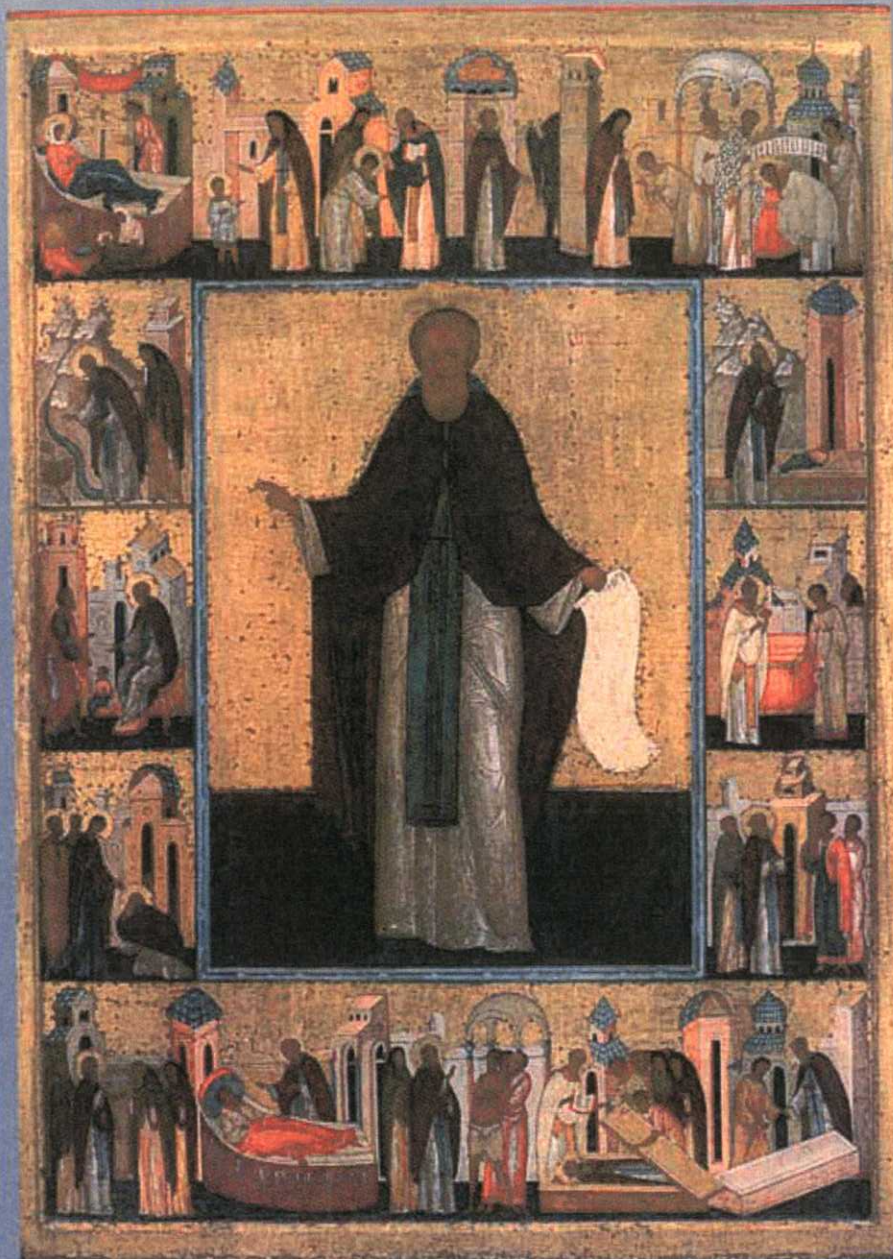


ПУЛЬМОНОЛОГИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ



2010

Грипп А / H1N1: уроки пандемии

В.В.Зарубаев¹, Н.А.Калинина¹, А.В.Гаршина¹, С.В.Беляевская¹, А.К.Сироткин¹, В.Е.Небольсин², О.И.Киселев¹

Этиотропное действие препарата Ингавирин® при экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной пандемическим вирусом гриппа А / H1N1 / 2009

1 – НИИ гриппа СЗО РАМН; 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 15/17

2 – ОАО "Валента Фарм", 119530, Москва, ул. Ген. Дорохова, 18, стр. 2

V.V.Zarubaev, N.A.Kalinina, A.V.Garshina, S.V.Belyaevskaya, A.K.Sirotkin, V.E.Nebolsin, O.I.Kiselev

Antiviral effects of Ingavirin® in experimental pneumonia caused by 2009 pandemic influenza virus A / H1N1

Summary

A mice model of pneumonia caused by 2009 pandemic influenza virus A / H1N1 has been developed. This model was principally close to a disease following this infection in human. Morphologic investigation of pandemic influenza virus A/California/07/09 (H1N1) v in cell culture and in the lungs of experimental animals showed that treatment with Ingavirin® had resulted in inhibition of viral replication in the lung. Electron microscopic analysis confirmed the antiviral effects of the drug such as inhibition of viral morphogenesis both during the eclipse phase and the virus progeny budding and keeping the normal ultrastructure of the cells infected with influenza virus.

