

Д. К. Львов, И. Т. Федякина, М. Ю. Щелканов, А. Г. Прилипов, П. Г. Дерябин, Г. А. Галегов

Действие *in vitro* противовирусных препаратов на репродукцию высокопатогенных штаммов вируса гриппа А/Н5N1, вызвавших эпизоотию среди домашних птиц летом 2005 г.

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва

Установлено, что коммерческие химиопрепараты — ремантадин, амантадин, рибавирин и арбидол — эффективны для подавления репродукции высокопатогенных вирусов гриппа А/Н5N1 *in vitro*. В работе использовалась клеточная линия почки эмбриона свиньи (СПЭВ) и высокопатогенный штамм A/Duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) от больной домашней утки (*Anas platyrhynchos domesticus*) (окрестности оз. Чаны, Новосибирская область).

Ключевые слова: вирус гриппа А/Н5N1, ремантадин, вирасол, арбидол, противовирусная активность

Commercial drugs, such as rimantadine, amantadine, ribavirin, and arbidole, are effective in suppressing the *in vitro* reproduction of highly pathogenic avian influenza A/H5N1 viruses. The study has used a porcine embryonic renal cell line and the highly pathogenic A/Duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) strain from a sick domestic duck (*Anas platyrhynchos domesticus*) (Chany Lake environs, Novosibirsk Region).

Key words: influenza virus A/H5N1, rimantadine, virasole, arbidole, antiviral activity

В середине июля 2005 г. на территории Западной Сибири произошла эпизоотическая вспышка с высокой смертностью в популяциях домашних птиц, вызванная высокопатогенным² вирусом гриппа А/Н5N1. В течение одного месяца эпизоотия охватила Новосибирскую, Омскую, Тюменскую, Курганскую, Челябинскую области и Алтайский край.

Специалистами НИИ вирусологии РАМН собран полевой материал в эпицентре эпизоотии (в Барабинской лесостепи, в окрестностях оз. Чаны). Были выделены от домашних и диких птиц на клеточных линиях почек эмбриона свиньи (СПЭВ) и почек эмбриона собаки (МДСК) высокопатогенные штаммы вируса гриппа А/Н5N1. Шесть штаммов депонированы в Государственную коллекцию вирусов РФ, а соответствующие нуклеотидные последовательности генов гемагглютинина — в базу данных GenBank (DQ190857, DQ190858, DQ190859, DQ190860, DQ190861, DQ190862). Аминокислотная последовательность сайта протеолитического нарезания гемагглютинина указывала на принадлежность этих штаммов к категории НРАI [4].

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей всех генов западносибирских штаммов НРАI А/Н5N1 с аналогичными последовательностями из GenBank позволил установить их значительную близость к штаммам НРАI А/Н5N1, выделенным во время массового падежа горных гусей (*Eulabeia indica*) на оз. Цинхай (в одноименной провинции на западе КНР) весной того же года.

Описанные выше эпизоотические события свидетельствуют о том, что человечество находится в одном шаге от пандемии гриппа — вирусу осталось лишь преодолеть межвидовой барьер путем реассортации с вариантами, способными циркулировать в человеческой популяции [7—9, 12]. Западносибирские варианты НРАI А/Н5N1 (2005 г.) рас-

сматриваются как возможные предшественники пандемических реассортантов, поэтому было необходимо проверить их чувствительность к коммерческим антивирусным химиопрепаратам.

Целью данной работы явилось изучение эффективности действия ремантадина, амантадина, вирасола и арбидола на репродукцию западносибирских штаммов НРАI А/Н5N1 (2005 г.) на модели перевиваемых клеточных линий.

Материалы и методы

Культуры клеток. Использовали культуру перевиваемой линии эмбриональных клеток почки свиньи (СПЭВ). Клетки были получены из коллекции клеточных культур НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН.

Вирус. В экспериментах использовался высокопатогенный штамм A/Duck/Novosibirsk/56/05, изолированный летом 2005 г. от больной домашней утки в окрестностях оз. Чаны (Здвинский район Новосибирской области) и депонированный в Государственную коллекцию вирусов (рег. № 2371).

