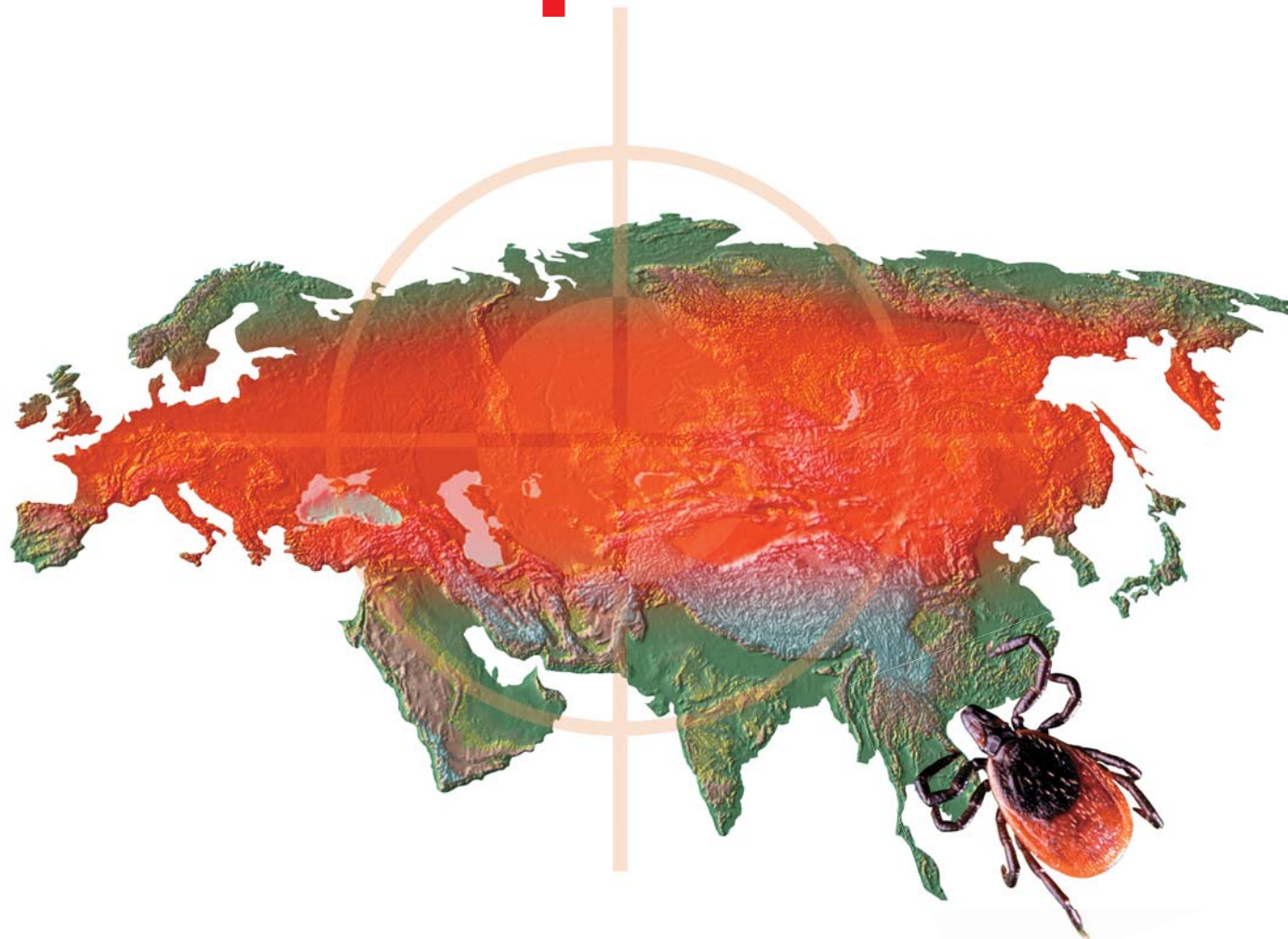


С.Е. ТКАЧЕВ

ПОД ПРИЦЕЛОМ У ЭНЦЕФАЛИТА



Столбик термометра за окном призадумался у отметки ноль, первый снег прикрыв золото бабьего лета... А с новосибирского городского сайта наконец-то исчезли сообщения отдела эпидемиологического надзора, больше всего похожие на сводки с фронта. Лето закончилось, и вместе с ним закончился и «сезон клеща». Самое время подсчитать потери: в медучреждения города и области обратилось более 19 тыс. человек, укушенных клещом, 505 человек было госпитализировано, диагноз «клещевой энцефалит» подтвержден в 116 случаях, а трое из заболевших умерли

