

УДК 578.74

Прогнозирование эволюционной изменчивости вируса гриппа А

Т. А. Тимофеева¹, М. Н. Асатрян, А. Д. Альтштейн, Б. С. Народицкий, А. Л. Гинцбург,
Н. В. Каверин

«ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

*E-mail: timofeeva.fatyana@inbox.ru

Поступила в редакцию 16.01.2017

Принята к печати 14.08.2017

РЕФЕРАТ Из-за своей быстрой эволюционной изменчивости вирус гриппа А остается одним из наиболее распространенных и опасных возбудителей инфекционных заболеваний человека. Изучение эволюции вирусов гриппа А, которую можно наблюдать буквально в реальном времени, за последние годы испытало подъем благодаря накоплению экспериментальных данных (селекция эскейп-мутантов с последующим изучением их фенотипических характеристик, конструирование вирусов с заданными мутациями при помощи методов обратной генетики), появлению новых теоретических подходов, в основе которых лежит построение и анализ филогенетических деревьев штаммов вирусов гриппа, а также системному сочетанию известных математических методов (системы интегро-дифференциальных уравнений, статистические методы, методы теории вероятности) и имитационного моделирования. Длительная циркуляция высокопатогенных вирусов гриппа А вызывает серьезные опасения в отношении появления пандемически опасных вариантов, поэтому возникает необходимость в применении теоретических и экспериментальных методов для прогнозирования эволюционной изменчивости и вирусов подтипа Н5.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирус гриппа А, филогенетические деревья, эскейп-мутанты, математические методы, математическое моделирование, фенотипические характеристики, обратная генетика.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HA – гемагглютинин вируса гриппа; NA – нейраминидаза вируса гриппа; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; МНС – главный комплекс гистосовместимости; Н1–Н18 – подтипы гемагглютинина вируса гриппа А; N1–N11 – подтипы нейраминидазы вируса гриппа А.

ДОЛГАЯ ПРОБЛЕМА С КОРОТКИМ НАЗВАНИЕМ «ГРИПП»

Первый вирус гриппа человека был выделен В. Смитом, К. Эндрюсом и П. Лэйдлоу (W. Smith, C.H. Andrewes, P.P. Laidlaw) в Англии в 1933 году в Национальном институте медицинских исследований [1, 2]. За два года до этого, в 1931 году, Р. Шоуп (R.E. Shope) в США выделил вирус гриппа свиней [3, 4]. За прошедшие 85 лет накоплена обширная информация о структурно-функциональных свойствах вирусов гриппа, патогенезе гриппозной инфекции, реакциях адаптивного и естественного иммунитета. Вирус гриппа до сих пор остается одним из наиболее распространенных и опасных возбудителей инфекционных заболеваний человека. Он способен вызывать эпидемии и пандемии, сопровождающиеся высокой смертностью населения и огромными экономическими потерями. Причиной этого является быстрая эволюция вируса гриппа А, его приспособляемость к человеческой популяции с меняющимся состоянием ее специфического иммунитета и неиз-

менными механизмами естественного иммунитета. Особое значение во взаимоотношении вируса с популяцией человека имеют его фенотипические характеристики: 1) способность заражать клетки верхних дыхательных путей (рецепторсвязывающая активность); 2) способность «ускользать» от специфических иммунных реакций организма; 3) способность образовывать инфекционное потомство. Первая и вторая характеристики зависят преимущественно от поверхностных белков вириона, вклад в третью могут вносить все вирусные белки. В основе изменения этих характеристик лежат разные механизмы изменчивости вирусного генома.

На вирус гриппа, попавший в организм, воздействуют две формы иммунного ответа. Гуморальному иммунному ответу, представленному, в основном, нейтрализующими антителами к поверхностным белкам – гемагглютинином (HA) и нейраминидазе (NA), принадлежит ведущая роль в защите от инфекции. Антитела против гемагглютинина наиболее важны для нейтрализации вируса и предотвраще-

ния заболевания [5]. Антитела против нейраминидазы менее эффективно предотвращают инфекцию, но сдерживают ее развитие, препятствуя высвобождению вируса из зараженных клеток [6]. Основную роль в защите от инфекции играют антитела к поверхностным гликопротеинам, однако антитела образуются и к консервативным внутренним антигенам М и NP, но они не являются вируснейтрализующими антителами [7]. Клеточный иммунный ответ действует на этапе уничтожения зараженных вирусом клеток, он представлен вирусспецифическими цитотоксическими Т-лимфоцитами, которые распознают иммунодоминантные сайты внутренних белков вируса гриппа (матриксного белка М1 и нуклеопротеина NP), представленные через молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) [8].

