

На правах рукописи

ПРОКОПЬЕВА
Елена Александровна

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ПАНДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА А(Н1N1)рdm09 ПРИ
АДАПТАЦИИ К МЫШАМ РАЗЛИЧНОГО ГЕНОТИПА**

03.02.02 - вирусология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург, 2015 г.

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, г. Новосибирск

Научный руководитель:

Шестопалов Александр Михайлович, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Игнатъев Георгий Михайлович, заместитель генерального директора по науке ООО "ФОРТ", доктор медицинских наук (03.02.02), профессор

Калинина Ольга Викторовна, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии Федерального бюджетного учреждения науки "Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера", доктор биологических наук (03.02.02)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии" (НИИФКИ)

Защита диссертации состоится _____ в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.043.01 при ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17), тел. (812) 499 15 04; e-mail: sovet@influenza.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17); <http://www.influenza.spb.ru>.

Автореферат разослан « » _____ 2015 г.

Учёный секретарь

Диссертационного совета Д 001.043.01,
кандидат медицинских наук

Суховецкая Вера Федотовна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Вирус гриппа А (ВГА) имеет широкий круг хозяев, включающий различные виды млекопитающих и птиц (Webster et al., 1992). Ежегодные эпидемии и случайные пандемии унесли миллионы людских жизней. Благодаря ВГА (H1N1)pdm09 мир стал свидетелем первой пандемической инфекции XXI века. Данный вирус гриппа возник в 2009 году в виде эпизоотии среди свиней в Мексике и вскоре быстро распространился среди людей, был зарегистрирован более чем в 214 странах и стал результатом около 151,700 – 575,400 смертей по всему миру (WHO, 2010a; WHO, 2010b; Dawood et al., 2012). Пристальное внимание к данному вирусу обусловлено опасностью возникновения катастрофической гриппозной пандемии, сравнимой с «Испанским гриппом» H1N1 1918 года, унесшего жизни 0,2%-8% инфицированных людей из различных стран (около 50 млн. людей по всему миру) (Taubenberger and Morens, 2009). Вирус гриппа А(H1N1)pdm09 охарактеризован высокой степенью трансмиссии, однако до сих пор остаются сравнительно низкими его вирулентные и летальные свойства. Однако известен ряд более тяжёлых и смертельных случаев инфицирования вирусом А(H1N1)pdm09, при которых отмечали схожие симптомы заболевания с высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н5N1, такие как пневмония и острый респираторный дистресс-синдром (Garigliany et al., 2010).

Молекулярные механизмы, с помощью которых пандемический вирус гриппа 2009 года смог преодолеть межвидовой барьер от свиней к людям, затем адаптироваться в популяции человека и приобрести высоко контагиозные свойства, до сих пор остаются неизвестными. Однако, лабораторно доказано, что вирус гриппа А(H1N1)pdm09 легко адаптируется к мышам при последовательном пассировании в лёгких, вызывая у последней экспериментальной группы 100% летальность (Rolling et al., 2009; Pyushina et al., 2010; Sakabe et al., 2011; Xu et al., 2011; Imai et al., 2012). Эти исследования позволяют предсказать вероятную картину развития событий в условии 100% адаптации вируса гриппа к той популяции, в которой он циркулирует при благоприятных для себя условиях.

Существует опасение, что если вирус гриппа А(H1N1)pdm09 сохранит способность эффективно передаваться от человека к человеку и при этом усилит свои вирулентные свойства, благодаря адаптации к человеку, то новый адаптированный вариант, возможно, будет обладать более значительным влиянием на здоровье населения планеты, что увеличит число смертельных исходов. Вирус гриппа А постоянно эволюционирует, и, не исключено, что в будущем появятся новые пандемические варианты. Поэтому чрезвычайно важно проводить мониторинг данного патогена в популяции диких и домашних животных (птиц, млекопитающих), а также среди людей, заболевших ОРВИ, и изучать адаптацию вируса гриппа к восприимчивым хозяевам. Новые данные принесут не только фундаментальные знания, но и будут иметь важное прикладное значение как для ветеринарии, так и для медицины.

Таким образом, все вышеизложенное указывает на важность изучения биологических свойств ВГА H1N1 и H5N1 с пандемическим потенциалом. Результаты, полученные в ходе данной работы, помогут не только улучшить знания о патогенезе, но и об адаптации пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09.

Степень разработанности. Одной из актуальнейших проблем современной вирусологии является изучение адаптации вирусов к новым хозяевам (домашним и диким животным, человеку). Вирусная адаптация является важной приспособительной задачей, цели которой заключаются в подавлении или избегании противовирусного иммунитета хозяина. Известно, что вирусы гриппа А способны преодолевать межвидовой барьер и вызывать заболевания среди птиц, млекопитающих и людей (Webster et al., 1992). И потому данный патоген является удобной моделью для изучения круга хозяев и механизма преодоления межвидового барьера, поскольку его геном имеет фрагментарное

строение, и вклад отдельных генов можно определить, используя метод реассортации или адаптации к различным экспериментальным животным (Киселев и Львов, 2012; Iyushina et al., 2010). Изучению механизмов вирусной адаптации и изменений вирулентности ранее непатогенных штаммов ВГ на мышинной модели посвящены работы следующих авторов: О.И. Киселева, Д.К. Львова, Т. Rolling, N.A. Iyushina, M. Garigliany, L. Xu, S. Sakabe, K.J. McHugh. Целесообразность изучения патологических процессов в лёгких, происходящих при адаптации ВГ к мышам, является адекватным методическим подходом, поскольку изменения, возникающие в лёгких мышей, сходны с патоморфологическими изменениями при вирусных пневмониях у человека (Sweet and Smith, 1980).

Используемый нами прототип (штамм *A/Tomsk/273/2009(H1N1pdm09) (Tomsk/2010)* был выделен в 2010 году во второй половине пандемии от человека, исход заболевания гриппом у которого был благополучным, и впоследствии адаптирован к лабораторным животным. В результате были получены три адаптированных варианта к генетически различным мышам: *A/Tomsk/273-MA1/2010(H1N1pdm09) (MA-BALB/c)* - к мышам линии BALB/c, *A/Tomsk/273-MA2/2010(H1N1pdm09) (MA-C57BL/6z)* - к мышам линии C57Bl/6z, *A/Tomsk/273-MA3/2010(H1N1pdm09) (MA-CD1)* - к аутбредным мышам CD1. Существуют аналоги близкие к нашим адаптированным вариантам. Это штамм *A/Russia/01-ma/09(H1N1)* и штамм *A/IV-Anadyr/177-ma/2009(H1N1)pdm09*, которые также изначально были выделены из человеческого организма, а затем адаптированы к лабораторным животным. Основное отличие аналогов от нашего прототипа в том, что изначально они были выделены в более ранний период пандемии - в 2009 году, при этом из гомогенатов умерших людей на территории РФ. Учитывая значительную изменчивость вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, циркулировавших в конце пандемического периода и достаточно различающихся по молекулярно-генетическим характеристикам от вариантов, циркулировавших в более ранний период пандемии, установлено, что сравниваемые штаммы аналогов качественно отличаются по геномному составу от нашего прототипа. В настоящий момент во всем мире широко распространились и продолжают циркулировать штаммы пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09, закрепившие в своём геноме нуклеотидные последовательности характерные для конца пандемического периода 2010 года (<http://www.euroflu.org/index.php>). Известно, что в эпидемиологическом сезоне 2013-2014 гг. среди сезонных вирусов гриппа доминировал A(H1N1)pdm09 (Лабораторная диагностика, Global).

В настоящий момент существует ограниченное количество работ, посвященных изучению роли домашних и диких животных, в том числе птиц, при возникновении высоковирулентных ВГА, обладающих эпизоотическим и пандемическим потенциалом. И потому сохраняется необходимость создания, изучения и использования актуальных вариантов пандемических штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 для проверки эффективности современных противогриппозных препаратов *in vivo* и *in vitro*, имеющих важное значение в эпидемиологической и клинической практике.

Цель исследования: оценка фено- и генотипа пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 при его адаптации к мышам.

Задачи исследования:

1. Получить высоковирулентные варианты вируса гриппа типа А, используя пандемический штамм *Tomsk/2010*, для инбредных мышей линии BALB/c и линии C57Bl/6z, а также для аутбредных мышей CD1 путём последовательных слепых пассажей через лёгкие.
2. Провести анализ изменения биологических свойств полученных высоковирулентных вариантов вируса гриппа типа А в процессе проводимой адаптации к мышам с помощью вирусологических и молекулярно-биологических методов.
3. Изучить репликацию неадаптированного и адаптированного вариантов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в органах (мозг, печень, почка, тонкая кишка) у

экспериментально инфицированных мышей линии BALB/c в динамике заболевания с помощью вирусологических и морфологических методов.

