

УДК616.98:578.833.29]-06:616.61-008.6]-085.37:582.272.4]-092.4

И.Г. Максема, И.Д. Макаренкова

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток)

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ФУКОИДАНОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ХАНТАВИРУСОМ

Ключевые слова: хантавирусная инфекция, фукоидан, макрофаг.

Исследована вирусингибирующая активность фукоиданов бурых водорослей с учетом их структурных особенностей в опытах *in vivo* при хантавирусной инфекции у мышей. Установлено, что фукоиданы из бурых водорослей *Laminaria japonica* и *Laminaria cichorioides* обладают свойством подавлять инфекционность хантавируса в отношении перитонеальных макрофагов мышей преимущественно в начальную фазу инфекционного процесса. Положительный эффект фукоиданов из фукусовых и ламинариевых водорослей в той или иной степени был выявлен для каждого из испытанных препаратов на 10, 14 и 21-е сутки. Высокая противовирусная активность препаратов в разгар инфекции (10–14-й день) связана, по-видимому, с их иммуномодулирующим действием.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) входит в группу хантавирусных инфекций и регистрируется в России на многих территориях, включая европейскую часть страны и районы Дальнего Востока. Разнообразная клиническая картина, нередкое возникновение неотложных состояний у больных обуславливают сложность терапии и делают лечение этого природно-очагового заболевания важной проблемой для здравоохранения России [1].

Большинство авторов придают ведущее значение патогенетической терапии с учетом главных клинико-патогенетических синдромов болезни. В то же время в последние годы все большую популярность завоевывает этиотропное лечение и терапия иммуномодулирующими препаратами [1, 2]. Известно, что оболочечные гликопротеины G1 и G2 хантавирусов ответственны за взаимодействие вируса с рецепторами цитоплазматических мембран. Проникновение вируса в клетку-мишень осуществляется путем рецепторно-опосредованного эндоцитоза, с помощью (33-интегринов, которые являются оболочечными поверхностными рецепторами эндотелиальных клеток, тромбоцитов и макрофагов [1, 8, 9].

При наличии чувствительных клеток и условий для репродукции вируса достаточно прервать первую стадию прикрепления вирусных частиц к поверхности клетки, чтобы остановить развитие вирусной инфекции задолго до мобилизации специфических механизмов иммунологической защиты организма. Существуют два различных по патогенетическим точкам приложения способа защиты от хантавирусной инфекции: путем воздействия на рецепторы вируса [9] и за счет блокады клеточных рецепторов [8]. В обоих случаях блокируются начальные этапы вирусной репродукции, связанные с прикреплением вируса к оболочке восприимчивой клетки и его внедрением в цитоплазму.

По результатам изучения процессов, протекающих в инфицированных вирусами клетках, известно, что нарушение нормальной конфигурации клеточных мембран вызывает снижение способности чувствительных клеток адсорбировать вирус, что, вероятно, связано с уменьшением количества клеточных рецепторов [4]. В этом плане несомненный интерес представляет группа сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей — фукоиданов, способных избирательно реагировать с некоторыми белками и специфически модифицировать клеточную поверхность [5]. Фукоиданы представляют большой практический интерес благодаря широкому спектру биологической активности: антикоагулянтной, иммуномодулирующей, антипролиферативной, противоопухолевой, противовоспалительной, противовирусной и т.д. [5]. Известно, что фукоиданы из ламинариевых и фукусовых водорослей различаются по степени сульфатирования, молекулярной массе, моносахаридному составу, что, очевидно, является следствием существенных различий в путях биосинтеза данных полисахаридов и причинах проявляемой ими той или иной биологической активности [5].

Нами ранее были получены интересные данные о влиянии сульфатированных полисахаридов на адсорбцию вируса Хантаан, возбудителя ГЛПС, в опытах *in vitro* [3]. Недавно Ф.А. Фадеевым и др. [6] были представлены данные о возможности изменения рецепторной специфичности энтеровирусов при репродукции *in vitro* и *in vivo*. Резонно предположить, что изменчивость данного признака при репродукции *in vivo* может играть существенную роль и в патогенезе хантавирусной инфекции.

Целью настоящей работы было изучение вирусингибирующей активности фукоиданов бурых водорослей с учетом их структурных особенностей в опытах *in vivo*.

