

NAG – это крупномолекулярный белок, который у здоровых людей не проходит через гломерулярный барьер, поэтому этот фермент начинает обнаруживаться в моче при повреждении почечного эпителия, патогномичного для СД. Он считается одним из самых ранних биомаркеров для диагностики ХБП. Ряд исследований показал, что увеличение экскреции NAG с мочой выявляется еще до появления микроальбуминурии [7]. В качестве доклинической диагностики ХБП у пациентов с СД может быть использовано определение количества подоцитов в моче. Поскольку при повреждении подоцитов снижается их адгезия к базальной мембране клубочков и увеличивается выведение подоцитов с мочой. При изучении мочевого осадка у больных СД на разных стадиях ХБП обнаружено большое количество специфических белков, которым отводится роль маркеров раннего поражения почек. К ним относятся такие белки, как Е-кадгерин и оросомукоид (UOER) [8].

Заключение

Таким образом, применяемые в современной медицине методы оценки функции почек (уровень креатинина, СКФ по креатинину и цистатину С, альбуминурия) выявляют нарушения уже на стадии поражения клубочков и не во всех случаях могут служить предикторами развития ХБП. Это приводит к поиску новых биохимических и генетических маркеров на доклинической стадии, которые позволят предотвратить или отсрочить развитие патологии почек у пациентов с СД, своевременно инициировать нефропротективную терапию и снизить экономические затраты на заместительную почечную терапию.

Список литературы

1. Швецов М.Ю. Это должен знать каждый!: Для чего нужны почки и как они работают? Как проверить состояние почек? Отчего возникают болезни почек? Как сохранить почки здоровыми? // Почки и здоровье: научно-популярное приложение к журналу «Нефрология». 2011. Т. 15. № 1. С. 3–32.
2. Colhoun H.M., Marcovecchio M.L. Biomarkers of diabetic kidney disease. *Diabetologia*. 2018 May;61(5):996-1011. doi: 10.1007/s00125-018-4567-5. Epub 2018 Mar 8. PMID: 29520581; PMCID: PMC6448994.
3. Yi-Chih Lin, Yu-Hsing Chang, Shao-Yu Yang, Kwan-Dun Wu, Tzong-Shinn Chu/Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease // *Journal of the Formosan Medical Association*. Volume 117. Issue 8. 2018. P. 662-675.
4. А.С. ЦИСТАТИН С В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРЫХ И ХРОНИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПОЧЕК // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016. № 11-1. С. 66-70.
5. Кучук Э.Н., Висмонт Ф.И. Патологическая физиология почек: учебно-методическое пособие. Министерство здравоохранения республики Беларусь «Белорусский государственный медицинский университет» кафедра патологической физиологии. Минск БГМУ, 2011.
6. Маркова Т.Н., Садовская В.В., Беспятова М.Ю. Современные возможности диагностики хронической болезни почек при сахарном диабете. *Сахарный диабет*. 2017;20(6):454-460.
7. Jiang H., Guan G., Zhang R., et al. Identification of urinary soluble E-cadherin as a novel biomarker for diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009;25(3):232-241.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА

Колодяжный Е.И.

ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, направление подготовки «Биология», Волгоград, e-mail: hostvelger@gmail.com

Род *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* состоит более, чем из 70 вирусов, большинство из которых является арбовирусами. Флавивирусы инфицируют широкий диапазон организмов, включающий в себя насекомых, птиц, млекопитающих и рептилий. Большинство из них способны вызывать тяжелые заболевания у человека, такие как: лихорадку Денге, желтую лихорадку, японский энцефалит, клещевой энцефалит и другие. В данный момент не существует эффективных методов лечения, вирусоспецифических медикаментов. В некоторых случаях не хватает даже методик профилактики заболеваний. На территории России особого внимания стоит вирус Западного Нила (ВЗН). Его наиболее активные очаги расположились в Астраханской области, близ дельты реки Волги. В силу местных экологических и географических факторов, сформировались крайне выгодные условия для поддержания активности ВЗН, и его циркуляции. Почти ежегодно возникает спорадическая заболеваемость лихорадкой Западного Нила. Понимание принципов молекулярной эволюции может помочь научному сообществу в разработке стратегии для борьбы с ВЗН.

