

doi 10.18699/vjgb-26-12

Однонуклеотидные полиморфизмы в геномах вирусов клещевого энцефалита и Западного Нила при тройной природной инфекции у садовой камышовки (*Acrocephalus dumetorum*)

Е.П. Пономарева ¹ , В.А. Терновой ¹, Е.В. Протопопова ¹, Н.А. Тупота ¹, В.Б. Локтев ^{1, 2}¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия ponomareva_ep@vector.nsc.ru

Аннотация. Вовлечение различных видов диких птиц в формирование природных очагов вирусов клещевого энцефалита (ВКЭ) и Западного Нила (ВЗН) обеспечивает быстрое распространение этих ортофлавирусов в различных географических районах и формирование новых природных очагов данных инфекций. Однако роль популяционной variability ВКЭ и ВЗН в формировании природных очагов, возможность появления (селекции) новых вирусных вариантов, патогенных для человека, в этих природных очагах остаются еще недостаточно изученными. Цель настоящего исследования – оценить популяционную гетерогенность геномов ВКЭ сибирского и дальневосточного генотипов и ВЗН, которые были одновременно выделены из тканей одной особи садовой камышовки (*Acrocephalus dumetorum*), отловленной в природных ландшафтах пригорода Томска. С этой целью были использованы методы выделения вирусных штаммов на различных культурах клеток в сочетании с анализом полных вирусных геномов полученных изолятов, определенных методами традиционного и высокопроизводительного секвенирования (NGS). Консенсусные полногеномные нуклеотидные последовательности вирусов получали секвенированием по Сэнгеру и сравнивали с последовательностями, полученными методом NGS, с однонуклеотидными заменами (single nucleotide variant, SNV) 2 % и выше, в пределах изучаемой популяции. Обнаруженный однонуклеотидный полиморфизм (SNP) ассоциировался как с синонимичными, так и несинонимичными нуклеотидными заменами преимущественно локализующихся в генах неструктурных белков ВКЭ и ВЗН. При этом возможных рекомбинационных событий в геномах изолированных ортофлавирусов обнаружить не удалось. Результаты показали, что изоляты ВЗН Tomsk/bird/2006/A4, ВКЭ RT12 и RT122, выделенные из *A. dumetorum*, представлены гетерогенными вирусными популяциями, в которых обнаруживаются множественные SNV, возникающие с частотой от 1.75 до 19.88 % для ВЗН и от 2.08 до 23.73 % для ВКЭ. Для большинства выявленных SNP найдены аналогичные нуклеотидные замены в геномах уже известных штаммов ВКЭ и ВЗН, что может свидетельствовать о важной роли этих SNV-спектров в вирусной адаптации и обеспечении генетического и фенотипического разнообразия этих вирусов в природе.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; вирус Западного Нила; однонуклеотидный полиморфизм; вирусный геном; высокопроизводительное секвенирование; садовая камышовка; ортофлавирусы

Для цитирования: Пономарева Е.П., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Тупота Н.А., Локтев В.Б. Однонуклеотидные полиморфизмы в геномах вирусов клещевого энцефалита и Западного Нила при тройной природной инфекции у садовой камышовки (*Acrocephalus dumetorum*). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(1):117-125. doi 10.18699/vjgb-26-12

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания 7/21 и 9/21 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Благодарности. Авторы выражают глубокую благодарность  А.Н. Швалову и  Т.П. Микрюковой за помощь в проведении экспериментов, секвенировании и выполнении анализа вирусных геномов.

Single nucleotide polymorphisms are typical for tick-borne encephalitis and West Nile viruses during triple natural mixed infections in Blyth's reed warbler (*Acrocephalus dumetorum*)

Е.П. Ponomareva ¹ , V.A. Ternovoi ¹, E.V. Protopopova ¹, N.L. Tupota ¹, V.B. Loktev ^{1, 2}¹ State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia ponomareva_ep@vector.nsc.ru

Abstract. Wild bird species contribute significantly to the rapid geographic dissemination of tick-borne encephalitis viruses (TBEV) and West Nile virus (WNV), facilitating the establishment of new natural foci of these *orthoflaviviruses*. However, the impact of TBEV and WNV population variability on shaping these foci, as well as the potential emergence of new human-pathogenic viral variants, remain underexplored. This study aimed to assess the genetic heterogeneity of TBEV (Siberian and Far Eastern genotypes) and WNV, isolated simultaneously from the tissues of a single garden reed warbler (*Acrocephalus dumetorum*) collected in the suburbs of Tomsk. The methods of viral strain isolation on various cell cultures were used in combination with a whole-genome analysis of isolates through traditional and high-throughput sequencing (NGS) methods. Consensus full-genome nucleotide sequences of the viruses were obtained by Sanger sequencing and compared with those obtained by NGS, with single nucleotide substitutions (single nucleotide variants, SNVs) accounting for 2 % or higher within the population under study. Our findings revealed single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with both synonymous and non-synonymous nucleotide substitutions, primarily located within the non-structural protein genes of TBEV and WNV. Notably, recombination events were not detected in the genomes of isolated *orthoflaviviruses*. The WNV isolate, Tomsk/bird/2006/A4, and the TBEV isolates, PT12 and PT122, obtained from *A. dumetorum*, exhibited heterogeneous viral populations, with SNVs ranging in frequency from 1.75 to 19.88 % for WNV and from 2.08 to 23.73 % for TBEV. Most identified SNPs shared similar nucleotide substitutions in the genomes of already known strains of TBEV and WNV, suggesting that these SNVs could play a crucial role in viral adaptation and underscore the genetic and phenotypic diversity of these viruses in nature.

Key words: tick-borne encephalitis virus; West Nile virus; single nucleotide polymorphism; viral genome; high-throughput sequencing; garden warbler; *orthoflaviviruses*

For citation: Ponomareva E.P., Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Tupota N.L., Loktev V.B. Single nucleotide polymorphisms are typical for tick-borne encephalitis and West Nile viruses during triple natural mixed infections in Blyth's reed warbler (*Acrocephalus dumetorum*). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(1):117-125. doi 10.18699/vjgb-26-12

Введение

Вирус клещевого энцефалита (*Orthoflavivirus encephaliti-dis*) и вирус Западного Нила (*Orthoflavivirus nilense*) относятся к семейству *Flaviviridae*, роду *Orthoflavivirus* (Current ICTV Taxonomy Release; Postler et al., 2023). Вирусы клещевого энцефалита (ВКЭ) и Западного Нила (ВЗН) способны вызывать заболевания человека, которые могут привести к развитию тяжелых поражений центральной нервной системы (Woraku, 2023; Singh et al., 2024). Вирусы формируют природные очаги, а человек, как правило, заражается через укус комара (ВЗН) или клеща (ВКЭ). Природные очаги ВКЭ характерны для северной Евразии, а ВЗН распространен фактически глобально (Pustijanac et al., 2023; Simonin, 2024). На территории юга Западной Сибири отмечена одновременная циркуляция этих двух ортофлавивирусов (Терновой и др., 2004; Кононова и др., 2006).