Key words: influenza, morphogenesis, Ingavirin®.

Резюме

Разработана модель гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа А / H1N1 / 2009 у белых мышей, и показано ее принципиальное сходство с патологическим процессом при этой инфекции у человека. Изучение особенностей морфогенеза гриппозной инфекции, вызванной пандемическим штаммом вируса А/California/07/09 (H1N1) v, в культуре клеток и в легких лабораторных животных показало, что применение Ингавирина® приводит к ограничению репликации вируса в легких. При помощи электронно-микроскопического анализа выявлено этиотропное действие препарата: способность к торможению вирусного морфогенеза как на ядерных стадиях, так и на этапе почкования вирионов потомства, и сохранение нормальной ультраструктуры клеток, инфицированных вирусом гриппа.

Ключевые слова: грипп, морфогенез, Ингавирин®.

Несмотря на успехи в разработке новых вакцин и противовирусных препаратов, грипп продолжает оставаться трудно контролируемой инфекцией. Благодаря особенностям репродукции и организации генома вирус гриппа способен к изменчивости 2 типов – генному дрейфу (постепенной смене антигенных свойств) и генному шифту (появлению в человеческой популяции вируса с принципиально новыми антигенными характеристиками). Высокая скорость изменчивости позволяет вирусу, с одной стороны, ускользать от иммунного ответа хозяина, а с другой – в течение нескольких вирусных поколений вырабатывать устойчивость к противовирусным препаратам.

Новые вирусы гриппа птиц (H5N1) и свиней (H1N1), инфицирующие людей в последние годы, являются опасными патогенами человека. Большинство человеческих изолятов вируса устойчивы к действию современных противогриппозных препаратов – амантадина и ремантадина [1], а некоторые – и осельтамивира [2, 3], а также способны эффективно подавлять интерфероновый ответ организма [4]. Помимо этого, поверхностные антигены этих вирусов являются новыми для иммунной системы человека, вследствие чего к ним отсутствует коллективный иммунитет. Перечисленные свойства делают неэффективными такие способы защиты человека, как хи-

миотерапия, специфический иммунный ответ и система интерферона.

В сложившейся за последние 2 года ситуации в эпидемиологии и терапии гриппа особую актуальность приобретает поиск и разработка новых эффективных средств профилактики и борьбы с этой инфекцией. При этом предпочтение следует отдавать препаратам более широкого спектра действия, эффективным в отношении многих типов и подтипов вируса гриппа. Мишенью таких препаратов являются либо консервативные компоненты вируса, либо клеточные белки и процессы, подвергающиеся нарушениям, или, напротив, используемые вирусом в ходе репликации в клетке [5]. Ранее была показана противогриппозная активность препарата Ингавирин® (имидазолитетанамид пентандиовой кислоты), который является низкомолекулярным аналогом эндогенного пептидоамина, выделенного из морского моллюска *Aplysia Californica*. Как в опытах *in vitro* [6], так и на модели гриппозной инфекции у животных [7] было показано, что препарат способен ограничивать репликацию вируса в культуре клеток, а также обладает высокой противовирусной активностью при экспериментальном гриппе у мышей.

Целью настоящего исследования было изучение особенностей морфогенеза гриппозной инфекции,

вызванной пандемическим штаммом вируса A/California/07/09 (H1N1) v, в культуре клеток и в легких лабораторных животных в условиях применения Ингавирина®.

Материал и методы

Препараты. В работе использовали препарат Ингавирин® (ОАО "Валента Фарм", Россия). Аликвоты препарата разводили в среде для клеточных культур Игла MEM ("БиолоТ", Санкт-Петербург, кат.#1.3.3). Из полученного раствора были приготовлены необходимые разведения на среде MEM для экспериментов на животных и в культуре клеток.

В качестве референс-препарата использовали Тамифлю® (Hoffmann-La Roche Ltd, Швейцария).

Вирусы. В работе был использован адаптированный к мышам вирус гриппа A/California/07/09 (H1N1) v. Вирус пассировали в аллантоисной полости 10–12-дневных куриных эмбрионов в течение 48 ч при 36 °С.

Животные. Белых беспородных мышей (самки) массой 16–20 г получали из питомника "Рапполово" (Ленинградская обл.) и содержали на стандартном рационе в регламентированных условиях вивария НИИ гриппа СЗО РАМН. Подбор животных в группы опыта проводили методом случайной выборки. До начала испытаний животные находились под наблюдением в течение 1 нед.

Экспериментальная гриппозная инфекция. Для заражения животных был использован гомогенат легочной ткани мышей, предварительно зараженных вирусом, на 3-й и 5-й сут. после инфицирования. Из него готовили серию 10-кратных разведений на физиологическом растворе, после чего инфекционную активность вируса в заражающем материале определяли в отдельном эксперименте при помощи титрования по летальности на животных. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [8].

