

Киселёв О.И.¹, Львов Д.К.²

На пути предсказательного конструирования пандемических вирусов гриппа типа А

¹ ФГБУ «НИИ гриппа» Министерства здравоохранения РФ;

² ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Министерства здравоохранения РФ

Пандемический вирус гриппа А (H1N1) pdm09 был отнесён к умеренно патогенным штаммам вирусов, уступающим в контагиозности и патогенности таким эталонным вирусам, как вирусы гриппа А (H1N1) pdm1918 и вирусам птичьего гриппа H5N1. Вероятность проникновения вируса гриппа А (H5N1) в популяцию человека со сменой рецепторных свойств гемагглютинина H5 с «птичьего» типа ($\alpha 2-3$) на человеческий тип ($\alpha 2-6$) оценивается в качестве реальной угрозы развития очередной пандемии гриппа. В данной обзорной статье рассматривается строение рецептор-связывающих доменов гемагглютинина (HA) вирусов гриппа типа А. Мутация в HA пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09 D222G, впервые выявленная на территории Российской Федерации, привела к расширению рецепторной специфичности у пандемического вируса с человеческого типа на смешанный тип: человеческий и птичий типы. Анализ исследований Fuchier с соавт. (2012) и Kawaoka с соавт. (2012) показал, что при наличии частичной адаптации рецепторных сайтов к смене видовой специфичности с рецепторов $\alpha 2-3$ на $\alpha 2-6$ при пассировании на хорьках быстро удаётся получить мутантные вирусы H5N1 с высокой аффинностью к рецепторам человеческого типа. Данные исследования обсуждаются с точки зрения создания новых подходов к конструированию противогриппозных вакцин или получения вирусов, рассматривающихся в качестве потенциальных агентов биотерроризма.

Ключевые слова: *грипп А, пандемия, А (H1N1) pdm09, А (H5N1), гемагглютинин, рецептор-связывающий сайт, рецепторная специфичность, мутации, трансмиссивность, видовая адаптация.*

Kiselev O.I.¹, Lvov D.K.²

On the way predictive design of pandemic influenza virus type A

¹ Institute of Influenza, Russian Ministry of public health;

² D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Russian Ministry of public health

Pandemic influenza A (H1N1) pdm09 virus has been classified as moderately pathogenic strains of viruses in comparison with other known pandemic viruses such as influenza A (H1N1) pdm1918 and avian influenza A (H5N1) virus. The probability of penetration of A (H5N1) virus in a human population with the change of the receptor properties of H5 hemagglutinin from the "bird" type ($\alpha 2-3$) to human type ($\alpha 2-6$) is estimated as a real threat of another next influenza pandemic. In presented review the structure of receptor binding domains (RBD) of hemagglutinin (HA) of influenza A viruses is described. Mutation in the HA RBD of pandemic A (H1N1) pdm09 D222G was the first substitution in RBD, identified in the Russian Federation, led to the expansion of the receptor specificity of a pandemic virus. The virus had a mixed type of recognition properties and was capable to interact with the human and avian types receptors. Overview of a recent research of Fouchier et al. (2012) and Kawaoka et al. (2012) showed that even partial adaptation of RBD to change the species specificity of receptors from $\alpha 2-3$ to the $\alpha 2-6$ in combination with of the virus passages in ferrets may lead quickly to appearance of mutant H5N1 viruses with high affinity to receptors of the human type and high rate of transmission between ferrets. These studies are discussed in terms of creating new approaches to designing vaccines or for viruses that are considered as potential agents of bioterrorism.

Key words: *influenza A, pandemia, A (H1N1) pdm09, A (H5N1), hemagglutinin, receptor binding site, receptor specificity, mutations, transmissibility, host range.*

Пандемия гриппа 2009–2011 гг. стремительно началась в марте 2009 г., но уже в начале 2011 г. пандемический потенциал вируса гриппа А (H1N1) pdm09 внезапно истощился. Несмотря на то, что вирус гриппа А (H1N1) pdm09 был отнесен к умеренно патогенным штаммам, частота осложнений при этом гриппе была относительно высока, смертельные исходы также были чаще, чем от сезонного гриппа [2, 4, 6, 9, 23]. Поэтому большинство специалистов разделяло мнение о том, что патогенность и контагиозность пандемического вируса в процессе циркуляции могут существенно возрасти. С одной стороны, это мнение было основано на молекулярно-генетических данных, а с другой стороны, одновременная циркуляция НРАИ / H5N1 (highly pathogenic avian influenza A / H5N1) в мире не исключала высокой вероятности реассортации между вирусами гриппа А (H1N1) pdm09 и НРАИ / H5N1 с появлением нового возбудителя с более высоким уровнем патогенности [3, 5, 10, 12, 35]. Кроме того, такая же опасность связана с возможностями адаптации НРАИ / H5N1 к человеческой популяции [5, 10, 35]. Вирусы гриппа А субтипов H1N1 и H5N1 проявляют признаки эволюционной изменчивости спектра рецепторной специфичности (РС) [1–14, 20, 25, 26, 28–30, 34]. Идеальным для появления нового пандемического вируса представляется сценарий, описанный на рис. 1.

| | | | | |
|--|----------|---|----------|--|
| H1N1 | + | НРАИ / H5N1 | = | А(H5N1) адаптация к человеку |
| Быстрое распространение Низкая смертность | + | Медленное распространение Высокая смертность | = | Контактный и капельно-воздушный пути распространения Высокая смертность |

Рисунок 1. Принципиально возможная схема реассортации вирусов гриппа А (H1N1) pdm09 и А (H5N1), приводящая к появлению пандемического вируса с высокой контагиозностью, высокой скоростью капельно-воздушного распространения и высокой смертностью.

