

На правах рукописи

ЛЕНЕВА Ирина Анатольевна

**МЕХАНИЗМ ВИРУССПЕЦИФИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
ПРЕПАРАТА АРБИДОЛ**

03.00.06 - вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук**



Санкт-Петербург -2005

Работа выполнена в Центре по химии лекарственных средств-Всероссийском научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте (ФГУП ЦХЛС-ВНИХФИ)

Научный консультант

член-корреспондент РАМН,
профессор, доктор меди-
цинских наук Гуськова
Татьяна Анатольевна

Официальные оппоненты

академик РАМН, профессор,
доктор медицинских наук
Ершов Феликс Иванович

академик РАМН, профессор,
доктор медицинских наук
Зверев Виталий Васильевич

доктор биологических наук
Еропкин Михаил Юрьевич

Ведущая организация

ГУ НИИ вирусологии
им. Д.И.Ивановского РАМН

Защита состоится 24 сентября 2005 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д001.043.01 при ГУ НИИ гриппа РАМН по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Попова, 15/17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ гриппа РАМН

Автореферат разослан 25.09.05 2005 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 001.043.01
кандидат медицинских наук



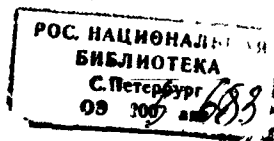
Лобова Тамара Геннадьевна

2006-4
19615

2167434

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Грипп является острым респираторным заболеванием, наносящим значительный ущерб здоровью людей и приводящим к огромным экономическим потерям. По данным Всемирной Организации Здравоохранения, каждый год во время эпидемий болеет от 5 до 15% населения, и по приблизительным оценкам, в целом в мире смертность от гриппа достигает 250 000 - 300 000 случаев в год, преимущественно среди людей пожилого возраста или страдающих хроническими заболеваниями. По оценкам Центра Контроля и Профилактики Заболеваний в Атланте, каждый год в США от гриппа и осложнений после него умирает в среднем 36000 человек и госпитализируется около 90 000 человек, а ежегодный экономический ущерб от эпидемий гриппа оценивается в пределах от 71 до 167 миллиардов долларов США. В России на протяжении последних 10-15 лет ежегодно регистрируется от 27,3 до 47, 2 млн. случаев заболеваний ОРВИ, причем удельный вес гриппа в структуре ОРВИ колеблется от 25 до 60% в зависимости от интенсивности эпидемий и пандемий гриппа. Поверхностные белки вируса гриппа гемагглютинин и нейраминидаза подвергаются постоянным изменениям (антигенный дрейф), приводящим к последовательному вытеснению из популяции людей ранее циркулировавших штаммов вируса гриппа А. В случае реассортации между штаммами вируса гриппа А человека, млекопитающих и птиц (шифтовые изменения) могут возникать новые пандемические вирусы гриппа типа А. Вспышка заболевания гриппом среди людей в Гонконге в 1997 г., вызванная вирусом гриппа птиц подтипа H5N1, беспрецедентные эпизоотии, вызванные в последнее время вирусами гриппа птиц, в частности в России, а также участвовавшие случаи заражения этими вирусами людей в странах Южной и Юго-Восточной Азии, сопровождавшиеся необычайно высокой смертностью, вызывают оправданные опасения, что эти события могут стать началом новой пандемии гриппа. Чрезвычайная изменчивость поверхностных белков вируса гриппа А является причиной, из-за которой может снижаться эффективность вакцинации, рекомендованной в настоящее время Всемирной Организацией Здравоохранения в качестве основного средства борьбы против гриппа. При появлении новых штаммов, содержащих измененные поверхностные антигены, предшествующий гуморальный иммунитет оказывается недостаточным. Как показывает опыт, для создания, тестирования на безопасность и распространения в достаточном количестве эффективной вакцины к такому вновь возникшему штамму вируса гриппа требуется около 6 месяцев. Этот промежуток времени является чересчур длительным в условиях приближающейся эпидемии гриппа. Кроме того, вакцинация не всегда эффективна у людей пожилого возраста, у пациентов, страдающих хроническими заболеваниями и нарушениями функций иммунной системы. В связи с



вышеизложенным особую важность и актуальность приобретает проблема разработки и применения препаратов для лечения и профилактики гриппа. Арсенал средств, используемых для этих целей, охватывает практически все возможные способы влияния на инфекционный процесс и включает в себя средства иммунокорректирующей, патогенетической и симптоматической терапии, вирулицидные препараты, однако ведущее место принадлежит препаратам этиотропного действия, оказывающим непосредственное воздействие на вирусную репродукцию. К настоящему времени в мире и в России для лечения и профилактики гриппа широкое применение получили несколько групп таких препаратов. К первому поколению относятся препараты адамантанового ряда: амантадин и ремантадин. Однако их использование ограничено отсутствием активности в отношении вирусов гриппа В, наличием серьезных побочных эффектов и возможностью возникновения резистентных к ним штаммов вируса гриппа. К препаратам второго поколения относятся ингибиторы нейраминидазы: применяемый в виде ингаляций или аэрозольного спрея занамивир и используемый в виде капсул или таблеток озельтамивир. Наряду с высокой стоимостью этих препаратов к их недостаткам относятся побочные эффекты в виде раздражения носоглотки при приеме занамивира и в виде тошноты и рвоты при приеме озельтамивира. Из вышесказанного следует, что существующие препараты не являются идеальными, в связи с чем сохраняется необходимость создания новых с отличным от них механизмом действия. Совместными усилиями ученых Центра по химии лекарственных соединений - Всероссийского научно-исследовательского химико-фармацевтического института, Научно-исследовательского института медицинской радиологии РАМН (г.Обнинск) и Ленинградского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера был разработан оригинальный препарат арбидол, рекомендованный Фармакологическим Комитетом Минздрава России для лечения и профилактики гриппа А и В у взрослых и детей. Клинические испытания, проведенные более чем на 10000 пациентах, а также опыт почти 15-летнего использования в медицинской практике свидетельствуют об эффективности и безвредности арбидола и отсутствии у него побочных эффектов. Высокая терапевтическая эффективность этого представителя из класса индола является результатом разнообразия его биологической активности и обусловлена иммуномодулирующим, интерферониндуцирующим, антиоксидантным и вирусспецифическим действием. Если иммуномодулирующие, интерферониндуцирующие и антиоксидантные свойства арбидола изучены довольно подробно, наличие вирусспецифического действия у арбидола до сих пор вызывало сомнение у ряда специалистов. Изучение вирусспецифического действия арбидола, его механизмов целенаправленно не проводилось, а

касавшиеся этого вопроса данные имели поверхностный характер и были недостаточно аргументированы. Доказательство наличия у арбидола вирусспецифического действия и выявление вирусспецифической мишени, на которую направлено это действие, являлось принципиально важным для того, чтобы поставить арбидол в один ряд с препаратами адамантанового ряда и ингибиторами нейраминидазы. Это определяло актуальность данной проблемы, решение которой позволило получить новую необходимую информацию о противовирусных свойствах арбидола для оптимизации его применения в клинической практике. Доказательство и установление механизма вирусспецифического действия арбидола также может способствовать его более широкому применению и завоеванию достойного места в ряду фармацевтических препаратов.

Целью исследования являлось изучение механизма вирусспецифического действия арбидола в отношении вируса гриппа, определение вирусспецифической мишени, на которую направлено это действие, а также углубленное изучение особенностей вирусспецифической активности, отличающей арбидол от других противогриппозных препаратов.

Задачи исследования:

1. Изучение особенностей вирусспецифической активности арбидола в отношении вирусов гриппа в культуре клеток, включая штаммовую специфичность, широту спектра действия и временные интервалы проявления наибольшей активности.
2. Определение спектра противовирусного действия арбидола в культуре клеток в отношении других вирусов, вызывающих респираторные инфекции.
3. Определение стадии вирусной репродукции, на которую направлено действие арбидола, и выявление точки приложения его действия (вирусспецифической мишени).
4. Выяснение возможности формирования у вирусов гриппа мутантов, резистентных к арбидолу, подтверждение их резистентности, изучение их свойств, а также определение генетической основы резистентности к арбидолу.
5. Изучение действия арбидола на репродукцию вируса гриппа А в культуре клеток в комбинации с противогриппозными препаратами, имеющими отличный от арбидола механизм действия, а также совместно с симптоматическими средствами.

Научная новизна исследования.

1. Впервые показано отсутствие у арбидола штаммовой специфичности в отношении трех антигенных серотипов вирусов гриппа А человека: H1N1, H2N2, H3N2, наличие активности в отношении вирусов гриппа птиц подтипа

H5N1 и H9N2, вызвавших гриппозную инфекцию у людей, и в отношении ремантадинрезистентных штаммов вирусов гриппа.

2. При изучении широты спектра противовирусного действия арбидола впервые установлена способность арбидола ингибировать в различных клеточных культурах репродукцию вируса гриппа С, аденовируса, респираторно-синцитиального вируса (РСВ).

3. Впервые выявлена корреляция между наиболее высоким антивирусным эффектом арбидола и его концентрацией в клетках и клеточных мембранах через 3-4 часа после добавления препарата к клеточной культуре.

4. Впервые идентифицирована стадия вирусной репродукции, ингибируемая арбидолом. Установлено, что арбидол ингибирует слияние липидной оболочки вируса с мембранами эндосом, происходящее внутри клеток. Показано, что арбидол не оказывает воздействия на адсорбцию, транскрипцию и трансляцию, а также нейраминидазную активность вируса гриппа.

5. Среди 47 изученных производных арбидола из ряда 5-оксииндолов выявлено 17 соединений, обладающих противовирусной активностью в отношении вируса гриппа А. Впервые в химическом ряду 5-оксииндолов выявлены соединения, подобно арбидолу ингибирующие эндоцитоз вируса гриппа А. Впервые в химическом ряду 5-оксииндолов выявлены соединения с противовирусной активностью в отношении РСВ. Из 7 соединений, изученных в отношении их способности ингибировать репродукцию РСВ в культуре клеток, было выявлено 4 соединения с активностью на уровне арбидола.

