

ВЕТЕРИНАРИЯ И ЗООТЕХНИЯ

DOI:10.31677/2072-6724-2022-64-3-83-92

УДК 619:578.5, 577.21:616.9

РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРОМОТОРОВ ГЕРПЕСВИРУСОВ В РЕАЛИЗАЦИИ ПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА НА ПРИМЕРЕ БОЛЕЗНИ МАРЕКА

^{1,2} В.Н. Афонюшкин, кандидат биологических наук¹ В.С. Городов, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник^{1,2} А.С. Кильп, младший научный сотрудник, аспирант² Н.А. Сigareва, кандидат биологических наук, доцент¹ Сибирский федеральный научный центр агробихотехнологий РАН, р.п. Краснообск, Новосибирской обл., Россия² Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

E-mail: lisocim@mail.ru

Ключевые слова: вирус болезни Марека, метилирование, ДНК, промоторы, ПЦР, гены, CpG-островки, зооантропонозы.

Реферат. Вирус болезни Марека (ВБМ) имеет повсеместное распространение и может не только наносить вред домашней птице, но и обладать онкогенностью для человека. ВБМ и индуцируемые ими злокачественные опухоли являются удобной и доступной естественной моделью изучения канцерогенеза, ассоциированного с герпесвирусами. На сегодняшний день, по нашим наблюдениям, появились дополнительные риски заражения людей вирусом болезни Марека – болезнь начала появляться у цыплят-бройлеров 30 дней и старше, т.е. контакт с мясом птицы несет риск заражения. Помимо этого, заболевание COVID-19 может сопровождаться дефицитом фолиевой кислоты, т.е. нарушением фолатного цикла у людей, что повышает риск манифестации заболеваний, связанных с ДНК-вирусами, так как нарушение фолатного цикла способно снизить активность метилирования ДНК, в т.ч. вирусной ДНК. Метилирование осуществляется ферментативно в первые минуты после репликации ДНК, т.е. пострепликативно. Поскольку нуклеотидная последовательность ДНК при этом не меняется, метилирование по сути своей – событие эпигенетическое. Нами была изучена зависимость между метилированием промоторов вируса болезни Марека и копийностью вируса. Оценка наличия или отсутствия метилирования, так же как и частичного метилирования, осуществлялась на основе выявления разницы между пороговыми циклами dC(t). Наличие неметилированных сайтов, входящих в состав изучаемой промоторной последовательности, выявлялось на основе способности метилчувствительных рестриктаз AclI и GluI. Была обнаружена корреляционная зависимость между концентрацией геномной ДНК вируса болезни Марека 1-го серотипа штамма CVI988 в культуре клеток и наличием деметилированных CpG-островков в составе промоторов, локализующихся в положении 9413–9865 и 127943–128193 п.н. геномной ДНК вируса. Полученные данные позволяют объяснить механизм повышения патогенности герпесвирусных инфекций в условиях снижения активности метилирования вирусной ДНК в организме.

THE ROLE OF HERPES VIRUS PROMOTER METHYLATION IN THE REALIZATION OF PATHOGENIC POTENTIAL IN THE EXAMPLE OF MAREK'S DISEASE

^{1,2} V.N. Afonyushkin, Ph.D. in Biological Sciences¹ B.S. Gorodov, Ph.D. in Biological Sciences, Senior Researcher^{1,2} A.S. Kilp, Junior Researcher, Postgraduate Student² N.A. Sigareva, Ph.D. in Biological Sciences, Associate Professor¹ Siberian Federal Research Center for Agrobiotechnologies, Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk settlement, Novosibirsk region, Russia² Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

E-mail: lisocim@mail.ru

Keywords: Marek's disease virus, methylation, DNA, promoters, PCR, genes, CpG islands, zooanthroponosis.

Abstract. Marek's disease virus is ubiquitous and can harm not only poultry, but also be oncogenic for humans. VBM and malignant tumors induced by them are a convenient and accessible natural model for studying herpesvirus-associated carcinogenesis. To date, according to our observations, there are additional risks of human infection with the Marek's disease virus - the disease began to appear in broiler chickens 30 days and older, i.e. contact with poultry meat carries a risk of infection. In addition, COVID-19 disease may be accompanied by folic acid deficiency, i.e. a violation of the folate cycle in humans, which increases the risk of manifestation of diseases associated with DNA viruses, since a violation of the folate cycle can reduce the activity of DNA methylation, incl. viral DNA. Methylation is carried out enzymatically in the first minutes after DNA replication, i.e. postreplicatively. Since the DNA nucleotide sequence does not change, methylation is essentially an epigenetic event. We have studied the relationship between the methylation of promoters of the Marek's disease virus and the copy number of the virus. The assessment of the presence or absence of methylation, as well as partial methylation, was carried out on the basis of identifying the difference between the threshold cycles dC(t). The presence of unmethylated sites included in the studied promoter sequence was detected on the basis of the ability of methyl-sensitive restrictases Acil and Glal. A correlation was found between the concentration of genomic DNA of the Marek's disease virus serotype 1 strain CVI 988 in cell culture and the presence of demethylated CpG islands in the composition of promoters located at position 9413-9865 bp. and 127943 - 128193 b.p. genomic DNA of the virus. The data obtained make it possible to explain the mechanism of the increase in the pathogenicity of herpesvirus infections under conditions of a decrease in the activity of viral DNA methylation in the body.

