

Изучение влияния ремантадина, рибавирина и триазавирина на репродукцию вирусов гриппа А в монослойных и лимфобластоидных клеточных линиях человеческого происхождения

Т. Д. СМЕРНОВА, Д. М. ДАНИЛЕНКО, М. Ю. ЕРОПКИН, Э. Г. ДЕЕВА, О. И. КИСЕЛЕВ

НИИ гриппа Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург

Influence of Rimantadine, Ribavirine and Triazavirine on Influenza A Virus Replication in Human Monolayer and Lymphoblastoid Cell Lines

T. D. SMIRNOVA, D. M. DANILENKO, M. YU. EROPKIN, E. G. DEEVA, O. I. KISELEV

Research Institute of Influenza, St. Petersburg

Изучено влияние противовирусных препаратов — ремантадина, рибавирина и триазавирина на репродукцию вирусов гриппа в клеточных линиях человека. Показано, что все исследуемые препараты подавляют синтез *de novo* вирусного нуклеопротенина НР. Наибольший эффект отмечен для рибавирина на клетках карциномы лёгкого А-549 и эндотелиальной линии ECV-304. Окрашивание красителем Hoechst-33258 обнаруживало при этом индукцию апоптоза во всех исследуемых линиях. Ремантадин и триазаваин оказывали ингибирующее воздействие на вирус-индуцированный апоптоз, в то время как рибавирин усиливал апоптоз в инфицированных клетках. Этот эффект проявлялся как в монослойных, так и в суспензионных клеточных линиях. Описано воздействие противовирусных препаратов на вирус-индуцированную пролиферацию суспензионных клеточных культур.

Ключевые слова: вирус гриппа, клеточные культуры, апоптоз, стимуляция пролиферации, противовирусные препараты.

The influence of antivirals, such as rimantadine, ribavirine and triazavirine on influenza virus replication in human cell cultures was evaluated. All the antivirals inhibited viral nucleoprotein NP synthesis. The strongest effect was shown for ribavirine in lung carcinoma A-549 cells and endothelial ECV-304 cells. Hoechst-33258 staining revealed induction of apoptosis in all the cell lines. Rimantadine and ribavirine inhibited virus-induced apoptosis while ribavirine enhanced it. The effect was registered in monolayer cell cultures as well as in suspension cell cultures. The influence of the antiviral drugs on the virus-induced cell proliferation in the suspension cell cultures is also described.

Key words: influenza virus, cell cultures, apoptosis, proliferation stimulation, antivirals.

Введение

В связи с появлением нового подтипа пандемического вируса гриппа А(H1N1)v остается актуальным вопрос о рекомендации антивирусных препаратов для лечебного и профилактического применения. Хотя все штаммы пандемического гриппа являются ремантадинорезистентными *in vitro* и генетически характеризуются мутациями в гене, кодирующем М2 белок, приводящими к такому фенотипу, в клинической практике существуют противоречивые данные об эффективности применения ремантадина в качестве противовирусного препарата при лечении гриппа, что требует проведения отдельных исследований.

Традиционный метод оценки противовирусной активности препаратов заключается в проверке их

действия на выживаемость белых мышей. Предварительно проводится скрининг исследуемых препаратов в монослойной перевиваемой клеточной линии почки собаки (MDCK) с целью определения цитотоксической и антивирусной доз препарата. Следует отметить, что существуют препараты, которые не демонстрируют антивирусной активности *in vitro*, однако в условиях *in vivo* оказываются эффективными.

Наши исследования по репродукции вирусов гриппа А в перевиваемых клеточных линиях, происходящих из гемобластозов человека, показали, что вирусы гриппа А при низких дозах заражения оказывали стимулирующее воздействие на пролиферацию данных клеточных линий, а также эффективно индуцировали апоптоз [1]. При этом многие препараты обнаруживали ингибирующее воздействие на эти процессы, что позволяет рассматривать данную модель в качестве дополнительного тестирования при испытании активности противовирусных препаратов *in vitro*.