Для ВКЭ и ВЗН характерно генетическое разнообразие, так, для ВКЭ описано существование не менее пяти основных генотипов, а для ВЗН – по меньшей мере девяти генотипов (Dai et al., 2018; Kozlova et al., 2018; Simonin, 2024). Уровень нуклеотидных различий между разными генотипами может достигать 18–20 %. Для сибирского региона характерна циркуляция сибирского и дальневосточного генотипов ВКЭ и генотипа 1a ВЗН.

Современные методы высокопроизводительного секвенирования дают возможность выявить наличие SNP (однонуклеотидный полиморфизм) в относительно небольших вирусных популяциях. Так, исследование наличия SNV (single nucleotide variant) в популяциях адаптированного к различным условиям культивирования штамма ЕК-328 ВКЭ и его клонированных вариантов показало, что SNV возникают с частотой около 1 % в популяциях лабораторного штамма ВКЭ (Litov et al., 2018). Это позволило предположить, что существование минорных SNV ВКЭ обеспечивает микроэволюцию и возможность быстрой

адаптации вирусной популяции к изменению условий даже при культивировании в лабораторных условиях. Данную гипотезу подтвердили исследования по изменчивости генома штамма С11-13 ВКЭ сибирского генотипа при культивировании в лабораторных условиях (Ternovoi et al., 2024). Наличие однонуклеотидного полиморфизма также описано в геномах вирусов Зика, денге, японского энцефалита и ВЗН (Kaiser et al., 2019; Zaráte et al., 2019; Borda et al., 2021). Однако попытка использования SNP, характерных для гена белка Е вакцинного штамма вируса японского энцефалита с целью аттенуации ВЗН не принесла успеха. Было высказано предположение, что профиль SNP характерен для каждого вида ортофлавивирусов.

Ранее участие диких птиц в циркуляции ВКЭ и ВЗН в Томской и Новосибирской областях было показано для 42 из 60 исследованных видов птиц (Mikryukova et al., 2014; Moskvitina et al., 2014; Korobitsyn et al., 2021). Причем у птиц и клещей, снятых с них, отмечено наличие микстинфекций в 2.13 % случаев для клещей и до 39 % для птиц. Такое видовое разнообразие птиц, обеспечивающее циркуляцию ВКЭ и ВЗН в природных условиях, закономерно ставит вопрос о механизмах адаптации этих ортофлавивирусов к новому хозяину. Было высказано предположение, что вовлечение различных видов диких птиц в формирование природных очагов ВКЭ и ВЗН обеспечивает быстрое распространение этих ортофлавивирусов в разных географических районах и формирование новых природных очагов данных инфекций. Однако роль популяционной variability ВКЭ и ВЗН в формировании природных очагов, возможность появления (селекции) новых вирусных вариантов, патогенных для человека в этих природных очагах, остаются еще недостаточно изученными.

В настоящем исследовании мы попытались оценить популяционную гетерогенность геномов ВЗН и ВКЭ в тканях одной садовой камышовки, которая была ранее отлов-

лена в пригороде Томска. С этой целью мы применили методы выделения вирусных штаммов на различных культурах клеток в сочетании с анализом полных вирусных геномов полученных изолятов, определенных методами традиционного и высокопроизводительного секвенирования.

Материалы и методы

Исследованные образцы – объединенный 10 % гомогенат селезенки и печени садовой камышовки (*Acrocephalus dumetorum*), отловленной в Томской области в 2006 г. (Mikryukova et al., 2014). Для изоляции ортофлавивирусов использовали клеточные культуры почки эмбриона свиньи (СПЭВ) и комара *Aedes albopictus* (С6/36), полученные из коллекции клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Клеточные культуры культивировали с помощью среды DMEM/F12 (ГНЦ ВБ «Вектор», РФ), содержащей 10 % сыворотки плода коровы (Gibco, США) и 80 мкг/мл сульфата гентамицина, при 37 °С для клеток СПЭВ и 28 °С для клеток С6/36.

Определение инфекционной активности вирусных изолятов проводили по развитию цитопатогенного действия. С этой целью клетки СПЭВ рассеивали в 96-луночные культуральные микропланшеты в количестве 10⁵ клеток в объеме 50 мкл на лунку и осуществляли заражение вирусосодержащим материалом. Вирусы титровали в среде DMEM/F12 с содержанием 2 % сыворотки плода коровы, в объеме 100 мкл на лунку. Результат учитывали через пять суток с вычислением инфекционного титра вирусов, как описано в статье (Svatchenko et al., 2021).

Иммуноферментный анализ. Выявление антигенов ВКЭ и ВЗН в культуральной среде проводили с использованием в качестве подложки мышинных моноклональных антител 13F6 против ВКЭ и 9E2 против ВЗН (Razumov et al., 2005; Shanshin et al., 2024). Связавшийся антиген находили при помощи моноклональных антител 10Н10 (ВКЭ) и 5Н6 (ВЗН), меченных биотином и стрептавидин-пероксидазным конъюгатом (ICN, США), как описано ранее (Korobitsyn et al., 2021).

Пробоподготовка. После обработки бензоназой (Law et al., 2013) тотальную РНК экстрагировали с помощью набора «Реагент Extract RNA» («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Построение первой цепи ДНК выполняли с использованием набора MMLV RT kit («Евроген») согласно инструкции производителя. Постановку ПЦР осуществляли с помощью «БиоМастер LR HS-ПЦР» («BioLabMix», Россия) с праймерами для выявления РНК-вируса клещевого энцефалита и вируса Западного Нила соответственно (Приложения 1 и 2)¹. Режим проведения ПЦР (амплификатор С1000, Bio-Rad, США): 94 °С – 10 с, 58 °С – 20 с, 72 °С – 30 с (40 циклов), 72 °С – 7 минут.

