

61

C322



ВИРУСОЛОГИЯ: ПАРАДОКСЫ, ПРОБЛЕМЫ, РЕШЕНИЯ

Екатеринбург, 2011

ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия»
Минздравсоцразвития

ВИРУСОЛОГИЯ: ПАРАДОКСЫ, ПРОБЛЕМЫ, РЕШЕНИЯ

*Актовая речь заведующего кафедрой микробиологии,
вирусологии и иммунологии, профессора
Сергеева Александра Григорьевича*

**НА ВСЕРОССИЙСКОЙ 66-Й НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ
КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ И СТУДЕНТОВ
«АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНСКОЙ
НАУКИ И ЗДРАВООХРАНЕНИЯ»**

6 апреля 2011 г.

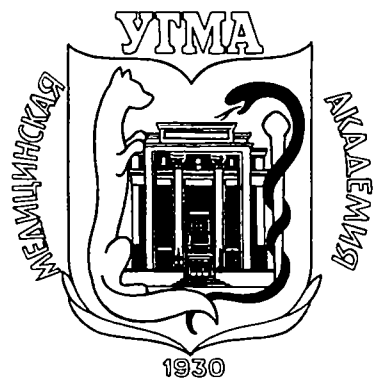
Екатеринбург, 2011

УДК 616.640

Сергеев А.Г.

ВИРУСОЛОГИЯ: ПАРАДОКСЫ, ПРОБЛЕМЫ, РЕШЕНИЯ.

Актовая речь – Екатеринбург. УГМА.-2011. - 40 с.



*Моему мудрому, доброму Учителю, профессору
Зинаиде Николаевне Кондрашовой
с благодарностью и пожеланиями
доброго здоровья и долгих лет жизни посвящаю*

ГЛУБОКОУВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ, СТУДЕНТЫ, ГОСТИ!

Когда я соглашался на любезное предложение руководства академии подготовить Актовую речь, то не вполне осознавал всю сложность ситуации, в которой окажусь, взявшись за этот труд. Одно дело, когда перед высокой аудиторией выступает известный, уважаемый клиницист и докладывает материал, который, в общем и целом, могут понять и по достоинству оценить и коллеги и студенты. Выступление же перед клиницистами теоретика, специалиста в довольно узкой области медицины, какой является вирусология, требует особой подачи «сухого», сложного материала, далекого от животрепещущих задач, стоящих перед здравоохранением. Еще более сложная задача - показать значимость своего, личного, пусть скромного вклада, малой толики новых знаний, добытых в результате многолетнего кропотливого труда. Поступая в медицинский институт на лечебный факультет, я твердо знал, что стану хирургом и до шестого курса был уверен, что так оно и будет. Но случилось так, что одна встреча и беседа с человеком, ставшим моим

дорогим Учителем, наставником и в науке и на жизненном пути, талантливым ученым и педагогом, Зинаидой Николаевной Кондрашовой, открыла передо мной совершенно новый, интереснейший мир, захватывающее поле научной деятельности.

В изложении материала я постарался избежать употребления сложной специальной терминологии, однако не смог обойтись без исторических экскурсов.

Вирусология, как наука, началась с открытия нашего соотечественника Дмитрия Ивановского, который в 1893 году доказал, что мозаичную болезнь растения (табака) вызывает возбудитель, резко отличающийся от описанных к тому времени микроорганизмов, прежде всего, крайне малыми размерами и неспособностью расти на питательных средах. Вскоре после этого была доказана вирусная природа множества заболеваний человека, животных и растений.

В течение следующих нескольких десятилетий не смолкали споры о природе вирусов: существо это или вещество? Некоторые свойства вирусов и даже само их название (от латинского *virus*— яд), больше подходили для неживых объектов. Чрезвычайно малые размеры (в сто раз меньше размеров бактериальной клетки) породили дискуссию о том, где проходит грань между живой и неживой природой. Оказалось, что вирусные частицы могут распадаться на отдельные молекулы, а затем их можно снова собирать, как элементы детского «конструктора». Точку в этом споре

поставил выдающийся австралийский ученый-вирусолог Фрэнк Макферлан Бернет в своей небольшой по объему, но удивительно емкой по содержанию, глубине анализа фактов, научному предвидению книге «Вирус как организм» (1946).

Парадоксальным является тот факт, что первая успешная попытка борьбы с особо опасной массовой вирусной инфекцией была осуществлена почти за 100 лет до открытия вирусов наблюдательным английским врачом Эдвардом Дженнером, на рубеже XVIII - XIX веков. Жидкость из пузырьков на вымени коров, больных оспой, надежно защищала привитых людей от черной оспы. С тех пор вакцинами (от латинского *vassa* – корова) стали называть профилактические и лечебные препараты, содержащие микроорганизмы, их фрагменты или продукты метаболизма, не имеющие никакого отношения к коровам. Метод Дженнера оказался настолько удачным, что массовое оспопрививание людей позволило ликвидировать натуральную оспу в масштабах земного шара. Об этом знаменательном событии Всемирная организация здравоохранения объявила в 1978 году – через 200 лет после открытия Э. Дженнера.

Одна из первых искусственных вакцин – против бешенства – также была получена до открытия вирусов Луи Пастером в 1885 году. Таким образом, первые успехи в специфической профилактике вирусных заболеваний были достигнуты эмпирическим путем задолго до формирования вирусологии как науки.

Период конца 19-го - начала 20 веков ознаменовался крупнейшими достижениями в области профилактики и лечения бактериальных инфекций, тогда как вирусология вплоть до 50-х годов прошлого столетия не имела ключевых технологий для своего бурного развития. В то время как для успешной борьбы с бактериальными инфекциями медики располагали мощным арсеналом вакцин, лечебных сывороток, антибиотиков, все попытки вирусологов создать эффективные лечебно-профилактические препараты заканчивались неудачами.