© Коллектив авторов, 2011

Адрес для корреспонденции: 197376 Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, 15/17. НИИ гриппа

Таблица 1. Чувствительность исследуемых вирусов к противовирусным препаратам на клеточной линии MDCK

Наименование вируса	Инфекционная активность (контроль) lg ТЦД ₅₀ /0,1 мл	Инфекционная активность в присутствии противовирусного препарата lg ТЦД ₅₀ /0,1 мл		
		ремантадин	рибавирин	триазамирин
А/Брисбен/10/07* (H3N2)	6,8	6,3	3,4	6,8
А/Брисбен/59/07 (H1N1)	6,0	3,0	3,0	6,0
А/Курица/Курган/5/05 (H5N1)	6,3	4,0	4,2	6,2
А/Калифорния/07/09* (H1N1)v	4,9	4,5	3,2	5,0
А/С.-Петербург/5/09* (H1N1)v	4,5	4,5	3,0	4,5
А/Свиная/1976/31 (H1N1)	5,0	4,5	3,0	5,0

Примечание. * — ремантадинорезистентные штаммы.

В задачу нашего исследования входило изучение воздействия трёх препаратов — ремантадина, рибавирина и триазамирин — на репродукцию вирусов гриппа А в монослойных и суспензионных клеточных линиях человека *in vitro*, а также оценка воздействия данных препаратов на стимулированную вирусом гриппа пролиферацию клеток и вирус-индуцированный апоптоз.

Материал и методы

Вирусы гриппа. В работе использованы вирус гриппа птиц подтипа H5N1 А/Курица/Курган/5/05; вирус «классического» гриппа свиней подтипа H1N1 А/Свиная/1976/31; вирусы гриппа человека подтипа H1N1v (пандемического гриппа) А/Калифорния/07/09, А/С.-Петербург/05/09, подтипа H1N1 (сезонного гриппа) А/Брисбен/59/07 и вирус гриппа подтипа H3N2 А/Брисбен/10/07 из музея вирусов гриппа ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития РФ.

Вирусы поддерживали заражением в аллантоисную полость 9–11-дневных куриных эмбрионов. Через 48–72 ч аллантоисную жидкость собирали, разливали на аликвоты и замораживали на -70°C. Титры вирусов определяли в клетках MDCK по цитопатическому действию и в РГА с эритроцитами кур [2].

Клеточные линии. В работе использовали клеточные линии из Коллекции клеточных линий НИИ гриппа. Монослойные клеточные линии — А-549 (перевиваемая линия клеток карциномы лёгкого человека), ECV-304 (перевиваемая линия клеток эндотелия человека) и ФЛЭЧ (диплоидные фибробласты лёгких эмбриона человека) пересевали на 6–7 сутки в среде альфа MEM с добавлением 2% фетальной эмбриональной сыворотки коров (ф. с.). Суспензионные перевиваемые клеточные линии человека — Jurkat (Т-лимфоциты), NC-37 (В-лимфоциты) и U-937 (гистиоцитарная лимфома) пересевали каждые 5–7 суток в среде RPMI-1640 с добавлением 2% ф. с. Все клеточные линии культивировали без антибиотиков. Питательные среды и сыворотки получали в фирме «БИОЛОТ» (Санкт-Петербург).

Заражение монослойных клеточных линий. Заражение монослойных культур вирусами гриппа проводили стандартным методом, как описано ранее [3]. Инфекционную дозу заражения рассчитывали исходя из титров инфекционной активности вирусов в культуре клеток MDCK.

Заражение суспензионных клеточных линий. Для изучения влияния вируса на пролиферацию клеток и индукцию апоптоза заражение суспензионных клеток вирусом проводили, как описано ранее [1].

Определение апоптоза. Определение индекса апоптоза проводили стандартным методом окрашивания ядер красителем Hoechst-33258 с последующим подсчётом нормальных и деградирующих ядер в 10 полях зрения, который описан в работе [1].

Метод иммунофлуоресценции (МФА) с применением моноклональных антител (МКА). Использовали непрямой МФА с МКА к нуклеопротеину (НП) вируса гриппа, полученными в

ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития РФ, как описано в работе [3].

Антивирусные препараты. В работе использованы три антивирусных препарата: ремантадин (Sigma, Германия), рибавирин (ICN, США), триазамирин (получен из института органического синтеза Уральского отделения РАН)[4].

Цитотоксическое действие и противовирусную активность препаратов оценивали методами, приведёнными в работе [3].

Статистическая обработка. Обработку данных проводили с помощью пакета программ MS Office Excel 2007 и Statistica 6.0.