Среди переносчиков инфекционных заболеваний человека клещи занимают второе место после комаров: на сегодня выявлено не менее трех вирусных, 22 бактериальных и несколько протозойных инфекций, которые переносятся иксодовыми клещами. Ситуация зачастую осложняется тем, что при укусах клещи способны передавать человеку одновременно разные виды бактерий, вирусов и простейших, вызывая смешанные инфекции, часто протекающие в более тяжелых формах. Дополнительный риск заражения возникает из-за возможной циркуляции патогенов в сельскохозяйственных и домашних животных (например, инфекционные агенты могут сохраняться в молочных продуктах), а также при переливаниях крови и трансплантации органов.

Наиболее опасными среди инфекций, переносимых клещами, считаются клещевой энцефалит, иксодовый клещевой боррелиоз, эрлихиоз, риккетсиоз и бабезиоз. Для России наиболее социально значимыми инфекционными агентами являются боррелии и конечно же вирус клещевого энцефалита, о котором пойдет речь ниже.

Таежная инфекция

В 30-х гг. XX в. шло интенсивное освоение Дальнего Востока: строились дороги, вырубались леса, из-за напряженных отношений с Японией в тайге дислоцировались крупные военные части. Врачи, работавшие в то время в Приморском крае, стали регулярно сообщать о неизвестной тяжелой болезни, поражающей как местных жителей, так и военных. Заболевание, считавшееся новой разновидностью тяжелого гриппа, сопровождалось резким повышением температуры и часто приводило к параличам и даже гибели заболевших.

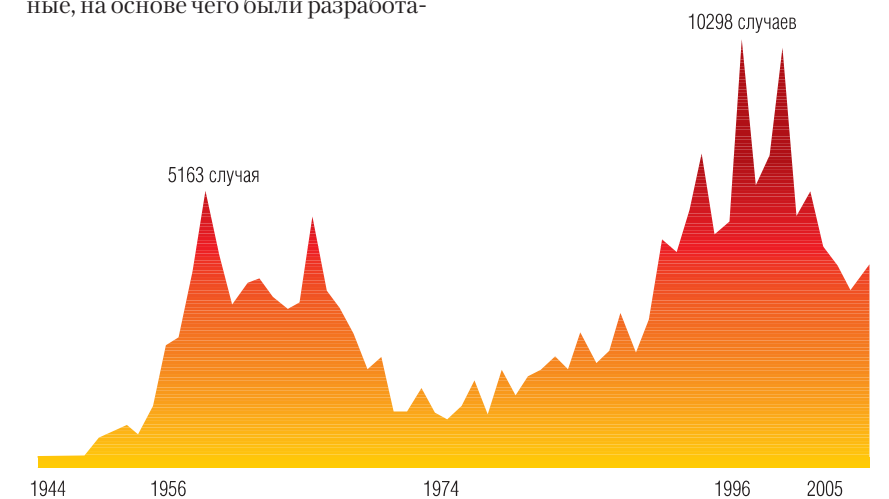
Правильно диагностировать неизвестную болезнь удалось лишь

в 1935 г. местному врачу А. Г. Панову. Заболевание оказалось воспалением мозга, т.е. *энцефалитом*, похожим по симптомам на описанный ранее японский энцефалит. В 1936 г. врачи дальневосточной пастеровской станции пытались выделить возбудителя заболевания, вводя мышам в мозг эмульсию мозга людей, погибших от энцефалита. Но, несмотря на то, что у мышей появлялись признаки заболевания, исследования не увенчались успехом.

В январе 1937 г. военные медики обратились в Наркомздрав СССР, где и было принято решение об организации на Дальний Восток научной экспедиции под руководством Л. А. Зильбера. В тяжелых полевых условиях была развернута настоящая вирусологическая лаборатория. Ученые свою задачу выполнили: патоген, вызывающий тяжелые заболевания центральной нервной системы, был успешно выделен и описан. Кроме того, была четко установлена определяющая роль иксодовых клещей в передаче инфекционного агента. Выяснилось, что источником заражения клещей служили дикие позвоночные животные, на основе чего были разработа-



ТКАЧЕВ Сергей Евгеньевич — научный сотрудник и заместитель заведующего лабораторией инфекционных заболеваний человека Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Научные интересы — молекулярная вирусология, вакцинология



В последние десятилетия в России наблюдается относительный рост заболеваемости клещевым энцефалитом (по данным В. И. Злобина, Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН)

ны рекомендации по необходимым профилактическим мерам.