Комплементарное взаимодействие двух вирусных геномов – А (H1N1) pdm09 и HPAI / H5N1 – способно привести к появлению вируса с наиболее высокой патогенностью и трансмиссивностью. HPAI / H5N1 отличается от типичных пандемических вирусов медленным распространением, то есть низкой контагиозностью.

Проблема прогноза пандемий гриппа на ближайший период состоит в том, чтобы понять возможен ли такой сценарий в лабораторных условиях и как он может осуществиться в природе ?

Рецепторная специфичность пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09.

Рецептор-связывающий сайт (РСС) гемагглютинаина (НА – hemagglutinin) образован тремя основными структурными элементами на «верхушке» головной части первой субъединицы НА: α -спиралью 190–198 (спираль-190); петлей 133–138 (петля-130); петлей 220–229 (петля-220) [14, 17, 31].

Шесть консервативных аминокислотных остатков Y98, S/T136, W153, H183, L/L194 и Y195 образуют основание РСС [31]. Критические аминокислотные остатки, определяющие РС различны для рецепторов человеческого, свиного и птичьего типов. Известно также, что для вирусов гриппа А (H1) человека критичными являются аминокислотные остатки E190 и G225. Не менее критичны замены в других положениях: Q226L и G228S [4, 6, 13, 14, 20, 25]. Однако, в силу высокой конформационной подвижности РСС многие замены в спирали-190, петле-130 и петле-220 могут оказывать существенное влияние на взаимодействие с клеточным рецептором [31, 33].

Клеточный рецептор для вирусов гриппа А представлен двумя основными типами ковалентной связи терминального остатка нейраминовой кислоты со следующим моносахаридом в составе сиалогликанов: α 2-6 (для РСС НА эпидемических штаммов) и α 2-3 (для РСС НА штаммов, изолированных от птиц). Более того, РСС распознает не только дисахариды, но и трисахариды, поэтому варибельность рецепторов оказывает влияние на степень сродства НА не только к определенному типу связи между терминальными моносахаридами, но также к структуре олигосахаридов [4, 5, 7, 9, 31, 33, 34].

НА вируса гриппа А (H1N1) pdm09 относится к свиному типу североамериканской линии вирусов гриппа А (H1N1) [1, 3, 9, 33, 34]. С самого начала своего распространения пандемический вирус обладал смешанным типом α 2-6 / α 2-3-специфичности [2, 3, 9], хотя строение его РСС полностью соответствует высокой аффинности к рецепторам α 2-6-типа [33].

Одновременно, наблюдения за циркулирующими вариантами HPAI / H5N1 свидетельствуют об отчетливой тенденции к постепенному увеличению генетического разнообразия [10, 24], изменению уровня вирулентности [11] и РС в направлении человека [7, 34]. Штаммы HPAI / H5N1, изолированные от перелётных птиц в Египте, содержали в НА следующие мутации: Q192H, I294L/I151T и проявляли повышенное сродство к рецепторам α 2-6-типа [34]. Поэтому у HPAI / H5N1 можно в будущем ожидать смену РС, α 2-3 \rightarrow α 2-6.

Мутация D222G в рецептор-связывающем сайте вируса гриппа А (H1N1) pdm09 усиливает патогенность, но не оказывает влияния на трансмиссивность. Отечественные вирусологи уже в первые месяцы пандемии гриппа А (H1N1) pdm09 обратили особое внимание на возможность значительных изменений в патогенности и экологических свойствах вируса даже в случае обретения одиночных мутаций в таких функционально значимых сайтах, как РСС [2, 6]. Последующие события имели более сложный сценарий, но, в целом, опасения оказались ненапрясными.

Действительно, очень быстро после начала пандемии был выделен штамм с одиночной мутацией в D222G – эта мутация впервые выявлена на территории России и Норвегии [6, 20]. Затем появились и другие сообщения о выделении мутантных вирусов от больных с тяжёлыми формами гриппозной инфекции [2, 4, 25, 29].

Первые изоляты вирусов гриппа А (H1N1) pdm09-D222G были прямо связаны со смертельными исходами, что послужило основанием для предположения о связи этой

мутации с усилением патогенности [6, 20, 25]. Кроме этого, замена D222G характерна для «испанки» – вируса гриппа А (H1N1) pdm1918 [31]. В связи с этим изучению этой мутации было уделено особое внимание [2, 4, 6, 20, 25, 29]. Показательные данные приводятся в работе [4]: среди больных гриппом А (H1N1) pdm09, от которых изолированы штаммы с мутацией D222G, летальность составляет 50 %.

Для получения прямых свидетельств о роли данной мутации в усилении патогенности и трансмиссивности с целью абсолютной чистоты эксперимента исследования проводились на штамме–прототипе вируса гриппа А (H1N1) pdm09 – A/Netherlands/602/2009. В ген, кодирующий НА этого вируса, была введена точечная мутация D222G [14]. Вирулентность и трансмиссивность вируса при аэрозольном воздушно-капельном заражении исследовались на мышах, морских свинках и хорьках. У мышей вирусная инфекция вызывала воспаление глаз без отчетливых дополнительных признаков вирулентности. Вне зависимости от способа передачи трансмиссивность носила умеренный характер. Однако, вирус A/Netherlands/602/2009-D222G проявлял свойства изменения рецепторной специфичности в тестах *in vitro*. Так установлено, что модифицированный вирус обладал повышенным сродством к макрофагам и пневмоцитам II-го типа в альвеолах, а также клеткам трахеи и бронхиального подслизистого эпителия. Оказалось, что вирус A/Netherlands/602/2009-D222G проявляет практически идентичный уровень связывания с рецепторами $\alpha 2$ -3- и $\alpha 2$ -6-типов [14]. Это свойство делает его ближе к свиным вирусам и вирусам гриппа птиц. Повышенное сродство к макрофагам и пневмоцитам II-го типа может объяснить его патогенность [2, 4–6, 9, 14]. Вероятно, способность инфицировать эти типы клеток может существенно повысить патогенность вируса в целом.

