

ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 578.832.1:578.76]:577.20.08

Цветков В.В., Деева Э.Г., Даниленко Д.М., Сологуб Т.В., Тихонова Е.П.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ ВИРУСА ГРИППА А(H1N1)PDM09

ФГБУ НИИ гриппа Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, 15/17

В отличие от эпидемий гриппа, практически ежегодно поражающих население, пандемии случаются гораздо реже, но имеют более тяжелые медицинские и социальные последствия. Изучение характера течения всех современных эпидемий и пандемий в настоящее время приобретает особую актуальность.

Пандемия гриппа А(H1N1) 2009 г. была вызвана вирусом смешанного (тройного) происхождения. В России первые три случая заболеваний были выявлены в Москве с 21 по 10 июня 2009 г. На Дальнем Востоке – на 2–2,5 мес позже по сравнению с европейской частью России. Однако эпидемия гриппа в России, вызванная вирусом гриппа А(H1N1)pdm09, началась и более стремительно развивалась именно на Дальнем Востоке. Наиболее высокая заболеваемость (10,2–10,3 на 100 человек) была зарегистрирована в городах Дальневосточного и Сибирского регионов.

Филогенетический анализ позволил установить происхождение тройного реассортанта вируса А(H1N1)pdm09 из вирусов H1N1, H1N2, H3N2 птиц, свиней и человека. Проведенный анализ функциональных доменов белков вируса гриппа А(H1N1)pdm09 показал, что современные пандемические вирусы гриппа имеют ряд принципиальных генетических дефектов, совокупность которых позволяет отнести их к умеренно патогенным вирусам. Высокий риск тяжелого течения гриппа и возникновения осложнений отмечен в трех группах больных: беременные женщины, особенно в III триместре беременности; дети до 2 лет и пациенты, имеющие сопутствующие хронические заболевания дыхательной и сердечно-сосудистой системы, а также пациенты с эндокринными нарушениями и ожирением.

Ключевые слова: грипп, А(H1N1)pdm09; эпидемия гриппа; пандемия гриппа; сезонный грипп.

Tsvetkov V.V.¹, Deeva E.G.¹, Danilenko D.M.¹, Sologub T.V.¹, Tikhonova E.P.²

MOLECULAR GENETIC FACTORS OF PATHOGENICITY OF INFLUENZA A VIRUS (H1N1) PDM09

¹Research Institute of Influenza, 15/17, professora Popova Str., Saint-Petersburg, Russian Federation, 197376²Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky, 1, Partizana Zheleznyaka Str., Krasnoyarsk, Russian Federation, 660022

Unlike influenza epidemics which affect the population almost yearly, pandemics occur much less frequently, but have more severe medical and social consequences. The investigation of the nature of the course of all modern epidemics and pandemics are acquiring the particular rationale. Pandemic influenza A (H1N1) 2009 was caused by the virus of the mixed (triple) origin. In Russia, the first three cases of disease have been identified in Moscow from 21 to 10 June 2009. In the Far East – 2–2,5 months later compared to the European part of Russia. However, the epidemic of influenza in Russia caused by influenza virus A (H1N1) pdm09, began and developed more rapidly just in the Far East. The highest morbidity rate (10,2–10,3 per 100 people) was registered in the cities of the Far Eastern and Siberian regions.

The phylogenetic analysis allowed to reveal the origin of the triple reassortant virus A (H1N1)pdm09 out of H1N1, H1N2, H3N2 avian/porcine/human virus.

The performed analysis of functional domains of proteins of the influenza virus A (H1N1) pdm09 showed that modern pandemic influenza viruses have several principal genetic defects, the totality of which permits to rank them to moderately pathogenic viruses. High risk of the severe course of influenza and occurrence of complications was noted in three groups of patients: pregnant women, especially in the 3 trimester of pregnancy, children under 2 years of age and patients with concomitant chronic respiratory and cardiovascular systems, as well as patients with endocrine disorders and obesity.

Key words: flu; A(H1N1)pdm09; influenza epidemic; influenza pandemic; seasonal flu.

В отличие от эпидемий гриппа, практически ежегодно поражающих население, пандемии случаются гораздо реже, но имеют более тяжелые медицинские и социальные последствия (табл. 1).

Главной характеристикой пандемии является способность распространения инфекции за пределы региона: в отдаленные страны и континенты. За последнее столетие человечество пережило несколько пандемий гриппа, каждая из которых в определен-

ной степени была уникальным событием и обладала рядом отличительных особенностей (табл. 2).

На сегодняшний день одной из главных задач эпидемиологического контроля является отдаленное и оперативное прогнозирование пандемии гриппа. Ведущее значение в оперативном прогнозировании пандемии принадлежит анализу эпидемиологических и клинических данных: заболеваемости, летальности, скорости распространения гриппа, а также данных о тяжести и характере течения заболевания. Отдаленное прогнозирование пандемии гриппа возможно благодаря этиологическому надзору и анализу направлений и скорости эволюции

Для корреспонденции (correspondens to): Цветков Валерий Владимирович, аспирант, науч. сотрудник ФГБУ “НИИ гриппа” Минздрава России, e-mail: suppcolor@gmail.com