От гуморального иммунного ответа организма вирус благополучно «уходит» при помощи механизма антигенного дрейфа [9] – накопления точечных мутаций, приводящих к изменению структуры поверхностных гликопротеинов вириона, вследствие чего специфические антитела перестают узнавать вирус. От клеточного иммунного ответа вирус также «защищается» путем антигенного дрейфа, суть которого состоит в накоплении точечных мутаций уже в иммунодоминантных сайтах внутренних белков [8]. Еще один из основных механизмов изменчивости вируса гриппа – это антигенный сдвиг – механизм реассортации фрагментов генома, который приводит к появлению новых пандемических вариантов [10]. Генетический материал вируса гриппа сегментирован – представлен отдельными блоками нуклеиновой кислоты, которые реплицируются в клетке независимо один от другого. Это позволяет разным вирусам гриппа А легко скрещиваться, образуя гибриды, которые называются реассортантами. Если два вируса гриппа А (птичий и человеческий) заразят одну и ту же клетку, то в вирусном потомстве многие вирусные частицы окажутся гибридными, получившими некоторые гены от птичьего вируса-родителя, а некоторые от человеческого.

Менее ясна роль других механизмов, обеспечивающих изменчивость вируса гриппа, таких, как образование дефектных частиц [11] и межмолекулярная рекомбинация. Хотя у вирусов с негативным РНК-геномом, к которым относится вирус гриппа, рекомбинация происходит достаточно редко, показано включение в ген *НА* клеточной мРНК. Это придает вирусу способность к многоцикловой инфекции в клеточной культуре без трипсина, что обычно коррелирует с высокой вирулентностью [12]. Не исключено, что подобные события могут быть фактором быстрых эволюционных изменений вируса гриппа А.

МНОГООБРАЗИЕ ВИРУСОВ ГРИППА А В ПРИРОДЕ И ИХ ЭВОЛЮЦИЯ

Вирусы гриппа А, циркулирующие в природе и выделенные от человека, а также от разных видов млекопитающих и птиц, характеризуются значительным структурным разнообразием гликопротеиновых оболочки – гемагглютинина и нейраминидазы. В настоящее время у вирусов гриппа А описано 18 (Н1–Н18) подтипов гемагглютинина и 11 (N1–N11) подтипов нейраминидазы [13]. Потенциальными возбудителями будущих пандемий могут стать вирусы с гемагглютинином подтипов Н1, Н2, Н3, Н5, Н6, Н7, Н9 и Н10 и нейраминидазами подтипов N1, N2, N3 и N8, которые вызывают заболевания у людей, в том числе спорадические. Из известных нам пандемий гриппа самой страшной была знаменитая «испанка» 1918 года, унесшая по разным оценкам от 50 до 100 миллионов жизней, поэтому хотелось бы иметь способы предсказания таких событий заранее.

Сезонным же эпидемиям гриппа достаточно эффективно противостоят вакцины, рекомендованные ВОЗ. Однако в результате быстрой эволюции вируса состав таких вакцин приходится обновлять практически каждый год. Изучение эволюции вирусов гриппа необходимо для того, чтобы научиться предсказывать, какой именно вариант вызовет эпидемию (или, возможно, пандемию) и своевременно создавать эффективные средства защиты.

Поскольку эволюцию вируса гриппа можно наблюдать буквально в реальном времени, в последние годы изучение эволюции вирусов гриппа А испытало подъем благодаря как накоплению экспериментальных данных, так и появлению новых теоретических подходов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА А

Мы остановимся на теоретических подходах, которые, на наш взгляд, наиболее перспективны для прогнозирования эволюционной изменчивости вирусов гриппа А. В основе этих подходов лежит построение и анализ филогенетических деревьев штаммов вирусов гриппа, а также специальный математический аппарат (системы интегро-дифференциальных уравнений, статистические методы, методы теории вероятности, имитационное моделирование) [14, 15].

Филогенетические деревья отражают эволюционные взаимосвязи между различными видами или другими биологическими сущностями, имеющими общего предка. Такие деревья строятся в несколько этапов: 1) сначала составляется выборка нуклеотидных и аминокислотных последовательностей; 2) затем производится множественное выравнивание;

3) далее осуществляется непосредственно построение дерева с использованием различных математических методов (например, метода максимального правдоподобия, метода ближайших соседей, матричных методов, метода максимальной бережливости); 4) и, наконец, производится визуализация и редактирование дерева. В настоящее время широко используется обширное программное обеспечение и интернет-ресурсы, предназначенные для визуализации филогенетических деревьев вируса гриппа А [16].