Вирусы оказались слишком сложными объектами для изучения, вирусологические исследования слишком дорогими, а практические результаты слишком скромными. Для успешного развития вирусологии требовался мощный импульс высокой социальной востребованности результатов труда ученых, привлекающий общественное внимание, требующий многократного увеличения финансирования, развития высоких технологий, концентрации усилий вирусологов на решение конкретной актуальной проблемы и скорейшее достижение социально значимого результата. Таким импульсом, настоящим «локомотивом» для развития вирусологии, стала очередная волна эпидемии полиомиелита, охватившая после окончания второй Мировой войны страны Европы и Северной Америки.

Развитие человеческого общества неизбежно сопровождается эволюцией возбудителей инфекционных

заболеваний. Проблема ранее неизвестных, вновь возникающих инфекций, хорошо знакома современникам: в 1981 г. началась пандемия ВИЧ-инфекции, в марте 2003 года Всемирной организацией здравоохранения была объявлена глобальная тревога в связи с распространением "атипичной пневмонии" – тяжелого острого респираторного синдрома, вызываемого новым вирусом - SARS CoV.

Нечто подобное происходило в недалеком историческом прошлом, во второй половине XIX века. В странах Европы стали быстро распространяться две новые эпидемические инфекции, поражавшие, в основном, детское население: дифтерия и полиомиелит. Первые случаи дифтерии были зарегистрированы в 1857 году, и вскоре эта инфекция стала одной из основных причин детской смертности.

Первая эпидемия полиомиелита произошла в Стокгольме в 1887 г. После этого в целом ряде стран Европы, а затем и Северной Америки, Австралии, Новой Зеландии периодически наблюдались эпидемии все более и более крупного масштаба. Вирус поражал двигательные нейроны передних рогов спинного мозга, вызывая вялый паралич мышц конечностей.

Эпидемия оставляла за собой страшный след – десятки тысяч искалеченных детей. Так, в 1913 году только в одном Нью-Йорке в течение нескольких месяцев жертвами полиомиелита стало более 3000 детей, летальность составляла от десяти до двадцати процентов. Самым известным человеком, перенесшим полиомиелит, безусловно,

был 32-й президент США Франклин Делано Рузвельт, прикованный к инвалидному креслу.

Инфекция быстро распространялась через воду, предметы обихода, воздушно-капельным путем. Кроме этого, стали небезопасными визиты к стоматологу и операции на ЛОР-органах. Были описаны случаи быстрого развития полиомиелита у детей после экстракции зубов. В 1940 г. в г. Экрон (штат Огайо, США) произошла трагедия в одной многодетной семье: пятеро детей одновременно заболели тяжелым полиомиелитом после вошедшей в моду операции тонзилэктомии, трое из них скончались.

После окончания второй Мировой войны эпидемия вернулась сначала в США, потом в страны Западной и Восточной Европы. Было отмечено возрастание случаев крайне тяжелого течения заболевания с развитием паралича дыхательной мускулатуры. Для оказания помощи таким больным в Соединенных Штатах начали массовое производство специальных дыхательных аппаратов, которые с подачи журналистов стали называть «железные легкие». Аппарат представлял собой небольшую барокамеру, в которую укладывали пациента; его голова, при этом, оставалась снаружи. В камере периодически создавали отрицательное давление, за счет чего воздух мог поступать в легкие. Сохранились фотодокументы, на которых запечатлены огромные залы госпиталя, уставленные рядами дыхательных аппаратов.

Ситуация казалась безнадежной, потому что неоднократные попытки создания вакцины против полиомиелита, начиная с середины 30-х годов, оканчивались неудачей. Все вакцины, благополучно прошедшие предварительный контроль безопасности на животных или на ограниченном контингенте добровольцев, при попытках их массового применения вызывали полиомиелит у 2-4% детей.

Переломным моментом в истории вирусологии стал 1949 год, когда был разработан метод, позволяющий культивировать клетки животных на искусственных питательных средах. Оказалось, что полиовирусы могут прекрасно размножаться *in vitro*, в культуре клеток почек обезьян. С этого времени появилась возможность приступить к разработке нового поколения вакцин. Через 5 лет в США к испытаниям была готова вакцина Джонаса Солка, содержащая вирусы, инактивированные формалином. Его работа финансировалась за счет средств из Фонда поддержки исследований для борьбы с полиомиелитом, который создала семья Рузвельта. В апреле 1955 г. по радио транслировался отчет руководителя испытаний Томаса Фрэнсиса, который объявил вакцину Солка безопасной, мощной и эффективной. В откликах прессы на это событие явно прослеживался характерный для того времени дух «холодной войны»: "Пожалуй, лишь свержение коммунизма в Советском Союзе могло бы принести столько же радости в сердца и дома Америки, как историческое объявление о том, что столетняя война против полиомиелита практически

подошла к концу", писала газета «Гардиан». Ликование американцев можно понять: последняя к тому времени эпидемия оставила после себя более 300 000 детей-инвалидов.

На территории Советского Союза эпидемия началась позже и ее пик пришелся на 1957-58 годы. Особенно пострадали республики Прибалтики: в некоторых районах заболеваемость превышала уровень 700 на 100 тыс. детского населения. Для борьбы с инфекцией были привлечены лучшие специалисты страны – вирусологи, эпидемиологи, педиатры. В 1955 году был создан Научно-исследовательский институт изучения полиомиелита, директором которого стал выдающийся ученый и организатор Михаил Петрович Чумаков.