Пандемии гриппа XX–XXI веков

Пандемия	Период, годы	Тип вируса	Количество заболевших	Количество смертельных исходов	Летальность, %
"Испанский" грипп	1918–1919	A(H1N1)	33% (500 млн)	20–50 млн	> 2,5
"Азиатский" грипп	1957–1958	A(H2N2)	н/д	2 млн	< 0,2
"Гонконгский" грипп	1968–1969	A(H3N2)	н/д	1 млн	< 0,1
"Свиной" грипп	2009–2010	A(H1N1) pdm09	> 622 482 лабораторно подтвержденных случаев	Около 20 тыс. (из лабораторно подтвержденных случаев гриппа)	0,03

Сравнительная характеристика пандемии и сезонной эпидемии гриппа

Пандемия гриппа	Сезонная эпидемия гриппа
Появление нового шифт-варианта вируса (рекомбинант, появившийся в результате антигенного шифта), к которому в популяции не сформирован иммунитет	Циркулируют сезонные штаммы вируса, которые имеют точечную мутацию (антигенный дрейф). В популяции взрослого населения сформирован популяционный иммунитет
Поражение до 30% населения	Обычно поражает около 5–7% населения
Увеличение частоты регистрации клинически тяжелых и осложненных форм с наличием острого респираторного дистресс-синдрома. Длительность заболевания увеличивается	Заболевание обычно длится от 1 до 2 нед
Ощущается нехватка вакцин	Достаточное количество вакцин
Формирование резистентных штаммов вируса к некоторым противовирусным средствам (ощущается нехватка противовирусных препаратов вследствие ограниченного их выбора)	Возможен выбор противовирусных препаратов
Повышение смертности в 3–7 раз	Обычная годовая смертность от гриппа в США – 36 тыс. в год
Увеличение частоты регистрации на ранних сроках заболевания первичных, вирусных пневмоний	Пневмонии чаще бактериальной природы и является осложнением основного заболевания
Тяжелое течение заболевания регистрируется во всех возрастных группах	Тяжелое течение заболевания наблюдается преимущественно у лиц пожилого возраста и у детей младшей возрастной группы
Развитие пандемии возможно в любое время года	Характерна сезонность, как правило, в зимний период
Имеет двухволновой характер с наличием волны предшественника	Обычно имеет одну волну заболевания
Быстро распространяется по всему миру	Сезонное распространение по континентам и странам с умеренной скоростью
Критическое значение в обоих случаях имеют свойства эпидемического и пандемического вирусов. Генетические различия между вирусами и определяют в значительной степени пандемический потенциал вируса. Вирусы гриппа, вызывающие пандемии, принципиально отличаются от эпидемических и сезонных вирусов.	

вирусов гриппа, вовлеченных в циркуляцию среди птиц, животных и человека. Уже в настоящее время анализ вирусных изолятов позволяет оценить степень их патогенности, уровень которой в отношении человека оценивается по данным анализа первичной структуры вирусного генома. Анализ изолятов позволяет: 1) выявить признаки устойчивой циркуляции подтипов вирусов; 2) определить молекулярные признаки патогенности. Совокупность генетических маркеров патогенности для таксономической группы патогенных организмов представляет собой типовой генетический паспорт патогена. Это понятие было впервые введено специалистами НИИ гриппа РАМН и позволяет объективно оценить свойства нового вируса и использовать паспортные данные для средств молекулярной диагностики.

В настоящее время к факторам, определяющим появление нового пандемического вируса гриппа, можно отнести: 1) распространение высокопатогенных вирусов гриппа птиц среди домашней птицы; 2) документированная передача вируса “птичьего”

гриппа от человека к человеку. Известно, что птицы являются природными хозяевами всех известных вирусов гриппа типа А. В зависимости от строения поверхностных протеинов (гемагглютинина и нейраминидазы) вирус гриппа типа А подразделяется на субтипы. На сегодняшний день известно о существовании 18 субтипов гемагглютинина и 11 субтипов нейраминидазы. В популяции птиц идентифицировано около 30 комбинаций пар гемагглютинина и нейраминидазы. Среди человеческой популяции циркулирует в основном три комбинации пар гемагглютинина и нейраминидазы: Н1, Н2 и Н3, а также N1, N2 и N8. Любопытен тот факт, что в течение почти полувека в человеческой популяции устойчиво циркулирует вирус гриппа А(Н1N1), нейраминидаза которого схожа по своему строению с нейраминидазой гриппа птичьего происхождения А(Н5N1). Можно предположить, что этот факт наряду с наличием мощного межвидового барьера является сдерживающим моментом широкоформатного распространения вируса гриппа А(Н5N1)