Вирус болезни Марека – онкогенный герпесвирус птиц. Проблема онкогенности этого вируса для человека остается нерешенной. Известно, что он может размножаться в организме человека [1, 2], и ранее уже были зафиксированы случаи заболевания групп людей онкологическими заболеваниями после контакта с данным вирусом (неопубликованные данные).

В последнее десятилетие отмечается резко возросший интерес к болезни Марека [3]. Связано это с резким снижением эффективности противоэпизоотических мероприятий, в частности вакцинаций, появлением высокопатогенных штаммов (vv+) вируса болезни Марека (ВБМ) и, как следствие, повышением восприимчивости к болезни у птицы молодого возраста. Данные изменения, связанные с возросшим полиморфизмом вируса, предъявляют новые требования к системе диагностических мероприятий, предназначенной для анализа эпизоотической ситуации, к разработке системы противоэпизоотических мероприятий, к контролю за их эффективностью и поиску новых средств борьбы с инфекцией [4, 5].

ВБМ и индуцируемые ими злокачественные опухоли являются удобной и доступной естественной моделью изучения канцерогенеза, ассоциированного с герпесвирусами [3].

Метилированные основания в дезоксирибонуклеазе (ДНК) обнаружены свыше 50 лет назад. ДНК прокариот содержит модифицированные основания N6-метиладенин и 5-метилцитозин, тогда как ДНК выс-

ших эукариот в основном 5-метилцитозин. Метилирование остатков цитозина ДНК имеет место у бактерий, растений, животных, в том числе млекопитающих (включая человека), но отсутствует у дрожжей, нематод и дрозифилы [1, 6]. Метилирование осуществляется ферментативно в первые минуты после репликации ДНК, т.е. пострепликативно. Поскольку нуклеотидная последовательность ДНК при этом не меняется, метилирование по сути своей – событие эпигенетическое. Метилирование хотя и является стабильной и наследуемой модификацией, обратимо под воздействием деметилирующих агентов или ферментов и тем самым принципиально отличается от мутаций ДНК [7, 8]. Профиль метилирования, сильно влияющий на функциональное состояние гена, стабильно передается в ряду клеточных поколений. С этой точки зрения для организмов с большой продолжительностью жизни и интенсивной тканевой регенерацией (позвоночные, растения) надежная система эпигенетической наследственности (типа метилирования ДНК) жизненно необходима [9–11].

Цель исследования – изучить зависимость между метилированием промоторов вируса болезни Марека и копийностью вируса и оценить риски последствий нарушения фолатного цикла для манифестации герпесвирусных инфекций у животных и человека.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для исследований использовали нуклеотидные последовательности геномной ДНК вируса болезни Марека различных серотипов, депонированные в GenBank: AF147806 EF523390 AF243438, DQ530438, AY510475, NC002641.

Анализ распределения CpG-островков внутри генома проводили с использованием программы CPGPLOT. При анализе структуры распределения CpG-островков руководствовались следующими критериями: Observed/Expected ratio > 0,60, процент C + G > 50,00, длина > 200 п.н. Для поиска промоторов использовали программу Proscan: Version 1.7 (BIMAS).

Праймеры рассчитывали с использованием программ Beakon Designer, Vector NTI с последующей проверкой на гомологию с неспецифической ДНК в программе BLAST.

ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл, содержащем 67 мМ трис.-HCl (pH 8,9), 16 мМ сульфат аммония; 2,4 мМ MgCl₂; 0,01% Твин 20; 0,2 мМ дНТФ; 0,5 мкМ растворы олигонуклеотидных праймеров (табл. 1) и 1ED Taq-полимеразы. Реакцию проводили по следующей программе: горячий старт 95°С – 3 мин, далее – 45 циклов с денатурацией при 95°С 10 с, отжигом при температуре 62°С в течение 10 с и синтезом при 72°С 10 с. Финальная элонгация проводилась при 72°С 3 мин.

Таблица 1

Олигонуклеотиды, используемые в работе
Oligonucleotides used in the work

Олигонуклеотиды	Локализация промотора, п.н.	Размер ПЦР-продукта, п.н.
GGGGCGGAGAACTGAATCTCCA (22) TCGTCCCCGCGTGCAAGAT (19)	127943–128193	251
GACCAAGCATTGGCTGCAAAC (21) TATGCGATTCGCTTACCSTTCC (22)	9412–9662	454

ПЦР в режиме реального времени с SYBRGreen I проводили на реалтайм-амплификаторе MiniOptycon (BioRad). Результаты амплификации верифицировали методом электрофореза в 6%-м ПААГ и анализом кривых плавления.

Статус метилирования ВБМ изучали в пробах патологического материала (селезенки) птицы, павшей от болезни Марека (БМ) на 4 птицефабриках (Алтайский край, Хакасия, Кемеровская и Новосибирская области), и от птицы, привитой против БМ аттенуированным штаммом ВБМ CVI988. Всего было собрано и протестировано 52 пробы.