6. Впервые путем многократных пассажей в клеточных культурах получены и охарактеризованы вирусные мутанты, резистентные к арбидолу, и изучены молекулярно-биологические основы резистентности к нему. Впервые показано, что вирусным белком, на который направлено действие арбидола и который определяет чувствительность к нему, является гемагглютинин (НА) вируса гриппа. Все мутанты, резистентные к арбидолу, имели аминокислотные замены только в субъединице НА2 НА мутантных вирусов гриппа и индуцировали слияние липидной оболочки вируса с клеточными мембранами при более высоком рН, чем вирус дикого типа. Арбидол не вызывал конформационных изменений у НА резистентных мутантов, в то время как его добавление к НА вируса дикого типа вызывало сдвиг конформационного перехода НА.

7. Изучено комбинированное действие арбидола в культуре клеток с каждым из противогриппозных препаратов: амантадином, ремантадином, карбоксилатом озельтамивира, рибавирином и рибамидилом. Показано, что это действие увеличивало эффект препаратов на вирусную репродукцию по сравнению с эффектом, оказываемым каждым из этих препаратов в отдельности. Наибольший

ингибирующий эффект при комбинированном действии арбидола с каждым из изученных препаратов был получен при использовании их низких концентраций, а при комбинированном действии с ингибиторами нейраминидазы также и при более позднем добавлении арбидола к клеткам.

8. Впервые изучено совместное действие на репродукцию вируса гриппа А арбидола с применяемыми в качестве симптоматических средств анальгином и ацетилсалициловой кислотой и показано, что добавление этих препаратов не снижало ингибирующего действия арбидола на вирусную репродукцию в культуре клеток.

Научно-практическая значимость исследования:

1. Данные о наличии у арбидола активности в отношении различных антигенных серотипов и ремантадинрезистентных штаммов вирусов гриппа А человека, а также в отношении вирусов гриппа птиц подтипа H5N1 и H9N2, вызвавших заболевания людей, являются экспериментальным основанием для его назначения во время вспышек и эпидемий гриппа, вызванных такими вирусами.

2. Данные об ингибировании арбидолом в клеточных культурах репродукции вируса гриппа С, аденовируса, РСВ могут служить обоснованием для использования арбидола как этиотропного препарата в отношении инфекций, вызванных этими возбудителями.

3. Выявление стадии репродукции вируса гриппа, ингибируемой арбидолом, получение резистентных к нему мутантов и установление молекулярно-биологических основ резистентности к арбидолу являются доказательством наличия у него вирусспецифического действия, по механизму отличающегося от действия известных противогриппозных химиопрепаратов, и дают полное основание отнести арбидол к этиотропным препаратам так называемой первой линии защиты против гриппозной инфекции.

4. Данные об увеличении эффективности действия в культуре клеток противогриппозных препаратов при сочетанном использовании их с арбидолом открывают перспективу для их клинического изучения при комбинированной терапии гриппозной инфекции и их следует учитывать при разработке доз и схем лечения при комбинированной терапии гриппа в целях более рационального и в то же время эффективного использования этих препаратов в клинической практике.

5. С использованием ИФА разработан, апробирован и внедрен для практического применения в научных лабораториях метод для быстрого и количественного определения противовирусной активности соединений в отношении респираторных вирусов в культуре клеток. Обнаружение в ряду производных 5-оксииндолов значительного количества соединений с высокой противовирусной активностью в отношении вируса гриппа и РСВ, а также

обнаружение среди них соединений, способных так же, как и арбидол, ингибировать эндоцитоз вируса гриппа, открывает новое направление в химиотерапии вирусных инфекций и делает перспективным дальнейший поиск новых противовирусных препаратов в этом ряду.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Арбидол обладает широким спектром противовирусной активности, ингибируя репродукцию трех основных антигенных серотипов H1N1, H2N2, H3N2 и ремантадинрезистентных вирусов гриппа А человека, вирусов гриппа птиц подтипов HА H5, H9 и H6, вызвавших заболевания людей или имеющих общие или близкородственные с ними гены, вирусов гриппа В и С, а также респираторно-синцитиального вируса и аденовируса в культуре клеток.
2. Арбидол ингибирует стадию слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом и не влияет на адсорбцию вируса гриппа и его нейраминидазную активность, а также на вирусную транскрипцию и трансляцию.
3. Впервые получены мутанты, резистентные к арбидолу, все из которых, имели аминокислотные замены в различных положениях субъединицы HА2 HА вируса гриппа. Арбидолрезистентные мутанты индуцируют слияние липидной оболочки вируса с клеточными мембранами при более высоком рН, чем вирус дикого типа, и при добавлении к ним арбидола у них не происходит сдвига конформационного перехода, наблюдаемого у вируса дикого типа.
4. Арбидол - этиотропный препарат, вируспецифической мишенью которого в цикле вирусной репродукции является HА вируса гриппа. Арбидол, взаимодействуя с HА, увеличивает его стабильность к конформационным изменениям, индуцируемым низким рН и необходимым для осуществления слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом.
5. Комбинированное использование арбидола с каждым из противовирусных препаратов - амантадином, ремантадином, карбоксилатом озельтамивира, рибавирином и рибамидилом усиливает их эффект на репродукцию вируса гриппа А в культуре клеток по сравнению с эффектом, оказываемым каждым из этих препаратов в отдельности.
6. Химический ряд производных 5-оксииндолов является перспективным для поиска новых препаратов, обладающих противовирусной активностью.

Апробация работы. Основные положения диссертации были представлены соискателем в виде докладов и стендовых сообщений на X, XII и XIII Международных конгрессах по вирусологии в 1996, 2002 и 2005 г.г., на VI, VII, VIII и XVIII Международных конференциях по антивирусным исследованиям в 1993, 1994, 1995, 2005 г.г., на XVIII Конференции Американского общества

вирусологов в 1999 г., на международной конференции “Актуальные вирусные инфекции-теоретические и практические аспекты” в Санкт-Петербурге в 2004 г., на коллоквиумах и заседаниях Ученых советов ФГУП ЦХЛС-ВНИХФИ, а также в отчетах НИР ФГУП ЦХЛС-ВНИХФИ.

Публикации. По результатам исследований опубликовано 27 работ, из них – 12 статей в ведущих и реферируемых российских научных журналах, 5 статей в международных журналах и 10 тезисов докладов на международных конференциях.

Структура диссертационной работы. Работа изложена на 233 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, состоящий из трех глав, материалы и методы, результаты, состоящие из 8 глав, обсуждение, общее заключение, выводы и список литературы. В диссертационной работе представлено 18 рисунков и 28 таблиц. Список цитируемой литературы включает 234 публикации отечественных и зарубежных авторов. Основные результаты, представленные в работе, получены самой И.А.Леневой и сотрудником лаборатории экспериментальной химиотерапии бактериальных и вирусных инфекций И.Т.Федякиной под руководством соискателя, а также в совместных исследованиях с сотрудниками ЦХЛС-ВНИХФИ проф., д.б.н. Н.И.Фадеевой и членом-корреспондентом РАМН, проф., д.м.н. Т.А.Гуськовой, сотрудниками отдела вирусологии Института медицинских исследований (Лондон, Великобритания)

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы и клетки. В работе использовали однослойные перевиваемые культуры клеток почки эмбриона собаки MDCK, клетки человека линий Hep-2, HeLa, Vero, суспензионные культуры лимфобластоидных клеток Raji и Namalwa, а также первичную трипсинизированную культуру фибробластов куриных эмбрионов (ФЭК). В опытах использовали лабораторные штаммы вирусов гриппа А, В и С человека, депонированные в музее ГУ НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН. Вирусы А/Сингапур/1/57 (H3N2), чумы птиц А/ВЧП/Вейбридж (H7N7) и реассортанты между ними, а также амантадинрезистентные и норакинрезистентные штаммы, полученные из вируса А/ВЧП/Вейбридж, были взяты из хранилища вирусов Всемирной Лаборатории по гриппу ВОЗ в Национальном Институте Медицинских Исследований (Великобритания, Лондон, Mill Hill). Вирусы гриппа А/Гонконг/156/97 (H5N1) и А/Гонконг/1074/99 (H9N2), изолированные от людей, а также вирусы А/Цесарка/Гонконг/G1/97 (H9N2) и А/Утка/Гонконг/W312/97, изолированные от птиц в Гонконге, являются собственностью отдела вирусологии детской клиники Сент-Джуд (Мемфис,

США), и все эксперименты с ними проводились в специальных помещениях этого отдела, относящихся к 3 уровню безопасности. Вирусы гриппа А/Утка/Приморье/2633/01 (H5N3), А/Утка/Приморье/2621/01 (H5N2) и А/Утка/Алтай/1285/91 (H5N3), изолированные от диких птиц на территории России, и вирусы гриппа А/Ярославль/8/04 (H3N2), А/Томск/27/04 (H3N2), В/Москва/1/02, изолированные в периоды эпидемических подъемов заболеваемости сезона 2002-2004 г., являются собственностью ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. В работе использовали вирусологические методы культивирования, накопления и характеристики вирусных препаратов.

Препараты и химические соединения. В работе изучались арбидол и 47 оригинальных химических соединений (производные индола), синтезированные в ЦХЛС-ВНИХФИ, а также препараты амантадин, ремантадин, рибавирин (фирма ICN, США), его отечественный аналог рибамидил, занамивир (фирма Glaxo Wellcome), карбоксилат озельтамивира (фирма Hoffmann La Roche), ацетилсалициловая кислота, анальгин.