ВЗН представляет собой вирус с одноцепочечной позитивной смысловой РНК с геномом приблизительно 11 т.п.н., кодирующим одну открытую рамку считывания (ORF), состоящую из трех структурных генов (С, ргМ и Е) и семи неструктурных генов (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). ВЗН принадлежит к серокомплексу вируса японского энцефалита вместе с вирусом энцефалита Сент-Луиса (SLEV), вирусом энцефалита долины Мюррей (MVEV) и вирусом Альфа (ALFV). Впервые он был выделен в провинции Западный Нил в Уганде в 1937 году от пациентки с лихорадкой. Первоначально вирус считался не опасным для человека, поскольку он вызывает лишь легкие субклинические инфекции. Однако спустя время было замечено, что вирус является причиной частой заболеваемости и смертности у различных видов животных, включая птиц, лошадей, овец, рептилий, кошек и грызунов. За последние три десятилетия произошло заметное увеличение случаев заболевания среди людей и лошадей.

Молекулярная эволюция ВЗН

ВЗН относится к группе комариных флавивирусов, переносчиком для которых являются

комары. Происхождение и эволюция комариных флавивирусов тесно связано с комарами родов *Culex* и *Aedes* [1, с. 73]. Данные филогенетического исследования отмечают, что предшественники большинства современных флавивирусов возникли на Африканском континенте. Африканское происхождение вируса желтой лихорадки в странах Южной и Центральной Америки достоверно задокументировано, и имеются все основания полагать, что транспорт вируса желтой лихорадки на Американский континент произошел около 300 лет назад, во времена работорговли. Имеются достоверно зафиксированные примеры распространения флавивирусов в течение последних десятилетий на обширных территориях Нового и Старого Света (вирусы денге, Усуту, Кьясанурской лесной болезни и многие другие флавивирусы). Но главное место в набирающем скорость распространении флавивирусов по новым территориям занимает ВЗН. Оказавшись в 1999 году на территории побережья Северной Америки, ВЗН в течение нескольких лет рассредоточился по территории как Южной, так и Северной, Америки [2, с. 1039]. Такая же вспышка имела место в Волгограде и в Астрахани 1999 года. Именно она привела к распространению генотипа 1 вируса Западного Нила по Евразии доходя даже до тихоокеанского побережья [3, с. 461]. В последние годы фиксируется продолжающееся распространение ВЗН в России, вплоть до границы лесотундры. Вторая же волна ВЗН по России связана уже с генотипом 2 данного вируса. Вероятнее всего, вариативность генома флавивирусов дает простор для быстрой молекулярной эволюции и адаптации к совершенно новым природным и географическим условиям. Способность флавивирусов реплицироваться в различных видах кровососущих, птицах и млекопитающих определяет их успешное внедрение в природные очаги и быстроту распространения в новых ландшафтах.

В работе 2013 г. [4, с. 31] авторами проводилась оценка эволюционной скорости вируса Западного Нила. Для анализов было взято 68 нуклеотидных последовательностей белка E ВЗН. Установленная скорость накопления нуклеотидных замен составила $2,5 \times 10^{-4}$ замен на сайт в год. Филогенетический анализ и оценка времени эволюции ВЗН с использованием методологии молекулярных часов продемонстрировала, что на европейской территории России циркулируют 1, 2 и 4 генотипы ВЗН с примерным временем дивергенции от единого предшественника около 2360, 2800 и 5950 лет, соответственно. Соотношение частот несинонимичных замен (dN) к синонимичным (dS) колеблется в пределах 0,022 – 0,275 для отдельных штаммов ВЗН, собранных в группы по филогенетическому или/и географическому признакам. Наивысшие значения в соотношении dN/dS обнаружались для со-

временных изолятов ВЗН в Северной Америке и России, которые интродуцировались на новые биоценозы этих регионов за последние 14 лет.

