

значительно удлиняло среднее время жизни животных в опытной группе, а защита от гибели составила всего 9,7%.

Сочетанное введение препаратов защищало от гибели 52% инфицированных животных. Кроме того, введение препаратов значительно увеличивало показатель среднего времени жизни мышей, а также уровень подавления репродукции вируса в головном мозге ($\Delta = 3,2 \lg$) животных опытной группы (табл. 2) по сравнению с контрольной группой и группами мышей, которые получали только один препарат.

Выраженная защитная эффективность комбинированного применения препаратов с различным механизмом действия, возможно, связана с влиянием амиксина на многоцентровые мишени-рецепторы клеточных мембран. В результате такого воздействия, вероятно, изменяются степень сродства (аффинности) специфических рецепторов, а также их чувствительность к действию других лекарственных веществ.

Таким образом, впервые установлено, что индуктор интерферона амиксин оказывает потенцирующее действие при его применении в сверхнизких дозах в сочетании с виразолом. Раздельное использование амиксина и виразола в дозах 0,4 мкг и 10 мкг соответственно неэффективно в отношении возбудителя ГЛПС — вируса Хантаан.

Результаты изучения эффективности сочетанного применения амиксина и виразола свидетельствуют о перспективности их сочетанного использования при проведении клинических исследований в очагах ГЛПС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванис В. А., Сокотун О. А., Колесникова Н. А. и др. Клинические особенности хантавирусной инфекции в При-

морском крае // Тихооксан. мед. журн. — 1998. — № 1. — С. 46—48.

2. Логинова С. Я., Ковальчук А. В., Борисевич С. В. и др. Изучение влияния малых доз амиксина и виразола на вирусы // Достижения отечественной эпидемиологии в XX веке. Взгляд в будущее: Сборник трудов науч. конференции с международным участием, посвященной 80-летию со дня рождения академика В. Д. Белякова, 15—16 ноября 2001, г. Санкт-Петербург. — СПб., 2001. — С. 266—267.
3. Логинова С. Я., Ковальчук А. В., Борисевич С. В. и др. Изучение эффективности амиксина при экспериментальной хантавирусной инфекции // Вопр. вирусол. — 2002. — № 5. — С. 25—29.
4. Мешкова Е. Н., Менткевич Л. М. Потенцирование анти-вирусной активности человеческих интерферонов виразолом в опытах *in vitro* // Вопр. вирусол. — 1987. — № 5. — С. 570—573.
5. Ткаченко Е. А., Дзагурова Т. К., Иванов А. П., Декопченко А. Е. Хантавирусы и хантавирусные инфекции // Новые информационные технологии в медицине и экологии (дополнение): Сборник трудов IX Международной конференции и дискус. науч. клуб. Украина, Крым, Гурзуф, 6—10 октября 2001. — Запорожье, 2001. — С. 116—117.
6. Чиссов Н. П., Ершов Ф. И., Индулен М. К. Основы экспериментальной химиотерапии вирусных инфекций. — Рига, 1988.
7. Garbe C., Kreuser E., Zouboulis C. et al. Combined treatment of metastatic melanoma with interferons and cytotoxic drugs // Semin. Oncol. — 1992. — Vol. 19. — P. 63—69.
8. Huggins J. W., Hsiang C. M., Cosgriff T. M. et al. Ribavirin therapy of HFRS: overall study efficacy of high dose intravenous therapy // International Symposium HFRS, Hubei, China, Oct. 31—Nov. 2, 1988. — Hubei, 1988. — P. 79.
9. Huggins J. W., Hsiang C. M., Cosgriff T. M. Chemotherapy of HFRS // 1-st International Conference HFRS, May 4—6, 1989, Seoul, Korea. — Seoul, 1989. — P. 84.
10. Hyang Q. T. Efficacy of Chinese ribavirin and with interferon combined to treat epidemic hemorrhagic fever // International Symposium HFRS, Hubei, China, Oct. 31—Nov. 2, 1988. — Hubei, 1988. — P. 88.
11. Lee U. W., Calisher C., Schmaljohn C. Manual of hemorrhagic fever with renal syndrom and Hantavirus Pulmonary Syndrom. — Seul, 1998.