Исследовали также культуры вируса, подвергнутого деметилированию в присутствии 5-аза-дезоксцитидина (20 мМ), препараты вакцин и интактный вирус. В работе использовали первично-трипсинизированные культуры клеток фибробластов (CEF) 20-дневных развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) и эпителий почки цыпленка.

Данные обрабатывали методами вариационной статистики, коэффициент корреляции рассчитывали по Пирсону.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка наличия или отсутствия метилирования, так же как и частичного метилирования, осуществлялась на основе выявления разницы между пороговыми циклами dC(t). Наличие неметилированных сайтов, входящих в состав изучаемой промоторной последовательности, выявлялось на основе способности метилчувствительной рестриктазы AclI рестриктировать неметилированные сайты 5`-C[^]CGG-3` и соответственно ингибировать реакцию (рис. 1), сдвигая пороговый цикл (C(t)) пропорционально количеству копий неметилированной ДНК.

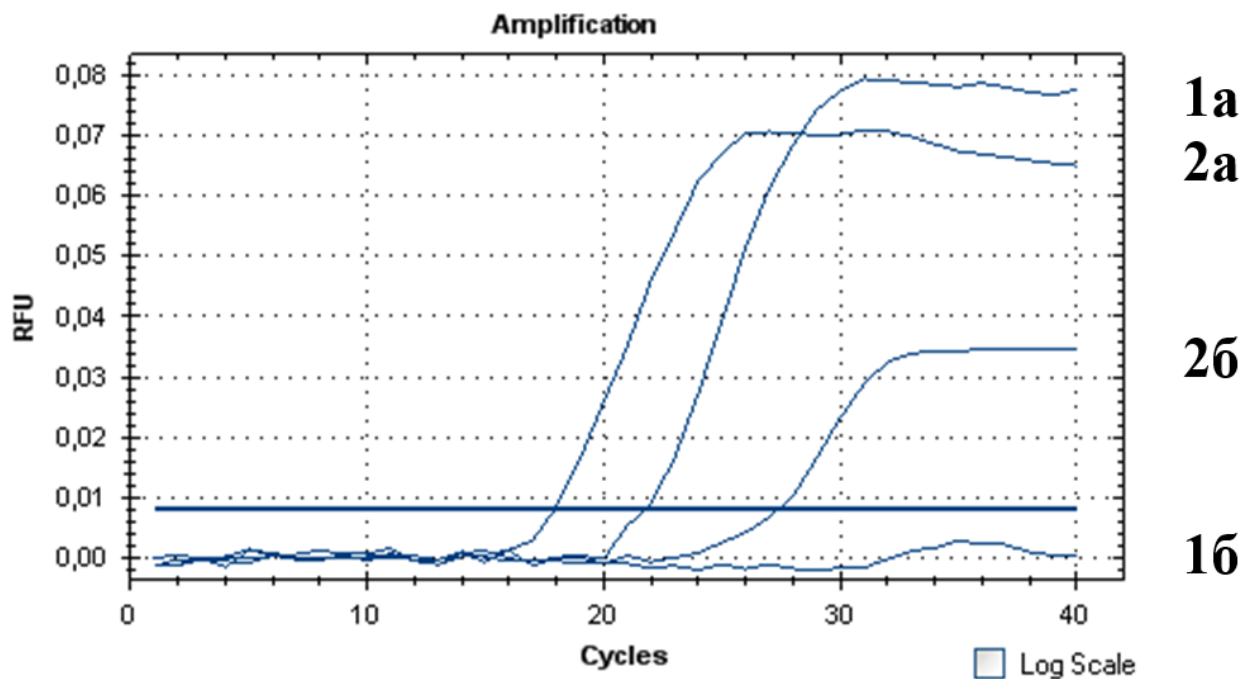


Рис. 1. Результаты метилчувствительной реал-тайм ПЦР штамма MDV CVI988 и полевого штамма MDV: 1а – штамм CVI 988 с деметилированной ДНК; 1б – штамм CVI 988 с деметилированной ДНК, предварительно рестриктированной АсiI; 2а – изолят вируса болезни Марека из очага инфекции; 2б – изолят вируса болезни Марека из очага инфекции (ДНК предварительно рестриктирована АсiI)

Fig.1 Results of methyl sensitive real-time PCR of strain MDV CVI 988 and field strain MDV: 1a – strain CVI 988 with demethylated DNA; 1b - strain CVI 988 with demethylated DNA, preliminarily restricted by АсiI; 2a - Marek’s disease virus Isolate from the focus of infection; 2b - Marek’s disease virus Isolate from the focus of infection (DNA pre-restricted with АсiI)

Наличие метилированных сайтов в составе исследуемых промоторных последовательностей также выявляли с использованием метилчувствительной рестриктазы GlaI, гидролизующей только метилированные сайты 5`-G(5mC)^G(5mC)-3`, что также приводило к появлению различий в пороговых циклах реакции dC(t) между интактной и обработанной рестриктазой GlaI пробами.