В одном из рассматриваемых подходов анализируют влияние положительного эпистаза на эволюцию вируса гриппа [17, 18]. К эпистатическим мутациям относятся парные мутации, появление одной из которых влияет на появление другой. При использовании филогенетических деревьев белков NA и HA (подтипов H3N2 и H1N1) на основе данных NCBI's Influenza Virus Resource [19] разработан статистический метод, позволяющий своевременно выявить признаки будущих эпистатических (парных) мутаций. Для построения филогенетических деревьев в этом подходе используется метод ближайших соседей. Суть метода заключается в обнаружении пар частей белка, интервалы на филогенетическом дереве между последовательными мутациями которых значительно ниже средних показателей, т.е. за основу взято предположение, что мутация в одной части белка ускоряет появление мутации в другой. Эти взгляды практически не учитываются при прогнозировании состава вакцин, но, тем не менее, могут быть очень важными.

Другой подход к прогнозированию предлагает способ определения клад (единицы популяции, более крупные, чем штамм) филогенетического дерева, которые будут «развиваться» (увеличивать свою частотность) в следующем сезоне или, наоборот, «затухать». Для этого разрабатывается «модель приспособляемости» [20] гемагглютинаина вируса гриппа А подтипа H3, которая предсказывает эволюцию популяции вируса от года к году и предлагает принципиальный способ выбора вакцины. Частотностью (концентрацией) штамма называется доля популяции носителей вируса, инфицированных данным штаммом. Частотностью клады в некотором сезоне считается сумма всех частотностей штаммов этого сезона, находящихся в данной кладе. Приспособляемостью (скоростью развития) штамма называется параметр, влияющий на увеличение или уменьшение частотности его дочерних штаммов в следующем сезоне [14]. При построении филогенетических деревьев в этом подходе используют метод максимального правдоподобия.

Для прогнозирования эволюционной изменчивости вирусов гриппа А с использованием этих подходов необходима максимально полная база данных нукле-

отидных последовательностей генов вируса гриппа, определенных к настоящему времени.

Чтобы построенные филогенетические деревья можно было считать максимально приближенными к реальности, исходные данные должны пройти тщательный отбор по критериям (наличие полноразмерных нуклеотидных последовательностей штаммов вируса гриппа А, их территориальное распределение и т.д.), которые могут улучшить их положение с точки зрения репрезентативности.

Хороший способ проверки построенного дерева и, как следствие, правильности критериев отбора заключается в сравнении эскейп-мутантов (от англ. escape – убегающий, ускользающий), полученных от некоторого штамма вируса, и ветвей филогенетического дерева, где «родительским» узлом является вышеназванный штамм. Эскейп-мутанты – это варианты вируса, устойчивые к нейтрализующему действию того или иного моноклонального антитела. Если последовательности эскейп-мутантов нашли свое отражение на филогенетическом дереве, то они должны находиться в ветвях, происходящих от исходного вируса. Если картина иная, то возможны различные объяснения, но наиболее вероятны либо ошибка при отборе данных для дерева, либо ошибка в его построении.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА А

Как и в случае теоретических подходов, для реализации экспериментальных подходов к прогнозированию эволюционной изменчивости вирусов гриппа А необходим анализ нуклеотидных последовательностей циркулирующих штаммов с использованием базы данных. При этом в результате экспериментальной работы база данных пополняется новыми штаммами – нуклеотидными последовательностями эскейп-мутантов. Классическая методика получения эскейп-мутантов по гемагглютинуину в лабораторных условиях описана еще в 1980 году [21]. После селекции эскейп-мутантов дальнейшее использование трехмерной структуры молекулы в сочетании с техникой секвенирования вирусных генов позволяет локализовать сайты (или отдельные аминокислотные остатки), распознаваемые нейтрализующими антителами. В трехмерной структуре молекулы эскейп-мутантов эти сайты (выступы, петли, «карманы») распределяются неслучайным образом.

Впервые сайты связывания с антителами были выявлены в трехмерной структуре молекулы гемагглютинаина H3, поскольку в течение 20 лет (с 1981 по 2001 год) это был единственный подтип, трехмерная структура которого была определена с помощью

рентгеноструктурного анализа [22, 23]. В настоящее время хорошо изучены сайты взаимодействия с антителами эскейп-мутантов потенциально пандемических подтипов HA, таких, как H1 [24–26], H2 [26, 27], H3 [26, 28], H5 [26, 29–31] и H9 [26, 32], очень слабо – H7 [33], для подтипов H6 и H10 данные отсутствуют.

