

УДК 578.832.1: 615.281.8

ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТНЫХ ШТАММОВ H1N1 И H7N7 ВИРУСА ГРИППА УСТОЙЧИВЫХ К КОММЕРЧЕСКИМ АНТИВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ

**Коротецкий И.С., Зубенко Н.В., Шилов С.В., Иванова Л.Н.,
Швидко С.В., Токсанбаев Р.Д.**

*Научный центр противоифекционных препаратов
ул. Ауэзова, 84, г. Алматы, Казахстан
lab.virus@mail.ru*

АБСТРАКТ

В статье представлены материалы по адаптации штаммов вируса гриппа A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) и A/Swine/Iowa/30 (H1N1) к коммерческим противовирусным препаратам адамантанового ряда («Ремантадин») и ингибитору нейраминидазы («Тамифлю»). Для определения стабильности фенотипа устойчивости полученные мутантные штаммы культивировали в отсутствие противовирусных препаратов в течение 5 последовательных пассажей. Значения IC_{50} «Тамифлю» для FPV_RTam и Sw_RTam составило $>0,3$ мг/мл, IC_{50} препарата «Ремантадин» составил $>0,1$ мг/мл. Определены термостабильность белка гемагглютинина и оценка активности фермента нейраминидазы. Анализ аминокислотных последовательностей показал наличие в структуре M2 белка мутантного штамма FPV_RRim замены S31N, а у мутанта Sw_RRim замены A30T, ответственных за развитие устойчивости к препарату «Ремантадин». У мутантов FPV_RTam и Sw_RTam выявлена специфическая замена в позиции N207S в строении аминокислотной последовательности белка M1. Сделано предположение о мультигенном характере возникновения устойчивости к лекарственным препаратам.

Ключевые слова: вирус гриппа, лекарственная устойчивость, «Тамифлю», «Ремантадин», секвенирование, мутации.

CHARACTERISATION OF INFLUENZA A (H1N1 AND H7N7) VARIANTS RESISTANT TO COMMERCIAL ANTIVIRAL DRUGS

**Korotetskiy I.S., Zubenko N.V., Shilov S.V., Ivanova L.N.,
Shvidko S.V., Toxanbayev R.D.**

*Scientific Centre for Anti-infectious Drugs
84, Auezov srt. Almaty, Kazakhstan
lab.virus@mail.ru*

ABSTRACT

Here, we describe the adaptation of influenza strains A/FPV/Weybridge/78 (H7N7) and A/Swine/Iowa/30 (H1N1) to the derivatives of adamantane (Rimantadine) and the neuraminidase inhibitor (Tamiflu). To determine the stability of the resistance phenotype, mutant strains were consecutively passaged in the absence of antiviral drugs for 5 passages. The IC_{50} value for FPV_RTam and Sw_RTam was >0.3 mg/ml for Tamiflu and >0.1 mg/ml for Rimantadine, respectively. Furthermore, the thermal stability of haemagglutinin and neuraminidase activity was determined in the study. Analysis of the amino acid sequence revealed the presence of a S31N substitution in the M2 protein of the FPV_RRim mutant strain, and an A30T substitution in Sw_RRim, which is responsible for the development of Rimantadine resistance. A specific substitution in position N207S of the amino acid

sequences of the M1 protein in FPV_RTam and Sw_RTam mutants was also observed. Taken together, the results suggest that the nature of drug resistance is a multigene character.

Keywords: influenza virus, drug resistance, Tamiflu, Rimantadine, sequencing, mutation.

ВВЕДЕНИЕ

Грипп, несмотря на достигнутые успехи, продолжает оставаться одной из наиболее актуальных медицинских и социальных проблем вследствие способности распространяться по всему миру и поражать широкий круг хозяев [1].

Попытки контролировать распространение вируса гриппа с помощью вакцинации затруднены скоростью, с которой вирус мутирует [2]. Вакцинация позволяет предотвратить развитие гриппа в 70-90% случаев у здоровых молодых реципиентов, тем не менее, вакцины защищают только от ограниченного круга штаммов и не являются эффективными против новых, потенциально пандемических вариантов [3].

Поэтому применение эффективных, безопасных и качественных лекарственных средств для лечения и профилактики вируса гриппа представляет большой интерес для современного общества. На сегодняшний день широко используются 2 группы противогриппозных препаратов: препараты амантаминового ряда (амантадин и ремантадин) [4], являющиеся блокаторами ионных каналов, образуемых вирусным белком M2 [5], и ингибиторы фермента нейраминидазы (занамибир и осельтамивир) [6].

Блокаторы белка M2 относятся к первому поколению препаратов, эффективных против вируса гриппа А [1, 7]. Действие ремантадина заключается в подавлении ранней стадии специфической репродукции (после проникновения вируса в клетку и до начальной транскрипции РНК). Являясь слабым основанием, ремантадин повышает рН эндосом, блокируя тем самым слияние вирусной оболочки с мембраной эндосомы, препятствуя разведению вируса и выходу генетического материала вируса в цитоплазму клетки [8].

Однако частота устойчивости к амантадину и ремантадину среди циркулирующих вирусов сезонного гриппа А резко возросла за последние десятилетия [5, 9]. Так, по итогам исследований Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) и Центра по контролю и профилактике заболеваний (Атланта, США), уровень резистентности к адамантам среди 43 стран в период 1992-1995 гг. находился на уровне 0,8% [1, 10]. В последующее десятилетие наблюдение (1995-2005 гг.) было установлено, что в странах Юго-Восточной Азии – Южной Кореи, Тайване, Гонг Конге и Китае, уровень резистентности достиг 15, 23, 70 и 74% соответственно [1]. В 2008-2009 гг. уже все протестированные изоляты вируса гриппа А/Н3N2 и вирусы нового пандемического гриппа А/Н1N1 оказались резистентными к адамантанам.

Изучение генетических основ резистентности показало, что все ремантадин-устойчивые штаммы имеют мутации в трансмембранной области белка M2 (позиции 22-46), а именно в позициях 26, 27, 30, 31, 34 [1]. При этом у мутантов изменяется структура трансмембранного домена M2 белка, что приводит к изменению структуры ионного канала вируса [11]. В результате доступность ключевого аминокислотного остатка резко ограничивается, карбоциклический остов химиопрепаратов оказывается неспособным проникнуть в полость ионного канала и, следовательно, блокировать обмен протонов [12].