Исследования проводили в пластиковых 24-луночных панелях ("Costar", США). Использовали среду 199 и МЕМ с добавлением 5% фетальной сыворотки крупного рогатого скота ("Gibco", США), L-глутамин (10 мкМ) и антибиотики. Все вируссодержавшие пробы содержали трипсин ("Sigma", США) в концентрации 2 мкг/мл.

Препараты. В качестве противовирусных веществ использовали: а) солянокислый ремантадин (АО "Адамантан", РФ); б) солянокислый амантадин ("Олайнфарм", Латвия); в) рибавирин (вирасол) ("ICN Pharmaceutical", США); г) арбидол ("Мастерлек", РФ).

Оценку противовирусной активности проводили на основе общепринятых методов: определения инфекционного титра вируса гриппа А, титра вирусспецифических гемагглютининов, уровня снижения экспрессии вирусных антигенов на основе иммуноферментного анализа (ИФА) и по способ-

²Highly pathogenic avian influenza (HPAI).

Таблица 1

Влияние рибавирина на репродукцию высокопатогенного штамма A/Duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) вируса гриппа в культуре клеток СПЭВ

Доза препарата, мкг/мл	Инфекционный титр (lg ТЦИД ₅₀ /мл)
0	6,5
1,25	5,40
2,50	4,90
5,0	3,85
10,0	2,25

Примечание. Здесь и в табл. 2: результаты через 72 ч после инфицирования клеток; множественность инфекции 0,1 ТЦИД₅₀/мл; средние результаты 3 идентичных опытов.

ности препаратов предотвращать развитие вирусиндуцированного цитопатогенного действия (ЦПД) [1, 2].

Панели, содержащие опытные и контрольные пробы, помещали в термостат и инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 72 ч, после чего регистрировали эффект противовирусного действия изучаемых препаратов. При изучении активности противовирусных препаратов с применением метода ИФА учет результатов проводили через 20 ч после инфицирования клеток.

Все препараты, добавленные к неинфицированным клеткам в диапазоне концентрации от 0 до 45 мкг/мл, не вызвали видимых цитотоксических изменений в клеточном монослое в течение 72 ч наблюдения.

Результаты и обсуждение

Результаты действия ремантадина и рибавирина на репродукцию штамма вируса гриппа A/Duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) в культуре клеток СПЭВ приведены в табл. 1 и 2. Действие этих препаратов на инфекционный титр вируса гриппа А — главный показатель репродукции вируса. Приведенные результаты свидетельствуют, что снижение инфекционного титра вируса гриппа А через 72 ч после инфицирования клеток носит дозозависимый характер.

Изучено действие ремантадина, амантадина, рибавирина и арбидола на репродукцию вируса (табл. 3), которое характеризуется двумя показателями — подавлением титра гемагглютининов в культуральной жидкости (МИК-I) и способностью частично подавлять развитие вирусиндуцированного ЦПД (МИК-II). Из табл. 3 следует, что величина МИК-I (полное подавление титра гемагглютининов) достигается при использовании всех препаратов. Величина МИК-II (предотвращение развития вирусиндуцированного ЦПД на 50% по сравнению

Таблица 2

Влияние ремантадина на репродукцию высокопатогенного штамма A/Duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) вируса гриппа в культуре клеток СПЭВ

Доза препарата, мкг/мл	Инфекционный титр (lg ТЦИД ₅₀ /мл)
0	6,5
0,75	5,80
1,25	5,30
2,50	4,75
5,0	4,10

Таблица 3

Влияние противогриппозных препаратов на гриппозную инфекцию *in vitro*, вызванную вирусом гриппа A/утка/Новосибирск/56/05 (H5N1) в культуре клеток СПЭВ

