

рительное выделение общих участков в последовательностях с достаточно высоким уровнем подобия (его статистическая значимость определяется свойствами MJ) и дальнейший анализ встречаемости таких участков и их дивергенции в массиве гомологичных последовательностей позволяют избежать недочетов традиционных методов в определении возможных единиц рекомбинации. Этот алгоритм позволил выделить у разных геновариантов Пуумала сохраняющиеся чередование консервативных и переменных участков в S- и M-сегментах генома. Возможно, такая организация последовательностей типична и для большого сегмента вирусов Пуумала. Проверка этого предположения станет возможной при дальнейшем накоплении генетических последовательностей вирусов в банках данных.

Оценки сходства по выявленным консервативным участкам S-сегмента пуумалаподобных хантавирусов с различных территорий Евразии, полученные с помощью вычисления величины взаимной информации, подтверждались построением деревьев (метод ОС) для этих же участков. Это давало одну и ту же картину разделения группы последовательностей на кластеры (в отношении первичной структуры M-сегмента такая проверка применялась только для гена G2 из-за ограниченности имеющейся выборки для гена G1). Состав кластеров, отражающий внутреннее строение группы, может меняться при переходе от одного консервативного участка к другому, что свидетельствует о возможной роли рекомбинационных событий в происхождении некоторых геновариантов, как, по видимому, это имеет место в случае сибирских и некоторых европейских (Vindeln и Vranica) изолятов. Такие рекомбинационные события не всегда выявляются традиционными методами сравнения последовательностей, не учитывающими их воз-

можную гетерогенность [8, 11]. Кроме того, сравнение филогенетических профилей MJ помогает быстро выявить особенности структуры последовательностей, сохраняющиеся внутри одного кластера и отсутствующие в другом, т. е. провести сравнение 2 множеств последовательностей, что может быть важным при оценке расстояний между давно дивергировавшими группами [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Кульбак С. Теория информации и статистика. — М., 1967.
2. Цилинский Я. Я. Популяционная структура и эволюция вирусов. — М., 1988.
3. Чалей М. Б., Коротков Е. В. Информационный подход к выявлению сходства генов тРНК и их глобальная классификация // Изв. РАН. Сер. биол. — 1991. — № 6. — С. 915—927.
4. Якименко В. В., Тюлько Ж. С., Деконенко А. Е. Филогенетические отношения западно-сибирских хантавирусов генотипов Тула и Пуумала // Хантавирусы и хантавирусные инфекции. — Владивосток, 2003. — С. 161—172.
5. Dekonenko A. et al. Genetic similarity of Puumala viruses found in Finland and western Siberia and of the mitochondrial DNA of their rodent hosts suggests a common evolutionary origin. // Infect. Genet. Evol. — 2003. — Vol. 3. — P. 245—257.
6. Plusnin A. et al. Recombination in Tula hantavirus evolution: Analysis of genetic lineages from Slovakia // J. Virol. — 1999. — Vol. 73. — P. 667—675.
7. Plusnin A. et al. Molecular evolution of Puumala hantavirus // J. Virol. — 2001. — Vol. 75. — P. 11803—11810.
8. Salminen M. O. et al. Identification of Breakpoints in intergenotypic Recombinants of HIV Type 1 by Bootscanning // AIDS Res. Human Retroviruses. — 1995. — Vol. 11, N 11.
9. Steuer R. et al. The mutual information: Detecting and evaluating dependencies between variables // Bioinformatics. — 2002. — Vol. 18. — Suppl. 2.S231—S240.
10. Tulko J. S., Korotkov E. V., Phoenix D. A. MIRs are present in coding regions of human genes // DNA Sequence. — 1998. — Vol. 8. — P. 31—38.
11. Weiller G. F., Phylogenetic profiles: A graphical method for detecting genetic recombinations in homologous sequences // Mol. Biol. Evol. — 1998. — Vol. 15, N 3. — P. 326—335.

Поступила 04.10.05

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2007

УДК 615.281.8.03:616.921.51.015.8.076.7

Е. И. Бурцева, Е. С. Шевченко, И. А. Ленева, Л. Н. Меркулова, Т. А. Оскерко, О. В. Шляпникова, А. Л. Заплатников, А. М. Шустер, А. Н. Слепушкин

Чувствительность к ремантадину и арбидолу вирусов гриппа, вызвавших эпидемические подъемы заболеваемости в России в сезоне 2004—2005 гг.

НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН; Центр химии лекарственных средств — Всероссийский научно-исследовательский химико-фармацевтический институт; ЗАО "Мастерлек"; Российская медицинская академия последипломного образования Минздравсоцразвития РФ, Москва

При изучении активности арбидола к эпидемическим штаммам вирусов гриппа А и В (2002—2005 гг.) в культуре клеток МДСК показана более высокая чувствительность ИФА по сравнению с РГА. Все изученные штаммы вируса гриппа А, в том числе резистентные к ремантадину (5 мкг/мл), были чувствительны к арбидолу (10 мкг/мл). Популяция штаммов вируса гриппа В была гетерогенна по данному признаку, при этом 43% штаммов обладали меньшей чувствительностью к препарату. В период 3 эпидемических сезонов в нашей стране отмечен рост числа штаммов вируса гриппа А (H3N2), резистентных к ремантадину (от 10 до 18%). Секвенирование гена, кодирующего белок M2, выявило наличие характерной для ремантадинрезистентных штаммов аминокислотной замены серина на аспарагин в положении 31. Комбинированное использование арбидола с ремантадином увеличивало эффект подавления вирусной репродукции в культуре клеток по сравнению с эффектом, оказываемым этими же концентрациями препаратов в отдельности.

Ключевые слова: вирусы гриппа, резистентность *in vitro*, ремантадин, арбидол

The study of the activity of arbidol against epidemic influenza A and B virus strains (2002-2005) in the cultured MDCK cells showed the higher sensitivity of enzyme immunoassay than that of hemagglutination test. The influenza A virus strains tested, including those resistant to rimantadine (5 µg/ml), were sensitive to arbidol (10 µg/

ml). The population of influenza B virus strains was heterogeneous in this indicator, 43% of the strains being less sensitive to arbidol. There was an increase in the number of rimantadine-resistant influenza A(H3N2) virus strains (10–18%) in our country during 3 epidemic seasons. The sequencing analysis of protein M2-encoding gene revealed the amino acid replacement of serine by asparagine in position 31, which is characteristic of rimantadine-resistant strains. Arbidol in combination with rimantadine potentiated the effect of viral reproduction in the cultured cells, as compared with the effect produced by the same concentrations of the drugs used alone.

Key words: influenza viruses, in vitro resistance, rimantadine, arbidol

Изучение спектра специфической активности химиопрепаратов против вирусов гриппа А и В остается приоритетным направлением исследований ученых многих стран мира. К безусловным преимуществам химиотерапии и химиопрофилактики необходимо отнести практически полное отсутствие зависимости их эффективности от изменчивости вирусов гриппа, антигенный дрейф которых регистрируют достаточно часто.

В настоящее время в России наиболее широко для химиопрофилактики и терапии гриппа применяют 2 препарата — ремантадин и арбидол, отличающиеся по механизмам и спектру противовирусной активности [1, 2, 16]. Ремантадин — блокатор ионных каналов М2-белка, обладает высокой эффективностью только в отношении вирусов гриппа А. Арбидол взаимодействует с гемагглютинином вируса гриппа, увеличивая его стабильность к конформационным изменениям, индуцированным низким рН, и как следствие ингибирует процесс слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом. Арбидол эффективен в отношении вирусов гриппа А и В. Кроме того, арбидол обладает интерферониндуцирующими, иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами [1, 3].

В связи с актуальностью вопросов профилактики и лечения гриппозной инфекции, а также с возможной угрозой развития новой пандемии, предвестниками которой служат участвовавшие случаи инфицирования людей вирусами гриппа птиц А(Н5N1), значительный интерес представляет изучение чувствительности популяции циркулирующих в последние годы штаммов вирусов гриппа к ремантадину и арбидолу и эффективности их комбинированного применения.

Материалы и методы

Изоляцию вирусов гриппа А и В проводили из носоглоточных смывов больных в период эпидемического подъема заболеваемости гриппом и ОРВИ (декабрь 2004 г.—март 2005 г.) с использованием чувствительной культуры клеток MDCK в присутствии ТРСК-трипсина ("Sigma Chemical Co.", США) в концентрации 2 мкг/мл [11]. Антигенная структура штаммов определена в реакции торможения гемагглютинирующей активности по общепринятой методике с использованием специфических поликлональных сывороток к эталонным вариантам вирусов гриппа: А/Новая Каледония/20/99 (H1N1), А/Кумамото/102/02 (H3N2), В/Гонконг/330/01 и В/Шанхай/361/02.