Несмотря на то, что структура нейраминидазы вируса гриппа постоянно меняется, аминокислотная последовательность активного участка фермента остается постоянной, что делает ее идеальной мишенью для противовирусной терапии. Осельтамивир («Тамифлю»), подавляя активность нейраминидазы, предупреждает высвобождение образующихся вирусов из клетки хозяина и таким образом ограничивает распространение инфекции [8]. Однако широкое применение препарата «Тамифлю» привело к появлению устойчивых форм вируса, у которых регистрировались специфические мутации, отвечающие за резистентность (E119V, R292K, N275Y, N294S) [13]. В сезон 2008/2009 гг. 99,5% протестированных изолятов вирусов гриппа А/Н1N1 от больных из различных стран оказались резистентными к осельтамивиру.

Во время эпидемического сезона 2013-2014 гг. все случаи появления устойчивых к «Тамифлю» штаммов вируса гриппа были преимущественно связаны с мутацией N275Y гена нейраминидазы.

Проблема появления устойчивости вируса гриппа к препаратам приводит к ситуации, когда набор существующих противовирусных средств оказывается малоэффективным. Вследствие этого у больных наблюдается селекция устойчивых к препаратам штаммов и вероятность их появления нарастает с увеличением продолжительности лечения в клинической практике [14]. Поэтому крайне важно иметь не только как можно более широкий спектр противогриппозных препаратов с

различным механизмом действия, но также понять механизмы возникновения устойчивости и возможные способы ее преодоления.

С целью создания основы для проведения последующих исследований, направленных на изучение механизмов возникновения лекарственной устойчивости у вирусов и поиска путей ее преодоления, нами получены резистентные к препаратам «Ремантадин» и «Тамифлю» мутанты. Проведены работы по адаптации диких штаммов вируса гриппа с различной антигенной структурой к высоким концентрациям противовирусных препаратов. Кроме того, изучено влияние изменения генотипа чувствительности на фенотипические свойства полученных мутантов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток

В исследовании была использована перевиваемая культура клеток почки собаки MDCK (Madin-Darby canine kidney), полученная из коллекции культур тканей ДГП «Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности» НЦБ МОН РК. Клетки выращивали на питательной среде DMEM с добавлением 10%-ного раствора фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и раствором антибиотика-антимикотика (100 ЕД/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В) при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Вирусы

Штаммы вируса гриппа A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) и A/Swine/Iowa/30 (H1N1) были получены из лаборатории противовирусной защиты Института микробиологии и вирусологии КН МОН РК. Вирус пассировали на культуре клеток MDCK в среде DMEM в присутствии 2,0%-ного раствора ФБС при 37°C и 5% CO₂. Вирусосодержащую жидкость хранили при температуре минус 70°C до использования.

Инфекционность вирусов

Инфекционный титр штаммов вируса гриппа определяли титрованием на культуре клеток MDCK методом предельных разведений [15]. О наличии вируса судили в реакции гемагглютинации. Титр инфекционности вирусов рассчитывали по методу Reed L. и Muench H. [16].

Коммерческие противовирусные препараты

В работе использовали коммерческие противовирусные препараты «Тамифлю» (производство Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцария) и «Ремантадин» (производство АО «ОЛАЙНФАРМ», Латвия).

Определение чувствительности вирусов гриппа А к коммерческим противовирусным препаратам

Чувствительность исследуемых штаммов вируса гриппа А к препаратам «Ремантадин» и «Тамифлю» определяли по снижению титра инфекционности обработанного вируса в реакции гемагглютинации по отношению к контролю [17].

Реакция гемагглютинации (РГА)

Гемагглютинирующую активность вирусов определяли по стандартной методике [15] с использованием 0,75%-ной взвеси эритроцитов человека (I группы).

Адаптация штаммов вируса гриппа А подтипа H1N1 и H7N7 к коммерческим противовирусным препаратам

Для заражения использовали культуральные матрасы объемом 25 см² с полным монослоем клеток MDCK. Для получения устойчивых мутантов исследуемые штаммы вируса гриппа культивировали с постоянным содержанием коммерческих противовирусных веществ. Пассажи с последовательным увеличением содержания препарата «Тамифлю» в среде начинали с концентрации 0,019 мкг/мл и осуществляли до тех пор, пока концентрация не составила 0,300 мг/мл.

Аналогичные манипуляции проводили при пассировании штаммов A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) и A/Swine/Iowa/30 (H1N1) в присутствии препарата «Ремантадин». Начальная концентрация составляла 0,003 мг/мл. Пассажи с последовательным увеличением содержания «Ремантадин» в среде проводили до тех пор, пока концентрация препарата не составила 0,100 мг/мл [18].

Определение нейраминидазной активности

Активность нейраминидазы вирусов определяли стандартным тиобарбитуровым методом по Aminoff с использованием в качестве субстрата фетуина [19]. Об активности фермента судили по способности расщеплять субстрат с образованием окраски, дающей поглощение при длине волны 549 нм.

Термочувствительность гемагглютинина

Готовили аликвоты штаммов вируса гриппа А подтип H1N1 и H7N7. Пробирки инкубировали в термошейкере при 56°C в течение 15, 30, 60, 90 и 120 мин. Термочувствительность белка гемагглютинина (НА) определяли по изменению титра в РГА.

Термостабильными считались штаммы, которые сохраняли способность вызывать агглютинацию эритроцитов человека (I группа) после прогревания при 56°C в течение 30 мин.

Выделение РНК

Суммарную РНК выделяли из 200 мкл вирусосодержащей культуральной жидкости, используя набор для экстракции РНК «РИБО-сорб-12» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия), согласно методическим рекомендациям производителя.