в человеческой популяции. Вместе с тем постоянное изменение антигенной структуры этого вируса делает его чрезвычайно патогенным с высокой резистентностью к противовирусному иммунитету. Вместе с тем имеется ряд моментов, требующих дополнительных данных и обоснований. Это прежде всего высокая патогенность вирусов гриппа птиц как в отношении вида-носителя, так и человека. В процессе циркуляции происходят постоянные изменения свойств вируса гриппа птиц за счет адаптивных мутаций, направленных на приобретение патогенных свойств в отношении животных и человека. Мутации в рецепторсвязывающем сайте приводят к изменению рецепторной специфичности и преодолению видового барьера птица – человек. Этот тип мутаций особенно свойственен пандемическим вирусам. Клетки трахеи свиней и перепелов содержат два типа рецепторов, способных связывать гемагглютинин вирусов как птичьего, так и человеческого происхождения. Благодаря наличию птичьего типа рецептора α -2,3-сиалилгалактозы происходит связывание гемагглютинина вируса гриппа птичьего происхождения, а наличие человеческого типа рецептора α -2,6-сиалилгалактозы позволяет связывать гемагглютинин вируса гриппа человеческого происхождения. Следует еще отметить, что температура тела человека и свиньи практически одинакова. В природе среди диких водоплавающих постоянно циркулирует апатогенный вирус гриппа птичьего происхождения. Вместе с тем в результате мутаций авирулентный вирус может приобретать патогенность и вызывать гибель домашних птиц. В основном вспышки птичьего гриппа регистрировались в странах Юго-Восточной Азии. Однако вспышки птичьего гриппа регистрировались и в Японии, Греции, Турции, Румынии, Вьетнаме, Северной Корее, России и в других странах мира. Эксперты ВОЗ обращают внимание на систематическое распространение вирусов гриппа птичьего происхождения во всем мире. При этом не прекращаются эпизоотии гриппа среди домашних и диких птиц, а также тяжелые заболевания среди людей с летальными исходами. Возникает единственный вопрос о том, что же нужно для формирования нового пандемического штамма гриппа? Может ли сформироваться потенциально пандемически опасный вирус в организме диких и домашних птиц? В связи с этим, изучение характера течения всех эпидемических вспышек и пандемий в настоящее время приобретает особую актуальность.

Особенности пандемии гриппа А(H1N1) 2009 г.

Пандемия гриппа А(H1N1) 2009 г. была вызвана вирусом смешанного (тройного) происхождения, содержащим гены вирусов свиней, птиц и человека [1]. В марте–апреле 2009 г. в Мексике, а несколько позднее в Калифорнии было отмечено распространение гриппоподобных заболеваний, в большом проценте случаев сопровождающихся развитием тяжелых

пневмоний. Вирусные изоляты, полученные от первых пациентов, принадлежали к подтипу А(H1N1), однако антигенные различия сезонного вируса с вирусом А(H1N1)v, выделенным в Мексике и США, были просто поразительны. Контагиозность нового вируса и степень его патогенности свидетельствовали о высоком пандемическом потенциале. С марта 2009 г. по январь 2010 г. вирус распространился более чем в 210 странах мира.

Эпидемия гриппа А(H1N1)pdm09 в России

В России завозные случаи гриппа, вызванные пандемическим вирусом А(H1N1)pdm09, начали регистрировать за 4 мес до начала эпидемии в стране. Первые три случая заболеваний были выявлены в Москве с 21 по 10 июня 2009 г. у россиян, прибывших из США и Италии [11]. На Дальнем Востоке первые заносы пандемического вируса гриппа произошли на 2–2,5 мес позже по сравнению с европейской частью России. Однако эпидемия гриппа в России, вызванная вирусом гриппа А(H1N1)pdm09, началась и более стремительно развивалась именно на Дальнем Востоке. К концу октября 2009 г. эпидемия гриппа А(H1N1)pdm09 была зарегистрирована практически во всех наблюдаемых городах Дальневосточного округа и в 8 из 11 городов Сибири и Урала. С отставанием на 1–2 нед к центральной части России эпидемия шла и из северо-западных городов – Калининграда, Мурманска. В Москве начало эпидемического подъема зарегистрировано на 41-й неделе, в Санкт-Петербурге – на 43-й неделе года. Большинство городов Поволжья, Центральной и Южной России были вовлечены в эпидемию позже – на 44–45-й неделе года. В целом по стране пик заболеваемости пришелся на 46-ю неделю. Снижение заболеваемости началось с 48-й недели в 39 городах, в том числе в Москве и Санкт-Петербурге. К концу декабря эпидемия в большинстве наблюдаемых городов закончилась и заболеваемость достигла сезонного уровня. В среднем продолжительность эпидемии составила 6,8 нед. Наиболее высокая заболеваемость на 100 человек (10,2–10,3) была зарегистрирована в городах Дальневосточного и Сибирского регионов, особенно в Чите (19,2), Магадане (12), Южно-Сахалинске (11,7). Самая низкая – в Южном федеральном округе (5,7).

Заболеваемость детей 0–2 и 3–6 лет была традиционно высокой, но превышала среднюю эпидемическую заболеваемость за последние 20 лет всего на 2–7%, тогда как в возрастной группе 7–14 лет превышение достигло 12,1%, что было в 1,6 раза выше. Минимальная заболеваемость регистрировалась у лиц старше 65 лет (1,3 на 100 человек).

В среднем доля госпитализированных за период эпидемии от числа заболевших гриппом и ОРВИ составила по всему населению 2,6%. Максимальные показатели госпитализации были в группе больных в возрасте 0–2 лет (5,3 на 100 заболевших), а минимальные – в группе лиц старше 65 лет (1,4 на 100 заболевших). При этом лиц преклонного возраста

Таблица 3

Симптомы и синдромы пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09 [12]

Синдром	Симптом
Интоксикационный	Повышение температуры тела (82%)
	Боли в мышцах, ломота в суставах (48%)
	Головная боль (47%)
Катарально-респираторный	Кашель (98%)
	Одышка (51%)
	Боль в горле (50%)
	Фарингит (39%)
	Насморк (33%)
	Лихорадка в сочетании с кашлем и трахеитом (81%)
	Рентгенологические находки: мультифокальные изменения (27%), унифокальные изменения (18%), без патологических изменений (50%), плевральный выпот (4%)
Астеновегетативный	Слабость (59%)
Диспепсический	Тошнота, рвота (18%)
	Диарея (13%)

госпитализировали в 1,7 раза реже, чем лиц в возрасте от 15 до 64 лет (2,4 на 100 заболевших).