Изучение противовирусной активности ремантадина и арбидола проводили на 96-луночных панелях со сформировавшимся монослоем клеток культуры ткани MDCK. За 2 ч до инфицирования на монослой клеток вносили арбидол (1–15 мкг/мл) и ремантадин (5 мкг/мл). Множественность заражения эпидемическими штаммами вирусов гриппа

составляла 0,1–0,0001 ТЦИД₅₀ на клетку. Панели инкубировали 24 или 48 ч при 37°C с последующим учетом результатов в реакции гемагглютинации (РГА) и/или иммуноферментном анализе (ИФА).

Постановку РГА осуществляли по методу, описанному ранее [8]. В реакции использовали 0,75% взвесь эритроцитов 0(I) группы крови человека. Оценку результатов проводили, рассчитывая инфекционные титры по методу Рида и Менча и сравнивая показатели, полученные в лунках с добавлением препаратов, с контрольными.

Постановку ИФА осуществляли после фиксирования клеток 80% ацетоном на фосфатном буфере [4]. Процент ингибирования определяли по формуле:

$$\frac{\text{ОП}_{450} \text{ опыта} - \text{ОП}_{450} \text{ клеточного контроля}}{\text{ОП}_{450} \text{ вирусного контроля} - \text{ОП}_{450} \text{ клеточного контроля}} \cdot 100\%$$

где ОП — оптическая плотность.

На основании полученных данных были построены кривые доза—ответ и по ним определена 50% минимальная ингибирующая концентрация (МИК₅₀) для препаратов в отношении каждого из изученных вирусов. Для одной точки опыта использовали 3 лунки планшета, а каждое значение представляет собой среднее арифметическое, вычисленное в 3 независимых опытах.

Определение нуклеотидных последовательностей белка М2 вирусов гриппа проводили с использованием праймеров 5'AgCAAAAgCaggTagATgTT, 5'TTCTATgTTgACAAAATgACCA, 5'AAgCaggTAGATgTTgAAAag и 5'AgTAGAAACAaggTAGTTT на автоматическом ДНК-анализаторе ("Applied Biosystems", 3130, США).

Результаты и обсуждение

Сообщения Н. Heider и соавт. в 1981 г. о выделении в 1980 г. вирусов гриппа А, циркулировавших в естественных условиях и резистентных к ремантадину, определили необходимость проведения таких исследований в рамках эпидемиологического надзора во многих странах мира, в том числе и в России.

Результаты исследований отечественных штаммов, проведенных в период 1982—1992 гг., подтвердили факт циркуляции среди людей резистентных штаммов вирусов гриппа А с характерной маркерной мутацией аспарагина в положении 31 М2-белка. При этом закономерного увеличения их количества в ходе развития эпидемий установлено не было [2]. Эти результаты согласовались с данными, полученными Т. Ziegler и соавт. [19], определившими только 0,8% резистентных к препарату эпидемических штаммов вируса гриппа А(Н3N2), циркулировавших в эти же годы в других странах мира. Авторы также показали, что изоляты в подавляющем своем большинстве имели аминокислотные

замены в положении 31 М2-белка серина на аспарагин и в редких случаях — в положении 30 М2-белка аланина на треонин [19].

Ранее авторами настоящей работы были получены данные для вирусов гриппа А(Н3N2) и А(Н1N1), циркулировавших в сезонах 2002—2003 и 2003—2004 гг. [8]. Результаты показали, что частота штаммов, резистентных к ремантадину, составила 9—14% в отношении вирусов гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2) с некоторой тенденцией к росту этого показателя для вирусов гриппа А(Н3N2).

В продолжение этих исследований определенный интерес представляли выбор метода для оценки активности арбидола, а также изучение чувствительности к ремантадину и арбидолу популяции штаммов вирусов гриппа, циркулировавших в эпидемическом сезоне 2004—2005 гг. как при раздельном, так и при комбинированном их применении.

В табл. 1 представлены результаты сравнительного изучения активности арбидола с использованием 2 методов учета результатов — РГА и ИФА. В исследование были включены 11 вирусов гриппа А, различающихся по своей чувствительности к ремантадину, и 7 штаммов вируса гриппа В.

Достоверное снижение титров инфекционной активности (по результатам РГА) в режиме инкубирования 48 ч регистрировали только в отношении А/Москва/24/03 (Н1N1) и А/Томск/27/04 (Н3N2). Результаты позволили выдвинуть предположение о низкой чувствительности данного метода при указанном режиме. Принимая во внимание полученные ранее данные о том, что через 24 ч в клетках MDCK разрушается более 50% арбидола, можно полагать, что это связано

с особенностями метаболизма арбидола в клетках MDCK [3].