4. Изучить биологические свойства неадаптированного и адаптированного вариантов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 к мышам в сравнении с высокопатогенным вирусом гриппа A/H5N1, используя вирусологические и морфологические методы.

Научная новизна. Были получены три адаптированных штамма пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 к мышам различных генотипов: линии BALB/c, линии C57Bl/6z и аутбредным мышам CD1. Показано усиление вирулентных свойств пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 при последовательном пассировании через лёгкие мышей, вне зависимости от генотипа животных. Показано, что пандемический вирус гриппа A(H1N1)pdm09 способен быстро адаптироваться к генетически различным лабораторным мышам, вызывая летальность до 100% благодаря селекционному накоплению аминокислотных замен в геноме. Получены полные геномные последовательности трёх адаптированных вариантов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09. Результаты секвенирования геномов депонированы в международный банк (GenBank). Проанализированы данные о роли отдельных сегментов генома вируса гриппа в повышении вирулентности при адаптации в лёгких экспериментально инфицированных мышей. Анализ первичной структуры всех белков пандемического ВГ неадаптированного варианта (штамм *Tomsk/2010*) и трех адаптированных вариантов (штамм *MA-BALB/c*, *MA-C57BL/6z* и *MA-CD1*) выявил 19 аминокислотных замен в шести белках (НА, NA, NP, NS2, PB2, PB1) и наличие потенциальной экспрессии факультативного неструктурного белка PB1-F2 у адаптированных вариантов вируса. Наиболее генетически близкими являются штамм *MA-BALB/c* и штамм *MA-C57BL/6z*. Обнаружен ряд одинаковых аминокислотных замен отвечающих за усиление патогенности штаммов *MA-BALB/c*, *MA-C57BL/6z* и *MA-CD1* во время адаптации к экспериментальным животным: в белке PB2 (S317L; T271A; R482K; T689A; I690V), в белке PA (295P), в белке NA (E172G, G239D), в белке NP(N375D), в белке NA (I357V; L443I; T467I), в белке NS2 (M235V, A236V). Доказана персистенция адаптированного варианта вируса гриппа в головном мозге, печени и почке у инфицированных мышей линии BALB/c. Показано наличие вирусных частиц в области гемато-ликворного барьера головного мозга. Полученные данные были также подтверждены с помощью электронной микроскопии.

Теоретическая и практическая значимость. Из прототипного штамма *Tomsk/2010* были получены три адаптированных варианта к генетически различным мышам: *MA-BALB/c* - к мышам линии BALB/c, *MA-C57BL/6z* - к мышам линии C57Bl/6z, *MA-CD1* - к аутбредным мышам CD1. Определены полные геномные последовательности всех вариантов пандемического ВГ A(H1N1)pdm09, а также изучены их вирулентные свойства и влияния на структуры внутренних органов (лёгкое, головной мозг, печень, почка и тонкая кишка). Из штаммов *MA-BALB/c*, *MA-C57BL/6z* и *MA-CD1* создана панель пандемических штаммов ВГ A(H1N1)pdm09 с оценкой действия противовирусных химиопрепаратов. Полученный в ходе выполнения работы адаптированный вариант вируса гриппа A(H1N1)pdm09 штамм A/Tomsk/273-MA3/2010(H1N1pdm09) использовали в доклиническом исследовании специфической противовирусной активности окисленных декстранов "Исследование профилактической эффективности окисленных декстранов с молекулярной массой 40 кДа (декстраналь 40, диальдегид декстран 40, ОД - 40) и 70 кДа (декстраналь 70, диальдегид декстран 70, ОД - 70) при интраназальном введении на модели гриппа у мышей", производимых в АО «ФНПЦ «Алтай» г. Бийск. С использованием адаптированного штамма *MA-CD1* A(H1N1)pdm09 было показано, что окисленные декстраны снижают смертность экспериментального гриппа у мышей до 60% в зависимости от молекулярной массы окисленного декстрана. Адаптированные варианты пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09, полученные в ходе данной работы, могут

быть использованы в вирусологических исследованиях для моделирования летальной гриппозной инфекции с целью изучения биологических свойств пандемического вируса гриппа типа А.

Методология и методы исследования. В работе использованы классические вирусологические методы (выделение вируса в культуре клеток MDCK и его наработка; инфицирование мышей; определение TCID₅₀, LD₅₀), серологические методы (РГА, РТГА, МН); молекулярно-биологические методы (выделение РНК, постановка ПЦР real time; гель-электрофорез, секвенирование; анализ генома вируса гриппа), а также методы морфофункционального анализа (световая и электронная микроскопия; иммуногистохимический анализ). Более подробно способы проведения экспериментов отражены в разделе «Материалы и методы».

Основные научные положения, выносимые на защиту:

1. Пандемический ВГ А(Н1N1)pdm09 способен быстро адаптироваться к генетически различным животным, вызывая 100% летальность благодаря селекционному накоплению аминокислотных замен в геноме. Высоковирулентные свойства адаптированных штаммов отличаются при перекрёстном инфицировании лабораторных мышей различных генотипов.
2. Неадаптированный вариант пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 (штамм *Tomsk/2010*) не вызывает летального заболевания у экспериментально заражённых мышей в отличие от адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 (штамм *MA-BALB/c*) и высокопатогенного ВГ А/Н5N1 (штамм *Krasn/05*), под воздействием которых у экспериментально инфицированных мышей линии BALB/c регистрируется репликация вируса в лёгких, головном мозге, печени и почке.
3. Наличие у адаптированных вариантов пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 (*MA-BALB/c*, *MA-C57Bl/6z*, *MA-CD1*) одинаковых аминокислотных замен в шести белках (PB2: *S317L*; *T271A*; *R482K*; *T689A*; *I690V*; PA: *295P*; HA: *E172G*, *G239D*; NP: *N375D*; NA: *I357V*; *L443I*; *T467I*; NS2: *M235V*, *A236V*) в комплексе с потенциальной экспрессией факультативного неструктурного белка PB1-F2 определяет их высоковирулентные свойства на модели млекопитающих.

Личное участие. Работа выполнена соискателем самостоятельно, участие соавторов отражено в совместно изданных научных статьях.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов исследований, проведённых автором, подтверждена адекватным статистическим анализом данных, полученных в ходе независимых экспериментов. Материалы диссертации доложены и обсуждены на: 12th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases (Bangkok, 2014); 7th annual CEIRS Surveillance meeting (Memphis, 2013 г.), международной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» (г. Санкт-Петербург, 2013 г.), III ежегодной конференции специалистов по работе с лабораторными животными (г. Новосибирск, 2013), the 3rd International Influenza Meeting (Munster, 2012 г.), конференции молодых специалистов «Грипп: Эпидемиология, вирусология, профилактика и лечение» (г. Санкт-Петербург, 2012 г.), международной молодежной научной школе "Эпидемиология, эпизоотология, оперативная диагностика инфекций, переносимых дикими птицами (г. Новосибирск, 2012 г.), Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Pathogenesis of Influenza: Virus-Host Interactions (Hongkong, 2011 г.), The fourth ES WI influenza (Malta, 2011 г.), конкурсе молодых ученых и специалистов на соискание премии им. Н.К. Кольцова (п. Кольцово, 2011 г.).

Публикации результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 18 работ, в том числе 3 статьи – в российских журналах, рекомендованных ВАК

Минобрнауки РФ («Bulletin of Experimental Biology and Medicine», «Вестник Новосибирского государственного университета»), 1 патент.

Внедрение результатов исследований. Из прототипного штамма *Tomsk/2010* получена коллекция адаптированных вариантов ВГ к мышинной модели млекопитающих: *MA-BALB/c* — к мышам линии BALB/c, *MA-C57BL/6z* — к мышам линии C57BL/6z, *MA-CD1* — к аутбредным мышам CD1. Все варианты пандемического ВГ А(H1N1)pdm09 депонированы в Музей вирусов гриппа и ОРЗ» в ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ (г. Санкт-Петербург).

Получены первичные структуры всех белков штаммов: *Tomsk/2010*, *MA-BALB/c*, *MA-C57BL/6z* и *MA-CD1*, которые депонированы в международной базе данных GenBank.