В 1957 году к испытаниям была готова новая вакцина американского исследователя Альберта Сэбина, содержащая живой ослабленный возбудитель. Осторожные ученые Соединенных Штатов отдавали предпочтение вакцине Солка, поскольку она не содержала живых вирусов, поведение которых после включения в циркуляцию среди населения было трудно предсказуемым. Не найдя признания в своей стране, Альберт Сэбин, предложил провести испытания своей живой вакцины в Советском Союзе. С точки зрения руководства СССР, вакцина Сэбина имела одно важное преимущество перед инактивированной вакциной Солка: ее производство и применение стоило в 10 раз дешевле. Под руководством М.П. Чумакова были проведены масштабные испытания

эффективности и безопасности обеих вакцин и с 1959 года налажено производство живой вакцины Сэбина, которой в этом же году было привито 15 миллионов детей. Для упрощения процедуры прививок вакцина выпускалась в форме конфет-драже. В течение последующих двух лет, благодаря массовой вакцинации детского населения, заболеваемость удалось снизить более чем в 100 раз. Угроза эпидемии миновала, но история с полиомиелитом оказалась хорошим уроком для Правительства и руководителей здравоохранения нашей страны. Стала очевидной необходимость вложения немалых средств в развитие фундаментальной вирусологической науки и прикладных исследований. Модный в то время лозунг, провозглашенный Н.С. Хрущевым и ставивший целью «Догнать и перегнать США!» был взят на вооружение не только в производстве сельскохозяйственной продукции, но и в области вирусологии. В течение нескольких лет в СССР было вновь создано и перепрофилировано несколько крупных научно-исследовательских учреждений, расширены вирусологические отделы в действующих НИИ, организована сеть вирусологических лабораторий в системе практического здравоохранения, подготовлены квалифицированные кадры вирусологов.

Одним из научных учреждений, перепрофилированных на борьбу с вирусными инфекциями, стал Свердловский научно-исследовательский институт антибиотиков, в 1957 году преобразованный в Институт по профилактике полиомиелита, а

с 1960 г. получивший новое название - Свердловский НИИ вирусных инфекций. В 1966 г. институт переместился в новые просторные корпуса, выстроенные в лесном массиве на окраине города, недалеко от бывшей дачи купцов Агафуровых.

В лаборатории энтеровирусных инфекций, которой с 1973г. руководила З.Н. Кондрашова, работало 28 сотрудников. Основным научным направлением была оценка эффективности вакцинопрофилактики полиомиелита. Для контроля за напряженностью коллективного иммунитета к полиовирусам у сотен детей разного возраста из г. Свердловска и области брали пробы крови и определяли уровень вируснейтрализующих антител на культуре клеток. Это был весьма трудоемкий, кропотливый и достаточно однообразный труд.

Благодаря успехам массовой вакцинации, уровень заболеваемости полиомиелитом в Советском Союзе к тому времени удалось снизить в 200 раз. По официальным данным ежегодно в стране регистрировалось менее 100 случаев полиомиелита и этот показатель из года в год снижался. Однако в конце 60-х годов начал отмечаться рост так называемых «полиомиелитоподобных» заболеваний у детей, проявляющихся в виде пареза мышц одной конечности. В ряде случаев заболевание развивалось у ребенка после приема живой вакцины или у детей, имевших контакт с реципиентами вакцины. В США случаи вакциноассоциированного полиомиелита были описаны в 50-е годы и это явилось одним

из аргументов отказа от применения живой вакцины Сзбина. Но в СССР, крупнейшем в мире производителе живой вакцины, которая поставлялась во все страны Восточной Европы, Индию, Японию, страны Южной Америки, на исследования, связанные с потенциальной опасностью живой вакцины, было наложено «табу». Нужно было обладать немалым мужеством, чтобы начать даже обсуждение этого вопроса, не говоря уже о том, чтобы открыто заявить, что часть случаев легких спинальных парезов у детей связана с прививками. Первым ученым, забившим тревогу по поводу эпидемического подъема острых паретических заболеваний у детей, был заведующий кафедрой детских инфекций СГМИ, в то время еще не профессор, Виталий Васильевич Фомин. Для обоснования своих выводов ему была нужна поддержка вирусологов, и он ее получил со стороны З.Н.Кондрашовой.

Выводы совместных исследований были следующими:

- в г.Свердловске в 1968-1971 г.г. наблюдался эпидемический подъем полиомиелитоподобных заболеваний с клиникой вялого пареза;

- часть случаев относится к вакциноассоциированным, другая – связана с циркуляцией «диких» штаммов полиовирусов;

- достаточно большая часть неоднократно вакцинированных детей младшего возраста не имеют антител к полиовирусам, т.е. не защищены от инфекции;

- для повышения эффективности вакцинопрофилактики

необходимо отказаться от применения вакцины в форме конфет-драже и вернуться к использованию жидкой формы.

Реакция Москвы последовала незамедлительно. В Свердловск зачастили проверочные комиссии, имеющие целью доказать несостоятельность выводов ученых, которых обвиняли чуть ли не в антисоветской деятельности. Но, несмотря на разносы и поношения, В.В. Фомин твердо стоял на своих позициях. З.Н. Кондрашова тоже не собиралась отступать и направила работу лаборатории на решение новых задач.

Одна из задач заключалась в разработке простых и экономичных методов лабораторной диагностики полиомиелита и других энтеровирусных инфекций, позволяющих, с одной стороны, существенно ускорить получение данных об этиологии заболевания, а с другой – проводить более масштабные исследования уровня коллективного иммунитета (слово «мониторинг» вошло в обиход гораздо позже).

Другая задача, не менее дерзкая для периферийного советского НИИ, заключалась в определении генетических изменений, происходящих с вакцинными штаммами после их размножения в организме человека и оценка их потенциальной опасности.