В связи с этим была изучена активность арбидола после его 24-часового инкубирования с зараженными клетками. Результаты показали, что в концентрации 5 мкг/мл препарат не оказывал действия на инфекционный титр эпидемических штаммов вирусов гриппа В, в то же время в концентрации 10 мкг/мл вызывал снижение инфекционных титров на 1—2,5 lg у 6 из 11 штаммов, в концентрации 15 мкг/мл — на 0,75—2,25 lg у 8 из 10 штаммов. В целом достоверное снижение титра с использованием этого метода было выявлено у 5 из 10 эпидемических штаммов. При этом необходимо отметить более низкую чувствительность к арбидолу штаммов вирусов гриппа В текущего эпидемического сезона (2004—2005 гг.).

При изучении действия различных концентраций арбидола на экспрессию вирусных антигенов с использованием ИФА было показано, что препарат ингибировал репродукцию всех эпидемических штаммов вируса гриппа А, причем ингибирующий эффект усиливался с увеличением концентрации препарата. Из 11 изученных 3 вируса гриппа А — А/Москва/173/03 (Н3N2), А/Москва/24/03 (Н1N1) и А/Москва/42/03 (Н1N1) — имели наиболее высокую чувствительность к арбидолу, МИК₅₀ для них была одинаковой (5 мкг/мл). Штаммы А/Москва/158/03, А/Москва/22/03 и А/Москва/171/03 обладали несколько меньшей чувствительностью к арбидолу, и МИК₅₀ для них составила 7,5 мкг/мл.

Выявлено, что ремантадинрезистентные штаммы чувствительны к действию арбидола, при этом МИК₅₀ для них была несколько выше и составила 8,75—10 мкг/мл.

Таблица 1
Сравнительное изучение методов оценки противовирусной активности арбидола в клетках культуры ткани MDCK

Вирус	Концентрация арбидола, мкг/мл						
	МИК ₅₀ (ИФА)	снижение инфекционной активности вирусов в РГА (lg) в режиме					
		инкубация 24 ч			инкубация 48 ч		
		5,0	10,0	15,0	5,0	10,0	15,0
<i>Вирусы гриппа А, чувствительные к концентрации ремантадина 0,5 мкг/мл</i>							
А/Москва/22/03 (Н1N1)	7,5	н. и.	н. и.	н. и.	н. и.	н. и.	н. и.
А/Москва/24/03 (Н1N1)	5	н. и.	н. и.	н. и.	1,0	2,5	н. и.
А/Москва/42/03 (Н1N1)	5	н. и.	н. и.	н. и.	н. и.	н. и.	н. и.
А/Москва/158/03 (Н3N2)	7,5	н. и.	н. и.	н. и.	н. и.	н. и.	н. и.
А/Москва/171/03 (Н3N2)	7,5	н. и.	н. и.	н. и.	0	0	0
А/Москва/173/03 (Н3N2)	5	н. и.	н. и.	н. и.	0	0	0,5
<i>Вирусы гриппа А, нечувствительные к концентрации ремантадина 0,5 мкг/мл</i>							
А/Москва/38/03 (Н3N2)	9,0	н. и.	2,0	2,25	0	0	н. и.
А/Липецк/69/03 (Н3N2)	8,75	н. и.	2,5	2,25	0	0	н. и.
А/Омск/23/04 (Н3N2)	9,0	н. и.	0	0	0	1,0	н. и.
А/Ярославль/8/04 (Н3N2)	8,75	н. и.	1,0	2,5	0	0,5	н. и.
А/Томск/27/04 (Н3N2)	10,0	н. и.	н. и.	н. и.	3,5	3,5	3,5
<i>Вирусы гриппа В</i>							
В/Москва/1/02	8	0	1,0	2,0	0	1,5	н. и.
В/Ярославль/8/02	5	0	1,0	1,0	0,5	1,0	н. и.
В/Ярославль/12/02	6,5	0	1,0	2,0	0	1,5	н. и.
В/Москва/7/03	11,5	0	0	0	н. и.	н. и.	н. и.
В/Москва/1/04	12,5	0	0	0,75	н. и.	н. и.	н. и.
В/Москва/2/04	> 12,5	0	0	н. и.	0	0	н. и.
В/Москва/3/05	> 12,5	0	0	0,75	н. и.	н. и.	н. и.

Примечание. 0 — нет активности; н. и. — не изучали.

Изучение действия арбидола на репродукцию штаммов вируса гриппа В позволило разделить их на 3 группы, отличающиеся по чувствительности к арбидолу. МИК₅₀ для вирусов гриппа В/Ярославль/8/02, В/Ярославль/12/02 и В/Москва/1/02 были примерно одинаковы. Другая группа изученных вирусов гриппа (В/Москва/1/04 и В/Москва/7/03) характеризовалась меньшей чувствительностью к арбидолу, и МИК₅₀ для них составили 12,5 и 11,5 мкг/мл соответственно. Эпидемические штаммы вируса гриппа В/Москва/2/04 и В/Москва/3/05 отличались более слабой чувствительностью к действию арбидола, который подавлял их репродукцию только на 20 и 26% соответственно.