Оценка dN/dS для вида ВЗН демонстрирует, что показатели внутривидовой изменчивости dN/dS могут использоваться для оценки присутствия ускоренной эволюции новых штаммов ВЗН. Это подтверждает гипотезу об установившихся, от 2 до 6 тысяч лет назад, благоприятных условиях для широкого распространения и быстрой эволюции различных генотипов ВЗН, в современных климатических условиях. Относящиеся к генотипу 1 ВЗН, вирусные штаммы, обширно распространены в различных Европы, Африки и Азии. Генотип 1 ВЗН (Hr-94) впервые был выделен на территории Российской Федерации в 1963 году. Позднее, в период с 1967-1970 гг., было изолировано три очень близких генетических штаммов (LEIV-72Az, LEIV-1640Az, LEIV-1628Az) на территории СССР. Современный генотип 1a ВЗН, принято связывать с крупными вспышками заболевания человека ЛЗН в Волгограде и Астрахане. Он был обнаружен в России 1999 г. В тот же год этот генотип был зафиксирован на Американском континенте, где смог вызвать серьезную вспышку заболеваний у людей в Нью-Йорке. На основе 68 нуклеотидных последовательностей, кодирующих поверхностный белок E штаммов ВЗН, было сконструировано филогенетическое дерево. Скорость накопления замен в гене E ВЗН, согласно результатам подсчетов, составила в среднем $2,5 \times 10^{-4}$ замен на сайт в год. Учитывая последние опубликованные работы по филогении ВЗН, данный вид делится на 5 основных генотипов. Вирус Кунджин находится в первом генотипе, но формирует в нем отдельный субкластер (1b). Российские штаммы ВЗН, хотя большинство из них и выделены на юге России, не имеют единого происхождения. Например, к первому генотипу относятся штаммы VLG-4, LEIV-Vlg00-276249 и LEIV-Vlg99-27889 (Волгоград); Ast99-901, Hr-94, (Астрахань). Выделенный на территории Астрахани в 1999 году штамм, формирует кластер с находящимися в США штаммами, но генетически он приближен к включенным в тот же кластер штаммами, которые выделили в Венгрии и Тунисе.

Примерный возраст самого близкого предка российского штамма Ast99-901 и родственных ему изолятов не из России (узел Д) составляет 158 лет. Три волгоградских штамма LEIV-Vlg99-27889, LEIV-Vlg00-276249 и VLG-4 имеют общее происхождение с штаммом из Румынии RO97-50 (узел Ж), который сам происходит от единого предка из Кении (узел Е) со штаммом KN3827. Рассматриваемый субкластер включает как российские, европейские и штаммы, которые выделили на африканском континенте (Египет, Кения, Марокко). Однако близость генетическая не коррелирует с географической,

и весь субкластер современного происхождения. Общий предок данного субкластера существовал примерно от 71 до 107 лет назад. Предполагается, что относительно недавно между этими зонами проходил множественный обмен штаммами ВЗН, связанный с миграцией перелетных птиц. Выделенный в Египте в 1951 году штамм Eg101 является самым старым среди вошедших в исследование штаммов и относится к генотипу 1. Eg101 дивергировал от общего для остальных штаммов предка (узел Г) примерно 304 года назад. Наряду с ним кластеризуются штаммы LEIV-72Az, LEIV-1628Az, HP-94, LEIV1640Az выделенные из клещей и птиц, находящихся на территории бывшего СССР в районе Каспийского моря, и индийский штамм 68856 выделенный в 1968 г. Выделенный в 1960 г. в Австралии вирус Куджин образует отдельный кластер (1b) в генотипе 1. Штаммы генотипа 1a, наряду с вирусом Куджин, разделились примерно 938 лет назад (узел В). Выделенные на территории Индии штаммы ВЗН образовали отдельный 5 генотип, близкий к генотипу 1.

Авторами были опубликованы новые геномные последовательности изолированных с 1955 года по 2011 год в Индии штаммов. Благодаря этим штаммам формируется компактная филогенетическая группа. Это доказывает процесс их длительной циркуляции на территории Индии. По мнению некоторых авторов, группа индийских штаммов ВЗН может относиться к генотипу I, а общий предок этого генотипа находился на восточном побережье Африки. Если верить расчетам, проводимым основываясь на генетической последовательности белка E, то следует, что генотипы 1 и 5 были разделены примерно 2360 лет назад. Это доказывает легитимность выделения генотипа 5 в отдельную филогенетическую группу ВЗН.

Примерный возраст общего предка генотипа 2 составляет около 1339 лет. Все африканские штаммы, выделенные в различное время в промежутке с 1958 по 2004 год, объединены в генотип 2. Так же генотип 2 включает ряд вариантов современных ВЗН, которые выделили в Волгограде в 2007 году. Анализируя полную последовательность штамма VLG/07 из России, видно, что Волгоградские изоляты давно отделились от африканских штаммов. Предок этого штамма, скорее всего, был занесен в Россию через территорию Израиля через Африку, ввиду того, что эти варианты кластеризуются со штаммом Sarafend (AY688948.1), изолированным приблизительно в середине прошлого века.