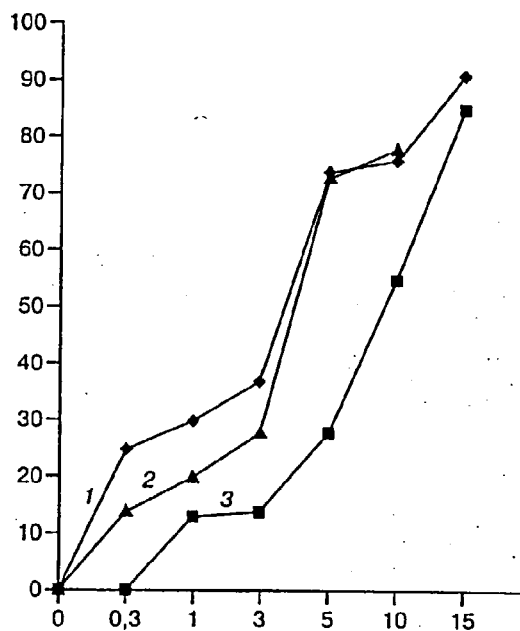
Препарат	МИК-I, мкг/мл	МИК-II, мкг/мл
Ремантадин	1,25	1,25
Амантадин	1,50	2,0
Рибавирин	2,50	2,50
Арбидол	7,0	6,50

Примечание. Результаты через 72 ч после инфицирования; МИК — минимально ингибирующая (достоверная) концентрация; МИК-I — первая концентрация, которая полностью предотвращает образование вирусных гемагглютининов в культуральной жидкости; МИК-II — концентрация, которая предотвращает образование вирусоспецифического ЦПД на 50% по сравнению с контрольными вирусинфицированными клетками, в которых ЦПД принято за 100%.

с контролем) также достигается с этими препаратами в диапазоне указанных концентраций (см. табл. 3). Важно, что все препараты (амантадин, ремантадин, рибавирин и арбидол) оказывают избирательное антивирусное действие, так как полученные величины МИК-I и МИК-II в несколько раз ниже концентраций этих препаратов, которые начинают вызывать цитотоксические изменения в неинфицированном клеточном монослое.

Полученные результаты по амантадину, ремантадину и рибавируну согласуются с данными литературы, опубликованными в 70—80-х годах. Результаты действия арбидола, приведенные в табл. 3, согласуются с данными Е. И. Бурцевой, изучавшей антигриппозное действие этого препарата методом бляшек в культуре клеток МДСК.

Также показано (см. рисунок), что ремантадин, арбидол и рибавирин подавляют репродукцию высокопатогенного штамма A/Duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) вируса гриппа А через 20 ч после



Влияние различных концентраций ремантадина (1), рибавирина (2) и арбидола (3) на репродукцию штаммов вируса гриппа A/Duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) в культуре клеток СПЭВ.

По оси ординат — процент ингибирования значения показателей ОП₄₅₀; по оси абсцисс — концентрация препаратов (в мкг/мл).

инфицирования клеток, имея в виду подавление экспрессии вирусных антигенов, образование которых определяли методом ИФА. Процесс подавления имел дозозависимый характер.

Для вариантов HPAI вирусов гриппа A/H5N1, изолированных от людей в Юго-Восточной Азии, была установлена резистентность к ремантадину и амантадину. Выявлено, что у резистентных штаммов позицию 31 белка M2 занимает аминокислота аспарагин вместо традиционного серина (Сообщение ВОЗ 2004 г. на основании данных A. J. Hay). Молекулярно-генетическое изучение, проведенное в нашем институте, показало, что западносибирский штамм A/Duck/Novosibirsk/56/05 (см. данные GenBank DQ234078), как и другие штаммы, выделенные нами в июле 2005 г., имеет в позиции 31 белка M2 традиционный серин.

Обсуждаемые результаты согласуются с полученными нами ранее результатами изучения действия противовирусных препаратов ремантадина, рибавирина, тамифлю в отношении низкопатогенных штаммов вируса гриппа A/H5N2—N3, изолированных ранее в Сибири и на Дальнем Востоке [3, 5, 6, 11].