Таким образом, полученные результаты выявили более высокую чувствительность ИФА для оценки противовирусной активности арбидола, что определило использование данного метода при изучении чувствительности к ремантадину и арбидолу популяции вирусов гриппа, циркулировавшей в эпидемическом сезоне 2004—2005 гг., в одномоментном опыте.

Эпидемический подъем заболеваемости в сезоне 2004—2005 гг. был обусловлен активной циркуляцией вирусов гриппа А(Н3N2) и В. Из 167 вирусов гриппа, выделенных в Центре экологии и эпидемиологии гриппа НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН или поступивших туда, мы изучили чувствительность к ремантадину и арбидолу 86 эпидемических штаммов. В исследовании использовали эквимоллярные концентрации препаратов, которые составили для ремантадина 5 мкг/мл, для арбидола 10 мкг/мл.

Из 45 штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) оказались нечувствительными к ремантадину 8 (18%) штаммов, и в целом для популяции вирусов гриппа А этого сезона показатель резистентности составил 17%, что несколько больше по сравнению с итогами предыдущих 2 периодов (10—14%). У этих штаммов было проведено секвенирование гена, кодирующего М2-белок (в зависимости от штамма — от 977 до 1026 нуклеотидных последовательностей), результаты которого подтвердили наличие характерной для резистентных мутантов аминокислотной замены серина на аспарагин в положении 31.

Результаты наших исследований в определенной степени согласуются с данными других авторов, свидетельствующими о росте числа штаммов, резистентных к ремантадину в последние годы. В России этот процесс идет не такими быстрыми темпами, как в некоторых других странах мира.

В последние годы выявлено 30-кратное увеличение числа штаммов, естественно резистентных к препаратам адамантанового ряда. Изучив более 7000 изолятов, полученных из ряда стран мира, с помощью генетической и фенотипической диагностики, авторы показали, что в эпидемическом сезоне 1994—1995 гг. доля резистентных штаммов составила 0,4%, в сезоне 2003—2004 гг. — уже 12,3%, в том числе 2 из 25 российских штаммов сезона 2005 г., переданных в рамках международного сотрудничества [9]. Изучение чувствительности вирусов гриппа А, изолированных с октября 2005 г. до середины января 2006 г. в США, показало, что доля резистентных штаммов составила 91%; это стало причиной запрета применения амантадина для лечения и профилактики гриппа в стране в эпидеми-

ческом сезоне 2005—2006 гг. [10]. Кроме того, ряд авторов как *in vitro*, так и *in vivo* подтвердили передачу от человека к человеку резистентных к амантадину/ремантадину штаммов, патогенность которых сравнима с таковой чувствительных к препарату вирусов [12, 17]. В связи с участвовавшими случаями инфицирования людей вирусом гриппа птиц А(Н5N1) в странах Юго-Восточной Азии, а также его широким распространением среди диких и домашних птиц в других странах мира, в том числе в России, многие исследователи высказывают мнение о его возможной потенциальной роли в развитии новой пандемии. Показано, что с 2003 г. все штаммы А(Н5N1), выделенные от людей, и большинство выделенных от птиц были резистентными к ремантадину/амантадину [10, 14]. Необходимо отметить, что широкое использование амантадина в Китае при проведении профилактических мероприятий как среди людей, так и среди домашней птицы в сложившихся условиях повышает вероятность формирования нового пандемического варианта, исходно несущего свойства устойчивости к препарату [13].

В связи с этим вопрос расширения спектра препаратов, имеющих активность в отношении вирусов гриппа А, в том числе имеющих пандемический потенциал, а также вирусов гриппа В, приобретает наибольшую актуальность [15, 18]. Одним из таких препаратов является арбидол, эффективность которого неоднократно подтверждена в отношении эталонных вариантов вирусов гриппа А и В человека, вирусов гриппа А подтипа Н5, выделенных от людей, а также патогенных и непатогенных вирусов гриппа А подтипа Н5, выделенных от диких и домашних птиц [5—7].

Результаты изучения чувствительности эпидемических штаммов вирусов гриппа А, циркулировавших в сезоне 2004—2005 гг., представлены в табл. 2. Арбидол был активен в отношении всех изученных штаммов вируса гриппа А. Наши исследования подтверждают данные работ, выполненных ранее, в которых показано отсутствие штаммовой специфичности эталонных вирусов гриппа А человека к арбидолу [4, 5].