Полученный в результате адаптации к аутбредным мышам CD1 штамм *MA-CD1* использовали в лаборатории экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний и лабораторией структурных основ патогенеза социально значимых заболеваний в рамках выполнения основной темы НИР "Исследование молекулярно-клеточных основ патогенеза новых и наиболее распространенных на территории Сибири инфекционных заболеваний вирусной этиологии для разработки средств их специфической профилактики" номер государственной регистрации 0121353865. Кроме того, штамм *MA-CD1* использовали в доклиническом исследовании специфической активности окисленных декстранов "Исследование профилактической эффективности окисленных декстранов с молекулярной массой 40 кДа (декстраналь 40, диальдегид декстран 40, ОД - 40) и 70 кДа (декстраналь 70, диальдегид декстран 70, ОД - 70) при интраназальном введении на модели гриппа у мышей".

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 183 страницах машинописного текста, включает список использованной литературы, введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов собственных исследований, выводы, практические приложения, список литературы и приложение.

Диссертация иллюстрирована 12 таблицами и 26 рисунками. Список литературы включает 260 источника, в том числе 198 работ зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

2.1 Материалы и методы исследования

Работа выполнена с 2010 по 2013 гг. в отделе зоонозных инфекций и гриппа ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»; с 2013 по 2015 гг. в лаборатории экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний ФГБУ «Научный исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины».

Морфофункциональный анализ проводили на кафедре физиологии Новосибирского государственного университета и частично на базе ЦКП микроскопического анализа биологических объектов Института цитологии и генетики СО РАН.

Вирусы. Неадаптированный вариант пандемического ВГ штамм *A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09)* (*Tomsk/2010*) изначально был выделен из носоглоточного смыва человека в январе 2010 г. (2-й пассаж на культуре клеток MDCK (Madin-Darby canine kidney) с титром вируса $5,625 \pm 0,6$ lgTCID₅₀/ml). Исход заболевания благополучный. Выделенный штамм был адаптирован к экспериментальным мышам разных генотипов:

1. инбредной линии BALB/c - штамм *A/Tomsk/273-MA1/2010(H1N1pdm09)* (*MA-BALB/c*) (KM277585-KM277592), 7 пассажей;
2. инбредной линии C57BL/6z - штамм *A/Tomsk/273-MA2/2010(H1N1pdm09)* (*MA-C57BL/6z*) (KM277593-KM277600), 12 пассажей;
3. аутбредных CD1 - штамм *A/Tomsk/273-MA3/2010(H1N1pdm09)* (*MA-CD1*) (KM277601-KM277608), 10 пассажей.

Пандемический вирус гриппа А(H1N1)pdm09 штамм *A/Novosibirsk/13/2009(H1N1)pdm09 (N13-2009)* выделен в сентябре 2009 года от женщины вернувшейся из-за границы. Исход заболевания благополучный.

Пандемический вирус гриппа А(H1N1)pdm09 штамм *A/Novosibirsk/KSH/2011(H1N1)pdm09 (KSH-2011)* выделен в январе 2011 года от мужчины, не выезжавшего за границу. Исход заболевания благополучный.

Вирус гриппа птиц субтипа H5N1 штамм *A/goose/Krasnoozerskoye/627/05 (Krasn/05)* был выделен из лёгкого гуся, погибшего во время вспышки гриппа птиц в селе Красноозёрское Новосибирской области в сентябре 2005 года (5-й пассаж на РКЭ с титром вируса 9,2 lg ЭИД50/мл).

Животные. Исследования проведены на 6-8-недельных мышах-самцах линии BALB/c, линии C57Bl/6z и аутбредных CD1. Инфицирование проводили интраназально (и.н.) в объеме 50 мкл дозой вируса. Группа отрицательного контроля (n=5) интраназально получала ФСБ (рН 7.2) в объеме 50 мкл. Все работы проводили в соответствии с протоколом исследования, утвержденным биоэтическим комитетом "Вектор".

Вирусологические методы. Идентификацию вирусов гриппа проводили в клеточной культуре MDCK и на РКЭ согласно методическим рекомендациям ВОЗ (WHO manual, 2011). Величину 50% инфекционной дозы для культуры клеток (50% tissue culture infectious dose -- TCID50) рассчитывали по методу Рида и Менча (1938) и выражали как lgTCID50/мл±стандартная ошибка (SE) среднего. Величину 50% летальной дозы для мышей рассчитывали по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева (1962) по формуле: $\lg TCID50/ml = \lg D_n - \delta(\sum Li - 0,5)$.

Серологические методы. Проведение реакции гемагглютинации, реакции торможения гемагглютинации и реакции микронеutralизации по общепринятой методике (WHO manual, 2011).

Молекулярно-биологические методы. Выделение РНК и получение кДНК вируса гриппа проводили с использованием набора «РИБО-сорб» и «РЕВЕРТА-Л», соответственно, по протоколам производителя («АмплиСенс», Россия). Для амплификации генов вируса гриппа был использован набор реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL» («АмплиСенс», Россия). Амплификацию проводили в приборе Rotor-Gene 6000.

Секвенирование генома. Определение нуклеотидных последовательностей в геноме вируса гриппа (штаммы *N13-2009* и *KSH-2011*) проводили с помощью секвенирующей реакции, используя коммерческий набор BigDye Terminator 3.1v Cyler (Applied Biosystem, США). Определение первичных последовательностей осуществляли в автоматическом анализаторе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem, США). Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием специализированного программного обеспечения: Vector NTI Advance 10 (Invitrogen), SeqMan (Lasergene) и специализированных ресурсов Influenza Virus Resource.

Определение нуклеотидных последовательностей в геноме вируса гриппа (штамм *Tomsk/2010*) и его адаптированных вариантов (*MA-BALB/c*, *MA-C57BL/6z*, *MA-CD1*) проводили с помощью набора «TruSeq DNA Sample Prep Kits v2» (Illumina, США). Полученные библиотеки визуализировали на станции автоматического электрофореза «QIAxcel Advanced System» (QIAGEN, Германия). Измерение молярности полученных библиотек проводили методом ПЦР в реальном времени (2x SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, США), прибор Bio-Rad CFX1000) согласно рекомендациям, изложенным в руководстве «Sequencing Library qPCR Quantification Guide» (Illumina, США). Секвенирование ДНК-библиотек проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора «MiSeq Reagent Kits V2 (300PE)» в соответствии с инструкцией производителя. Обработку данных полногеномного секвенирования, сборку контигов и картирование ридов проводили с использованием программы Vector NTI v11.

Схемы экспериментов

Эксперимент	Животные (шт)	Материалы	Исследования		
			Вирусологические; Серологические	Молекулярно-биологические	Морфологические
I - Адаптация ВГ А(H1N1)pdm09	BALB/c (75)	По 10 шт. мышей каждой линии и.н. заражали 50 мкл физиологического раствора, содержащего 10^3 TCID ₅₀ /мл штамма <i>Tomsk/2010</i> . По 7 шт. мышей из каждой группы были выбраны для ежедневного мониторинга признаков болезни, потери веса и летальности в течении 14 суток со дня инфицирования (д.и.). На третьи сутки после д.и. из каждой группы по 3 шт. мышей умерщвляли путём дислокации шейных позвонков. Из их лёгких готовили 10%-ные гомогенаты на физиологическом растворе. После этого проводили и.н. заражение новых групп мышей 10%-ми гомогенатами лёгких (50 мкл).	ЛД ₅₀ ; TCID ₅₀ (лёгкое, мозг, печень, почка, тонкая кишка)	выделение РНК, постановка ПЦР, секвенирование	На 3 сутки после д.и. от мышей линии BALB/c, инфицированных штаммом <i>Tomsk/2010</i> (n=3) и штаммом <i>MA-BALB/c</i> (n=3), брали лёгкое, головной мозг, печень, почку, тонкую кишку для светового анализа (окраска гематоксилином и эозином; иммуногистохимическая окраска).
	C57Bl/6z (125)				
	CD1 (105)				
II - Перекрестное инфицирование	BALB/c (15) и C57Bl/6z (15)	Мыши линии BALB/c были и.н. заражены штаммом <i>MA-C57BL/6z</i> в дозе 10 ЛД ₅₀ (50 мкл), а мыши линии C57BL/6z – штаммом <i>MA-BALB/c</i> в дозе 10 ЛД ₅₀ (50 мкл). Группа отрицательного контроля (отр.к.) каждой линии мышей (n=5) и.н. получала ФСБ (рН 7.2) 50 мкл.	ЛД ₅₀	—	—
III - Изучение биологических свойств штаммов ВГ А(H1N1)pdm09, циркулировавших в 2009 и 2011 гг.	BALB/c (34)	1 ^{ая} группа мышей и.н. была инфицирована 50% мышинной инфекционной дозой (MID ₅₀) штамма <i>N13-2009</i> в дозе 3,8 lgMID ₅₀ /мл (50 мкл). 2 ^{ая} группа - <i>KSH-2011</i> в дозе 3,6 lgMID ₅₀ /мл (50 мкл). Группа отр.к. каждой линии мышей (n=5) интраназально получала ФСБ (рН 7.2) (50 мкл). На 1-е, 3-и, 6-е и 10-е сутки после д.и. мышей выводили из эксперимента путём дислокации шейных позвонков. Сыворотки от переболевших гриппом людей (n=9).	TCID ₅₀ (легкое, головной мозг); РГА, РТГА, МН	ПЦР real time, секвенирование последовательностей геномов, филогенетический анализ	Световой анализ (окраска гематоксилином и эозином) легкого и головного мозга
IV - Сравнительный анализ патогенности ВГ А(H1N1)pdm09 и А(H5N1)	BALB/c (65)	1 ^{ая} группа мышей (n=24) была и.н. заражена штаммом <i>Krasn/05</i> в дозе 5 ЛД ₅₀ в объёме 50 мкл. 2 ^{ая} группа мышей (n=12) была и.н. заражена MID ₅₀ штаммом <i>Tomsk/2010</i> в дозе 6,38 lgTCID ₅₀ /мл в объёме 50 мкл. 3 ^я группа мышей (n=24) была и.н. заражена штаммом <i>MA-BALB/c</i> в дозе 5 ЛД ₅₀ в объёме 50 мкл. На 1-е, 3-и, 6-е и 10-е сутки после заражения животных выводили из эксперимента путём дислокации шейных позвонков.	ЛД ₅₀ ; TCID ₅₀ и ЭИД ₅₀ (лёгкое, мозг, печень, почка, тонкая кишка)	—	Световой анализ (окраска гематоксилином и эозином) и электронно-микроскопический анализ.

