

На правах рукописи

Лоломадзе Елена Анатольевна

**ВЕРТИКАЛЬНАЯ ПЕРЕДАЧА И ДИНАМИКА ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ
TORQUE TENO VIRUS В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ**

3.3.8 Клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор РАН

Ребриков Денис Владимирович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор

Рубальский Олег Васильевич

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии.

доктор биологических наук,
член-корреспондент НАН

Баранов Олег Юрьевич

Высшая государственная научная организация «Национальная академия наук Беларуси», академик-секретарь отделения биологических наук.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2023 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.058.04 на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1 и на сайте: <http://www.rsmu.ru/>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.2.058.04

доктор медицинских наук, профессор

Гордеев Иван Геннадьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Вирусы являются наиболее многочисленной биологической формой. Они считаются переходной формой между живой и неживой материей, способные заражать не только практически всех представителей флоры и фауны, но и микроорганизмы. Борьба со многими вирусами, как правило, не имеет долгосрочных положительных результатов, так как они не только располагают природным резервуаром, но и постоянно изменяются (мутируют), вследствие чего снижается эффективность проведения вакцинопрофилактики (Sanjuan R. & Domingo-Calap P., 2016).

При некоторых обстоятельствах вирусы могут персистировать или становиться латентными в организме хозяина, при этом клинические проявления или реактивация вируса могут развиваться значительно позже момента заражения, или не развиваться вовсе (Boldogh I. et al., 1996).

Первые годы жизни чрезвычайно важны для развития иммунитета и влияют на здоровье человека в зрелом возрасте (Lim E. S. et al., 2015). Многие факторы предрасполагают недоношенных детей к наибольшему риску развития инфекции и смерти от инфекции в сравнении со всеми другими возрастными группами. Известно, что иммунная система недоношенных детей проявляет совершенно иную, а не просто недостаточную функцию по сравнению с доношенными, и что иммунная функция у недоношенных детей повышает риск заражения. Множество факторов, включая преждевременные роды, искусственное вскармливание и антибиотикотерапия в неонатальном периоде делают новорожденного (а особенно – недоношенного ребенка) более восприимчивым к бактериальным и вирусным инфекциям (Collins A. et al., 2018; Simon A. K. et al., 2015).

Исследования микробиоты человека показывают, что наш организм находится в симбиозе с огромным количеством микроорганизмов (всего в микробиоте человека обнаружено более 1000 видов микроорганизмов). Каждая часть человеческого тела, подверженная воздействию внешней среды, населена бактериями и вирусами, при этом основная часть популяции микроорганизмов находится в пищеварительном тракте. Микробиом вовлечен в ряд физиологических процессов, жизненно важных для здоровья хозяина, таких как развитие и состояние иммунной системы, защита от патогенов, метаболизм, энергетический гомеостаз, нейроразвитие, а также развитие кишечного эпителия хозяина и поддержания гомеостаза тканей (Shulman L. M. & Davidson I., 2017; Yadav M. et al., 2018; Rowan-Nash A. D. et al., 2019).

Вирусный микробиом («виром» или «виробиота») состоит из бактериофагов и эукариотических РНК- и ДНК-вирусов. В целом виром

человека менее изучен (в сравнении с бактериальным сообществом), однако сегодня наблюдается интенсивное развитие этой области. Накапливаются данные, укрепляющие мнение о том, что не все вирусы действуют как обязательные патогены и могут быть как симбиотическими, так и комменсальными членами микробиоты человека (Abeles S. R. & Pride D. T., 2014; Barton E. S. et al., 2007). Существование вирусов как стабильных членов виroma человека, может играть важную роль в здоровье хозяина, особенно в неонатальном периоде.

Основные группы вирусов у новорожденных – это респираторные вирусы (Luoto R. et al., 2016) и герпесвирусы (Freij B. J. & Sever J. L., 1988; Tremolada S. et al., 2008). Среди них есть и присутствующие у плода и новорожденного скрытым образом (без цитологических нарушений). При этом не всегда скрытая инфекция может быть безопасна для новорожденных в неонатальном и постнатальном периодах, некоторые из вирусов связаны с внутриутробной и неонатальной гибелью, повреждением органов и различными заболеваниями новорожденных (Euscher E. et al., 2001; Tomai X-H., 2011).

Открытый в 1997 году Torque teno virus (TTV) из семейства *Anelloviridae* представляет собой небольшой вирус с одноцепочечной кольцевой молекулой ДНК 3,6 – 3,9 т.п.н., в зависимости от изолята (King A. M. Q. et al., 2012). TTV является наиболее распространенным компонентом виробиоты крови и достоверно не ассоциирован с заболеваниями человека. Ряд исследователей считают TTV комменсальным вирусом (Simmonds P. et al., 1999; Mushahwar I. K., 2000; Kaczorowska J. & van der Hoek L., 2020), широко представленным в человеческой популяции. В этой связи встает вопрос о сроках и путях его проникновения в организм человека, возможности вертикальной передачи от матери к ребенку и динамике вирусной нагрузки у детей в постнатальном периоде. Интерес к данному вирусу обусловлен тем, что TTV проявляет свойства маркера иммунной функции и связан с состоянием подавления иммунитета в ранние сроки после трансплантации солидных органов (Beland K. et al., 2014; Focosi D. et al., 2014; Gorzer I. et al., 2015). За прошедшие с момента открытия Torque teno virus 25 лет по запросу «TTV» в PubMed обнаруживается 1221 публикация (для сравнения, по запросу «CMV» за этот же период вышло 29567 публикаций), из них по вопросу вертикальной передачи и пролиферации у новорожденных – около 70 научных работ.

На сегодняшний день хорошо изучена распространенность и генетическая гетерогенность TTV как у здоровых людей, так и при различных патологиях. При этом ранние сообщения о возможном патогенном влиянии TTV, описывающие его связь с широким спектром заболеваний (от гепатита до рака), на данный момент не подтвердились (Charlton M. et al., 1998; Irshad M. et al., 2008). В

дополнение к отсутствию ассоциации с заболеваниями, тот факт, что высокая распространенность TTV замечена с самого раннего возраста (Ninomiya M. et al., 2008) и среди здорового населения достигает 95% (Hsiao K.-L. et al., 2016) затрудняет интерпретацию TTV в ключе возможной патогенности этой группы вирусов и подтверждает идею о том, что TTV является истинным комменсалом.

Пути передачи TTV от матери к ребенку, по-видимому, многообразны, при этом возможность трансплацентарной передачи TTV на момент начала нашего исследования оставалась спорной.

С целью изучения трансплацентарной передачи TTV и распространенности TTV в постнатальном периоде, возможных источниках заражения новорожденных этой группой вирусов, информативным могло стать обследование беременных, новорожденных и детей первого года жизни. В этой связи была сформулирована цель диссертационной работы.

Цель работы: исследование вертикальной передачи и динамики вирусной нагрузки Torque teno virus в постнатальном периоде.

Задачи работы:

1. Оценить вирусную нагрузку TTV у беременных.
2. Оценить возможность трансплацентарной передачи TTV от матери плоду.
3. Определить зависимость вирусной нагрузки TTV ребенка от вирусной нагрузки матери.
4. Сравнить вирусную нагрузку TTV в крови недоношенных и доношенных младенцев в течение первых четырех месяцев после рождения.
5. Определить динамику вирусной нагрузки TTV в течение первого года жизни здоровых детей.
6. Разработать тест-системы для дифференциальной количественной диагностики 3-х основных вирусных групп семейства *Anelloviridae* (TTV, TTMV и TTMDV).

Научная новизна

Впервые продемонстрировано отсутствие трансплацентарной передачи TTV, вне зависимости от уровня вирусной нагрузки матери.

Впервые показано, что вирусная нагрузка TTV ребенка не зависит от вирусной нагрузки матери.