Электрофоретический анализ и выделение фрагментов вирусной ДНК из геля. Продукты амплификации анализировали в 2 % агарозном геле в буфере TAEх1 (40 mM Трис, 1 mM Na₂ЭДТА). Для выделения продуктов

амплификации из агарозного геля применяли набор diaGene («Диаэм», Россия).

Определение нуклеотидных последовательностей вирусной кДНК. Определение нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации осуществляли при использовании автоматического генетического анализатора ABI 3130xl (Applied Biosystems (США), BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit) и набора реактивов Applied Biosystems (США) согласно инструкции производителя. Выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли при помощи приложения Lasergene 7 (DNASTAR).

Синтез первой цепи кДНК для NGS проводили с применением модуля NEBNext® Ultra Directional (NEB). Синтез второй цепи осуществляли при использовании UMI Second Strand Synthesis Module for QuantSeq FWD (Illumina, Lexogen, Австрия). Cutadapt (версия 1.18) и SAMtools (версия 0.1.18) использовали для удаления адаптеров Illumina и повторного чтения. Контиги были собраны *de novo* с применением ассемблера MIRA (версия 4.9.6).

Нуклеотидные последовательности сравнения были взяты из базы данных GenBank. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили при помощи приложения AlignX, программного пакета Vector NTI 11 (InforMax, США). Анализ полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программ Unipro UGENE v.1.30 и MEGA 7/10 (Kumar et al., 2018). Филогенетические деревья рассчитаны по методу максимального правдоподобия с использованием 1000 реплик бутстрапов.

Результаты

В нашей работе задействован объединенный образец из печени и селезенки садовой камышовки (*A. dumetorum*), отловленной в Томской области в 2006 г. (Mikryukova et al., 2014). На рис. 1 представлена схема выделения вирусных изолятов из данного образца на культурах клеток С6/36 и СПЭВ.

Уже после проведения двух пассажей было зарегистрировано первое появление цитопатогенного эффекта, которое, предположительно, связано с репликацией ВКЭ. Однако после семи дополнительных пассажей в пробе обнаружены антиген и генетический материал ВЗН и ВКЭ. Пассирование инфекционного материала в клетках комара С6/36 позволило получить чистую культуру ВЗН. Дополнительные пассажи этого же материала на клетках СПЭВ фактически элиминировали популяцию ВЗН и сформировали стабильную популяцию вируса клещевого энцефалита.

Секвенирование образцов дало возможность определить нуклеотидные последовательности геномов для двух изолятов ВКЭ (РТ12 и РТ122) и одного изолята ВЗН (Tomsk/bird/2006/А4). Филогенетический анализ полногеномных последовательностей показал, что изолят РТ12 относился к дальневосточному генотипу ВКЭ, а изолят РТ122 представлен сибирским генотипом ВКЭ. Изолят Tomsk/bird/2006/А4 был генотипирован как вирус, относящийся к генотипу Ia ВЗН (Приложение 3).

¹ Приложения 1–4 см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx8.pdf>

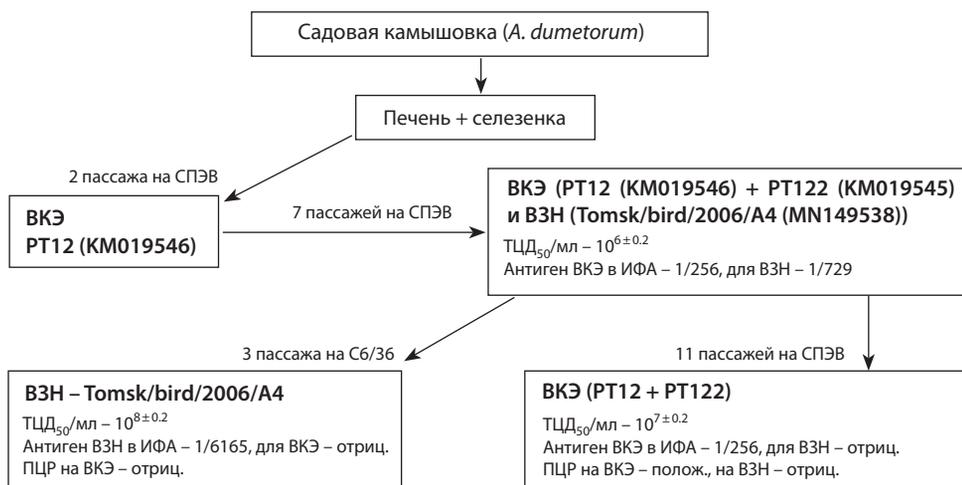


Рис. 1. Схема выделения изолятов ВКЭ и ВЗН из объединенного гомогената селезенки и печени садовой камышовки на культурах клеток.

По мере проведения пассажей на клеточных культурах в каждом отмеченном на схеме блоке выполнялись определение инфекционной активности, наличия вирусного антигена в ИФА с помощью моноклональных антител, проведение ПЦР и секвенирование образца методами Сэнгера и высокопроизводительного секвенирования, как описано в разделе «Материалы и методы».