Морфологические методы. Для световой микроскопии кусочки органов фиксировали в 4 % растворе формалина, затем обезвоживали по стандартной методике и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори и иммуногистохимическим методом (мышинные моноклональные антитела к NP белку ВГА). Морфометрический анализ структур органов проводили на парафиновых срезах в поле зрения при окуляре 10х/25 и объективе 100х/1,3 oil. Для электронно-микроскопического исследования кусочки органов фиксировали в 2.5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере, рН 7,4, дофиксировали по стандартной методике. Ультратонкие срезы контрастировали насыщенным раствором уранилацетата и раствором Рейнольдса и изучали в электронном микроскопе Libra 120 Carl Zeiss (Германия) при ускоряющем напряжении 80 kV.

Статистический анализ. Определение статистической достоверности различий вирусных титров и морфометрических параметров в сравниваемых группах проводили методами вариационной статистики. Вероятность достоверности различий сравниваемых средних величин оценивали по t-критерию Стьюдента, достоверными считали различия при $p < 0,05$ (Усович и Лебедев, 1970; Автандилов, 2002).

2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Изучение молекулярных основ и механизмов адаптации пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09 в лабораторных условиях к организмам лабораторных животных

Настоящее исследование выполнено на двух инбредных линиях мышей BALB/c и C57Bl/6z и аутбредных мышях CD1. В результате проведённых экспериментов были получены три адаптированных к организмам мышей высоко патогенных штамма, вызывающих тяжёлое заболевание и гибель экспериментальных животных (Табл. 1). Проведённый анализ показал, что пандемический вирус гриппа А(H1N1)pdm09 при благоприятных для себя условиях способен быстро адаптироваться к генетически различным мышам, вызывая 100% летальность, которая была получена к 7 пассажу в группе мышей линии BALB/c, к 12 пассажу в группе мышей линии C57BL/6z и в группе мышей CD1 – к 10-му пассажу (Табл. 1, 2).

Значения 50% летальной дозы для мышей линии BALB/c оказались наименьшими, по сравнению со значением ЛД₅₀ для мышей линии C57BL/6z и мышей CD1, что свидетельствует о большей степени вирулентности штамма, полученного путём адаптации к организму мышей линии BALB/c (*MA-BALB/c*) (Табл. 3).

Патологические изменения в лёгких, приводящие к летальному исходу, характеризуются развитием интерстициальной пневмонии. Сравнительный анализ лёгких мышей инбредных линий выявил наиболее выраженные патологические изменения в группе мышей BALB/c, которые проявлялись сладжем эритроцитов в сосудистом русле и плазматическим пропитыванием кровеносных сосудов с формированием гиалиноподобных (фибриновых) мембран, что, вероятно, снижало кровоснабжение лёгкого и способствовало развитию синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром).

Анализ аминокислотных последовательностей штамма А/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09) и его адаптированных вариантов (штаммы *MA-BALB/c*, *MA-C57Bl/6z* и *MA-CD1*) показал различия по шести белкам HA, NA, NP, NS2, PB2, PB1 и наличие потенциальной экспрессии факультативного неструктурного белка PB1-F2 (Табл. 5). Аминокислотные (ам.к.) замены в белке HA отмечены в антигенных сайтах: (Sa) E172G, (Ca2) G239D; в белке NA: I357V, L443I, T367I, при этом во всех исследуемых штаммах обнаружено закрепление главных несинонимичных замен – I06I, 248D (не показано в таблице), характерных для А(H1N1)pdm09, циркулирующих во второй половине пандемии. Замены в белках NP (N375D), NS2 (M235V) и в белках полимеразного комплекса: PB1 (L50S, S233R, R586K, P605H), PB2 (G158E, S279F, S317L,

R482K, T689A, I690V) также вероятно способствовали увеличению патогенности во время адаптации пандемического штамма A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09). Кроме того, в трёх адаптированных вариантах отмечена возможность экспрессии белка PB1-F2, который является факультативным неструктурным белком и обнаруживается не у всех ВГА. Он играет роль в увеличении патогенности, вызывая апоптоз клеток-хозяина и разрушая альвеолярные макрофаги. Также данный белок опосредованно регулирует полимеразную активность, находясь в комплексе с белком PB1, и влияет на иммунный ответ хозяина (B.G. Haleetal., 2010; Z.T. Varda and P. Paleze, 2011).

Таблица 1. Процесс адаптации пандемического штамма A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09) путем пассирования через легкие экспериментальных мышей.

Инбредные мыши						Аутбредные мыши		
Линия BALB/c			Линия C57Bl/6z			CD1		
Пассажи	Смертность %	Клинические симптомы	Пассажи	Смертность %	Клинические симптомы	Пассажи	Смертность %	Клинические симптомы
контроль	0	-	контроль	0	-	контроль	0	-
МА-1	0	-	МА-1	0	-	МА-1	0	-
МА-2	0	+	МА-2	0	-	МА-2	0	-
МА-3	0	+++	МА-3	0	-	МА-3	0	+
МА-4	2/10	++++	МА-4	0	-	МА-4	0	+++
МА-5	6/10	+++++	МА-5	0	+	МА-5	3/10	+++++
МА-6	7/10	+++++	МА-6	0	+	МА-6	8/10	+++++
МА-7	10/10	+++++	МА-7	0	++	МА-7	8/10	+++++
			МА-8	2/10	+++	МА-8	8/10	+++++
			МА-9	2/10	++++	МА-9	9/10	+++++
			МА-10	4/10	+++++	МА-10	10/10	+++++
			МА-11	9/10	+++++			
			МА-12	10/10	+++++			

Примечание к таблице 1: МА – адаптированный к организму мышей штамм A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09), прошедший через лёгкие мышей линии BALB/c 7 пассажей, через лёгкие мышей линии C57Bl/6z 12 пассажей, а через лёгкие мышей CD1. + изменения шёрстного покрова; ++ изменения шёрстного покрова, сгорбленная осанка; +++ изменения шёрстного покрова, сгорбленная осанка, снижение аппетита; ++++ изменения шёрстного покрова, сгорбленная осанка, снижение аппетита, животные сбиваются в кучу; +++++ изменения шёрстного покрова, сгорбленная осанка, животные сбиваются в кучу, снижение аппетита и веса тела, усиленное брюшное дыхание, у некоторых мышей отмечается конъюнктивит.

Таблица 2. Количество вируса гриппа А штамма A/Tomsk/273/2010(H1N1pdm09) на разных пассажах во время адаптации через лёгкие инбредных мышей линии BALB/c, C57Bl/6z и аутбредных мышей CD1.