Изучение противовирусной активности препаратов и соединений. Изучение противовирусной активности препаратов и соединений проводили с использованием методов ингибирования цитопатического действия вирусов (ЦПД), бляшкообразующей активности (БОА) и метода иммуоферментного анализа (ИФА), модифицированного для определения противовирусной активности соединений в культуре клеток. MDCK клетки выращивали в 96-луночных планшетах до полного монослоя, после чего инфицировали вирусами с множественностью заражения от 10 до 100 БОЕ на клетку или от 0,1 до 1 БОЕ на клетку соответственно в одноцикловых и многоцикловых опытах в присутствии изучаемых препаратов или соединений. Кроме особо оговоренных случаев, препараты к клеткам добавлялись за 30-60 минут до их инфицирования. После 17 часов инкубации при температуре 37° С в атмосфере 5% CO₂ в многоцикловых или 6 часов в одноцикловых опытах клетки фиксировались и определялся уровень экспрессии вирусных антигенов, как описано Grambas et al. (1992). Для тестирования противовирусной активности соединений использовались моноклональные антитела (к внутренним белкам вируса гриппа А и В в разведении 1:1000, к белку F РСВ и внутренним белкам аденовируса в разведении 1:500), поликлональная сыворотка (к вирусу гриппа С в разведении 1:100), а также IgG кролика против IgG мыши, меченные пероксидазой хрена в разведении 1:1000. Оптическую плотность (ОП) измеряли на автоматическом спектрофотометре при длине волны 492 нм при использовании ортофенилендиамин (ОФД) или при длине волны 450 нм с использованием 33'55' тетраметилбензидина (ТМБ). В качестве контроля использовали лунки, не зараженные вирусом. Процент ингибирования вирусной репродукции

изучаемым соединением определяли по формуле: процент ингибирования = $100 - (\text{ОП опыта} - \text{ОП клеточного контроля} / \text{ОП вирусного контроля в отсутствии соединения} - \text{ОП клеточного контроля}) \times 100$. Концентрация препарата, уменьшающая значение величины ОП на 50%, принималась за минимальную ингибирующую концентрацию 50 (МИК₅₀). Данный метод использовался также и для изучения комбинированного действия арбидола с различными препаратами в культуре клеток, однако в этих опытах каждый планшет, помимо лунок с клеточным контролем (клетки, неинфицированные вирусом) и лунок с вирусным контролем (клетки, инфицированные вирусом), включал в себя лунки, инфицированные вирусом в присутствии двух изучаемых препаратов, и контрольные лунки (клетки, инфицированные вирусом в присутствии каждого из изучаемых препаратов в отдельности).

Изучение действия арбидола на различные стадии вирусной репродукции проводили с использованием молекулярно-биологических методов. Определение действия арбидола на нейраминидазную активность вируса гриппа проводили по методу Gubareva L. et al. (1996). Изучение влияния арбидола на транскриптазную активность РНП вируса гриппа *in vitro* проводили по методу Bishop D. et al. (1971), изучение меченых ³H-уридином продуктов транскрипции вирусов гриппа А и В в культуре клеток в присутствии арбидола проводили с помощью метода электрофореза в 3% ПААГе. Изучение вирусных белков, синтезированных в присутствии арбидола в культуре клеток, проводили методом электрофореза в 7,5-15% ПААГе. Изучение действия арбидола и его аналогов на ранние стадии вирусной репродукции проводили методом расщепления флуоресценции (РФ) с использованием меченого флуоресцентного зонда, встроенного в мембрану вирусов гриппа А и В, и методом гемолиза эритроцитов (Wharton S. et al., 1986). Конформационные изменения НА вируса дикого типа и арбидолрезистентных мутантов изучали по методу, описанному Daniels R. et al. (1985) с использованием конформационных антител к нативному НА (НС58) и к активному НА (Н9), способному индуцировать слияние мембран. Определение нуклеотидной последовательности генов НА и М вируса дикого типа и арбидолрезистентных мутантов проводили на автоматическом секвенаторе ABI Model 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems (США) с использованием набора "ABI Prism dye terminator cycle sequencing kit" по предварительной процедуре и с использованием праймеров, описанных Grambas S. et al. (1992).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительное изучение влияния арбидола и других противовирусных препаратов на репродукцию вирусов гриппа человека в культуре клеток MDCK. Известно, что у людей заболевания гриппом вызывают антигенные

типы вируса А, В и С. До 1997 в человеческой популяции периодически циркулировали три антигенных серотипа вируса гриппа А H1N1, H2N2 и H3N2, которые в свою очередь подвергались изменениям при постоянно происходящем антигенном дрейфе. Поэтому важнейшей характеристикой противогриппозного препарата является отсутствие штаммовой специфичности. Изучение действия арбидола на репродукцию различных штаммов вирусов гриппа А, В и С в культуре клеток было проведено в сравнении с другими противогриппозными препаратами. В опытах с вирусами гриппа А использовали примерно эквимоллярные концентрации препаратов (около 20 мкМ): арбидол, занамивир, карбоксилат озельтамивира -10 мкг/мл, рибавирин, рибамидил, амантадин, ремантадин-5 мкг/мл, в опытах с вирусами гриппа В и С, чтобы убедиться в отсутствии эффекта, амантадин и ремантадин были добавлены к клеткам в концентрации 20 мкг/мл. По данным фармакокинетических исследований, изученная концентрация каждого из исследованных препаратов может быть достигнута в носоглоточных секретах при их терапевтическом применении. Проведенные нами эксперименты показали (табл. 1), что арбидол ингибировал репродукцию всех изученных нами штаммов вируса гриппа А человека примерно в одинаковой степени на уровне 80%, причем ингибирующий эффект арбидола не отличался, а иногда и превосходил ингибирующий эффект других противогриппозных препаратов. В отличие от амантадина и ремантадина, которые практически не влияли на репродукцию вируса гриппа В, арбидол, так же как рибавирин и ингибиторы нейраминидазы, подавлял ее на 60%. Ингибирование арбидолом репродукции вирусов гриппа С было слабее, чем репродукции вирусов гриппа А и В, и составляло 20%. Одним из недостатков препаратов адамантанового ряда, в частности ремантадина, является быстрое формирование резистентности к ним. Изучение действия арбидола на репродукцию ремантадинрезистентных штаммов вируса гриппа, один из которых был получен путем пассирования вируса в культуре клеток в присутствии ремантадина, и двух эпидемических штаммов, выделенных от людей во время эпидемического сезона 2003-2004 года, показало, что арбидол, в отличие от ремантадина, подавляющего репродукцию только ремантадинчувствительного штамма вируса гриппа А, подавляет репродукцию как ремантадинчувствительного, так и ремантадинрезистентных штаммов вирусов гриппа (табл. 1).

Таблица 1. Влияние противовирусных препаратов на репродукцию различных штаммов вирусов гриппа А, В и С человека в культуре клеток MDCK*

Вирусы	Процент уменьшения значения ОП ₄₉₂ **						
	арбидол	амантадин	ремантадин	рибавирин	рибамидил	занамивир	озельтамивир
H1N1							
A/PR/8/34	80±3	50±8	40±3	59±4	59±3	75±3	73±2
A/WSN	85±5	***	-	-	-	-	-
H2N2							
A/Сингапур/1/57	80±4	79±1	81±7	60±2	60±5	81±1	79±9
A /Япония/305/57	87±5	84±4	80±4	-	-	-	-
H3N2							
A/Тайвань/79	79±1	85±4	80±10	-	-	85±2	77±3
A/Миссисипи/85	83±5	82±3	87±9	66±4	66±1	84±3	80±5
A/ВЧП/Вейбридж (H7N7) ремантадинчувствительный (дикий тип)	60±3	-	56±4	-	-	-	-
A/ВЧП/Вейбридж (H7N7) ремантадинрезистентный	80±4	-	15±5	-	-	-	-
A/Ярославль/8/04 (H3N2) ремантадинрезистентный	68±2	-	9±2	-	-	-	-
A/Томск/27/04 (H3N2) ремантадинрезистентный	55±5	-	6±1	-	-	-	-
Вирусы гриппа В							
В/Ли/40	60±6	6±3	8±2	71±2	-	65±5	68±7
В/Москва/1/02	67±7	-	2±1	68±5	-	-	-
Вирусы гриппа С							
С/СССР/77	20±5	н.а	10±1	-	-	-	-
С/Ленинград	22±3	10±1	15±1	-	-	-	-

*Для сравнения использовали примерно эквимоллярные концентрации препаратов: арбидол, занамивир, карбоксилат озельтамивира -10 мкг/мл, рибавирин, рибамидил, амантадин, ремантадин-5 мкг/мл. В опытах с вирусами гриппа В и С, чтобы убедиться в отсутствии эффекта, амантадин и ремантадин использовали в концентрации 20 мкг/мл. **В каждом опыте на одну точку использовали 4 лунки, результат представляет среднее арифметическое трех независимых опытов±среднее квадратичное отклонение. *** - не изучалось