Новыми являются данные о том, что первые признаки пролиферации вируса можно обнаружить методом ПЦР через 1-2 недели от рождения.

Впервые продемонстрировано, что плато вирусной нагрузки TTV достигается через 3-6 месяцев с активной пролиферацией в течение первых 6-8 недель от рождения.

Установлено отсутствие статистически значимой разницы в вирусной нагрузке ТТV для недоношенных и доношенных детей.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты расширяют научные представления о механизмах репликации ТТV и путях передачи этого вируса в постнатальном периоде. Показано, что ТТV широко распространен среди здоровых грудных детей первого года жизни, а присутствие вируса у детей не зависит от вирусной нагрузки матери.

Полученные результаты проливают свет на возможную взаимосвязь ТТV с иммунитетом ребенка в постнатальном периоде.

Разработаны три тест-системы для дифференциальной количественной диагностики вирусов ТТV, ТTMV и ТТMDV. Тест-системы внедрены в серийное производство на базе компании ООО «ДНК-Технология ТС» (Россия).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Трансплацентарной передачи ТТV от матери плоду не выявлено.
2. Вирусная нагрузка ТТV ребенка не зависит от вирусной нагрузки матери.
3. Вирусная нагрузка ТТV у недоношенных и доношенных детей не отличается.
4. Вирусная нагрузка ТТV не зависит от способа родоразрешения и веса ребенка при рождении.
5. ДНК ТТV в крови новорожденного появляется через 1-2 недели после рождения. Титр вируса активно нарастает в течение первых 6-8 недель.
6. Вирусная нагрузка ТТV увеличивается у детей первого года жизни с возрастом, достигая плато через 3-6 месяцев.

Методология и методы исследования

Всего в исследование были включены 363 младенца, рожденных или наблюдающихся в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России в период с 2016 по 2019 гг., из них 137 младенцев составляли пару с матерями (общее число участников исследования – 500). Для всех детей и матерей проведен анализ вирусной нагрузки ТТV в крови методом ПЦР «в реальном времени».

В 1-ю группу вошли 100 пар мать-ребенок с определением уровня вирусной нагрузки ТТV в крови и плазме матери (до родов) и в пуповинной крови и плазме, собранных в момент родов.

2-ю группу составили 37 пар мать-ребенок для определения зависимости вирусной нагрузки ТТV ребенка от вирусной нагрузки матери, из них 34 младенца дополнили 3-ю группу детей первых четырех месяцев жизни и 3 младенца дополнили 4-ю группу детей первого года жизни.

3-ю группу составили 200 младенцев: 92 недоношенных и 108 доношенных детей первых четырех месяцев жизни.

4-ю группу составили 98 клинически здоровых младенцев – дети первого года жизни (возраст детей от 1 месяца до 1 года, из них 35 младенцев также входили и в 3-ю группу).

В работе использованы следующие методы: экстракция ДНК, количественная ПЦР, электрофорез в агарозном геле, секвенирование, спектрофотометрия, биоинформатические методы анализа. Статистическая обработка результатов исследования была проведена с использованием методов непараметрического и параметрического анализа. Обработку полученных результатов проводили в программном пакете GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA).

Степень достоверности результатов работы

Достоверность полученных результатов исследования определяется достаточным (репрезентативным) объемом выборок обследованных пациентов и качеством исследований, проведенных с использованием арсенала современных молекулярно-генетических методов; достоверность результатов подтверждена методами статистической обработки данных, адекватных поставленным задачам.

Апробация диссертации

Апробация работы проведена 24.10.2022 г. на заседании апробационной комиссии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции «Генетический и репродуктивный потенциал с позиций доказательной медицины» 2020 года.

Личный вклад автора в исследование

Личное участие соискателя в выполнении диссертационного исследования состоит в проведении анализа предшествующих исследований, сборе биологического материала от пациентов, непосредственном проведении основного экспериментального этапа работ и анализе полученных результатов исследования. Самостоятельно проведены статистический анализ и интерпретация полученных данных, сделаны научные выводы. Личный вклад автора в исследование составляет 85%.

Внедрение результатов исследования

Разработанные тест-системы для дифференциальной количественной диагностики семейства *Anelloviridae* вирусов TTV, TTMV и TTMDV внедрены в

серийное производство ООО «ДНК-технология ТС» (Россия) и могут быть использованы для выявления клинической значимости трех основных вирусных групп семейства вирусов *Anelloviridae* в любых когортах пациентов.

Научные положения и результаты диссертационной работы используются в лекционном элективном курсе «Молекулярная биология» кафедры биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России с 2020 по настоящее время и позволяют знакомить студентов с современными представлениями о диагностике, оценке динамики вирусной нагрузки и распространенности Torque teno virus.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.3.8 – «Клиническая лабораторная диагностика». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно – пунктам 5-7 паспорта специальности 3.3.8 – «Клиническая лабораторная диагностика».

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых изданиях, входящих в международную базу Scopus, тезисы в сборнике материалов научной конференции, а также 3 патента на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения собственных исследований, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы и списка литературы. Работа иллюстрирована 10 таблицами и 20 рисунками, кроме этого, работа включает 4 приложения. Список литературы включает 210 источников, из них 1 – отечественный и 209 – зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Всего в исследование были включены 363 младенца, рожденных или наблюдающихся в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России в период с 2016 по 2019 гг., из них 137 младенцев составляли пару с матерями (общее число участников исследования – 500).

В 1-ю группу вошли 100 пар мать-ребенок с определением уровня вирусной нагрузки TTV в крови и плазме матери (до родов) и в пуповинной

крови и плазме, собранных в момент родов. Возраст матерей варьировался от 20 до 47 лет, средний возраст – 31 год.

Две отдельные аликвоты каждого образца, собранные из периферической вены матери и пуповины, помещали в 4 мл ЭДТА вакуумные пробирки. Все образцы хранили при + 4°C не более трех часов, после чего их центрифугировали для отделения плазмы сначала при 800 g в течение 5 минут, а затем при 3000 g в течение 5 минут. Образцы крови и плазмы хранили при -20°C в течение 1-7 дней до выделения ДНК.

Отдельную группу составили 37 пар мать-ребенок с определением в постнатальном периоде уровня вирусной нагрузки TTV в крови матери и ребенка (2-я группа исследования), из них 34 младенца дополнили 3-ю группу детей первых четырех месяцев жизни и 3 младенца дополнили 4-ю группу детей первого года жизни.

Всего 3-ю группу составили 200 младенцев: 92 недоношенных и 108 доношенных детей первых четырех месяцев жизни. 55 младенцев были протестированы повторно и 14 из них показали TTV-положительный результат от 2 до 11 раз, поэтому общее число проанализированных образцов в 3-й группе составило 306.

4-ю группу составили 98 клинически здоровых младенцев – дети первого года жизни (возраст детей от 1 до 12 месяцев, число детей по месяцам соответственно – 9; 6; 13; 8; 11; 14; 6; 9; 10; 6; 4; 2), из них 35 младенцев также входили и в 3-ю группу. 10 младенцев были протестированы повторно (2 или 3 раза), поэтому общее число проанализированных образцов в этой группе составило 109.

Все дети находились на грудном вскармливании с рождения, за исключением недоношенных детей, получавших смесь первые несколько суток и затем переведенных на грудное вскармливание в разном возрасте, в зависимости от физиологического состояния и назначений врача в течение всего периода забора крови.

Две отдельные аликвоты каждого образца капиллярной крови от ребенка и венозной крови от матери были собраны в Microvette 200 мкл К3 ЭДТА (Sarstedt, Германия) и в 4 мл ЭДТА вакуумные пробирки соответственно. Образцы хранили при -20°C в течение 1-7 дней до выделения ДНК.