К сожалению, это поистине блестящее открытие, ставшее важной вехой в истории вирусологии, не обошлось без жертв среди самих участников научной экспедиции. Так, М. П. Чумаков — будущий академик и создатель Института по изучению полиомиелита — перенес тяжелейшую форму инфекции, перешедшую у него в хроническую пожизненную форму; последствием заболевания у В. Д. Соловьева стала шестимесячная слепота.

Опасный сосед

Что на сегодня известно о *вирусе клещевого энцефалита* (ВКЭ)? Вирус относится к достаточно старому в эволюционном плане семейству *флавивирусов* (Flaviviridae), включающему более 70 вирусов животных и человека, в том числе такие опасные, как вирус желтой

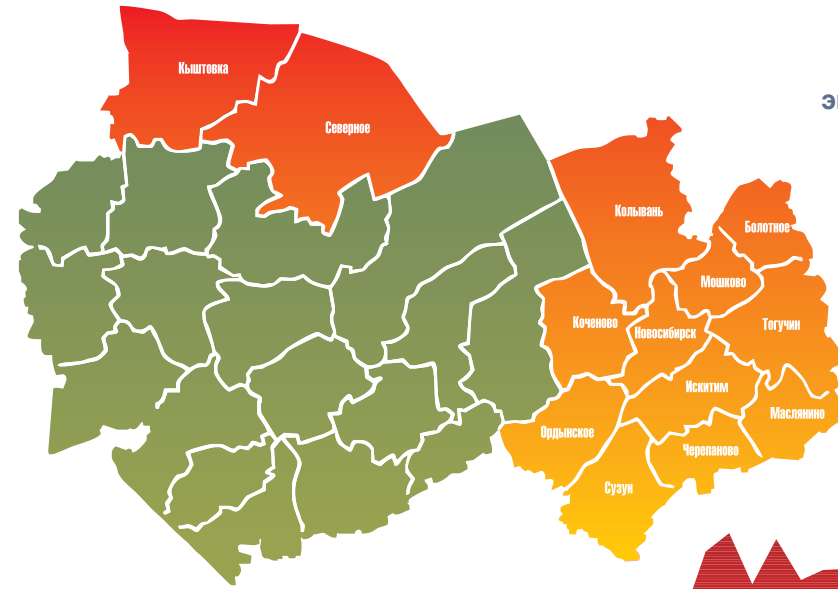
лихорадки, японского энцефалита, вирус лихорадки Денге и вирус гепатита С.

Основным природным резервуаром ВКЭ служат мелкие млекопитающие (полевки, мыши, насекомоядные). Вирус способен заражать животных и размножаться в их организме, однако заболевание протекает у них зачастую без видимого вреда для здоровья. Переносчиками вируса являются клещи, питающиеся кровью лесных зверьков, — европейский лесной клещ, таежный, луговой клещи, а также ряд других, более редко встречающихся видов. ВКЭ может размножаться и в их организме. Точно не известно, был ли вирус первоначально связан только с клещами, или только с позвоночными животными, но в процессе эволюции он приспособился к существованию в организмах как тех, так и других.

В настоящее время вирус клещевого энцефалита встречается в лес-

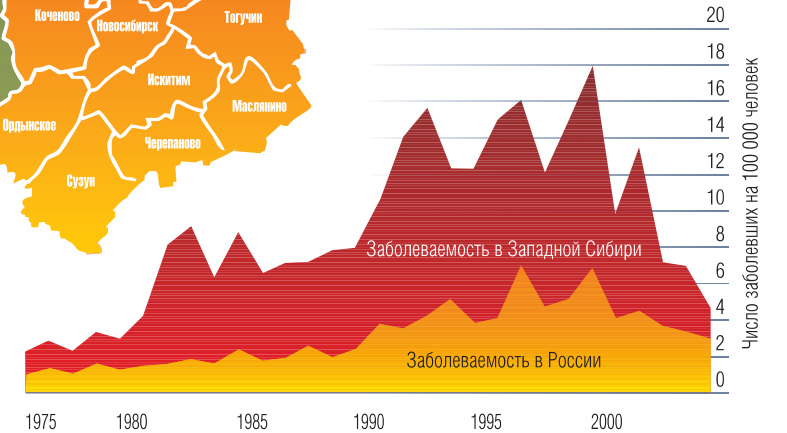
ных регионах по всей территории Евразии от Атлантического океана до Тихого, причем в целом область его распространения совпадает с ареалами европейского лесного и таежного клещей. В последние десятилетия ареал ВКЭ неуклонно расширяется, что связано с усилением хозяйственной деятельности человека. Так, заброшенные лесные вырубki зарастают мелкими кустарниками и заболачиваются, что создает идеальные условия для обитания мелких млекопитающих и связанных с ними клещей.