Генотип 3 представлен одним штаммом Rabensburg, выделенным в Европе и имеющим общего предка с генотипом 2, возрастом около 2815 лет. Все четыре выше описанных генотипа (узел Б), произошли от общего предка, существовавшего примерно 3568 лет назад. Около 5945 лет назад возник генотип 4 ВЗН

(узел А). Этот генотип интересен тем, что все известные его представители были выделены с 1998 по 2006 год на территории России и северо-западного Кавказа. Помимо этого, указанный выше генотип является самым генетически удаленным от первых четырех генотипов ВЗН, и скорее всего является эндемичным для территории России уже около 132 лет (Узел И). Исходя из этого, можно сделать вывод, что на территории России выявляются штаммы относящиеся к трем генотипам: 1, 2 и 4.

Комары, инфицирующие птиц, являются главным вектором для ВЗН. Именно благодаря кочевому образу жизни птиц обеспечивается быстрота распространения вируса на различных территориях. Это объясняет повсеместное распространение ВЗН на всех пяти континентах. За последние 20 лет, особо широко распространялся современный генотип 1a ВЗН, сумевший охватить территории Америки, Африки, Азии и Европы. Именно с ним связаны многочисленные случаи болезни у человека. Судя по всему, ВЗН интродуцировался в природный ландшафт в различных природно-климатических условиях [5, С. 222]. В современных исследованиях предельно точно указаны те климатические условия, что происходили на нашей планете за последние несколько тысяч лет. Дата последнего ледникового периода (около 10 тыс. лет назад) является ключевой для понимания принципа освоения флавивирусами новых территорий на севере Америки и Евразии после таяния ледников. Также указаны периоды дальнейших серьезных похолоданий и чередующихся за ними потеплений, способные заметно изменить модель распространения кровососущих насекомых. Эти периоды могли весомо повлиять на процесс эволюции фалавивирусов на территориях северной Америки и Евразии.

Репликация ВЗН в кровососущих комарах имеет весомую зависимость от температуры [6, С. 1039]. При температуре 14,3 °С активная репликация ВЗН в современных комарах рода Culex фактически прекращается. Данное обстоятельство является предопределяющим для формирования ареала природных очагов ВЗН в наиболее теплых зонах, в сравнении с клещевыми флавивирусами. Переносчики клещевых фалавивирусов начинают свою активность в периоды ранней осени, при средней температуре среды примерно 0 °С. Интересным феноменом является продолжение циркуляции разделившихся довольно давно генотипов ВЗН в одном регионе. Например, на территории Волгоградской области продолжают обнаруживаться 1, 2 и 4 генотипы ВЗН. Исходя из этого, можно утверждать, что передача ВЗН на европейскую территорию была как минимум несколько раз и в различные периоды истории. Проведенный тест селекции к гену E ВЗН показывающий соотношение dN/dS, доказал, что ВЗН на территории Африки под-

вергается стабилизирующему отбору. Исходя из этих данных, мы можем подтвердить гипотезу, что у ВЗН – африканские корни происхождения. Для российских штаммов ВЗН, влияние движущего отбора на данной территории указывает на более активную эволюцию. Судя по всему, это можно связать с относительно недавним возникновением этих штаммов путем дивергенции от африканских и европейских предков.

Таким же образом движущий отбор оказывает свое влияние для изолятов выделенных на американском континенте, где ВЗН стал эндемичным сравнительно недавно. Оценивая эволюционную скорость генотипа ВЗН характерного России, видно, что скорость накопления нуклеотидных замен в нуклеотидной последовательности гена E составляет примерно 2,5 x 10⁻⁴ замен на сайт в год. Данная оценка, смогла показать, что скорость накопления мутаций для различных штаммов колеблется в пределах от 6,35 x 10⁻³ до 4,27 x 10⁻⁵. Проведенные ранее расчеты для клещевых флавивирусов, показали значение равное 1,4x10⁻⁴ для гена белка E ВКЭ и 5,4x10⁻⁵ для гена NS5 вируса Повассан. Оценка времени процесса дивергенции по гену белка E от единых предшественников для 1, 2 и 4 генотипов ВЗН, циркулирующих на европейской части территории России, дала понять, что расчетное время для дивергенции составляет 2360, 2800 и 5950 лет, соответственно.