Компьютерное моделирование РСС с $\alpha 2$ -6-сиалозидами подтверждает, что мутация D222G приводит к расширению рецепторной специфичности, проявляющейся способностью к взаимодействию вируса A/Netherlands/602/2009-D222G с $\alpha 2$ -6- и $\alpha 2$ -3-рецепторами и повышению сродства к рецепторам в нижних отделах респираторного тракта человека [14]. Фактически, механизм усиления патогенности этого вируса идентичен таковому у HPAI / H5N1, которые поражают, главным образом, нижние отделы респираторного тракта человека, быстро вызывая альвеолиты и отёк легких [2–10, 12, 20, 25].

Получение штаммов HPAI / H5N1 с высокой рецепторной специфичностью в отношении эпителиоцитов верхнего отдела респираторного тракта хорьков и людей. Из анализа результатов исследований структуры РСС со всей очевидностью следует, что понимание путей конструирования РСС с заданной видовой специфичностью – задача достаточно сложная, в чём можно убедиться по публикациям исследовательских групп проф. Фуше [16, 17] и проф. Каваока [18].

Длительная циркуляция HPAI / H5N1 делает необходимым реальный прогноз скорости и путей его адаптации к человеческой популяции и выяснения условий быстрой эволюции его РС, которые обеспечат его стабильный переход в человеческую популяцию с совершенно очевидными последствиями [5, 7, 10, 12, 13, 15].

Исследования Фуше и Каваока [16–18] показали, что РС как фактор адаптации к новому хозяину (человеку) имеет наиболее принципиальное значение для трансмиссивности HPAI / H5N1 среди людей.

Группа проф. Каваока [18] на первом этапе с использованием случайного мутагеноза гена НА получили 370 штаммов HPAI / H5N1 с удалённым сайтом протеолитического расщепления НА. Скрининг РС этих вирусов привёл к изоляции 9 мутантных штаммов с высокой $\alpha 2$ -6-РС. У всех штаммов выявлены мутации, расположенные вблизи «кармана» РСС. Дополнительная селекция по связыванию с синтетическим аналогом клеточного рецептора привела к окончательной идентификации 8 штаммов, характеризующихся высокой $\alpha 2$ -6-РС. У этой группы изолятов выявлены следующие мутации: E119G, V152I, N224K, и Q226L. Дополнительный анализ показал, что ключевое значение для распознавания $\alpha 2$ -6-рецепторов имеет комбинация мутаций N224K и Q226L. Мутация N224K, по мнению авторов, может изменять ориентацию петли-220 в «кармане» РСС и тем

самым усилить взаимодействие аминокислотного остатка в положении 226 с α 2-6-РСС (рис. 2).