Летальность от лабораторно подтвержденного гриппа А(Н1N1)pdm09 в 49 городах, наблюдаемых Федеральным центром по гриппу при ФГБУ НИИ гриппа Минздрава России, составила 3,2 на 100 заболевших. В возрастной структуре умерших от гриппа в эпидемию А(Н1N1)pdm09 в сезон 2009–2010 гг. доля детей в возрасте от 0 до 17 лет составила 5,8%, а лиц в возрасте от 18 до 53 лет – 78,8%, что в первую очередь обусловлено высоким абсолютным показателем численности взрослого населения. 12,9% смертельных исходов приходилось на лиц в возрасте 54–64 лет, а 2,5% – на лиц старше 65 лет.

Группы риска

Высокий риск тяжелого течения заболевания и возникновения осложнений отмечен в трех группах больных: 1) беременные женщины, особенно в III триместре беременности; 2) дети до 2 лет; 3) пациенты, имеющие хронические заболевания дыхательной системы (бронхиальная астма), а также пациенты с метаболическим синдромом, ожирением и диабетом.

Анализ летальности выявил, что наиболее часто отягчающими обстоятельствами являлись: заболевания эндокринной системы (10,2%), ожирение (6,9%), иммунодефицитные состояния, включая ВИЧ, злокачественные болезни крови и новообразования (9,6%), заболевания сердечно-сосудистой системы (6,4%), беременность (4,5%). Реже у пациентов, погибших от гриппа, регистрировались такие заболевания, как гепатиты, панкреатиты и болезни почек (в сумме выявлены в 8,3% случаев), хронические болезни легких (3,5%) и энцефалопатии (ДЦП,

Таблица 4

Происхождение тройного реассортантного вируса А(Н1N1)pdm09 из вирусов Н1N1, Н1N2, Н3N2 птиц, свиней и человека

Ген	Субтип	Родительская линия	Вид-хозяин
НА	Н1N2	Североамериканская свинья	Свинья
NA	Н1N1	Евразийская свинья	Свинья
М	Н3N2	Евразийская свинья	Свинья
PB2	Н3N2	Североамериканская птичья	Птицы
PB1	Н1N1	Человеческая	Человек
РА	Н1N2	Североамериканская птичья	Птицы
NP	Н3N2	Североамериканская свинья	Свинья
NS	Н3N2	Североамериканская свинья	Свинья

алкогольная энцефалопатия, эпилепсия) – в 2,2% случаев.

Клиническая картина

Клинические проявления пандемического гриппа существенно варьировали в зависимости от возраста больных, состояния иммунной системы, наличия сопутствующих заболеваний (табл. 3).

Молекулярно-генетические особенности вируса гриппа А(Н1N1)pdm09

Филогенетический анализ позволил установить происхождение тройного реассортанта вируса А(Н1N1)pdm09 из вирусов Н1N1, Н1N2, Н3N2 птиц, свиней и человека (табл. 4).

Особенности структуры гемагглютинина (НА)

Особый интерес представляют индивидуальные особенности структуры рецепторсвязывающего домена НА. Для пандемического вируса А(Н1N1)pdm09 характерно сочетание 94D, 125D, 250V, что полностью совпадает с набором аминокислотных остатков в этих положениях у вирусов гриппа А(Н1N1) 1918 г. Одиночные мутации в этих положениях связывают со способностью НА взаимодействовать с тем или иным типом сиаловых рецепторов. α -2,6-сиалилгалактоза (рецептор “человеческого типа”) экспрессируется на поверхности пневмоцитов 1-го типа и эпителиальных клеток, выстилающих как верхние, так и нижние дыхательные пути. В свою очередь α -2,3-сиалилгалактоза (рецептор “птичьего типа”) экспрессируется на поверхности пневмоцитов 2-го типа и эпителиальных клеток, выстилающих преимущественно дистальные бронхиолы [14]. Мутация D222G приводит к формированию у НА вируса А(Н1N1)pdm09 способности к эффективному взаимодействию как с α -2,6-сиалилгалактозой, так и с α -2,3-сиалилгалактозой [13], что, по всей видимости, ассоциировано с более сильным электростатическим взаимодействием между рецептором и белком [15]. Возможным подтверждением тому являются данные, свидетельствующие о высокой частоте встречаемости D222G среди тяжелых больных гриппом типа А(Н1N1)pdm09 [16], а также среди больных с высокой вирусной нагрузкой [17].

Одним из первых идентифицированных молекулярных признаков патогенности вирусов гриппа тип А является сайт протеолиза (квиведжа) HA [19]. Анализ структуры сайта расщепления пандемического вируса A(H1N1)pdm09, так же как и вируса A(H1N1) 1918 г., показал, что для этих вирусов характерно наличие консервативного аминокислотного остатка в положении 328 (S), что свидетельствует о зависимости расщепления HA от трипсина и сериновых протеаз класса TMPRSS2 [20] и прикрепления к клеточной мембране. Таким образом, протеолиз HA вируса A(H1N1)pdm09 возможен лишь в присутствии мембранной сериновой протеазы, что значительно снижает скорость инфекционной активации и делает ее зависимой от адсорбции вируса на клетке. Вместе с тем клинические наблюдения свидетельствуют о проявлении пандемическими штаммами вируса определенных признаков нейротропности. Вероятно, одиночной замены в положении 328 HA (S-I-F) может быть достаточно для проявления вирусом A(H1N1)pdm09 нейровирулентных свойств [5].