Штаммы, адаптированные к инбредным мышам				Штаммы, адаптированные к аутбредным мышам	
МА-BALB/c		МА-C57Bl/6z		МА-CD1	
Пассажи	Титр вируса (lgTCID50/ml) ¹	Пассажи	Титр вируса (lgTCID50/ml) ¹	Пассажи	Титр вируса (lgTCID50/ml) ¹
контроль	5,6±0,60	контроль	5,6±0,60	контроль	5,6±0,60
МА-1	3,5±1,00	МА-1	4,0±0,50	МА-1	6,3±0,44
МА-2	4,0±0,50	МА-2	4,8±0,75*	МА-2	5,8±0,60
МА-3	3,0±0,50	МА-3	4,0±0,50	МА-3	7,0±0,50
МА-4	4,5±0,62	МА-4	4,9±0,34*	МА-4	6,3±0,66
МА-5	5,3±0,44*	МА-5	5,5±0,32*	МА-5	6,3±0,60
МА-6	5,5±0,79	МА-6	4,6±0,22*	МА-6	6,3±0,44
МА-7	5,0±0,50	МА-7	5,8±0,30*	МА-7	6,9±0,12
		МА-8	5,4±0,23	МА-8	6,9±0,20
		МА-9	5,0±0,41	МА-9	7,5±0,44
		МА-10	4,6±0,38	МА-10	7,5±0,35
		МА-11	4,6±0,23*		
		МА-12	5,4±0,54		

Примечание: 1-титры вируса в лёгких инбредных мышей линии BALB/c и C57Bl/6z, а также аутбредных мышей CD1 были определены с помощью культуры клеток MDCK и выражены в lgTCID50 на 1мл исследуемого образца, в виде M±I95, где M - средняя арифметическая величина, а I – доверительный интервал.* - P<0,05 при сравнение титра вируса в экспериментальной группе по отношению к группе контроля (t-критерий Стьюдента). Контроль - это доза вируса гриппа A(H1N1)pdm09, посчитанная на культуре клеток MDCK при выделении изолята от человека.

Таблица 3. Вирусологические характеристики пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 и его адаптированных вариантов, полученных на инбредных мышах линии BALB/c, C57Bl/6z и аутбредных мышях CD1.

Название штаммов вируса гриппа А(Н1N1)pdm09	Титр вируса в лёгких мышей ¹	ГАЕ ²	ЛД ₅₀ ³	ЛД ₅₀ , выраженная в lgTCID _{50/мл}
A/Tomsk/273/2010	5,6±0,60	2560	-	-
МА-BALB/c	5,0±0,50	2560	10 ^{-3,8}	1,2
МА-C57Bl/6z	5,4±0,50	1280	10 ^{-1,9}	3,5
МА-CD1	7,5±0,35	1280	10 ^{-2,5}	5,0

Примечание: ¹ - титры вирусов выражены в lgTCID₅₀ на 1мл исследуемого образца в виде М±I95, где М - средняя арифметическая величина, а I - доверительный интервал; ² - гемагглютинирующая единица в 1мл исследуемого образца; ³ - 50%-ная летальная доза для мышей в 1 мл на 1 г веса животного.

Для изучения внутривидовой изменчивости по устойчивости к адаптированному варианту пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 было проведено перекрёстное инфицирование мышей двух различных генетических линий. Мышей линии BALB/c и.н. инфицировали штаммом, адаптированным к мышам линии C57Bl/6z, а мышей линии C57Bl/6z - штаммом адаптированным к мышам линии BALB/c. Вирусологический анализ штамма *МА-BALB/c*, полученного путём адаптации к мышам линии BALB/c, выявил его высокую летальность для группы мышей линии C57Bl/6z – к 9-м суткам эксперимента смертность животных составила 100% (Рис. 1). В то же время штамм *МА-C57Bl/6z*, адаптированный к мышам линии C57Bl/6z, проявил слабые патогенные свойства по отношению к мышам линии BALB/c, не вызывая летальных случаев (Рис. 1).

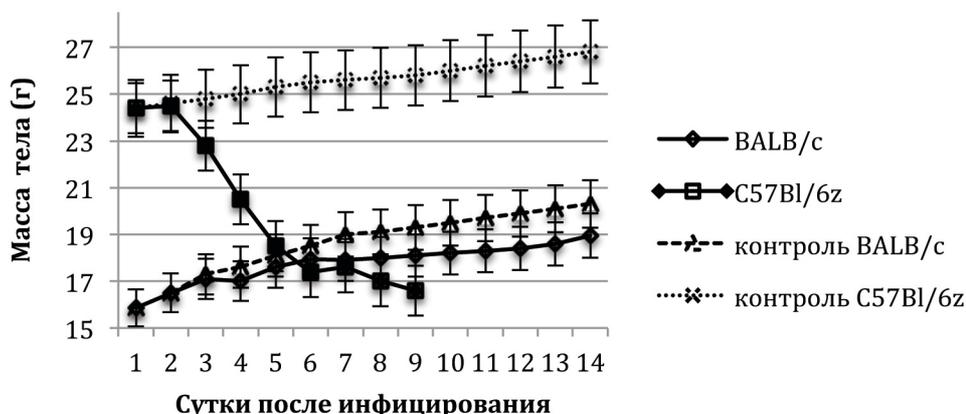


Рисунок 1 - Выживаемость и изменение массы тела мышей линии BALB/c и C57Bl/6z при перекрёстном инфицировании штаммами *МА-C57Bl/6z* и *МА-BALB/c*, соответственно.

Примечание: вес инфицированных животных М±m, где М – средняя арифметическая величина, а m - стандартная ошибка средней величины.

Возможно, за высоковирулентные свойства штамма *МА-BALB/c*, проявляющиеся на различных линиях мышей, отвечает наличие аминокислоты S в положении 279 белка PB2 в комплексе с другими заменами в структурных и факультативном белках. Более того, показано, что штамм *МА-BALB/c*, был получен за более короткий пассажный период и обладал более высокими вирусологическими характеристиками (такими как ЛД₅₀) и значительным патологическим проявлением в лёгких по сравнению со штаммами *МА-C57Bl/6z* и *МА-CD1*.

Молекулярные механизмы, с помощью которых пандемический вирус гриппа 2009 года смог адаптироваться к популяции человека и быстро распространиться среди

людей, до сих пор остаются неизвестными. Однако, лабораторные эксперименты, посвящённые изучению адаптации пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09, позволяют подойти к решению актуальной фундаментальной задачи – определению генетических маркёров вирулентности, роли отдельных генов в патогенезе гриппозного заболевания, а также выявлению молекулярных основ преодоления межвидового барьера.

Проведенный сравнительный анализ показал, что штамм адаптированного пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09, полученный на мышах линии BALB/c, является высоко патогенным не только для мышей линии BALB/c, но и для другой инбредной линии мышей C57Bl/6z. В то время как штамм *MA-C57Bl/6z* оказался высоко летальным только для мышей линии C57Bl/6z и низко патогенным для мышей другой инбредной линии - BALB/c.

Таким образом, проведённый анализ показал, что пандемический вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 при благоприятных для себя условиях способен быстро адаптироваться к генетически различным мышам, вызывая 100% летальность, благодаря селекционному накоплению аминокислотных замен в геноме. Однако не во всех случаях адаптированный вариант может проявлять свои высоколетальные и патогенные свойства на другой экспериментальной модели животных.

2.2.2 Выявление особенностей патогенеза гриппозного заболевания вызванного адаптированным вариантом вируса гриппа А(Н1N1)pdm09

С целью выявления особенности влияния неадаптированного варианта вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 на внутренние органы (лёгкое, головной мозг, печень, почка, тонкая кишка) в сравнении с воздействием адаптированного варианта ВГ А(Н1N1)pdm09 было проведено экспериментальное инфицирование мышей линии BALB/c штаммом *Tomsk/2010* и штаммом *MA-BALB/c*. Вирусологические данные показали наличие вирусного титра в головном мозге, печени и в почке только под воздействием штамма *MA-BALB/c* (Табл. 4). Проведенный морфо-функциональный анализ клеточных структур головного мозга, печени, почек и кишечника у мышей линии BALB/c выявил наиболее существенные патоморфологические изменения в группе животных, инфицированных адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 - штаммом *MA-BALB/c*. Морфометрический анализ различных структур внутренних органов (головной мозг, печень, почка, тонкая кишка) показал достоверные отличия между группами животных, инфицированных неадаптированным и адаптированным вариантами гриппа А(Н1N1)pdm09 (Табл. 6). Наибольшая реактивность органных структур наблюдалась в случае инфицирования адаптированным вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09: в головном мозге – увеличение среднего количества клеток «теней» и диаметра кровеносных сосудов коры головного мозга; в печени – уменьшение средней величины гепатоцитов при увеличении диаметра синусоидных капилляров; в почке – увеличение диаметра собирательных трубочек; в кишечнике уменьшение среднего количества бокаловидных клеток при увеличении высоты каёмчатых клеток слизистой оболочки тонкой кишки.