В эксперименте использовали вирус Хантаан (прототипный штамм 76-118, выделенный от полевой мыши *Apodemus agrarius koreae*, Корея) в титре 3,1 фокус-формирующие единицы/мл.

Животные: неинбредные мыши-самцы, массой 16–18 г. Мыши содержались в стандартных условиях вивария с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных. Мышей выводили из опыта эфирным наркозом, согласно правилам работы с экспериментальными животными.

Таблица

Влияние фукоиданов на число инфицированных вирусом Хантаан макрофагов у мышей (нМФА), %

Группа	Число инфицированных макрофагов в различное время с момента заражения (М±m)												
	часы								сутки				
	0,5	1	2	4	6	24	48	72	7	10	14	21	35
1-я	57±3,6	49±5,0	16±2,6	61±5,5	50±3,6	33±3,7	19±3,9	24±4,3	54±4,1	59±4,9	50±5,0	23±4,2	35±4,8
2-я	10±2,2	26±4,4	11±2,3	25±4,3	26±3,1	33±3,2	45±4,9	20±4,0	40±3,7	20±4,0	28±4,5	10±3,0	23±4,2
p	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	1,00	0,00	0,49	0,01	0,00	0,00	0,02	0,06
3-я	18±2,7	47±4,9	19±3,1	40±4,9	28±3,5	52±4,2	30±4,6	21±4,1	43±3,8	33±4,7	25±4,3	16±3,7	22±4,1
p	0,00	0,78	0,46	0,01	0,00	0,00	0,07	0,61	0,05	0,00	0,00	0,21	0,04
4-я	73±3,3	53±4,9	10±2,4	39±3,9	37±3,6	48±4,0	12±3,3	27±4,4	42±3,7	33±4,7	33±4,7	30±4,6	29±4,5
p	0,01	0,57	0,09	0,00	0,01	0,01	0,17	0,63	0,03	0,00	0,01	0,26	0,36

Примечание. Для оценки значимости различий при нормальном распределении количественных признаков использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок. Выборочные параметры, приведенные в таблице, имеют следующие обозначения: средняя арифметическая (М), средняя ошибка средней арифметической (m), p — значимость различий между показателями контрольной и опытных групп.

В работе исследованы сульфатированные полисахариды из различных видов морских бурых водорослей. Выделение, изучение химического состава и структуры фукоиданов проведены в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН с применением современных методов исследования и любезно предоставлены нам д-ром хим. наук Т.Н. Звягинцевой:

1. Фукоидан из бурой водоросли *Laminaria japonica* является ос-Л-фуканом, сульфатированным в основном по С-4 остаткам фукозы (М.м. 10–30 кДа), отличается высоким содержанием галактозы. Моносахаридный состав представлен галактозой, маннозой, ксилозой и глюкозой в соотношении - 65:20:8:4:3;
2. Фукоидан из бурой водоросли *Laminaria cichorioides* представляет собой полностью сульфатированный 1n>3-ос-Б-фукан (М.м. 40–80 кДа);
3. Фукоидан из бурой водоросли *Fucus evanescens* является 1 3;1 И-ос-Б-фуканом, сульфатированным в основном по С-2 остаткам фукозы (М.м. 40–60 кДа). Моносахаридный состав представлен галактозой, ксилозой и маннозой в соотношении 70:9:10:8. Соотношение фукозы и сульфата составляет 1:0,9.

Отрабатывали лечебно-профилактическую схему лечения животных. Под наблюдением находились следующие группы мышей (по 36 особей в каждой): 1-я группа (контроль) — мыши, зараженные внутрибрюшинно в дозе 0,5 мл; 2-я группа — инфицированные мыши, которым за 5 дней до заражения и в течение 5 дней после заражения вводили препарат фукоидан из *L. japonica* внутримышечно по 100 мкг, что соответствует дозе 5 мг/кг; 3-я группа — инфицированные мыши, которым фукоидан из *L. cichorioides* введен по схеме 2-й группы; 4-я группа — инфицированные мыши, которым фукоидан из *F. evanescens* введен по схеме 2-й группы.