Влияние арбидола на репродукцию вирусов гриппа птиц подтипов HA H5, H9 и H6 в культуре клеток MDCK. В 1997 году в Гонконге вирус гриппа птиц A/Гонконг/157/97 (H5N1) вызвал заболевания гриппом у 18 человек, 6 из которых умерли. Через год другой птичий вирус гриппа A H9N2 также вызвал несколько случаев заболевания у людей. С 2000 г. в странах Южной и Юго-Восточной Азии наблюдались эпизоотии среди кур, сопровождавшиеся заболеванием людей, подчас с высокой смертностью. Всего к началу 2005 г. зарегистрировано 45 случаев заболеваний «птичьим гриппом», закончившихся смертельными исходами. Летом 2005 г. в России также наблюдалось распространение гриппа среди птиц, вызванного патогенным вирусом H5N1. Два вируса, вызвавшие заболевания у людей, A/Гонконг/157/97 (H5N1) и A/ Цесарка/Гонконг/G1/97 (H9N2), а также птичий вирус штамм A/Утка/Гонконг/W312/97(H6N1) имеют шесть общих генов, кодирующих внутренние белки. Еще один птичий вирус A/Курица/Гонконг/G9/97 (H9N2) обладает двумя генами (PB1 и PB2), общими с перечисленными выше тремя вирусами. Сотрудниками отдела экологии вирусов ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского на территории России были изолированы вирусы гриппа A/Утка/Алтай/1285/91 (H5N3), A/Утка/Приморье/ 2621/01 (H5N2) и A/Утка/Приморье/2633/01(H5N3) от диких птиц. Антигенная и первичная структура HA этих трех вирусов сходна с таковой у вирусов, обусловивших вспышки заболевания среди людей и кур в странах Юго- Восточной Азии. В настоящее время все перечисленные вирусы продолжают циркулировать в птичьей популяции и нельзя исключить вероятность перехода ими межвидового барьера и внедрения в человеческую популяцию. В связи с этим данные вирусы рассматриваются как кандидаты, потенциально способные вызвать будущие эпидемии вируса гриппа, и получение данных об активности противогриппозных препаратов в отношении этих вирусов крайне важно. Из результатов, представленных в табл.2, видно, что арбидол подавляет репродукцию всех изученных вирусов гриппа птиц, однако чувствительность их к препарату отличается. МИК₅₀ арбидола для обоих H9N2 вирусов составляла 15 мкг/мл, в то время как для A/Гонконг/157/97 (H5N1) и A/Утка/Гонконг/W312/97 (H6N1) составляла соответственно 30 и 25 мкг/мл. МИК₅₀ для вирусов гриппа A/Утка/Алтай/1285/91 (H5N3), A/Утка/Приморье/2621/01(H5N2) и A/Утка/Приморье/2633/01(H5N3) были ниже и составляли соответственно 4,5 мкг/мл, 4,0 мкг/мл и 7,5 мкг/мл. МИК₅₀ для вируса гриппа человека A/Сингапур/1/57, взятого в качестве контроля, составляла 7,5 мкг/мл.

Таким образом, арбидол подавляет репродукцию вирусов гриппа птиц, вызвавших заболевания у людей или имеющих общие со штаммом A/Гонконг/157/97(H5N1) гены, кодирующие внутренние белки. Однако, арбидол менее активен в отношении этих вирусов, чем в отношении H1N1, H2N2, H3N2

антигенных серотипов вируса гриппа А, циркулирующих в человеческой популяции. Активность арбидола в отношении вирусов гриппа птиц H5N2 и H5N3, выделенных на территории России, сходна с его активностью в отношении антигенных серотипов вируса гриппа А человека.

Таблица 2. Противовирусная активность арбидола в отношении вирусов гриппа птиц подтипов H5 и H9 в культуре клеток MDCK

Вирусы	МИК ₅₀ (мкг/мл) *
А/Гонконг/157/97 (H5N1)	30±5
А/ Цесарка /Гонконг/G1/97 (H9N2)	15±3
А/ Утка /Гонконг/W31297 (H6N1)	25±3
А/ Курица /Гонконг/G9/97 (H9N2)	15±5
А/Утка/Приморье/2633/01(H5N3)	4,5±2,5
А/Утка/Приморье/2621/01(H5N2)	4,0 ±1
А/Утка/Алтай/1285/91 (H5N3)	7,5±2,5
А/Сингапур/1/57 (H2N2)	7,5±4

*Для одной точки опыта использовали четыре лунки планшета, а каждое значение МИК₅₀ представляет среднее арифметическое ± среднеквадратичное отклонение, вычисленное из четырех таких независимых опытов.

Изучение влияния арбидола на репродукцию РСВ и аденовируса в культурах клеток. Одним из преимуществ любого противовирусного препарата является широта его спектра действия. Арбидол рекомендован Фармакологическим Комитетом Минздрава России не только в качестве профилактического и лечебного средства при гриппе А и В, но также при острых респираторных вирусных инфекциях (ОРВИ) негриппозной этиологии, однако данные, подтверждающие вирусспецифическое действие арбидола в отношении других возбудителей ОРВИ, отсутствовали. С использованием ИФА была разработана система оценки активности препаратов против РСВ и аденовируса в культуре клеток, в которой было изучено действие арбидола на репродукцию этих вирусов в сравнении с рибавирином и рибамидилом. Из данных, представленных в табл. 3, видно, что арбидол подавляет репродукцию РСВ и аденовируса на уровне рибамидила и рибавирина, активных в отношении

возбудителей этих инфекции и используемых нами в качестве контроля, с МИК₅₀ соответственно 10 мкг/мл и 20 мкг/мл.

Таблица 3. Противовирусная активность арбидола в культурах клеток

Препараты	МИК ₅₀ препаратов *	
	РСВ, штамм Long, клетки МК-2	Аденовирус тип 5, клетки HeLa
Арбидол	10±2 мкг/мл	20±3 мкг/мл
Рибавирин	5±1 мкг/мл	20±2 мкг/мл
Ремантадин	> 100 мкг/мл	> 100 мкг/мл

*Для одной точки опыта использовали четыре лунки планшета, а каждое значение МИК₅₀ представляет среднее арифметическое ± среднеквадратичное отклонение, вычисленное из четырех таких независимых опытов.

Таким образом, полученные нами данные показывают, что арбидол обладает широким спектром противовирусной активности, ингибируя репродукцию различных антигенных серотипов и ремантадинрезистентных штаммов вирусов гриппа А человека, вирусов гриппа птиц подтипа H5 и H9, вызвавших заболевания у людей, или обладающих общими или близкородственными с ними генами, а также вирусов гриппа В и С. Данные о широком спектре действия арбидола в отношении респираторных вирусов позволяют сделать вывод о его перспективности для лечения и профилактики ОРВИ и дают основание для рекомендации начала лечения им без проведения предварительной диагностики заболевания.

Изучение противовирусной активности соединений в ряду нидолов. В связи с высокой и широкой по спектру противовирусной активностью арбидола в культуре клеток представлялось перспективным изучение его аналогов. С использованием метода ИФА, модифицированного для оценки противовирусной активности соединений в культуре клеток, из 47 соединений, изученных нами в отношении их способности ингибировать репродукцию вируса гриппа А, было выявлено 17 соединений с высокой противовирусной активностью на уровне арбидола, 15 соединений с менее выраженной активностью и 15 неактивных соединений. Из 7 соединений, изученных в отношении их способности ингибировать репродукцию РСВ в культуре клеток, было выявлено 4 соединения с активностью на уровне арбидола или превосходящей ее, 1 слабоактивное и 2

неактивных соединений. Обнаружение нами большого процента соединений с выраженной ингибирующей активностью в отношении вируса гриппа и РСВ позволяет сделать вывод о перспективности поиска соединений, причем с широким спектром противовирусной активности, в этом химическом ряду.

Изучение действия арбидола на различные стадии репродукции вируса гриппа. Первым шагом в изучении селективного действия препарата и доказательства наличия у него вирусспецифического эффекта является установление стадии вирусной репродукции, ингибируемой этим препаратом. Изучение действия арбидола на поздние стадии репродукции, проведенное нами, показало, что арбидол не влияет на вирусную транскрипцию и трансляцию, нейраминидазную активность. В одноцикловом опыте было показано, что добавление арбидола к клеткам MDCK через 1 час после их инфицирования не оказывало влияния на репродукцию вирусов гриппа А/Япония/305/57 и В/Ли/40, в то время как добавление арбидола к клеткам за 1 час до инфицирования вызывало ингибирование репродукции этих вирусов соответственно на 80% и 70% (рис.1). Эти данные позволили предположить, что действие арбидола связано с его влиянием на ранние стадии вирусной репродукции. Методом рассвечивания флуоресценции (РФ) с использованием флуоресцентного зонда, встроенного в вирусную мембрану, было изучено действие арбидола на ранние стадии вирусной репродукции. Добавление арбидола в различных концентрациях не оказывало влияния на связывание (адсорбцию) вируса с клетками MDCK. Далее было изучено действие арбидола на эндоцитоз вирусов гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 и В/Ли/40 в клетках Raji. В предварительных экспериментах с ингибиторами эндоцитоза и тушителями флуоресценции было показано, что значение величины РФ при $pH=5,0$ в реакционной среде отражает процесс слияния липидной оболочки вируса с плазматическими мембранами, а при $pH=7,4$ в реакционной среде - процесс слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом. Из данных, представленных на рис.2, видно, что добавление арбидола к клеткам при $pH=5,0$ и при $pH=7,4$ приводило к уменьшению значения величины РФ соответственно на 50% и 60% и подавляло, таким образом, как слияние липидной оболочки вируса с плазматической мембраной, так и с мембранами эндосом. Поскольку у вируса гриппа в естественных условиях наблюдается только слияние липидной оболочки вируса с мембранами эндосом, логично было предположить, что вирусспецифическое действие арбидола обусловлено его влиянием именно на эту стадию вирусной репродукции. Для подтверждения нашего предположения в следующей серии экспериментов мы изучили действие структурных аналогов арбидола, обладающих разной противовирусной активностью, как на слияние липидной оболочки вируса с плазматическими мембранами, так и на ее слияние с эндосомами (табл. 4).

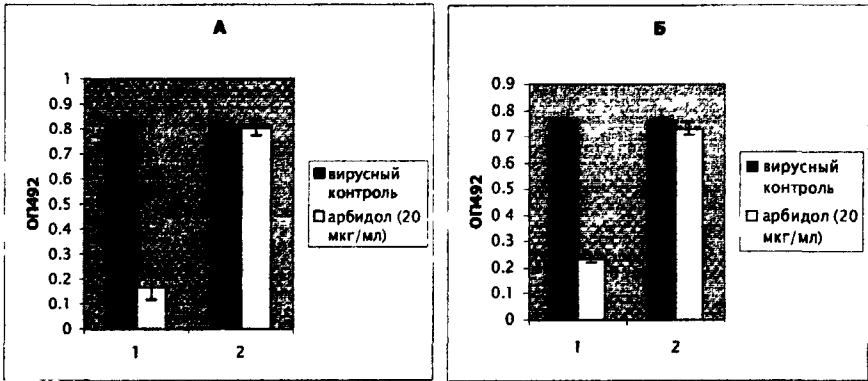


Рис.1. Влияние арбидола на репродукцию вируса гриппа А/Япония/305/57 (А) и вируса гриппа В/Ли/40 (Б) в клетках MDCK в зависимости от времени добавления препарата в условиях одноциклового опыта

1 - 60 минут до инфицирования; 2 – через 60 минут после инфицирования

Для одной точки опыта использовали четыре лунки планшета, а каждое значение представляет среднее арифметическое \pm среднеквадратичное отклонение, вычисленное из трех таких независимых опытов.

