

УДК [616.91-002.151-06:616.61]-085.281:582.273

ПРОТИВОВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАРРАГИНАНОВ ИЗ КРАСНОЙ ВОДОРΟΣЛИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХАНТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

И.Г. Максема¹, Г.Г. Компанец¹, А.О. Барабанова², И.М. Ермак², Р.А. Слонова¹

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1), ²Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)

Ключевые слова: каррагинаны, хантавирусная инфекция.

Изучена противовирусная активность каррагинанов двух структурных типов – каппа и лямбда, полученных из водорослей *Chondrus armatus*, в опытах *in vitro* при экспериментальной хантавирусной инфекции. Обнаружено выраженное вирусингибирующее действие при использовании высоких концентраций каррагинанов: 1000–2000 мкг/мл. Установлено, что при использовании более низких концентраций (500 мкг/мл) наблюдалась заметная разница в проявлении противовирусного действия. Отмечено, что даже в достаточно высоких концентрациях каррагинаны обладают низкой эффективностью подавления вирусной репродукции при предварительной обработке препаратами клеток Vero E6.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – острая вирусная природно-очаговая зоонозная инфекция человека, представляющая серьезную проблему в связи с широким распространением, тяжестью болезни, отсутствием эффективных средств этиотропной терапии и специфической профилактики. В Дальневосточном регионе ГЛПС регистрируется ежегодно и характеризуется чередованием подъемов и спадов заболеваемости с преобладанием тяжелых и среднетяжелых форм болезней и высокой летальностью. При среднемноголетнем показателе заболеваемости 3,1 % в отдельные годы летальность достигала 15 % [4].

До настоящего времени для предупреждения заболеваний ГЛПС в нашей стране специфическая профилактика не осуществляется. Рекомендательный комплекс мер неспецифической профилактики не всегда является эффективным, поскольку широкий охват территорий, где регистрируется заболевание, для проведения истребления грызунов и дезинфекционных мероприятий является трудновыполнимой задачей.

С учетом важности проблемы как для Приморского края, так и в целом для России поиск препаратов, обладающих противовирусным действием, при отсутствии вакцинопрофилактики остается актуальной задачей. Перечень средств, которые используются при хантавирусной инфекции в профилактических и лечебных целях, пока невелик. В экспериментальных и клинических наблюдениях показана эффективность препарата виразола (рибавирина) для снижения тяжести и продолжительности заболевания [5, 7]. Действие виразола связано с нарушением репродукции вируса в чувствительных клетках за счет мутаций в геноме. Однако положительные результаты отмечаются при использовании виразола в ранние сроки заболевания, что при ГЛПС не всегда возможно из-за несвоевременной постановки

диагноза. Выявленные иммунные нарушения, во многом определяющие тяжесть инфекции, обуславливают возможность применения иммунокорректирующей терапии в комплексном лечении больных ГЛПС [3].

В последние годы проводятся исследования по использованию индукторов интерферона различного происхождения. По данным С.Я. Логиновой и др. [5], в культурах клеток КЛ-17 и СПЭВ ларифан и рифастин в незначительной концентрации практически полностью подавляли репродукцию вируса Хантаан. Известный и широко используемый при респираторных инфекциях препарат арбидол препятствовал контакту и проникновению хантавирусов в клетку *in vitro* и *in vivo* [9].

Результаты комплексных фундаментальных и прикладных исследований демонстрируют целесообразность дальнейшего поиска новых соединений, обладающих противовирусными свойствами. В этом плане большой интерес представляют препараты из морских гидробионтов, в частности полисахариды, благодаря их биосовместимости, биоразлагаемости и широкому спектру биологической активности. Исследования, проведенные нами ранее с использованием фукоиданов – сульфатированных полисахаридов бурых водорослей, показали их влияние на адсорбцию вируса Хантаан при экспериментальной инфекции [6].