Результаты исследования

Монослойные культуры клеток человека. Результаты сравнительного изучения инфекционной активности вирусов гриппа птиц, свиней и человека показали, что во всех исследуемых монослойных клеточных линиях отмечался невысокий уровень репродукции вирусов гриппа А. Наиболее перmissive оказались клетки эндотелиального происхождения, в которых репродукция вирусов гриппа птичьего и человеческого происхождения (за исключением вирусов пандемического гриппа) была выше, чем на клетках карциномы лёгких и диплоидных фибробластах человека (2–3 lg ТЦД₅₀/0,1 мл на клетках эндотелиального происхождения и не более 2 lg ТЦД₅₀/0,1 мл на клетках карциномы лёгкого и фибробластах лёгкого). При этом репродукция вирусов гриппа свиней и вирусов пандемического гриппа во всех трёх культурах была или очень низкой (не более 1 lg ТЦД₅₀/0,1 мл), или же признаков цитопатического действия (ЦПД) и гемагглютинации не отмечалось.

Поскольку инфекционная активность вирусов гриппа в культурах клеток человека была низкой, предварительная оценка противовирусного действия препаратов была проведена на модельной культуре MDCK (табл. 1). По результатам тестирования было подтверждено, что вирусы пандемического гриппа (H1N1)v и вирус А/Брисбен/10/07 (H3N2) резистентны к ремантадину. Вирусы гриппа птиц (А/H5N1), свиней (А/H1N1) и сезонные вирусы гриппа человека (А/H1N1) чувствительны к ремантадину (10 мкг/мл). Все тестируемые вирусы чувствительны к рибавирину (100 мкг/мл), однако данный препарат обладал более слабой противовирусной активностью по сравнению с ремантадином. Триазамирин (50 мкг/мл) *in vitro* не подавлял репродукцию ни одного из тестируемых

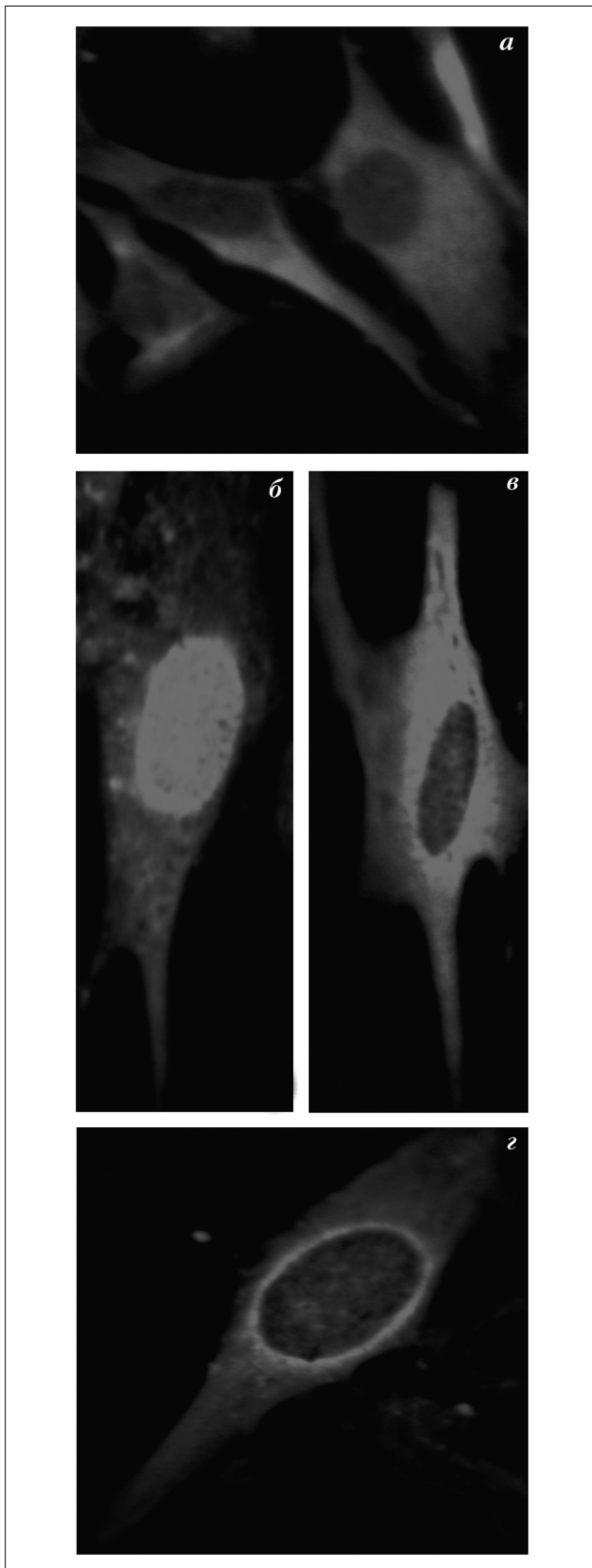


Рис. 1. Иммунофлюоресцентное окрашивание клеток ФЛЭЧ с использованием МКА против НП вируса гриппа.