Получение κДНК

Обратную транскрипцию осуществляли с помощью M-MLV («Invitrogen», США) в 10 мкл реакционной смеси (4,0 мкл РНК; 0,5 мкл 20 pmol праймера Uni-12 5'-agcraaacgag-3'; 2,5 мкл воды, 2,0 мкл 5x буфера для обратной транскриптазы («Invitrogen», США), 0,5 мкл 2 mM смеси dNTPs, 0,5 мкл M-MLV (10 U/мкл) («Invitrogen», США). Реакцию проводили при 42°C в течение 60 мин.

Секвенирование ДНК

Полноразмерное секвенирование генов NA и МР штаммов вируса гриппа проводили на секвенаторе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США). ДНК библиотека была получена путем фрагментирования κДНК генов NA и МР с использованием набора Ion Xpress Plus Fragment Library kit (Life Technologies, США). Баркодирование полученной ДНК библиотеки проводили при помощи набора Ion Xpress Barcode Adapters (Life Technologies, США) согласно инструкции производителя. Загрузку полученной баркодированной ДНК библиотеки осуществляли на Ion 314 Chip с последующим секвенированием на аппарате Ion Torrent PGM.

Получение контигов и поиск SNPs

Сборку полученных на секвенаторе Ion Torrent PGM ридов в контиги и последующий поиск SNPs (single nucleotide polymorphism) выполняли с использованием программного обеспечения SeqManPro из пакета программ DNASTAR Lasergene (версия 12, DNASTAR, Inc, Madison, WI).

Методы *in silico*

Структура М2 канала вируса гриппа была взята из международной базы данных Protein Data Bank (PDB). Номер доступа – 4QK7.

Компьютерный анализ структуры белка осуществлялся с использованием пакета программ «Accelrys Discovery Studio» (Accelrys Software Inc, USA) и Unipro UGENE v1.18.0 (UniPro, Russia).

Статистическая оценка

Обработку данных производили в программе Microsoft Office Excel 2003. Для статистической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок. Достоверность отличия средних значений проверяли по t-критерию Стьюдента (уровень значимости $p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка чувствительности исходных штаммов вируса гриппа А к противовирусным препаратам

Прежде чем приступить к адаптации штаммов вируса гриппа А/FPV/Waybrige/78 (H7N7) и А/Swine/Iowa/30 (H1N1), была проведена оценка их чувствительности к ингибирующему действию препарата «Ремантадин» в концентрациях от 0,100 до 0,003 мг/мл и препарата

«Тамифлю» в концентрациях от 0,300 до 0,009 мг/мл. На основании данных, полученных при фенотипическом изучении чувствительности штаммов дикого типа вируса гриппа А к действию нетоксических концентраций исследуемых веществ на репродукцию вирусов гриппа А, для каждого из исследуемых штаммов были построены типичные кривые доза-ответ, из которых были определены значения IC_{50} (концентрация препарата, при которой в культуре наблюдается 50% подавление инфекционной активности вируса) (таблица 1).

Таблица 1. Оценка значения IC_{50} коммерческих препаратов в отношении исходных штаммов вируса гриппа А

Table 1. Determination of IC_{50} value of commercial drugs against wild-type of influenza A

Штаммы Strains	IC_{50} , мг/мл IC_{50} , mg/ml	
	«Ремантадин» Rimantadine	«Тамифлю» Tamiflu
A/FPV/Waybrige/78 (H7N7)	0,011	0,01
A/Swine/Iowa/30 (H1N1)	< 0,0031	0,055

Как видно из представленных в таблице 1 значений, чувствительность вируса гриппа А/FPV/Waybrige/78 (H7N7) к препаратам «Тамифлю» и «Ремантадин» оказалась практически одинаковой (значение IC_{50} составило 0,010 мг/мл и 0,011 мг/мл соответственно). Тогда как для штамма A/Swine/Iowa/30 (H1N1) была выявлена более высокая чувствительность к препарату «Ремантадин» (IC_{50} < 0,003 мг/мл), чем к «Тамифлю», показатель IC_{50} которого составлял 0,055 мг/мл.

Таким образом, в ходе проведенного эксперимента было продемонстрировано, что выбранные штаммы вируса гриппа А обладают чувствительностью к коммерческим противовирусным препаратам в исследуемых концентрациях от 0,300 до 0,009 мг/мл для препарата «Тамифлю» и от 0,100 до 0,003 мг/мл для «Ремантадин».

Адаптация штаммов вирусов гриппа А к противовирусным препаратам «Ремантадин» и «Тамифлю»

Устойчивые штаммы вируса гриппа А/FPV/Waybrige/78 (H7N7) и A/Swine/Iowa/30 (H1N1) к препаратам «Тамифлю» и «Ремантадин» получали путем их последовательного пассирования на культуре клеток MDCK с постепенным увеличением концентрации противовирусных веществ («Тамифлю» от 0,009 до 0,300 мг/мл и «Ремантадин» от 0,003 до 0,100 мг/мл). Полученные в результате селекции мутанты были названы FPV_RTam, FPV_RRim, Sw_RTam и Sw_RRim. Адаптация штаммов дикого типа вируса гриппа А/FPV/Waybrige/78/H7N7 и A/Swine/Iowa/30/H1N1 к препарату «Тамифлю» произошла за 15 последовательных пассажей при постоянном содержании и последовательном увеличении концентрации препарата от 0,009 до 0,300 мг/мл.

Аналогичные результаты получены в опытах с коммерческим препаратом «Ремантадин». Адаптация штаммов вируса гриппа А/FPV/Waybrige/78/H7N7 и A/Swine/Iowa/30/H1N1 произошла в течение 12 и 15 последовательных пассажей при тех же условиях (диапазон концентраций препарата составлял от 0,100 до 0,003 мг/мл).

Для определения стабильности фенотипа устойчивости полученные мутантные штаммы культивировали в отсутствие противовирусных препаратов в течение 5 последовательных пассажей. Для подтверждения получения резистентных форм был проведен сравнительный анализ фенотипа устойчивости полученных мутантов и штаммов дикого типа в отношении противовирусных препаратов «Тамифлю» и «Ремантадин».