Таблица 2

Чувствительность к химиопрепаратам вирусов гриппа А и В, циркулировавших в эпидемическом сезоне 2004—2005 гг.

Место изоляции эпидемических штаммов	Штаммовая специфичность вирусов гриппа А к			
	ремантадину (0,5 мкг/мл)		арбидолу (10 мкг/мл)	
	А(Н1N1)	А(Н3N2)	А(Н1N1)	А(Н3N2)
Москва	н. в.	3/16	н. в.	0/16
Владимир	н. в.	0/9	н. в.	0/9
Ярославль	н. в.	0/7	н. в.	0/7
Хабаровск	0/1	0/5	0/1	0/5
Рязань	н. в.	3/3	н. в.	0/3
Екатеринбург	н. в.	2/3	н. в.	н/в
Ставрополь	0/2	н. в.	0/2	н. в.
Новгород Великий	н. в.	0/1	н. в.	0/1
Ростов-на-Дону	н. в.	0/1	н. в.	0/1
Итого...	0/3	8/45 (18)	н. в.	0/45

Примечание. Числитель — число резистентных штаммов, знаменатель — число исследованных штаммов, н. в. — не выделены. В скобках — процент.

Популяция вирусов гриппа В была представлена 2 эталонными вариантами, причем наибольшая эпидемическая активность отмечена в отношении штаммов, подобных В/Шанхай/361/02 (38 из 40 вирусов). Оба изученных вируса гриппа В, подобные В/Гонконг/330/01, были чувствительны к арбидолу, в то же время активность репродукции 17 из 38 эпидемических штаммов, подобных В/Шанхай/361/02, снижалась в присутствии арбидола менее чем на 50%, в целом показатель составил 43%. Таким образом, можно предположить существование штаммовой специфичности чувствительности вирусов гриппа В к арбидолу. Вероятно, для достижения большего ингибирующего эффекта требуется увеличение концентрации арбидола, однако это представляет трудности в опытах *in vitro* из-за сравнительно низкого химиотерапевтического индекса арбидола в культуре клеток MDCK.

Определенный интерес представляло изучение комбинированных схем применения ремантадина и арбидола, обладающих различным механизмом действия и направленных на разные мишени-белки в цикле вирусной репродукции. В работе Леневой и соавт. [5] показано, что комбинированное использование арбидола и ремантадина увеличивало эффект подавления вирусной репродукции вируса гриппа А/Сингапур/1/57 (H2N2) в клетках культуры ткани MDCK по сравнению с эффектом, оказываемым этими же концентрациями препаратов в отдельности. При этом наибольшее усиление ингибирующего эффекта было получено при использовании низких доз препаратов (5 мкг/мл арбидола и 0,3 мкг/мл ремантадина).

На примере 4 штаммов, чувствительных к обоим препаратам, и 2 штаммов, резистентных к ремантадину (5 мкг/мл) и чувствительных к арбидолу (в концентрации 10 мкг/мл ингибирование арбидолом составляло 93—96%), проведено изучение эффективности схем комбинированного их применения (табл. 3). В исследовании были использованы следующие концентрации: арбидол — 0,5, 1, 2,5 и 5 мкг/мл; ремантадина — 0,001, 0,005 и 0,01 мкг/мл. В табл. 3 представлены результаты испытания тех

концентраций препаратов, в отношении которых получен максимальный эффект. Полученные результаты подтвердили эффективность комбинированного применения 2 препаратов. При этом наиболее выраженный ингибирующий эффект был получен в отношении чувствительных к ремантадину штаммов (снижение репродукции вирусов на 16—21%) по сравнению с резистентными мутантами (6—7%).

Таким образом, результаты сравнительной оценки изучения активности арбидола выявили более высокую чувствительность ИФА по сравнению с РГА, а также целесообразность инкубирования инфицированных культур с добавлением препарата не более 24 ч.

Данные изучения противовирусной активности арбидола показали отсутствие штаммовой специфичности этого препарата в отношении вирусов гриппа А. Все изученные штаммы вирусов гриппа А, в том числе резистентные к ремантадину, были чувствительны к препарату в концентрации, не превышающей 10 мкг/мл. В то же время чувствительность вирусов гриппа В к арбидолу различалась, при этом 43% штаммов обладали меньшей чувствительностью к данному препарату при выбранной концентрации.