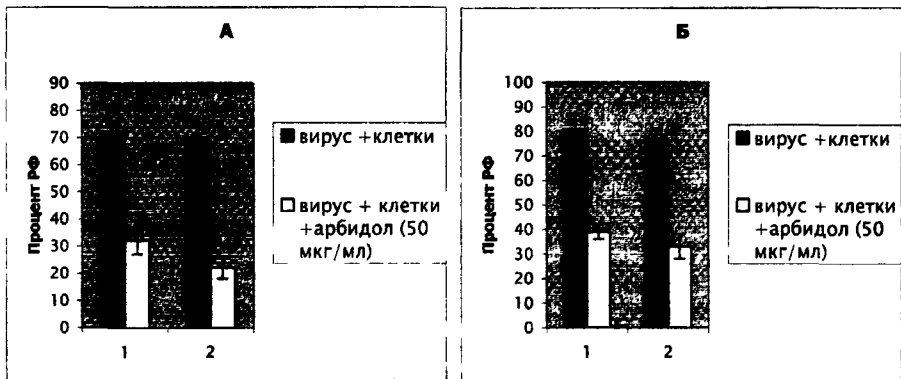


Рис.2. Влияние арбидола на величину РФ при взаимодействии вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (А) и вируса гриппа В/Ли/40 (Б) с лимфобластоидными клетками Raji при pH=5,0 (1) и при pH= 7,4 (2)

Для одной точки опыта использовали три повторности, а каждое значение представляет среднее арифметическое \pm среднеквадратичное отклонение, вычисленное из четырех таких независимых опытов.

Таблица 4. Противовирусная активность аналогов арбидола в культуре клеток MDCK и их влияние на эндоцитоз вируса гриппа А/Краснодар/101/59 в лимфобластоидных клетках Raji

Соединения	% подавления вирусной репродукции*	% подавления РФ**	
		pH=5,0	pH=7,4
Арбидол	60±10	52±2,7	50±2,0
А-902	65±10	42±2,1	44±2,2
Гр-3213	52±7	23±1,2	35±1,8
Гр-1834	50±10	76±2,5	66±2,4
III-1447	50±7	40±1,9	48±2,1
III-1603	40±5	45±2,2	40±2,1
Кардиофан	н/а	5±0,1	5±0,2
ГЯЛ-78	6±3	39±2,1	15±1,2
Гр-3110	12±4	43±2,2	н/а
А-502	8±3	43±2,4	10±0,9
Гр-3078	7±4	70±3,4	10±0,5
III-1488	н/а	35±1,9	5±0,2

*В опытах по определению противовирусной активности соединений для одной точки опыта использовали четыре лунки планшета, а каждое значение представляет среднее арифметическое ± среднеквадратичное отклонение, вычисленное из трех таких независимых опытов.

** В опытах по изучению влияния соединений на эндоцитоз вируса гриппа для одной точки опыта использовали три повторности, а каждое значение представляет среднее арифметическое ± среднеквадратичное отклонение, вычисленное из трех таких независимых опытов.

Из данных по изучению их влияния на эндоцитоз вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 в клетках Raji при pH=5,0 и pH=7,4 видно, что аналоги арбидола, проявляющие сходную с ним противовирусную активность в культуре клеток, ингибируют величину РФ при pH=5,0 и pH=7,4 приблизительно на том же уровне, как и сам арбидол. Ни одно из соединений, не обладающих противовирусной активностью, не ингибировало значение величины РФ при pH=7,4, отражающей процесс слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом (табл.4). Эти данные подтверждают наше предположение о том, что подавление вирусной репродукции арбидолом обусловлено ингибированием препаратом одной из ее стадий, а именно - слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом, происходящего внутри клеток.

Изучение влияния арбидола на репродукцию реассортантов, имеющих различный набор генов. Для установления мишени, на которую направлено действие арбидола, мы изучили эффект арбидола на репродукцию реассортантов между вирусами гриппа А/ВЧП/Вейбридж и А/Сингапур/1/57, каждый из которых имел различный состав генов (рис.3). Видно, что одна группа реассортантов обладала высокой чувствительностью к действию арбидола (рис. 4). Все реассортанты этой группы имели НА от А/ВЧП/Вейбридж. Вторая группа реассортантов, которые имели НА от А/Сингапур/1/57, была менее чувствительна к арбидолу. Не было обнаружено никакой корреляции между каким-либо другим геном и чувствительностью к арбидолу. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что поверхностный белок НА является основным белком, определяющим чувствительность к арбидолу.

Реассортанты	Гены							
	1	2	3	4	5	6	7	8
19b	W*	A	A	W	A	W	W	A
7a	W	W	W	W	W	W	A	W
21b	W	W	A	W	W	A	A	W
9a	A**	A	A	W	A	A	A	W
43a	W	W	W	A	W	W	W	W
58a	A	A	A	A	A	A	A	W

Рис.3. Состав генома реассортантов, полученных при совместном заражении клеточной культуры вирусами гриппа А/Сингапур/1/57 (H3N2) и А/ВЧП/Вейбридж (H7N1) (*W-ген от А/ВЧП/Вейбридж; **A-ген от А/Сингапур/1/57)

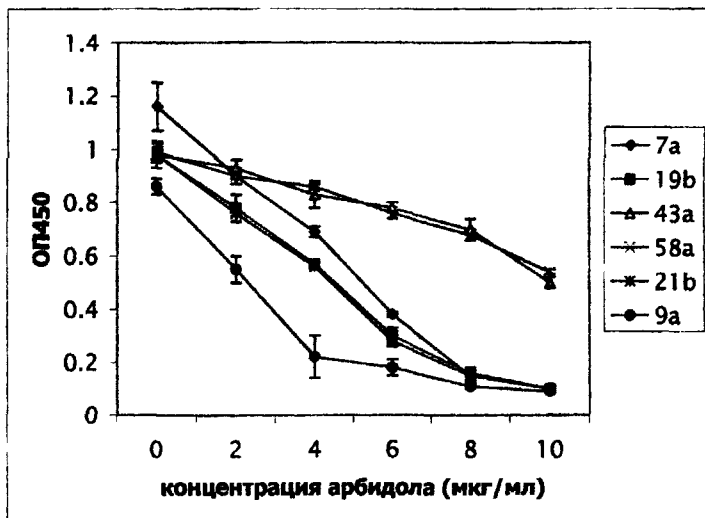


Рис.4. Влияние различных концентраций арбидола на репродукцию реассортантов между вирусами гриппа А/Сингапур/1/57 и А/ВЧП/Вейбридж в культуре клеток MDCK

Для одной точки опыта использовали четыре лунки планшета, а каждое значение представляет среднее арифметическое \pm среднееквадратичное отклонение, вычисленное из трех таких независимых опытов.

Получение мутантов, резистентных к арбидолу, и изучение их свойств. До настоящего исследования попытки получения мутантов, резистентных к арбидолу, не увенчались успехом. Арбидолрезистентные мутанты были получены нами после 15 пассажей вируса в присутствии увеличивающихся (от 5 мкг/мл до 20 мкг/мл) концентраций арбидола в культуре клеток MDCK. Резистентность к арбидолу этих мутантов была подтверждена в опытах по ингибированию бляшкообразующей активности (БОА) и гемолизу эритроцитов, а также с использованием ИФА. Определение нуклеотидной последовательности НА полученных нами арбидолрезистентных мутантов показало, что все они имеют мутации в гене, кодирующем НА2, но в различных позициях (табл. 5).

Изучение влияния арбидола на конформационные изменения НА вируса гриппа. Известно, что ведущую роль в осуществлении слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом играет поверхностный гликопротеин вируса гриппа НА, конформационные изменения которого при низком pH

индуцируют этот процесс, что приводит к освобождению вирусного генома и началу транскрипции. С использованием двух типов конформационных антител (КАТ), различающих НА в нативном состоянии (НС58) и индуцируемом низким рН активном состоянии (Н9), мы изучили конформационные изменения НА арбидолрезистентных мутантов в сравнении с НА вируса дикого типа, из которого эти мутанты были получены. Для дикого типа вируса переход НА из нативного состояния в активное состояние имел место при $pH=5,0$, однако для арбидолрезистентного штамма этого же вируса такой переход имел место при $pH=5,2$, то есть при pH выше, чем для вируса дикого типа (рис.5). Такие же результаты были получены и для остальных мутантов, резистентных к арбидолу. Гемолиз эритроцитов, индуцируемый этими же мутантами, также имел место при более высоком pH , чем для дикого типа вируса (табл.5).

Таблица 5. Изменение первичной последовательности арбидолрезистентных мутантов и увеличение pH , при котором происходит индуцируемое ими слияние вирусной липидной оболочки с клеточными мембранами.