Согласно литературным данным, высокую ингибирующую активность в отношении некоторых вирусов животных и человека проявляют сульфатированные полисахариды красных водорослей – каррагинаны [10, 13]. Каррагинаны представляют собой семейство линейных сульфатированных галактанов, построенных из остатков галактозы и ее производных, характеризуются разнообразием структурных типов и широким спектром биологической активности – иммуномодулирующей, антикоагулирующей, антиоксидантной и антивирусной [15]. Физиологический эффект каррагинанов определяется как структурой полисахарида, так и его молекулярной массой. Так, различные типы каррагинанов оказывают *in vitro* ингибирующее влияние на репликацию ряда ДНК- и РНК-вирусов: вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) 1-го типа, вируса желтой лихорадки, вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов, вирусов свинной и тропической лихорадки [10, 13, 15]. Обнаружено, что *in vitro* каррагинан с высокой степенью сульфатирования способен блокировать эпителиальную трансмиссию ВИЧ в дозах, в тысячу раз более низких, чем требуется для ингибирования клеточной адгезии [8]. Наиболее вероятно, что основной мишенью противовирусного

Максема Ирина Геннадьевна – канд. мед. наук, ст.н.с. лаборатории ГЛПС НИИЭМ СО РАМН: e-mail: irinaluna@inbox.ru

действия каррагинанов является адсорбция вирусов, а не вирусная интернализация и синтез внутриклеточных белков [10]. А. Reunov et al., впервые показали, что κ/β -каррагинан из дальневосточной красной водоросли *Tichocarpus crinitus* ингибирует накопление вируса табачной мозаики в листьях табака [12].

О влиянии каррагинанов на развитие хантавирусной инфекции не сообщалось. Поскольку важнейшим свойством противовирусных препаратов является их способность подавлять репродукцию вируса в клетке, нашей целью был анализ вирусингибирующей активности каррагинанов *in vitro* на культуре чувствительных клеток Vero E6.

Материал и методы. В экспериментах использовали штамм 76–118 вируса Хантаан, адаптированный к культуре клеток Vero E6, в титре 4,8 lg фокусобразующих единиц/мл. В качестве ростовой среды для выращивания клеток и размножения вируса использовали питательную среду «Игла MEM» с двойным набором аминокислот и витаминов, с добавлением 7% фетальной сыворотки, 0,06% L-глутамина и антибиотиков. Реакцию индикации инфекционных фокусов проводили согласно P.W. Lee. et al [11]. Вирусосодержащую жидкость предварительно обрабатывали каррагинанами в нижеперечисленных концентрациях. Контакт неразведенной вирусосодержащей жидкости с каррагинанами осуществляли в течение 1 часа при 37°C. Затем смесь титровали с 10-кратными разведениями и наносили на монослой клеток Vero E6, выращенный на 24-луночных планшетах. Клетки культивировали под полужидким покрытием (0,6% КМЦ) в инкубаторе с воздушной смесью, содержащей 5% CO₂ при 37°C. Результат учитывали на 10-е сутки после заражения.

Каррагинаны двух структурных типов – каппа и лямбда – были получены из водорослей *Chondrus armatus*, собранных в Японском море (залив Петра Великого, м. Фальшивый). Полисахариды выделяли, фракционировали, идентифицировали методами инфракрасной и ¹³C-ядерно-магнитно-резонансной спектроскопии, как описано ранее [14]. Общее содержание углеводов определяли фенол-сернокислотным методом, используя D-галактозу в качестве стандарта, а количество сульфатных групп определяли турбидиметрическим методом, согласно приведенным ранее методикам.

Для вычисления молекулярной массы использовали вискозиметрический метод. Вязкость измеряли в модифицированном вискозиметре Убеллоде (СКБ «Пушино», Россия) с диаметром капилляра 0,3 мм в диапазоне концентраций 0,5–2,0 мг/мл в 0,01М растворе NaCl при 25°C. Значения характеристической вязкости вычисляли путем экстраполяции графика зависимости $(\ln \eta_{\text{отн}})/C$ от концентрации на нулевую концентрацию.

Молекулярные массы рассчитывали по уравнению Марка–Хаувинка–Куна: $[\eta] = KM^\alpha$, где $[\eta]$ – характеристическая вязкость, а K и α – эмпирические константы, значения которых были взяты для данной системы полимер–растворитель: K = 3×10^3 и $\alpha = 0,95$. В работе

Таблица 1

Характеристика каррагинанов

Тип	Содержание, %			Молярная масса, кДа
	моносахариды	3,6-ангидрогалактоза	сульфаты	
Каррагинан-1	47	33,0	22,0	246
Каррагинан-2	29	0,56	28,0	140

использовали препараты – каррагинан-1 (κ-тип) и каррагинан-2 (λ-тип), различающиеся степенью сульфатирования и молекулярной массой (табл. 1). Каррагинаны применяли в концентрациях 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 и 2000 мкг/мл. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Первичный скрининг препаратов проводили по двум направлениям: различными концентрациями каррагинанов обрабатывали вирус и неинфицированные клетки Vero E6. Наблюдения за культурой клеток при использовании всех концентраций препаратов не выявили цитодеструктивного эффекта. Результаты вирусингибирующей активности каррагинанов при предварительной обработке вируса представлены в табл. 2. Показано, что препараты в дозах 10–50 мкг/мл не снижали инфекционность вируса. При использовании каррагинанов в концентрациях 100–250 мкг/мл титр вируса снижался в пределах 1,0 lg.