Из-за быстрой изменчивости вирусов гриппа A область сайтов взаимодействия гемагглютинаина с антителами у эскейп-мутантов изменяется и постоянно расширяется. Поэтому возникает необходимость не только в изучении гемагглютининов тех подтипов, которые мало изучены или не изучены ранее (H6, H7 и H10), но также в выявлении сайтов взаимодействия с антителами гемагглютинаина новых вариантов вируса, появляющихся в ходе эволюции уже изученных подтипов (H1, H2, H3, H5, H9). Такая задача становится особенно актуальной, если появляется новый вариант вируса гриппа человека, вызывающий мощную эпидемическую вспышку.

Для прогнозирования эволюционной изменчивости вируса гриппа A важно учитывать вариации не только гемагглютинаина, но и другого поверхностного белка – нейраминидазы, поскольку именно в результате слаженного функционирования генов этих белков возможно появление новых эволюционно наиболее успешных вариантов вируса. Поэтому изучение в лабораторных условиях эскейп-мутантов нейраминидазы и гемагглютинаина началось практически одновременно.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ, СПОСОБСТВУЮЩИЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЮ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВИРУСА ГРИППА

Для предсказания распространения того или иного варианта вируса в природных условиях недостаточно просто определить сайты поверхностных белков (как гемагглютинаина, так и нейраминидазы), отвечающие за взаимодействие с антителами.

Необходимо проводить **скрининг природных изолятов** вируса гриппа A, циркулировавших в предшествующие годы, с целью обнаружения вариантов вируса, полученных в лаборатории. Оказалось, что не все мутации, зарегистрированные у лабораторных эскейп-мутантов, встречаются в природных изолятах вируса гриппа A. Причинами такого несоответствия могут быть дополнительные **фенотипические эффекты**, вызванные мутациями. Поэтому очень важно изучение фенотипических свойств эскейп-мутантов, в первую очередь, вирулентности и сродства к аналогам клеточных рецепторов («птичьего» и «человеческого» типов), уровня репликации и репродуктивной активности при различных температурах

и, наконец, устойчивости по отношению к факторам окружающей среды (температуре, pH).

Например, при изучении влияния аминокислотных замен в молекуле гемагглютинаина вирусов гриппа на фенотипические свойства таких потенциально пандемических подтипов, как H5 и H9, было замечено, что эскейп-мутанты подтипа H9 [34] более консервативны в фенотипических вариациях, в то время как у эскейп-мутантов подтипа H5 [35, 36] все фенотипические характеристики изменялись в зависимости от аминокислотных замен в молекуле гемагглютинаина. Геном вирусов гриппа подтипа H9 более стабилен и не обнаруживает такой вариабельности при циркуляции в природных условиях, как геном вирусов H5. Этот факт хорошо согласуется с экспериментальными результатами [34].

Таким образом, изучение влияния аминокислотных замен на фенотипические свойства эскейп-мутантов позволяет ограничить множество отобранных в лаборатории предполагаемых эволюционно удачных вариантов вируса и попытаться прогнозировать активность таких вариантов при циркуляции в природе.

Но вариации фенотипических свойств вирусов гриппа могут быть обусловлены мутациями не только в поверхностных, но и в других белках. Следовательно, для строгого доказательства зависимости фенотипических свойств вируса от мутаций в той или иной позиции молекулы гемагглютинаина (или другого вирусного белка) необходимо с помощью **методов обратной генетики** сконструировать вирусы с точно заданными мутациями и изучить их фенотипические свойства, тем самым подтвердить и ограничить множество прогнозируемых штаммов.

При прогнозировании эволюционной изменчивости вирусов подтипа H5 в направлении пандемически опасных вариантов необходимо обращать внимание на важные регионы молекулы HA, мутации в которых могут приводить к усилению патогенных свойств вируса гриппа A. Такими участками могут быть:

- рецепторсвязывающий сайт, отвечающий за взаимодействие с клеточными рецепторами;
- сайты, отвечающие за связывание с антителами (антигенные сайты);
- сайт гликозилирования, играющий важную роль в созревании молекулы HA;
- сайт нарезания, имеющий большое значение для инфекционности вируса.

В связи с этим возникает необходимость в применении теоретических и экспериментальных методов для прогнозирования эволюционной изменчивости вирусов и подтипа H5.