В России в период 3 эпидемических сезонов отмечен рост (от 10 до 18%) числа штаммов вирусов гриппа А(H3N2), резистентных к ремантадину, что в определенной степени отражает тенденции последних лет, которые наблюдаются в других странах мира (Юго-Восточная Азия, США и Канада), где доля резистентных к ремантадину штаммов составляет 61—91%.

В популяции циркулировавших эпидемических штаммов не выявлено вирусов, изначально резистентных к арбидолу, что значительно повышает ценность его применения для лечения и профилактики гриппа в условиях современного эпидемического процесса.

Полученные данные еще раз подтвердили, что комбинированное использование арбидола с ремантадином увеличивает эффект подавления вирусной репродукции в культуре клеток по сравнению с эффектом, оказываемым этими же концентрациями препаратов в отдельности. Это может способствовать снижению лечебных дозировок препаратов, а значит, токсичности и частоты побочных эффектов ремантадина, а также риска формирования резистентных мутантов.

В заключение необходимо еще раз отметить, что возобновление и расширение в нашей стране исследований, направленных на изучение чувствительности циркулирующих штаммов вирусов гриппа к химиопрепаратам, имеют важное значение для ограничения ущерба в период эпидемических подъемов заболеваемости, а также для осуществления мероприятий по подготовке к возможному появлению и распространению нового пандемического варианта вируса гриппа А.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ФГУЗ "Центров гигиены и эпидемиологии" Липецка, Ярославля, Владимира, Екатеринбургa, Ставрополя, Хабаровска, Новгорода Великого, Ростова-на-Дону, Омска, Томска, Рязани, Твери, Калининграда за сотрудничество и предоставление эпидемических штаммов, циркулировавших на этих тер-

Таблица 3
Ингибирующее действие ремантадина и арбидола при раздельном и комбинированном их применении на репродукцию вирусов гриппа А(H3N2) в клетках MDCK

Вирус	Процент ингибирования вирусной репродукции в культуре клеток MDCK при концентрациях препаратов		
	арбидол	ремантадин	комбинированная схема
<i>Эпидемические штаммы вируса гриппа А(H3N2), чувствительные к ремантадину</i>			
А/Москва/6/05	25 (2,5)	40 (0,001)	56
А/Ростов-на-Дону/57/05	47 (2,5)	34 (0,001)	68
А/Ярославль/12/05	41 (5,0)	33 (0,005)	57
А/Ярославль/11/05	41 (5,0)	33 (0,005)	57
<i>Эпидемические штаммы вируса гриппа А(H3N2), резистентные к ремантадину</i>			
А/Москва/23/05	4 (2,5)	29 (0,001)	26
	13 (5,0)	15 (0,005)	22
А/Екатеринбург/1/05	4 (2,5)	0 (0,001)	0
	12 (5,0)	1 (0,005)	18

Примечание. В скобках — концентрации препаратов (в мкг/мл).