Таблица 4. Количество адаптированного варианта пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 штамм *MA-BALB/c* во внутренних органах экспериментально

Название штаммов вируса гриппа А(Н1N1)pdm09	титр вируса в органах ¹			
	головной мозг	печень	почка	тонкая кишка
<i>Tomsk/2010</i>	0	0	0	0
<i>MA-BALB/c</i>	3,75±0,22	2,5±0,5	0,74±0,48	0

инфицированных мышей.

Примечание: ¹ - титры вирусов выражены в lgTCID₅₀ на 1мл исследуемого образца в виде М±I95, где М - средняя арифметическая величина, а I – доверительный интервал.

Таблица 5 - Аминокислотные отличия пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09 и его адаптированных вариантов к организмам мышей инбредных линий BALB/c, C57Bl6/z и аутбредной линии CD1

Название штаммов вируса гриппа А(H1N1)pdm09	PB2						PB1				PB1-F2	HA Antigenic site		NP	NA			NS2	
	158	279	317	482	689	690	50	233	586	605		Sa	Ca2		375	357	443	367	235
A/Tomsk/273/2010	G	S	S	R	T	I	L	S	R	P	-	E	G	N	I	L	T	M	A
MA-BALB/c	E	S	L	K	A	V	S	R	K	H	Q	G	D	D	V	I	I	V	V
MA-C57Bl6/z	E	F	L	K	A	V	S	R	K	H	Q	G	D	D	V	I	I	V	V
MA-CD1	G	S	L	K	A	V	S	R	K	H	Q	E	G	N	V	I	I	V	V

Таблица 6. Результаты морфометрического исследования структур головного мозга, печени, почки и тонкого кишечника лабораторных мышей линии BALB/c при инфицировании неадаптированным и адаптированным вариантами пандемического ВГ А(H1N1)pdm09

	Головной мозг		Печень		Почка			Тонкая кишка	
					Почечные клубочки		Собирательные трубки		
	Среднее количество клеток «теней» на поле зрения (N _A) ¹	Диаметры сосудов коры головного мозга (D)	Среднее значение гепатоцитов (L)	Диаметр синусоидных капилляров (D)	Диаметр почечных клубочков (D max) ²	Диаметр почечных клубочков (D min) ³	Диаметр собирательных трубочек (D)	Среднее количество бокаловидных клеток на поле зрения (N) ¹	Высота каёмчатых клеток эпителиального слоя (L)
Контроль	4,07±0,41	6,74±0,10	17,15±1,10	4,01±0,45	56,05±1,15	46,71±0,82	18,84±0,56	11,66±0,08	14,27±0,6
Неадаптированный вариант вируса гриппа А(H1N1)pdm09 (штамм A/Tomsk/273/2010(H1N1)pdm09)	8,31±0,52 ^{4***}	6,53±0,08	16,45±0,15	4,73±0,08	56,07±1,08	46,65±1,06	19,46±0,34	9,13±1,16 ^{5***}	16,54±0,06 ^{5***}
Адаптированный вариант вируса гриппа А(H1N1)pdm09 (штамм MA-BALB/c)	8,97±0,49 ^{4***}	9,40±0,20 ^{4***}	14,95±0,12 ^{4***}	5,53±0,06 ^{4***}	56,85±1,14	44,09±1,00	25,81±0,66 ^{4***}	8,40±0,76*	18,49±0,23 ^{4***}

Примечание: 1 - поле зрения - окуляр 10х/25, объектив 100х/1,3 oil; 2 – D max – максимальный диаметр почечного клубочка с капсулой; 3 - D min - минимальный диаметр почечного клубочка с капсулой; 4 – достоверные различия по сравнению с контролем составили > 0,99; 5 - достоверные различия по сравнению с контролем составили > 0,95. * (достоверность > 0,9) и *** (достоверность > 0,99) - величины, достоверно отличающиеся от аналогичных параметров у животных, инфицированных неадаптированным вариантом и адаптированным вариантом пандемического ВГ А(H1N1)pdm09.

2.2.3 Изучение биологических свойств штаммов вируса гриппа А(Н1N1)pdm09, циркулировавших во время пандемии 2009г. и в постпандемический период в 2011г.

Оба штамма N13-2009 и KSH-2011 эффективно реплицировались в лёгких мышей с 1^{ых} по 6^{ые} сутки после д.и. Однако показатели титра вируса штамма N13-2009 на 1^{ые} сутки были достоверно выше по сравнению со штаммом KSH-2011. Морфологическое исследование показало, что к 6-ым суткам развивается интерстициальная пневмония, преимущественно перибронхиальной формы. В целом воспалительный процесс тяжелее протекает в случае инфицирования штаммом 2009 года.

Анализ аминокислотных замен у исследуемых штаммов выявил различия в генах HA и NA по сравнению со штаммом сравнения - *A/California/07/2009*. У штамма N13-2009 обнаружены три аминокислотные замены в антигенном сайте гемагглютинаина Ca: I166T, S203T, R205K; и две в нейраминидазе: V106I, N248D. В то время как у штамма KSH-2011 аминокислотных замен существенно больше: в субъединице HA1 - S143G, A197T, K211N, A215E, в том числе, в антигенных сайтах - (Ca) S203T, (Cb) L70P, (Sb) S185T; в субъединице HA2 - E374K, S451N; и в NA: V106I, N248D. Определено, что штамм N13-2009 генетически близок вирусам, циркулировавшим на территории Украины и Гонконга, при этом все эти вирусы не выделяются в отдельную генетическую кладу и остаются наиболее близкими к штамму *A/California/07/2009*, а штамм KSH-2011 принадлежит к седьмой генетической клade, к которой также относятся пандемические вирусы, циркулировавшие в мире в 2011-2012 годах.

Анализ сывороток крови инфицированных мышей показал, что штамм 2009 г. значительно более иммуногенен по сравнению со штаммом 2011 г. Эти данные были подтверждены тестированием иммуногенных свойств штаммов вируса гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в 2010-2011 гг. от пациентов из Новосибирской области с подтверждённым диагнозом "грипп" (Курская и др., 2011; Сулопаров и др., 2011; Прокопьева и др., 2013).

Таким образом, для вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 на примере штамма KSH-2011, выделенного в постпандемический период в 2011 г., отмечено накопление аминокислотных замен в гене гемагглютинаина по сравнению с вирусом гриппа, циркулировавшим в пандемический период 2009 года, что, по-видимому, свидетельствует о непрерывном антигене дрейфе в вирусной популяции, которая приводит к смене генетических клад. Кроме того, накопление мутаций в генотипе пандемического вируса гриппа 2011 г. привело к снижению его эпидемической активности и патогенности.

Морфологический анализ выявил у всех экспериментальных мышей нейротрофическое повреждение головного мозга, которое проявлялось периваскулярным отёком, петехиями, клеточными некрозами нейронов и глиоцитов. Отмечалось, что патологические процессы имели более глубокий характер поражения в случае инфицирования штаммом N13-2009, максимальное развитие которых приходилось на десятые сутки после заражения (Прокопьева и др., 2013). Достоверно показано, что пандемический ВГ А(Н1N1)pdm09 оказывает цитопатическое действие на паренхиматозные и стромальные клеточные структуры головного мозга, вызывая их дистрофию и некроз.

2.2.4 Сравнительный анализ патогенности ВГ А(Н1N1)pdm09 и А(Н5N1)

Показано, что высокопатогенный ВГ А/Н5N1 способен вызывать тяжёлую гриппозную инфекцию у экспериментальных мышей линии BALB/c без предварительной адаптации, в то время как пандемический ВГ А(Н1N1)pdm09 без предварительной адаптации не является летальным и не вызывает гибели инфицированных животных.

Только под воздействием двух летальных штаммов - *Krasn/05* и *MA-BALB/c* - регистрируется репликация ВГ в головном мозге, печени, почке.