Внимание к вирусам гриппа A подтипа H5 не ослабевает с 1997 года, когда впервые у людей за-

регистрировали респираторную инфекцию, вызванную этими вирусами [37]. В настоящее время смертность от заболевания, вызванного подтипом H5, составляет около 53%, что почти в 5 раз выше, чем при знаменитой «испанке». На данный момент вирус не способен передаваться от человека к человеку, в частности, из-за специфичности связывания с рецепторами «птичьего», а не «человеческого» типа [38], но при приобретении такой способности последствия могут оказаться катастрофическими для всего человечества.

В случае вирусов подтипа H5 построению филогенетических деревьев особенно затрудняет неполная представленность данных в базе нуклеотидных последовательностей. Расширить базу данных мы можем путем ее пополнения нуклеотидными последовательностями эскейп-мутантов подтипа H5, отдавая при этом себе отчет, что такие данные, полученные в экспериментальных условиях, могут быть использованы как промежуточные узлы к реально зарегистрированным (природным) штаммам.

ЧТО ОТДЕЛЯЕТ НАС ОТ ПАНДЕМИИ, ВЫЗВАННОЙ «ПТИЧЬИМ» ГРИППОМ!

Для того чтобы вирус гриппа птиц подтипа H5 приобрел не только способность к распространению в человеческой популяции, но и эволюционно удачные фенотипические характеристики, необходимы изменения, на которые может потребоваться не очень много времени.

В лабораторных условиях показано [39, 40], что всего нескольких мутаций в молекуле HA циркулирующего штамма H5N1 достаточно, чтобы вирус приобрел способность к передаче воздушно-капельным путем и стал пандемически опасным. Эти мутации (рис. 1) располагаются в районе рецепторсвязывающего сайта (N224K, Q226L – обозначены красным цветом), в стержневом регионе (T318I – зеленый) и зоне поверхностного контакта тримеров (H107Y – синий), а также в области сайта гликозилирования (N158D, T160A – показаны желтым). На основе филогенетического анализа гена HA были предсказаны позиции аминокислотных остатков, отвечающих за распространение вируса H5N1 среди млекопитающих [41]. Это позиции 186, 226 и 228, расположенные в рецепторсвязывающем сайте, и 160 в сайте гликозилирования. Локализация двух теоретически предсказанных и экспериментально выявленных позиций полностью совпадает. Следует отметить, что предсказанные позиции располагаются в важных регионах молекулы HA – рецепторсвязывающем сайте и сайте гликозилирования. При этом, что важно, в их число входит и позиция 186, которая встречается у экспериментально отобранных эскейп-мутантов

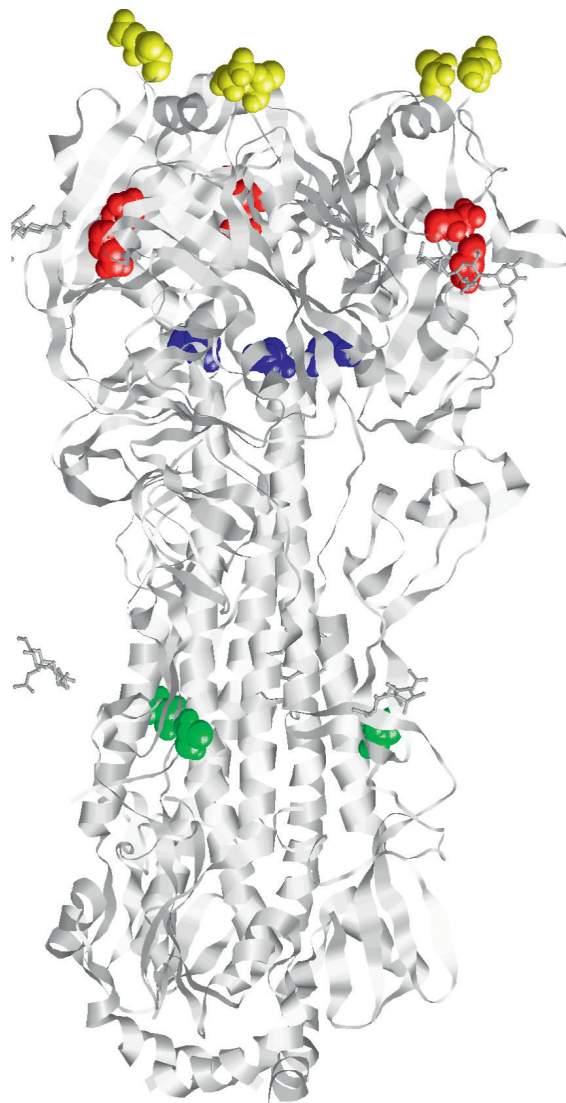


Рис. 1. Локализация в тримере молекулы гемагглютинаина H5 аминокислотных остатков, мутации в которых способствуют распространению высокопатогенных вирусов H5N1 среди млекопитающих [39, 40]

[36]. В настоящее время в молекуле HA выявлены дополнительные новые стабилизирующие (эволюционно-удачные) мутации, сопряженные с мутациями, изменяющими рецепторную специфичность высокопатогенных вирусов H5N1 в сторону «человеческого» типа [42].