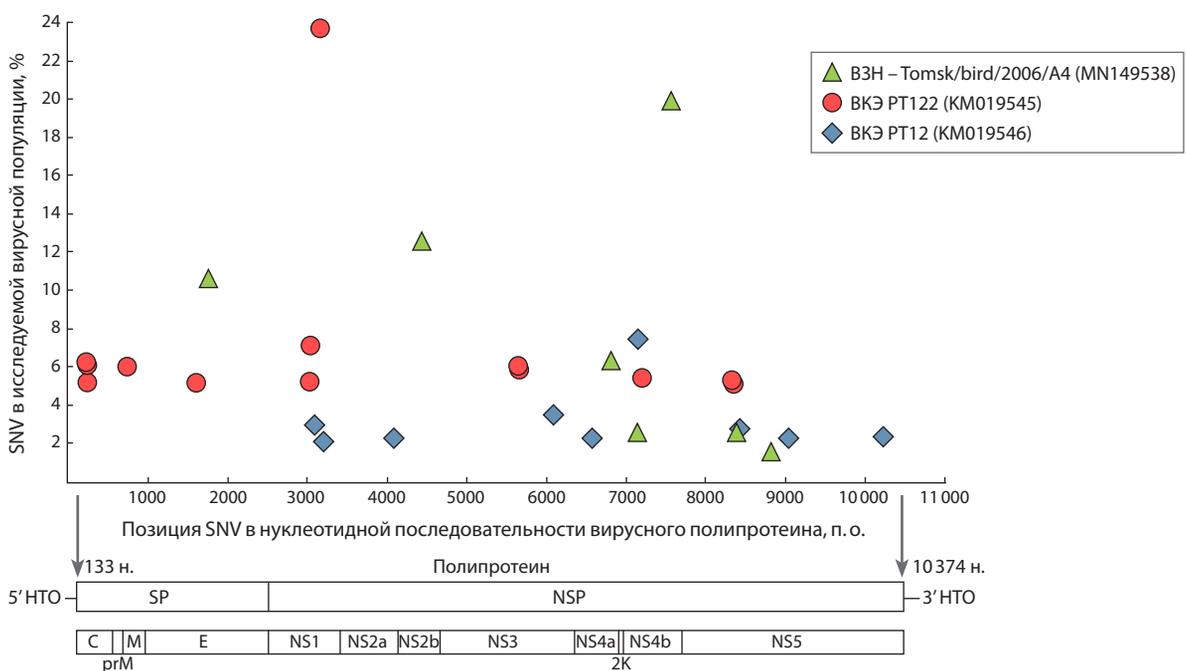


Рис. 2. Картирование однонуклеотидных замещений в геномах ВКЭ и ВЗН методом высокопроизводительного секвенирования.

Анализ набора нуклеотидных последовательностей в результате высокопроизводительного секвенирования позволил выявить наличие SNV в вирусных популяциях. Обнаруженные однонуклеотидные замены, возникающие с частотой 1.75 % и выше, для трех исследованных вирусных популяций представлены на рис. 2.

Полученные результаты показали, что изоляты ВЗН Tomsk/bird/2006/A4 и ВКЭ – PT12 и PT122, выделенные из *A. dumetorum*, представлены гетерогенными вирусными

популяциями, в которых обнаруживаются множественные SNV, возникающие с частотой от 1.75 до 19.88 % для ВЗН и от 2.08 до 23.73 % для ВКЭ (см. таблицу). Выявленные SNP картируются на протяжении всего вирусного генома как в генах структурных вирусных белков, так и в генах неструктурных белков. При этом изолят PT12 дальневосточного генотипа ВКЭ был полностью лишен SNV в области генома, кодирующей структурные белки вириона. Наибольшее количество SNP в этом районе генома обна-

Однонуклеотидные замещения в геномной РНК ВЗН и ВКЭ при ассоциированной инфекции у *A. dumetorum*

№ п/п	Позиция в нуклеотидной последовательности вирусного полипротеина, п.о.	Превалирующий нуклеотид/SNV в исследуемой вирусной популяции	Частота возникновения SNP, %	Прототипные штаммы вирусов клещевого энцефалита и Западного Нила (номера доступа GenBank) с выявленными аналогичными нуклеотидными замещениями в геномах	Ген	Аминокислотная замена
ВКЭ РТ12 (KM019546), дальневосточный генотип						
1	3093	C/T	2.95	JF819648 JN229223 JN003205 и др.	NS1	Y ₁₀₃₁ Y
2	3201	T/C	2.08	KF880803 KU761572 EU816451 и др.		D ₁₀₆₇ D
3	4083	T/C	2.23	JQ825154 EF469661 KY069125 и др.	NS2a	S ₁₃₆₁ S
4	6087	C/T	3.48	JN003205 AF069066 KP716978 и др.	NS3	T ₂₀₂₉ T
5	6572	T/C	2.23	JF819648 JN003205 JN003206	NS4a	M ₂₁₉₁ T
6	7150	G/T	7.41	Нет	NS4b	V ₂₃₈₃ L
7	8430	C/T	2.76	JQ825147 JQ650523 JX534167 и др.	NS5	H ₂₈₁₀ H
8	9038	G/A	2.27	KJ633033 DQ862460 KF880803 и др.		G ₃₀₁₃ E
9	10217	A/C	2.33	Нет		E ₃₄₀₆ A
ВКЭ РТ122 (KM019545), сибирский генотип						
1	218	T/C	6.32	EU816451 KT321430 JN003208 и др.	C	V ₇₃ A
2	231	A/G	6.10	JQ825155 DQ862460 OP902895 и др.		K ₇₇ K
3	234	C/T	5.18	KJ626343 JX498939 JN003205 и др.		I ₇₈ I
4	732	C/T	6.01	JQ825147 FJ402886 JF819648 и др.	preM	N ₂₄₄ N
5	1605	T/C	5.17	JN003207 EF469661 AF069066 JQ650523 и др.	E	Y ₅₃₄ Y
6	3027	C/T	5.22	KJ000002 KJ739729 KC414090 FJ572210 и др.	NS1	D ₁₀₀₉ D
7	3031	G/C	7.09	FJ968751		A ₁₀₁₁ P
8	3159	A/C	23.73	U27495 KP716978 KJ922516 KY069125 и др.		T ₁₀₅₃ I
9	5643	C/T	6.05	KJ633033 EU816451 JQ825147 и др.	N NS3	N ₁₈₈₁ N
10	5658	G/A	5.86	KJ922516 KC414090 MF774565 и др.		E ₁₈₈₆ E

Окончание таблицы

№ п/п	Позиция в нуклеотидной последовательности вирусного полипротеина, п.о.	Превалирующий нуклеотид/SNV в исследуемой вирусной популяции	Частота возникновения SNP, %	Прототипные штаммы вирусов клещевого энцефалита и Западного Нила (номера доступа GenBank) с выявленными аналогичными нуклеотидными замещениями в геномах	Ген	Аминокислотная замена
БКЭ РТ122 (KM019545), сибирский генотип						
11	7194	C/T	5.42	MF774565 KJ633033	NS4b	V ₂₄₉₈ V
12	8220	C/T	5.20	JN003208 KF826914 JQ654701 и др.	NS5	N ₂₇₄₀ N
13	8238	C/T	5.15	KU761572 JQ825155 KP716978 и др.		N ₂₇₄₆ N
ВЗН Tomsk/bird/2006/A4 (MN149538), генотип 1a						
1	1748	A/G	10.55	KX547363 KX547219 MH507756 и др.	E	E ₅₈₃ G
2	4434	C/T	12.58	AF196835 EF657887 AF404754 и др.	NS2b	C ₁₄₇₈ C
3	6807	C/T	6.29	AY262283 DQ786572	2k	S ₂₂₆₉ S
	7149	G/T	2.52	AF196835 EF657887 AF404754 и др.	NS4b	V ₂₃₈₃ V
5	7566	C/A	19.88	KJ958922 GQ851607 GQ851608 и др.		D ₂₅₂₂ E
6	8388	G/A	2.55	AY701413 JN858069 GQ851607 и др.	NS5	G ₂₇₉₆ G
7	8907	C/T	1.75	FJ766332		R ₂₉₆₉ R

Примечание. Темно-серым фоном выделены несинонимичные нуклеотидные замены; светло-серым – отсутствие прототипных штаммов с выявленными аналогичными нуклеотидными замещениями в геномах. Обозначения аминокислот указаны в соответствии с общепринятым международным однобуквенным кодом. SNV/SNP – однонуклеотидные замены (single nucleotide variant)/однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism). Нуклеотиды: A, T, C, G – аденин, тимин, цитозин и гуанин соответственно.