Как следует из табл. 2, полевые изоляты ВБМ характеризуются широкимразнообразием статуса метилирования промотора,

локализуемого в позиции 9413–9865 п.н. геномной ДНК CVI988. Внутри промотора имеется 4 сайта рестрикции АсiI.

Наличие как метилированных, так и неметилированных сайтов рестрикции для рестриктаз GlaI и АсiI встречалось в 45% случаев. Только метилированные сайты для рестриктаз GlaI и АсiI встречались в 25% случаев. В остальных случаях встречались неметилированные последовательности промотора 9413–9865 п.н.

Таблица 2

Статус метилирования CpG входящего в состав промотора (9413–9865 п.н.)
CpG methylation status of the promoter (9413–9865 bp)

№ п/п	Статус метилирования	Регион, откуда были получены пробы	Метилчувствительная ПЦР– гидролиз проб метилчувствительной рестриктазой АсiI			Метилчувствительная ПЦР –гидролиз проб метилчувствительнойрестриктазой GlaI,гидролизующей метилированные сайты CpG		
			АсiI	контроль	dC(t)	GlaI	контроль	dC(t)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
			АсiI	контроль	dC(t)	GlaI	контроль	dC(t)
1	3	Саяны	28	26	2	27	27	0
2	3	Саяны	34	32	2	31	30	1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	2	Саяны	32	32	0	31	30	1
4	3	Саяны	31	29	2	30	29,5	0,5
5	3	Саяны	33	30	3	31	31	0
6	1	Саяны	34	32	2	34	30	4
7	2	Саяны	36	36	0	33	30	3
8	1	Саяны	33	32	1	31	29	2
9	1	Саяны	33	31	2	28	27	1
10	2	Кемерово	32	32	0	28	25	3
11	1	Саяны	31	29	2	28	26	2
12	2	Саяны	28	28	0	26	22	4
15	1	Саяны	30	28	2	28	27	1
16	1	Саяны	30	27	3	30	28	2
18	2	НСО	28	28	0	31	18	13
19	1	НСО	26	24	2	24	23	1
23	1	Алтайский край	30	27	3	31	29	2
24	3	Алтайский край	24	16	8	16	16	0
25	3	Алтайский край	28	14	14	14	15	-1
32	1	Хакасия	24	16	8	30	16	14
Тотально деметилированный CVI 988			28	22	6	22	22	0
Частично деметилированные штаммы CVI 988			34	31	3	38	35	3
			31	29	2	31	28	3
			34	33	1	35	34	1

Примечание. 1 – есть метилированные и неметилированные сайты рестрикции; 2 – есть только метилированные сайты рестрикции; 3 – есть только неметилированные сайты рестрикции.

При изучении статуса метилирования промотора 127943–128193 п.н. не гидролизировались рестриктазой AciI 30% проб, причем статус метилирования промоторных последовательностей 9413–9865 и 127943–128193 п.н. в ряде случаев не совпадал. Такие результаты свидетельствуют о том, что метилирование участка геномной ДНК вируса болезни Марека не в полной мере отражает общий уровень ее метилирования.

В рамках выяснения роли деметилирования промоторных последовательностей проанализировали зависимости между dC(t) (между пробой, обработанной рестриктазой AciI, и той же, но интактной пробой) и C(t) (интактной пробой). Так, увеличение пула вирусов болезни Марека, содержащих неметилированные сайты AciI в составе промоторных последовательностей 9413–9865 и 127943–128193 п.н., свидетельствует о том, что пробы, характеризующиеся $dC(t) > 1$, от-

личаются более значительным содержанием геномной ДНК ВБМ. Коэффициент корреляции dC(t) и C(t) для промоторных последовательностей 9413–9865 и 127943–128193 п.н. составил $r = -0,88$ и $r = -0,79$. В данном случае корреляция отрицательна ввиду того, что зависимость между количеством матричной ДНК и величиной порогового цикла (C(t)) также отрицательна. Корреляционных зависимостей между результатами метилчувствительных ПЦР с использованием GlaI и AciI, а также между dC(t) и C(t) в метилчувствительной ПЦР с GlaI обнаружено не было.

Установлено наличие частично гидролизуемых метилчувствительными рестриктазами проб (50%), что выражается в присутствии dC(t) при постановке метилчувствительной ПЦР как с использованием рестриктазы GlaI, так и AciI, а также в самом факте неполного ингибирования реакций рестриктазами (рис. 2).