Наблюдение за животными вели 35 суток. Исследование перитонеальных макрофагов у зараженных мышей проводили через 30 мин, 1, 2, 4, 6, 24, 48 и 72 часа, 7, 10, 14, 21 и 35 суток. Макрофаги как объект

исследования выбраны в связи с тем, что при изучаемой инфекции они являются клетками-мишенями для вируса. Клетки экссудата собирали промыванием перитонеальной полости животных 5 мл среды 199, содержащей гепарин (5 ед./мл). Полученную клеточную взвесь центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об./мин и отмывали от гепарина 2 раза. Концентрацию клеток доводили до 5×10^6 кл./мл в среде 199. Взвесь клеток указанной концентрации наносили на покровные стекла и оставляли в термостате при 37°C на 30 мин для адгезии макрофагов и затем фиксировали в течение 40 с в холодном 96° этаноле.

Противовирусную активность полисахаридов оценивали с помощью непрямого метода флюоресцирующих антител (нМФА) по их способности снижать процент инфицированных перитонеальных макрофагов. Постановку реакции осуществляли по стандартной методике с использованием иммунной сыворотки к вирусу Хантаан, полученной в результате заражения лабораторных 3–4-недельных крыс, и люминесцирующей сыворотки против глобулинов мыши (ИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва).

В результате исследований установлено, что фукоиданы из бурых водорослей *L. japonica* и *L. cichorioides* обладают свойством подавлять инфекционность хантавируса в отношении перитонеальных макрофагов мышей преимущественно в начальную фазу инфекционного процесса. Так, полисахарид из *L. japonica* снижал через 30 мин после заражения число инфицированных клеток у животных в 5,7 раза, а через 1 час — в 1,9 раза по сравнению с контрольной группой (табл.). Фукоидан из бурой водоросли *L. cichorioides* проявлял менее выраженную защиту в первые 30 мин инфекционного процесса: количество зараженных клеток в препарате было снижено по сравнению с контролем в 3,2 раза. Через 2 часа после заражения происходило снижение показателя инфицированных макрофагов во всех группах, что может быть связано с распадом белковой оболочки вируса и высвобождением нуклеиновой кислоты [4]. В следующие 4–6

часов полисахарид из *L. japonica* снижал число инфицированных клеток у животных в среднем в 2,2 раза, а полисахарид из *L. cichorioides* — в 1,7 раза. Иная картина наблюдалась в группе зараженных хантавирусом мышей, получавших фукоидан из бурой водоросли *F. evanescens*: защитный эффект у животных в первые 6 часов был мало выражен.

Дальнейшие исследования, проведенные в течение 1-й недели после заражения (24, 48 и 72 часа и 7 суток), показали, что количество инфицированных макрофагов в контрольных и опытных группах мышей практически не отличалось. В то же время положительный эффект фукоиданов из фукусовых и ламинариевых водорослей в той или иной степени был выявлен для каждого из испытанных препаратов на 10, 14 и 21-е сутки. Анализируя результаты исследований, следует отметить, что фукоидан из *L. japonica* оказывает наиболее выраженное защитное действие. Показатель инфицированных клеток при использовании этого полисахарида по сравнению с контролем на 10–21-й день снижался в среднем в 2,3 раза. При применении других сульфатированных полисахаридов различие в показателях пораженных вирусом макрофагов в опытах по сравнению с контролем было менее выражено. В отдаленные сроки экспериментальной хантавирусной инфекции (35-е сутки) показатели контроля и опыта в данной лечебно-профилактической схеме не различались.

В результате проведенных исследований установлено, что фукоиданы ламинариевых водорослей эффективно защищают мышей от хантавируса на начальном этапе развития инфекционного процесса. Снижение числа инфицированных перитонеальных макрофагов у животных в первые 30 мин и 1 час после заражения, возможно, связано со способностью фукоиданов из *L. japonica* и *L. cichorioides* блокировать проникновение вируса в клетки путем конкурентного взаимодействия с αV(33-рецепторами ((33-интегрины). Однако, учитывая широкий спектр инфицированных тканей при ГЛПС и пантропизм возбудителя, резонно предположить, что наличие рецепторов — (33-интегринов — не всегда определяет чувствительность клетки к хантавирусу. Кроме этого в литературе имеются данные об использовании хантавирусами корешков для инфицирования клеток-мишеней [10]. Это наводит на мысль о том, что на клеточных мембранах, по-видимому, не существует специфичных, строго гомологичных и высокоаффинных рецепторов к белкам G1 и G2, способных реализовать проникновение вируса в клетки организма человека, и механизм вирусно-клеточного взаимодействия является многофакторным [9]. Подтверждением данного предположения служит также обнаружение двух частично перекрывающихся антигенных сайтов на белке G1 и семи — на белке G2 с различными функциональными свойствами [7]. Поэтому изучение важнейшего для раннего патогенеза хантавирусной инфекции вопроса о механизмах вирусно-клеточно-