Моя трудовая деятельность в Свердловском НИИ вирусных инфекций началась в пору его расцвета. Штат научных сотрудников насчитывал более 50 человек,

большинство из которых составляли недавние выпускники санитарно-гигиенического факультета СГМИ, имевшие опыт работы в практическом здравоохранении. Институт был на хорошем счету в Министерстве здравоохранения, поэтому не было отказов в закупке дорогостоящих импортных приборов, оборудования, реактивов. Молодые сотрудники в обязательном порядке стажировались в ведущих столичных НИИ, в служебные командировки для участия в конференциях выезжали целые делегации научных сотрудников. По линии отдела молодежной науки ЦК ВЛКСМ с периодичностью в 2-3 года проводилась «Школа молодого вирусолога», обычно в шикарнейших, по тем временам, ведомственных пансионатах. Блестящие лекции, увлекательные дискуссии проходили с участием самых авторитетных в стране ученых-вирусологов, среди которых были академики, директора НИИ, авторы учебников и монографий. К сожалению, такое «торжество науки» продолжалось недолго и очень скоро все это почувствовали. Наступали другие времена.

К моменту моего появления в лаборатории З.Н. Кондрашовой, генетические исследования полиовирусов уже шли полным ходом. Экспериментальной моделью служили обезьяны, которых закупали в Индии, Индонезии, странах Африки. Эту интереснейшую работу выполнял талантливый ученик З.Н.Кондрашовой, выпускник нашего института Владимир Игоревич Злобин, ныне являющийся действительным членом РАМН. В.И.Злобину я обязан первыми

уроками по молекулярной генетике вирусов, ставшей в последующем основным предметом моих научных изысканий. В лаборатории сложился дружный коллектив молодых научных сотрудников. Стиль руководства З.Н.Кондрашовой отличался демократизмом, она обладала тонким чувством юмора, острым умом и женским обаянием. Зинаида Николаевна умела быть жесткой, некоторые сотрудники ее побаивались, но на многие наши проделки она смотрела снисходительно, поддерживая в нашей молодежной компании атмосферу свободного творчества. В 1979 году З.Н.Кондрашова перешла на заведывание кафедрой микробиологи СГМИ и «ядро» этого коллектива последовало за своим руководителем.

Передо мной была поставлена сугубо прикладная задача: разработать ускоренный метод лабораторной диагностики - реакцию непрямой гемагглютинации для определения уровня антител к вирусам Коксаки группы В - близких родственников полиовирусов, вызывающих у детей заболевания, сходные по клинике с легкими формами полиомиелита. Для достижения цели надо было в первую очередь прочно связать вирусы с поверхностью эритроцитов - получить эритроцитарный диагностикум. Задача казалась довольно простой, хотя подобных диагностикумов для энтеровирусов на тот момент в мире не существовало.

Реакция агглютинации (склеивания) эритроцитов была впервые описана в начале XX века Карлом Ландштейнером, автором открытия антигенных групп крови АВО, и всем хорошо

известна. В норме эритроциты имеют на поверхности некоторый отрицательный заряд, который удерживает их на расстоянии друг от друга. Если же заряд снимается, эритроциты склеиваются, т.е. происходит их агглютинация. При определении групповой принадлежности крови агглютинация происходит за счет того, что антитела, присоединившиеся к эритроцитам, экранируют их заряды.

Новая модификация реакции агглютинации эритроцитов была разработана в Советском Союзе в 1946 году и получила название «реакция Кравченко-Соколова». Долгое время она оставалась засекреченной, так как использовалась военными для диагностики особо-опасных инфекций, потом стала известной под названием «реакция непрямо́й гемагглютинации». Суть метода заключалась в том, что к эритроцитам животных присоединяли бактериальные антигены, в результате чего они приобретали способность к агглютинации в присутствии соответствующих антибактериальных антител. Иными словами, эритроциты можно было использовать в качестве носителей любых антигенов, в зависимости от поставленной задачи.

Я с энтузиазмом принялся за работу, рассчитывая быстро справиться с задачей и заняться чем-нибудь более интересным. Однако пришлось неожиданно столкнуться с проблемами, которые к настоящей науке имели мало отношения. В середине 70-х годов, после очередной «перестройки» в ВАКе, возросли требования к внедрению

научных достижений в производство. Кандидатские диссертации, выполненные в отраслевых НИИ, должны были заканчиваться разработкой технической документации на препарат, получением не менее трех опытных серий в условиях производства с подтверждением успешных испытаний в Государственном контрольном институте. Мне понадобилось 3 года на разработку метода и еще 5 лет, чтобы наладить производственный выпуск препарата. Кроме диссертации, пришлось написать 3 довольно толстых тома технической документации. Сотрудники Предприятия по производству бактериальных и вирусных препаратов, которое размещалось в корпусах Института, относились ко мне хорошо, но в новом препарате были абсолютно не заинтересованы, я только мешался у них под ногами.

Защита диссертации проходила в Москве, в Государственном институте стандартизации и контроля биологических препаратов. Официальным оппонентом был академик Анатолий Тимофеевич Кравченко, один из авторов «реакции Кравченко-Соколова», по которой я защищался.

Во время работы над диссертацией я решил сделать электронную микрофотографию эритроцитов, нагруженных вирусом, и получил неожиданный результат. Поверхность некоторых эритроцитов была буквально усеяна вирусными частицами, в то время как на большинстве из них обнаруживались лишь единичные вирионы. Это наблюдение послужило началом дальнейших изысканий в области

патогенеза энтеровирусной инфекции и молекулярной генетики вирусов.

Получалось, что эритроциты существенно отличаются друг от друга по способности адсорбировать вирусы, и по каким-то причинам некоторые из них буквально концентрируют вирус на своей поверхности. О том, что некоторые вирусы Коксаки и ЕСНО способны адсорбироваться на эритроцитах человека, было известно еще в 50-е годы, однако вопрос о биологическом смысле этого феномена в научной литературе не обсуждался.

Главными вопросами, на которые я пытался найти ответы, были следующие:

- зачем вирус адсорбируется на безъядерной клетке, в которой невозможна его репродукция?

- какую роль могут играть эритроциты, нагруженные вирусом, в патогенезе энтеровирусных инфекций? Может быть, они осуществляют доставку вируса к клеткам-мишеням?