В работе использованы следующие методы: экстракция ДНК, количественная ПЦР, электрофорез в агарозном геле, секвенирование, спектрофотометрия, биоинформатические методы анализа.

Статистическая обработка результатов исследования была проведена с использованием методов непараметрического и параметрического анализа. Исследованные количественные показатели представляли в виде Me (L-H), где

Me – медиана, L – нижний квартиль, H – верхний квартиль. Поскольку для некоторых совокупностей данных невозможно было вычислить медиану и квартили, то количественные показатели представляли в виде среднего с диапазонами.

Для сопоставления двух групп по количественным признакам использованы методы: U-критерий Манна-Уитни и критерий Уилкоксона; для проверки данных на нормальность распределения использованы: тест на нормальность Д'Агостино и Пирсона и тест на нормальность Шапиро-Уилка; для выявления и оценки тесноты связи между двумя рядами сопоставляемых количественных показателей использованы: тест Спирмена и тест Пирсона. Различие групп полагали статистически значимым при $p < 0,05$. Обработку полученных результатов проводили в программном пакете GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка вирусной нагрузки TTV у беременных женщин и исследование трансплацентарной передачи вируса от матери плоду

В рамках исследования трансплацентарной передачи TTV путем количественного определения вируса в венозной крови и плазме беременных женщин, а также в пуповинной крови и плазме, собранных после родов, было установлено, что у 84 (84%) беременных женщин вирусная нагрузка TTV превышает чувствительность методики в 10^3 коп/мл (рисунок 1).

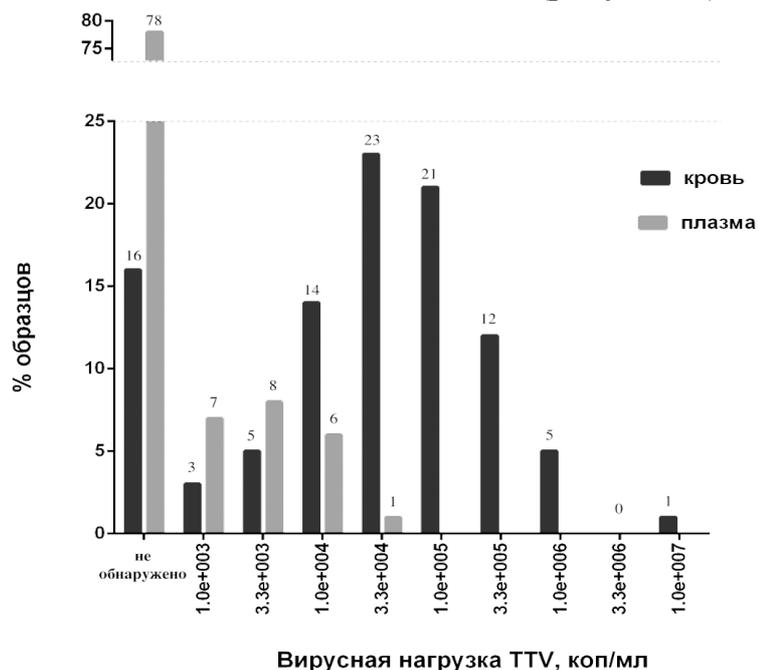


Рисунок 1 – Вирусная нагрузка TTV в образцах матери. Числа над столбцами означают количество образцов.

Вирусная нагрузка ТТV в плазме была приблизительно в 100 раз ниже, чем в цельной крови (рисунок 2), что хорошо согласуется с данными литературы (Vasilyev E. V. et al., 2009). Всего 22 (22%) образца плазмы были ТТV-положительными.

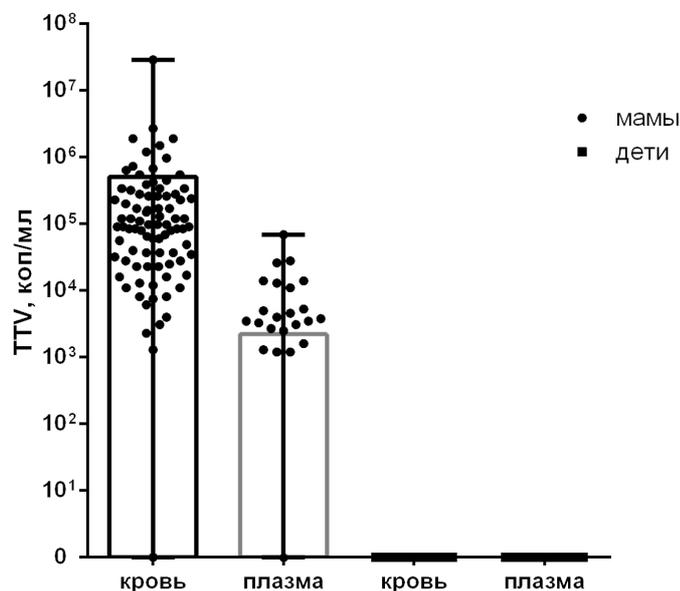


Рисунок 2 – Вирусная нагрузка ТТV в образцах крови и плазмы 100 пар мать-ребенок.

ТТV не был обнаружен ни в одном из 100 образцов пуповинной крови и ни в одном из 100 образцов плазмы пуповинной крови. При этом уровни геномной ДНК человека были сопоставимы в образцах материнской и пуповинной крови (в среднем $4,1$ и $4,2 \times 10^8$ коп/мл соответственно). Полученные данные свидетельствуют в пользу отсутствия трансплацентарной передачи ТТV.

Средние значения вирусной нагрузки ТТV в материнских образцах крови и плазмы составили $5,0 \times 10^5$ коп/мл в крови и $2,2 \times 10^3$ коп/мл в плазме. Коэффициент корреляции вирусной нагрузки ТТV в крови и плазме матерей составил $r = 0,48$ и оказался незначим (тест Спирмена, $p > 0,05$).

Присутствие ТТV в крови у 84% беременных женщин хорошо коррелирует с ранее опубликованными исследованиями здоровых индивидов (Vasilyev E. V. et al., 2009; Haloschan M. et al., 2014). Однако данные более ранних исследований вирусной нагрузки ТТV в группах беременных или матерей с младенцами – неоднозначны. Так, в исследовании (Kazi A. et al., 2000) приблизительно одинаковая и невысокая (около 30%) распространенность ТТV была выявлена у матерей и младенцев в течение первых 2 лет жизни, независимо от статуса инфицирования ТТV матерей. Это связано с тем, что 99% образцов пуповинной крови были отрицательными, и все матери воздерживались от грудного вскармливания.

В ряде исследований сыворотки крови беременных (Iso K. 2001, Fang F. et al., 2001; Zhang Z. et al., 2001, Xin X. et al., 2004) ТТV был обнаружен

соответственно в 20%, 11,3%, 40% и 17,8%. Вместе с тем, ряд работ демонстрирует гораздо более высокий уровень детекции TTV в сыворотке крови беременных – 72% (Goto K. et al., 2000; Bagaglio S. et al., 2002), что согласуется с данными, полученными в нашем исследовании.

Нами было установлено, что TTV не передается трансплацентарно, поскольку все образцы пуповинной крови были отрицательными независимо от вирусной нагрузки матери. При этом ряд исследований противоречат нашим данным, демонстрируя наличие ДНК TTV у 1 – 66% образцов пуповинной крови при сопоставимой чувствительности ПЦР-методики (Saback F. L. et al., 1999; Gerner P. et al., 2000; Goto K. et al., 2000; Kazi A. et al., 2000; Morrica A. et al. 2000; Matsubara H. et al., 2001; Zhong M. et al., 2001; Xin X. et al., 2004; Mutlu D. et al., 2007), при этом большая часть этих исследований все же указывает на невысокую долю (1 – 19%) TTV-положительных образцов пуповинной крови.