Прошлые пандемии гриппа показали, что вакцины никогда не были доступны в нужное время в достаточном количестве. Для производства вакцины требуется не менее 6 мес, а создание пандемической вакцины заранее проблематично. В связи с этим при отсутствии доступной вакцины против будущего пандемического варианта большую роль будет играть применение антивирусных средств, особенно общедоступных коммерческих химиопрепаратов [7, 9]. Результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о чувствительности HPAI/H5N1 к ремантадину, амантадину, арбидолу и рибавирину и позволяют рекомендовать их для лечебно-профилактического применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуськова Т. А., Николаева И. С., Петерс В. В. Методические указания по изучению противовирусной активности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М., 2000. — С. 272—274.
2. Ленева И. А., Фадеева Н. И., Федякина И. Т. и др. Применение иммуноферментной индикации вирусспецифических антигенов в изучении нового противогриппозного препарата арбидола // Хим.-фарм. журн. — 1994. — № 9. — С. 4—8.
3. 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.
4. Львов Д. К., Щелканов М. Ю., Дерябин П. Г. и др. Изоляция штаммов вируса гриппа A/H5N1 от домашних и диких птиц в период эпизоотии в Западной Сибири (июль 2005 г.) и их депонирование в Государственную коллекцию вирусов РФ (8 августа 2005 г.) // Вопр. вирусол. — 2006. — № 1. — С. 11—14.
5. Федякина И. Т., Ямникова С. С., Галегов Г. А., Львов Д. К. Действие официальных противовирусных препаратов на репродукцию вирусов гриппа птиц A/H5, изолированных в России // Вопр. вирусол. — 2005. — № 4. — С. 35—37.
6. Федякина И. Т., Ленева И. А., Ямникова С. С. и др. Чувствительность вирусов гриппа A/H5, изолированных от диких птиц на территории России, к арбидолу в культуре клеток MDCK // Вопр. вирусол. — 2005. — № 6. — С. 32—35.
7. Avian Influenza: Assessing the Pandemic Threat // WHO/CDC Report. — January, 2005.
8. Fock R., Bergman H., Bumann H. et al. Influenza pandemic: preparedness planning in Germany // Eurosurveillance. — 2002. — Vol. 7. — P. 1—5.
9. Gani R., Hughes H., Fleming D. et al. Potential impact of antiviral drug use during influenza pandemic // Emerg. Infect. Dis. — 2005. — Vol. 11, N 9. — P. 1355—1362.
10. Guan Y., Poon L. L., Cheung C. Y. et al. H5N1 influenza: a potential pandemic threat // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004. — Vol. 101, N 21. — P. 8156—8161.
11. Lvov D. K., Yamnikova 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 (Okinawa, Japan, October 7—11, 2003): International Congress Series. — 2004. — Vol. 1263. — P. 169—173.
12. Webby R. J., Webster R. G. Are we ready for pandemic influenza? // Science. — 2003. — Vol. 302. — P. 1519—1522.

Поступила 31.10.05

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2006

УДК 578.832.1:578.1].083.2

В. Т. Иванова, Р. О. Ракутина, Л. В. Кордюкова, А. А. Манькин, Н. В. Федорова, А. Л. Ксенофонтов, А. П. Слепушкин

Получение и исследование внутренних белков эпидемических штаммов вируса гриппа

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Из субвирусных частиц (вирионов, лишенных эктоменов гемагглютинина и нейраминидазы) получены матриксный белок M1 и рибонуклеопротеид гриппа, свободные от примесей поверхностных белков. Субвирусные структуры не образовывали агрегатов при pH 5,0 в отличие от интактных вирионов. Получены субвирусные частицы штамма В/Гонконг/330/2001, относящиеся к эволюционной группе В/Виктория/2/87 при тех же условиях протеолитической обработки ферментом бромелайном, как и из вируса гриппа эволюционной группы В/Ямагата/16/88-подобных. Хроматографический анализ триптических гидролизатов, полученных для M1 вирусов гриппа A(H1N1) и A(H3N2), выявил различия, наиболее существенные между молекулами белка M1, выделенными из вирусов гриппа разных подтипов гемагглютинина. Эти данные указывают на вариации в структуре консервативного внутреннего вирусного белка M1 в процессе эволюции.

Ключевые слова: вирус гриппа А и В, субвирусные частицы, белок M1, различия

The internal influenza virus proteins M1 and RNP free from surface protein impurities were isolated from subviral particles (virions free from HA and NA ectomenes). The spikeless particles had no propensity to aggregate in the solution at pH 5.0 as compared with native viruses. The subviral particles of B/Hong Kong/330/01 influenza virus, which belonged to B/Victoria/2/87-lineage, were obtained by proteolytic treatment with the enzyme bromelain un-