Кроме того, все большее число людей предпочитает проводить свободное время на природе, отдыхая или работая на приусадебных участках. В той же Новосибирской области около 75% населения проживает на территории, условия которой благоприятны для жизни клещей, здесь же сосредоточена и основная масса летних оздорови-



Районы Новосибирской области, эпидемиологически неблагоприятные по клещевому энцефалиту

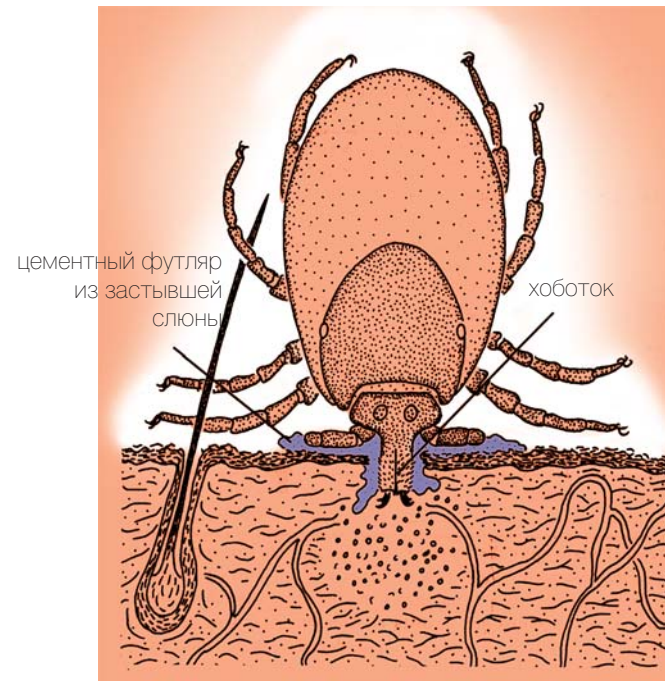
В Сибирь вирус клещевого энцефалита мог попасть с Дальнего Востока; не исключено также, что природные очаги заболевания существовали здесь задолго до появления человека



Лев Александрович ЗИЛЬБЕР (1894—1966) — один из основоположников медицинской науки в СССР. С его именем связаны фундаментальные исследования изменчивости у бактерий и природы иммунитета, организация первых в стране вирусологических центров, создание и экспериментальная разработка вирусно-генетической теории происхождения опухолей, а также совершенно нового направления — иммунологии рака.

За работу по выявлению возбудителя и переносчика весенне-летнего энцефалита в 1937 г. был награжден премией Наркомздрава СССР, но в том же году арестован по ложному обвинению, что экспедиция, которую возглавлял Зильбер, тайно распространяла японский энцефалит на Дальнем Востоке, и освобожден лишь через полтора года. В короткий промежуток времени между освобождением и новым арестом работал над монографией об эпидемических энцефалитах, подготовил несколько статей.

В 1940 г. Зильбер опять арестован и обвинен в измене, шпионаже, вредительстве и осужден на 10 лет. Был освобожден в 1944 г. в результате ходатайства за него друзей и видных ученых, а в 1945 г. избран действительным членом АМН СССР. Несмотря на то, что почти всю войну Зильбер провел в заключении, после войны он был награжден медалью «За доблестный труд в Великой Отечественной войне 1941—1945 гг.». И эту медаль он действительно заслужил, поскольку в лагере спас тысячи жизней врачеванием, избавлением от общих работ, словом участия и поддержки.



Присосавшийся иксодовый клещ напоминает хорошо отлаженный насос: в минуту он делает от 2 до 60 актов всасывания, строго разделенных актами впрыскивания слюны. Слева — взрослая самка иксодового клеща, питающаяся на лошади (по Estrada-Pena et al., 2004). Справа — «портрет» объекта вирусологических исследований, таежного клеща *Ixodes persulcatus*. Сканирующий электронный микроскоп. Фото автора



А.Г. Плетнев (крайний слева) — руководитель группы «расшифровщиков» генома вируса клещевого энцефалита

Белок С образует нуклеокапсид, содержащий геномную РНК вириона, а его оболочка состоит из липидного слоя мембран эндоплазматической сети хозяйских клеток, захваченного вирусом при размножении, и двух вирусных белков — М и Е

В Институте химической биологии и фундаментальной медицины были исследованы 95 штаммов вируса клещевого энцефалита из коллекции Института систематики и экологии животных СО РАН, выделенных от взрослых особей таежного клеща, собранных с растительности в восточной части Новосибирской области в 1980—2001 гг.