Существенные различия в представленности TTV в образцах пуповинной крови для перечисленных выше исследований (включая и наше исследование) могут быть объяснены использованием принципиально разных методов обнаружения вируса: ПЦР «в реальном времени» и «вложенной» ПЦР с анализом по конечной точке. При использовании «вложенной» ПЦР контаминация лаборатории продуктами ПЦР практически неизбежна, что могло дать большое число ложноположительных результатов.

Определение зависимости вирусной нагрузки TTV ребенка от вирусной нагрузки матери

В ходе определения зависимости вирусной нагрузки TTV ребенка от вирусной нагрузки матери из 37 исследованных парных образцов (возраст детей от 17 до 186 дней, средний возраст младенцев – 62 дня) 24 (65%) материнских образца были TTV-положительными (рисунок 3), а среди их детей были 17 TTV-отрицательных (средний возраст 44 дня) и 7 TTV-положительных образцов крови младенцев (средний возраст 111 дней).

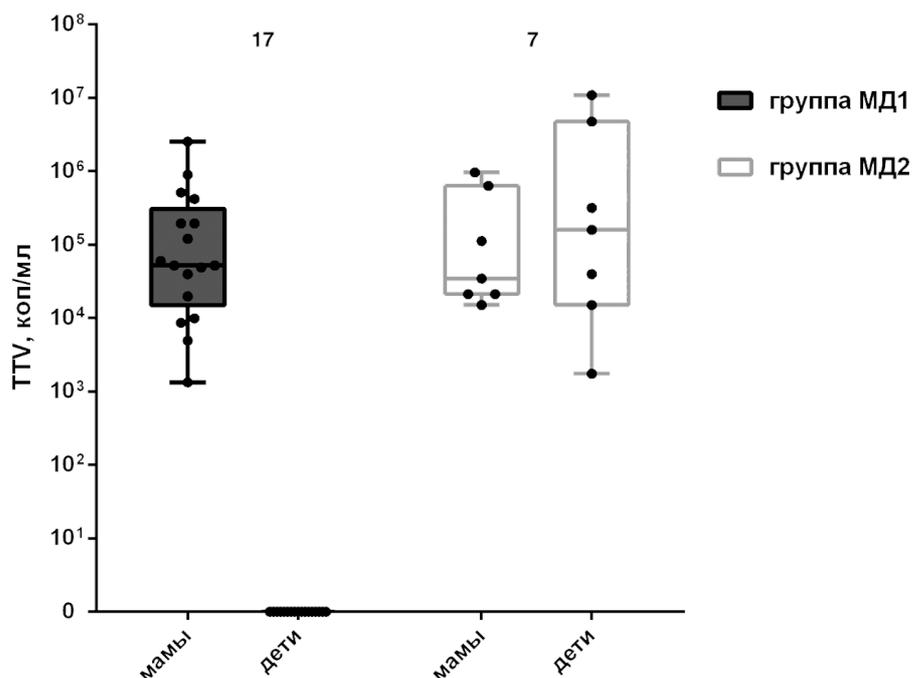


Рисунок 3 – Вирусная нагрузка ТТV в парах мать-ребенок. Числа над диаграммами представляют общее количество пар (мать-ребенок) в каждой группе, где МД1 обозначает группу, где мамы ТТV-положительны, а их дети ТТV-отрицательны; МД2 обозначает группу, где мамы и их дети ТТV-положительны.

При сравнении 7-ми ТТV-положительных парных образцов мать-ребенок не выявлено статистически значимой разницы между вирусной нагрузкой ТТV младенцев и вирусной нагрузкой ТТV их матерей (тест Уилкоксона, $p < 0,05$), коэффициент корреляции: $r = -0,11$ (тест Спирмена, $p > 0,05$), что свидетельствует о наличии очень слабой отрицательной корреляции. Такие результаты демонстрируют, что передача ТТV ребенку не зависит от вирусной нагрузки матери.

В таблице 1 приведены статистические показатели вирусной нагрузки ТТV в парных образцах крови матери и ребенка. Статистически значимых различий в вирусной нагрузке ТТV у матерей из двух групп (ТТV-положительных матерей с ТТV-отрицательными и ТТV-положительными младенцами) не выявлено (тест Манна-Уитни, $p < 0,05$).

Таблица 1 – Статистические показатели по вирусной нагрузке ТТV в парах мать-ребенок.

Анализируемые группы	МД1		МД2	
	Мама	Дети	Мама	Дети
Объем выборки (n)	17	0	7	7
Минимум	$1,3 \times 10^3$	0	$1,5 \times 10^4$	$1,8 \times 10^3$
25% процентиль (L)	$1,5 \times 10^4$	0	$2,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
Медиана (Me)	$5,3 \times 10^4$	0	$3,5 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$
75% процентиль (H)	$3,1 \times 10^5$	0	$6,4 \times 10^5$	$4,8 \times 10^6$

Максимум	$2,5 \times 10^6$	$9,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7$
Среднее	$3,1 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$
Стандартное отклонение	$6,3 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$4,2 \times 10^6$
Стандартная ошибка среднего	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$
Относится ли совокупность данных к распределению Гаусса (нормальное распределение)?	Нет (тест нормальности Шапиро-Уилка)	Нет (тест нормальности Шапиро-Уилка)	Нет (тест нормальности Шапиро-Уилка)

13 матерей (35%) были TTV-отрицательными, и среди их детей (средний возраст 59 дней) лишь один младенец в возрасте 3,5 месяцев (на рисунке 3 не представлен) показал наличие TTV с вирусной нагрузкой $2,6 \times 10^4$ в образце крови. Это можно объяснить двумя гипотезами: 1) мать могла быть положительна к нескольким типам TTV и передала своему ребенку вариант TTV, ставший доминирующим у него, 2) не исключен вариант того, что мать к моменту родов имела низкий уровень вирусной нагрузки TTV и, соответственно, вирус, обнаруженный у ребенка, может иметь происхождение из других источников (от других людей). Описание подобных случаев встречается в литературе. Так, например, в исследовании (Bagaglio S. et al., 2002) один ребенок был TTV-положительным при рождении и оставался таким в течение 9 месяцев, однако у его матери при родах доминирующий генотип TTV был отличным от генотипа TTV ребенка; при этом автор указывает на возможность эволюции TTV у плода. В исследовании (Biagini P. et al., 2003) авторы показали, что штамм TTV, обнаруженный у новорожденного, был приобретен от матери во время родов или в послеродовом периоде, но отличался от доминирующего штамма TTV, обнаруженного у матери. Можно предположить, что штаммы TTV обладают разным потенциалом передачи между людьми. В статье (Biagini P. et al., 2003) приводятся доказательства того, что симптомы доброкачественного «вирусного» ринита включая четкие выделения из носа у новорожденного в определенный момент, связаны с выявлением TTV в слюне новорожденного.

В литературе имеются данные о генетической идентичности TTV матерей и их детей. Были исследованы парные образцы мать-ребенок и показано, что анализ последовательностей TTV от 2 из 5 TTV-положительных пар мать-ребенок подтвердил генетическую связь между TTV матерей и их младенцев (Zhong M. et al., 2001). Вместе с тем, в исследовании (Bagaglio S. et al., 2002) показано, что послеродовое приобретение TTV младенцами в течение первых нескольких месяцев жизни примерно в половине случаев отличалось от материнских изолятов, выявленных во время родов. Также, в исследовании (Ohto

Н. et al., 2002) из 13 TTV-положительных пар мать-ребенок, 6 показали высокую степень сходства нуклеотидных последовательностей, тогда как для остальных 7-ми пар штаммы вируса матери и ребенка отличались. Еще в одном исследовании филогенетический анализ 7-ми пар мать-ребенок показал, что близкое генетическое родство штаммов было обнаружено лишь в 2-х парах мать-ребенок (Lin H.-H. et al., 2002). Все упомянутые исследования свидетельствуют, что вирусная нагрузка TTV материнской крови не была вероятным фактором риска передачи, позволяя предположить, что младенцы могут быть инфицированы TTV из других источников, не связанных с TTV их матерей.