а — контроль клеток; *б* — свечение ядра; *в* — свечение цитоплазмы; *г* — свечение ядерной мембраны.

вирусов, хотя его противовирусное действие *in vivo* описано в литературе [4].

В работе изучали синтез и распределение вирусного белка НП в клетках человека с помощью моноклональных антител, полученных к НП вируса гриппа А (H3N2), которые вследствие консервативности нуклеопротеина селективно и с высокой аффинностью связываются с НП разных субтипов вируса гриппа А и поэтому используются в диагностических наборах.

Во всех клетках человека (диплоидные фибробласты, пневмоциты и эндотелий) через 20—21 час после заражения клеток высокими дозами всех исследуемых вирусов (100—1000 доз) отмечался достаточно заметный уровень синтеза НП всех вирусов. Позднее появлялись признаки цитотоксического действия вирусов в виде разрежения монослоя. Специфическое свечение НП вируса гриппа А отмечалось в эти сроки, в основном, в цитоплазме, (степень свечения в пределах 30—50%), реже светились ядра клеток и очень редко наблюдалось перинуклеарное свечение в виде ободка ядерной мембраны, что указывает на то, что транслокация НП из ядра в цитоплазму в этот период времени уже произошла (рис. 1).

Как свидетельствуют данные приведённые в табл. 2, в клетках А-549 и ECV-304 ремантадин оказывал заметное ингибирующее действие на синтез НП практически всех вирусов, о чем свидетельствует подавление свечения цитоплазмы (за исключением ремантадиноустойчивого вируса пандемического гриппа А/СП6/5/09 в клетках А-549). В клетках ФЛЭЧ ремантадин подавлял синтез НП чувствительных вирусов, но не влиял на устойчивый к ремантадину вирус А/Калифорния/07/09 (H1N1)_v и слабо чувствительный вирус А/Сви́нья/1976/31 (H1N1), хотя свечение цитоплазмы в клетках, заражённых устойчивым к ремантадину вирусом А/СП6/5/09 (H1N1)_v, было снижено.

В клетках А-549 и ECV-304 в присутствии рибавирина наблюдалось не только снижение свечения цитоплазмы, но и наличие ядерного и перинуклеарного свечения, что свидетельствует о подавлении транслокации вирусных НП из ядра в цитоплазму. В клетках ФЛЭЧ рибавирин очень слабо подавлял свечение НП пандемических вирусов А/Калифорния/07/09 и А/СП6/5/09, и не отмечено влияния рибавирина на синтез НП вирусов гриппа птиц (А/Н5N1/Курица/Курган/5/05) и свиней (А/Н1N1/Сви́нья/1976/31).

Действие триазавирина было сходным во всех клеточных линиях при заражении всеми вирусами и проявлялось, в основном, в снижении транслокации НП, о чем свидетельствует свечение ядер, и изредка перинуклеарного пространства, при одновременном незначительном подавлении свечения в цитоплазме.

Таким образом, было показано, что ремантадин оказывал ингибирующее действие на синтез и

транслокацию НП не только чувствительных к нему вирусов гриппа (А/Н1N1/Брисбен/59/07, А/Н5N1/Курица/Курган/5/05), но и устойчивых, к которым относятся вирусы свиного происхождения. Подобный эффект отмечен и по отношению к триазавири-ну, который при отсутствии ингибирующего дейст-вия в отношении ЦПД и ГА всех вирусов, показанного на клетках MDCK, также оказывал за-метное подавление на синтез и распределение НП.

Наиболее сильно ингибирующее действие ре-мантадина и рибавирина проявилось в клетках А-549 и ECV-304, наименьший эффект проявлялся в клетках ФЛЭЧ, тогда как действие триазавири-на было сходным во всех клеточных линиях. Сле-дует отметить тот факт, что ингибирующее дейст-вие рибавирина и триазавирина проявлялось не только в виде подавления общего свечения клет-ки, но и в виде задержки перехода НП из ядра в цитоплазму, на что указывало свечение ядра или перинуклеарное свечение в виде ободка (табл. 2).