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Е, кодирующего белок оболочки вируса, показал, что все штаммы соответствуют сибирскому генетическому типу.

С другой стороны, в крови людей, госпитализированных с подозрением на клещевые инфекции, в совместных исследованиях с новосибирскими медиками были обнаружены изоляты ВКЭ, относящиеся к дальневосточному генетическому типу.

Ранее считалось, что этот тип вызывает только тяжелые формы заболевания, тогда как сибирский — преимущественно хронические. Наши исследования, подтвержденные данными других авторов, показали, что вирус дальневосточного генетического типа способен вызывать различные формы клещевого энцефалита, начиная от самых тяжелых и заканчивая стертыми, никак не проявляющимися.

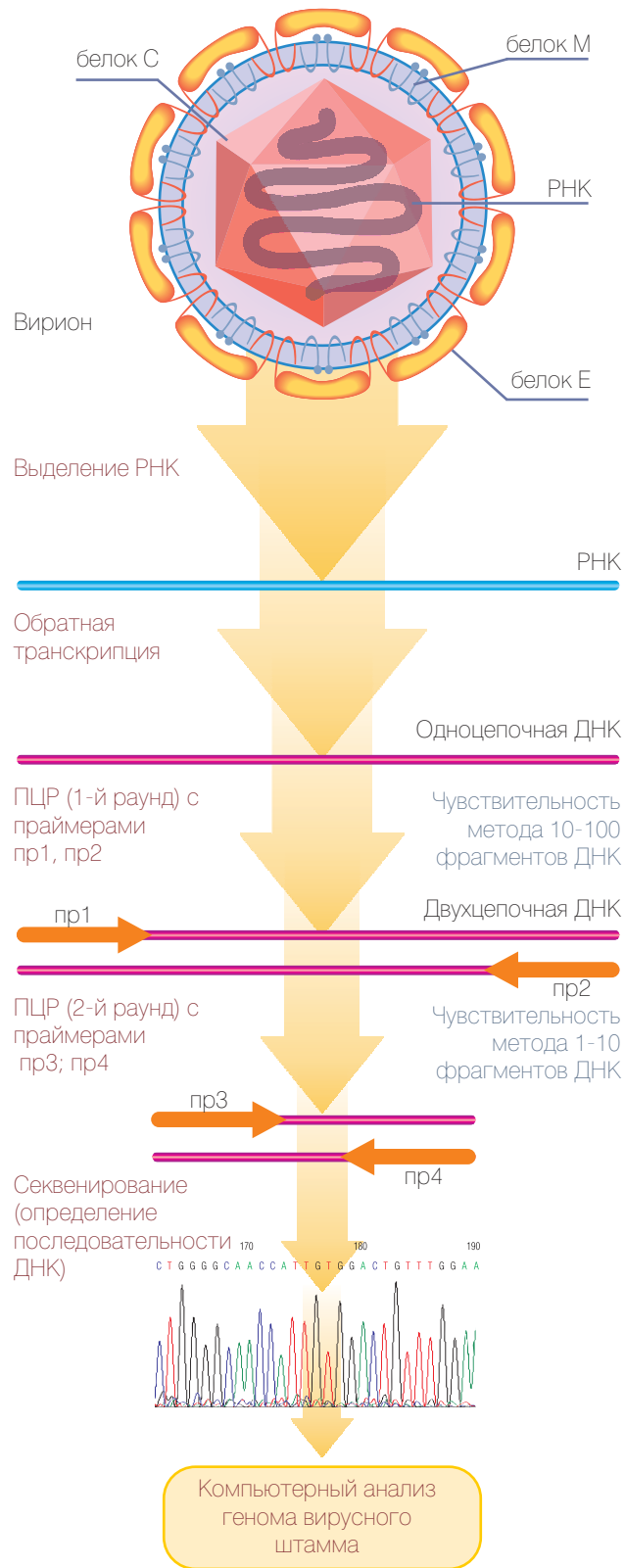
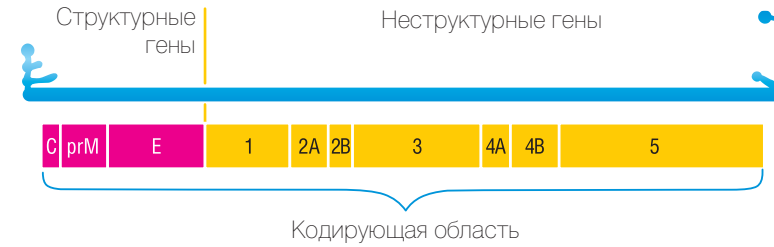


Схема молекулярно-генетических исследований вируса клещевого энцефалита



тельных учреждений, зон массового отдыха, садово-дачных участков.