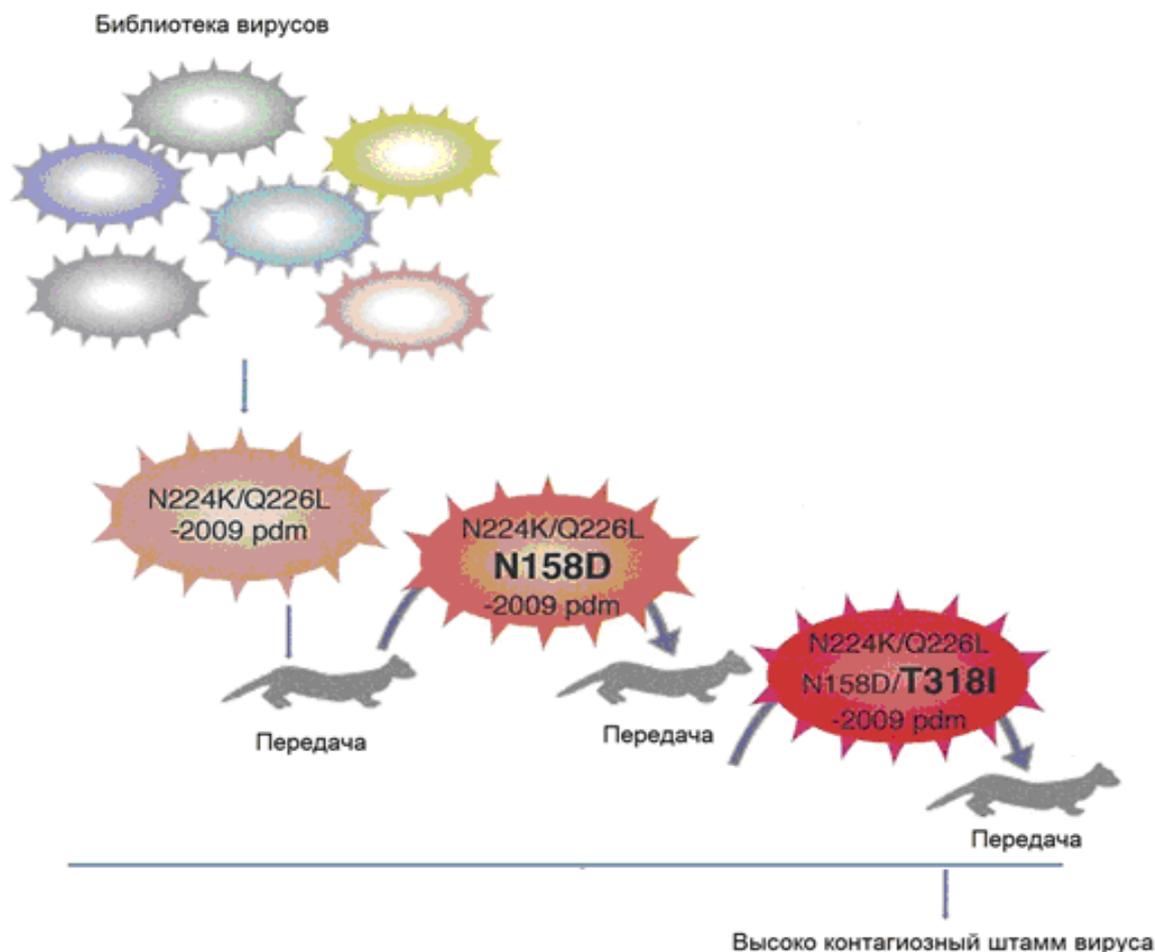


Рисунок 2. Схема селекции мутантных по HA штаммов HPAI / H5N1 с адаптацией к рецепторам человеческого типа (α 2-6) путём пассажей на хорьках (по [10]).

Следует обратить особое внимание на то, что библиотека (клонотека) мутантных штаммов HPAI / H5N1 подверглась первичному скринингу на связывание с рецепторами человеческого типа. На этом этапе был отобран один вариант наиболее эффективно связывающийся с синтетическими α 2-6-сиалополигликанами и несущий в HA мутации N224K/Q226L, но не передающийся среди хорьков. Этот вирус не был достаточно адаптирован к инфицированию животных и человека. Дальнейшее пассирование этого клона HPAI / H5N1-N224K/Q226L на хорьках привело к появлению вируса с мутацией N158D в HA [18]. Этот вариант уже проявлял отчётливый уровень трансмиссивности и передавался в 2 из 6 пар (33 %) хорьков по данным изоляции вирусов. Однако, согласно серологическим данным, передача вируса имела место у 5 из 6 хорьков (83 %). Штамм, изолированный от одного из хорьков на этой стадии, отличался наличием в HA ещё одной мутации – T318I, локализованной далеко за пределами РСС. Тестирование этого вируса на трансмиссивность показала, что, по данным изоляции, он оказался способным к заражению 4 из 6 пар (67 %) хорьков, а по данным сероконверсии – 6 из 6 (100 %). Полная «формула» измененной структуры РСС HPAI / H5N1 с приобретённой de novo РС в отношении клеточных рецепторов млекопитающих (рис. 2) выглядит следующим образом: N224K / Q226L / N158D / T318I.

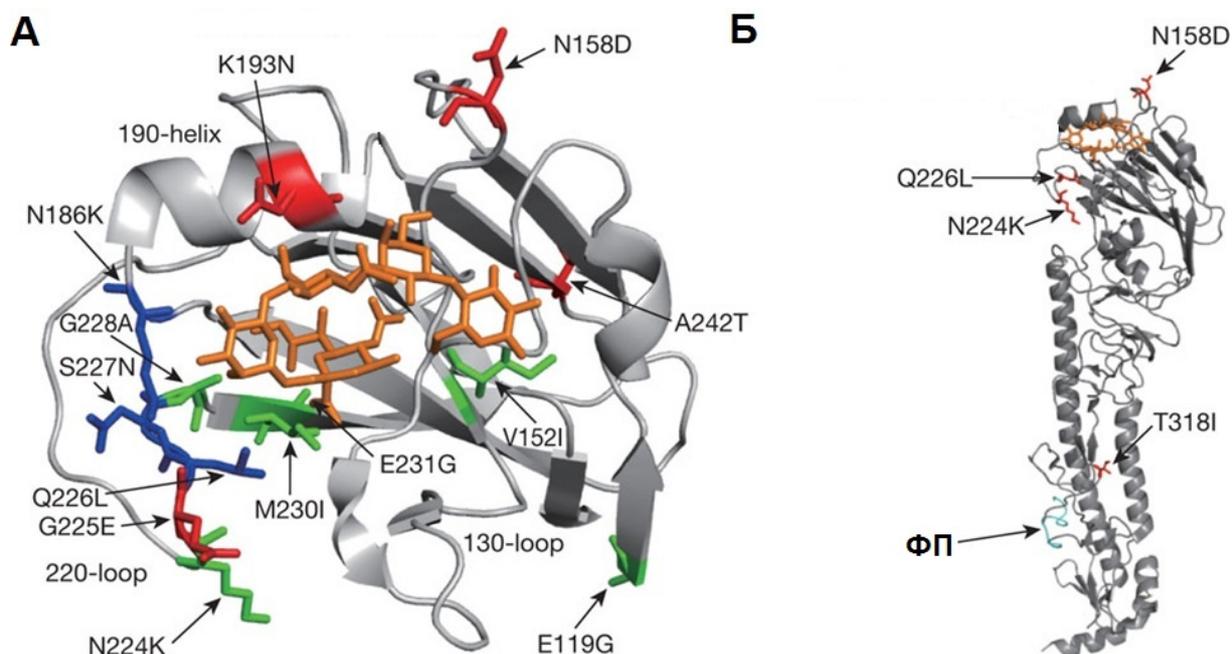


Рисунок 3. Модель молекулы НА штамма A/Vietnam/1203/2004 с изменённой РС (по [10]):
 А – РСС, развёрнутый вдоль длинной оси; обозначены спираль-190, петля-220, петля-130;
 Б – нерасщеплённый мономер НА, развёрнутый по короткой оси; ФП – пептид слияния (фьюжин-пептид).
 Новые мутации, обеспечивающие воздушно-капельную передачу вируса: K193N, A242S, T381I.
 Мутации после контактной передачи: N158D, N224K, T381I.
 Мутации, повышающие α 2-6-РС, выделены синим цветом, повышающие α 2-3-РС – зелёным цветом.
 Мутации, выявленные в НРАI / H5N1 после появления способности к репликации и передаче вируса у хорьков, выделены красным цветом.