Исследуемые препараты вводили животным перорально через желудочный зонд в объеме 0,2 мл по лечебной схеме (1 раз в сутки в течение 5 дней, начиная через 24 ч после инфицирования животных). Препараты сравнения применяли перорально по той же схеме. Дозы препаратов составили: Ингавирин® – 30 мг / кг веса животных, Тамифлю® – 20 мг / кг веса. В качестве плацебо контрольной группе животных вводили физиологический фосфатный буфер. В качестве отрицательного контроля использовали интактных животных, которые содержались в тех же условиях, что и опытные группы.

Животных заражали интраназально под легким эфирным наркозом в дозе 1 LD₅₀. В каждую группу наблюдения брали по 30 мышей. На 3-й и 12-й день после заражения по 5 животных из каждой группы умерщвляли, вскрывали и изолировали легкие. Легкие фиксировали 10%-ным забуференным формалином и использовали для гистологического анализа.

Титрование вируса. Для изучения влияния Ингавирина® на инфекционную активность вируса гриппа *in vivo* животных инфицировали интраназально

под легким эфирным наркозом вирусом гриппа в дозе 10 LD₅₀. В каждую группу опыта брали по 10 мышей. На 3-й и 5-й сут. после инфицирования животных забивали, вскрывали грудную клетку и готовили бронхолегочные смывы (БЛС), промывая легкие через трахею 1 мл физиологического фосфатного буфера. Из смывов готовили серию 10-кратных разведений на том же буфере. При определении титра вируса гриппа использовали культуру клеток MDCK, выращенных на 96 луночных планшетах на среде MEM. Клетки заражали серийными 10-кратными разведениями БЛС от 10⁰ до 10⁻⁶ и инкубировали в термостате в течение 48 ч. По окончании срока инкубации культуральную жидкость переносили в лунки планшета для иммунологических реакций, после чего добавляли равный объем 1%-ной взвеси куриных эритроцитов в физиологическом растворе.

Уровень репродукции вируса в лунках панели оценивали по реакции гемагглютинации (РГА) эритроцитов. За титр вируса принимали величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации, и выражали в логарифмах 50%-ной экспериментальной инфекционной дозы вируса (lg ЭИД₅₀).

Гистологический анализ. Для морфологического исследования легкие фиксировали 10%-ным формалином на фосфатном буфере, отмывали в проточной воде в течение ночи, дегидратировали в этаноле нарастающей концентрации, проводили через хлороформ, заливали в парафин и готовили из полученных блоков срезы толщиной 4 мкм. Срезы освобождали от парафина ксилолом, регидратировали в этаноле убывающей концентрации, окрашивали гематоксилином и эозином, дифференцировали в подкисленном спирте, окончательно обезвоживали в спиртах нарастающей концентрации, проводили через 2 смены ксилола и заключали в бальзам. Полученные препараты исследовали под световым микроскопом Leica DM1000. Качественно оценивали интенсивность и клеточный состав воспалительного инфильтрата в очагах пневмонии, а также степень дегенеративных и пролиферативных процессов в ткани легких.

Для оценки адекватности модели гриппозной инфекции у животных проводили сравнительный морфологический анализ, сопоставляя патологические изменения в легких животных с таковыми в аутопсийном материале. Для анализа использовали гистологические материалы от пациентов, умерших от пандемического гриппа A / H1N1 / 2009, подтвержденного при помощи лабораторного анализа (ПЦР и вирусовыделение с последующим серотипированием) из коллекции НИИ гриппа СЗО РАМН.

Ультроструктурные исследования. Для изучения ультроструктурных особенностей вирусного морфогенеза в клетках при воздействии Ингавирина® клетки MDCK, выращенные в 24-луночных планшетах, обрабатывали препаратом в концентрации 150 мкг / мл за 1 ч до заражения вирусом гриппа в дозе 100 СТД₅₀ на клетку. Через 6 и 20 ч после заражения контроль-

ные и опытные клетки культуры фиксировали 2,5%-ным раствором глутаральдегида на среде DMEM (pH – 7,2), центрифугировали 20 мин при 2 000 об. / мин и фиксировали 2,5%-ным раствором OsO₄. Клетки обезвоживали ацетоном в возрастающей концентрации и заливали в смесь эпон / аралдит. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме *Ultracut (Reichert, Австрия)*, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали на электронном микроскопе JEM-100S (*Jeol, Япония*) при инструментальном увеличении 5 000–50 000. Фотосъемку производили на пленку ФТ-41МД.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов (расчет средних значений и стандартных отклонений) проводили при помощи программы *Microsoft Excel*. Достоверность отличий оценивали по критерию Стьюдента. Достоверными считали различия между группами при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Как было показано при помощи морфологического анализа, заражение животных адаптированным вирусом гриппа А / H1N1 / 2009 приводило к развитию патологического процесса с типичными для гриппозной инфекции проявлениями. На 3-и сут. после инфицирования в легких отмечались изменения в виде скоплений нейтрофилов и клеточного детрита в просветах крупных бронхов, вирусоспецифическое поражение бронхиального эпителия с формирова-

нием в эпителиоцитах вирусных включений и отторжением пораженных клеток в просвет бронха, интенсивного геморрагического отека, нейтрофильной инфильтрации и распада клеток в респираторных отделах (рис. 1а, б). Значительная часть нейтрофилов при этом находилась в стадии распада. Перечисленные явления типичны для интенсивно протекающей вирусной пневмонии, а степень их выраженности может служить критерием оценки тяжести процесса.