- что происходит с макрофагами, поглотившими такие эритроциты? Может быть, именно они транспортируют вирус в ЦНС?

- с каким клеточным рецептором взаимодействуют вирусы на поверхности эритроцитов?

Работа над решением этих вопросов была начата в Свердловском НИИ вирусных инфекций и продолжается на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии УГМА уже более 20 лет. Со временем изменялась формулировка

некоторых вопросов, появлялись новые. В результате сформировалось научное направление, предметом изучения которого являются молекулярно-генетические механизмы патогенности энтеровирусов. Эритроциты оказались чрезвычайно удобным объектом как для изучения признака рецепторной специфичности этих вирусов на самом первом, ключевом этапе вирусной репродукции, так и для исследования генетической структуры вирусной популяции.

Род Enterovirus включает в себя более 100 представителей, обитающих в кишечнике человека. Эти вирусы широко циркулируют в человеческой популяции, вызывая время от времени локальные вспышки и эпидемии в разных частях Земного шара. Уникальным свойством энтеровирусов является их способность вызывать заболевания, существенно различающиеся по клинической картине, степени тяжести и поражаемым органам. Однако особую актуальность имеет способность некоторых энтеровирусов (прежде всего, вирусов полиомиелита) вызывать гибель нейронов.

В подавляющем большинстве случаев энтеровирусная инфекция протекает в бессимптомной или стертой форме, ограничиваясь эпителием и клетками лимфоидных образований носоглотки и тонкой кишки. В редких случаях происходит лимфогенное распространение вируса и возникает вирусемия, которая может сопровождаться только лихорадкой (малая болезнь), либо возникновением на фоне лихорадочной реакции симптомов поражения различных органов и тканей

(мозговые оболочки, нервная ткань, поперечно-полосатые мышцы, поджелудочная железа, сердце).

Учитывая тот факт, что за всю историю человечества, вплоть до конца 19 века, не описано эпидемий заболеваний, сходных с теми, которые могут быть вызваны энтеровирусами, можно сделать вывод об их исходно низком патогенном потенциале. Но тогда возникает вопрос, почему с конца 19 и до середины 20 века мир сотрясали крупные эпидемии полиомиелита? Почему во второй половине 20 века появились офтальмотропные штаммы энтеровирусов и штаммы, вызвавшие крупнейшую эпидемию ящуроподобного синдрома? Каково происхождение эпидемических штаммов энтеровирусов? Откуда они берутся и почему в течение относительно короткого срока снижают свой патогенный потенциал?

Выделив признак способности к адсорбции на эритроцитах в качестве патогенетически значимого, мы попытались оценить потенциал генетической изменчивости энтеровирусов при их репродукции в разных клеточных культурах. Было установлено, что в популяциях гемагглютинирующих штаммов и клонов вируса ECHO 11 постоянно обнаруживаются мутанты со средней частотой $3,0 \times 10^{-5}$. Найденное значение свидетельствовало о точковом характере мутации, приводящей к утрате и восстановлению способности вируса к адсорбции на эритроцитах. Далее было показано, что в одних клеточных культурах поддерживается

постоянное соотношение мутантных и немутантных форм (псевдоравновесное состояние вирусной популяции), тогда как в других культурах наблюдается жесткая положительная или отрицательная селекция вирусов по этому признаку. Полученные данные подтверждали возможность быстрой селекции энтеровирусов при естественном инфекционном процессе. Так как в инфицированном организме, по имеющимся оценкам, численность вирусной популяции составляет от 10⁹ до 10¹² инфекционных вирусных частиц, в ней должны реализоваться все возможные одиночные мутации, наряду с убывающей вероятностью двойных, тройных (и так далее) мутаций. Таким образом, популяции РНК-геномных вирусов как *in vitro*, так и *in vivo* находятся в состоянии динамического равновесия, которое может достаточно быстро изменяться под действием селективных факторов. Учитывая полученные нами данные о том, что эритроциты способны *in vitro* блокировать инфекционную активность гемагглютинирующих вариантов так же эффективно, как вируснейтрализующие антитела, логично было предположить, что взаимодействие с эритроцитами является селективным фактором, приводящим к отбору негемагглютинирующих вариантов в гетерогенной популяции энтеровирусов в ходе естественного инфекционного процесса *in vivo*.

Полученные результаты, опубликованные в 1994 году в журнале *Archives of Virology*, издаваемом в Австрии и США,

подтверждали актуальность работы и наш приоритет в исследовании изменчивости рецепторной специфичности энтеровирусов. В том же году ассистентом кафедры А.В. Новоселовым по этой теме была защищена кандидатская диссертация. Защита проходила в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН.

В тяжелой для страны экономической обстановке 90-х годов наши экспериментальные исследования были прерваны почти на 10 лет. За это время в научной литературе появилось достаточно много интересных работ зарубежных коллег по интересующему нас направлению. Был идентифицирован ряд клеточных рецепторов, с которыми взаимодействуют энтеровирусы, в том числе ответственный за их прикрепление к эритроцитам рецептор DAF (CD55). С помощью рентгеноструктурного анализа было определено взаимное расположение всех аминокислотных остатков в белках капсида у некоторых энтеровирусов. В результате этого появилась возможность точно локализовать участок капсида, затронутый мутациями.

В 90-е годы произошли революционные изменения методов генетического анализа. Открытие в 1983 году американским исследователем К.Муллисом полимеразной цепной реакции привело к бурному прогрессу в области молекулярной генетики. Появились фантастические возможности использования генетического анализа для диагностики как инфекционных, так и неинфекционных

заболеваний.