Особого внимания заслуживают данные, свидетельствующие о возможном наличии прямой цитотоксичности HA. Обогащенная остатками цистеина область HA (в положении 56–109) вируса A(H1N1)pdm09 оказалась гомологична соответствующей последовательности токсина скорпиона [4]. Авторы предполагают, что токсигенные детерминанты этой области HA могут быть ответственны за развитие отека легких.

Особенности структуры белка PB2

Все пандемические штаммы вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в положении 627 белка PB2 содержат глутаминовую кислоту (E) [18], что ассоциируется с невозможностью репликации вируса при температуре 33°C и в свою очередь значительно снижает возможность передачи вируса от человека к человеку. Однако у изолятов 2010 г. обнаружена замена E627K, что значительно повышает репликативный потенциал вируса при температуре 33°C и подтверждает возможную тенденцию к возрастанию вирулентности пандемических штаммов.

Особенности структуры белка PB1

Рамка считывания для дополнительного белка PB1-F2 (фактор апоптоза макрофагов) трижды прерывается стоп-кодонами, что приводит к отсутствию синтеза этого белка в инфицированных клетках [18]. Именно этот генетический признак является принципиальным отличием современного пандемического вируса A(H1N1)pdm09 от вируса A(H1N1) 1918 г., вызвавшего пандемию “Испанка” [3]. При дальнейшей циркуляции пандемического вируса полноразмерная рамка может быть восстановлена в результате мутации в стоп-кодонах или путем реассортации с другими циркулирующими в данный период вирусами.

Особенности структуры белка M1

Структурной особенностью белка M1 вируса A(H1N1)pdm09 является наличие полноценного

Zn⁺⁺-фингер-домена (в положении 148–162) [21]. Белки, содержащие Zn⁺⁺-фингер-домены (ССНН типа), представляют собой дивергентное семейство ДНК- и РНК-связывающих белков, принимающих участие в регуляции транскрипции. Полноценный Zn⁺⁺-фингер-домен не часто встречается среди белков M1 вируса гриппа. Как правило, этот домен не совершенен и может быть лишен одного из четырех аминокислотных остатков, составляющих Zn⁺⁺-фингер-домен. Полноценный мотив является признаком высокой патогенности вируса.

Особенности структуры белка M2

Мутации в положениях E14-F55 белка M2, вероятно, могут влиять на скорость передачи вируса гриппа от человека к человеку (контагиозность) [6], а также играть ключевую роль в генерировании свободных радикалов кислорода и модуляции АТФ-зависимых K⁺/Na⁺-ионных каналов [7]. Кроме того, замены V28L и S31N в структуре белка M2 современных пандемических вирусов строго ассоциированы с резистентностью к противовирусным препаратам адамантанового ряда [18].

Особенности структуры белка NS1

Ведущая роль в противостоянии системе интерферона [8] и развитии иммуносупрессии принадлежит неструктурным белкам вируса гриппа – NS1 и NS2. PDZ-связывающий домен белка NS1 является важным регуляторным участком, играющим ключевую роль в активации сигнального пути через взаимодействие с регуляторной субъединицей p85 IP3-киназы, что является существенным компонентом, обеспечивающим репликацию вируса. Активацию этого сигнального пути ассоциируют с индукцией пролиферации и включением программы антиапоптоза [22]. У пандемических вирусов A(H1N1)pdm09 рамка считывания для белка NS1 в положении 220 прерывается стоп-кодоном, что приводит к COOH-концевой делеции PDZ-домена [18]. Однако установлено, что C-конец дефектного белка NS1 вируса гриппа A(H1N1)pdm09 содержит SH3-связывающий домен (212-PSLPP-216), посредством которого также возможно связывание белком субъединицы p85 IP3-киназы [22].

Важной особенностью структуры белка NS1 пандемических вирусов A(H1N1)pdm09 является наличие иммуносупрессивного домена (LETLILL), обогащенного остатками лейцина и ранее описанного как пептид CSK-17, ISD25 [23, 24]. Такие пептиды способны к ингибированию презентации вирусных антигенов, что делает невозможным развитие полноценного специфического цитотоксического иммунитета.

Наличие белка NS1 в клетке подавляет синтез интерферонов 1-2-го типов в ответ на распознавание патоген-ассоциированных молекул [25]. В структуре белка NS1 пандемических вирусов A(H1N1)pdm09 следует выделить последовательность TLEE, которая ответственна за связывание с TRIM25. Блокада TRIM25 ингибирует убиквитирование RIG-1, а, сле-

довательно, и запуск сигнального каскада, инициирующего синтез интерферонов. RIG-1 является внутриклеточным сенсором как для двуспиральной РНК, так и для односпиральной РНК, несущей 5'-фосфат, характерных для фазы репликации вирусов.