Арбидол- резистентные мутанты	Аминокис- лотные замены	Положения аминокислот- ных замен	Увеличение pH слияния***	
			ΔpH *	ΔpH **
M1	Q→N	HA2 27	0.2	0.4
202	K→N	HA2 42	0.2	0.2
201	K→N	HA2 51	0.2	0.2
203	K→N	HA2 51	0.2	0.2
206	K→N	HA2 51	0.2	0.2
204	K→N	HA2 51	0.2	0.2
	F→S	HA2 87		
F1	K→R	HA2 117	0.2	0.2

* ΔpH - изменение pH перехода НА из нативного состояния в активное состояние при низком значении pH , определенное методом ИФА с использованием конформационных антител

** ΔpH - изменение pH гемолиза эритроцитов, индуцируемое вирусами, определенное при измерении их гемолитической активности при различных значениях pH

*** различия между ΔpH для вируса дикого типа и арбидолрезистентных мутантов были статистически достоверны ($p < 0,05$)

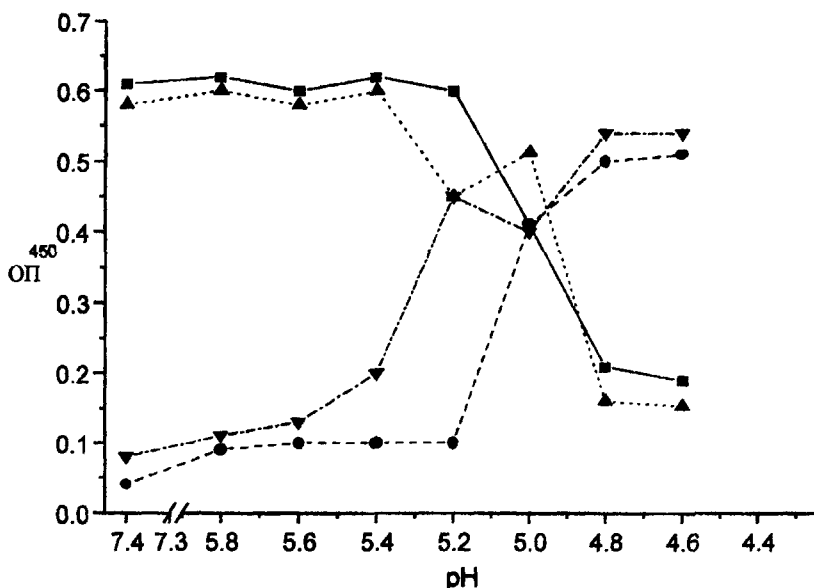


Рис.5. pH конформационных изменений НА арбидолрезистентного мутанта 202 (---▲---, ---▼---) и вируса дикого типа 7a (—■—, ---●---), взаимодействие НА с КАТ НС58 (—■—, ---▲---) и Н9 (---▼---, ---●---).

При построении кривых для определения pH конформационного перехода НА для каждой точки опыта использовали шесть лунок планшета, а полученное значение pH представляет среднее арифметическое, вычисленное из трех таких независимых опытов.

Для подтверждения прямого взаимодействия НА вируса гриппа с арбидолом далее был изучен эффект последнего на конформационные изменения НА вируса дикого типа и арбидолрезистентных мутантов (табл.6). Добавление арбидола к НА дикого типа вызывало сдвиг конформационного перехода НА на 0,2 единицы. Увеличение концентрации арбидола до 50 мкг/мл не вызывало дальнейшего увеличения разницы значения pH перехода для НА. Добавление от 10 до 50 мкг/мл арбидола к НА резистентных вирусов не оказывало влияния на значение pH, при котором конформационные изменения НА имели место в отсутствии арбидола. Таким образом, НА арбидолрезистентных штаммов не был чувствителен к действию арбидола.

Таблица 6. Влияние арбидола на конформационные изменения НА вируса дикого типа 7а и арбидолрезистентных мутантов 201 и 202.

Концентрации арбидола (мкг/мл)	рН перехода НА из нативного состояния в состояние, индуцированное низким рН*		
	7а	201	202
0	5.0	5.2	5.2
10	4.8	5.2	5.2
20	4.8	5.2	5.2
50	4.8	5.2	5.2

*При определении рН конформационного перехода НА для каждой точки опыта использовали шесть лунок планшета, а полученное значение рН представляет среднее арифметическое, вычисленное из трех таких независимых опытов.

** различия между рН слияния для вируса дикого типа 7а в отсутствии и присутствии арбидола были статистически достоверны ($p < 0,05$)

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что вируспецифической мишенью действия арбидола в цикле вирусной репродукции является НА вируса гриппа. Арбидол взаимодействует с НА вируса гриппа, 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. Таким образом, полученные нами данные доказывают, что арбидол обладает вируспецифическим действием и по механизму этого действия отличается от применяемых противогриппозных препаратов: амантадина и ремантадина, являющихся блокаторами ионных каналов, образованных М2 белком вируса гриппа, и ингибиторов нейраминидазы - занамивира и озельтамивира.

Изучение влияния арбидола на репродукцию вируса гриппа при сочетании с другими препаратами в культуре клеток MDCK. Одним из подходов для увеличения эффективности химиопрепарата против вирусной инфекции является его использование в комбинации с другим препаратом. При этом наилучшие результаты дает использование препаратов, имеющих различный механизм действия и направленных на разные мишени в цикле вирусной репродукции. Наши исследования показали, что механизм действия арбидола отличается от других применяемых в настоящее время противогриппозных препаратов.

Изучение эффекта арбидола в сочетании с амантадином и ремантадином
Использование препаратов адамантанового ряда лимитировано возникновением резистентных к ним штаммов и побочными эффектами, отмеченными при применении высоких доз препаратов. Для того, чтобы уменьшить вероятность возникновения резистентных штаммов или повысить эффективность действия их низких доз, представляло интерес изучить комбинированное действие этих препаратов с арбидолом.

Из данных, представленных в табл.7, видно, что ни одна из изученных концентраций амантадина и ремантадина не уменьшали эффект арбидола на вирусную репродукцию. Добавление к арбидолу в концентрации 1 мкг/мл всех изученных концентраций амантадина не влияло значительным образом на величину ингибирования вирусной репродукции, оказываемыми этими же концентрациями препаратов в отдельности. Комбинации арбидола с амантадином (арбидол 1 мкг/мл+амантадин 10 мкг/мл, арбидол 5 мкг/мл + все изученные концентрации амантадина; арбидол 10 мкг/мл+ все изученные концентрации амантадина) увеличивали эффект арбидола на вирусную репродукцию по сравнению с эффектом, оказываемым арбидолом и амантадином в этих же концентрациях в отдельности, однако наибольшее усиление эффекта ингибирования наблюдалось при комбинации 5 мкг/мл арбидола с амантадином в концентрации 0,3 мкг/мл и 1 мкг/мл. Сходные данные были получены при изучении эффекта арбидола на вирусную репродукцию в комбинации с ремантадином (табл.7).

Таблица 7. Действие арбидола в комбинации с амантадином и ремантадином на репродукцию вируса гриппа А/Сингапур/1/57 в культуре клеток MDCK

Арби- дол (мкг/мл)	Процент ингибирования вирусной репродукции *									
	Амантадин (мкг/мл)					Ремантадин(мкг/мл)				
	0	0,3	1	5	10	0	0,3	1	5	10
0	-	22±2	28±3	50±2	56±5	-	25±5	31±5	56±4	59±7
1	30±5	30±1	30±2	52±2	59±3	30±6	31±6	33±6	50±6	59±9
5	38±4	60±5	68±5	74±5	81±4	38±3	63±3	71±7	74±4	82±2
10	67±8	77±4	81±9	82±8	85±3	67±6	78±8	80±5	82±5	86±6

*Для одной точки опыта использовали четыре лунки планшета, а каждое значение представляет среднее арифметическое ± среднеквадратичное отклонение, вычисленное из трех таких независимых опытов.

Изучение эффекта арбидола в сочетании с карбоксилатом озельтамивира.

Другим противогриппозным препаратом, разработанным сравнительно недавно и доступным на отечественном рынке, является ингибитор нейраминидазы - озельтамивир. В экспериментах на животных и в клинических испытаниях показано, что этот препарат эффективен при небольшой задержке лечения. Действие арбидола тем более эффективно, чем раньше начато лечение. Наши эксперименты также показали, что наибольший ингибирующий эффект активного метаболита озельтамивира - карбоксилата озельтамивира наблюдается при добавлении его к клеткам через 2 часа после их инфицирования и остается примерно на этом же уровне при добавлении препарата к клеткам в течение 5 часов после их инфицирования. Наибольший ингибирующий эффект арбидола наблюдается при добавлении к клеткам препарата за 3-4 часа до их инфицирования вирусом, в то время как добавление арбидола к клеткам после их инфицирования практически не оказывает влияния на вирусную репродукцию. Данные факты явились предпосылкой для изучения действия арбидола в сочетании с карбоксилатом озельтамивира на вирусную репродукцию при использовании трех схем внесения препаратов: оба препарата одновременно за 3 часа до инфицирования клеток, арбидол за 3 часа до инфицирования, а карбоксилат озельтамивира через 2 часа после инфицирования, оба препарата одновременно через 2 часа после инфицирования клеточной культуры (табл.8).

Полученные нами результаты показали, что во всех случаях наблюдалось увеличение эффекта препаратов, однако наибольшее усиление ингибирующего эффекта арбидола было получено при использовании третьей схемы внесения препаратов. Добавление арбидола через 2 часа после инфицирования клеток практически не вызывает ингибирования вирусной репродукции при всех концентрациях препарата, за исключением 10 мкг/мл. Добавление карбоксилата озельтамивира к клеткам через 2 часа после их инфицирования вызывает ингибирование вирусной репродукции, причем уровень ингибирования увеличивается с 36% для концентраций 0,3 мкг/мл до 52% для концентраций 40 мкг/мл.

Одновременное с карбоксилатом озельтамивира добавление арбидола в концентрации 0,3 мкг/мл к клеткам через 2 часа после их инфицирования также не увеличивает уровень ингибирования вирусной репродукции, вызываемый ими, однако, начиная с концентрации арбидола от 1 мкг/мл и выше позволяет значительно усилить эффект обоих препаратов, а при комбинациях арбидол (3 мкг/мл и выше + карбоксилат озельтамивира 3 мкг/мл) практически полностью подавить вирусную репродукцию (табл.8).