Поступила 02.06.04

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2005

УДК 615.281.8:578.832.1].076.7

И. Т. Федякина, И. А. Ленева, С. С. Ямникова, Д. К. Львов, Р. Г. Глушков, А. М. Шустер

Чувствительность вирусов гриппа А/Н5, изолированных от диких птиц на территории России, к арбидолу в культуре клеток MDCK

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского РАН, Научно-исследовательский химико-фармацевтический институт, ЗАО "Мастерлек", Москва

Изучено действие противовирусного препарата арбидола на репродукцию вирусов гриппа птиц А/Н5 в опытах *in vitro*. Штаммы изолированы от диких птиц Восточной Сибири и близкородственны вирусам 1997—2000 гг. из Юго-Восточной Азии. Препарат арбидол оказывает селективное ингибирующее действие на репродукцию этих вирусов в культуре клеток MDCK.

Ключевые слова: вирус гриппа А птиц, арбидол, вирусингибирующая активность

The effect of the antiviral drug arbidol on the reproduction of avian influenza A/H5 viruses was studied in *in vitro* experiments. The strains were isolated from the wild birds of Eastern Siberia and they were closely related to the 1997-2000 viruses from South-Eastern Asia. Arbidol was shown to exert a selective inhibiting effect on the reproduction of these viruses in the MDCK cell cultures.

Key words: avian influenza A virus, arbidol, virus-inhibiting activity

Вирусы гриппа (ВГ) А инфицируют различные виды птиц и млекопитающих, включая человека, вызывая пандемии и эпизоотии [5]. Естественными хозяевами ВГ являются различные птицы водного и околводного комплексов. ВГ характеризуются высокой гетерогенно-

стью поверхностных белков гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (НА) и представлены, согласно номенклатуре, 16 подтипами НА и 9 — НА [10]. От диких птиц изолированы вирусы со всеми известными сочетаниями поверхностных белков.

Вместе с тем, несмотря на антигенную гетерогенность ВГ, только 3 подтипа НА (Н1—Н3) и 2 — НА (N1—N2) циркулируют среди людей. Периодически отмечается инфицирование людей и других млекопитающих ВГ птиц. Вспышка заболевания гриппом среди людей в Гонконге в 1997 г. впервые показала, что преодоление межвидового барьера птица—человек может достаточно эффективно происходить в естественных условиях. Это был первый случай прямой передачи "птичьего" ВГ А/Н5N1 человеку, когда из 18 инфицированных человек 6 умерли. Передача вируса от человека к человеку не выявлена [9, 11, 16]. В октябре 2003 г. во Вьетнаме и Китае из 14 человек (13 детей и 1 взрослый), инфицированных вирусом Н5N1, 12 умерли. В 2004 г. количество инфицированных в разных странах Азии возросло. К началу 2005 г. зарегистрировано 45 случаев заболеваний "птичьим гриппом", закончившихся смертельным исходом [7].

Возникновение реассортантов между высокопатогенными вирусами птиц и эпидемическими ВГ человека представляет реальную угрозу возникновения новых пандемических вирусов. К настоящему времени нет вакцинных препаратов против данного сероварианта, поскольку приготовление стандартной вакцины на куриных эмбрионах затруднено из-за патогенности этих вирусов для эмбрионов.

Все вышесказанное определяет актуальность разработки и совершенствования тактики имеющихся апробированных противогриппозных препаратов.

Широкое применение в России для лечения и профилактики гриппа отечественного препарата арбидола, активного в отношении ВГ как А, так и В [1, 4], но отсутствие данных по изучению действия арбидола на ВГ птиц А/Н5, которые представляют в настоящее время реальную опасность, послужило основанием для изучения действия данного препарата на эти вирусы.

Материалы и методы

Вирусы и клетки. В работе использовали ВГ А/Н5N2 и А/Н5N3, изолированные от диких птиц, мигрирующих из Китая. Изоляты имеют апатогенный сайт нарезания НА и по антигенной и первичной структуре НА близкородственны вирусам, обусловившим вспышки заболевания людей и кур в странах Юго-Восточной Азии [6, 15]. Вирусы культивировали в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов. Клетки MDCK культивировали в 96- и 24-луночных панелях фирмы "Costar" (США) в среде MEM с добавлением 10% фетальной сыворотки телят ("Gibco", США), 10 мМ глутамина и антибиотиков.