Особый интерес представляет использование в этой работе [18] теста на температурную стабильность вирусов при $t = 50^\circ\text{C}$, что косвенно свидетельствует о стабильности НА. Оказалось, что добавление мутации N158D к мутациям N224K/Q226L существенно повышает стабильность НА. Таким же фенотипическим эффектом появляется мутация T318I. Для конструирования мутантного вируса был использован вирус A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Этот вьетнамский изолят был одним из кандидатов в вакцинные штаммы [18] против НРАI / H5N1, активно циркулирующем в странах Юго-Восточной Азии [5, 10, 12, 16, 35]. Более того, этот изолят был получен от человека, что повышало шансы на его дальнейшую адаптацию к человеку. НА этого вируса проявлял высокую РС птичьего типа (α 2-3). Для обеспечения возможности проведения работ в научной лаборатории уровня BSL2 авторы [19] также произвели замену сайта протеолитического расщепления НА, свойственного НРАI, на авирулентный вариант. Библиотека гена НА штамма A/Vietnam/1203/2004 была получена с использованием мутагенеза в ПЦР. При этом, ген НА не подвергся изменениям, что, в определённой степени, снижает ценность полученных результатов. Клонированные варианты гена НА были использованы для получения библиотеки инфекционного вируса на основе оставшихся 6 генов прототипного штамма A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Этот штамм вируса более 50 лет используется в лабораторной практике, и реально утратил основные детерминанты патогенности. Конструирование вируса со сменой РС с «птичьего» на «человеческий» тип (α 2-3 \rightarrow α 2-6) осуществлено без учёта существенного вклада других генов в преодоление межвидового барьеров птица-человек и патогенность в отношении того или иного вида. Поэтому данное исследование можно рассматривать только в качестве экспериментального доказательства роли рецепторной специфичности в трансмиссии вирусов гриппа типа А.

На рис. 3 представлена модель РСС штамма A/Vietnam/1203/2004 с расширенной топографией ключевых аминокислотных остатков и замен при изменении РС с «птичьего»

типа на «человеческий». Как уже отмечалось, мутация Т381I не влияла на связывание с $\alpha 2-6$ -сиалозидами, но в силу локализации в стебле НА (в контактной области тримера НА – см. рис. 3.Б) стабилизировала нативный НА в составе тримера на поверхности вириона.

Очевидно также, что одних мутаций в РСС недостаточно для обеспечения трансмиссивности вируса среди людей и хорьков. Ключевую роль в этих процессах могут играть также мутации в белках полимеразного комплекса, белке NS1 и, вероятно, в других вирусных белках, включая белки NP, M1 и M2 [1, 5, 10].

Таким образом, воздушно-капельный путь передачи связан с мутациями в следующих положениях: K193N, A242S, T318I. Контактный путь передачи связан с мутациями в других положениях РСС: N158D, N224K, Q226L и T381I (рис. 3).

Конструирование вирусов с комбинацией генов HPAI / H5N1 и пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09.

Одновременно с работами исследовательской группы проф. Каваока [18] появились публикации научной группы под руководством проф. Фуше [16, 17], основанные на использовании штамма HPAI A/Indonesia/5/2005 (H5N1). Этот штамм выделен от человека во время серии заражения людей от птиц с развитием тяжёлых заболеваний, в том числе – с летальными исходами. Для исследования использована такая же модель инфекции, как и в работе [18], то есть пассирование вирусов и изучение их трансмиссивности осуществлялось на хорьках.

Все авторы [16–18] особо подчёркивают, что, безусловно, вирулентность вирусов гриппа А птиц, свиней и человека зависит не только от структуры НА, но и других вирусных генов. У птиц репликация вируса осуществляется при 41 °С, а у человека в верхних дыхательных путях температура составляет всего 33 °С. Поэтому считается, что мутация E627K в белке PB2 играет ключевое значение в адаптации к репликации при пониженной температуре [17]. Нельзя не отметить, что мутации, способствующие температурной адаптации, часто локализуются в гене, кодирующем белок NP [1]. В такой же степени, температурная зависимость репликации может быть связана с такими элементами вирусного генома, как обращенные концевые повторы. Однако, до сих пор этому не придается должного значения [1].

Принимается во внимание также и тот факт, что при аэрозольном заражении существенное значение имеет размер частиц аэрозоля. Поэтому они используют термин не аэрозольное заражение, а «воздушный путь передачи инфекции» [17].