При сравнении морфологических особенностей гриппозной пневмонии у мышей и людей было отмечено принципиальное сходство морфогенеза 2 процессов. Как было описано, тяжелая гриппозная пневмония у пациентов также характеризовалась серозно-геморрагическим отеком легких, поражением слоя бронхиального эпителия, а также интенсивной нейтрофильной инфильтрацией легочной паренхимы и респираторных отделов (рис. 1в, г).

К 12-м сут. развития инфекции у животных серозный экссудат замещался клеточным, состоящим из нейтрофилов, лимфоцитов и макрофагов. Слой бронхиального эпителия восстанавливался и пролиферировал, образуя характерные структуры гиперплазированных клеток и аденоматозные структуры, окруженные массивными инфильтратами лимфоидно-макрофагальных элементов, что приводило к карнификации обширных отделов легких (рис. 2а).

Сходные явления были отмечены и в аутопсийном материале при длительном течении гриппозной пневмонии (рис. 2б). Как и в модельном экспери-

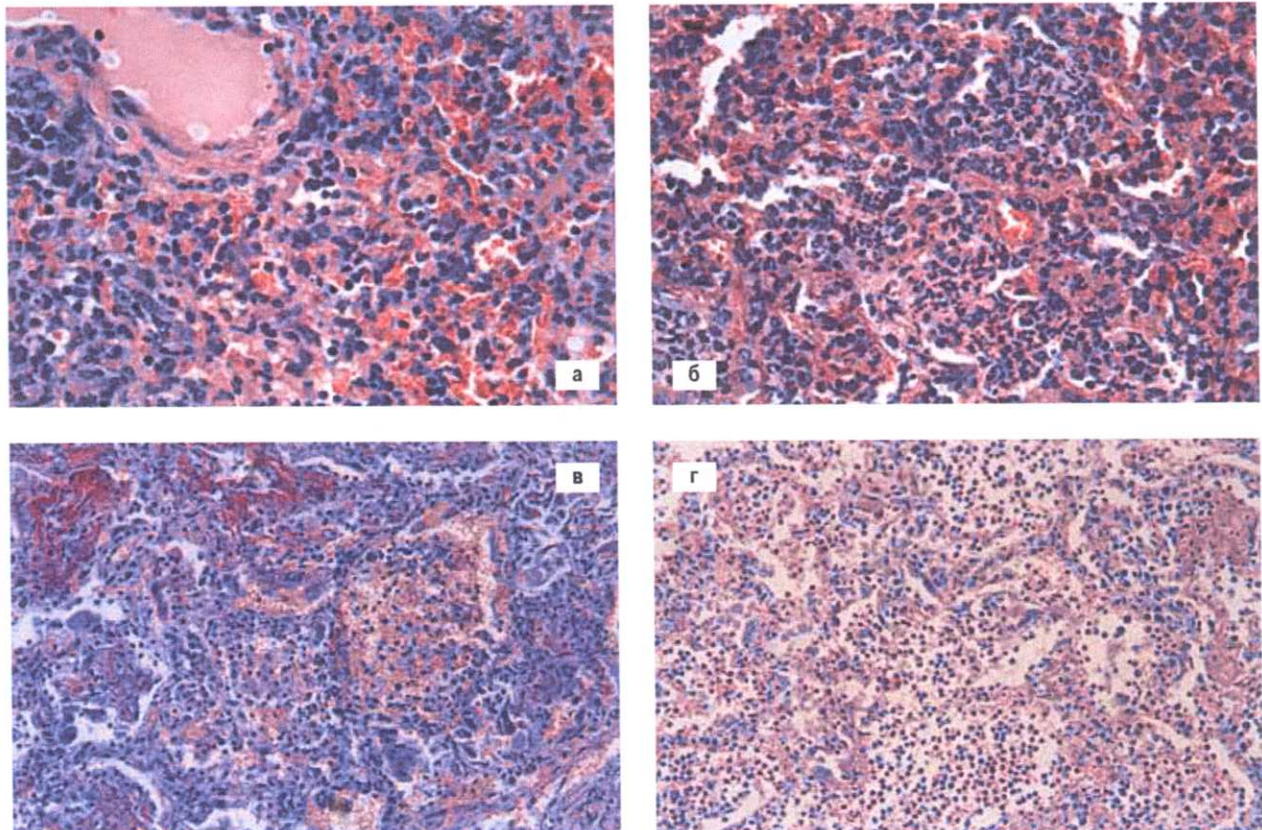


Рис. 1. Очаги острой гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа А/California/07/09 (H1N1) v, у мыши (а, б) и человека (в, г): а, в – геморрагический экссудат в респираторных отделах; б, г – отек межальвеолярных перегородок и очаги нейтрофильной инфильтрации. Окраска гематоксилином и эозином; а, б – $\times 400$; в, г – $\times 240$