Список литературы

1. Kuno G., Chang G.J., Tsuchiya K.R., Karabatos N., Cropp C.B. Phylogeny of the genus *Flavivirus* // *J Virol*. 1998. V. 72 (1). P. 73.
2. Gubler, D.J. The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere // *Clin Infect Dis*. 2007. V. 45 (8). C. 1039.
3. Murata R., Hashiguchi K., Yoshii K., Kariwa H., Nakajima K., Ivanov L.I., Leonova G.N., and Takashima I. Seroprevalence of West Nile virus in wild birds in far eastern Russia using a focus reduction neutralization test. // *Am J Trop Med Hyg*. 2011. V.84 (3). C. 461.
4. Субботина Е.Л., Локтев В.Б. Молекулярная эволюция вируса Западного Нила. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2014. №1. 31-37 С. 31.
5. Botha E.M., Markotter W., Wolfaardt M., Paweska J.T., Swanepoel R., Palacios G., Nel L.H., Venter M. Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains // *Emerg Infect Dis*. 2008. V. 14 (2). C. 222.
6. Gubler, D.J. The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere // *Clin Infect Dis*. 2007. V. 45 (8). P. 1039.

ОСНОВНЫЕ АСПЕКТЫ ДИАГНОСТИКИ РНК-ВИРУСА SARS-COV-2 МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Кубышкина Д.В., Антипова Д.В.,
Ковалёва Л.Г., Рашимова А.Д.

ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России – ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, направление подготовки «Биология», Волгоград, e-mail: goku59uri@gmail.com

Показана классификация, к которой относится вирус SARS-CoV-2. Природный хозяин

является таким же, как и у остальных представителей рода *Betacoronavirus*, но также имеется промежуточный хозяин среди мелких млекопитающих. Выявлены пути передачи вируса и то, что он крайне неустойчив в условиях окружающей среды. В настоящее время самым достоверным методом диагностики РНК вируса является метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, но существуют определённые нюансы, способные привести к ложноположительным результатам.

Достаточно долгое время человечество знакомо с инфекциями, вызванными коронавирусами, но лишь в начале XXI века столкнулось с новыми видами, которые могут проникать в организм человека, вызывая тяжёлые поражения дыхательной системы.

За всю историю наблюдалось три вспышки коронавирусных инфекций, третья отмечается в данный момент, объявленная ВОЗ как пандемия планетарного масштаба.

Возникла острая необходимость в разработке быстрого и точного метода обнаружения возбудителя COVID-19. Соответствуя этим требованиям, наиболее подходящей стала тест-система, основанная на полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией.

Характеристика вируса SARS-CoV-2

Вирус SARS-CoV-2 относится к царству *Riboviria*, отряду *Nidovirales*, подотряду *Cornidovirineae*, семейству *Coronaviridae*, подсемейству *Orthocoronavirinae*, роду *Betacoronavirus*, подроду *Sarbecovirus*, виду *SARS-coronavirus*.

10 января 2020 года в КНР был впервые секвенирован геном вируса SARS-CoV-2. Первые секвенированные геномы были идентичны на 99,98%, что свидетельствует об одном начальном источнике инфекции.

Выяснилось, что природным хозяином вируса являются летучие мыши, однако имеется промежуточный хозяин, и существует предположение, что это могут быть панголины, предположительно ставшие причиной заражения «нулевого пациента» [1, 2].

Размер вириона составляет примерно 80-220 нм. Нуклеокапсид имеет вид гибкой спирали, состоящей из геномной плюс-нити РНК и большого количества молекул нуклеопротеина N.

Имеют суперкапсид в виде солнечной короны с выдающимися пепломерами – булавовидными образованиями, которые состоят из белка S – основной белок мембраны. Данный белок играет важную роль в прикреплении, слиянии и проникновении вируса в поражаемые клетки.

Пути передачи вируса – воздушно-капельный и контактно-бытовой.

Для SARS-CoV-2 характерна низкая устойчивость в окружающей среде – он погибает при воздействии УФ-излучения, дезинфекции