Таким образом, **детальный структурно-функциональный анализ** рецепторсвязывающего сайта, антигенных сайтов, сайта нарезания, сайта гликозилирования гемагглютининов различных подтипов вируса гриппа А создает основу для анализа эволюционных



Рис. 2. Локализация в мономере молекулы белка PB2 аминокислотных остатков, мутации в которых способствуют распространению высокопатогенных вирусов H5N1 среди млекопитающих [44]

изменений этих подтипов и открывает новые возможности для прогнозирования появления в природе вариантов, которые отбираются в лабораторных условиях.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ «ПТИЧЬЕГО» ГРИППА

Способность высокопатогенных вирусов H5N1 передаваться среди млекопитающих связана с мутациями не только в гемагглютинине, но и в белке полимеразного комплекса PB2 – кеп-распознающей эндонуклеазе, вовлеченной в инициацию транскрипции вирусной мРНК и играющей важную роль в процессе репликации вируса [43]. В генах полимеразного комплекса, который отвечает за передачу вируса среди млекопитающих, недавно был выявлен целый набор мутаций – это, помимо известной мутации E627K в белке PB2, аминокислотные замены E192K, E627V, D701V, K702R в PB2 (рис. 2) и N105S в белке PB1 [44]. Теоретическое предсказание аминокислотных остатков, отвечающих за передачу вируса

подтипа H5N1 среди млекопитающих, основанное на филогенетическом анализе гена PB2 [45], включает позиции 590, 627 и 701. В двух случаях теоретически предсказанные позиции полностью совпадают с определенными экспериментально – 627 и 701 [41].

До недавнего времени считалось, что эскейп-мутации сосредоточены только в высоковариабельных поверхностных белках вируса гриппа. В последние годы появились работы, доказывающие существование таких мутаций в сайтах внутренних – консервативных – белков, в частности, в белке нуклеопротеина (NP). Исходно белок NP был охарактеризован как высококонсервативный. Но дальнейшие серологические исследования с помощью поликлональных или моноклональных антител показали, что белок NP подвержен изменчивости. Однако селекция эскейп-мутантов не применима к сайтам белка NP вируса гриппа А, отвечающим за взаимодействие с антителами, поскольку анти-NP-антитела не обладают нейтрализующей активностью. Поэтому в этом случае можно использовать сайт-специфический мутагенез с последующим тестированием получен-

ного в прокариотической системе белка в иммуноферментном анализе. Все обнаруженные антигенно значимые аминокислотные остатки являются вариabельными, и в 3D-структуре они «разбросаны» по поверхности молекулы белка NP [45]. Определено также расположение и структура компактного антигенного сайта в домене тела молекулы NP вируса гриппа А [46].

Для прогнозирования эволюционной изменчивости вирусов гриппа А необходимо учитывать также влияние мутаций не только в поверхностных, но и во внутренних белках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, вирус гриппа остается одним из наиболее распространенных и опасных возбудителей инфекционных заболеваний человека. Он способен вызывать эпидемии и пандемии, сопровождающиеся высокой смертностью среди населения и огромными экономическими потерями. Причина этого заключается в быстрой эволюции и приспособляемости вируса гриппа А к человеческой популяции с ее меняющимся состоянием специфического иммунитета и неизменными механизмами естественного иммунитета.

Поскольку эволюцию вируса гриппа можно наблюдать буквально в реальном времени, то в последние годы изучение эволюции вирусов гриппа А испытало подъем благодаря как накоплению значительного количества экспериментальных данных (селекция эскейп-мутантов с последующим изучением их фенотипических характеристик, конструирование вирусов со строго заданными мутациями при помощи методов обратной генетики), так и появлению новых подходов, в основе которых лежит построение и анализ филогенетических деревьев штаммов вирусов гриппа, а также системное сочетание математических методов (системы интегро-дифференциальных уравнений, статистические методы, методы теории вероятности) и имитационного моделирования.

Чтобы построенные филогенетические деревья можно было считать максимально приближенными к реальности, исходные данные должны пройти

тщательный отбор по критериям (наличие полных нуклеотидных последовательностей штаммов вируса гриппа А, их территориальное распределение и т.д.), которые могут улучшить положение с точки зрения их репрезентативности. Хороший способ проверки построенного дерева и, как следствие, правильности критериев отбора заключается в сравнении эскейп-мутантов, полученных от некоторого штамма вируса, и ветвей филогенетического дерева, где «родительским» узлом является вышеназванный штамм.