Изучение чувствительности мутантных штаммов вируса гриппа А к противовирусным препаратам

При изучении фенотипических характеристик резистентности мутантных штаммов вируса гриппа А (FPV_RTam, FPV_RRim, Sw_RTam и Sw_RRim) была исследована чувствительность вирусов к коммерческим противовирусным препаратам в диапазоне нетоксических концентраций от 0,100 до 0,003 мг/мл для «Ремантадин» и от 0,300 до 0,009 мг/мл для «Тамифлю». На основании

полученных кривых зависимости антивирусного действия от концентрации (доза-ответ) были определены значения IC_{50} (таблица 2).

Таблица 2. Определение антивирусного действия коммерческих препаратов в отношении мутантных штаммов вируса гриппа А

Table 2. Determination of antiviral activity of commercial drugs against mutant strains of influenza A virus

IC_{50} , мг/мл IC_{50} , mg/ml	Штаммы Strains			
	FPV_RTam	FPV_RRim	Sw_RTam	Sw_RRim
«Тамифлю» Tamiflu	> 0,3	N/A	> 0,3	N/A
«Ремантадин» Rimantadine	N/A*	> 0,1	N/A	> 0,1
Примечание: * – значения IC_{50} для данных штаммов не определялись Note: * – IC_{50} value for these strains weren't determined				

При проведении сравнительного анализа фенотипических характеристик чувствительности мутантных штаммов вируса гриппа А и штаммов дикого типа в отношении «Тамифлю» и «Ремантадин» было установлено, что полученные штаммы оказались резистентными к антивирусным препаратам, так как исследуемые нетоксические для клеток концентрации антивирусных препаратов не оказывали влияние на репродукцию всех полученных мутантных штаммов вирусов. Значение IC_{50} «Тамифлю» для FPV_RTam и Sw_RTam увеличилось до >0,300 мг/мл, тогда как для дикого типа вируса гриппа A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) и A/Swine/Iowa/30 (H1N1) этот показатель составлял 0,010 и 0,055 мг/мл, соответственно. Похожая картина наблюдалась и в отношении клонов FPV_RRim и Sw_RRim, для которых показатель IC_{50} препарата «Ремантадин» составил >0,100 мг/мл, в то время как значение IC_{50} в отношении штаммов дикого типа A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) и A/Swine/Iowa/30 (H1N1) составляло 0,011 и <0,003 мг/мл соответственно. Представленные наблюдения подтверждаются данными молекулярно-генетического анализа этих штаммов.

Биологическая характеристика диких и мутантных штаммов вируса гриппа

Фенотипом является совокупность всех признаков и свойств организма, которые выявляются в процессе индивидуального развития в данных условиях и являются результатом взаимодействия генотипа с комплексом факторов внутренней и внешней среды. В наших исследованиях проведено воздействие лимитирующим фактором, который повлек за собой изменение в генотипе. Поэтому, наравне с изучением части генов, нами проведена оценка изменений фенотипических проявлений полученных мутантов вируса гриппа.

С целью изучения фенотипических признаков полученных мутантов проведены исследования по характеристике основных поверхностных белков вируса. Были определены следующие показатели – термостабильность белка гемагглютинина и оценка активности фермента нейраминидазы. Данные признаки являются характеристикой двух важнейших поверхностных белков, принимающих участие в проникновении и распространении вируса гриппа.

Термостабильность гемагглютинина

Ввиду того, что температурное воздействие при нейтральном значении pH способствует образованию фузогенной формы белка HA [20], была проведена оценка термостабильности белка гемагглютинина полученных мутантов (рисунок 1). Штаммы дикого типа и полученные мутанты инкубировали при 56°C различное время (от 15 до 120 мин), после чего определяли

гемагглютинирующую активность. Термостабильными считались штаммы, которые сохраняли способность вызывать агглютинацию эритроцитов человека (I группа) после прогревания при 56°C в течение 30 мин.

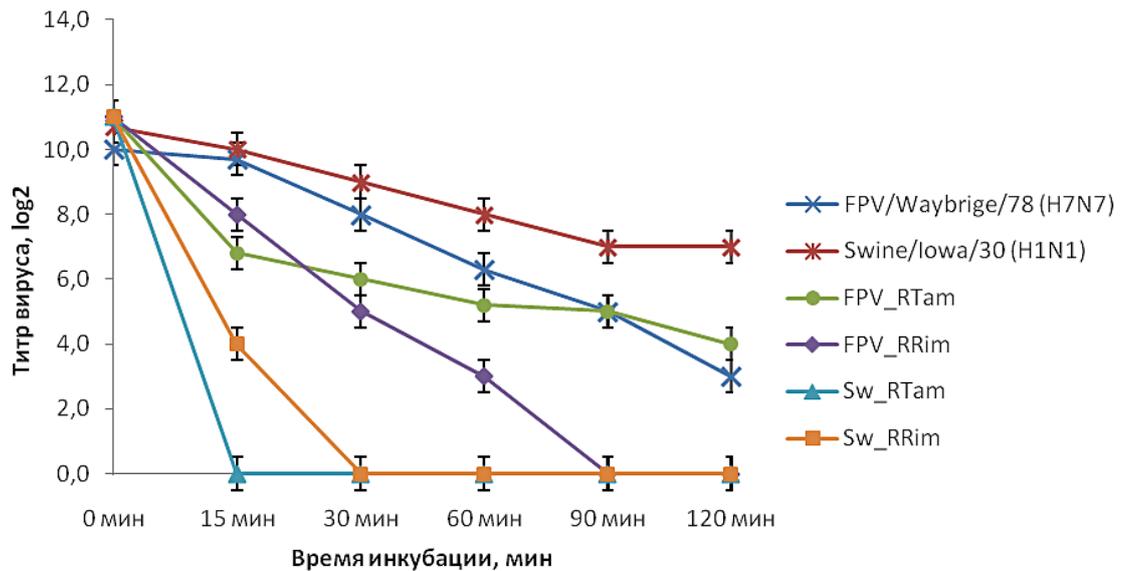


Рис. 1. Результаты сравнительного анализа термочувствительности гемагглютинаина диких и мутантных штаммов вируса гриппа

Fig. 1. Results of comparative analysis of thermo stability of hemagglutinin wild and mutant strains of influenza A viruses

По отношению к температурному фактору штаммы дикого типа вируса гриппа A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) и A/Swine/Iowa/30 (H1N1) и полученные резистентные мутанты FPV_RTam и FPV_RRim характеризовались термостабильным гемагглютинином, сохранявшим активность после 30 мин прогревания при 56°C. В то время как клоны Sw_RTam и Sw_RRim оказались неустойчивы к нагреванию и теряли способность вызывать агглютинацию эритроцитов человека (I группы) после прогревания при 56°C в течение 15-30 мин.