В данной работе не был проведен филогенетический анализ штаммов TTV для пар мать-ребенок, однако показано, что не выявлена связь между уровнем вирусной нагрузки TTV матери и наличием TTV у ребенка. Это согласуется с исследованием (Mutlu D. et al., 2007), демонстрирующим отсутствие статистически значимой разницы в вирусной нагрузке TTV между матерями, передававшими, и не передававшими TTV своим детям. Вертикальная передача TTV от матери (трансплацентарно или при родах) может играть лишь частичную роль в раннем приобретении TTV у младенцев. В любом случае можно утверждать, что даже если вирус проходит трансплацентарный барьер, концентрация вируса в пуповинной крови крайне низка и не зависит от вирусной нагрузки TTV у матери.

Сравнение вирусной нагрузки TTV у недоношенных и доношенных младенцев в течение первых четырех месяцев после рождения

В ходе исследования вирусной нагрузки у 200 младенцев в течение первых 4-х месяцев после рождения лишь 42 (21%) младенца были TTV-положительными, в том числе 10 недоношенных младенцев (средний возраст 2 месяца) и 32 доношенных младенца (средний возраст 3 месяца). Один из детей (среди недоношенных) показал наличие TTV уже с 13-го дня после рождения, в то время как остальные дети стали TTV-положительными спустя месяц и более после рождения.

Среднее значение вирусной нагрузки TTV недоношенных и доношенных младенцев было почти одинаково ($1,4 \times 10^5$ и $1,5 \times 10^5$ коп/мл). Несколько дополнительных статистических показателей приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Статистические показатели по вирусной нагрузке TTV у недоношенных и доношенных младенцев.

Группы	Недоношенные	Доношенные
Объем выборки (n)	10	32
Минимум	$2,2 \times 10^3$	$3,8 \times 10^2$
25% процентиль (L)	$5,4 \times 10^3$	$7,5 \times 10^3$

Медиана (Me)	$7,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
75% процентиль (H)	$2,2 \times 10^5$	$4,7 \times 10^4$
Максимум	$5,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$
Среднее	$1,4 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
Стандартное отклонение	$1,8 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$
Стандартная ошибка среднего	$5,8 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$
Относится ли совокупность данных к распределению Гаусса (нормальное распределение)?	Нет (тест нормальности Шапиро-Уилка)	Нет (тест нормальности Шапиро-Уилка)

На рисунке 4 показана вирусная нагрузка TTV у недоношенных и доношенных младенцев.

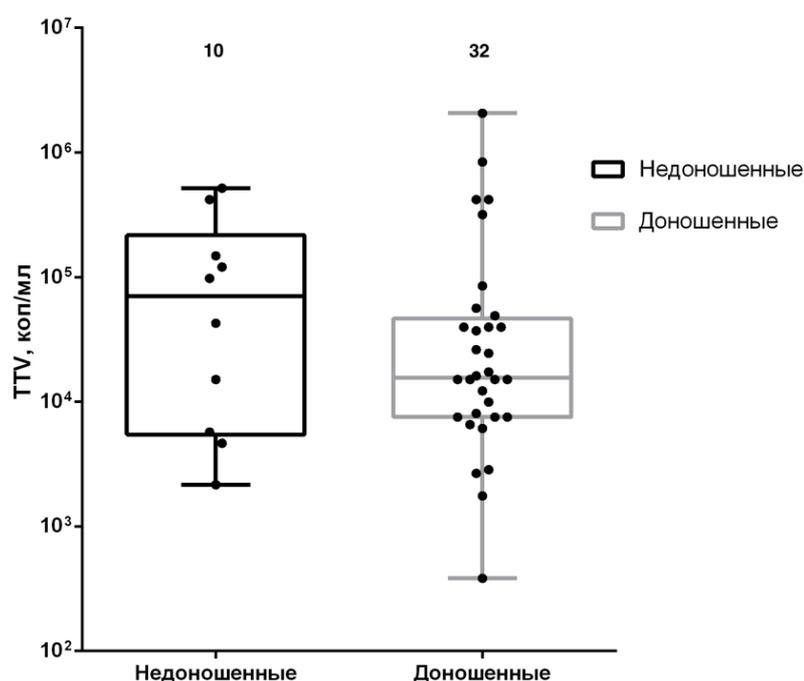


Рисунок 4 – Вирусная нагрузка TTV у недоношенных и доношенных младенцев. Числа над диаграммами представляют общее количество младенцев в каждой группе.

Статистически значимой разницы между группами недоношенных и доношенных младенцев не выявлено (тест Манна-Уитни, $p < 0,05$).

Количество детей, рожденных через естественные родовые пути (физиологические роды) и путем кесарева сечения (оперативные роды) было приблизительно одинаковым в этих двух группах (22 и 20 соответственно). При этом максимумы вирусной нагрузки в группах физиологических и оперативных родов были $2,1 \times 10^6$ коп/мл и $8,4 \times 10^5$ коп/мл соответственно (таблица 3).

Таблица 3 – Статистические показатели по вирусной нагрузке TTV в группах по способу родоразрешения.

Группы	Физиологические роды	Оперативные роды
Объем выборки (n)	22	20
Минимум	$1,8 \times 10^3$	$3,8 \times 10^2$
25% процентиль (L)	$7,5 \times 10^3$	$6,8 \times 10^3$

Медиана (Me)	$1,5 \times 10^4$	$3,8 \times 10^4$
75% процентиль (H)	$6,4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$
Максимум	$2,1 \times 10^6$	$8,4 \times 10^5$
Среднее	$1,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
Стандартное отклонение	$4,5 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$
Стандартная ошибка среднего	$9,5 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$
Относится ли совокупность данных к распределению Гаусса (нормальное распределение)?	Нет (тест нормальности Шапиро-Уилка)	Нет (тест нормальности Шапиро-Уилка)

Не выявлено статистически значимой разницы в вирусной нагрузке ТТV по способу родоразрешения (тест Манна-Уитни, $p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют, что вирусная нагрузка ТТV не зависит от способа родоразрешения (рисунок 5).

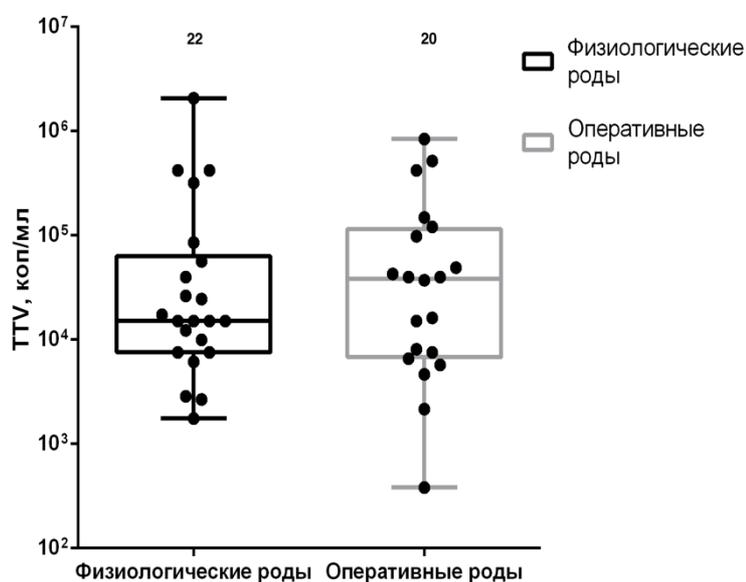


Рисунок 5 – Вирусная нагрузка ТТV по способу родоразрешения. Числа над диаграммами представляют общее число младенцев в каждой группе.