го взаимодействия в первые часы инфекции является целью наших дальнейших исследований.

Несмотря на то, что сульфатированные полисахариды в той или иной степени подавляли первичное размножение хантавируса у инфицированных белых мышей, они не оказывали полного ингибирующего действия на инфекционный процесс. С течением времени вирус достигал оптимальной концентрации и показатель инфицированных макрофагов практически не отличался в опытных и контрольной группах. Высокая противовирусная активность препаратов в разгар инфекции (10–14-й день) связана, по-видимому, с их иммуномодулирующим действием. Полученные результаты позволяют, на наш взгляд, сделать предположение о том, что фукоиданы морских водорослей обладают способностью стимулировать напрямую или опосредованно (через продукцию цитокинов клетками) выработку специфических антител.

Патогенез хантавирусной инфекции включает в себя несколько стадий, начиная с участия клеток респираторного тракта в раннем иммунном ответе и заканчивая развитием полиорганной недостаточности, основой которой является вовлечение в инфекционный процесс обширной поверхности сосудистого эндотелия, клеток крови и тканевых макрофагов [1]. При этом инфицирование нового органа или ткани в начальный период болезни может быть следствием взаимодействия вируса с альтернативным клеточным рецептором. Данное направление исследований представляется перспективным в плане разработки новых подходов к процессу прерывания адсорбции вируса на чувствительных клетках.

Литература

1. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом / Р.А. Слонова, Е.А. Ткаченко, В.А. Иванис и др. — Владивосток: Примполиграфкомбинат, 2006.
2. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Ковальчук А.В. и др. // Вopr. вирусол. - 2006. - №2. - С. 34-36.
3. Макаренко И.Д., Компанец Г.Г., Беседнова Н.Н. и др. // Вopr. вирусол. - 2007. - №2. - С. 29-32.
4. Соловьев В.Д., Баландин И.Г. Клетка и вирус. — М.: Медицина, 1973.
5. Усов АМ. // Химия и технология растительных веществ : тез. докл. II Всерос. конф. — Казань, 2002. — С. 91.
6. Фадеев Ф.А., Сергеев А.Г., Новоселов А.В. // Вopr. вирусол. - 2008. - №1. - С. 4-9.
7. Arikava J., Yao J.S., Yoshimatsu K. et al. // Arch. Virol. - 1992. - Vol. 126, No. 1-4. - P. 271-281.
8. Gavrilovskaya I., Brown E., Ginsberg M. et al. // J. Virol. - 1999. - Vol. 73, No. 5. - P. 3951-3959.
9. Hall P.R., Hjelle B., Brown D.C. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. — 2008. — [Epub ahead of print].
10. Krautkramer E., Zeier M. // J. Virol. - 2008. - Vol. 82, No. 9. - P. 4257-4264.

Поступила в редакцию 21.05.2008.

ANTIVIRAL ACTIVITY OF FUKOIDANS OF NATURAL ORIGIN AT THE EXPERIMENTAL INFECTION CAUSED BY HANTAVIRUS

I.G. Maksema, I.D. Makarenkova

Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Siberian branch of the Russian Academy of Medical Science (Vladivostok)

Summary — The virus inhibiting activity of the fukoidans of the brown seaweed in view of their structural features in experiences in vivo at hantavirus infection at mice is investigated. It is found, that fukoidans from brown seaweed *Laminaria japonica* and

Laminaria cichorioides possess property to suppress the hantavirus infection to the peritoneal macrophages of mice mainly in an initial phase of infectious process. The positive effect of fukoidans from fukus and laminaria seaweed has been to some extent revealed for each of the tested preparations on 10, 14 and 21st day. High antiviral activity of preparations in peak of an infection (10—14th day) is connected, with their immune modulating action.