ружено для сибирского генотипа вируса клещевого энцефалита.

Интересно отметить, что все 29 выявленных SNP в трех изолятах ортофлавивирусов были оригинальными. Это показывает, что обнаруженный спектр SNV характерен и специфичен для исследованных вирусных популяций БКЭ и ВЗН в одном инфицированном хозяине, что косвенно подтверждается ранее полученными данными по несовпадению спектров SNV для вакцинного штамма вируса японского энцефалита и ВЗН (Kaiser et al., 2019). Однако при сборке полных геномов этих вирусов нам не удалось выявить наличие признаков рекомбинации протяженными фрагментами между выделенными изолятами БКЭ и ВЗН, которые были обнаружены в тканях одной дикой птицы. Уникальный паттерн SNV для всех трех изолятов подтверждает отсутствие рекомбинации при одновременной циркуляции трех вирусов в одном хозяине.

Наибольшее количество SNP (13) обнаружено для изолята РТ122 сибирского генотипа БКЭ, наименьшее – для ВЗН (7). Более 60 % SNP картировалось в генах, кодирующих неструктурные вирусные белки. Средняя пред-

ставленность частоты SNP в отношении консенсусной геномной последовательности составила 3.1 % для изолята РТ12 БКЭ (дальневосточный генотип), 7.1 % – для РТ122 БКЭ (сибирский генотип) и 8.0 % – для изолята ВЗН генотипа 1a (см. таблицу).

Примечательно, что для выявленных нами SNP были найдены аналогичные подтвержденные замены в геномах уже известных штаммов вирусов БКЭ и ВЗН. Только SNP₇₁₅₀ в белке NS4b и SNP₁₀₂₁₇NS5, картированные для дальневосточного генотипа БКЭ, не имели аналогов среди известных геномов БКЭ. Это позволяет предположить, что наличие идентичных нуклеотидных замен в геномах описанных ранее вирусных изолятов свидетельствует о неслучайном характере возникновения SNV и говорит об их потенциальной роли в обеспечении генетической изменчивости этих флавивирусов.

Обсуждение

Известно, что изоляты различных РНК-содержащих вирусов представляют собой, как правило, гетерогенную популяцию близкородственных вариантов, которую часто трак-

туют как квазивид (Eigen et al., 1988; Holland et al., 1992; Domingo, Holland, 1997; Domingo et al., 2012; Karbowiak et al., 2016). Вирусная популяция обычно представлена совокупностью большого количества вирусных частиц, ее размер может достигать 10^{10} – 10^{12} и более вирионов на инфицированный макроорганизм (Marí Saéz et al., 2015; Diallo et al., 2016; Thorson et al., 2016; Domingo et al., 2021). При этом для инфицирования чувствительного организма бывает достаточно всего нескольких вирусных частиц. Дальнейшая репликация РНК-содержащих вирусов в организме хозяина обеспечивает формирование гетерогенной вирусной популяции.

Гетерогенность квазивида может формироваться в силу целого ряда причин и приводить к появлению новых вирусных вариантов. Наиболее часто изменчивость вирусного РНК генома ассоциируется со значительным уровнем ошибок РНК полимеразы, что приводит к высокому уровню возникновения нуклеотидных замен; отсутствием механизмов коррекции (восстановления) нуклеотидной последовательности вирусной РНК; действием различных селективных факторов на вирусную популяцию при размножении в организме хозяина.

Ранее в городских и пригородных биотопах Томска была обнаружена одновременная циркуляция ВЗН и ВКЭ (Москвитина и др., 2008; Чаусов и др., 2009). Характерной особенностью природных очагов данных инфекций в этом регионе было участие более 42 видов диких птиц (Mikryukova et al., 2014; Moskvitina et al., 2014; Korobitsyn et al., 2021). При этом совместное присутствие в пробе генетических маркеров ВКЭ и ВЗН было зарегистрировано в 1.7 % исследованных проб. Известны также и другие случаи микст-инфекций, вызванных различными генотипами ВКЭ (Безрукова и др., 2008; Ковалев и др., 2008; Козлова и др., 2010; Погодина и др., 2012). Причем частота обнаружения разных подтипов ВКЭ в иксодовом клеще может достигать 4.4–15 %.

Уровень генетических различий между европейским, сибирским и дальневосточными генотипами ВКЭ может быть 18–20 % (Ternovoi et al., 2007). ВКЭ и ВЗН относятся к разным видам ортофлавивирусов и имеют существенно более выраженные отличия геномов, уровень которых может достигать 28–32 % и более. Такие генетические отличия, характерные для этих двух видов ортофлавивирусов, позволили выделить не менее пяти основных генотипов для ВКЭ и девяти генотипов ВЗН (Dai et al., 2018; Kozlova et al., 2018; Simonin, 2024). Как правило, различные генотипы этих вирусов ассоциируются с природными очагами, расположенными в разных географических районах мира.

В последнее время накапливаются многочисленные данные, говорящие о возможности совместной циркуляции и широком распространении различных ортофлавивирусов в новых регионах. Циркуляция ВКЭ и ВЗН в городских и пригородных биотопах Томска подтверждает эту тенденцию, а обнаружение совместной циркуляции нескольких ортофлавивирусов в одной особи садовой камышовки наглядно иллюстрирует особенности распространения этих вирусов на юге Западной Сибири.