Белок NS1 вируса гриппа типа А относится к мультифункциональным белкам и локализуется как в цитоплазме клеток, так и в клеточном ядре [26]. Особого внимания заслуживает способность NS1-белка к контролю ядерно-цитоплазматического транспорта и процессинга клеточных мРНК. NS1 ингибирует процессинг мРНК путем связывания с факторами полиаденилирования: CPSF и PAB 2 [27] и фактором, контролирующим сплайсинг NS1-BP [27]. Подобное взаимодействие сопровождается прекращением транспорта клеточных мРНК из ядра в цитоплазму. Кроме того, белок NS1 вируса гриппа типа А образует комплекс с ключевыми компонентами ядерной экспортной "машины": NXF1/TAP, p15/NXT, Rae1/mtrp41, E1B-AP5 [27], что в свою очередь сопровождается развитием блока в ядерно-цитоплазматическом транспорте, преимущественно мРНК-транскриптов генов, контролирующихся интерферонами 1-го типа. Однако особенности структуры NS1 пандемических вирусов A(H1N1)pdm09 свидетельствуют о неспособности белка к полноценному контролю ядерного экспорта за счет слабого взаимодействия с CPSF30 [28]. Это является основанием для того, чтобы отнести этот вирус к умеренно патогенным.

Выводы и обсуждения

Поданным ВОЗ, все сезоны 2012–2013 и 2013–2014 гг. в мире циркулировали субтипы вируса гриппа А: A(H1N1)pdm09 и A(H3N2), а также грипп типа В. Пандемические штаммы вируса A(H1N1)pdm09 по-прежнему сохраняют свою эпидемическую актуальность и на территории России.

Проведенный анализ функциональных доменов белков вируса гриппа A(H1N1)pdm09 показал, что современные пандемические вирусы гриппа имеют ряд принципиальных генетических дефектов, совокупность которых позволяет отнести их к умеренно патогенным вирусам [2, 29]:

1. Зависимость сайта протеолиза НА от мембранной сериновой протеазы, что значительно снижает скорость инфекционной активации и делает ее зависимой от адсорбции вирусов на клетках.

2. Рамка считывания для дополнительного белка PB1-F2 (фактор апоптоза макрофагов) трижды прерывается стоп-кодонами, что приводит к отсутствию синтеза этого белка в инфицированных клетках. Именно этот генетический признак является принципиальным отличием современного пандемического вируса A(H1N1)pdm09 от вируса A(H1N1) 1918 г., вызвавшего пандемию "Испанка" [3].

3. СООН-концевая делеция PDZ связывающего домена белка NS1 – важного регуляторного участка, играющего ключевую роль в активации сигнальных систем клетки через PI3-киназы.

4. Ослабление контроля ядерного экспорта клеточных мРНК за счет нестабильного взаимодействия с CPSF30 [28].

Однако в клинической практике в период пандемии гриппа 2009 г. по сравнению с сезонными эпидемиями прошлых лет наблюдалась более высокая частота регистрации тяжелого/осложненного течения гриппа. По различным данным от 10 до 40% госпитализированных больных нуждались в проведении интенсивной терапии по причине развития у них острого респираторного дистресс-синдрома. У половины всех заболевших, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, отмечались те или иные воспалительные изменения на рентгенологической картине легких. В возрастной структуре летальности преобладала группа лиц от 18 до 53 лет (78,8%).

Высокий риск тяжелого течения гриппа и возникновения осложнений отмечен в трех группах больных:

1. Беременные женщины, особенно в III триместре беременности;
2. Дети до 2 лет;
3. Пациенты, имеющие сопутствующие хронические заболевания дыхательной и сердечно-сосудистой системы, а также пациенты с эндокринными нарушениями и ожирением.

Современные пандемические вирусы характеризуются следующими признаками патогенности [29]:

- 1) способностью НА вируса A(H1N1)pdm09 к связыванию с α -2,3-сиалилгалактозой, а также наличием аминокислотной замены D222G в структуре НА, что ассоциируется с более высокой частотой развития первичных (вирусных) пневмоний и более тяжелым/осложненным течением заболевания;

- 2) наличием прямой цитотоксичности НА, связанной с присутствием в структуре белка домена токсина скорпиона, модулирующего активность K^+ / Na^+ -ионных каналов;

- 3) наличием в структуре белка M1 полноценного Zn^{++} -фингер-домена, вовлеченного в контроль ядерного экспорта в ядерных порах;

- 4) высокой контагиозностью за счет мутаций в положениях E14-F55 белка M2, что также ассоциировано с генерированием свободных радикалов кислорода и модуляцией АТФ-зависимых K^+ / Na^+ -ионных каналов;

- 5) резистентностью к противовирусным препаратам адамантанового ряда;

- 6) наличием в структуре белка NS1 иммуносупрессивного домена (LETLILL), что ассоциировано с ингибированием презентации вирусных антигенов;

- 7) способностью к индукции цитокинового шторма с развитием системного поражения органов и тканей.

В современных условиях особое внимание следу-

ет уделить этиологическому надзору и анализу циркулирующих изолятов с целью контроля эволюции уже известных, а также еще малоизученных факторов патогенности пандемических вирусов гриппа A(H1N1)pdm09.