Во всех клеточных линиях еще до появления первых признаков цитотоксического действия (через 18–20 часов при высоких дозах зараже-ния), окрашивание с помощью красителя Hoechst-33258 обнаруживало индукцию деграда-ции хроматина (апоптоз), который наиболее ярко проявлялся в клеточной линии пневмоцитов че-ловека А-549. Определение апоптоза в этой кле-точной линии, заражённой исследуемыми виру-сами, показало активное влияние всех препаратов на этот процесс. Ремантадин и триазаваирин про-явили ингибирующее действие на индукцию ви-русами апоптоза, тогда как рибавирин, наоборот, значительно усиливал апоптоз в заражённых ви-русами клетках А-549 (рис. 2).

Суспензионные гемобластоидные клеточные ли-нии. Как было показано нами ранее, все исследуе-мые вирусы гриппа А при очень низких дозах зара-жения (1–10 доз) обладали способностью

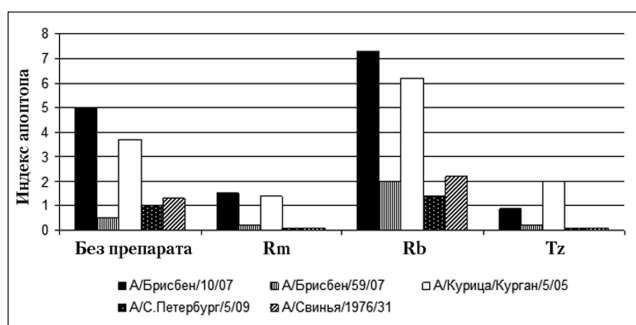


Рис. 2. Влияние противовирусных препаратов на ин-дукцию апоптоза вирусами гриппа А в клеточной линии А-549.

Примечание. Контроль — клетки, заражённые виру-сом гриппа, без препаратов; Rm — в присутствии ре-мантадина в среде; Rb — в присутствии рибавирина в среде; Tz — в присутствии триазавирина в среде.

Таблица 2. Влияние антивирусных препаратов на локализацию вирусного белка НП в клеточных линиях человека

Вирус/клеточная линия	А-549: карцинома лёгких человека						ECV-304: клетки эндотелия человека						ФЛЭЧ: лимфоидные фибробласты клеток эмбриона человека					
	без препарата	реман-тадин	рибави-рин	триаза-ваирин	без препарата	реман-тадин	рибави-рин	триаза-ваирин	без препарата	реман-тадин	рибави-рин	триаза-ваирин	без препарата	реман-тадин	рибави-рин	триаза-ваирин	без препарата	реман-тадин
А/Брисбен/59/09 (H1N1)	ЦИТ.	Ц+++ П/Н	Ц+++ ЯДРО	Ц+ П/Н	ЦИТ. ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	ЦИТ.	Ц++ ЯДРО	Н.Д.	Ц+ ЯДРО	ЦИТ.	Ц++ ЯДРО	П/Н	П/Н	П/Н	П/Н
А/Курица/Курган/5/05 (H5N1)	ЦИТ.	Ц+++ П/Н	Ц+++ ЯДРО	Ц+ ЯДРО	ЦИТ. ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	ЦИТ.	Ц+++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	ЦИТ.	Ц+++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО
А/Калифорния/07/09 (H1N1v)	ЦИТ. ЯДРО	Ц++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	Ц+ ЯДРО	ЦИТ. ЯДРО	Ц++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	ЦИТ. ЯДРО	Ц++ ЯДРО	Ц++ ЯДРО	Ц++ ЯДРО	ЦИТ. ЯДРО	Ц++ ЯДРО	П/Н	П/Н	П/Н	П/Н
А/СПб/05/09 (H1N1v)	ЦИТ.	Ц----	Ц+++ П/Н	Ц+ ЯДРО	ЦИТ. ЯДРО	Ц++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	ЦИТ. ЯДРО	Ц++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	ЦИТ. ЯДРО	Ц++ ЯДРО	П/Н	П/Н	П/Н	П/Н
А/Свинья/1976/31 (H1N1)	ЦИТ.	Ц+++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	Ц+ ЯДРО	ЦИТ. ЯДРО	Ц++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	ЦИТ. ЯДРО	Ц++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	Ц+++ ЯДРО	ЦИТ. ЯДРО	Ц++ ЯДРО	П/Н	П/Н	П/Н	П/Н

Примечание. ЦИТ. — свечение цитоплазмы; ЯДРО — свечение клеточного ядра; П/Н — перинуклеарное свечение; Ц+++ , Ц++ , Ц+ — степень подавления свече-ния цитоплазмы на 75% , 50% и 25% соответственно; Ц---- — отсутствие подавления свечения цитоплазмы.