Более выраженное вирусингибирующее действие было обнаружено при использовании высоких концентраций испытуемых препаратов. Каррагинан-1 снижал титр вируса в концентрации 1000–2000 мкг/мл на 1,9–3,8 lg. Выраженный антивирусный эффект каррагинана-2 также проявлялся при максимальной концентрации (2000 мкг/мл). Следует отметить, что при низких концентрациях каррагинанов, используемых для обработки вируса (500 и 1000 мкг/мл), регистрировалась заметная разница противовирусного действия. Так, антивирусная активность каррагинана-2 при концентрации 500 мкг/мл была в 1,5 раза выше, чем каррагинана-1 (табл. 2), что, вероятно, обусловлено структурными особенностями этих полисахаридов, в частности высокой степенью сульфатирования каррагинана-2 и незначительным содержанием 3,6-ангидрогалактозы (табл. 1). Согласно литературным данным, противовирусная активность сульфатированных полисахаридов повышается с увеличением степени сульфатирования, но важную роль при этом играют распределение сульфатных групп, конформационная гибкость и относительное количество 3,6-ангидрогалактозы [10, 13]. В то же время относительно высокая активность каррагинана-1 при использовании больших концентраций может проявляться благодаря его более высокой молекулярной массе (табл. 1) и способности этого типа полимера образовывать гели при высоких концентрациях [15], что, возможно, приводит к обволакиванию вируса и ингибированию его прикрепления к клеткам.

Таблица 2

Влияние различных концентраций каррагинанов на репродукцию вируса Хантаан в культуре клеток Vero

Препарат	Доза, мкг/мл	Подавление репродукции вируса (Δ), lg
Каррагинан-1	100	0,7±0,5
	250	1,3±0,5
	500 ¹	1,1±0,3
	1000	1,9±0,2 ²
	1500	2,8±0,3 ²
	2000	3,8±0,3 ²
Каррагинан-2	100	1,3±0,3
	250	1,3±0,3
	500 ¹	2,0±0,3 ²
	1000	2,5±0,5 ²
	1500	2,8±0,3 ²
	2000	3,8±0,3 ²
Контроль вируса	–	4,8±0,2

¹ Различие между препаратами статистически значимо.

² Различие с контролем статистически значимо.

Несколько иная картина отмечалась при предварительной обработке препаратами клеток Vero E6. Отмечено, что даже в достаточно высоких концентрациях (500–1000 мкг/мл) каррагинаны обладали низкой эффективностью в подавлении вирусной репродукции (1,0 lg). Использование более высоких концентраций (1500 и 2000 мкг/мл) снижало инфекционный титр на 1,5 lg.

Эффективность вирусингибирующего действия каррагинанов зависела от титра вируса. При невысоком титре (3,0 lg) отмечалось снижение инфекционности возбудителя, при предварительной обработке каррагинаном-1 в концентрации 100 и 200 мкг/мл, на 2,0 lg. Т.е. чем выше титр вируса, тем более высокие концентрации препаратов необходимы для его подавления.

Ранее было показано, что условная величина, позволяющая дифференцировать вирусингибирующие препараты, составляет 1,78 lg [2]. Другие авторы за истинную вирусингибирующую активность принимали разницу в титрах вируса в опытном и контрольных рядах не менее 2,0 lg [1]. Таким образом, снижение титра хантавируса под действием каррагинанов на 1,9–3,8 lg можно считать проявлением истинной вирусингибирующей активности. Суммирование результатов изучения антивирусной активности полисахаридов в отношении вируса Хантаан показало целесообразность дальнейшего анализа эффективности каррагинанов в отношении возбудителя ГЛПС *in vivo*, а также оценки возможности использования их в практической медицине.