ЛИТЕРАТУРА

- Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A. et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009; 325 (5937): 197–201.
- Покровский В.И., Киселев О.И. Пандемический грипп H1N1. СПб.: Росток; 2010.
- Conenello G.M., Zamarin D., Perrone L.A., Tumpey T., Palese P. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathogens*. 2007; 3 (10): 141.
- Tran G.M.K., Gerbaud L., Caprani A.C. Scorpion model of influenza A(H1N1). *Jn: ISHEID Conf. Toulon*; 2010: 168.
- Sun X., Tse L.V., Ferguson A.D., Whittaker G.R. Modification to the hemagglutinin cleavage site control the virulence of a neurotropic H1N1 influenza virus. *J. Virol.* 2010; 84 (17): 8683–90.
- Arias C.F., Escalera-Zamudio M., Soto-del Rio M. et al. Molecular anatomy of 2009 influenza virus A(H1N1). *Arch. Med. Res.* 2009; 40: 643–54.
- Gannage M., Dormann D., Albrecht R. et al. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell. Host. Microbe*. 2009; 6: 367–80.
- Fernandez-Sesma A., Marukian S., Ebersole B.J. et al. Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein. *J. Virol.* 2006; 80: 6295–304.
- Min J.-Y., Krug R.M. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2',5'-oligo(A)synthetase/RNase L pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006, 103 (18): 7100–5.
- Twu R.Y., Noah D.L., Rao P. et al. The CPSF30 binding site on the NS1A protein of influenza A virus is a potential antiviral target. *J. Virol.* 2006; 80: 3957–65.
- Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г. и др. Изоляция 24.05.2009 года и депонирование в Государственную коллекцию вирусов первого штамма A/Moscow/01/2009(H1N1)sw1, подобного свиному вирусу A(H1N1) от первого выявленного 21.05.2009 года больного в г. Москве. *Вопросы вирусологии*. 2009; 5: 10–4.
- Denholm J.T., Gordon C.L., Johnson P.D. et al. Hospitalised adult patients with pandemic (H1N1) 2009 influenza in Melbourne, Australia. *Med. J. Austral.* 2010; 192 (2): 84–6.
- Soundararajan V. et al. Extrapolating from sequence – the 2009 H1N1 “swine” influenza virus. *Nat. Biotechnol.* 2009; 27: 510–13.
- Shinya K. et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*. 2006; 440: 435–6.
- Tse H. et al. Structural basis and sequence co-evolution analysis of the hemagglutinin protein of pandemic influenza A/H1N1 (2009) virus. *Exp. Biol. Med.* 2011; 236: 915–25.
- Chen H. et al. Quasispecies of the D225G substitution in the hemagglutinin of pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus from patients with severe disease in Hong Kong, China. *J. Infect. Dis.* 2010; 201: 1517–21.
- Tse H. et al. Clinical and virological factors associated with viremia in pandemic influenza A/H1N1/2009 virus infection. *PLoS One*. 2011; 6: e22534.
- Garten R.J. et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009; 325: 197–201.
- Покровский В.И., Киселев О.И. Грипп птиц: происхождение инфекционных биокатастроф. СПб.: Росток; 2005.
- Bottcher E., Freuer C., Steinmetzer T., Klenk H.-D., Garten W. MDCK cells that express proteases TMPRSS2 and HAT provide a cell system to propagate influenza viruses in the absence of trypsin and to study cleavage of HA and its inhibition. 2009. *Vaccine*. Doi:10.1016/j.vaccine. 2009.03.029.
- Hui E.K.-W., Smee D. F., Wong M.-H. and Nayak D.P. Mutations in influenza virus M1 CCHH, the putative zinc finger motif, cause attenuation in mice and protect mice against lethal influenza virus infection. *J. Virol.* 2006; 80 (12): 5697–707.
- Shin Y.-K., Liu Q., Tikoo S.K., Babiuk L.A., Zhou Y. Influenza A virus NS1 protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway by direct interaction with the p85 subunit of PI3K. *J. Gen. Virol.* 2007; 88: 13–8.
- Bukreyev A., Volchkov V.E., Blinov V.M. et al. The GP-protein of Marburg virus contains the region similar to the “immunosuppressive domain” of oncogenic retrovirus P15E proteins. *FEBS Lett.* 1993; 323 (1–2): 183–7.
- Nelson M., Nelson D.S., Cianciolo G.J., Snyderman R. Effects of CKS-17, a synthetic retroviral envelope peptide, on cell-mediated immunity in vivo: immunosuppression, immunogenicity, and relation to immunosuppressive tumor products. *Cancer Immunol. Immunother.* 1989; 30: 113–8.
- Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы. М.: Геотар, 2005.
- Hale B.G., Randall R.E., Ortin J., Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 2008; 89: 2359–76.
- Satterly N., Tsai P.-L., van Deursen J. et al. Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104: 1853–8.
- Hale B.G., Steel J., Medina R.A., Manicassamy B. et al. Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* 2010; 84: 6909–22.
- Киселев О.И. Генном пандемического вируса гриппа A/H1N1v-2009. М.: Издательство «Димитрейд График Групп»; 2011.