Определение нейраминидазной активности

Оценка активности фермента нейраминидазы является одной из основных характеристик проявления инфекционности вируса гриппа. Проведено сравнительное изучение активности нейраминидазы штаммов дикого типа и мутантных штаммов (рисунок 2).

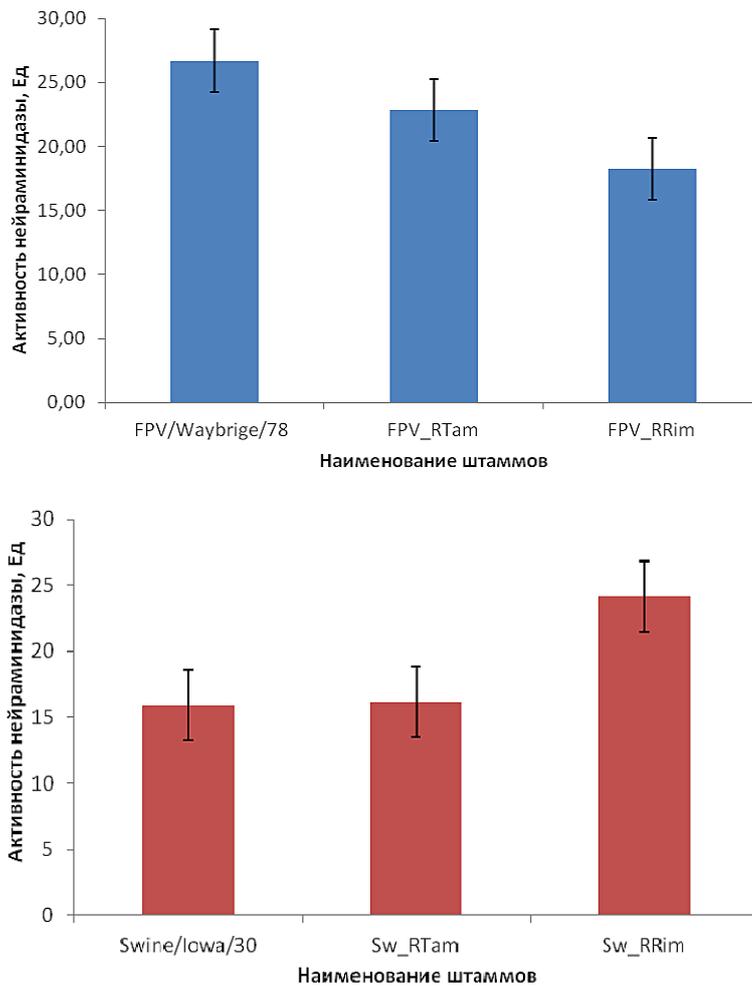


Рис. 2. Результаты сравнительного анализа нейраминидазной активности диких и мутантных штаммов вируса гриппа

Fig. 2. Results of comparative analysis of neuraminidase activity wild and mutant strains of influenza viruses

Анализ активности фермента нейраминидазы у мутантных вариантов по сравнению со штаммами дикого типа выявил отличия. Согласно данным, представленным на рисунке 2, активность фермента нейраминидазы у штаммов FPV_RTam и FPV_RRim снижается по сравнению с исходным вариантом A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) на 21,27 и 28,86% соответственно, в то время как у мутантов, полученных из штамма A/Swine/Iowa/30 (H1N1), наблюдается обратная картина. Так, активность нейраминидазы мутанта Sw_RTam оставалась на уровне исходного штамма, а у мутанта Sw_RRim активность увеличивалась на 50% по сравнению с диким вариантом.

Возможно, приобретение наследуемых изменений, приводящих к появлению фенотипа устойчивости в структуре популяции вируса гриппа, влечет за собой изменение в активности некоторых структурных белков вирионов.