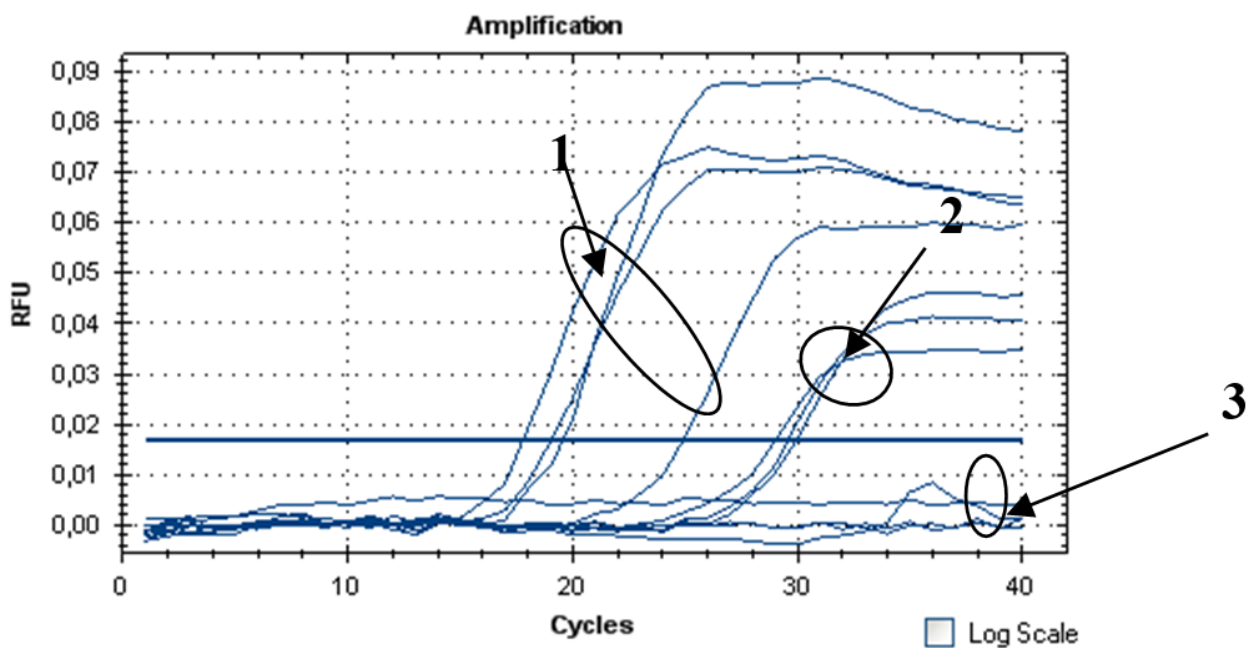


Рис. 2. Результаты метилчувствительной реал-тайм ПЦР ДНК вируса болезни Марека из павшей от БМ птицы:

1а – нерестриктированные метилчувствительной рестриктазой пробы; 2 – пробы, характеризующиеся частичным метилированием изучаемого промотора (обработка рестриктазой *AciI* частично ингибировала реакцию); 3 – пробы, характеризующиеся 100% отсутствием сайтов рестрикции *AciI* (промотор полностью гидролизован *AciI*)

Fig.2. Results of methyl-sensitive real-time PCR DNA of Marek’s disease virus from birds that died from Marek’s disease

1a – samples unrestricted with a methyl-sensitive restriction enzyme, 2 – samples characterized by partial methylation of the studied promoter (treatment with restriction enzyme *AciI* partially inhibited the reaction); 3 - samples characterized by the presence of 100%-m absence of *AciI* restriction sites (the promoter is completely hydrolyzed by *AciI*)

Данный феномен может быть объяснен как наличием новообразованных цепей ДНК, которые не успели метилироваться, так и наличием ДНК вируса с различным статусом метилирования.

В современных реалиях существуют риски реверсии апатогенных/вакцинных штаммов. В контексте данного исследования можно рассуждать о рисках повышения патогенности герпесвирусов на модели болезни Марека в условиях дефицита фолиевой кислоты, B_6 , B_{12} и холина.

Герпесвирусы способны к иммортализации лимфоцитов человека, вызывая бласттрансформацию, а многие представители этого семейства: вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), герпесвирус человека 6-го типа (ВГЧ-6), 8-го типа (ВГЧ-8), герпесвирус обезьян саймири – прототипные модели для изучения вирусного канцерогенеза [12, 13].

В присутствии герпесвирусов в организме снижается концентрация в плазме крови витаминов B_6 , B_{12} , но не фолиевой кислоты [14]. Однако при этом дефицит витамина B_{12} может генерировать большой пул метил-ТГФ, который не способен вступать в реакции и будет имитировать дефицит фолиевой кислоты. Патогенность герпесвирусов повышается вследствие нарушения фолатного цикла и снижения иммунного ответа.

По мнению ВОЗ, основным источником инфекций для людей в последнее время являются животные.

Зоонозы составляют значительную долю новых и существующих болезней человека. С учетом наших тесных связей с сельскохозяйственными, домашними и обитающими в природной среде животными зоонозы представляют собой серьезную проблему в области здравоохранения во всем мире.

У людей, переболевших COVID-19, возникают нарушения пуринового обмена и дефицит фолиевой кислоты, что может являться причиной активации герпесвирусов и снижения иммунного ответа. Разнообразные симптомы напоминают дефицит витамина V_{12} – состояние, при котором нарушается статус метилирования. При нарушениях пуринового обмена происходит гиперпродукция мочевой кислоты, что проявляется повышением ее концентрации в крови (гиперурикемия) и моче (гиперурикурия) [15]. Вирус SARS-CoV-2 вызывает повышенную потребность в метильных группах, одновременно нарушая их поступление из-за вызванного вирусом окислительного стресса [16]. Люди с постковидным синдромом наиболее подвержены реактивации в организме герпесвирусов, которые в том числе могут попадать в организм человека от животных.