Выявление целого набора SNV в популяциях изолятов Tomsk/bird/2006/A4 ВЗН, PT12 ВКЭ и PT122 ВКЭ в тканях одной дикой птицы свидетельствует о выраженной гетерогенности этих вирусных популяций. Возможность возникновения случайных нуклеотидных замен в геномной РНК исключать нельзя. Однако большинство обнаруженных SNP имеет аналогичные нуклеотидные замены в геномах уже известных ВЗН и ВКЭ. Вероятно, существование целого ряда SNP определяет пределы для генетической вариативности этих флавивирусов и предопределяет возможности генетической изменчивости данных ортофлавивирусов в природных очагах. Картирование оригинальных паттернов SNV, характерных для каждого из трех различных изолятов ортофлавивирусов и циркулирующих одновременно в одной инфицированной особи, говорит о независимости механизмов поддержания гетерогенности вирусной популяции в пределах сибирского и дальневосточного генотипа ВКЭ и генотипа Ia ВЗН. Важно отметить, что нам не удалось выявить наличие признаков новых рекомбинационных событий при сборке и анализе консенсусных геномов этих вирусов (Приложение 4).

Таким образом, полученные результаты показывают существование выраженной гетерогенности популяции геномной РНК флавивирусов, которая сохраняется при коинфекции тремя флавивирусами одной чувствительной особи. По всей вероятности, существование множественных SNV внутри ограниченной вирусной популяции ортофлавивирусов может быть важным механизмом формирования новых геновариантов ВКЭ и ВЗН даже при репликации этих вирусов в тканях инфицированного хозяина.

Заключение

Оценка возможной популяционной гетерогенности вирусов клещевого энцефалита и Западного Нила методами метагеномного анализа показала наличие множественных SNV в вирусных популяциях всех трех исследованных изолятов ортофлавивирусов, выделенных из тканей одной особи садовой камышовки. Частота обнаружения SNV у исследованных изолятов ВКЭ и ВЗН колебалась от 1.75 до 23.73 %.

Выявленные SNP были ассоциированы как с синонимичными, так и с несинонимичными одиночными нуклеотидными заменами, которые преимущественно локализовались в генах вирусных неструктурных белков. Наибольшее количество (13) SNP обнаружено у PT122 ВКЭ (сибирский генотип). Они характеризовались высокой частотой встречаемости в вирусной популяции, которая достигала 23.73 % для SNP₃₁₅₉ в белке NS1. У штамма PT12 ВКЭ дальневосточного генотипа наиболее часто встречался SNP₇₁₅₀NS4b с аминокислотной заменой V₂₃₈₃L, возникающей с частотой 7.41 % и не описанной ранее для других известных штаммов ВКЭ, так же, как и SNP₁₀₂₇₁NS5. Наименьшее количество (7) SNV выявлено у ВЗН, однако SNP₁₇₄₈E, SNP₄₄₃₄NS3b и SVP₇₅₆₆NS4b имели высокую частоту встречаемости, от 10.55 до 19.88 %, в исследованной вирусной популяции.

Всего в исследованных штаммах ВКЭ и ВЗН обнаружено 29 SNP, приводящих к существованию девяти вирусных вариантов с аминокислотными заменами. Совокупность полученных результатов свидетельствует о значимости SNP для обеспечения генетического разнообразия ортофлавириусов.