Геном вируса клещевого энцефалита был расшифрован в 1989—1990 гг. практически одновременно в нашей стране (в том числе и в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Pletnev et al., 1990)) и за рубежом (Mandl et al., 1989). На сегодня выделено три генетических типа вируса, различающихся по своим свойствам: дальневосточный, сибирский и западноевропейский. Такая привязка генетического типа к географическому местоположению достаточно условна, поскольку в одном регионе могут встречаться штаммы, относящиеся к разным типам.

Для вируса клещевого энцефалита, как и для большинства других вирусных инфекций, не существует высокоспецифических методов лечения — в этом заключается его опасность. Лечение всех вирусных заболеваний направлено в основном на стимуляцию иммунитета и устранение внешних симптомов заболевания, а дальше организм должен сам справиться с инфекцией. ВКЭ опасен еще и тем, что способен вызывать хронические формы заболевания, а его последствиями могут

быть параличи и инвалидность. Поэтому важнейшим делом в исследовании этого инфекционного агента является разработка методов диагностики и профилактики заболевания.

Диагностика и профилактика

В клинической диагностике вируса клещевого энцефалита наиболее распространены *серологические методы*, с помощью которых в крови пациента определяют наличие антител, специфических защитных белков, или наличие самого агента. Однако чувствительность этих методов не слишком высока, к тому же существует вероятность ошибки из-за возможных перекрестных реакций с другими патогенами. Кроме того, с их помощью невозможно получить подробную характеристику самого возбудителя (например, определить его генетический тип).

Молекулярно-генетические методы, направленные на специфическое распознавание генетического материала вируса, обладают более высокой чувствительностью. Особенно это относится к методу *полимеразной цепной реакции*** (ПЦР), благодаря которой можно размножить, а потом идентифицировать ничтожное количество наследственного материала вируса, что позволяет провести диагностику в течение первых дней после заражения. Однако при некоторых обстоятельствах достоинства могут переходить в недостатки: генодиагностика ВКЭ молекулярно-генетическими мето-

Геном вируса — одноцепочечная линейная молекула РНК* с короткими некодирующими областями на концах. Кодированная область содержит гены структурных белков, входящих в состав самих вирусных частиц, а также белков, необходимых для размножения вируса в клетках хозяина

дами благодаря высокой чувствительности может также приводить к ошибкам, обусловленным многочисленными новыми мутациями вирусных геномов, а кроме того, предъявляет высокие требования к чистоте экспериментов.

Важнейшей мерой профилактики клещевых энцефалитов сегодня является иммунизация соответствующими вакцинами. Наиболее популярны вакцины против флавивирусных инфекций — инактивированные (убитые) вакцины, получаемые на основе культур клеток, зараженных вирусом, а затем обработанных специальными химическими соединениями. Таким способом в конце 1970-х гг. была получена очищенная вакцина против ВКЭ, получившая широкое распространение в странах Европы и Азии. В целях профилактики клещевого энцефалита применяется также вакцина на основе его химически инактивированного «родственника» — вируса японского энцефалита.

Подобные инактивированные вирусы и очищенные вирусные белки более безопасны по сравнению с другой группой вакцин, так называемых «живых», созданных на основе ослабленных вирусных штаммов. Однако действие последних часто бывает более эффективным, так как химическая инактивация инфекционных агентов может приводить к частичному нарушению структуры вирусных белков, которые должны вызывать развитие защитного иммунитета.

* О строении и свойствах РНК читайте в журнале «НАУКА из первых рук», № 2, 2004.

**О методе ПЦР читайте в журнале «НАУКА из первых рук», № 1, 2006.

Живые вакцины

Живые вакцины — способ стимуляции иммунитета введением в организм ослабленных вирусов, открытый еще в 1796 г. английским врачом Э. Дженнером. С тех пор была получена живая вакцина против вируса желтой лихорадки, отличающаяся от высокопатогенных штаммов многочисленными заменами нуклеотидов в геноме; продолжают поиски ослабленных штаммов флавивирусов Денге, Западного Нила и Лангат для разработки на их основе живых вакцин.

Были предприняты попытки создания живой вакцины и против вируса клещевого энцефалита. В 1957 г. в качестве такой живой вакцины было решено использовать ослабленный штамм флавивируса *Лангат*, вызывающий в организме выработку антител, подобных антителам к ВКЭ. Однако выяснилось, что при внутримозговом введении этот штамм сам становится патогенным и вызывает энцефалиты и атрофию участков мозга без внешних клинических проявлений. В дальнейшем были обнаружены ослабленные штаммы самого ВКЭ, но, к сожалению, все они оказались генетически нестабильными.