Болезнь Марека – инфекционное, высококонтагиозное, хроническое заболевание кур, широко распространенное во всем мире, характеризующееся развитием массовых лимфоидных новообразований, снижением иммунитета и гибелью птицы [17, 18]. В научной литературе отмечается способность человека к вирусовыделению ВБМ в течение 70 дней. Нами отмечалось успешное культивирование ВБМ на культурах клеток человека.

Большая часть промоторов у ВБМ 1-го серотипа не входит в состав CpG-островков, так, из 56 найденных промоторов только 9 теоретически могут изменять свою регуляторную активность под воздействием метилирования [8, 19].

Теоретически, интерес в качестве генов-кандидатов, метилирование промоторов которых способно влиять на патогенность вируса, должны представлять те из них, продукты экспрессии которых не являются структурными компонентами капсида вирусной частицы, и в рамках вирусной репликации допускается изменение активности экспрессии.

Обращает на себя внимание наличие у апаатогенного вакцинного штамма CVI988 дополнительного островка длиной 229 п.н. (111589–111817 п.н.). Данный островок предшествует CDS99 (MDV062, UL49) – гомологу фосфопротеина VP22 герпессимплексовируса человека [6]. Функция фосфопротеина VP22 у герпесвирусов человека и животных в настоящее время до конца не изучена. Показана способность фосфопротеина VP22 связываться с хроматином эукариотических клеток и микротрубочками ядерного аппарата. Изучена и используется с исследовательскими целями

способность ассоциации с плазматическими мембранами клетки, сопровождающейся интенсификацией транспорта различных белков внутрь клетки. Исследователи установили способность VP22 к взаимодействию с вирусным протеином VP16 и изменению уровня упаковки в вирион белка ICP0. У различных штаммов вируса болезни Марека первого серотипа данный ген характеризуется высокой изменчивостью [20].

Представляет интерес индукция апоптоза (механизм самоуничтожения клетки, например, в ответ на вирусную инфекцию или опухолевую трансформацию) вследствие нарушения изменения концентрации Bax/Bcl-2-протеинов. В исследованиях на культуре клеток нейробластомы человека использовали VP22 герпесвируса крупного рогатого скота, поэтому дальнейшие исследования с герпесвирусами птиц будут иметь большую значимость.

Ввиду того, что фаза цитолитической инфекции БМ, вызванной патогенными штаммами ВБМ, сопровождается индукцией апоптоза клеток лимфоидного ряда, возможно, именно регуляция экспрессии гена VP 22 является решающим фактором в реализации патогенности вируса болезни Марека 1-го серотипа. Семейство Bcl-2-протеинов является внутриклеточным мессенджером поверхностно-связанного рецептора ФНО (фактора некроза опухоли) – регуляторного протеина, обладающего провоспалительными и проапоптотическими активностями, в частности экспрессия гена Bax, при условии превышения концентрации этого белка относительно белков-ингибиторов апоптоза (A1, Bcl-2, Bcl-w and Bcl-xL), способна запустить каскад регуляторных реакций, приводящих к апоптозу клетки [19].

Сам факт наличия неоднородности метилирования отдельных локусов ДНК ВБМ заставляет усомниться в роли эпигенетических изменений и их сохранении при передаче инфекционного агента.

В 2011–2021 гг. инфекция стала поражать более молодую птицу – в возрасте около 30 дней вместо 70 ранее. Одновременно помолодела другая герпесвирусная инфекция, поражающая репродуктивную систему. Волны герпесвирусных инфекций совпадают с третьей инфекцией – RSS.

RSS (везикулярный энтерит, ассоциируется с синдромом расслоения стада по массе). По нашим наблюдениям (неопубликованные данные), эта инфекция очень часто сопровождается появлением БМ. Массовое распро-

странение RSS нами зафиксировано с 2011 г., вероятно, связанное с племенной птицей (не исключено распространение с живыми вакцинами). Новая форма везикулярного энтерита начала нами фиксироваться в РФ в течение лета 2013 г. Распространение по птицефабрикам осуществлялось, с высокой вероятностью, через людей (температура 37°C в течение года, воспаления лицевых нервов). В 2011–2012 гг. наблюдались случаи появления злокачественных новообразований молочной железы у всех сотрудниц, работающих с живым вирусом ВБМ на одной из птицефабрик в Краснодарском крае. В 2011–2012 и 2014–2016 гг. две волны БМ (опухоль сочетались с поражением яичников у птицы) сопровождались ростом инцидентности доброкачественных и злокачественных новообразований яичников у ветеринарного персонала. На одной из птицефабрик Западно-Сибирского региона переболел 21 человек (были прооперированы), 2 человека умерли. Пока нет возможности доказать наличие заражения БМ этих людей и можно рассуждать лишь о косвенной связи.