Таблица 8. Действие арбидола в комбинации с карбоксилатом озельтамивира на репродукцию вируса гриппа А/Сингапур/1/57 в культуре клеток MDCK

Арби-дол (мкг/ мл)	Процент ингибирования вирусной репродукции*											
	Время добавления (арбидол и карбоксилат озельтамивира за 3 часа до инфицирования)						Время добавления (арбидол за 3 часа до, карбоксилат озельтамивира через 2 часа после инфицирования)					
	Карбоксилат озельтамивира (мкг/мл)						Карбоксилат озельтамивира (мкг/мл)					
	0	0,3	1	3	10	40	0	0,3	1	3	10	40
0	-	24±5	25±4	30±5	35±4	38±5	-	36±4	39±8	37±6	48±5	52±5
0,3	н.и.**	60±7	60±3	79±8	80±5	87±5	н.и.	80±8	79±6	87±5	88±8	94±5
1	15±3	71±4	76±8	79±6	80±7	85±4	15±4	100	100	100	100	100
3	62±2	75±4	77±7	89±8	90±3	90±6	62±3	100	100	100	100	100
5	66±4	75±3	79±3	79±5	84±4	86±7	66±7	100	100	100	100	100
10	97±1	100	100	97±3	98±2	100	97±2	100	100	100	100	100
Арбидол (мкг/мл)	Время добавления (арбидол и карбоксилат озельтамивира одновременно, через 2 часа после инфицирования)											
	Карбоксилат озельтамивира (мкг/мл)											
	0	0,3	1	3	10	40						
0	-	36±6	39±9	37±5	48±7	52±5						
0,3	н.и.	35±5	40±6	37±7	47±5	55±6						
1	н.и.	48±5	59±8	56±5	100	100						
3	н.и.	62±7	58±7	90±8	100	100						
5	н.и.	79±8	84±8	100	98±2	100						
10	20±4	70±10	85±12	100	100	100						

*Для одной точки опыта использовали четыре лунки планшета, а каждое значение представляет среднее арифметическое \pm среднеквадратичное отклонение, вычисленное из трех таких независимых опытов.

н.и.**-нет ингибирования

Изучение эффекта арбидола в сочетании с рибавирином и рибамидилом. Нередко также при лечении тяжелых форм ОРВИ применяются рибавирин и его отечественный аналог рибамидил. Из-за высокой токсичности эти препараты применяются в условиях стационара у лиц с ослабленным иммунитетом. Арбидол, помимо вирусспецифического действия в отношении вируса гриппа, обладает иммуномодулирующим эффектом и способностью индуцировать интерферон, в связи с чем он также рекомендован для применения у больных с ослабленным иммунным статусом.

Таблица 9. Действие арбидола в комбинации с рибавирином и рибамидилом на репродукцию вируса гриппа А/Сингапур/1/57 в культуре клеток MDCK

Арбидол (мкг/мл)	Процент ингибирования вирусной репродукции*									
	Рибавирин (мкг/мл)					Рибамидил (мкг/мл)				
	0	1	3	10	15	0	1	3	10	15
0	-	5 \pm 1	25 \pm 5	30 \pm 4	38 \pm 5	-	4 \pm 2	28 \pm 6	32 \pm 5	40 \pm 5
3	н.и**	19 \pm 3	30 \pm 4	52 \pm 2	54 \pm 4	н.и	17 \pm 3	52 \pm 5	50 \pm 5	59 \pm 6
10	23 \pm 4	26 \pm 5	35 \pm 6	85 \pm 10	82 \pm 5	24 \pm 4	25 \pm 5	68 \pm 5	79 \pm 6	80 \pm 3
15	40 \pm 7	43 \pm 4	41 \pm 4	82 \pm 3	80 \pm 6	38 \pm 4	41 \pm 6	42 \pm 4	72 \pm 3	84 \pm 8
20	55 \pm 6	65 \pm 5	68 \pm 5	80 \pm 5	82 \pm 7	54 \pm 6	71 \pm 7	72 \pm 6	80 \pm 5	86 \pm 7

*Для одной точки опыта использовали четыре лунки планшета, а каждое значение представляет среднее арифметическое \pm среднеквадратичное отклонение, вычисленное из трех таких независимых опытов.

н.и.*-нет ингибирования

Изучение действия арбидола в комбинации с рибавирином показало, что добавление рибавирина к арбидолу во всех случаях увеличивало его ингибирующий эффект, однако степень увеличения была различна в зависимости от концентраций препаратов. Наибольшее усиление ингибирующего эффекта обоих препаратов наблюдалось при следующих их комбинациях: арбидол 3 мкг/мл + рибавирин 1 мкг/мл; арбидол 10 мкг/мл + рибавирин 10 мкг/мл; арбидол 15 мкг/мл + рибавирин 10 мкг/мл. Добавление к различным концентрациям арбидола рибамидила также во всех случаях увеличивало ингибирующее действие арбидола на вирусную репродукцию, однако наибольшее усиление ингибирующего эффекта арбидола и рибамидила

наблюдалось при следующих их комбинациях : арбидол 3 мкг/мл+ рибамидил 1 мкг/мл; арбидол 3 мкг/мл+ рибамидил 3 мкг/мл; арбидол 10мкг/мл + рибамидил 3 мкг/мл; арбидол 10мкг/мл + рибамидил 10 мкг/мл (табл. 9).

Изучение эффекта арбидола в сочетании с анальгином и ацетилсалициловой кислотой Для облегчения течения гриппозной инфекции наряду со средствами этиотропной терапии используются симптоматические препараты. В качестве таких препаратов при ОРВИ для ослабления головной и мышечной боли, ломоты, понижения лихорадки используются анальгин и аспирин. Изучение эффекта арбидола на репродукцию вируса А/Япония/305/57 (H2N2) в культуре клеток MDCK в сочетании с анальгином и ацетилсалициловой кислотой показало, что добавление анальгина или ацетилсалициловой кислоты в концентрациях 0,3 мкг/мл, 1 мкг/мл, 5 мкг/мл и 10 мкг/мл практически не оказывало влияния на эффект арбидола по сравнению с его эффектом на вирусную репродукцию в отсутствие этих препаратов и не снижало его ингибирующего действия на вирусную репродукцию в культуре клеток.

Таким образом, изучение действия арбидола в сочетании с различными противогриппозными препаратами, обладающими отличным от арбидола механизмом действия, показало, что комбинация каждого из этих препаратов с арбидолом увеличивает их эффект на вирусную репродукцию в культуре клеток. Это позволяет для достижения того же самого эффекта при комбинации арбидола с ремантадином, амантадином, рибавирином и рибамидилом использовать более низкие концентрации последних, а при комбинации с озельтамивиром также начинать лечение арбидолом на более позднем этапе. Добавление к культуре клеток совместно с арбидолом симптоматических препаратов анальгина и ацетилсалициловой кислоты не снижало его ингибирующего действия на вирусную репродукцию.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши исследования показали, что арбидол является противовирусным препаратом, с отсутствием штаммовой специфичности в отношении вирусов гриппа типов А и В, не уступающим по степени активности другим противогриппозным препаратам и обладающим широким спектром действия относительно возбудителей ОРВИ. Полученные данные о широком спектре активности арбидола в отношении ряда ОРВИ, для профилактики и лечения которых в настоящее время не существует вакцин и эффективных препаратов, позволяют рассматривать арбидол как препарат, не требующий проведения предварительной лабораторной диагностики перед началом лечения им. Проведенные нами исследования доказывают наличие у арбидола вирусспецифического механизма действия, заключающегося в том, что он

ингибирует процесс слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом, взаимодействуя с НА вируса гриппа и увеличивая его стабильность к конформационным изменениям, необходимым для осуществления этого слияния. Комбинированное использование арбидола с другими противогриппозными препаратами, обладающими отличным от него механизмом действия, увеличивает их ингибирующий эффект на вирусную репродукцию. Полученные данные с полным основанием позволяют отнести арбидол к этиотропным препаратам первой линии защиты от гриппа. Наши результаты также являются обоснованием для существенного расширения возможностей моно- и комбинированной химиотерапии ОРВИ арбидолом, а также оптимизации его применения для более рационального и в то же время эффективного использования в клинической практике.

ВЫВОДЫ:

1. Арбидол в клеточных культурах в одинаковой степени ингибирует репродукцию антигенных серотипов вирусов гриппа А человека H1N1, H2N2, H3N2, а также ремантадинчувствительных и ремантадинрезистентных штаммов вирусов гриппа А.
2. Арбидол ингибирует репродукцию вирусов гриппа птиц А : H5N1и H9N2, вызвавших заболевания у людей, H6N1 и H9N2, имеющих общие с H5N1 и H9N2 внутренние гены, а также H5N2 и H5N3, изолированных от диких птиц на территории России.
3. Арбидол ингибирует в различных клеточных культурах репродукцию вирусов гриппа В и С, аденовируса и респираторно-синцитиального вируса.
4. Максимальный противовирусный эффект арбидола в клеточных культурах наблюдается при его добавлении за 3-4 часа до инфицирования клеточной культуры и коррелирует с моментом достижения его наивысшей концентрации в клетках, что подтверждает особую эффективность использования арбидола на ранних стадиях заболевания, а также в профилактических целях.
5. Арбидол ингибирует одну из ранних стадий вирусной репродукции, подавляя слияние липидной оболочки вируса с мембранами эндосом, происходящее внутри клеток. Арбидол не влияет на адсорбцию вируса гриппа и его нейраминидазную активность, а также на вирусную транскрипцию и трансляцию.
6. Исследования с реассортантами между А/ВЧП/Вейбридж/ (H7N7) и А/Сингапур/1/57 (H2N2), имеющими различный набор генов, показали, что

чувствительность реассортантов к арбидолу определяется геном, кодирующим НА.