Наша научная работа временно перешла в область теоретических изысканий. К ней проявил интерес талантливый ученый, профессор Института математики и механики УрО РАН, Аркадий Владимирович Ким. Сформировался научный коллектив, состоящий из известных профессоров, молодых ученых и студентов УГМА, Уральского государственного университета, УГТУ-УПИ и Уральской государственной архитектурной академии. Итогом совместной работы стало создание математической модели мутационного процесса в вирусной популяции, опубликованной в 2004 году в Нидерландах в журнале *Russian Journal of Numerical Analysis and Mathematical Modelling*. Результаты численного моделирования через несколько лет подтвердились молекулярно-генетическими методами в эксперименте.

Исследования в области молекулярной генетики удалось возобновить, благодаря поддержке ректора УГМА, профессора Анатолия Петровича Ястребова. В 1997 году при кафедре микробиологии была создана Лаборатория молекулярной диагностики, одна из первых в регионе, в которой стал широко использоваться метод ПЦР (зав. лабораторией – к.м.н. С.В.Лебедев), а с 2006 года аспирантом кафедры А.В.Резайкиным освоен метод секвенирования ДНК. Метод секвенирования обладает широчайшими возможностями. Он позволяет определить нуклеотидную последовательность генома, проводить идентификацию микроорганизмов, выявлять

локализацию мутаций. В последующие годы были проведены оригинальные исследования по картированию мутаций, ответственных за рецепторную специфичность вируса ECHO11, в международном генетическом банке депонировано около 100 нуклеотидных последовательностей участков генома различных энтеровирусов. Основные результаты были опубликованы в 2009г. в международном журнале *Virus Research* и представлены в диссертационной работе аспиранта кафедры Ф.А.Фадеева, защита которой состоялась в Институте вирусологии им. Д.И.Ивановского. Научный материал, накопленный к настоящему времени, обобщен в диссертационной работе аспиранта кафедры А.В.Резайкина.

Классическая генетика, как известно, изучает законы наследственности и изменчивости определенных признаков живых организмов. В основном, это морфологические и биохимические признаки. У болезнетворных бактерий в особую группу признаков выделены «факторы патогенности»: инвазивность, токсигенность и резистентность к антибактериальным препаратам. Для генетики вирусов выделить «факторы патогенности» и связать их с конкретными мутациями оказывается далеко не простой задачей. Обращаясь к предмету нашего исследования – энтеровирусам – можно сказать, что до настоящего времени выделены далеко не все признаки, определяющие меру их патогенности. Одним из таких признаков, на которых постоянно концентрируется

внимание исследователей, остается «нейровирулентность» – способность поражать нейроны при интрацеребральном заражении приматов. Результаты наших исследований изменчивости рецепторной специфичности энтеровирусов позволяют дополнить представление о свойствах, определяющих их патогенный потенциал и рассматривать в качестве самостоятельного генетического признака «инвазивность» – способность вируса к распространению в организме лимфогенным и гематогенным путем. Кроме этого, нами предложено выделить в качестве отдельного признака энтеровирусов «нейроинвазивность», как способность к проникновению через гемато-энцефалический барьер. Основанием для этого может служить тот факт, что природные штаммы вирусов полиомиелита исходно обладают нейровирулентностью, однако редко преодолевают гемато-энцефалический барьер, а остальные энтеровирусы, напротив, постоянно обнаруживаются в спинномозговой жидкости больных с клиникой серозного менингита, однако чрезвычайно редко поражают нейроны.

Итоги более чем 20-летних исследований позволили сформулировать положения, дополняющие представление о патогенетических механизмах энтеровирусной инфекции с точки зрения молекулярной генетики вирусов. Основными положениями являются следующие:

- способность энтеровирусов реагировать с тем или иным клеточным рецептором не является консервативным видовым

признаком. В популяции штаммов постоянно появляются мутанты, способные реагировать с определённым числом альтернативных клеточных рецепторов;

- для изменения специфичности вирусного антирецептора, достаточно одной аминокислотной замены в соответствующем участке капсидного белка; частота появления таких мутантов составляет 3×10^{-5} ;

- на разных стадиях патогенеза энтеровирусных инфекций по мере продвижения вируса из кишечника к внутренним органам-мишеням происходит последовательная селекция мутантов, способных связываться с тем или иным рецептором, в соответствии со сменой клеточного окружения;

- на стадии вирусемии селективное преимущество получают варианты, не имеющие сродства с рецептором DAF (CD55), так как CD55(+)-варианты прочно связываются с эритроцитами и исключаются из патологического процесса. Кроме эритроцитов, «ловушками» для вирусов являются клетки, имеющие на своей поверхности специфические рецепторы, но не имеющие корецепторов для проникновения вируса в цитоплазму;

- смена рецепторного пейзажа окружающих клеток является постоянно действующим селективным фактором, благодаря которому осуществляется задержка скорости репродукции вируса при его продвижении к органам-мишеням и успевает сформироваться иммунный ответ.

Одним из уникальных свойств энтеровирусов является

необычайно широкий спектр их вирулентности и эпидемической опасности. Они могут годами циркулировать среди населения, не нанося существенного ущерба здоровью. Исследования, проведенные в нашей стране, показали, что в течение года инфицированность практически здоровых детей составляет, в среднем 5%, то есть каждый двадцатый ребенок может являться источником энтеровирусной инфекции. Эта скрытая циркуляция время от времени проявляет себя неожиданными вспышками заболеваний, масштабы которых практически невозможно прогнозировать. Типичными являются небольшие локальные вспышки в организованных детских коллективах, реже в эпидемический процесс вовлекается население города и только в очень редких случаях инфекция захватывает большие территории. После такого «всплеска» эпидемическое благополучие на данной территории может сохраняться в течение десятилетий. Так, в течение последних 10 лет в разных городах Свердловской области было зарегистрировано несколько эпидемических вспышек серозного менингита энтеровирусной этиологии, в том числе в г. Североуральске, где на протяжении более чем 20 предшествующих лет не было отмечено подобных случаев. Проведенные нами исследования показали, что в период эпидемического благополучия 2008-2009 гг. на территории г. Екатеринбурга и в Свердловской области происходила широкая циркуляция 15 энтеровирусов: ЕСНО, Коксаки А и В. Однако существенного подъема заболеваемости в этот период времени не наблюдалось.