На сегодняшний день, по нашему мнению, появились дополнительные факторы, повышающие риск заражения людей ВБМ:

1. болезнь Марека начала появляться у цыплят-бройлеров в возрасте 30 дней и старше, т.е. отныне контакт с мясом птицы несет риск заражения;

2. эпидемия COVID-19 сопровождается дефицитом фолиевой кислоты, т.е. нарушением фолатного цикла у людей, что повышает

риск манифестации заболеваний, связанных с ДНК-вирусами;

3. COVID-19 снижает устойчивость населения к герпесвирусным инфекциям [21] (см. также п. 2).

ВЫВОДЫ

1. Обнаружена корреляционная зависимость между концентрацией геномной ДНК вируса болезни Марека 1-го серотипа в патологическом материале и наличием деметилированных CpG-островков в составе промоторов, локализующихся в положении 9413–9865 и 127943–128193 п.н. геномной ДНК вируса.

2. Наличие зависимости между копийностью вируса и статусом метилирования позволяет предполагать, что процессы метилирования ДНК герпесвирусов (на примере болезни Марека) могут влиять на устойчивость к вирусным инфекциям, а на уровне популяций – на интенсивность вирусовыделения, повышая риск эпизоотий и эпидемий герпесвирусных инфекций.

3. Возможной причиной реактивации герпесвирусных инфекций у людей, переболевших COVID-19, может быть также дефицит фолиевой кислоты, что, в свою очередь, повышает риск межвидового перехода, в т.ч. ВБМ.

Работа выполнена при поддержке госзадания НГАУ (122040400096-4) «Изучение молекулярных основ полигостальности возбудителей болезней, в том числе общих для человека и животных».

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Jin Z., Liu Y. DNA methylation in human diseases // *Genes & diseases*. – 2018. – Т. 5, N 1. – P. 1–8.
2. Kennedy D.A., Dunn P.A., Read A.F. Modeling Marek's disease virus transmission: A framework for evaluating the impact of farming practices and evolution // *Epidemics*. – 2018. – Т. 23. – P. 85–95.
3. Detection of avian oncogenic Marek's disease herpesvirus DNA in human sera / S. Laurent [et al.] // *Journal of general virology*. – 2001. – Т. 82, N 1. – P. 233–240.
4. Marek's disease vaccines-induced differential expression of known and novel microRNAs in primary lymphoid organ bursae of White Leghorn / L. Zhang [et al.] // *Veterinary research*. – 2020. – Т. 51, N 1. – С. 1–14.
5. Нуралиев Е.Р., Кочии И.И. Болезнь Марека в приусадебных хозяйствах – резервуар возбудителя инфекции для промышленного птицеводства // *Вестник Омского государственного аграрного университета*. – 2017. – № 4 (28). – С. 162–169.
6. Донченко А.С., Юшков Ю.Г., Афонюшкин В.Н. Поиск генов-кандидатов вируса болезни Марека, способных повышать его патогенность при деметилировании промоторов // *Вестник российской сельскохозяйственной науки*. – 2009. – № 1. – С. 73–75.
7. Analysis of DNA methylation of CD79B in MDV-infected chicken spleen / L. Wang [et al.] // *Journal of Integrative Agriculture*. – 2021. – Т. 20, N 11. – P. 2995–3002.

8. *Correlation analyses of CpG island methylation of cluster of differentiation 4 protein with gene expression and T lymphocyte subpopulation traits / X. Zhao [et al.] // Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* – 2018. – Т. 31, N 8. – P. 1141.
9. *Jaenisch R., Bird A.* Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals // *Nature genetics.* – 2003. – Т. 33, N 3. – P. 245–254.
10. *Genetic characterization of a Marek's disease virus strain isolated in Japan / S. Murata [et al.] // Virology journal.* – 2020. – Т. 17, N. 1. – P. 1–13.
11. *Frias-Lasserre D., Villagra C.A.* The importance of ncRNAs as epigenetic mechanisms in phenotypic variation and organic evolution // *Frontiers in Microbiology.* – 2017. – Т. 8. – P. 2483.
12. *Role of Marek's Disease Virus (MDV)-encoded US3 serine/threonine protein kinase in regulating MDV Meq and Cellular CREB phosphorylation / Y. Liao [et al.] // Journal of virology.* – 2020. – Т. 94, N 17. – P. e00892-20.
13. *Identification of Marek's disease virus VP22 tegument protein domains essential for virus cell-to-cell spread, nuclear localization, histone association and cell-cycle arrest / L. Trapp-Fragnet [et al.] // Viruses.* – 2019. – Т. 11, N 6. – P. 537.
14. *Effects of B vitamin injections on plasma B vitamin concentrations of feed-restricted beef calves infected with bovine herpesvirus-1 / P.L. Dubeski, F.N. Owens, W.O. Song, S.P. Coburn, J.D. Mahuren // J Anim Sci.* – 1996. – Vol. 74 (6). – P. 1358–1366. – DOI: 10.2527/1996.7461358x. PMID: 8791209.
15. *Яровой С.К., Максудов Р.Р.* Нарушения обмена пуринов в практике врача уролога // *Экспериментальная и клиническая урология.* – 2013. – № 3. – С. 88–93.
16. *McCaddon A., Regland B.* COVID-19: A methyl-group assault? // *Medical hypotheses.* – 2021. – Т. 149. – С. 110543.
17. *López O.S., Villar A.D., Chaparro G.J.* Challenges in the diagnosis and control of Marek's disease virus in Colombia // *Revista MVZ Córdoba.* – 2019. – Т. 24, N 1. – P. 7157–7165.
18. *Davidson I.* Out of Sight, but Not Out of Mind: Aspects of the Avian Oncogenic Herpesvirus, Marek's Disease Virus // *Animals.* – 2020. – Т. 10, N 8. – P. 1319.
19. *Вопросы эволюции CpG-островков в геноме вируса болезни Марека / Ю.Г. Юшков [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* – 2010. – № 1. – С. 84.
20. *Alphaherpesvirus major tegument protein VP22: its precise function in the viral life cycle / L. Wu [et al.] // Frontiers in Microbiology.* – 2020. – Т. 11. – P. 1908.
21. *COVID-19 и риск реактивации герпесвирусной инфекции / Т.В. Соломай [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* – 2021. – Т. 11, № 2. – С. 55–62.