7. Впервые в культуре клеток получены и охарактеризованы мутанты, резистентные к арбидолу. Определение нуклеотидной последовательности мутантов, резистентных к арбидолу, показало, что все они имеют аминокислотные замены в различных положениях субъединицы НА2 НА вируса гриппа.

8. Слияние липидной оболочки вируса с клеточными мембранами у арбидол-резистентных мутантов происходит при более высоком рН, чем у вируса дикого типа. Арбидол не вызывает конформационных изменений НА у резистентных к нему мутантов, в то время как его добавление к НА вируса дикого типа вызывает сдвиг конформационного перехода НА.

9. Комбинированное использование арбидола с каждым из изученных противовирусных препаратов (амантадин, ремантадин, рибавирин, рибамидил, карбоксилат озельтамивира) увеличивало их эффект подавления вирусной репродукции в культуре клеток по сравнению с эффектом, оказываемым этими же концентрациями препаратов в отдельности. Во всех случаях наибольшее усиление ингибирующего эффекта было получено при использовании низких доз препаратов, а при комбинированном использовании арбидола с карбоксилатом озельтамивира также и при более позднем добавлении арбидола к клеткам.

10. Добавление симптоматических препаратов анальгина и ацетилсалициловой кислоты совместно с арбидолом не снижало его ингибирующего действия на вирусную репродукцию в культуре клеток.

11. Показано, что химический ряд производных 5-оксииндолов, к которым относится арбидол, является перспективным для поиска соединений, обладающих противовирусной активностью. Из 47 соединений, изученных в отношении их способности ингибировать репродукцию вируса гриппа А, и из 7 соединений, изученных в отношении их способности ингибировать репродукцию РСВ, в культуре клеток, было выявлено соответственно 17 и 4 соединения, сопоставимых по активности с арбидолом.

12. Полученные данные доказывают наличие у арбидола вируссpezifического действия, позволяющего отнести его к этиотропным препаратам первой линии защиты против гриппозной инфекции. Доказательства вируссpezifического действия арбидола являются основанием для включения арбидола в перечень этиотропных средств для химиотерапии ОРВИ и продолжения клинических исследований по оптимизации его применения при моно- и комбинированной терапии ОРВИ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Melnikov S.Ja., Mikhejeva A.V., **Leneva I.A.**, Ghendon Yu. Z. Interaction of M1 protein and RNP of fowl plague virus in vitro // *Virus Research*, 1985, № 3. P. 353-365.
2. **Ленева И.А.**, Гулак П.В., Дубров Ю.Н., Соболев А.С. Действие ремантадина на слияние липидной оболочки вируса гриппа А с плазматическими и внутренними мембранами в лимфобластоидных клетках // *Бюллетень экспериментальной биологии*, 1990, № 4. С. 483-485.
3. Глушков Р.Г., Фадеева Н.И., **Ленева И.А.**, Герасина С.Ф., Буданова Л.И., Соколова Н.Д., Стебаева Л. Ф., Федякина И.Т. Молекулярно-биологические особенности действия арбидола-нового противовирусного препарата // *Хим.-фарм. журнал*, 1992, № 2. С. 8-15.
4. Фадеева Н.И., **Ленева И.А.**, Панишева Е.К., Буссе Т.Л., Христова М.Л., Граник В.Г., Харитоненков И.Г. Ингибиторы ранних стадий вирус-клеточного взаимодействия среди производных 3-этоксикарбонил-5-окси-6-броминдола // *Хим.-фарм. журнал*, 1992, № 9. С. 9-11.
5. Fadeeva N.I., **Leneva I.A.**, Khristova M.L., Fedyakina I.T., Kharitonenkov I.G. Monoclonal antibodies influenza virus ELISA-kits in determination of antiviral activity // 6th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Seville, Spain, 28-31 March.-1993.
6. Романова О.Б., Иванюк Т.В., Кадушкин А.В., Фадеева Н.И., **Ленева И.А.**, Николаева И. С., Петерс В.В., Крылова Л. Ю., Граник В.Г., Гуськова Т.А. Синтез и исследование противовирусной активности енаминодикетопов, замещенных при атоме азота гидроксилсодержащими группам // *Хим.-фарм. Журнал*, 1993, № 10. С. 23-26.
7. Fadeeva N.I., **Leneva I.A.**, Glushkov R.G., Fedyakina I.T. The effect of new antiviral drug Arbidol on influenza virus reproduction // 18th International Congress of Chemotherapy, Stockholm, Sweden, June 27-July 2, 1993, Abstr.1463. P.366.
8. Рябова С.Ю., Трофимкин Ю., Кадушкин А.В., Николаева И. С., Гуськова Т.А. Фадеева Н.И., **Ленева И.А.**, Граник В.Г. Синтез и исследование противовирусной активности ряда азагетероциклов, имеющих в качестве заместителей гидроксилсодержащие агенты // *Хим.-фарм. журнал*, 1993, № 9. С.32- 34.
9. **Leneva I.A.**, Fadeeva N.I., Fedyakina I.T., Khristova M.L., Kharitonenkov I.G. The study of a new antiviral drug arbidol using ELISA kits // *Antiviral Research*, 1993,- V.20, S(1). P.173
10. **Ленева И.А.**, Фадеева Н.И., Федякина И.Т., Гуськова Т.А., Христова М.Л., Соколова М.В., Харитоненков И.Г. Применение иммуноферментной индикации вирусспецифических антигенов в изучении нового противовирусного препарата // *Хим.-фарм. журнал*, 1994, № 9. С. 4-15.
11. **Leneva I.A.**, Fadeeva N.I., Fedyakina I.T. The study of effect of a new antiviral drug arbidol on different stages of viral reproduction // *Antiviral Research*, 1994,

V.23, S(1). P. 187.

12. **Leneva I.A.**, Fedyakina I.T., Fadeeva N.I., Guskova T.A. The effect of a new antiviral drug arbidol on influenza virus replication // Xth International Congress of Virology, Jerusalem, Israel, 11-16 August, 1996. Abs. PW30-11.

13. **Leneva I.**, Hay A. The mechanism of action of arbidol against influenza A virus. Selection and characterization of arbidol-resistant mutants // 18th Meeting of American Society of Virology, Amherst, Massachusetts, USA, 10-14 July, 1999. Abs. W27-6.

14. Гуськова Т.А., **Ленева И.А.**, Федякина И.Т., Чистяков В.В., Глушков Р.Г. Изучение кинетики арбидола и его влияния на репродукцию вируса гриппа А в культуре клеток МДСК // Хим.-фарм. журнал, 1999, № 6. С.14-17.

15. **Leneva I.**, Roberts N., Govorkova E., Goloubeva O., and Webster R.G. 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 Research, 2000, V. 48. P. 101-115.

16. Glushkov R., Guskova T., **Leneva I.**, Krylova L. The new data of Arbidol activity // XVI International Symposium on Medical Chemistry, Bologna, Italy, 2000. P.561.

17. Hoffmann E., Stech J., **Leneva I.**, Krauss S., Scholtissek C., Chin P., Peiris M., Schortridge K., Webster R. Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in Southern China: was H6N1 a derivate or a precursor of H5N1? // Journal of Virology.-2000, V.74. P.6309-6315.

18. **Leneva I.**, Goloubeva O., Fenton R., Tisdale M., and Webster R.G. Efficacy of zanamivir against avian influenza A viruses that possess genes encoding H5N1 internal proteins and are pathogenic in mammals // Antimicrob.Agents Chemotherapy, 2001, V.45, P. 1216-1224.

19. Govorkova E.A., **Leneva I.A.**, Goloubeva O.G., Bush K., Webster R.G. Comparison of the efficacy of RWJ-270201, zanamivir, and oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses // Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 2001, V.45. P. 2723-2732.

20. **Leneva I.**, Hay A. The mechanism of action of arbidol against influenza virus-selection and characterization of arbidol-resistant mutants // 12th International Congress of Virology, Paris, 2002. Abs.1077.

21. **Ленева И.А.**, Федякина И.Т., Соколова М.В., Гуськова Т.А. Использование иммуноферментного анализа для изучения действия противовирусного препарата на репродукцию респираторно-синцитиального вируса // Вопросы вирусологии, 2002, № 2. С. 42-45.

22. **Ленева И.А.**, Гуськова Т.А., Глушков Р.Г. Лекарственные средства для химиотерапии и химиопрофилактики гриппа: особенности механизма действия, эффективность и безопасность (обзор) // Хим.-фарм. журнал, 2004, № 11. С.8-14.

23. **Ленева И.А.**, Федякина И.Т., Фадеева Н.И., Гуськова Т.А., Глушков Р.Г. Изучение противовирусной активности препарата арбидол в культурах клеток //

Новые лекарственные препараты, 2004, №. 11. С. 16-21.

24. Ленева И.А. Арбидол-эффективный препарат для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ у детей // Русский медицинский журнал, 2005, № 13. С.72-75.

25. Leneva I., Shuster A., Hay A., Glushkov R. The Features of Antiviral Action of Arbidol. Selection and Characterization of Arbidol-Resistant Mutants. Antiviral Research, 2005, V. 11. Abs. 122.

26. 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 // Терапевтический архив, 2005, № 8. С. 84-88.

27. Leneva I., Shuster A., Fedyakina I., Glushkov R. Sensitivity of Different Strains of Influenza Viruses to Arbidol. Combination Study of Arbidol in Cell Culture with Other Antivirals // XIII International Congress of Virology, San Francisco, California, USA, July 23-28, 2005, Abs. V-33. P.7.

Типография ООО «Телер»
127299 Москва, ул. Космонавта Волкова, 12
тел.: 937-86-64, 156-40-84

Подписано в печать 21.09.2005 г. Формат 60х90 1/16. Тираж 120 экз.
Бумага «Снегурочка» 1,5 печ.л. Заказ № П 666

№ 17 072

РНБ Русский фонд

2006-4

11615