Феномен внезапного появления и относительно быстрого исчезновения эпидемических штаммов энтеровирусов давно привлекает внимание исследователей, однако до настоящего времени не существует даже гипотез, рассматривающих механизм этого явления.

Результаты проведенных на кафедре исследований позволили сформулировать гипотезу происхождения вирулентных штаммов энтеровирусов. В общих чертах, гипотеза опирается на следующие факты:

-энтеровирусы исходно обладают низким патогенным потенциалом, широко циркулируют в человеческой популяции, паразитируют в клетках слизистой оболочки носоглотки и тонкого кишечника *in situ*, не вызывая серьезных патологических изменений и не выходя за пределы входных ворот;

-появление мутантов, способных преодолеть тканевые барьеры, вызвать вирусемию и поражение внутренних органов, является достаточно редким вероятностным событием и приводит к возникновению спорадических случаев заболевания;

-селекция мутантов происходит в несколько этапов по мере продвижения вирусной популяции к актуальным органам-мишеням, по типу прохождения через «бутылочное горлышко»; селективным фактором является меняющийся рецепторный пейзаж клеточного окружения;

-результатом такой микроэволюции *in vivo* является

накопление в тканевой жидкости, кровеносном русле и спинномозговой жидкости больного мутантов, обладающих высоким патогенным потенциалом, однако они не включаются в эпидемический процесс, так как не выделяются во внешнюю среду естественным путем.

Патогенный штамм остается «запертым» внутри организма хозяина и в дальнейшем элиминируется при участии вируснейтрализующих антител, а из кишечника больного еще некоторое время продолжается выделение исходного слабовирулентного штамма, не опасного для окружающих. Исходя из вышеизложенного, первичными факторами передачи эпидемических штаммов энтеровирусов, по нашему мнению, следует считать кровь и спинномозговую жидкость больного. Заражению могут подвергаться медицинские работники, контактирующие с соответствующим биологическим материалом больного, а также с секционным материалом во время вскрытия, в случае несоблюдения или нарушения правил работы. Кроме этого, вирулентный штамм может попасть в сточные воды из секционных залов патологоанатомических отделений. Дальнейшее распространение вируса в человеческой популяции происходит по классической цепи передачи инфекции с участием фекально-орального и аэрогенного механизмов. Размножаясь в клетках эпителия входных ворот, вирулентный штамм подвергается селекции, но теперь уже в «обратную сторону», постепенно утрачивая мутации, связанные с патогенностью и

восстанавливая исходный низкий патогенный потенциал.

Экспериментальная проверка данной гипотезы представляет серьезную проблему ввиду отсутствия адекватной биологической модели. Однако в подтверждение небезосновательности подобного подхода к трактовке эволюции энтеровирусных инфекций можно привести два бесспорных аргумента:

- на единственном из сохранившихся древних изображений человека с последствиями перенесенного полиомиелита запечатлен египтянин Рума, жрец храма богини Астарты, живший 5,5 тысяч лет назад. В профессиональные обязанности жрецов, как известно, входило вскрытие и бальзамирование тел усопших;

- начало истории эпидемий полиомиелита по времени и месту (Европа второй половины XIX века) совпадает с периодом бурного развития патологической анатомии. О том, что патологоанатомы часто подвергаются риску инфицирования, свидетельствуют, к примеру, данные о повышенной заболеваемости туберкулезом в этой группе медицинских работников.

Вирусологическая наука продолжает быстро развиваться, однако как показывает исторический опыт, прогнозировать ее достижения чрезвычайно сложно. Достаточно вспомнить, что на протяжении полувека после открытия вирусов не удавалось изготовить эффективные противовирусные вакцины. Еще одним примером может служить выдержка из выступления

ведущего вирусолога СССР, академика В.М.Жданова на заседании Президиума РАН в 1952 году, где он, в частности, сказал: «... В настоящее время у нас есть хорошие гриппозные вакцины, позволяющие покончить с этой инфекцией в течение ближайших 5 лет. Что же касается полиомиелита, то на решение этой проблемы могут уйти десятилетия.» Все получилось с точностью до наоборот. Еще одно курьезное заявление было сделано Президентом РАН, ученым-ядерщиком, академиком А.П.Александровым в 1973 году: «Вакцину, сделанную руками советских ученых, можно назвать водородной бомбой против гриппа». Вирусы гриппа продолжают эволюционировать, алармистские настроения, которые время от времени поднимаются в средствах массовой информации, будоражат общественность, однако прогнозы развития ситуации с этой инфекцией серьезными учеными делаются весьма осторожно.

С полиомиелитом, казалось бы, все обстояло более-менее благополучно, однако достижение конечной цели – глобальной ликвидации этой инфекции, которая казалась такой близкой, отодвинулось на неопределенное время. Тому пример – беспрецедентная вспышка полиомиелита 2010 года в Таджикистане, отголоски которой докатились до нескольких городов России, в том числе и до Екатеринбурга.

Несмотря на то, что с момента открытия полиовирусов Карлом Ландштейнером прошло уже более 100 лет и их структура известна с точностью до отдельных атомов, многие

из наиболее существенных вопросов эпидемиологии и патогенеза полиомиелита, впрочем, также как и других энтеровирусных инфекций, до настоящего времени остаются невыясненными. Вот только некоторые из них, самые простые и очевидные:

- в каких клетках кишечника размножается вирус?

- каковы механизмы его проникновения через гемато-энцефалический барьер?

- почему образования головного мозга, в которых отсутствует гемато-энцефалический барьер, редко поражаются вирусом?

- почему полиовирусы, в отличие от других нейротропных вирусов, поражают, преимущественно, мотонейроны нижних отделов спинного мозга?