Вот трагический пример использования живых вакцин против ВКЭ. В 1969 г. от больного, у которого после укуса клеща в течение 4 лет не было клинических проявлений заболевания, но в крови сохранялись высокие титры антител, был выделен ослабленный штамм вируса клещевого энцефалита. Лабораторные исследования выявили его низкую нейровирулентность, после чего были проведены клинические испытания на добровольцах, давшие положительные результаты. В конечном счете ослабленным штаммом ВКЭ было иммунизировано около 650 тыс. человек. Однако 35 вакцинированных получили тяжелые осложнения в виде менингитов и менингоэнцефалитов, причем у 22 из них тяжелые последствия заболевания остались на всю жизнь, а один человек умер. Использование этого штамма в качестве живой вакцины было прекращено (Timofeev, Karganova, 2003).

ДНК-копии

Ослабленные штаммы вирусов раньше получали путем отбора после длительного культивирования, сейчас же широкое распространение получил метод так называемого *сайт-направленного мутагенеза*.

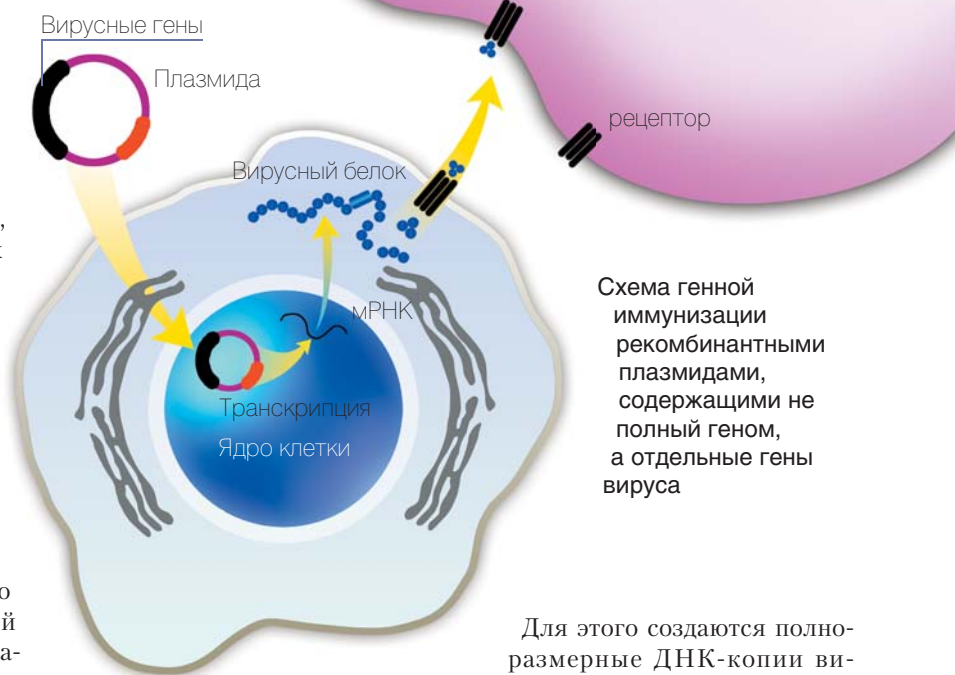


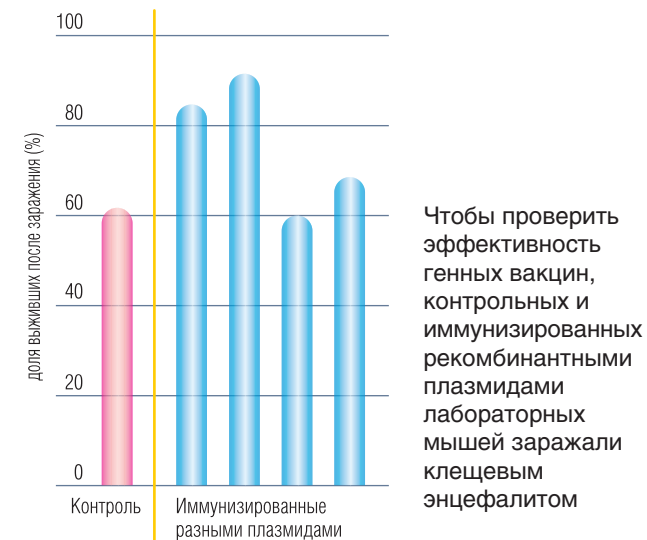
Схема генной иммунизации рекомбинантными плазмидами, содержащими не полный геном, а отдельные гены вируса

Для этого создаются полно-размерные ДНК-копии вирусных РНК-геномов, в которые методами генной инженерии вводятся определенные мутации. Такая ДНК затем служит матрицей для синтеза соответствующей вирусной РНК в «пробирке». Вводя такие рекомбинантные РНК в клетки, можно получить в результате ослабленные вирусы с заданными свойствами.