Список литературы / References

- Безрукова (Гамова) Е.Г., Погодина В.В., Левина Л.С., Карань Л.С., Маленко Г.В. Изучение штаммов вируса клещевого энцефалита различных генотипов, выделенных от больных с хроническим течением болезни. *Медицина в Кузбассе*. 2008;55:21-28 [Bezrukova (Gamova) E.G., Pogodina V.V., Levina L.S., Karan L.S., Malenko G.V. The research of different genotypes of TBE strain virus isolated from patients with chronic course of the disease. *Medicina v Kuzbasse = Medicine in Kuzbass*. 2008;55:21-28 (in Russian)]
- Ковалев С.Ю., Умпелова Т.В., Снитковская Т.Э., Килячина А.С., Романенко В.В., Кокорев В.С., Глинских Н.П. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика вируса клещевого энцефалита на территории Свердловской области на основе генотип-специфической ОТ-ПЦР. *Вопросы вирусологии*. 2008;53(2):27-31 [Kovalev S.Yu., Umpelova T.V., Snitkovskaya T.E., Kilyachina A.S., Romanenko V.V., Kokorev V.S., Glinskikh N.P. Molecular and epidemiological characteristics of tick-borne encephalitis virus in the Sverdlovsk region on the basis of genotype-specific RT-PCR. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*. 2008;53(2):27-31 (in Russian)]
- Козлова И.В., Верхозина М.М., Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Дорошенко Е.К., Лисак О.В., Карань Л.С., Колясникова Н.М., Рар В.А., Фоменко Н.В., Ткачев С.Е., Богомазова О.Л., Борисов В.А., Туваков М.К., Злобин В.И. Сочетанные очаги трансмиссивных клещевых инфекций на территории Прибайкалья. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010;4(53):40-46 [Kozlova I.V., Verkhovina M.M., Demina T.V., Dzhioev Yu.P., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Karan L.S., Koliashnikova N.M., Rar V.A., Fomenko N.V., Tkachev S.E., Bogomazova O.L., Borisov V.A., Tuvakov M.K., Zlobin V.I. Combined natural foci of tick-borne infections in Baikal region. *Epidemiologiya i Vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2010;4(53):40-46 (in Russian)]
- Кононова Ю.В., Терновой В.А., Щелканов М.Ю., Протопопова Е.В., Золотых С.И., Юрлов А.К., Друзяка А.В., Славский А.А., Шестопалов А.М., Львов Д.К., Локтев В.Б. Генотипирование вируса Западного Нила в популяциях диких птиц наземного и древесно-кустарникового комплексов на территориях Барабинской вирус лесостепи и Кулундинской степи (2003-2004 гг.). *Вопросы вирусологии*. 2006;51(4):19-23 [Kononova Yu.V., Ternovoi V.A., Shchelkanov M.Yu., Protopopova E.V., Zolotykh S.I., Yurlov A.K., Druzyaka A.V., Slavskii A.A., Shestopalov A.M., Lvov D.K., Loktev V.B. West Nile virus genotyping among wild birds belonging to ground and tree-brush bird populations on the territories of the Baraba forest-steppe and Kulunda steppe (2003-2004). *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*. 2006;51(4):19-23 (in Russian)]
- Москвитина Н.С., Романенко В.Н., Терновой В.А., Иванова Н.В., Протопопова Е.В., Кравченко Л.Б., Кононова Ю.В., Куранова В.Н., Чаусов Е.В., Москвитин С.С., Першикова Н.Л., Гашков С.И., Коновалова С.Н., Большакова Н.П., Локтев В.Б. Выявление вируса Западного Нила и его генотипирование в иксодовых клещах (Acari: Ixodidae) в Томске и его пригородах. *Паразитология*. 2008;42(3):210-225 [Moskvitina N.S., Romanenko V.N., Ternovoi V.A., Ivanova N.V., Protopopova E.V., Kravchenko L.B., Kononova Yu.V., Kuranova V.N., Chausov E.V., Moskvitin S.S., Pershikova N.L., Gashkov S.I., Konovalova S.N., Bolshakova N.P., Loktev V.B. Detection of the West Nile virus and its genetic typing in ixodid ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Tomsk and its suburbs. *Parazitologiya*. 2008;42(3):210-225 (in Russian)]
- Погодина В.В., Карань Л.С., Колясникова Н.М., Герасимов С.Г., Левина Л.С., Бочкова Н.Г., Андаев Е.И., Трухина А.Г., Борисова Т.И., Сидорова Е.А., Нагибина О.А., Маленко Г.В., Безрукова Е.Г. Политиповые штаммы в генофонде вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2012;57(3):30-37 [Pogodina V.V., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Gerasimov S.G., Levina L.S., Bochkova N.G., Andayev E.I., Trukhina A.G., Borisova T.I., Sidorova E.A., Nagibina O.A., Malenko G.V., Bezrukova E.G. Polytypic strains in the genofund of tick-borne encephalitis virus. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*. 2012;57(3):30-37 (in Russian)]
- Терновой В.А., Щелканов М.Ю., Шестопалов А.М., Аристова В.А., Протопопова Е.В., Громашевский В.Л., Друзяка А.В., Славский А.А., Золотых С.И., Локтев В.Б., Львов Д.К. Выявление вируса Западного Нила у птиц территории Барабинской и Кулундинской низменностей (западносибирский пролетный путь) в лето-осенний период 2002 г. *Вопросы вирусологии*. 2004;49(3):52-56 [Ternovoi V.A., Shchelkanov M.Yu., Shestopalov A.M., Aristova V.A., Protopopova E.V., Gromashevsky V.L., Druzyaka A.V., Slavsky A.A., Zolotykh S.I., Loktev V.B., Lvov D.K. Detection of West Nile virus in birds in the territories of Baraba and Kulunda lowlands (West Siberian migration way) during summer-autumn of 2002. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*. 2004;49(3):52-56 (in Russian)]
- Чаусов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Першикова Н.Л., Москвитина Н.С., Романенко В.Н., Иванова Н.В., Большакова Н.П., Москвитин С.С., Коробицын И.Г., Гашков С.И., Тютенков О.И., Куранова В.Н., Кравченко Л.Б., Сучкова Н.Г., Агулова Л.П., Локтев В.Б. Генетическое разнообразие инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами в г. Томске и его пригородах. *Паразитология*. 2009;43(5):374-388 [Chausov E.V., Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Konovalova S.N., Kononova J.V., Pershikova N.L., Moskvitina N.S., Romanenko V.N., Ivanova N.V., Bolshakova N.P., Moskvitin S.S., Korobitsyn I.G., Gashkov S.I., Tutenkov O.I., Kuranova V.N., Kravchenko L.B., Suchkova N.G., Agulova L.P., Loktev V.B. Genetic diversity of ixodid tick-borne pathogens in Tomsk City and suburbs. *Parazitologiya*. 2009;43(5):374-388 (in Russian)]
- Borda V., da Silva Francisco Junior R., Carvalho J.B., Morais G.L., Duque Rossi A., Pezzuto P., Azevedo G.S., ... Tanuri A., Stratakis C.A., Aguiar R.S., Cardoso C.C., Vasconcelos A.T.R. Whole-exome sequencing reveals insights into genetic susceptibility to Congenital Zika Syndrome. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(6):e0009507. doi 10.1371/journal.pntd.0009507
- Current ICTV Taxonomy Release. Taxonomy Browser. Ch. Family: Flaviviridae. Available at: <https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae/orthoflavivirus>
- Dai X., Shang G., Lu S., Yang J., Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7:74. doi 10.1038/s41426-018-0081-6
- Diallo B., Sissoko D., Loman N.J., Bah H.A., Bah H., Worrell M.C., Conde L.S., ... Formenty P., Keita S., Günther S., Rambaut A., Duraffour S. Resurgence of Ebola virus disease in Guinea linked to a survivor with virus persistence in seminal fluid for more than 500 days. *Clin Infect Dis*. 2016;63(10):1353-1356. doi 10.1093/cid/ciw601
- Domingo E., Holland J.J. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*. 1997;51:151-178. doi 10.1146/annurev.micro.51.1.151
- Domingo E., Sheldon J., Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012;76(2):159-216. doi 10.1128/mmb.05023-11
- Domingo E., García-Crespo C., Perales C. Historical perspective on the discovery of the quasispecies concept. *Annu Rev Virol*. 2021;8(1):51-72. doi 10.1146/annurev-virology-091919-105900
- Eigen M., McCaskill J., Schuster P. Molecular quasi-species. *J Phys Chem*. 1988;92(24):6881-6891. doi 10.1021/j100335a010