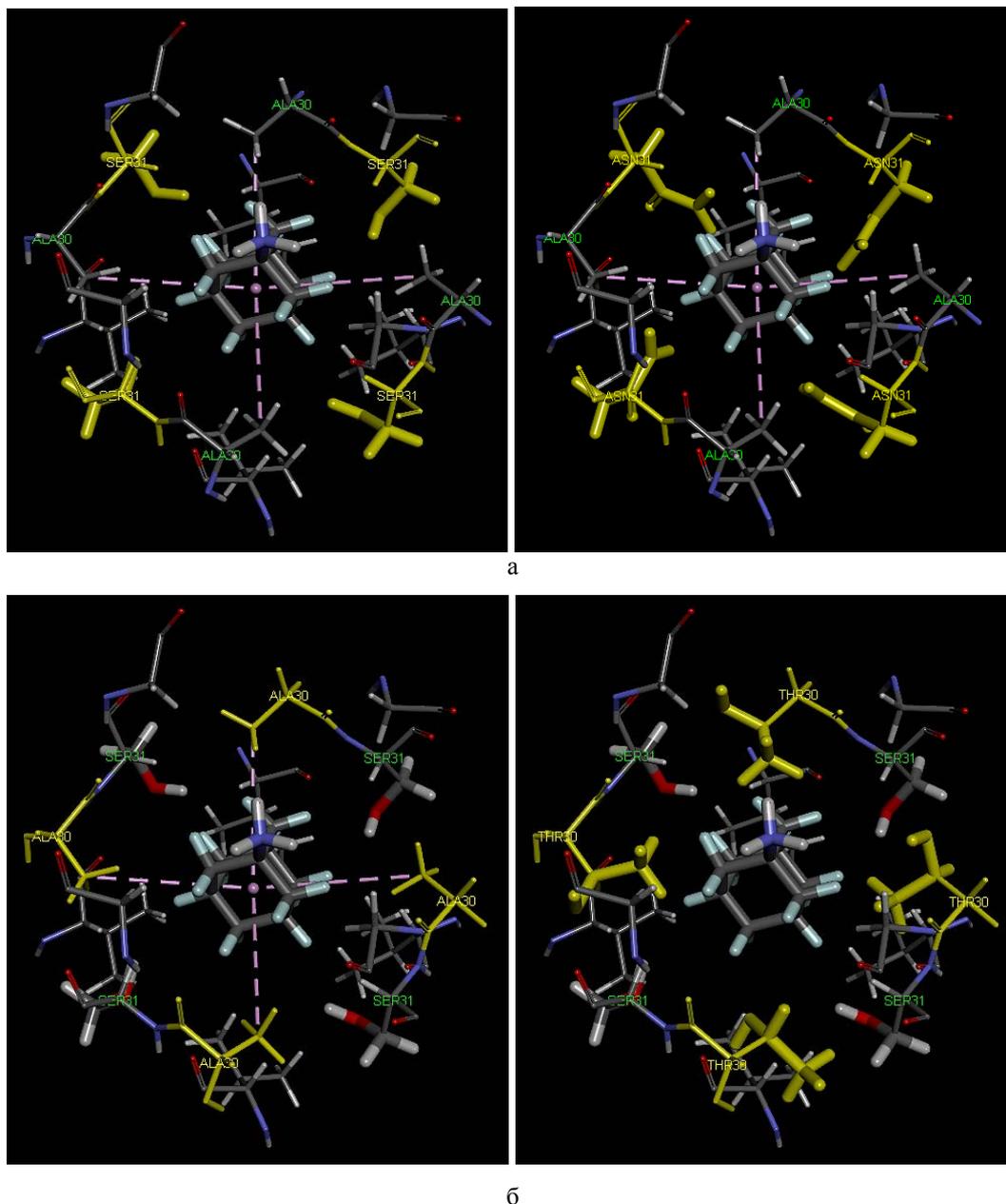
Генетическое подтверждение устойчивости к противовирусным препаратам полученных мутантов

Для подтверждения того, что фенотипическое проявление устойчивости к противовирусным препаратам у мутантных штаммов обусловлено специфическими заменами в НК (нуклеиновых кислотах), было проведено полноразмерное секвенирование генов NA и MP, ответственных за резистентность к препаратам «Тамифлю» и «Ремантадин» соответственно.

Проведенные сравнительные исследования основных молекулярно-генетических свойств резистентных к ингибиторам мутантов и штаммов дикого типа вируса гриппа А позволили

выявить характерные специфические замены в структуре НК, ответственные за формирование фенотипа устойчивости к препаратам «Гамифлю» и «Ремантадин».

Анализ аминокислотных последовательностей показал наличие в структуре M2 белка мутантного штамма FPV_RRim замены S31N (рисунок 3а), а у мутанта Sw_RRim замены A30T, ответственных за развитие устойчивости к препарату «Ремантадин» (рисунок 3б).



а – активный центр белка M2 штамма FPV_RRim; б – активный центр белка M2 штамма Sw_RRim.

Рис. 3. Анализ аминокислотных замен в структуре M2 белка вируса гриппа

а – active center of M2 protein of strain FPV_RRim; б – active center of M2 protein of strain Sw_RRim.

Fig. 3. Analysis of amino acid substitutions in the M2 protein of influenza virus

Анализ активного центра M2 белка мутантного штамма FPV_RRim (рисунок 3а) не выявил видимых изменений в приобретении или потере связей между аминокислотой в 31 положении и структурой препарата «Ремантадин». По всей видимости, смена аминокислоты Ser на Asn в 31

положении ведет к пространственному изменению M2 канала, что, в свою очередь, приводит к формированию резистентности.

Анализируя представленные на рисунке 3б данные, видно, что смена аминокислоты Ala в 30 положении на Thr, у мутанта Sw_RRim приводит к утрате гидрофобной связи между аминокислотой и препаратом «Ремантадин». По всей видимости, данный факт является причиной возникновения фенотипа устойчивости.

Детальный поиск не выявил канонической мутации N274Y в структуре белка NA, отвечающей за развитие резистентности к препарату «Тамифлю» у мутантов FPV_RTam и Sw_RTam. Однако анализируя нуклеотидные последовательности исследуемых штаммов, было обнаружено, что мутанты, устойчивые к препарату «Тамифлю», в строении аминокислотной последовательности белка M1 имели специфическую замену в позиции N207S. Данные о влиянии этой замены на устойчивость к лекарственным препаратам не описаны в литературе. В качестве предположения нами выдвинута гипотеза о том, что мутация в гене M1 может носить селективный характер и влиять на фенотип устойчивости вируса гриппа к препарату «Тамифлю».

Анализ полученных данных позволяет сделать два предположения о природе возникновения фенотипа лекарственной устойчивости. Во-первых, появление фенотипа резистентности не связано с возникновением мутаций, а носит эпигенетический характер. Однако контрольные пассажи полученных мутантов в отсутствие селективного фактора показали наследуемость приобретенного признака. Второе предположение кажется наиболее вероятным. Предположительно, специфическая мутация в положении N207S в структуре белка M1 у мутантов FPV_RTam и Sw_RTam имеет селективное значение в формировании устойчивости к препарату «Тамифлю». И, таким образом, возникновение резистентности может носить мультигенный характер и характеризоваться возникновением мутаций не только в белке-мишени, на который ориентирован противовирусный препарат, но и в другом структурном белке, не связанным напрямую с действием препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена адаптация штаммов вируса гриппа A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) и A/Swine/Iowa/30 (H1N1) к коммерческим противовирусным препаратам адамантанового ряда («Ремантадин») и ингибитору нейроминидазы («Тамифлю»). Показано изменение биологических свойств основных поверхностных белков у полученных мутантных вариантов. Анализ данных секвенирования показал корреляцию между изменением фенотипических проявлений белков гемагглютинаина и нейраминидазы и модификацией генетического аппарата. Наравне с каноническими мутациями устойчивости к препарату «Ремантадин», показанными в строении белка M вируса гриппа у мутантов FPV_RRim и Sw_RRim, выявлена специфическая мутация в положении N207S в структуре белка M1 у мутантов FPV_RTam и Sw_RTam. Сделано предположение о мультигенном характере возникновения резистентности к коммерческому препарату «Тамифлю».