Хотя в данном исследовании не была выявлена зависимость вирусной нагрузки ТТV от способа родоразрешения, такая взаимосвязь была обнаружена авторами исследования (McCann A. et al., 2018), при этом они не наблюдали значимых различий в зависимости от типа вскармливания. Стоит отметить, что выявленная McCann разница вирусной нагрузки ТТV по способу родоразрешения была обнаружена для образцов ДНК, выделенных из фекалий младенцев.

На рисунке 6 показаны первоначальная вирусная нагрузка ТТV и вес ребенка при рождении.

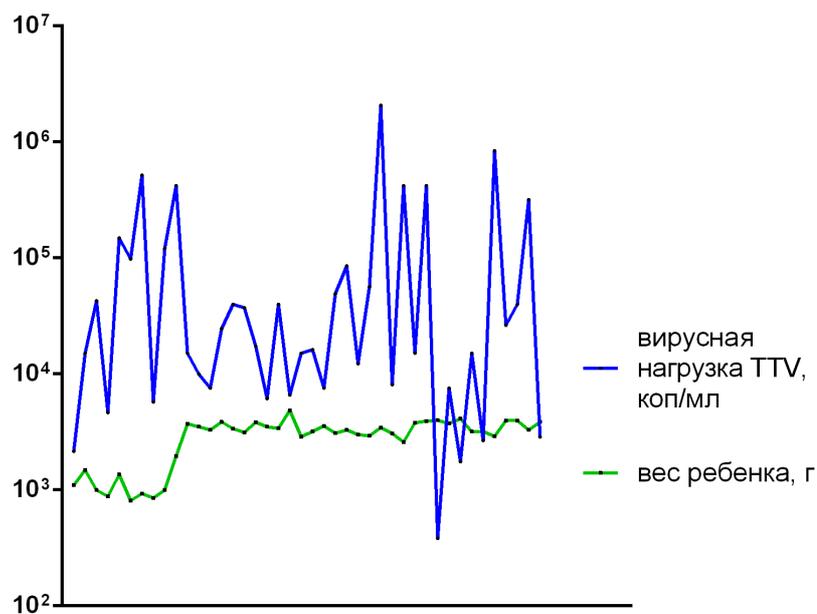


Рисунок 6 – Сравнение зависимости вирусной нагрузки 42 ТТV-положительных младенцев с весом при рождении.

Для определения зависимости двух групп переменных – вирусной нагрузки ТТV и веса ребенка при рождении был определен коэффициент корреляции: $r = -0,29$ (тест Спирмена, $p > 0,05$). Таким образом, вирусная нагрузка ТТV не зависит от веса ребенка при рождении.

Из 42 ТТV-положительных младенцев 14 были протестированы по меньшей мере 2 раза и показали наличие ТТV в повторном исследовании (рисунок 7). Ребенок, показавший вирусную нагрузку ТТV с 13 дня после рождения, был тестирован 11 раз через различные промежутки времени.

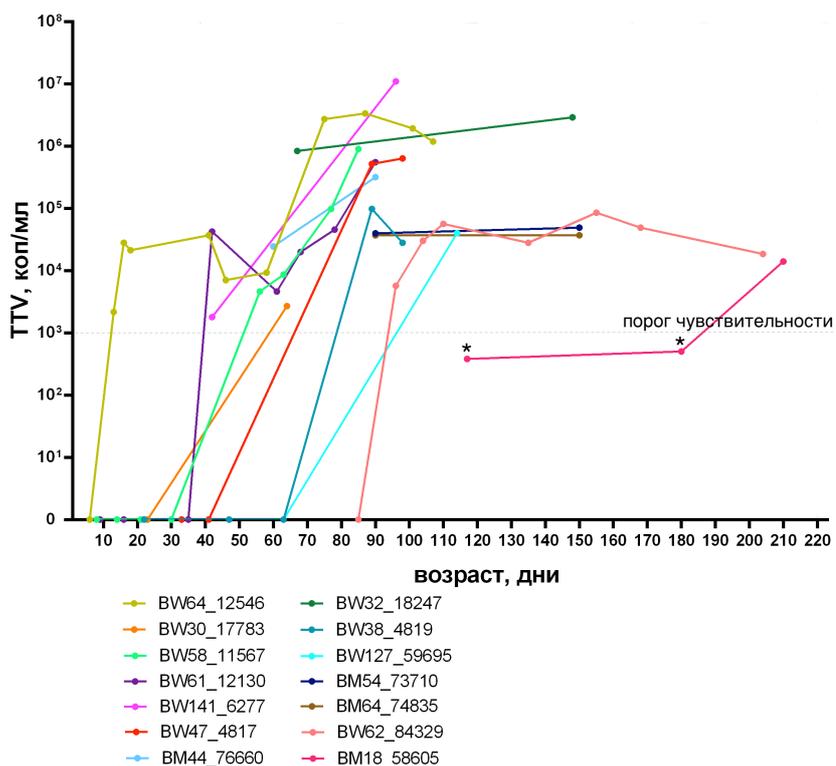


Рисунок 7 – Индивидуальная динамика вирусной нагрузки ТТV для 14 ТТV-положительных детей с несколькими временными точками. * – значения ниже порога чувствительности возможны вследствие неизбежной вариативности параметров теста.

Для четырнадцати повторно протестированных ТТV-положительных младенцев показана индивидуальная динамика вирусной нагрузки ТТV. Кривые на рисунке 7 показывают быстрый рост ТТV в образцах ДНК, выделенных из крови в течение первых недель жизни.

Активная пролиферация ТТV у младенцев регистрировалась через 6-8 недель (рисунок 8). Только у двух детей ТТV был обнаружен до 4 недель (с чувствительностью методики 1000 коп/мл). Доля ТТV-положительных образцов растет с 18% через 6 недель до 67% через 16 недель.

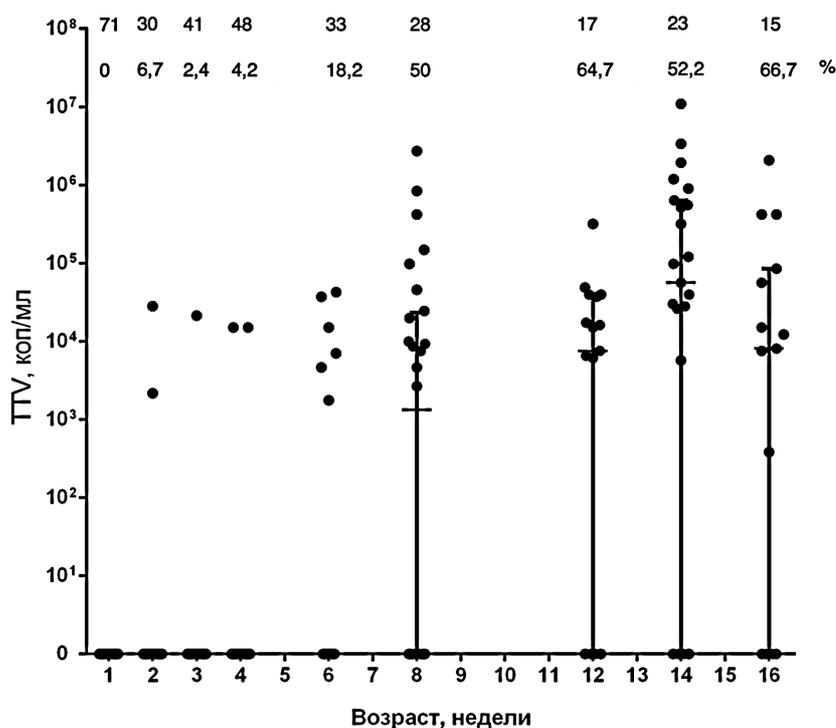


Рисунок 8 – Динамика вирусной нагрузки TTV в первые недели жизни (числа над каждой группой представляют общее количество протестированных образцов и процент положительных образцов TTV).