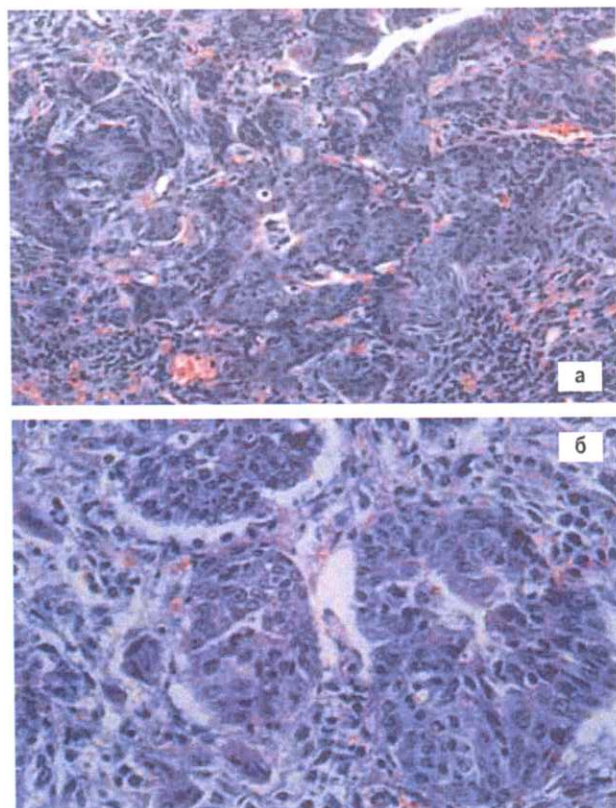


Рис. 2. Очаги метапластических изменений бронхиального эпителия на дальних сроках гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1) v, у мыши (а) и человека (б). Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$

менте, в очагах гриппозной пневмонии у людей обнаруживались зоны гиперплазии эпителия и типичные аденоматозные структуры, сформированные крупными эпителиальными клетками.

Таким образом, на основании собственных данных и результатов зарубежных исследователей [9–11] можно утверждать, что разработанная модель гриппозной инфекции, вызванной пандемическим вирусом гриппа А / H1N1 / 2009, воспроизводит принципиальные черты аналогичного процесса у человека.

Титрование вируса в препаратах БЛС показало, что при использовании Ингавирина® инфекционность вирусного потомства, сформированного в клетках легких, снижается более чем на порядок по сравнению с инфекционностью вируса у контрольных животных (таблица). Статистически противовирусный эффект Ингавирина® оказался сопоставимым с эффектом препарата сравнения — осельтамивира.

Таблица
Влияние химиопрепаратов на инфекционную активность вирусного потомства при экспериментальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1) v

Препарат	Инфекционный титр вируса ($\log_{10} \text{EID}_{50} / 20 \text{ мг ткани}$)
Ингавирин®	$3,5 \pm 0,4; p = 0,036$
Тамифлю®	$3,4 \pm 0,3; p = 0,004$
Контроль вируса	$4,7 \pm 0,1$