Таблица 3. Влияние ремантадина, рибавирина и триазавирина на пролиферацию и апоптоз гемобластозных клеток человека, заражённых вирусами гриппа А

Вирус гриппа А	Пролиферация клеток (% от контроля)				Индекс апоптоза			
	без препарата	Rm	Rb	Tz	без препарата	Rm	Rb	Tz
Jurkat								
А/Брисбен/10/07	152±7,2	102±3,2	89±4,7	131±5,3	29±1,2	17±1,0	39±2,3	18±1,0
А/Брисбен/59/07	142±8,6	116±4,1	118±7	107±6,7	25±0,9	19±0,9	29±2,5	15±1,3
А/С.Петербург/5/09	157±6,9	128±8,9	118±11,3	112±5,6	30±2,1	14±0,6	41±2,2	14±0,8
А/Калифорния/7/09	152±5,3	147±5,9	84±3,4	107±5,9	32±2,5	19±1,7	43±1,9	20±1,5
А/Сви́нья/1976/31	196±9,1	81±6,7	93±5,4	142±9,3	35±1,8	14±1,3	39±2,1	16±1,1
NC-37								
А/Брисбен/10/07	144±7,3	102±8,2	106±7,6	96±7,6	27±2,2	6±0,2	42±2,5	5±0,4
А/Брисбен/59/07	135±3,6	109±9,8	108±6,3	111±8,4	9±0,7	5±0,3	27±1,3	1,7±0,1
А/С.Петербург/5/09	168±4,9	118±4,7	108±9,9	119±8,6	22±1,2	5±0,8	40±3,6	4±0,3
А/Калифорния/7/09	136±4,1	96±4,9	93±5,3	116±7,2	25±1,6	8±0,7	36±2,7	9±0,3
А/Сви́нья/1976/31	155±6,4	101±6	108±7,1	113±9,1	21±0,8	9±0,4	29±1,7	6±0,2
U-937								
А/Брисбен/10/07	323±19,7	153±13,8	189±11,3	319±20,7	29±2,3	8±0,5	39±3,1	7±0,2
А/Брисбен/59/07	267±16	210±12,1	222±15,2	269±21,6	25±1,5	6±0,5	38±1,5	9±0,6
А/С.Петербург/5/09	313±14,9	256±21,8	203±16,2	315±22	31±1,9	4±0,2	35±2,8	7±0,6
А/Калифорния/7/09	221±15,4	105±4,7	169±9,8	207±16,6	19±1,1	3±0,3	28±1,7	4±0,2
А/Сви́нья/1976/31	296±14,8	203±15,4	211±10,6	284±25,6	26±1,2	8±0,6	42±3,5	6±0,4

Примечание. Сокращения см. в рис. 2.

стимулировать пролиферацию клеток гемобластозов и индуцировать в них апоптоз, с незначительными отличиями в степени воздействия, в зависимости от субтиповой и штаммовой принадлежности [1].

В наших опытах вирусы гриппа А/Брисбен/59/07 (H1N1) и А/СП6/05/09 (H1N1)v показали сходную активность в отношении стимуляции пролиферации и индукции апоптоза в клетках Jurkat, NC-37 и U-937.

Все три исследуемых препарата — ремантадин (10 мкг/мл), рибавирин (50 мкг/мл) и триазабирин (25 мкг/мл) оказывали заметное ингибирующее воздействие на стимулированную вирусами в этих клетках пролиферацию и апоптоз. Исключением явились моноцитарные клетки гистиоцитарной лимфомы U-937, стимулированную вирусами пролиферацию которых не подавлял триазабирин. Ремантадин и триазабирин подавляли вирус-индуцированный апоптоз во всех клеточных линиях, в то время как рибавирин его усиливал (табл. 3) также, как и в монослойных клеточных линиях.