В результате изучения влияния аминокислотных замен на фенотипические свойства эскейп-мутантов можно ограничить множество отобранных в лаборатории предполагаемых эволюционно удачных вариантов вируса и попытаться прогнозировать их активность при циркуляции в природе. Однако вариации фенотипических свойств вирусов гриппа могут быть обусловлены мутациями не только в гене *НА*, но и в других генах. Следовательно, для строгого доказательства зависимости фенотипических свойств вируса от мутаций в той или иной позиции молекулы гемагглютинина (или другого белка) необходимо с помощью методов обратной генетики сконструировать вирусы с заданными мутациями путем использования и выявления фенотипических свойств таких вирусов.

Постройка филогенетических деревьев вирусов подтипа Н5 затрудняется неполной представленностью данных в базе нуклеотидных последовательностей. Расширить базу данных можно путем ее пополнения нуклеотидными последовательностями эскейп-мутантов Н5, учитывая при этом, что полученные в экспериментальных условиях данные, могут использоваться как промежуточные узлы к реально зарегистрированным (природным) штаммам.

Для прогнозирования эволюционной изменчивости вирусов гриппа А необходимо учитывать влияние мутаций не только в поверхностных (*НА* и *NA*), но и во внутренних белках (*NP*, *M1*, *M2*, *P*).

Используя системное сочетание современных подходов и накопленный экспериментальный опыт, можно проводить исследования с целью прогнозирования эволюционной изменчивости вирусов гриппа А. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Smith W., Andrewes C.H., Laidlaw P.P. // *Lancet*. 1933. P. 66–68.
- Smith W., Andrewes C.H., Laidlaw P.P. // *Br. J. Exp. Pathol*. 1935. V. 16. P. 291–302.
- Shope R.E. // *J. Exp. Med*. 1931. V. 54. P. 373–385.
- Shope R.E. // *J. Exp. Med*. 1934. V. 62. P. 49–61.
- Донина С.А., Найхин А.Н., Руденко Л.Г. // *Аллергология и иммунология*. 2000. № 1. С. 114.
- Cox R.J., Brokstad K.A., Ogra P. // *Scand. J. Immunol*. 2004. V. 59. № 1. P. 1–15.
- Askonas B.A., McMichael A.J., Webster R.G. // *Basic and Applied Influenza Research*. / Ed. Beare A.S. Boca Raton, FL: CRC Press, 1982. P. 159–188.
- Найхин А.Н., Лосев И.В. // *Вопросы вирусологии*. 2015. Т. 60. С. 11–16.
- Both G.W., Sleight M.J., Cox N.J., Kendal A.P. // *J. Virol*. 1978. V. 75. P. 4886–4890.
- Lamb R.A., Krug R.M. // *Orthomyxoviridae. Fields virology. Section 2, Specific Virus Families* / Eds B.N. Fields and D.M. Knipe. Lippincott, Williams, Wilkins, 2001. P. 1091–1137.