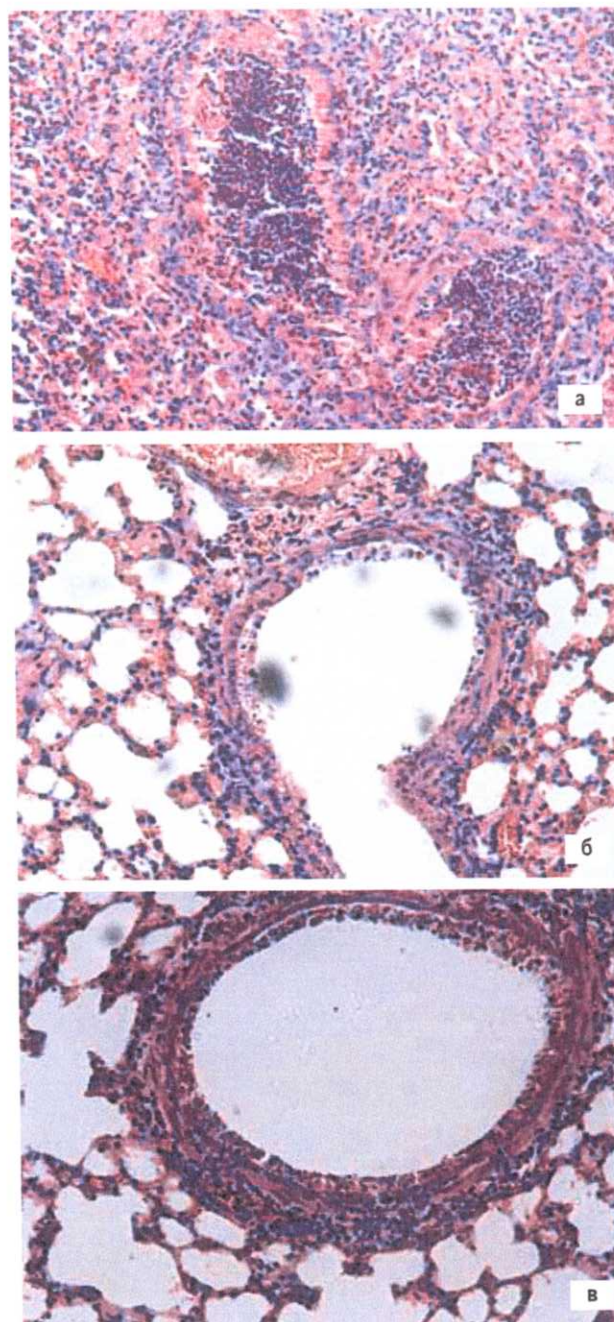


Рис. 3. Очаги острой гриппозной пневмонии на 3-и сут. после инфицирования вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1) v без применения препаратов (а) и на фоне применения Ингавирина® (б) и Тамифлю® (в): а — деструкция клеток бронхиального эпителия, отек стромы и интенсивный клеточный инфильтрат в просвете бронха, периваскулярном и перибронхиальном пространстве; б — интактные клетки эпителия, умеренный инфильтрат и сохраненные респираторные отделы; в — большинство клеток эпителия интактны, незначительная перибронхиальная инфильтрация и отек межальвеолярных перегородок. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 200$

Противовирусные свойства Ингавирина® обосновывают его способность к существенному снижению степени проявления патологических изменений в легких. Как было показано в ходе гистологического анализа, инфицирование вирусом гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1) v приводило к развитию у животных выраженных деструктивных изменений

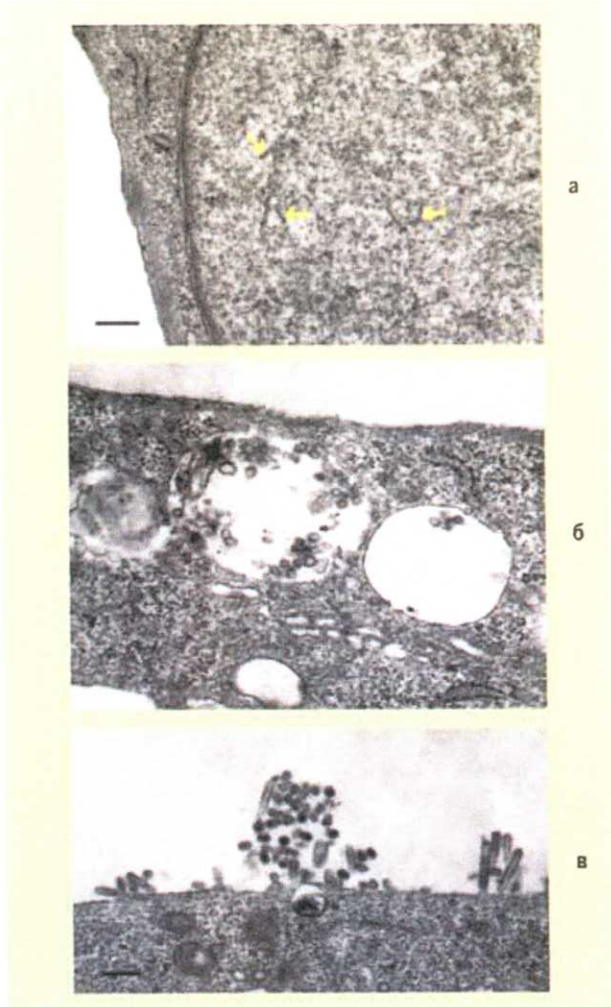


Рис. 4. Морфогенез гриппозной инфекции, вызванной вирусом A/California/07/09 (H1N1) v в клетках MDCK: а – вирусоспецифические включения в ядре клетки через 6 ч после заражения. Видна спиральная структура нуклеокапсидов (указаны стрелками); б – вакуолизация цитоплазмы и почкование вирионов в вакуоли через 20 ч после заражения; в – почкование вирионов потомства кластерами от плазматической мембраны клетки через 20 ч после заражения; а, в – $\times 20\,000$, б – $\times 25\,000$

в легких. Применение химиопрепаратов, как Ингавирин®, так и Тамифлю®, оказывало нормализующее воздействие на структуру ткани легкого (рис. 3). Таким образом, в настоящем исследовании получены данные, согласующиеся с предыдущими результатами. Так, ранее нами было показано выраженное противовирусное действие Ингавирин® в отношении клеток бронхиального эпителия – первых клеток-мишеней, в наибольшей степени страдающих при гриппозной инфекции [12].

Для изучения ультраструктурных особенностей морфогенеза гриппозной инфекции при воздействии Ингавирин® были проведены электронно-микроскопические исследования на инфицированной культуре клеток.

