p>The structure shows a central hydrogen atom coordinated to four nitrogen atoms of a phthalocyanine ring. Four sodium acetate groups are attached to the ring: two via the oxygen atom (NaOOCH<sub>2</sub>C) and two via the methyl group (CH<sub>2</sub>COONa).</p>	1887,7
13	Gi 742	 <p>The structure shows a central chlorine atom coordinated to four nitrogen atoms of a phthalocyanine ring. Four potassium acetate groups are attached to the ring: two via the oxygen atom (KOOCH<sub>2</sub>C) and two via the methyl group (CH<sub>2</sub>COOK).</p>	2002,73
14	Gi 748	 <p>The structure shows a central chlorine atom coordinated to four nitrogen atoms of a phthalocyanine ring. Four potassium acetate groups are attached to the ring: two via the oxygen atom (KOOCH<sub>2</sub>C) and two via the methyl group (CH<sub>2</sub>COOK).</p>	1872,54
15	Gi 997	 <p>The structure shows a central chlorine atom coordinated to four nitrogen atoms of a phthalocyanine ring. Four potassium propyl carboxylate groups are attached to the ring via the oxygen atom (KOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>).</p>	1842,51