Литература

- Бичурина М.А., Никитина Л.Е., Советова М.Г. и др. Вирусингибирующая активность препарата, полученного из мидийного гидролизата // *Вопр. вирусол.* 1994. № 3. С. 134–136.
- Вотьяков В.И., Борекко Е.И. Подход к оценке активности химических соединений против вирусов, размножающихся в тканевых культурах // *Метод. вопр. научной разработки противовирусных веществ: тез. докл.* Минск, 1977. С. 10–14.
- Иванис В.А. Иммунопатогенез, клиника, иммунокорректирующая терапия геморрагической лихорадки с почечным синдромом в регионе циркуляции разных серотипов хантавирусов: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Владивосток, 2004. 52 с.

- Иванис В.А., Максема И.Г., Афанасьева В.И., Слонова Р.А. Клинико-иммунологические особенности геморрагической лихорадки с почечным синдромом при тяжелом течении с благоприятным и летальным исходами в Приморском крае // *Тихоокеанский мед. журнал.* 2010. № 3. С. 46–51.
- Логинова С.Я., Борисевич С.В., Ковальчук А.В. и др. Противовирусная активность *in vitro* лекарственных препаратов в отношении возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом // *Вопросы вирусологии.* 2007. № 6. С. 34–36.
- Максема И.Г., Макаренко И.Д. Противовирусная активность фукоиданов природного происхождения при экспериментальной инфекции, вызванной хантавирусом // *Тихоокеанский мед. журнал.* 2008. № 2. С. 86–89.
- Образцов Ю.Г. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом у военнослужащих в Приморском крае (клинико-эпидемиологическая характеристика и возможности этиотропной терапии): автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2005. 20 с.
- Bourgougnon N. Anti-HIV Compound from Red Seaweeds // *Recent Advances in Marine Biotechnology* (Fingerman M, Nagabhushanam R. eds). Sci. Publ. Inc. USA–UK. 2003. Vol. 9. P. 165–206.
- Deng H.Y., Luo F., Shi L.Q. et al. Efficacy of arbidol on lethal hantaan virus infections in suckling mice and *in vitro* // *Pharmacologica Sinica.* 2009. No. 30. P. 1015–1024.
- Ghosh T., Chattopadhyay K., Marschall M. et al. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation // *Glycobiology.* 2009. Vol. 19. No. 1. P. 2–15.
- Lee P.W., Gibbs C. Jr., Gajdusek D., Yanagihara R. Serotypic classification of hantaviruses by indirect immunofluorescent antibody and plaque reduction neutralization tests // *J. Clin. Microbiol.* 1985. No. 22. P. 940–944.
- Reunov A., Nagorskaya V., Lapshina L. et al. Effect of k/?-carrageenan from red a lga *Tichocarpus crinitus* (Tichocarpaceae) on infection of detached tobacco leaves with tobacco mosaic virus // *J. Plant Diseases and Protection.* 2004. Vol. 111. P. 165–172.
- Talarico L.B., Zibetti R.G., Faria P.C. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Crytonmia crenulata* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2005. Vol. 34. P. 63–71.
- Yermak I.M., Kim Y.H., Titlyanov E.A. et al. Chemical structure and gel properties of carrageenan from a lga belonging to the Gigartinaceae and Tichocarpaceae, collected from the Russian Pacific coast // *J. Appl. Phycol.* 1999. Vol. 11. P. 41–48.
- Yermak I.M., Khotimchenko Yu.S. Chemical properties, biological activities and applications of carrageenan from red a lga // *Recent Advances in Marine Biotechnology* (Fingerman M, Nagabhushanam R. eds). Sci. Publ. Inc. USA–UK. 2003. Vol. 9. P. 207–255.

Поступила в редакцию 27.05.2011.

ANTIVIRAL ACTION OF RED ALGAE-DERIVED CARRAGEENANS IN CASE OF EXPERIMENTAL HUNT VIRUS INFECTION

I.G. Maksema¹, G.G. Kompanets¹, A.O. Barabanova², I.M. Ermak², R.A. Slonova¹

¹ Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia), ² Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russia)

Summary – The authors have studied antiviral action of Kappa type carrageenan and Lambda type carrageenan derived from *Chondrus armatus* algae *in vitro* during experimental Hunt virus infection and found out evident virus-inhibiting action, given the high concentrations of Carrageenan of up to 1000–2000 mkg/ml. Given the lower concentrations (500 mkg/ml), the antiviral effects varied very much. In case of high levels, the Carrageenans were of low efficiency to inhibit viral reproduction during preliminary treatment with Vero E6 cells.

Key words: Carrageenan, Hunt virus infection.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 32–34.