Таким образом, установлено, что штамма HPAI A/Indonesia/5/2005 (H5N1) изменяет РС с $\alpha 2-3$ - на $\alpha 2-6$ -тип при введении следующих аминокислотных замен в структуру РСС НА: N182K, Q222L/G228S. Ранее было установлено, что мутации Q222L и G228S играют ключевую роль в изменении РС пандемических вирусов гриппа А (H2N2) pdm1957 и А (H3N2) pdm1968, соответственно [17, 31]. Мутация в положении N182K позднее была выявлена у штаммов HPAI / H5N1, изолированных от человека. В соответствии с этими данными, сайт-специфическим мутагенезом были получены штаммы, содержащие эти замены в НА. Изучение трансмиссивности у хорьков таких вирусов показало, что ключевое значение для этого показателя имеют мутации Q222L/G228S [17, 31, 33]. Введение точечной замены в белок PB2 в положение E627K не приводило в сочетании с мутациями в НА к изменению трансмиссивности. Более того, в контрольном эксперименте наблюдалось отсутствие передачи инфекционного вируса интактным хорькам. В связи с этим, было принято решение о заборе назальных смывов и пассировании вируса с использованием 10 последовательных пассажей. В результате селекции в естественных условиях (пассирование на хорьках) был получен вирус, проявляющий высокую трансмиссивную активность. Вирусные изоляты после 10 пассажей были изолированы с последующим секвенированием вирусного генома. В результате были выявлены множественные мутации практически во всех генах кроме сегмента 7, кодирующего белки M1 и M2, которые у вирусов гриппа А являются наиболее консервативными [16, 17]. В НА пассированных

штаммов выявлена только одна дополнительная мутация T156A. Эта мутация сопровождается утратой сайта гликозилирования NTS в HA. Замена T156A встречалась у 89 % изолятов на 10 пассаже, а в 11 % встречалась мутация N154K также приводящая к утрате сайта гликозилирования [17]. Ликвидация сайта гликозилирования в результате мутации N158D в этом участке также установлена в [18].

Таким образом, мутации в гене PB2 и дополнительные мутации в гене HA, приводящие к ликвидации сайта гликозилирования в 158 или 156 положениях в совокупности с другими неидентифицированными мутациями, приводят также к изменению РС HPAI / H5N1, что делает эти вирусы опасным для животных и человека [17].

Дальнейший анализ структуры генома пассированных в разных условиях штаммов выявил дополнительные аминокислотные замены. Среди них стабильно определялись следующие замены: H103Y и T156A в HA, H99Y I368V в PB1, R99K и S345N в NP.

Неканонические проявления рецепторной адаптации вирусов гриппа А: реакция врожденного иммунитета на структуру рецептор-связывающего сайта.

В первые годы распространения HPAI / H5N1 было установлено, что развитие клинической картины заболевания уже на ранних стадиях носит системный характер [21, 22, 32]. В первую очередь, системность проявлялась в генерализованном провоспалительном синдроме, системном поражении органов и инфекционно-токсическим шоком [12, 15, 19, 20, 25]. Наиболее тяжёлыми осложнениями были альвеолиты, пневмонии и геморрагический отёк лёгких [21, 22, 32]. Однако, аналогичное течение заболевания гриппом наблюдалось у больных, инфицированных пандемическим вирусом гриппа А (H1N1) pdm09 [2–4, 6, 9, 20], а также у лабораторных белых мышей, интраназально заражённых адаптированным штаммом гриппа А (H1N1) pdm09 [8].

Накопленные за эти годы наблюдения свидетельствуют о том, что развитие воспалительного синдрома при гриппе, получившего название «цитокинового шторма», является результатом активации реакций врожденного иммунитета при вирусной инвазии [22, 32]. Более того, установлено, что штаммы HPAI / H5N1 отличаются от других (и в том числе – пандемических вирусов) по способности к индукции чрезмерного синтеза цитокинов с нарушением их баланса и усилением действия отдельных провоспалительных компонентов цитокинового семейства [21, 25, 32].

В последние годы все больше внимания уделяется функциям дендритных клеток при гриппозной инфекции [32]. Дендритные клетки экспрессируют множество рецепторов, включающих набор рецепторов молекулярного распознавания патогенов (PRR – pattern recognition receptors). Первичная идентификация вирусов и бактерий включает распознавание молекулярного профиля структурных компонентов и молекул, ассоциированных с ними. Системы распознавания вирусов и бактерий включают также цитоплазматические сенсоры типа RIG1- хеликазы, индуцируемые ретиноевой кислотой. В эндосомах распознавание патогенов осуществляется Toll-рецепторами. На мембранах дендритных клеток для этой функции также представлены Toll-рецепторы и лектины типа С [21, 32].

Наличие множественной системы распознавания патогенов свидетельствует о том, что эта система, по крайней мере, на уровне дендритных клеток должна действовать в отношении видовых признаков тех же вирусов гриппа.

В этой связи особый интерес представляет исследование Ramos с соавт. [30], в котором исследовалась индукция цитокинов рекомбинантными штаммам с различной РС, которые получались из A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) путём введения точечных мутаций Q226L и G228S [30]. У этой пары рекомбинантных вирусов исследовалась РС по отношению к α 2-3- и α 2-6-сиалополигликанам, профиль активации синтеза цитокинов и белков воспаления, индуцированных в дендритных клетках и клетках трахео-бронхиолярного эпителия. Установлено, что вирус дикого типа (A/Vietnam/1203/2004-Q226, G228) с α 2-3-РС является более сильным индуктором синтеза цитокинов и хемокинов в дендритных клетках,

макрофагах, клетках трахеи и бронхов человека по сравнению с мутантным вирусом (A/Vietnam/1203/2004-Q226L, G228S), имеющим α 2-6-РС («человеческого» типа). Таким образом, дендритные клетки, макрофаги и эпителиальные клетки дыхательных путей обладают «сенсорным» механизмом реагирующим на HPAI / H5N1 с α 2-3-РС («птичьего» типа). Это сопровождается активацией генов, кодирующих провоспалительные цитокины и хемокины, что приводит к развитию «цитокинового шторма». Смена рецепторной специфичности у вирусов HPAI / H5N1 на «человеческий» тип делает эту реакцию более умеренной и сбалансированной [30].

Совершенно очевидно, что эти данные открывают новый путь аттенуации вирусов гриппа А, перспективы направленного дизайна вакцин и соответствующих лекарственных препаратов.