ЛИТЕРАТУРА

1. Глушков Р. Г., Фадеева Н. И., Ленева И. А. и др. Молекулярно-биологические особенности действия арбидола — нового противовирусного препарата // Хим.-фарм. журн. — 1992. — № 2. — С. 8—15.
2. Грипп: Руководство для врачей / Под ред. Г. И. Карпухина. — СПб., 2001.
3. Гуськова Т. А., Глушков Р. Г. Арбидол — иммуномодулятор, индуктор интерферона, антиоксидант. — М., 1999.
4. Ленева И. А., Фадеева Н. И., Федякина И. Т. и др. Применение иммуноферментной индикации вирусспецифических антигенов в изучении нового противовирусного препарата // Хим.-фарм. журн. — 1994. — № 9. — С. 4—15.
5. Ленева И. А., Федякина И. Т., Гуськова Т. А., Глушков Р. Г. Чувствительность различных штаммов вируса гриппа к арбидолу. Изучение эффекта арбидола на репродукцию вируса гриппа А в комбинации с различными противовирусными препаратами // Тер. арх. — 2005. — № 8. — С. 84—88.
6. Львов Д. К., Федякина И. Т., Щелканов М. Ю. и др. Действие *in vitro* противовирусных препаратов на репродукцию высокопатогенных штаммов вируса гриппа А/Н5N, вызвавших эпизоотию среди домашних птиц летом 2005 г. // Вопр. вирусол. — 2006. — № 2. — С. 20—22.
7. Федякина И. Т., Ленева И. А., Ямникова С. С. и др. Чувствительность вирусов гриппа А/Н5, изолированных от диких птиц на территории России, к арбидолу в культуре клеток MDCK // Вопр. вирусол. — 2005. — № 6. — С. 22—25.
8. Шевченко Е. С., Бурцева Е. И., Слепушкин А. Н. Спектр чувствительности к ремантадину вирусов гриппа А, циркулировавших в эпидемических сезонах 2002—2004 гг. // Вопр. вирусол. — 2005. — № 5. — С. 32—35.
9. Bright R. A., Medina M., Xu X. et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A(H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause to concern // Published Online. — 2005. — September 22.
10. CDC/WHO Avian Influenza Response Team. Outbreaks of avian influenza A(H5N1) in Asia and interim recommendations for evaluation and reporting of suspected cases — United States // Morbid. Mortal. Wkly Rep. — 2004. — Vol. 53. — P. 97—100.
11. Davies H. W., Appleyard G., Cunningham P., Pereira M. S. The use of continuous cell line for the isolation of influenza virus // Bull. Wld Hlth Org. — 1978. — Vol. 56. — P. 1991—1993.
12. Hayden F. G., Belshe R. B., Clover R. D. et al. Emergence and apparent transmission of Rimantadine-resistant influenza A virus in families // N. Engl. J. Med. — 1989. — Vol. 321. — P. 1696—1702.
13. Hayden F. G. Perspectives on antiviral use during pandemic influenza // Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B. — 2001. — Vol. 359. — P. 1877—1884.
14. High levels of adamantane resistance among influenza A(H3N2) viruses and interim guidelines for use of antiviral agents in United States, 2005—2006 influenza season // www.cdc.gov/mmwr. — 2006. — Vol. 55 (02). — P. 44—46.
15. Kiso M., Mitamura K., Sakai-Tagawa Y. et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study // Lancet. — 2004. — Vol. 364. — P. 759—765.
16. Leneva I., Hay A. The mechanism of action of arbidol against influenza virus-selection and characterization of arbidol-resistant mutants // 12-th International Congress of Virology. — Paris, 2002. — Abstr. 1077.
17. Monto A., Arden N. Implications of viral resistance to amantadine in control of influenza A // Clin. Infect. Dis. — 1992. — Vol. 15. — P. 362—367.
18. Monto A. S. Vaccines and antiviral drugs in pandemic preparedness // Emerg. Infect. Dis. — 2006. — Vol. 12, N 1. — P. 55—60.
19. Ziegler T., Hemphill M., Ziegler M. et al. Low incidence of rimantadine resistance in field isolates of influenza A viruses // J. Infect. Dis. — 1999. — Vol. 180. — P. 935—939.

Поступила 13.04.06

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2007

УДК 578.833.29.083.2

И. Д. Макаренкова, Г. Г. Компанец, Н. Н. Беседнова, Р. А. Слонова, Т. Н. Звягинцева, Н. М. Шевченко

Скрининг биополимеров из морских гидробионтов, влияющих на адсорбцию вируса Хантаан

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН; Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток

На культуре клеток Vero E6 проведен скрининг биополимеров из морских гидробионтов и выделена группа сульфатированных полисахаридов — фукоиданов, обладающих выраженным ингибирующим действием на адсорбцию вируса Хантаан. Механизм действия сульфатированных полисахаридов, по-видимому, реализуется за счет конкурентного углеводспецифического связывания с мембранными рецепторами клеток, а также за счет лигандрецепторного взаимодействия и блокирования гликопротеинов (G-1 и G-2) хантавируса.

Ключевые слова: вирус Хантаан, клетки Vero E6, адсорбция, ингибирование, сульфатированные полисахариды

The biopolymers extracted from sea hydrocoles were screened and a group of sulfated polysaccharides - fucoidans having a pronounced inhibitory effect on the adsorption of Hantaan virus in the cultured Vero E6 cells was identified. The mechanism of action of sulfated polysaccharides was realized through competitive carbohydrate-specific binding to cell membrane receptors and through ligand-receptor interaction and blocking of Hantaan virus glycoproteins (G1 and G2).

Key words: Hantaan virus, Vero E6 cells, adsorption, inhibition, sulfated polysaccharides

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) представляет серьезную проблему для здравоохранения Российской Федерации, включая районы Дальнего Востока. Это обусловлено широким распространением природных очагов инфекции, ежегодной регистрацией тяжелых и летальных случаев заболевания и отсутствием в нашей стране специфической профилактики.

Известно, что пусковым этапом в развитии заболевания является прикрепление и проникновение вируса в клетки организма хозяина. Изучение механизма репликации вируса показало, что некоторые вещества могут действовать избирательно на вирус, не затрагивая клетку-хозяина [2]. В связи с этим актуальным является поиск новых высокоэффективных препаратов для прерывания или полного блокирования адсорбции вирусов. В этом плане