REFERENCES

- Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A. et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009; 325 (5937): 197–201.
- Pokrovskiy V.I., Kiselev O.I. [Pandemicheskiy gripp H1N1]. St. Petersburg: Rostok; 2010. (in Russian)
- Conenello G.M., Zamarin D., Perrone L.A., Tumpey T., Palese P. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathogens*. 2007; 3 (10): 141.
- Tran G.M.K., Gerbaud L., Caprani A.C. Scorpion model of influenza A(H1N1). *Yn: ISHEID Conf. Toulon*; 2010: 168.
- Sun X., Tse L.V., Ferguson A.D., Whittaker G.R. Modification to the hemagglutinin cleavage site control the virulence of a neurotropic H1N1 influenza virus. *J. Virol.* 2010; 84 (17): 8683–90.
- Arias C.F., Escalera-Zamudio M., Soto-del Rio M. et al. Molecular anatomy of 2009 influenza virus A(H1N1). *Arch. Med. Res.* 2009; 40: 643–54.
- Gannage M., Dormann D., Albrecht R. et al. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell. Host. Microbe*. 2009; 6: 367–80.
- Fernandez-Sesma A., Marukian S., Ebersole B.J. et al. Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein. *J. Virol.* 2006; 80: 6295–304.
- Min J.-Y., Krug R.M. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2',5'-oligo(A)synthetase/RNase L pathway.
- Twu R.Y., Noah D.L., Rao P. et al. The CPSF30 binding site on the NS1A protein of influenza A virus is a potential antiviral target. *J. Virol.* 2006; 80: 3957–65.
- Lvov D.K., Burtseva Ye.I., Prilipov A.G. et al. Izolyatsiya 24.05.2009 godai deponirovaniyev Gosudarstvennyukollektsiyu virusov pervogo shtamma A/Moscow/01/2009(H1N1)sw1, podobnogo svinomu virusu A(H1N1) ot pervogo vyavlenogo 21.05.2009 goda bolnogo v g. Moskve. *Voprosy virusologii*. 2009; 5: 10–4. (in Russian)
- Denholm J.T., Gordon C.L., Johnson P.D. et al. Hospitalised adult patients with pandemic (H1N1) 2009 influenza in Melbourne, Australia. *Med. J. Austral.* 2010; 192 (2): 84–6.
- Soundararajan V. et al. Extrapolating from sequence – the 2009 H1N1 “swine” influenza virus. *Nat. Biotechnol.* 2009; 27: 510–3.

14. Shinya K. et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*. 2006; 440: 435–6.
15. Tse H. et al. Structural basis and sequence co-evolution analysis of the hemagglutinin protein of pandemic influenza A/H1N1 (2009) virus. *Exp. Biol. Med.* 2011; 236: 915–25.
16. Chen H. et al. Quasispecies of the D225G substitution in the hemagglutinin of pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus from patients with severe disease in Hong Kong, China. *J. Infect. Dis.* 2010; 201: 1517–21.
17. Tse H. et al. Clinical and virological factors associated with viremia in pandemic influenza A/H1N1/2009 virus infection. *PLoS One*. 2011; 6: e22534.
18. Garten R.J. et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009; 325: 197–201.
19. Pokrovskiy V.I., Kiselev O.I. [Grippy ptits: proiskhozhdeniye infektsionnykh biokatastrof]. St. Peterburg: Rostok; 2005. (in Russian)
20. Bottcher E., Freuer C., Steinmetzer T., Klenk H.-D., Garten W. MDCK cells that express proteases TMPRSS2 and HAT provide a cell system to propagate influenza viruses in the absence of trypsin and to study cleavage of HA and its inhibition. 2009. *Vaccine*. Doi:10.1016/j.vaccine. 2009.03.029.
21. Hui E.K.-W., Smee D.F., Wong M.-H., Nayak D.P. Mutations in influenza virus M1 CCHH, the putative zinc finger motif, cause attenuation in mice and protect mice against lethal influenza virus infection. *J. Virol.* 2006; 80 (12): 5697–707.
22. Shin Y.-K., Liu Q., Tikoo S.K., Babiuk L.A., Zhou Y. Influenza A virus NS1 protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / Akt pathway by direct interaction with the p85 subunit of PI3K. *J. Gen. Virol.* 2007; 88: 13–8.
23. Bukreyev A., Volchkov V.E., Blinov V.M. et al. The GP-protein of Marburg virus contains the region similar to the “immunosuppressive domain” of oncogenic retrovirus P15E proteins. *FEBS Lett.* 1993; 323 (1–2): 183–7.
24. Nelson M., Nelson D.S., Cianciolo G.J., Snyderman R. Effects of CKS-17, a synthetic retroviral envelope peptide, on cell-mediated immunity in vivo: immunosuppression, immunogenicity, and relation to immunosuppressive tumor products. *Cancer Immunol Immunother.* 1989; 30: 113–118.
25. Ershov F.I., Kiselev O.I. [Interferony i ikh induktory]. Moscow: Geotar; 2005. (in Russian)
26. Hale B.G., Randall R.E., Ortin J., Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 2008; 89: 2359–76.
27. Satterly N., Tsai P.-L., van Deursen J., et al. Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104: 1853–58.
28. Hale B.G., Steel J., Medina R.A., Manicassamy B. et al. Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* 2010; 84: 6909–22.
29. Kiselev O.I. [Genom pandemicheskogo virusa grippa A/H1N1v-2009]. Moscow: Izdatel'stvo “Dimitryd Grafik Grupp”; 2011. (in Russian)

Поступила 10.06.14

Received 10.06.14

Сведения об авторах:

Деева Элла Германовна, канд. мед. наук, гл. врач специализированной клиники вирусных инфекций ФГБУ “НИИ гриппа” Минздрава России, e-mail: klinika@influenza.spb.ru; *Даниленко Дарья Михайловна*, науч. сотр. лаб. эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ “НИИ гриппа” Минздрава России, e-mail: daria.baibus@gmail.com; *Сологуб Тамара Васильевна*, доктор мед. наук, проф. зам. директора по научной и клинической работе ФГБУ “НИИ гриппа” Минздрава России, e-mail: sologub@influenza.spb.ru; *Тихонова Елена Петровна*, доктор мед. наук, проф., зав. каф. инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом ПО Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, 100204, Россия, Красноярский край, Красноярск, ул. Курчатова, 17, e-mail: infekbolepidem@krasgma.ru