Заражение культуры MDCK вирусом пандемического гриппа приводило к типичным изменениям ультраструктуры клеток. Так, уже через 6 ч после инфицирования в ядрах клеток наблюдались пересор-

тировка хроматина и развитие многочисленных оформленных (фибрилярных) и диффузных ядерных включений различной плотности. В их составе были хорошо различимы типичные спиральные структуры, представляющие собой новосинтезированные рибонуклеопротеиды, еще не покрытые оболочкой (рис. 4а).

Через 20 ч после инфицирования клеток процессы цитодеструкции достигали максимальных показателей. В цитоплазме клеток на этой стадии отчетливо прослеживались признаки цитотоксического действия вируса. Сама цитоплазма содержала большое число вакуолей, в которых отмечались многочисленные почкующиеся вирионы гриппа (рис. 4б). На поверхности клеток отмечались вирионы потомства, почкующиеся от плазматической мембраны, а также зрелые внеклеточные вирусные частицы. Характерной морфологической особенностью использованного в работе пандемического вируса гриппа явилось почкование его не равномерно от всей поверхности клетки, а группировка вирионов кластерами (рис. 4в).

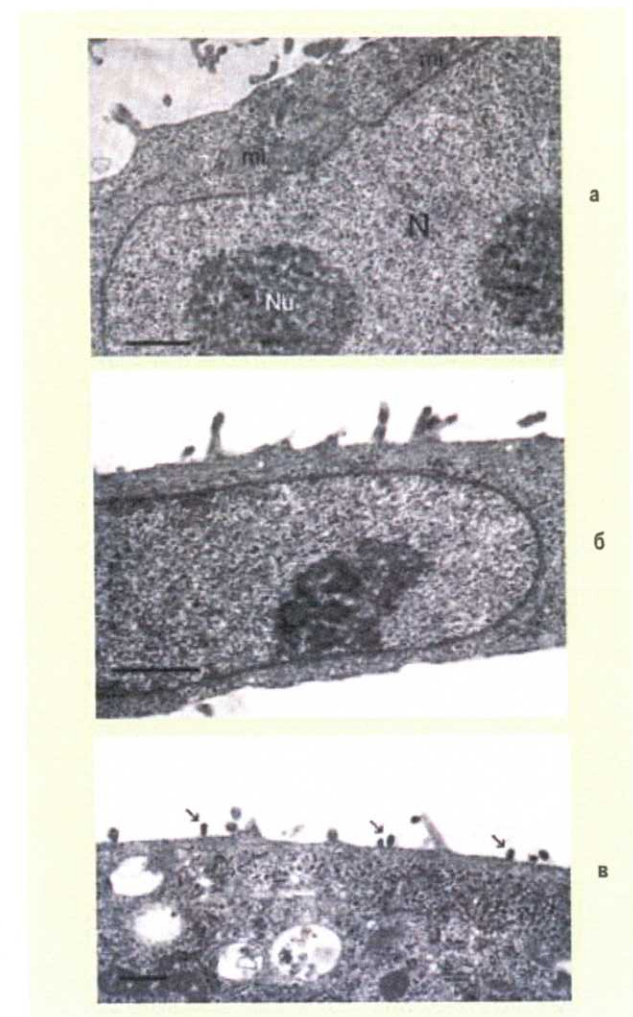


Рис. 5. Морфогенез гриппозной инфекции, вызванной вирусом A/California/07/09 (H1N1) v в клетках MDCK в присутствии Ингавирин®: а – клетка через 6 ч, б – через 20 ч после инфицирования; в – вирионы гриппа (указаны стрелками), почкующиеся от поверхности клетки; а, в – $\times 20\,000$, б – $\times 15\,000$
Примечание: N – ядро; Nu – ядрышко; mi – митохондрии.

Применение Ингавирина® существенно ограничивало признаки вирусной репликации в клетках. Так, через 6 ч после инфицирования клетки MDCK морфологически не отличались от интактной культуры. Признаков вирусной репликации или цитотоксического эффекта не наблюдалось ни в ядре, ни в цитоплазме клеток (рис. 5а). Через 20 ч после инфицирования признаки как цитотоксичности, так и вирусной репликации проявлялись значительно менее выражено, чем в контрольной культуре. Вакуолизации цитоплазмы не наблюдалось, цистерны аппарата Гольджи имели нормальную морфологическую структуру. Со стороны ядрышек отмечалась некоторая дезагрегация компонентов, не сопровождающаяся, однако, перестройкой структуры хроматина, как у контрольных клеток (рис. 5б). Процесс почкования вирионов потомства в присутствии Ингавирина® также существенно отличался от такового в клетках контрольной культуры. Вирионы почковались от плазматической мембраны по одному, а не кластерами, и их количество было существенно меньше, по сравнению с клетками без Ингавирина® (рис. 5в).