Keywords: hantavirus infection, fukoidans, macrophage.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 2, p. 86-89.

УДК 577.112:578.833.29

Н.Х. Мухаметханов¹, А.Х. Баймиев²

¹ Филиал НПО «Микроген» МЗ РФ «Иммунопрепарат», ² Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА G2 ХАНТАВИРУСА СЕРОТИПА PUUMALA

Ключевые слова: вирус *Puumala*, гликопротеин G2, рекомбинантный белок.

От инфицированных мышевидных грызунов выделены и амплифицированы фрагменты М-сегмента, кодирующие оболочечный гликопротеин G2 хантавируса *Puumala*. Точные нуклеотидные последовательности гена определены и клонированы в экспрессирующий вектор Pin-Point. Некоторые антигенные характеристики рекомбинантного белка были установлены в ELISA.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — довольно распространенное заболевание на территории России. Различают два очага инфекции: на Дальнем Востоке и на территории Европейской части страны. Заболеваемость на территории Европейской части России в Республике Башкортостан занимает первое место, превышая показатели по стране в 8—15 раз, и составляет 40—60%. Этот очаг является одним из самых крупных и активных не только в России, но и в бывшем СССР [3]. Актуальность проблемы обусловлена отсутствием тенденции к снижению заболеваемости, тяжестью инфекционного процесса и количеством осложнений, что представляет большую опасность для трудоспособного населения. Кроме того, серьезную озабоченность вызывает то, что патологический процесс протекает в виде стертых, атипичных форм [5, 7]. Таким образом, в республике сложилась крайне напряженная эпидемиологическая ситуация, а следовательно, проблема разработки лечебных и профилактических средств является весьма актуальной [4].

В настоящее время проводятся исследования по созданию генно-инженерных конструкций, кодирующих поверхностные гликопротеины G1 и G2 вируса, относящегося к роду хантавирусов семейства буньявирусов [8, 10], которые в дальнейшем могут быть использованы как для получения тест-систем, так и ДНК-вакцины и вакцины на основе очищенных белков вируса [1, 6]. Геном отрицательной полярности включает три сегмента: большой (L), средний

(M) и малый (S). L-сегмент кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу с молекулярной массой 250 кДа, которая обладает также эндонуклеазной функцией и, возможно, рядом других [11]. М-сегмент кодирует два поверхностных гликопротеина G1 и G2 в виде одного предшественника с молекулярной массой 113—120 кДа, который посттрансляционно расщепляется и гликолизуется в эндоплазматическую сеть. Предполагается, что гликопротеины ответственны за присоединение и слияние с клеткой, а также за образование вируснейтрализующих антител [9, 12]. S-сегмент кодирует нуклеокапсидный белок с молекулярной массой 54 кДа. Данный белок выполняет как структурную функцию — связывается с РНК и гликопротеином G1, так и регуляторную — переключает трансляцию хантавируса на репликацию и наоборот [13].

От рыжих полевок, отловленных на территории Уфимского, Иглинского, Благовещенского и Туймазинского районов Республики Башкортостан, были отобраны образцы, которые в иммуноферментном анализе давали положительную реакцию на антигены хантавируса. Тотальная клеточная РНК была выделена из ткани легких зараженных грызунов массой 0,5 г с помощью гуанидинтиоцианатного метода. Ткань растирали тефлоновым пестиком в пробирке типа Эппендорф в буфере следующего состава: 4 М гуанидинтиоцианат, 2% саркозил. 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 10 мМ ЭДТА, 1% (3-меркаптоэтанол. Далее добавляли 0,2 объема 10% додецилсульфата натрия, 0,1 объема 2М ацетата натрия (рН 4,0), 0,2 объема хлороформа и 1 объем фенола. Экстракцию проводили на шейкере в течение 1 часа. После депротенинизации вирионов смесью фенола (рН 5,0) и хлороформа РНК осаждали изопропанолом. Осадок РНК после двукратной промывки 70% этанолом растворяли в воде, обработанной диэтилпиروкарбонатом. Синтез