С помощью подобных манипуляций были созданы живые химерные вакцины, содержащие, например, часть генов вируса желтой лихорадки и часть генов других флавивирусов. При этом в функционально важные участки их геномов были введены точечные мутации, вызывающие ослабление патогенности (Pletnev et al., 2006).

Тем не менее в настоящее время применение ослабленных живых вакцин, в том числе и против ВКЭ, ограничено, поскольку существует вероятность превращения ослабленных штаммов в высокопатогенные штаммы дикого типа. Это происходит потому, что в клетке-хозяине отсутствуют системы коррекции мутаций, которые могут возникнуть в вирусной РНК. Гарантией безопасности таких вакцин могла бы служить утрата больших фрагментов вирусных геномов, однако это приводит к значительному снижению жизнеспособности самих вирусов-мутантов.

Нужно отметить, что исследования флавивирусов, как и многих других патогенов, осложняются их высокой инфекционностью, следствием которой являются строгие требования безопасности, а также дороговизной самих вирусных препаратов. И в этом смысле использование неинфекционных ДНК-копий генома ВКЭ



Чтобы проверить эффективность генных вакцин, контрольных и иммунизированных рекомбинантными плазмидами лабораторных мышей заражали клещевым энцефалитом

является очень перспективным направлением.

В ИХБФМ был получен ряд генно-инженерных ДНК, содержащих в том числе и полноразмерную ДНК-копию генома вируса клещевого энцефалита (Dobrikova et al., 1996). Конструирование подобных стабильных ДНК-копий вирусных геномов открывает широкие возможности для исследования хода размножения вируса в клетках, изучения функций отдельных вирусных белков и их комплексов.

Иммунизация генами

В 1993 г. появился новый подход к профилактике инфекционных заболеваний — *генная иммунизация*, основанная на прямом введении в организм генно-инженерной ДНК, рекомбинантных плазмид (векторов-переносчиков), содержащих не весь геном, но отдельные гены возбудителя заболевания.

Учеными из ИХБФМ были сконструированы четыре таких плазмиды, содержащие различные гены одного из штаммов вируса клещевого энцефалита. Для оценки эффекта генной иммунизации привитых мышей заражали летальными дозами того же штамма ВКЭ. В результате оказалось, что некоторые плазмиды обладают определенным защитным эффектом.

Чтобы изучить возможные нежелательные эффекты этих вакцин, плазмиды вводили в различные клеточные культуры. В результате выяснилось, что при увеличении времени культивирования клеток до нескольких меся-

В качестве вакцин против вирусных заболеваний ученые предполагают использовать генно-инженерные плазмиды, в которые встроены отдельные гены вирусов

цев наблюдалась существенная модификация плазмид и встраивание их в хозяйский геном.

Таким образом, несмотря на положительные результаты генной вакцинации, вопрос о применении ДНК-вакцин в настоящее время остается открытым, поскольку препятствием к их использованию также является проблема безопасности. Возможно, преодолеть это препятствие удастся созданием РНК-вакцин с аналогичным принципом действия, для которых не существует риска интеграции в ДНК-геном хозяйской клетки. Но это уже задачи будущих исследований.

Как защитить себя от клещевого энцефалита? Самый простой способ был предложен в свое время еще Зильбером: «Избегать клещей!». Людям, чья профессиональная деятельность связана с длительным пребыванием в лесу, необходимо пройти вакцинацию, точно соблюдая схему иммунизации. В этом случае заболевание наступает крайне редко, к тому же, как правило, протекает в более легкой форме.

Возможно ли полностью избавиться от ВКЭ, например, уничтожив его основных переносчиков, иксодовых клещей? В свое время такая попытка была сделана с использованием печально известного ДДТ, но последствия массовой обработки лесов сильнейшим ядом были поистине ужасающими.

Уничтожить вирус клещевого энцефалита возможно, пожалуй, разве что в результате тотального уничтожения всего живого, ведь в «круговорот» ВКЭ в природе включено бесчисленное число живых организмов. Существование вируса в природе людям стоит принять как должное, но при этом продолжать разрабатывать необходимые средства защиты от своего опасного врага.