Целенаправленное конструирование высоко-патогенных вирусов гриппа человека и проблема биотерроризма.

Получив описанные выше результаты, исследовательские группы проф. Фуше и проф. Каваока направили публикации в журналы Nature и Science. Вопрос о публикации стал предметом активной дискуссии на самых различных уровнях. Редакции этих известных научных журналов не взяли на себя ответственность за публикацию подробных данных о строении лабораторных вариантов вирусов HPAI / H5N1 с высокой трансмиссивной активностью в отношении хорьков и человека. Вместе с тем, нельзя не отметить, что вирус гриппа А давно признан реальным объектом для использования его в качестве биологического оружия [26]. В этой связи, необходимо было решить вопрос о степени публичной доступности этой информации и соответствующих технологических подходов. Этот вопрос обсуждался на уровне Национального научно-консультативного Совета по биобезопасности при Национальном Институте здоровья США (NSABB – National Science Advisory Board for Biosecurity) [19, 27, 28], Комиссии ВОЗ по подготовке к пандемии гриппа (PIP Advisory Group) и других международных организаций. Опасения экспертов состояли в том, что аналогичные или близкие по строению и патогенности вирусы могут быть получены с целью их использования в качестве высокопатогенных агентов для актов биотерроризма [26]. Однако в качестве контраргумента ведущие вирусологи США и Европы заявили, что целенаправленное конструирование высоко патогенных вирусов методами обратной генетики и сайт-направленного мутагенеза требуют высочайшей квалификации, сильной лабораторной базы, сопровождения специалистами по биоинформатике, дизайну генов и белков. Необходима также высокая квалификация специалистов в области молекулярной генетики и геной инженерии.

Из научных изданий дискуссия сместилась в средства массовой информации. Основным вопросом, который обеспокоил мировую общественность, явился вопрос о возможности использования таких подходов группами террористов, ориентированных на использование бактериологического оружия [26, 27]. Ряд ученых выступили с аргументом о том, что данные технологии недоступны слаборазвитым странам, поэтому в ближайшие годы можно не опасаться повторения этих исследований в целях создания бактериологического оружия. На самом деле аргумент этот имеет два недостатка: 1. демонстрацию превосходства и сильного научного и технологического отрыва, что недопустимо в вопросах здравоохранения; 2. практика последних 5–7 лет показала, что в ряде стран, в которых до эпизоотии HPAI / H5N1 практически отсутствовала вирусологическая наука и практика работы в этой области, быстро достигли во многих направлениях реального мирового уровня. Это может произойти и в других менее контролируемых мировым сообществом странах. Данных, опубликованных в работах [16, 17] и [18] совершенно недостаточно для понимания плана конструирования «идеального» высокопатогенного пандемического штамма. Поэтому простор для воображения у специалистов-вирусологов остается неограниченным, как это было и до обсуждаемых публикаций.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Киселёв О.И.* Геном пандемического вируса гриппа A/H1N1v-2009. – М.: Изд-во «Димитрэйд График Групп», 2011. – 163 с.
2. *Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Щелканов М.Ю.* и др. Пандемический грипп в России: отличительные особенности клинического течения и отсутствие ранней этиотропной терапии как фактор риска развития тяжёлых форм заболевания // *Терапевтический архив.* – 2011. – Т. 83. – № 9. – С. 48–53.
3. *Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю.* и др. Распространение нового пандемического вируса гриппа А (H1N1) v в России // *Вопросы вирусологии.* – 2010. – Т. 55. – № 3. – С. 4–9.
4. *Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В.* и др. Корреляция между рецепторной специфичностью штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, изолированных в 2009-2011 гг., структурой рецептор-связывающего сайта и вероятностью развития летальной первичной вирусной пневмонии // *Вопросы вирусологии.* – 2012. – Т. 57. – № 1. – С. 14–20.
5. *Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В.* Эпидемический потенциал высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1). Информационное сообщение по материалам ВОЗ // В сб.: *Материалы IX Научно-практической конференции «Инфекционные болезни и антимикробные средства» (Москва, Россия; 06–07 октября 2011 г.).* – М.: Инфомедфарм Диалог, 2011. – С. 55–57.
6. *Львов Д.К., Яшкулов К.Б., Прилипов А.Г.* и др. Обнаружение аминокислотных замен аспарагиновой кислоты на глицин и аспарагин в рецептор-связывающем сайте гемагглютинаина в вариантах пандемического вируса гриппа А (H1N1) swl от больных с летальным исходом и со среднетяжёлой формой заболевания // *Вопросы вирусологии.* – 2010. – Т. 55. – № 3. – С. 15–18.
7. *Прошина Е.С., Щелканов М.Ю., Федеякина И.Т.* и др. Рецепторная специфичность штаммов высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1), изолированных на территории России (2005–2010) // В сб.: *Материалы IX Научно-практической конференции «Инфекционные болезни и антимикробные средства» (Москва, Россия; 06–07 октября 2011 г.).* – М.: Инфомедфарм Диалог, 2011. – С. 73–74.
8. *Федеякина И.Т., Щелканов М.Ю., Аристова В.А.* и др. Экспериментальная пневмония лабораторных мышей, вызванная адаптированным штаммом пандемического вируса гриппа A/Anadyr/177/2009 (H1N1) swl, как модель изучения противовирусной активности химиопрепаратов // В сб.: *Материалы IX Научно-практической конференции «Инфекционные болезни и антимикробные средства» (Москва, Россия; 06–07 октября 2011 г.).* – М.: Инфомедфарм Диалог, 2011. – С. 85–86.
9. *Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Львов Д.К.* Грипп: история, клиника, патогенез // *Лечащий врач.* – 2011. – № 10. – С. 33–38.
10. *Щелканов М.Ю., Львов Д.К.* Эволюция высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1) в экосистемах Северной Евразии: от эпизоотии к возможной пандемии // В сб.: *Материалы IX Научно-практической конференции «Инфекционные болезни и антимикробные средства» (Москва, Россия; 06–07 октября 2011 г.).* – М.: Инфомедфарм Диалог, 2011. – С. 94–96.
11. *Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., Львов Д.К.* и др. Динамика вирулентности штаммов высоковирулентного вируса гриппа А / H5N1 генотипа 2.2, изолированных на территории России в 2005–2007 гг. // *Вопросы вирусологии.* – 2009. – Т. 54. – № 2. – С. 8–17.
12. *Casadevall A., Shenk T.* Mammalian-transmissible H5N1 virus: containment level and case fatality ratio // *mBio.* – 2012. – V. 3. – N 2. – P. e00054-12.
13. *Cline T.D., Karlsson E.A., Freiden P., et al.* Increased pathogenicity of a reassortant 2009 pandemic H1N1 influenza virus containing an H5N1 hemagglutinin // *J. Virol.* – 2011. – V. 85. – P. 12262–12270.
14. *Chutinimitkul S., Herfst S., Steel J., et al.* Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus affects receptor binding // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – P. 11802–11813.
15. *Doherty P.C., Thomas P.G.* Dangerous for ferrets: lethal for humans? // *BMC Biology.* – 2012. – V. 10. – P. 10–11.