Обнаруженное в данной работе быстрое увеличение вирусной нагрузки коррелирует с предыдущими данными о распространенности ДНК TTV. Динамика вирусной нагрузки TTV у младенцев схожа с пролиферацией TTV у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, демонстрируя возможное совпадение внутриклеточных механизмов вирусной прогрессии (Albert E. et al., 2017; Wohlfarth P. et al., 2018).

Проанализировав вирусную нагрузку TTV в течение первых недель жизни у недоношенных и доношенных детей в зависимости от способа родоразрешения и веса ребенка при рождении, были получены первые признаки активной вирусной пролиферации уже через 6-8 недель. Статистически значимой разницы в вирусной нагрузке TTV для недоношенных и доношенных детей не выявлено.

Поскольку все дети находились на грудном вскармливании с рождения, за исключением недоношенных детей, получавших смесь первые несколько суток и затем переведенных на грудное вскармливание в разном возрасте, в зависимости от физиологического состояния и назначений врача в течение всего периода забора крови, определить зависимость вирусной нагрузки TTV по способу кормления не представлялось возможным. Однако по данным литературы грудное молоко часто TTV-положительно (23,3% и 67%) (Iso K. et al., 2001; Matsubara H. et al., 2001), вследствие чего грудное вскармливание может быть одним из путей передачи TTV младенцам. При этом результаты исследования (Kazi A. et al., 2000) демонстрируют отсутствие корреляции

вирусной нагрузки ТТV матерей с вирусной нагрузкой их детей, поскольку дети в возрасте 6-8 месяцев, рожденные как от ТТV-положительных, так и от ТТV-отрицательных матерей, выявили вирусную нагрузку 24% и 8% соответственно и это не может быть связано с внутриутробной передачей или передачей через грудное молоко, т.к. 99% образцов пуповинной крови были отрицательными и все матери воздерживались от грудного вскармливания.

Определение динамики вирусной нагрузки ТТV в течение первого года жизни здоровых детей

В рамках определения динамики вирусной нагрузки ТТV в течение первого года жизни здоровых грудных детей вирусная нагрузка ТТV цельной крови была определена для 98 детей в возрасте от 1 до 12 месяцев.

67% всех проанализированных образцов были ТТV-положительны (более 10^3 коп/мл на основе порога чувствительности) со средним значением 5×10^4 вирусных геномов на 1 мл крови (диапазон значений: $0 - 6 \times 10^6$ коп/мл).

В таблице 4 показано распределение вирусной нагрузки ТТV по возрасту. Обнаружена достоверная положительная корреляция между возрастом и медианой вирусной нагрузки ТТV, коэффициент корреляции: $r = 0,81$ (тест Пирсона, $p > 0,05$).

Таблица 4 – Распределение вирусной нагрузки ТТV по возрасту.

Возраст, месяцы	Среднее	Медиана	% ТТV-положительных образцов
1	$1,7 \times 10^3$	0	11
2	$7,7 \times 10^4$	$8,7 \times 10^3$	67
3	$3,1 \times 10^4$	$2,9 \times 10^3$	53
4	$2,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$	63
5	$4,3 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$	77
6	$9,0 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	61
7	$1,6 \times 10^5$	$9,8 \times 10^4$	100
8	$1,3 \times 10^5$	$4,4 \times 10^4$	70
9	$6,3 \times 10^5$	$3,1 \times 10^4$	90
10	$3,0 \times 10^5$	$5,6 \times 10^4$	83
11	$3,1 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	80
12	$1,4 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	100

Показанная на рисунке 9 динамика вирусной нагрузки ТТV в течение первого года жизни согласуется с динамикой вирусной нагрузки ТТV в первые недели жизни (рисунок 8).

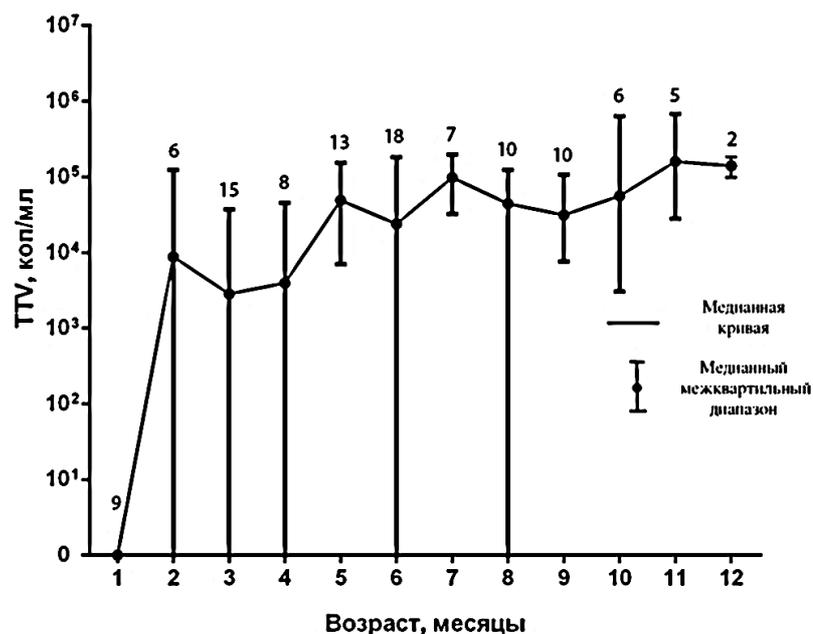


Рисунок 9 – Динамика вирусной нагрузки ТТV в течение первого года жизни (числа над каждой группой представляют общее количество протестированных образцов).

В двух похожих исследованиях продемонстрировано увеличение доли ТТV-положительных детей (по сыворотке крови) в первые месяцы жизни (Bagaglio S. et al., 2002; Komatsu H. et al., 2004). Результаты нашего исследования по цельной крови коррелируют с результатами по сыворотке, но с большей долей ТТV-положительных образцов (рисунок 10).

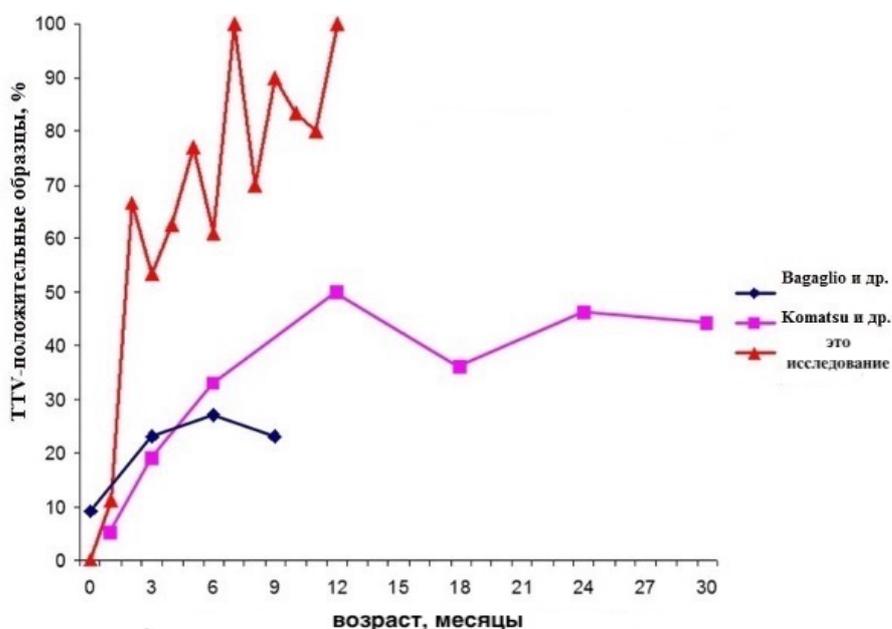


Рисунок 10 – Доля ТТV-положительных детей в первые месяцы жизни. Данные из Bagaglio S. et al., 2002 и Komatsu H. et al., 2004, основаны на анализе сыворотки крови.