Препараты. В экспериментах использовали следующие препараты: арбидол, синтезированный фирмой "Мастерлек", солянокислый ремантадин (АО "Адамантан", Москва) и виразол (ICN, США).

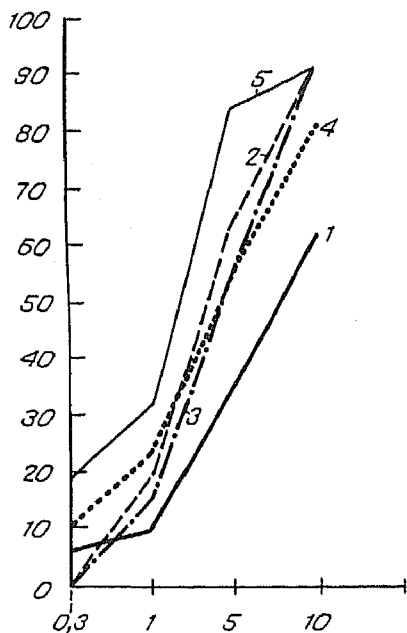
Цитотоксическое действие (ЦД₅₀) определяли, как описано ранее [3].

Противовирусную активность исследуемых препаратов в отношении ВГ А/Н5 учитывали по снижению инфекционного титра вируса в культуре

клеток MDCK и уровня экспрессии вирусного антигена в тест-системе на основе ИФА.

Перед заражением клетки MDCK 2 раза промывали средой без сыворотки для снижения возможной неспецифической реакции. Затем добавляли препараты в исследуемой концентрации в 100 мкл среды MEM и инкубировали с клетками в течение 1,5 ч. Инфицирование проводили 10-кратными разведениями вирусов на среде MEM с добавлением трипсина (TPCK treated, "Sigma", США) в концентрации 2 мкг/мл. Адсорбцию вируса проводили в течение 40 мин при 37°C. Несорбированный вирус удаляли 3-кратной промывкой средой без сыворотки. К клеточному монослою добавляли различные концентрации исследуемых препаратов в среде MEM с трипсином в концентрации 2 мкг/мл. Контроли вирусов и клеток культивировали в этой же среде. Далее планшеты инкубировали в термостате с CO₂ в течение 72 ч при 37°C. Учет результатов проводили через 72 ч.

При изучении активности противовирусных препаратов методом ИФА клетки MDCK выращивали в 96-луночных планшетах. Перед заражением вирусом клетки MDCK 2 раза промывали средой без сыворотки для снижения возможной неспецифической реакции. Исследуемые препараты добавляли к клеткам в двукратной концентрации в 100 мкл среды MEM. К вирусному контролю добавляли по 100 мкл среды, а к контролю клеток — 200 мкл. После инкубации клеток с исследуемыми препаратами в течение 1,5—2 ч при 37°C в лунки, исключая клеточный контроль, добавляли по 100 мкл вируса на среде MEM. Множественность заражения составляла 0,1—0,01 ТЦИД₅₀ на клетку. Все процедуры проводили на среде MEM с добавлением трипсина в концентрации 2 мкг/мл. Далее планшеты инкубировали в термостате с CO₂ в течение 20 ч при 37°C. После инкубации клетки исследовали под инвертированным микроскопом, чтобы зарегистрировать отсутствие в них цитотоксических и цитопатических изменений. Среду удаляли и клетки фиксировали 80% ацетоном в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в течение 15 мин, хорошо высушивали и затем отмывали 3 раза ФСБ с 0,05% твина-20. Эти и все дальнейшие процедуры отмывки проводили указанным раствором. Затем к клеткам добавляли по 100 мкл раствора ФСБ с 1% фетальной сыворотки и 0,05% твина-20, инкубировали при 37°C 30 мин. После удаления раствора к клеткам добавляли по 100 мкл моноклональных антител к NP-белку ВГ А в концентрации 10 мкг/мл. После инкубации с антителами в течение 1 ч при 37°C в лунки вносили по 100 мкл IgG кролика против IgG мыши, меченных пероксидазой хрена в разведении 1:1000. После 4-кратной отмывки связавшуюся пероксидазу выявляли добавлением в лунки 100 мкл 3-3',5-5'-тетраметилбензидина на субстратном буфере. Реакцию учитывали по оптической плотности (ОП) при 450 нм в спектрофотометре фирмы "Биоком" (Россия). Каждое разведение вируса исследовали в 4 повторах, для которых вычисляли среднее значение ОП₄₅₀. Процент ингибирования определяли как (ОП₄₅₀ опыта—ОП₄₅₀ клеточного контроля/ОП₄₅₀ вирусного контроля—ОП₄₅₀ клеточного контроля) · 100%.