11. Steinhäuser D.A., Holland J.J. // *Annu. Rev. Microbiol.* 1987. V. 41. P. 409–433.
12. Khatchikian D., Orlich M., Rott R. // *Virology.* 1982. V. 122. P. 38–47.
13. Webster R.G., Govorkova E.A. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2014. V. 1323. P. 115–139.
14. Strelkova N., Lassig M. // *Genetics.* 2012. V. 192. P. 671–682.
15. Shih A.C.-C., Hsiao T.-C., Ho M.-S., Li W.-H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 6283–6288.
16. Neher R.A., Bedford T. // *Bioinformatics.* 2015. V. 31(21). P. 3546–3548.
17. Kryazhimskiy S., Dushoff J., Bazykin G.A., Plotkin J.B. // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. e101301.
18. Neverov A.D., Kryazhimskiy S., Plotkin J.B., Bazykin G.A. // *PLoS Genet.* 2015. V. 11(8). e1005404.
19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/FLU>.
20. Luksza M., Lassig M. // *Nature.* 2014. V. 507. P. 57–74.
21. Webster R.G., Laver W.G. // *Virology.* 1981. V. 104. P. 139–148.
22. Wilson I.A., Skehel J.J., Wiley D.C. // *Nature.* 1981. V. 289. P. 366–373.
23. Skehel J.J., Stevens D.J., Daniels R.S., Douglas A.R., Knosow M., Wilson I.A., Wiley C.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. P. 1779–1783.
24. Caton A.J., Browlee G.G., Yewdell J.W., Gerhard W. // *Cell.* 1982. V. 31. P. 417–427.
25. Rudneva I., Ignatieva A., Timofeeva T., Shilov A., Kushch A., Masalova O., Klimova R., Bovin N., Mochalova L., Kaverin N. // *Virus Res.* 2012. V. 166. P. 61–67.
26. Каверин Н.В., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Игнатьева А.В. // *Вопросы вирусологии, Приложение 1.* 2012. С. 148–158.
27. Tsuchiya E., Sugawara K., Hongo S., Matsuzaki Y., Muraki Y., Li Z.N., Nakamura K. // *J. Gen. Virol.* 2001. V. 82. P. 2475–2484.
28. Wiley D.C., Wilson I.A., Skehel J.J. // *Nature.* 1981. V. 289. P. 373–378.
29. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Ilyushina N.A., Varich N.L., Lipatov A.S., Smirnov Y.A., Govorkova E.A., Gitelman A.K., Lvov D.K., Webster R.G. // *J. Gen. Virol.* 2002. V. 83. P. 2497–2505.
30. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Govorkova E.A., Timofeeva T.A., Shilov A.A., Kochergin-Nikitsky K.S., Krylov P.S., Webster R.G. // *J. Virol.* 2007. V. 81. P. 12911–12917.
31. Rudneva I.A., Kushch A.A., Masalova O.V., Timofeeva T.A., Klimova R.R., Shilov A.A., Ignatieva A.V., Krylov P.S., Kaverin N.V. // *Viral Immunol.* 2010. V. 23. № 2. P. 181–187.
32. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Ilyushina N.A., Lipatov A.S., Krauss S., Webster R.G. // *J. Virol.* 2004. V. 78. № 1. P. 240–249.
33. Schmeiser F., Vasudevan A., Verma S., Wang W., Alvarado E., Weiss C., Autokorale V., Maseda G., Weir J.P. // *PLoS One.* 2015. V. 10(1). e0117108.
34. Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignatieva A.V., Shilov A.A., Ilyushina N.A. // *Arch. Virol.* 2016. V. 161. P. 3515–3520.
35. Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignatieva A.V., Shilov A.A., Krylov P.S., Ilyushina N.A., Kaverin N.V. // *Virology.* 2013. V. 447. P. 233–239.
36. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignatieva A.V., Shilov A.A., Bovin N.V., Ilyushina N.A. // *Virus Res.* 2015. V. 210. P. 81–89.
37. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) // *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.* 1997. V. 46(50). P. 1204–1207.
38. Matrosovich M., Zhou N., Kawaoka Y., Webster R. // *J. Virol.* 1999. V. 73. P. 1146–1155.
39. Imai M., Watanabe T., Hatta M., Das S.C., Ozawa M., Shinya K., Zhong G., Hanson A., Katsura H., Watanabe S., et al. // *Nature.* 2012. V. 486. № 7403. P. 420–428.
40. Russell C.A., Fonville J.M., Brown A.E., Burke D.E., Smith D.L., James S.L., Herfst S., van Boheemen S., Linster M., Schrauwen E.J., et al. // *Science.* 2012. V. 336. P. 1541–1547.
41. Zhang Z.-W., Liu T., Zeng J., Chen Y.-E., Yuan M., Zhang D.-W., Zhu F., Yuan S. // *Infectious of Poverty.* 2015. V. 4. № 50. P. 2–9.
42. Hanson A., Imai M., Hatta M., McBride R., Imai H., Taft A., Zhong G., Watanabe T., Suzuki Y., Neumann G., et al. // *J. Virol.* 2016. V. 90. № 6. P. 2981–2992.
43. Plotch S.J., Bouloy M., Krug R.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. P. 1618–1622.
44. Taft A.S., Ozawa M., Fitch A., Depasse J.V., Halfmann P.J., Hill-Batorski L., Hatta M., Fridrich T.C., Lopes T.J.S., Maher E.A., et al. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. № 7491. P. 1–12.
45. Varich N.L., Sadykova G.K., Prilipov A.G., Kochergin-Nikitsky K.S., Kushch A.A., Masalova O.V., Klimova R.R., Gitelman A.K., Kaverin N.V. // *Viral Immunol.* 2011. V. 24. № 2. P. 1–7.
46. Varich N.L., Sadykova G.K., Prilipov A.G., Kochergin-Nikitsky K.S., Webster R.G., Kaverin N.V. // *Arch. Virology.* 2014. V. 159. P. 1493–1497.