Финансирование

Исследования проведены в рамках выполнения научной программы «Исследование реверсии антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов», № 0113РК00831.

ЛИТЕРАТУРА

1. Роганов М. Контроль чувствительности штаммов вируса гриппа А к противовирусным лекарственным средствам: автореф. ... канд. биол. наук: 15.00.02. – М., 2008. – 133 с.
2. Choung U.K., Xiaowu Ch., Dirk B.M. Neuraminidase inhibitors as anti-influenza virus agents // *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*. – 1999. – Vol. 10. – P. 141-154.
3. Brandi M.B., Slavish P.J., DuBois R.M., Boyd V.A., White S.W., Webb T.R. Identification of influenza endonuclease inhibitors using a novel fluorescence polarization assay // *ACS Chem. Biol.* – 2012. – Vol. 7, №3. – P. 526-534.
4. Ленева И.А., Гуськова Т.А. Арбидол – эффективный препарат для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ: обзор результатов клинических исследований // *Русский медицинский журнал: независимое издание для практикующих врачей*. – 2008. – Т. 16, №29. – С. 3-9.
5. Pontoriero A., Baumeister E., Campos A.M., Savy V.L. Virological surveillance and antiviral resistance of human influenza virus in Argentina, 2005 – 2008 // *Rev Panam Salud Publica*. – 2011. – Vol. 30, №6. – P. 634-640.

6. Смирнов В.С. Профилактика и лечение гриппа и острых респираторных вирусных инфекций // Рук. для терапевтов, инфекционистов, семейных врачей. – СПб: АЙСИНГ. – 2012. – 56 с.
7. Kinchington D. Recent advances in antiviral therapy // *J. Clin. Pathol.* – 1999. – Vol. 52, №2. – P. 89 – 94.
8. Чернова Т.М., Тимченко В.Н. Противовирусные препараты и лечение гриппа // Всероссийский междисциплинарный медицинский журнал. – 2011. – Т. 64, №1. – С. 10-14.
9. Bright R.A., Medina M.J., Xu X., Perez-Oronoz G., Wallis T.R., Davis X.M., Povinelli L., Cox N.J., Klimov A.I. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern // *Lancet.* – 2005. – Vol. 366, №9492. – P. 1175-1181.
10. Ziegler T., Hemphill M.L., Ziegler M., Perez-Oronoz G., Klimov A.I., Hampson A.W., Regnery H.L., Cox N.J. Low Incidence of Rimantadine Resistance in Field Isolates of Influenza A Viruses // *J. Infect. Dis.* – 1999. – Vol. 180, №4. – P. 935-939.
11. Yi M., Cross T.A., Zhou H.-X. Conformational heterogeneity of the M2 proton channel and a structural model for channel activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2009. – Vol. 106, №32. – P. 13311-13316.
12. Wang J.-F., Wei D.-Q., Chou K.-C. Insights from investigating the interactions of adamantane-based drugs with the M2 proton channel from the H1N1 swine virus // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – Vol. 388, №2. – P. 413-417.
13. Силуянова Э.В. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа А(Н3N2) и В в период 2003-2013 гг. в РФ: автореф. ... канд. биол. наук: 03.02.02, 03.01.03. – М., 2014. – 167 с.
14. Ерофеева М.К., Позднякова М.Г., Максакова В.Л. Актуальные вопросы профилактики гриппа и других ОРВИ // Русский медицинский журнал: независимое издание для практикующих врачей. – 2011. – Т. 19. – С. 2091-2095.
15. Sretter K.J., Balish A.L., Katz J.M. *Current Protocols in Microbiology* – 2006. – Unit. 15G.1 – 15G.1.22: Influenza: Propagation, quantification, and storage.
16. Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // *Amer. J. Hyg.* – 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.
17. Зубенко Н.В., Коротецкий И.С., Шилов С.В., Иванова Л.Н. Адаптация штаммов вируса гриппа с различной антигенной структурой к коммерческим противовирусным препаратам // Матер. I Междунар. конф. молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. – Новосибирск, 2014. – С. 41-45.
18. Barnett J.M., Cadman A., Burrell F.M., Madar S.H., Lewis A.P., Tisdale M., Bethell R. In Vitro selection and characterisation of influenza B/Beijing/1/87 isolates with altered susceptibility to zanamivir // *Virology.* – 1999. – Vol. 265, №2. – P. 286-295.
19. Aminoff D. Method for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids // *Biochem. J.* – 1961. – Vol. 81. – P. 384-392.
20. Carr C.M., Chaudhry C., Kim, P.S. Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1997. – Vol. 94. – P. 14306-14313.

REFERENCES

1. Rotanov M. Kontrol' chuvstvitel'nosti shtammov virusa grippa A k protivovirusnym lekarstvennym sredstvam: avtoref. ... kand. biol. nauk: 15.00.02. М., 2008, 133 с. – 003171132.
2. Choung U.K., Xiaowu Ch., Dirk B.M. Neuraminidase inhibitors as anti-influenza virus agents. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 1999, vol. 10, pp. 141-154. PMID: 10480735.
3. Brandi M.B., Slavish P.J., DuBois R.M., Boyd V.A., White S.W., Webb T.R. Identification of influenza endonuclease inhibitors using a novel fluorescence polarization assay. *ACS Chem. Biol.*, 2012, vol. 7, no. 3, pp. 526-534. DOI: 10.1021/cb200439z.
4. Leneva I.A., Gus'kova T.A. Arbidol – jeffektivnyj preparat dlja lechenija i profilaktiki grippa i ORVI: obzor rezul'tatov klinicheskijh issledovanij. *Russkij medicinskij zhurnal: nezavisimoe izdanie dlja praktikujushhijh vrachej*, 2008, vol. 16, no. 29, ss. 3-9.
5. Pontoriero A., Baumeister E., Campos A.M., Savy V.L. Virological surveillance and antiviral resistance of human influenza virus in Argentina, 2005 – 2008. *Rev Panam Salud Publica*, 2011, vol. 30, no. 6, pp. 634-640. DOI: 10.1590/S1020-49892011001200023.
6. Smirnov V.S., Profilaktika i lechenie grippa i ostryh respiratornyh virusnyh infekcij. Ruk. dlja terapevtov, infekcionistov, semejnyh vrachej – SPb: AJSING, 2012, 56 с.
7. Kinchington D. Recent advances in antiviral therapy. *J. Clin. Pathol.*, 1999, vol. 52, no. 2, pp. 89-94. DOI: 10.1136/jcp.52.2.89.