Влияние различных концентраций арбидола на репродукцию ВГ А человека и птиц в культуре клеток MDCK.

По оси ординат — процент снижения значения ОП₄₅₀; по оси абсцисс — концентрация арбидола (в мкг/мл). 1 — А/утка/Приморье/2633/01 (H5N3); 2 — А/утка/Приморье/2621/01 (H5N2); 3 — А/утка/Алтай/1285/91 (H5N3); 4 — А/PR/8/34 (H1N1); 5 — А/Aichi/68 (H3N2).

Результаты

Определение ЦД₅₀ препаратов показало, что для арбидола оно составило 40 мкг/мл, для ремантадина — 60 мкг/мл, а для виразола — 100 мкг/мл.

Изучение противовирусной активности арбидола. В 1-й серии экспериментов изучали действие арбидола в сравнении с таковым ремантадина и виразола на репродукцию ВГ птиц А/Н5 в культуре клеток MDCK. Из табл. 1 следует, что арбидол в концентрации 10 мкг/мл, так же как ремантадин и виразол в концентрациях 5 мкг/мл, эффективно ингибирует репродукцию всех 3 вариантов ВГ А/Н5 птиц. Ингибирующее действие препаратов выразилось в снижении инфекционного титра ВГ птиц в среднем на 2—2,5 lg ТЦИД₅₀/мл в отношении всех исследуемых ВГ птиц А/Н5.

Далее изучали действие различных концентраций арбидола в сравнении с таковым ремантадина и виразола на репродукцию ВГ А/Н5 птиц в тест-системе ИФА при одинаковой множественности заражения. С целью выяснения специфичности действия препарата на ВГ с различной антигенной структурой НА в опытах в тех же условиях определяли активность арбидола в отношении традиционных лабораторных штаммов ВГ, относящихся к

подтипам, циркулировавшим среди людей ранее: А/PR/8/34 (H1N1) и А/Aichi/68 (H3N2).

Данные о влиянии различных концентраций арбидола на репродукцию ВГ птиц, представленные на рисунке, характеризуют зависимость действия препарата на репродукцию ВГ от его концентрации. Арбидол ингибирует репродукцию ВГ А/Н5 птиц, причем его ингибирующий эффект находится в пропорциональной зависимости от концентрации препарата. Арбидол в концентрации 1 мкг/мл подавлял репродукцию вируса незначительно, о чем свидетельствует величина ОП₄₅₀. При дозе 5 мкг/мл величина подавления ОП₄₅₀ увеличивается и при концентрации арбидола 10 мкг/мл составляет 62, 92 и 91% для ВГ А/утка/Приморье/2633/01 (H5N3), А/утка/Приморье/2621/01 (H5N2) и А/утка/Алтай/1285/91 (H5N3) соответственно.

Аналогичные графики зависимости вирусингибирующего эффекта от концентрации были получены также для ремантадина и виразола. Концентрации препаратов, ингибирующие вирусную репродукцию на 50%, представлены в табл. 2. МИК₅₀ для арбидола составляла 4,4, 3,4 и 7,5 мкг/мл для ВГ А/утка/Алтай/1285/91 (H5N3), А/утка/Приморье/2621/01 (H5N2) и А/утка/Приморье/2633/01 (H5N3) соответственно. Для ремантадина и виразола МИК₅₀ были ниже, чем для арбидола: в отношении ВГ А/утка/Алтай/1285/91 (H5N3) они составляли 0,9 и 1,5 мкг/мл, А/утка/Приморье/2621/01 (H5N2) — 0,7 и 1 мкг/мл и А/утка/Приморье/2633/01 (H5N3) — 0,4 и 3 мкг/мл соответственно.