REFERENCES

1. Jin Z., Liu Y., DNA methylation in human diseases, *Genes & diseases*, 2018, Vol. 5, No. 1, pp. 1–8.
2. Kennedy D.A., Dunn P.A., Read A.F., Modeling Marek's disease virus transmission: A framework for evaluating the impact of farming practices and evolution, *Epidemics*, 2018, Vol. 23, pp. 85–95.
3. Laurent S. [et al.], Detection of avian oncogenic Marek's disease herpesvirus DNA in human sera, *Journal of general virology*, 2001, Vol. 82, No. 1, pp. 233–240.
4. Zhang L. [et al.], Marek's disease vaccines-induced differential expression of known and novel microRNAs in primary lymphoid organ bursae of White Leghorn, *Veterinary research*, 2020, Vol. 51, No. 1, pp. 1–14.
5. Nuraliev E.R., Kochish I.I., *Vestnik Omskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2017, No. 4 (28), pp. 162–169 (In Russ.).
6. Donchenko A.S., Yushkov Yu.G., Afonyushkin V.N., *Vestnik rossiiskoi sel'skokhozyaistvennoi nauki*, 2009, No. 1, pp. 73–75 (In Russ.).
7. WANG L. [et al.], Analysis of DNA methylation of CD79B in MDV-infected chicken spleen, *Journal of Integrative Agriculture*, 2021, Vol. 20, No. 11, pp. 2995–3002.

8. Zhao X. [et al.], Correlation analyses of CpG island methylation of cluster of differentiation 4 protein with gene expression and T lymphocyte subpopulation traits, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2018, Vol. 31, No. 8, pp. 1141.
9. Jaenisch R., Bird A., Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nature genetics*, 2003, Vol. 33, No. 3, pp. 245–254.
10. Murata S. [et al.], Genetic characterization of a Marek's disease virus strain isolated in Japan, *Virology journal*, 2020, Vol. 17, No. 1, pp. 1–13.
11. Frías-Lasserre D., Villagra C.A., The importance of ncRNAs as epigenetic mechanisms in phenotypic variation and organic evolution, *Frontiers in Microbiology*, 2017, Vol. 8, pp. 2483.
12. Liao Y. [et al.], Role of Marek's Disease Virus (MDV)-encoded US3 serine/threonine protein kinase in regulating MDV Meq and Cellular CREB phosphorylation, *Journal of virology*, 2020, Vol. 94, No. 17, pp. e00892-20.
13. Trapp-Fragnet L. [et al.], Identification of Marek's disease virus VP22 tegument protein domains essential for virus cell-to-cell spread, nuclear localization, histone association and cell-cycle arrest, *Viruses*, 2019, Vol. 11, No. 6, p. 537.
14. Dubeski P.L., Owens F.N., Song W.O., Coburn S.P., Mahuren J.D., Effects of B vitamin injections on plasma B vitamin concentrations of feed-restricted beef calves infected with bovine herpesvirus-1, *J Anim Sci.*, 1996, Vol. 74 (6), pp. 1358–66, DOI: 10.2527/1996.7461358x. PMID: 8791209.
15. Yarovoj S.K., Maksudov R.R., *Eksperimental'naya i klinicheskaya urologiya*, 2013, No. 3, pp. 88–93 (In Russ.).
16. McCaddon A., Regland B., COVID-19: A methyl-group assault?, *Medical hypotheses*, 2021, Vol. 149, p. 110543.
17. López O.S., Villar A.D., Chaparro G.J., Challenges in the diagnosis and control of Marek's disease virus in Colombia, *Revista MVZ Córdoba*, 2019, Vol. 24, No. 1, pp. 7157–7165.
18. Davidson I., Out of Sight, but Not Out of Mind: Aspects of the Avian Oncogenic Herpesvirus, Marek's Disease Virus, *Animals*, 2020, Vol. 10, No. 8, pp. 1319.
19. Yushkov Yu.G. [et al.], *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*, 2010, No. 1, p. 84 (In Russ.).
20. Wu L. [et al.], Alphaherpesvirus major tegument protein VP22: its precise function in the viral life cycle, *Frontiers in Microbiology*, 2020, Vol. 11, p. 1908.
21. Solomaj T.V. [et al.], *Epidemiologiya i infektionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*, 2021, Vol. 11, No. 2, pp. 55–62 (In Russ.).