Структурные изменения в лёгких выявляли уже на *первые* сутки после инфицирования в виде кровенаполнения мелких сосудов и повышенной секреторной активности бокаловидных клеток. В случае заражения вирусом А(Н1N1)pdm09 (неадаптированный и адаптированный варианты) степень секреторной активности была значительно выше, чем в случае инфицирования ВПВГП А/Н5N1. Вероятно, это связано с высоким титром штамма *Tomsk/2010* и штамма *MA-BALB/c* на начальном этапе воспаления в лёгких, а также с тропностью пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 именно к респираторному эпителию бронхов (Shinya et al., 2006; van Riel et al., 2006). Основные ультраструктурные изменения в лёгком сводились к следующему: в просвете альвеолярных мешков видны сферические вирусные частицы, клеточные остатки; в цитоплазме альвеолоцитов 1-го типа и макрофагах наблюдали вирусные частицы сферической и нитевидной формы, вироплазму; в альвеолоцитах 2-го типа разрушены гранулы с сурфактантом, много миелиноподобных фигур. На *третьи* сутки в лёгких мышей трёх экспериментальных групп процесс деструкции тканевых структур усугублялся, наблюдалось утолщение эластических мембран, кровоизлияния в строму. Значительно страдали альвеолоциты 2-го типа, в которых регистрировали вироплазму, электронноплотные миелиноподобные структуры. К *шестым* суткам после инфицирования у всех животных отмечали явления микротромбозов, сладж и гемолиз эритроцитов, что, возможно, сопряжено с повреждающим фактором ВГ эндотелия сосудов лёгких (Шестопалова и др. 2011). Однако степень поражения лёгких была наиболее выражена под воздействием летальных штаммов (*Krasn/05* и *MA-BALB/c*). Регистрировали множественные очаги некрозов, увеличение количества фиброзных структур. Картины отшнуровки вируса у животных, инфицированных ВГ А/Н5N1 и адаптированным вариантом ВГ А(Н1N1)pdm09, отмечались чаще, чем в группе животных, инфицированных неадаптированным вариантом ВГ А(Н1N1)pdm09. На *десятые* сутки постинфекционного заражения лёгочный рисунок в обеих группах изменялся за счёт многоочаговых крупных фокусов воспаления. При этом под воздействием штамма *Krasn/05* и штамма *MA-BALB/c* отмечали развитие интерстициальной пневмонии, а под воздействием штамма *Tomsk/2010* – воспалительный процесс был, преимущественно, выражен бронхитом с локальными участками воспаления интерстиция.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненных работ получены адаптированные варианты ВГ А(Н1N1)pdm09, которые представляют собой панель пандемических штаммов вируса гриппа *A/Tomsk/273-MA1/2010(H1N1pdm09)*, *A/Tomsk/273-MA2/2010(H1N1pdm09)* и *A/Tomsk/273-MA3/2010(H1N1pdm09)*, адаптированных к мышам инбредных линий BALB/c, C57BL/6z и к аутбредным мышам CD1, соответственно. Полученная панель может быть использована для изучения механизмов адаптации вирусных патогенов к новым хозяевам с оценкой действия противовирусных химиопрепаратов. Благодаря выполненному анализу полных геномов адаптированных вариантов ВГ А(Н1N1)pdm09 и развернутому обзору литературы создана база данных маркеров патогенности, которая может найти своё применение для тестирования и разработки лекарственных препаратов, основным механизмом действия которых может быть блокировка проникновения вируса в клетку или нарушение работы полимеразного комплекса ВГ.

Проведено изучение патогенеза гриппозной инфекции с помощью различных методов анализа (вирусологический, молекулярно-биологический, световой, иммуногистохимический и электронно-микроскопический). Полученные данные легли в основу публикаций в ведущих российских и международных журналах и были представлены на российских и международных конференциях.

ВЫВОДЫ

1. Пандемический ВГ А(H1N1)pdm09 способен быстро адаптироваться к генетически различным лабораторным мышам, вызывая 100% летальность благодаря селекционному накоплению аминокислотных замен в геноме. Полученный адаптированный вариант вызывает в организме инфицированных животных генерализованную инфекцию аналогично ВГ А/H5N1. Высоковирулентные свойства адаптированных штаммов отличаются при перекрёстном инфицировании различных генетических линий лабораторных мышей.
2. Получены три высококовирулентных адаптированных варианта пандемического ВГ А(H1N1)pdm09 к генетически различным мышам:
 - *МА-BALB/c* - к мышам инбредной линии BALB/c;
 - *МА-C57BL/6z* - к мышам инбредной линии C57BL/6z;
 - *МА-CD1* - к аутбредным мышам CD1.
3. Анализ первичной структуры всех белков пандемического ВГ неадаптированного варианта (штамм *Tomsk/2010*) и адаптированных вариантов (штамм *МА-BALB/c*, *МА-C57BL/6z* и *МА-CD1*) выявил 19 аминокислотных замен в шести белках (НА, NA, NP, NS2, PB2, PB1) и наличие потенциальной экспрессии факультативного неструктурного белка PB1-F2 у адаптированных вариантов вируса. Наиболее генетически близкими являются штамм *МА-BALB/c* и штамм *МА-C57BL/6z*.
4. Обнаружен ряд одинаковых аминокислотных замен, которые, вероятно, отвечают за усиление патогенности штаммов *МА-BALB/c*, *МА-C57BL/6z* и *МА-CD1* во время адаптации к экспериментальным животным: в белке PB2 (S317L; T271A; R482K; T689A; I690V), в белке PA (295P), в белке NA (E172G, G239D), в белке NP(N375D), в белке NA (I357V; L443I; T467I), в белке NS2 (M235V, A236V).
5. Неадаптированный вариант пандемического ВГ А(H1N1)pdm09 (штамм *Tomsk/2010*) реплицируется только в лёгких и не является летальным для экспериментально заражённых мышей, в то время как адаптированный вариант пандемического ВГ А(H1N1)pdm09 (штамм *МА-BALB/c*) и высокопатогенный ВГ А/H5N1 (штамм *Krasn/05*) являются летальными для мышей линии BALB/c, под воздействием которых регистрируется репликация вируса в лёгких, головном мозге, печени и почке.
6. Исследование лёгких мышей линии BALB/c выявило развитие интерстициальной пневмонии к 6^{бм} суткам после инфицирования адаптированным вариантом пандемического ВГ А(H1N1)pdm09 (штамм *МА-BALB/c*) с преимущественной репродукцией вируса в альвеолоцитах 2-го типа и в альвеолярных макрофагах.
7. Исследование головного мозга, печени и почек мышей линии BALB/c выявило персистенцию адаптированного варианта ВГ А(H1N1)pdm09 (штамм *МА-BALB/c*) на 3^н сутки после инфицирования.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы исследования.

Полученные в ходе данной работы адаптированные варианты пандемического ВГ А(H1N1)pdm09 могут быть использованы в общей и медицинской вирусологии для моделирования летальной гриппозной инфекции с целью изучения биологических свойств пандемического ВГ, а также эффективности лечебных и профилактических препаратов против пандемического ВГ в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Три адаптированных варианта пандемического ВГ А(H1N1)pdm09 обладают уникальными антигенными и молекулярно-биологическими свойствами, отличными от таковых для вируса сезонного гриппа субтипа А/H1N1.

Заявка на изобретение "Панель пандемических штаммов вируса гриппа А/Tomsk/273-МА1/2010(H1N1pdm09), А/Tomsk/273-МА2/2010(H1N1pdm09) и А/Tomsk/273-МА3/2010(H1N1pdm09) для изучения механизмов адаптации вирусных патогенов к новым хозяевам с оценкой действия противовирусных химиопрепаратов"

относится к разделам эпизоотологии, эпидемиологии, общей и медицинской вирусологии и касается вируса гриппа А. Данное изобретение создает адекватные модели изучения активности противовирусных препаратов против пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 *in vitro* и *in vivo*. Три адаптированных варианта пандемического ВГ А(Н1N1)pdm09 обладают уникальными антигенными и молекулярно-биологическими свойствами, отличными от таковых для вируса сезонного гриппа субтипа А/Н1N1(номер заявки на патент 2015108981 от 13.03.2015).