Обсуждение

Проведенные исследования показали, что арбидол, ремантадин и виразол в культуре клеток MDCK в дозах, нетоксичных для клеток, существенно ингибировали репродукцию ВГ птиц А/Н5, изолированных на территории России от диких птиц. Действие препаратов возрастало с увеличением их концентрации. Арбидол давал достаточно высокий ингибирующий эффект в отношении как ВГ птиц А/Н5, так и ВГ человека.

Сравнительное изучение вирусингибирующих концентраций показало, что МИК₅₀ для арбидола была выше, чем для рибавирина и ремантадина. Однако если для выражения МИК₅₀ использовать молярные концентрации препаратов, то с учетом того, что молекулярные массы виразола и ремантадина в 2 раза и более ниже, чем молекулярная масса арбидола, то различие в МИК₅₀ будет меньше.

Авторы, изучавшие механизм действия арбидола, показали, что вирусспецифической мишенью его действия в цикле вирусной репродукции явля-

Таблица 1

Влияние арбидола на репродукцию различных штаммов ВГ птиц А/Н5 в культуре клеток MDCK

ВГ	Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀ /мл			
	вирусный контроль	ремантадин 5 мкг/мл	виразол 5 мкг/мл	арбидол 10 мкг/мл
А/утка/Алтай/1285/91 (H5N3)	8,0	6,0	6,0	5,5
А/утка/Приморье/2633/01 (H5N3)	7,0	5,0	5,0	5,0
А/утка/Приморье/2621/01 (H5N2)	3,0	0,5	0,5	1,0

Примечание. Представлены результаты 3 идентичных опытов.

Таблица 2

Минимальная ингибирующая концентрация (МИК₅₀) для различных противовирусных препаратов в отношении разных штаммов ВГ А/Н5

ВГ	МИК ₅₀ , мкг/мл		
	рибавирин	ремантадин	арбидол
А/утка/Алтай/1285/91 (H5N3)	1,5	0,9	4,4
А/утка/Приморье/2633/01 (H5N3)	3,0	0,4	7,5
А/утка/Приморье/2621/01 (H5N2)	0,9	0,7	3,4

ется НА ВГ. Арбидол взаимодействует с НА ВГ, увеличивая его стабильность к конформационным изменениям, индуцированным низким рН, и как следствие ингибирует процесс слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом, приводящий к освобождению вирусного нуклеокапсида и началу транскрипции вирусного генома [1, 2, 4, 14].

Результаты наших исследований действительно показали вирусспецифическое действие арбидола на различные подтипы НА: H1N1, H3N2, H5N2, H5N3. Вместе с тем полученные нами результаты указывают на штаммоспецифический характер противогриппозного действия арбидола, ремантадина и виразола в культуре клеток МДСК в отношении ВГ А/Н5. В частности, репродукция вируса А/утка/Алтай/1285/91 (H5N3), который является наиболее родственным по структуре НА особо опасным вирусам, обусловившим вспышки заболевания среди людей и птиц в Юго-Восточной Азии и Европе (1997—2003 гг.), ингибировалась на 2,5 Ig ТЦИД₅₀/мл. Арбидол и виразол ингибировали репродукцию ВГ H5, А/утка/Приморье/2633/01 (H5N3) также несколько слабее по сравнению с другими изолятами из Приморья. Однако этот вирус, по нашим данным, как и вирус А/утка/Алтай/1285/91 (H5N3), вызывал заболевание у мышей без предварительной адаптации (данные не приводятся).

Изучение нескольких штаммов А/Н5, которые различались по структуре рецепторного сайта и генному составу [6, 15], показало, что различия в рецепторной активности ВГ А/Н5 не оказывали существенного влияния на активность арбидола в отношении этих вирусов.