Обсуждение результатов

Полученные данные свидетельствуют о том, что исследованные нами препараты, как в случае резистентности к ним вирусов, так и не обнаруживших противовирусной активности при исследовании *in vitro* на клетках MDCK, проявляют ингибирующие (или стимулирующие) эффекты при использовании других клеточных тест-систем.

Это проявлялось, прежде всего, в подавлении синтеза НП и его транслокации из ядра в цитоплазму. Следует отметить, что очень многие факторы способны повлиять на синтез и распределение этого вирусного белка. После проникновения вируса в клетку и освобождения в эндосоме от поверхностных белков, происходит быстрый переход вирусно-

го рибонуклеопротеина (vRNP) из цитозоля в нуклеоплазму через ядерные поры, где происходит репликация геномных сегментов и синтез вирус-специфических мРНК [5]. Вирусный НП и белки полимеразы синтезируются *de novo* в цитоплазме, а затем транспортируются в клеточное ядро, где они собираются в рибонуклеопротеин, который позже транслоцируется в цитоплазму для последующей сборки вирусных частиц на клеточной мембране и выхода из клетки путём почкования. На ядерную и цитоплазматическую локализацию нуклеопротеина влияют многочисленные факторы и, прежде всего, этот процесс регулируют сигналы, находящиеся в самом НП [6–8], сигналы ядерного экспорта в вирусном белке NEP (NS2) и вирусный белок M1 [6–8]. Кроме этого, влияние на транслокацию НП оказывает плотность монослоя заражённых клеток и активность клеточных протеинкиназ [9], способность НП и рибонуклеопротеина образовывать комплексы с актиновыми филаментами цитоскелета [10], а импорт белка из цитоплазмы в ядро зависит от степени конформационной зрелости вновь синтезируемого НП [11]. Подобная система сигналов и факторов, регулирующих ядерно-цитоплазматический транспорт НП, его взаимоотношение как с вирусными, так и с клеточными белками в процессе инфекционного цикла, представляет целый комплекс факторов, которые могут быть мишенями воздействия противовирусных препаратов.

Другой эффект, оказываемый исследуемыми препаратами, это влияние на индуцируемый вирусами апоптоз в заражённых клетках. Нами показано, что ремантадин и триазабирин подавляли апоптоз, в то время как рибавирин его значительно усиливал. Хорошо известно, что соединения адамантана, блокирующие разделение вируса, ингибируют вирус-индуцированный апоптоз [12].

Механизм антивирусного действия рибавирина заключается во внутриклеточном превращении препарата в рибавирин-5-фосфат, ингибирующий активность инозин-5-монофосфатдегидрогеназы, а также в уменьшении количества ксантозин-монофосфата и гуанозин-монофосфата в инфицированных клетках. Это приводит к торможению синтеза ксантозиловой кислоты и, в свою очередь, угнетает синтез РНК и ДНК на стадии репликации [13]. Такое влияние препарата на состав пула пуриновых нуклеозидов сопровождается не только прекращением репродукции вируса [14], но и влиянием на метаболизм клетки-хозяина, что выражается в ингибции вирус-индуцированной пролиферации клеток и стимуляции апоптоза в заражённых вирусом клетках. Как известно, рибавирин является мощным индуктором апоптоза в раковых клетках и рассматривается некоторыми авторами как потенциальный противоопухолевый препарат [15].

Данные по воздействию триазавирина на апоптоз в литературе пока не встречаются, однако наши эксперименты показывают, что этот препарат обладает ингибирующим воздействием в отношении вирусов гриппа А, индуцирующих апоптоз.

Учитывая тот огромный вклад, который вносят Т- и В-лимфоциты, моноциты другие клетки крови в патогенез заболеваний, вызываемых вирусами гриппа А, нами был разработан методический подход, позволяющий оценить еще одну сторону взаимоотношений вируса гриппа А и клеток гемобластозов: это стимулирующий эффект, производимый заражением низкими дозами вируса на пролиферацию клеток и индукцию в них апоптоза [1].

Изучение воздействия антивирусных препаратов также обнаружило влияние на эту сторону взаимодействия вирусов и гемобластозных клеток, которое, в основном, выражалось в ингибции стимулированной вирусом пролиферации клеток и

индуцируемого в них апоптоза. Исключением явились клетки, имеющие происхождение из моноцитов, на стимулированную вирусом пролиферацию которых триазавирин не оказывал воздействия. Кроме этого, рибавирин, как и в монослойных клеточных линиях, усиливал индуцированный вирусом апоптоз клеток гемобластозов.