- почему в подавляющем большинстве случаев инфекция клеток ЦНС носит abortивный характер, затрагивая один или несколько сегментов спинного мозга?

Существование такой брешы в знаниях об инфекции, которую собираются ликвидировать в масштабе земного шара, кажется парадоксальным, однако это факт, и тому есть свои причины: резкое падение интереса к изучению полиовирусной инфекции было связано со сменой приоритетов и по времени совпало с открытием возбудителя новой инфекции – вируса иммунодефицита человека.

История изучения ВИЧ-инфекции началась в 1981 году, однако, несмотря на колоссальные затраты и усилия ученых

всего мира, проблема создания эффективной вакцины против «чумы XX века» перекочевала в третье тысячелетие.

Таким же «крепким орешком» оказался вирус гепатита С. Высокий уровень изменчивости этого возбудителя позволяет ему «уходить» от иммунного ответа, что делает чрезвычайно сложной задачу создания эффективной вакцины. В качестве противоположного примера можно привести историю создания генно-инженерной вакцины против гепатита В. Для выработки прочного иммунитета оказалось достаточным введения в организм очищенного поверхностного вирусного белка – Hbs-антигена. Получение этого белка в чистом виде с помощью генной инженерии было относительно легкой технологической задачей.

Приведенные примеры показывают, что современный уровень развития вирусологии позволяет успешно решать только относительно простые задачи, используя принципы профилактики, заложенные основоположниками учения об инфекции и иммунитете. Не вызывает сомнения огромный прогресс в развитии методической базы, технического оснащения вирусологических исследований. При этом по-прежнему ощущается острая нехватка фундаментальных знаний, формирующих базу для новых достижений в области борьбы с вирусными заболеваниями.

Приращению этих знаний посвящена работа научно-педагогического коллектива кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, которая в этом году будет

отмечать свой 80-летний Юбилей. Мы бережно храним память о наших учителях, возглавлявших кафедру, которые внесли немалый вклад в развитие микробиологической науки и совершенствование учебного процесса, таких как Леопольд Генрихович Перетц, Николай Васильевич Крупин, Евгения Николаевна Рысакова. Однако заслуга создания научной школы бесспорно принадлежит профессору Зинаиде Николаевне Кондрашовой, руководившей кафедрой с 1979 по 1999 год. В этот период вокруг Зинаиды Николаевны сформировался творческий коллектив преподавателей, молодых ученых. В числе ее учеников 15 кандидатов и два доктора наук; кафедра вышла на качественно новый уровень научной работы и преподавания дисциплины. Зинаида Николаевна до настоящего времени продолжает оставаться научным руководителем Школы, поддерживает в коллективе теплоту человеческих отношений, приверженность высоким нравственным идеалам, всегда готова помочь мудрым советом. Преемственность поколений по-прежнему остается доброй традицией кафедры, продолжается работа по подготовке квалифицированных научно-педагогических кадров. Под моим руководством защищено 5 кандидатских диссертаций, в настоящее время выполняются три диссертации: две кандидатские (Резайкин А.В., Устюжанин А.В.) и одна докторская (доцент Ворошилина Е.С.).

В последние годы произошло существенное улучшение материально-технического оснащения учебного процесса,

коллектив кафедры активно занимается работой по совершенствованию методического обеспечения, внедрению новых технологий в процесс обучения студентов.

Развитие научных направлений кафедры было бы невозможно без постоянной поддержки руководства академии. Исследования, проводимые в Лаборатории молекулярной диагностики, оснащенной современной аппаратурой, позволяют идти в ногу с последними достижениями мировой науки. За последние 5 лет в реферируемых отечественных и зарубежных изданиях сотрудниками кафедры было опубликовано 18 научных работ, получено два патента на изобретения, в соавторстве с учеными Уральского НИИ дерматовенерологии и иммунопатологии издана монография.

В настоящее время сфера научного поиска не ограничивается инфекционной патологией. В лаборатории освоены новейшие методики, позволяющие определять у пациентов генетические полиморфизмы, ассоциированные с риском развития тромбофилии, артериальной гипертензии, нарушениями фолатного цикла и др. Это расширяет перспективы сотрудничества кафедры с клиницистами разных специальностей – неврологами, акушерами, кардиологами, хирургами.

Большое внимание на кафедре уделяется научной работе студентов, активно работает научный кружок, члены которого ежегодно становятся лауреатами конкурса работ НОМУС УГМА и других ВУЗов России.

С 2007 года на базе Лаборатории молекулярной диагностики было выполнено 5 и в настоящее время продолжается выполнение 5 студенческих научно-исследовательских работ по грантам «Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» в рамках Федеральной программы «УМНИК».

Творческая атмосфера научного поиска, заложенная профессором Зинаидой Николаевной Кондрашовой, продолжает привлекать к работе в нашем научном кружке самых талантливых и активных студентов академии. В подтверждение своих слов приведу один факт: в течение последних 15 лет Совет НОМУС поочередно возглавляют старосты научного кружка кафедры - Роман Иванов, Александр Виноградов, Александр Устюжанин.

В заключении разрешите еще раз поблагодарить руководство УГМА, руководителей НОМУС за предоставленную возможность выступить с Актовой речью перед уважаемым собранием коллег и студентов.

**ЖЕЛАЮ ВСЕМ КРЕПКОГО ЗДОРОВЬЯ
И БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!**

ВИРУСОЛОГИЯ:
ПАРАДОКСЫ, ПРОБЛЕМЫ, РЕШЕНИЯ

Актовая речь

Подписано в печать 31.03.2011г. Формат 60 x 84/16.

Усл. печ. л. 2,0. Тираж 100 экз. Заказ № 10.

Отпечатано в ГОУ ВПО УГМА Минздравсоцразвития. г. Екатеринбург, ул. Рспина, 3.