Заключение

Таким образом, в ходе проведенных исследований разработана модель гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа А / H1N1 / 2009 у животных, и показано ее принципиальное сходство с патологическим процессом при этой инфекции у человека. Применение препаратов Ингавирин® и Тамифлю® приводит к снижению инфекционной активности вируса в клетках и, как следствие, к ограничению патологического процесса в легких и нормализации их структуры. При помощи электронно-микроскопического анализа показано торможение вирусного морфогенеза на ядерных стадиях жизненного цикла вируса и на этапе почкования вирионов потомства в присутствии Ингавирина®, а также сохранение ультраструктуры клеток, инфицированных вирусом гриппа. Полученные данные свидетельствуют о этиотропном действии препарата Ингавирин®, что обуславливает его высокую противовирусную активность при летальной гриппозной инфекции. При этом конкретные мишени и механизмы реализации противовирусного действия требуют дополнительного изучения.

Литература

1. Cheng P.K., Leung T.W., Ho E.C. et al. Oseltamivir- and amantadine-resistant influenza viruses A (H1N1). *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15 (6): 966–968.
2. Wang B., Dwyer D.E., Blyth C.C. et al. Detection of the rapid emergence of the H275Y mutation associated with oseltamivir resistance in severe pandemic influenza virus A / H1N1 09 infections. *Antiviral Res.* 2010; 87 (1): 16–21.
3. Hurt A.C., Holien J.K., Parker M.W. et al. Oseltamivir resistance and the H274Y neuraminidase mutation in seasonal, pandemic and highly pathogenic influenza viruses. *Drugs* 2009; 69 (18): 2523–2531.
4. Hale B.G., Randall R.E., Ortin J. et al. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 2008; 89 (10): 2359–2376.
5. Pleschka S. RNA viruses and the mitogenic Raf/MEK/ERK signal transduction cascade. *J. Biol. Chem.* 2008; 389 (10): 1273–1282.
6. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Лыков М.В. и др. Изучение эффективности Ингавирина® in vitro в отношении "мексиканского" пандемического подтипа H1N1 вируса гриппа А, штаммы А/California/04/2009 и А/California/07/2009. *Антибиотики и химиотер.* 2009; 3–4: 15–17.
7. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Максимов В.А. и др. Изучение терапевтической эффективности нового отечественного препарата Ингавирин в отношении возбудителя гриппа А (H3N2). *Антибиотики и химиотер.* 2008; 53 (11/12): 27–30.
8. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27: 493–497.
9. Soto-Abraham M.V., Soriano-Rosas J., Diaz-Quinonez A. et al. Pathological changes associated with the 2009 H1N1 virus. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361 (20): 2001–2003.
10. Shieh W.J., Blau D.M., Denison A.M. et al. 2009 Pandemic influenza A (H1N1): Pathology and pathogenesis of 100 fatal cases in the United States. *Am. J. Pathol.* 2010.
11. Mauad T., Hajjar L.A., Callegari G.D. et al. Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 181 (1): 72–79.
12. Зарубаев В.В., Гаршинина А.В., Калинина Н.А. и др. Протективная активность препарата Ингавирин при экспериментальной летальной гриппозной инфекции белых мышей, вызванной пандемическим вирусом гриппа А (H1N1) v. *Антибиотики и химиотер.* 2010; 55 (5–6): 24–31.

Информация об авторах

Зарубаев Владимир Викторович – к. б. н., зав. лабораторией молекулярных основ химиотерапии вирусных инфекций НИИ гриппа СЗО РАМН; тел.: (812) 234-67-25; e-mail: zarubaev@influenza.spb.ru
 Калинина Нелли Александровна – к. м. н., ст. науч. сотрудник лаборатории молекулярных основ химиотерапии вирусных инфекций НИИ гриппа СЗО РАМН; тел.: (812) 234-67-25; e-mail: zarubaev@influenza.spb.ru
 Гаршинина Анжелика Валерьевна – науч. сотрудник лаборатории молекулярных основ химиотерапии вирусных инфекций НИИ гриппа СЗО РАМН; тел.: (812) 234-67-25; e-mail: zarubaev@influenza.spb.ru
 Беляевская Светлана Валентиновна – мл. науч. сотрудник лаборатории молекулярных основ химиотерапии вирусных инфекций НИИ гриппа СЗО РАМН; тел.: (812) 234-67-25; e-mail: zarubaev@influenza.spb.ru
 Сироткин Алексей Константинович – к. б. н., ведущий науч. сотрудник лаборатории протеомики НИИ гриппа СЗО РАМН; тел.: (812) 234-67-25; e-mail: sirotkin@influenza.spb.ru
 Небольсин Владимир Евгеньевич – к. х. н., сотрудник ОАО "Валента Фарм"; тел.: (495) 933-60-80; e-mail: nv@valentapharm.com
 Киселев Олег Иванович – акад. РАМН, д. б. н., директор НИИ гриппа СЗО РАМН; тел. (812) 234-62-00; e-mail: office@influenza.spb.ru

Поступила 23.07.10

© Коллектив авторов, 2010

УДК [616.98:578.831]-085.281.8