Заключение

Полученные нами результаты могут иметь практическое значение, заключающееся в том, что все исследованные нами препараты могут вызывать положительный ингибирующий эффект, даже при высоких дозах инфекции клеток человека резистентными вирусами. Более того, ингибирующее действие препаратов не обязательно должно сопровождаться подавлением репродукции вируса на клетках MDCK, т. к. лежащие в основе их действия механизмы могут иметь другие мишени.

Разработанная нами клеточная модель на основе гемобластозных клеток, основанная на стимулирующем действии низких доз вируса на пролиферацию и апоптоз клеток, только подтверждает опасность, вызываемую гриппозной инфекцией, даже в лёгкой форме, на возникновение лимфолейкозов и обострение после ремиссии. Исследуемые противовирусные препараты ремантадин и триазавирин способны оказать положительный эффект у подобных больных. Особенно интересен препарат рибавирин, значительно усиливающий апоптоз в заражённых вирусом гриппа клетках, что подтверждает его противоопухолевый эффект, описанный в литературе [15].

Полученные нами данные свидетельствуют о необходимости использования дополнительных тест-систем *in vitro* при исследовании противовирусных препаратов, которые могут обнаружить новые стороны взаимоотношений вируса и клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смирнова Т. Д., Гудкова Т. М., Кузнецова И. К., Рыжак Г. А. Разработка модели взаимоотношения вируса гриппа А с перевиваемыми лимфобластозными клетками человека для изучения биологических особенностей вируса и определения активности антивирусных препаратов. Инф бюллетень «Клеточные Культуры». СПб.: 2009; Выпуск 24: 25—34.
2. Соминина А. А., Бурцева Е. И., Коновалова Н. И. и др. Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация. Метод реком. М.: 2006; 24.
3. Ленева И. А., Федякина И. Т., Ерошкин М. Ю. и др. Изучение противовирусной активности отечественных противогриппозных химиопрепаратов в культуре клеток и на модели животных. Вopr вирусол 2010; 55: 3: 19—27.
4. Karpenko I., Deev S., Kiselev O. et al. Antiviral properties, metabolism, and pharmacokinetics of a novel azolo-1,2,4-triazine-derived inhibitor of influenza A and B virus replication. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 2017—2022.
5. Bouvier N. M., Palese P. The biology of influenza viruses. Vaccine 2008; 26: D49—D53.
6. Bullido R., Gomes-Puertas P., Albo C., Portella A. Several protein regions contribute to determine the nuclear and cytoplasmic localization of the influenza A virus nucleoprotein. J Gen Virol 2000; 81: 135—142.
7. Kao R. Y., Yang D., Lau L. S., Tsui W. H. et al. Identification of influenza A nucleoprotein as an antiviral target. Nat Biotechnol 2010; 28: 6: 600—605.
8. Kesley M., Ari H. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. J Virol 1991; 65: 1: 232—244.
9. Bui M., Meyers J., Whittaker G. Nucleo-cytoplasmic localisation of influenza virus nucleoprotein depends on cell density and phosphorylation. Virus Res 2002; 84: 37—44.
10. Digard P., Elton D., Bishop K. et al. Modulation of nuclear localisation of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. J Virol 1999; 73: 3: 2222—2231.
11. Семенова Н. П., Чумаков В. М., Григорьева Т. А., Прокудина Е. Н. Зависимость ядерного импорта полимеров нуклеопротеина вируса гриппа от их конформационного статуса. Вopr вирусол 2008; 53: 6: 21—24.
12. Morris S. J., Price G. E., Barnett J. M. Role of neuraminidase in influenza virus-induced apoptosis. J Gen Virol 1999; 80: 137—146.
13. Wrey S. K., Gilbert B. E., Knight V. Effect of ribavirin triphosphate on primer generation and elongation during influenza virus transcription *in vitro*. Antiviral Res 1985; 5: 39—48.
14. Gilbert B. E., Knight V. Biochemistry and clinical applications of ribavirin. Antimicrob Agents Chemother 1986; 30: 201—203.
15. Kókény S., Papp J., Weber G. et al. Ribavirin acts via multiple pathways in inhibition of leukemic cell proliferation. Anticancer Res 2009; 29: 1971—1980.