8. Chernova T.M., Timchenko V.N. Protivovirusnye preparaty i lechenie gripa. *Vserossijskij mezhdisciplinarnyj medicinskij zhurnal*, 2011, vol. 64, no. 1, ss. 10-14.
9. Bright R.A., Medina M.J., Xu X., Perez-Oronoz G., Wallis T.R., Davis X.M., Povinelli L., Cox N.J., Klimov A.I. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet*, 2005, vol. 366, no. 9492, pp. 1175-1181. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67338-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67338-2).
10. Ziegler T., Hemphill M.L., Ziegler M., Perez-Oronoz G., Klimov A.I., Hampson A.W., Regnery H.L., Cox N.J. Low Incidence of Rimantadine Resistance in Field Isolates of Influenza A Viruses. *J. Infect. Dis.*, 1999, vol. 180, no. 4, pp. 935-939. DOI: 10.1086/314994.
11. Yi M., Cross T.A., Zhou H.-X. Conformational heterogeneity of the M2 proton channel and a structural model for channel activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, vol. 106, no. 32, pp. 13311-13316. DOI: 10.1073/pnas.0906553106.
12. Wang J.-F., Wei D.-Q., Chou K.-C. Insights from investigating the interactions of adamantane-based drugs with the M2 proton channel from the H1N1 swine virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009, vol. 388, no. 2, pp. 413-417. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.08.026.
13. Silujanova Je.V. Jevoljucionnaja izmenchivost' virusov gripa A(H3N2) i V v period 2003-2013 gg. v RF: avtoref. ... kand. biol. nauk: 03.02.02, 03.01.03. M., 2014, 167 s.
14. Erofeeva M.K., Pozdnjakova M.G., Maksakova V.L. Aktual'nye voprosy profilaktiki gripa i drugih ORVI. *Russkij medicinskij zhurnal: nezavisimoe izdanie dlja praktikujushhijh vrachej*, 2011, vol. 19, ss. 2091-2095.
15. Szretter K.J., Balish A.L., Katz J.M. Current Protocols in Microbiology – 2006. – Unit. 15G.1 – 15G.1.22: Influenza: Propagation, quantification, and storage.
16. Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 1938, vol. 27, pp. 493-497.
17. Zubenko N.V., Koroteckij I.S., Shilov S.V., Ivanova L.N. Adaptacija shtammov virusa gripa s razlichnoj antigennoj strukturoj k kommercheskim antivirusnym preparatam. *I Mezhdunarodnaja konferencija molodyh uchenyh: biotehnologov, molekularnyh biologov i virusologov*. Novosibirsk, 2014, ss. 41-45.
18. Barnett J.M., Cadman A., Burrell F.M., Madar S.H., Lewis A.P., Tisdale M., Bethell R. In Vitro selection and characterisation of influenza B/Beijing/1/87 isolates with altered susceptibility to zanamivir. *Virology*, 1999, vol. 265, no. 2, pp. 286-295. DOI: 10.1006/viro.1999.0058.
19. Aminoff D. Method for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.*, 1961, vol. 81, pp. 384-392. PMID: 13860975.
20. Carr C.M., Chaudhry C., Kim, P.S. Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, pp. 14306-14313. PMID: 9405608.

ВИРУСҚА ҚАРСЫ КОММЕРЦИЯЛЫҚ ПРЕПАРАТТАРҒА ТӨЗІМДІ ТҰМАУ ВИРУСЫНЫҢ Н1Н1 И Н7Н7 МУТАНТТЫ ШТАММДАРЫНЫҢ СИПАТТАМАСЫ

**Коротецкий И.С., Зубенко Н.В., Шилов С.В., Иванова Л.Н.,
Швидко С.В., Токсанбаев Р.Д.**

*Инфекцияға қарсы препараттар ғылыми орталығы
Әуезов көш., 84., Алматы қ., Қазақстан
lab.virus@mail.ru*

ТҮЙІН

Мақалада адаманды қатардағы («Ремантадин») және нейроминидаза ингибиторы («Тамифлю») вирусқа қарсы коммерциялық препараттарға тұмау вирусының А/FPV/Waybrige/78 (H7N7) және А/Swine/Iowa/30 (H1N1) штамдарының бейімділігі жөнінде материалдар ұсынылған. Төзімділік фенотипінің тұрақтылығын анықтау мақсатымен алынған мутантты штамдар вирусқа қарсы препараттарсыз 5 жүйелі пассаж бойы культивирленді. FPV_RTам және Sw_RTам үшін IC₅₀ «Тамифлю» >0,3 мг/мл болып, «Ремантадин» препаратының IC₅₀ >0,1 мг/мл болды. Гемагглютинин ақуызының термотұрақтылығы анықталып, нейроминидаза ферментінің белсенділігі бағаланды. Амин қышқылдары тізбектерінің талдауын жүргізу кезінде «Ремантадин» препаратына

төзімділіктің дамуына жауапты FPV_RRim мутантты штаммының M2 ақуызының құрылымындағы S31N ауысуы, ал Sw_RRim мутантында A30T ауысуы көрінді. FPV_RTam және Sw_RTam мутанттарында M1 ақуызының құрылымындағы амин қышқылдарының тізбектеріндегі N207S орнында спецификалық ауысу байқалды. Емдік препараттарға мультигендік көріністе төзімділіктің пайда болатынына болжам жасалды.

Негізгі сөздер: тұмау вирусы, дәрілік төзімділік, «Тамифлю», «Ремантадин», сиквенстеу, мутациялар.