- Holland J.J., De La Torre J.C., Steinhauer D.A. RNA-virus populations as quasispecies. In: Holland J.J. (Ed.) Genetic Diversity of RNA Viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology. Vol. 176. Berlin; Heidelberg: Springer, 1992;176:1-20. doi 10.1007/978-3-642-77011-1_1
- Kaiser J.A., Luo H., Widen S.G., Wood T.G., Huang C.Y., Wang T., Barrett A.D.T. Japanese encephalitis vaccine-specific envelope protein E138K mutation does not attenuate virulence of West Nile virus. *NPJ Vaccines*. 2019;4:50. doi 10.1038/s41541-019-0146-0
- Karbowiak G., Biernat B., Werszko J., Rychlik L. The transstadial persistence of tick-borne encephalitis virus in *Dermacentor reticulatus* ticks in natural conditions. *Acta Parasitol*. 2016;61(1):201-203. doi 10.1515/ap-2016-0028
- Korobitsyn I.G., Moskvitina N.S., Tyutenkov O.Y., Gashkov S.I., Kononova Y.V., Moskvitin S.S., Romanenko V.N., ... Kononova S.N., Tupota N.L., Sementsova A.O., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Detection of tick-borne pathogens in wild birds and their ticks in Western Siberia and high level of their mismatch. *Folia Parasitol (Praha)*. 2021;68:024. doi 10.14411/fp.2021.024
- Kozlova I.V., Demina T.V., Tkachev S.E., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Verkhozina M.M., Karan L.S., ... Savinova Y.S., Chernovanova O.O., Ruzek D., Tikunova N.V., Zlobin V.I. Characteristics of the Baikal subtype of tick-borne encephalitis virus circulating in Eastern Siberia. *Acta Biomed Scientifica*. 2018;3(4):53-60. doi 10.29413/ABS.2018-3.4.9
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;35(6):1547-1549. doi 10.1093/molbev/msy096
- Law J., Jovel J., Patterson J., Ford G., O'Keefe S., Wang W., Meng B., ... Mitchell T., Jordan T., Carpenter E., Mason A.L., Wong G.K. Identification of hepatotropic viruses from plasma using deep sequencing: a next generation diagnostic tool. *PLoS One*. 2013;8(4):e60595. doi 10.1371/journal.pone.0060595
- Litov A.G., Deviatkin A.A., Goptar I.A., Dedkov V.G., Gmyl A.P., Markelov M.L., Shipulin G.A., Karganova G.G. Evaluation of the population heterogeneity of TBEV laboratory variants using high-throughput sequencing. *J Gen Virol*. 2018;99(2):240-245. doi 10.1099/jgv.0.001003
- Marí Saéz A., Weiss S., Nowak K., Lapeyre V., Zimmermann F., Düx A., Kühl H.S., ... Fahr J., Borchner M., Gogarten J.F., Calvignac-Spencer S., Leendertz F.H. Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic. *EMBO Mol Med*. 2015;7(1):17-23. doi 10.15252/emmm.201404792
- Mikryukova T.P., Moskvitina N.S., Kononova Y.V., Korobitsyn I.G., Kartashov M.Y., Tyutenkov O.Y., Protopopova E.V., ... Moskvitin S.S., Tupota N.L., Sementsova A.O., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Surveillance of tick-borne encephalitis virus in wild birds and ticks in Tomsk city and its suburbs (Western Siberia). *Ticks Tick Borne Dis*. 2014;5(2):145-151. doi 10.1016/j.ttbdis.2013.10.004
- Moskvitina N.S., Korobitsyn I.G., Tyutenkov O.Y., Gashkov S.I., Kononova Y.V., Moskvitin S.S., Romanenko V.N., ... Kononova S.N., Tupota N.L., Sementsova A.O., Ternovoi V.A., Loktev V.B. The role of birds in the maintenance of tick borne infections in the Tomsk anthropurgic foci. *Biol Bull Russ Acad Sci*. 2014;41(4):387-393. doi 10.1134/S1062359014040086
- Postler T.S., Beer M., Blitvich B.J., Bukh J., de Lamballerie X., Drexler J.F., Imrie A., Kapoor A., Karganova G.G., Lemey P., Lohmann V., Simmonds P., Smith D.B., Stapleton J.T., Kuhn J.H. Renaming of the genus *Flavivirus* to *Orthoflavivirus* and extension of binomial species names within the family *Flaviviridae*. *Arch Virol*. 2023;168(9):224. doi 10.1007/s00705-023-05835-1
- Pustijanac E., Buršić M., Talapko J., Škrlec I., Meštrović T., Lišnjić D. Tick-borne encephalitis virus: a comprehensive review of transmission, pathogenesis, epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, and prevention. *Microorganisms*. 2023;11(7):1634. doi 10.3390/microorganisms11071634
- Razumov I.A., Kazachinskaja E.I., Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Galkina I.V., Gromashevskii V.L., Prilipov A.G., Kachko A.V., Ivanova A.V., L'vov D.K., Loktev V.B. Neutralizing monoclonal antibodies against Russian strain of the West Nile virus. *Viral Immunol*. 2005;18(3):558-568. doi 10.1089/vim.2005.18.558
- Shanshin D.V., Borisevich S.S., Shaprova O.N., Nesmeyanova V.S., Bondar A.A., Porozov Y.B., Khamitov E.M., Kolosova E.A., Shelemba A.A., Ushkalenko N.D., Protopopova E.V., Sergeev A.A., Loktev V.B., Shcherbakov D.N. Phage display revealed the complex structure of the epitope of the monoclonal antibody 10H10. *Int J Mol Sci*. 2024;25(19):10311. doi 10.3390/ijms251910311
- Simonin Y. Circulation of West Nile virus and Usutu virus in Europe: overview and challenges. *Viruses*. 2024;16(4):599. doi 10.3390/v16040599
- Singh P., Khatib M.N., Ballal S., Kaur M., Nathiya D., Sharma S., Siva Prasad G.V., ... Lakhanpal S., Shabil M., Bushi G., Sah S., Serhan H.A. West Nile virus in a changing climate: epidemiology, pathology, advances in diagnosis and treatment, vaccine designing and control strategies, emerging public health challenges – a comprehensive review. *Emerg Microbes Infect*. 2024;30:2437244. doi 10.1080/22221751.2024.2437244
- Svyatchenko V.A., Nikonov S.D., Mayorov A.P., Gelfond M.L., Loktev V.B. Antiviral photodynamic therapy: inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 *in vitro* using methylene blue and Radachlorin. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021;33:102-112. doi 10.1016/j.pdpdt.2020.102112
- Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Chausov E.V., Novikov D.V., Leonova G.N., Netesov S.V., Loktev V.B. Novel variant of tickborne encephalitis virus, Russia. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(10):1574-1578. doi 10.3201/eid1310.070158
- Ternovoi V.A., Ponomareva E.P., Protopopova E.V., Tupota N.L., Mikryukova T.P., Loktev V.B. Changes in the genome of the Tick-Borne encephalitis virus during cultivation. *Mol Biol*. 2024;58(2):266-278. doi 10.1134/S0026893324020146
- Thorson A., Formenty P., Lofthouse C., Broutet N. Systematic review of the literature on viral persistence and sexual transmission from recovered Ebola survivors: evidence and recommendations. *BMJ Open*. 2016;6:e008859. doi 10.1136/bmjopen-2015-008859
- Worku D.A. Tick-borne encephalitis (TBE): from tick to pathology. *J Clin Med*. 2023;12(21):6859. doi 10.3390/jcm12216859
- Zárate S., Hernández-Pérez F., Taboada B., Martínez N.E., Alcaráz-Estrada S.L., Del Moral O., Yocupicio-Monroy M. Complete genome of DENV2 isolated from mosquitoes in Mexico. *Infect Genet Evol*. 2019;71:98-107. doi 10.1016/j.meegid.2019.03.018

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.01.2025. После доработки 23.05.2025. Принята к публикации 30.05.2025.