Большую долю ТТV-положительных образцов при анализе цельной крови можно объяснить тем, что сыворотка содержит меньшее число клеточных элементов.

По динамике вирусной нагрузки TTV у детей первого года жизни результаты данной работы также согласуются с результатами (Ohto H. et al., 2002), где минимальный уровень инфицирования наблюдался в самом раннем возрасте и с возрастом (в 6 месяцев и 2 года) наблюдался рост распространенности TTV.

Выводы

1) TTV выявлен у 84% беременных женщин (максимум 3×10^7 , медиана 8×10^4 коп/мл) при чувствительности методики 10^3 коп/мл. Вирусная нагрузка TTV в плазме примерно в 100 раз ниже, чем в цельной крови, что указывает на преимущественно внутриклеточную локализацию вируса.

2) Продемонстрировано отсутствие трансплацентарной передачи TTV от матери плоду.

3) Вирусная нагрузка TTV у ребенка не зависит от вирусной нагрузки матери.

4) Не обнаружено статистически значимой разницы в вирусной нагрузке TTV у доношенных и недоношенных детей, а также по способу родоразрешения и весу ребенка при рождении.

5) Вирусная нагрузка TTV увеличивается в течение первых месяцев жизни здоровых грудных детей, достигая плато через 3-6 месяцев с сильной пролиферацией в течение первых 6-8 недель от рождения. При этом первые признаки активной пролиферации вируса можно обнаружить через 1-2 недели от рождения.

6) Разработаны три тест-системы для дифференциальной количественной диагностики вирусов TTV, TTMV и TTMDV семейства *Anelloviridae*.

Практические рекомендации

1. Разработанные и внедренные в серийное производство тест-системы для дифференциальной количественной диагностики вирусов TTV, TTMV и TTMDV семейства *Anelloviridae* могут быть использованы для выявления клинической значимости трех основных вирусных групп семейства *Anelloviridae* в любых когортах пациентов. Рекомендуется сравнение вирусной нагрузки TTV у здоровых пациентов (контрольная группа) и у пациентов с различными заболеваниями/осложнениями, а также исследование вирусной нагрузки TTV у беременных женщин в динамике по триместрам.

2. Рекомендуется создание клиничко-диагностической базы данных пациентов, включающих результаты клиничко-лабораторного обследования пар

мать-ребенок на три различных генетических варианта TTV (TTV, TTMV и TTMDV). Диагностика различных вариантов TTV в образцах крови, слюны и грудного молока в парах мать-ребенок позволит выявить штаммы, обладающие более высоким потенциалом трансмиссии.

Перспективы дальнейшей разработки темы

1. Дальнейшее изучение TTV может углубить понимание механизмов репликации вируса и роли TTV в вирусе человека. Особый интерес представляет исследование вируса беременных женщин и новорожденных. В ходе анализа вируса беременных женщин и детей грудного возраста могут быть получены новые данные о взаимосвязи TTV с иммунитетом, что в перспективе может позволить использовать этот вирус в качестве маркера состояния иммунитета и / или маркера какого-либо патологического состояния при беременности.

2. Целесообразным представляется изучение генома TTV матерей и их детей с целью выявления различий вирусных изолятов. Это позволит уточнить данные о влиянии материнского TTV на приобретение TTV младенцами в постнатальном периоде. Можно рекомендовать сравнение генотипов TTV, обнаруженных в различных биологических образцах (крови, слюны, грудного молока).

3. В последнее время активно развиваются вирусные системы доставки лекарств. Это крайне актуально при лечении рака и при генотерапии наследственных заболеваний. Белок TTV TAIP можно использовать в качестве целевой системы доставки лекарств, поскольку он обладает свойством индуцировать апоптоз в раковых клетках (Kooistra K. Et al., 2004). К тому же локализация генома TTV во всех типах клеток (в особенности в кроветворных) будет способствовать продолжительности экспрессии трансгенов в активно делящихся клетках. Доставка исправленных генов с помощью TTV может осуществляться в различные места организма в зависимости от клеток-мишеней. Так, например, локализация TTV преимущественно в лимфоцитах и гепатоцитах открывает широкие возможности для доставки терапевтических генов в эти ткани с целью лечения таких моногенных заболеваний как иммунодефициты (аденозиндезаминаза, пуриноклеозидфосфоорилаза), эмфизема легких (альфа-1-антитрипсин); семейная гиперхолестеринемия (рецептор липопротеинов низкой плотности), фенилкетонурия (фенилаланингидроксилаза), гипераммонемия (орнитинтранскарбамилаза), цитрулинемия (аргиносукцинатсинтетаза) и др.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Щербакова С. М., Тыщик Е. А. Исследование вирусной нагрузки Torque teno virus у рожениц и трансплацентарной передачи вируса // Сборник тезисов XII Международной (XXI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – 2017. – С. 143 – 144.
2. Tyschik E. A., Shcherbakova S. M., Ibragimov R. R., Rebrikov D. V. Transplacental transmission of torque teno virus // **Virology Journal**, 2017 Vol 14: 92. doi: 10.1186/s12985-017-0762-0. Scopus
3. Tyschik E. A., Rasskazova A. S., Degtyareva A. V., Rebrikov D. V., Sukhikh G. T. Torque teno virus dynamics during the first year of life // **Virology Journal**, 2018 Vol 15: 96. doi: 10.1186/s12985-018-1007-6. Scopus
4. Лоломадзе Е. А. Способ выявления ДНК Torque teno virus рода Alphatorquevirus семейства Anelloviridae в крови и других биоматериалах методом ПЦР-РВ / Е. А. Лоломадзе, Д. В. Ребриков // Патент на изобретение № 2715315. Зарегистрировано в Роспатенте 26.02.2020.
5. Лоломадзе Е. А. Способ выявления ДНК Torque teno midi virus рода Gammatorquevirus семейства Anelloviridae в крови и других биоматериалах методом ПЦР-РВ / Е. А. Лоломадзе, Д. В. Ребриков // Патент на изобретение № 2715860. Зарегистрировано в Роспатенте 03.03.2020.
6. Лоломадзе Е. А. Способ выявления ДНК Torque teno mini virus рода Betatorquevirus семейства Anelloviridae в крови и других биоматериалах методом ПЦР-РВ / Е. А. Лоломадзе, Д. В. Ребриков // Патент на изобретение № 2717336. Зарегистрировано в Роспатенте 23.03.2020.
7. Lolomadze E. A., Rebrikov D. V. Constant companion: clinical and developmental aspects of torque teno virus infections // **Archives of Virology**. – 2020, Vol 165, № 12. – P. 2749 – 2757. doi: 10.1007/s00705-020-04841-x. Scopus
8. Lolomadze E. A., Degtyareva A. V., Rebrikov D. V. The newborns Torque teno virus dynamics depending on the term, feeding type and maternal viral load // **Acta Virologica**. – 2021, Vol 65, № 3. – P. 307 – 312. doi: 10.4149/av_2021_306. Scopus

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

т.п.н. – тысячи пар нуклеотидов

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

TAIP – TTV-производный белок, вызывающий апоптоз (TTV-derived apoptosis-inducing protein)

TTMDV – торктено мидивирус (Torque teno midivirus)

TTMV – торктено минивирус (Torque teno minivirus)

TTV – торктено вирус (TT-virus, Torque teno virus)