Полученные результаты могут быть использованы широким кругом ветеринарных и медицинских специалистов, студентами ВУЗов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Prokop'eva, E.A. Biological Characteristics of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Circulating in West Siberia during Pandemic and Post-Pandemic Periods / E.A. Prokop'eva, O.G. Kurskaya, S.G. Saifutdinova, A.V. Glushchenko, L.V. Shestopalova, A.M. Shestopalov, V.A. Shkurupii // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. – 2014. – V. 156. - № 5. – P. 673-679.
2. Прокопьева, Е.А. Особенности влияния пандемического вируса гриппа А/Н1N1 на клетки головного мозга лабораторных мышей / Е.А. Прокопьева, А.В. Глущенко, Л.В. Шестопалова, А.М. Шестопалов // **Вестник НГУ**. - Т. 11. - Вып. 3. - 2013. - С.84-90.
3. Прокопьева, Е.А. Ультраструктурные изменения альвеолоцитов и макрофагов легких под влиянием высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N1 / Е.А. Прокопьева, К.В. Корчагина, Д.А. Максимова, А.В. Зайковская, В.А. Шкурупий, А.М. Шестопалов, Л.В. Шестопалова // **Вестник НГУ**. - Т. 9. - Вып. 1. - 2011. - С.58-65.
4. Sharshov, K. Neuropathological Effect of Clade 2.3.2 H5N1 Influenza Virus Isolated from Wild Birds / K. Sharshov, E. Prokopyeva, I. Susloparov, W. Wang, Z. Li, L. Li, L. Shestopalova, A. Shestopalov // *Journal of Virology and Emerging Diseases*. - 2015. Article in press 1(1), doi <http://dx.doi.org/10.16966/jved.102>
5. Prokopeva, E.A. Comparative Analysis of Biological Properties of Influenza A (H1N1) pdm09 Virus Strains isolated in the Pandemic of 2009 and the Post-Pandemic Period in the Asian Part of Russia / E.A. Prokopeva, S.G. Sayfutdinova, A.V. Glushchenko, O.G. Kurskaya, A.V. Zaykovskaya, A.G. Durymanov, T.N. Ilyicheva, L.V. Shestopalova, A.M. Shestopalov // *Journal of Virology and Microbiology*. - 2013. - Article ID 890660, DOI: 10.5171/2013.890660
6. Прокопьева, Е.А. Молекулярно-биологические особенности штаммов вируса гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в пандемический и постпандемический периоды / Е.А. Прокопьева, С.Г. Сайфутдинова, А.В. Глущенко, А.В. Зайковская, Т.Н. Ильичева, Л.В. Шестопалова, А.М. Шестопалов // *Грипп: эпидемиология, вирусология, профилактика и лечение: материалы конф. мол. спец.* - Санкт Петербург, 2012. - С. 23-28.
7. Прокопьева, Е.А. Ультраструктурное исследование особенностей топологии пандемического вируса гриппа Н1N1 и высокопатогенного вируса гриппа H5N1 в клетках лёгких и головного мозга / Е.А. Прокопьева, К.В. Корчагина, Л.В. Шестопалова, Д.А. Максимова, Н.Г. Лузгина, В.А. Шкурупий // *Казанская наука*. - 2010. - № 8. - Вып. 1. - С.50-53.
8. Прокопьева, Е.А. Изучение ультраструктуры клеток мозга лабораторных мышей, экспериментально зараженных высокопатогенными штаммами вируса гриппа / Е.А. Прокопьева, К.В. Корчагина, Л.В. Шестопалова, А.В. Зайковская, А.А. Красильникова, А.М. Шестопалов // *PhisioMedi*. - 2010. - Т. 1. - С.199-201.

Патент:

1. **Сивай, М.В. Синтетические олигонуклеотиды-праймеры, используемые для получения первичных последовательностей генов (PB2, PB1, PA, NP, MP, NS) низкопатогенных вирусов гриппа птиц / М.В. Сивай, К.А. Шаршов, Е.А. Прокопьева, А.Г. Дурыманов, А.М. Шестопалов; Пат. № 2522822 от 11.10.12 Российская Федерация, МПК7 С 12 Q 1/68, С 12 N 15/09, С 12 Т 7/00; заявитель и патентообладатель Новосибирск, Новосибирский государственный институт. - Бюл. № 20. - 9 с. : 1 ил.**

Тезисы:

1. Прокопьева Е.А., Глушенко А.В., Сайфутдинова С.Г., Сивай М.В., Альховский С.В., Щетинин А.М., Щелканов М.Ю., Шестопалова Л.В., Шестопалов А.М. Адаптация пандемического вируса гриппа H1N1 на мышах линии BALB/C, C57BL/6z // Материалы седьмой Всероссийской научно-практической конференции "Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов"; Молодежного симпозиума "Молекулярно-клеточные и медико-экологические проблемы компенсации и приспособления". 2015. Новосибирск, 21-22 апреля. С. 225.
2. Соловьева Е.И. Оценка степени патогенности пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 и его адаптированного варианта в сравнении с высокопатогенным вирусом гриппа A/H5N1 / Е.И. Соловьева, Е.А. Прокопьева // Материалы 53-межд. науч. студ. конф. "Студент и научно-технический прогресс". Биология - Новосибирск, 2015. С. 104.
3. Соловьева, Е.И. Сравнительный анализ структурных изменений в тканях легкого экспериментально инфицированных мышей адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 и высокопатогенным вирусом гриппа A/H5N1 / Е.И. Соловьева, Е.А. Прокопьева // Материалы 52-межд. науч. студ. конф. "Студент и научно-технический прогресс". Биология - Новосибирск. 2014 - С. 142.
4. Прокопьева, Е.А. Изучение влияния адаптации вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на структурные изменения в тканях легкого, головного мозга, печени, почек и сердца у экспериментальных мышей / Е.А. Прокопьева, А.В. Глушенко, Л.В. Шестопалова, А.М. Шестопалов // Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций: материалы межд. конф. - Санкт-Петербург, 2013. - С.165-166.
5. Prokopyeva, E.A. Studies on the effect of adaptation of the influenza virus A(H1N1)pdm09 to structural changes in the tissues of the lung, brain, liver, kidney and heart in experimental mice / E.A. Prokopyeva, A.V. Gluschenko, L.V. Shestopalova, A.M. Shestopalov // 7th annual CEIRS Surveillance meeting. - Memphis, 2013 - P. 54.
6. Прокопьева, Е.А. Анализ адаптации пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09, выделенного на территории Сибири, к экспериментальным моделям животных / Е.А. Прокопьева, А.В. Глушенко, В.О. Прохорова, А.М. Шестопалов // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии: IV межд. науч. интернет-конф. - <http://www.paxgrid.ru/conference/index.php?c=postgenom2013&lang=rus> Казань, 2013. - Т. 2. С.61-62.
7. Prokopyeva, E.A. Comparative analysis of some biological properties of influenza A(H1N1)pdm09 virus strains isolated in Russia in 2009 and 2011 / E.A. Prokopyeva, S.G. Sayfutdinova, T.N. Ilyicheva, L.V. Shestopalova, A.M. Shestopalov // The 3rd International Influenza Meeting. - Munster, 2012. - P. 82.
8. Prokopyeva, E.A. The comparative analysis of pandemic influenza H1N1sw and highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses / E.A. Prokopyeva, K.V. Korchagina, A.M. Shestopalov, E.M. Shestopalova, L.V. Shestopalova, A.V. Zaykovskaya // Keystonesymposia. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Pathogenesis of Influenza: Virus-Host Interactions" - Hongkong, 2011. - P. 94.

9. Silko, N.Y. Pathological changes in mice lungs during experimental infection with natural and mice-adapted strains of H1N1(2009) pandemic influenza virus / N.Y. Silko, A.M. Shestopalov, E.A. Prokopeva, L.V. Shestopalova, K.V. Korchagina // The fourth ES WI influenza. - Malta, 2011. - P.98.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

HA (hemagglutinin) – ГА (гемагглютинин)
LD₅₀ (50% lethal dose) - доза вируса, убивающая 50% инфицированных лабораторных животных
MDCK (Madin-Darby canine kidney) – культура клеток почки собаки
M1 (matrix protein) – матричный белок
M2 (membrane protein) – мембранный белок
MID₅₀ (50% mouse infectious dose) - доза вируса, инфицирующая 50% экспериментальных животных
mRNA (maternal RNA) – мРНК (матричная РНК)
NA (neuraminidase) – нейраминидаза
NP (nucleocapsid protein) – нуклеокапсидный белок
NS – неструктурный белок
PA – полимеразный белок
PB1 – полимеразный белок 1
PB2 – полимеразный белок 2
PBS (phosphate buffered saline) – фосфатно-солевой буфер (ФСБ)
TCID₅₀ (tissue culture infectious dose) – инфекционная доза, заражающая 50% культуры клеток
а.к. – аминокислота
ВГ – вирус гриппа
ВГП – вирус гриппа птиц
ВГА – вирус гриппа А типа
ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения
ВПВГП – высокопатогенный вирус гриппа птиц
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
д.п.и. - день после инфицирования
и.н. - интраназальное инфицирование
1 ЛД₅₀ – доза вируса, убивающая 50% инфицированных лабораторных животных
МИД₅₀ – доза вируса, инфицирующая 50% экспериментальных животных
МН – реакция микронейтрализации
РГА – реакция гемагглютинации
РКЭ – развивающийся куриный эмбрион
РТГА – реакция торможения гемагглютинации
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ЦНС – центральная нервная система