ВОЗ для борьбы с так называемым "птичьим гриппом" рекомендовала применение противогриппозных препаратов. Полагают, что на первом этапе возможной пандемии вирусспецифические химиопрепараты окажутся единственным средством борьбы. Однако серьезным ограничением применения препаратов адамантанового ряда является быстрое возникновение резистентности к ним [8]. Вирусы H5N1, изолированные от больных людей в 2003—2004 гг. в странах Юго-Восточной Азии, уже были резистентны. Это особенно опасно в условиях пандемии, вызванной высокопатогенным вирусом [7].

В настоящее время доказана эффективность использования ингибиторов NA при гриппе [12, 13], но в России отсутствуют их аналоги, и стоимость этих препаратов импортного производства доволь-

но высока. Кроме того, по данным ВОЗ, существующие производственные мощности обеспечения этими препаратами незначительны, и для стран, их не производящих, они будут практически недоступны. Таким образом, определяющими выбор противовирусных препаратов, помимо их активности в отношении ВГ, будут такие факторы, как их доступность и стоимость. Этим требованиям в достаточной мере отвечает арбидол, широко используемый в России.

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. Гуськова Т. А., Глушков Р. Г. Арбидол — иммуномодулятор, индуктор интерферона, антиоксидант. — М., 1999.
3. Ленева И. А., Фадеева Н. И., Федякина И. Т. и др. Применение иммуноферментной индикации вирусспецифических антигенов в изучении нового противогриппозного препарата арбидол // Хим.-фарм. журн. — 1994. — № 9. — С. 4—8.
4. Ленева И. А., Глушков Р. Г., Гуськова Т. А. Лекарственные средства для химиотерапии и химиопрофилактики гриппа: особенности механизма действия, эффективность и безопасность // Хим.-фарм. журн. — 2004. — Т. 38, № 11. — С. 8—14.
5. Львов Д. К., Жданов В. М. Персистенция генов эпидемических вирусов в природных популяциях // Вопр. вирусол. — 1982. — № 4. — С. 17—20.
6. Львов Д. К., Ямникова С. С., Федякина И. Т. и др. Экология и эволюция вирусов гриппа в России (1979—2002 гг.) // Вопр. вирусол. — 2004. — № 3. — С. 17—24.
7. Avian Influenza: Assessing the pandemic threat // Report WHO. — 2005. — January.
8. Belshe R. B., Hay A. J. Drug resistance and mechanisms of action on influenza A viruses // J. Respir. Dis. — 1989. — Vol. 10. — P. 952—961.
9. Cauthe A. N., Swayne D. E., Schultz-Cherry S. et al. Continued circulation in China of highly pathogenic avian influenza viruses encoding the hemagglutinin gene associated with the 1997 H5N1 outbreak in poultry and humans // J. Virol. — 2000. — Vol. 74, N 14. — P. 6592—6599.
10. Foucher Ron A. M., Munster Vincent, Wallensten Anders et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls // J. Virol. — 2005. — Vol. 79, N 5. — P. 2814—2822.
11. Ito Toshihiro, Goto Hideo, Yamamoto Eiji et al. Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens // J. Virol. — 2001. — Vol. 75, N 9. — P. 4439—4443.
12. Leneva I., Roberts N., Govorkova E. et al. The neuraminidase inhibitor GS4104 (oseltamivir phosphate) is efficacious against A/Hong Kong/156/97 (H5N1) and A/Hong Kong/1074/99 (H9N2) influenza virus // Antiviral Res. — 2000. — Vol. 48, N 2. — P. 101—115.
13. Leneva I., Goloubeva O., Fenton R. et al. Efficacy of zanamivir against avian influenza A viruses that possess genes encoding H5N1 internal proteins and are pathogenic in mammals // Antimicrob. Agents Chemother. — 2001. — Vol. 45, N 4. — P. 1216—1224.
14. 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. — 2002. — Paris, 2002. — Abstr. 1077.
15. Lvov D. K., Yarnikova S. S., Fedyakina I. T. et al. Evolution of H4, H5 influenza A viruses in natural ecosystems in Northern Eurasia (2000—2002) // Proceedings of the International Conference on Options for the Control of Influenza V. Okinawa, Japan, 7—11 October 2003. International Congress Series, Volume 1263, June 2004, P. 169—173.
16. Subbaro K., Klimov A., Katz J. et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness // Science. — 1998. — Vol. 279. — P. 393—396.