16. *Herfst S., Schrauwen E.J.A., Chutinmitkul S., et al.* Why is HPAI virus not transmissible via aerosol? An extensive mutational and phenotypic analysis of mutant and reassortant H5N1 viruses // In: Proceedings of the IV-th ESWI Influenza Conference (Malta; September, 11-14, 2011). – Abs. B2000.
17. *Herfst S., Schrauwen E.J.A., Linster M., et al.* Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets // *Science*. – 2012. – V. 336. – P. 1534–1541.
18. *Imai M., Watanabe T., Hatta M., et al.* Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets // *Nature* – 2012. – V. 486. – N 7403. – P. 420–428.
19. *Imperiale M.J., Hanna M.B.* III. Biosafety considerations of mammalian transmissible H5N1 influenza // *mBio*. – 2012. – V. 3. – N 2. – P. e00043-12.
20. *Kilander A., Rykkvin R., Dudman S., Hungnes O.* Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus and severe clinical outcome. Norway 2009-2010 // *Eur. Surveill.* – 2010. – V. 15. – N 9. – pii: 19498.
21. *Koyama S., Ishii K.J., Coban C., Akira Sh.* Innate immune response to viral infection // *Cytokine*. – 2008. – V. 43. – N 3. – P. 336–341.
22. *Lee S.M.Y., Gardy J.L., Cheung C.Y., et al.* Systems-level comparison of host-responses elicited by avian H5N1 and seasonal H1N1 influenza viruses in primary human macrophages // *PLoS One*. – 2009. – V. 4. – N 12. – P. e8072.
23. *Louie J.K., Acosta M., Winter K., et al.* Factors associated with death or hospitalization due to pandemic 2009 influenza A(H1N1) infection in California // *JAMA* – 2009. – V. 302. – P. 1896–1902.
24. *Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Prilipov A.G., et al.* Evolution of HPAI H5N1 virus in natural ecosystems of Northern Eurasia (2005-2008) // *Avian Dis.* – 2010. – V. 54. – P. 483–495.
25. *Mak G.C., Au K.W., Tai L.S., et al.* Association of D222G substitution in hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) with severe disease // *Eur. Surveill.* – 2010. – V. 15. – N 14. – pii: 19534.
26. *Madjid M., Lillibridge S., Parsa M., et al.* Influenza as a bioweapon // *J. R. Soc. Med.* – 2003. – V. 96. – P. 345–346.
27. *O'Toole T., Inglesby T.* Strategic priorities for U.S. Biosecurity // *Biosecur. Bioterror.* – 2009. – V. 7. – P. 25–28.
28. *Palese P., Wang T.T.* H5N1 influenza viruses: facts, not fear // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* // 2012. – V. 109. – P. 2211–2213.
29. *Puzelli S., Facchini M., Spagnolo D., et al.* Transmission of hemagglutinin D222G mutant strain of pandemic (H1N1) 2009 virus // *Emerg. Infect. Dis.* – 2010. – V. 16. – P. 863–865.
30. *Ramos I., Bernal-Rubio D., Durham N., et al.* Effects of receptor binding specificity of avian influenza virus on the human innate immune response // *J. Virol.* – 2011. – V. 85. – P. 4421–4431.
31. *Stevens J., Blixt O., Glaser L., et al.* Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities // *J. Mol. Biol.* – 2006. – V. 355. – P. 1143–1155.
32. *Summerfield A., McCullough K.C.* Dendritic cells in innate and adaptive immune responses against influenza virus // *Viruses*. – 2009. – V. 1. – P. 1022–1034.
33. *Yang H., Camey P., Stevens J.* Structure and receptor binding properties of a pandemic H1N1 virus hemagglutinin // *PloS One*. – 2010. – V. 2. – RRN152.
34. *Watanabe Y., Ibrahim M.S., Ellakany H., et al.* Acquisition of human type binding specificity by new H5N1 influenza virus sublineages during their emergence in birds in Egypt // *PLoS Pathog.* – 2012. – V. 7. – N 5. – e1002068.
35. *WHO.* Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO. – 2012 // www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives.