

ЯДЕРНАЯ НАУКА БОРЕТСЯ С МАЛЯРИЕЙ

РАДИАЦИОННЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ МОГУТ ВЫПОЛНЯТЬ ЦЕЛЕВЫЕ ЗАДАЧИ

СТЕФЕН ГРОТ, БАЛДИП ХАН,
АЛАН РОБИНСОН И ЙОРГ ХЕНДРИКС

Малария является наиболее серьезным заболеванием, переносимым насекомыми. В год в мире отмечается от 300 до 500 млн. клинических случаев заболевания малярией. Они ежегодно приводят к 2 млн. смертей (одна смерть каждые 30 с), более 90% которых имеют место в странах Африки к югу от Сахары. Свыше 90% пострадавших – дети в возрасте до пяти лет. Экономическое воздействие этого заболевания особенно тяжело сказывается на положении бедных семей, которым на меры профилактики и борьбы с болезнью может понадобиться тратить до четверти своего годового дохода. Возбудителями являются паразиты рода *Plasmodium*, которые переносятся только самками комаров рода *Anopheles*.

Среди ключевых стратегий борьбы с малярией – проверка эффективности противомаларийных препаратов путем контроля уровней устойчивости к лекарственным средствам и уменьшение популяции комаров. Ядерные методы могут играть важную роль в этих попытках бороться с малярией. В данной статье речь идет о деятельности МАГАТЭ, связанной с устойчивой к лекарственным препаратам малярией, и описывается, каким образом молекулярные методы, в рамках которых используются радиоактивные изотопы, могут обеспечить существенное преимущество при диагностике устойчивости. В статье также представлены планы МАГАТЭ по развертыванию программы исследований для оценки целесообразности разра-

ботки метода стерилизации насекомых (МСН) как дополнительного способа борьбы с носителями малярии.

ОБНАРУЖЕНИЕ УСТОЙЧИВОЙ К ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ МАЛЯРИИ

Лечение малярии лекарственными препаратами является краеугольным камнем в оказании помощи больным и, вероятно, останется таковым в долгосрочной перспективе. В некоторых регионах у паразитов развилась лекарственная устойчивость. Так, недорогое противомаларийное средство, хлорохин, более не действует на многие подвиды этого паразита. Устойчивость образовалась в результате таких изменений в мембране паразита, что мембрана, подвергающаяся воздействию хлорохина, непрерывно выкачивает его наружу.

Больным в районах, где наблюдается устойчивость к хлорохину, требуется лечение другими, более дорогими препаратами. Поскольку постоянно появляются новые разновидности малярийных паразитов, обладающие повышенной устойчивостью к применяемым в настоящее время лекарствам, непрерывное отслеживание развития лекарственной устойчивости является необходимым элементом деятельности всех программ борьбы с малярией. Предварительные данные из Кении показывают, что

в некоторых районах устойчивость к лекарствам, даже более новым, достигает 30%.

Значительно облегчают диагностирование лекарственно устойчивой малярии молекулярные методы. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является молекулярным методом, который можно использовать, чтобы обнаружить развившуюся лекарственную устойчивость. Применение изотопов в методе ДЮТ-блот-гибридизации в сочетании с ПЦР позволяет добиться повышенной чувствительности и специфичности при выявлении лекарственной устойчивости (см. вставку на стр. 34).

Эти молекулярные методы могут обнаружить лекарственную устойчивость к некоторым противомаларийным препаратам в течение нескольких часов. Получение той же информации традиционными методами занимает до 28 дней и требует значительной численности персонала на местах.

Передача молекулярных методов государствам-членам. В рамках трехгодичного проекта технического сотрудничества МАГАТЭ в Кении, Мали, Судане, Танзании, Замбии, Зимбабве и Уганде для выявления мутаций паразита, связанных с устойчивостью к этим лекарствам, недавно стали применяться ядерные методы.

В рамках этого проекта также оказывалась поддержка при раз-

Г-н Грот – директор Отдела здоровья человека МАГАТЭ, г-жа Хан – сотрудница Отдела; г-н Робинсон – руководитель Группы энтомологии Лабораторий МАГАТЭ в Зайберсдорфе; г-н Хендрикс – глава Секции борьбы с насекомыми-вредителями Объединенного отдела ФАО/МАГАТЭ по ядерным методам в продовольственной и сельскохозяйственной областях.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ В БОРЬБЕ С МАЛЯРИЕЙ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Основной принцип применения ПЦР в диагностике состоит в том, что, если присутствует заданный фрагмент ДНК, он будет размножен в ходе реакции, возможно, в миллионы раз, что даст такое количество вещества, которое легко может быть обнаружено. Процесс начинается с нагревания фрагмента ДНК для разделения его на две нити. Затем добавляется копирующий ДНК фермент под названием ДНК-полимераза для создания двух полных копий исходного фрагмента. Повторяя этот процесс, можно за короткое время получить миллионы копий исходного фрагмента ДНК. Зонды из радиоактивно помеченных нуклеиновых кислот могут быть затем использованы для идентификации фрагмента ДНК. Это очень чувствительный и специфичный метод, требующий лишь небольшого образца крови.

Основанная на ПЦР ДОТ-блот-гибридизация. Этот метод может использоваться для характеристики мутаций ДНК паразита. ДНК извлекают из крови, зараженной малярией, которая была нанесена на фильтровальную бумагу, и амплифицируют, используя ПЦР. ДНК непосредственно “накапывают” на нейлоновую мембрану. Для визуализации результатов применяются гибридизация с радиоактивно мечеными ДНК-зондами и автордиография с проявлением рентгеновской пленки и просмотром результатов. Преимущество этого метода состоит в том, что “пятна”, полученные из многочисленных образцов, могут анализироваться одновременно. Другое преимущество – возможность удалить радиоактивный зонд и ввести новый, определяющий другую мутацию; таким образом могут быть последовательно проверены несколько мутаций. Этот метод может применяться для обнаружения малочисленной устойчивой популяции во взятых у больных образцах крови, значительная доля которых содержит смесь устойчивых и чувствительных паразитов.

работке и реализации программ контроля за лекарственной устойчивостью, необходимых для эффективного лечения малярии. За время осуществления проекта курс лечения малярии прошли 10 тыс. человек. Из них данные по 3 тыс. использовались при исследованиях, а также был проведен молекулярный анализ 1500 образцов крови из пальца, взятых с применением фильтровальной бумаги. Анализ этих данных показал наличие положительного соотношения между распространенностью мутаций паразитов и устойчивостью паразитов к противомалярийным препаратам фансидар и хлорохин.

Эти результаты показывают, что частота мутаций была очень низка в тех странах (Мали и Су-

дан), где невелика устойчивость к фансидару (2,5%). Что касается устойчивости к хлорохину, сообщается о высокой частоте мутаций и, соответственно, высоком уровне устойчивости к хлорохину в Кении, Мали и Танзании.

Практические результаты испытаний на местах. В Мали молекулярное тестирование хлорохина и фансидара проводилось во время эпидемии малярии. Там, где не было оборудования для микроскопического анализа, с помощью фильтровальной бумаги производился оперативный анализ образцов крови, взятой из пальца. Результаты были получены через несколько дней (в противоположность обычному тесту, занимающему 28 дней) и показали, что мутации, устойчивые к хлорохи-

ну, присутствовали в 75% образцов, тогда как устойчивость к фансидару отсутствовала. Поэтому фансидар применялся и был высокоэффективен в борьбе с эпидемией.

В результате этой работы появился быстрый и надежный инструмент широкомасштабного мониторинга хлорохиновой устойчивости, что ранее было невозможно по причинам значительных затрат времени, средств и персонала, необходимых для проведения стандартных клинических исследований устойчивости к хлорохину. Теперь можно будет обеспечить выборку большей популяции и предоставить руководителям программы борьбы с малярией более точную, чем ранее, информацию.

Расширение масштабов работы. В дополнение к передаче африканским странам технологии в рамках программы были установлены связи с другими международными и региональными программами борьбы с малярией. В их числе – Инициатива по борьбе с малярией Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), Многосторонняя инициатива по борьбе с малярией (МИМ) и Восточноафриканская сеть мониторинга лечения малярии (ЭАНМАТ).

В качестве дополнения к осуществляемой деятельности танзанийскому партнеру МАГАТЭ было поручено произвести генотипирование образцов малярии из девяти африканских стран, участвующих в проекте, который объединил ряд центров. В этом проекте основное внимание уделяется эффективности комплексной терапии при лечении малярии, и такой подход поддерживается Целевой группой ВОЗ по устойчивости к противомалярийным препаратам и политике в области борьбы с малярией. Выражается надежда, что комбинированное применение двух противомалярийных препаратов, а именно фансидара и артемисинина, будет препятствовать появ-

лению лекарственной устойчивости к обоим препаратам. При генотипировании образцов используется та же молекулярная технология, что и в региональном африканском проекте.

Дальнейшие шаги. Основываясь на успешном внедрении методов молекулярной биологии, МАГАТЭ в декабре 2000 г. решило расширить сферу охвата проекта и включить дополнительные африканские страны в расширенное региональное исследование. Это было сделано в значительной мере на основании предложений, внесенных африканскими государствами-членами (Угандой, Замбией, Суданом), а также вследствие общей заинтересованности других государств-членов, включая Нигерию и Гану. Проект был разработан при том понимании, что менее опытным учреждениям в регионе будет оказана поддержка со стороны более развитых и опытных.

Пока более радикальные варианты решения проблемы искоренения малярии, такие как вакцинация и борьба с переносчиком, находятся в стадии разработки, предложенные методы эффективного выявления лекарственной устойчивости будут способствовать эффективному лечению больных, которое является одной из основных стратегий контроля Инициативы ВОЗ по борьбе с малярией. Этот проект будет соответствовать Абуджийской декларации, в которой, среди прочего, содержится призыв к созданию механизмов, упрощающих предоставление надежной информации лицам, ответственным за принятие решений на различных уровнях эпидемиологического контроля, что даст возможность органам здравоохранения разработать подходящие стратегии контроля и наблюдения.

Общая цель проекта состоит в том, чтобы базовые изотопные молекулярные методики стали средством обеспечения уверенности и создания потенциала соответствующих организаций в

МЕТОД СТЕРИЛИЗАЦИИ НАСЕКОМЫХ (МСН)

Начиная с 50-х гг. было доказано, что можно бороться с вредными насекомыми или уничтожать их методом “контроля рождаемости”, известным как “метод стерилизации насекомых” (МСН). Ключевыми элементами МСН являются массовое разведение вредных насекомых, против которых ведется борьба, на больших биофабриках, стерилизация их ионизирующим излучением и рассеяние по воздуху на местности на систематической основе и в количестве, достаточном для достижения необходимого преобладания стерильных насекомых над дикими. Дикие самки не будут иметь потомства после спаривания с выпущенными стерильными самцами, что приведет к снижению природной популяции вредителя.

Главным в применении МСН является принцип охвата всего района, согласно которому обработке должна подвергаться вся популяция вредителя в данном районе или регионе. МСН также не является автономной технологией. Чтобы быть эффективной, она должна быть интегрирована с другими методами борьбы с вредителями. Тем не менее МСН обладает уникальным свойством — его эффективность возрастает по мере уменьшения плотности целевой популяции, и в результате этот метод может привести к полному ее уничтожению в случае систематического применения ко многим поколениям на основе охвата всего района. МСН также является наиболее безопасным для окружающей среды методом борьбы с вредителями, поскольку он полностью *видоспецифичен*: стерильность индуцируется исключительно у целевого вида и воздействует, таким образом, только на популяцию вредного насекомого.

Полевые испытания МСН против комаров. В прошлом предпринималось несколько попыток разработки МСН против комаров, которые имели переменный успех. Они включали следующие полевые испытания:

<i>Culex fatigans</i>	Индия, 1962 г.
<i>C. pipiens quinquefasciatus</i>	Флорида, США, 1970 г.
<i>C. p. fatigans</i>	Индия, 1975 г.
<i>C. tarsalis</i>	Калифорния, США, 1965 г.
<i>C. tarsalis</i>	Калифорния, США, 1980 г.
<i>Aedes aegypti</i>	Флорида, США, 1962 г.
<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	Флорида, США, 1962 г.
<i>Anopheles albimanus</i>	Сальвадор, 1975 г.

отношении использования более совершенных, автоматизированных и, возможно, неизотопных методов решения основных проблем здравоохранения. Для поддержки этих усилий проект будет осуществляться в тесном сотрудничестве с ВОЗ.

БОРЬБА С МАЛЯРИЙНЫМИ КОМАРАМИ

Было доказано, что метод стерилизации насекомых (МСН) весьма эффективен для борьбы с определенными широко распространенными насекомыми-вредителями и/или их уничтожения, вклю-

чая переносчика трипаносомоза животных — муху цеце. В результате за последнее десятилетие от государств-членов неоднократно поступали запросы на разработку данной технологии применительно к малярийным комарам.

Ранее было предпринято, с переменным успехом, несколько попыток разработать МСН против *Anopheles*. При том или ином новом подходе можно многое позаимствовать из этих более ранних исследований, а также воспользоваться существенными усовершенствованиями, внесенными в технологию МСН

со времени этих давних полевых испытаний. В двух консультативных докладах, составленных по поручению МАГАТЭ, для МСН рекомендовались несколько видов-кандидатов из рода *Anopheles*, а также возможные участки для проведения первоначальных полевых испытаний. Вместе с тем в докладах подчеркивается, что до этого этапа следует устранить важные технические ограничения, относящиеся к нескольким ключевым компонентам технологии МСН.

С этой целью МАГАТЭ, откликаясь на просьбы многих государств-членов и в соответствии с резолюцией Генеральной конференции (GC-44/24), прошедшей в сентябре 2000 г., решило провести анализ технической осуществимости применения МСН к одному из основных переносчиков малярии. Исследования будут первоначально проводиться в отношении одного из основных видов *Anopheles gambiae*, распространяющих малярию, который является единственным ее переносчиком на больших территориях в Африке.

Анализ технической осуществимости. Анализ будет проведен в отношении требующих решения следующих технических проблем:

■ **Разработка эффективных методов массового разведения.** Успех МСН зависит от возможности массового производства высококачественных насекомых для стерилизации и выпуска. В случае комаров *Anopheles* необходимо добиться крупных усовершенствований в области разведения личинок и сбора куколок. Обе эти стадии проходят в водной среде, и к ним нелегко применить технологию массового производства. Содержание большого числа взрослых комаров для производства яиц не должно быть серьезной проблемой, а системы кормления через мембрану уже существуют.

■ **Усовершенствование технологий стерилизации, обработки и выпуска.** Необходимо разработать процедуры облучения для получения стерильных самцов комаров необходимого качества. В прошлом это представляло определенные проблемы, и необходимы новые пути для эффективной стерилизации самцов куколок или взрослых особей. Рассчитанная на охват района в целом программа МСН для комаров потребует рассеяния стерильных насекомых над большими площадями, для чего необходимо выпускание с воздуха. Следует определить, возможно ли это в отношении таких хрупких насекомых, как комары, или же следует рассмотреть способы выпуска стерилизованных куколок.

■ **Разработка генетических и молекулярных методов производства самцов комаров.** Любая программа МСН для комаров потребует выпуска только самцов с целью предотвратить увеличение переноса выпущенными стерильными самками, поскольку только самки способны переносить малярию. В 70-х гг. для многих видов *Anopheles* были разработаны системы генетического выбора пола с применением классической менделевской генетики, и опыты на средиземноморской фруктовой мушке *Ceratitis capitata* показали, что этот подход пригоден для массового производства самцов насекомых. В настоящее время молекулярные подходы к созданию генетических систем выбора пола разрабатываются многими лабораториями, но пока не была продемонстрирована какая-либо испытанная методика. В отсутствие надежной и безопасной системы выбора пола применение МСН может принести значительный вред.

■ **Интеграция МСН с другими методами борьбы с *Anopheles*.** МСН не является автономной технологией и дол-

жен быть интегрирован с другими методами подавления популяции. Обработанные инсектицидами кроватные сетки, применение которых пропагандирует ВОЗ, широко используются сейчас для борьбы с комарами, а в отношении их эффективности и стоимости достигнуты значительные успехи. Такие сетки защищают людей от самок комаров *Anopheles*, убивая их. Поскольку этот метод направлен против самок комаров, он полностью совместим с ведущимся одновременно выпуском стерильных самцов, с тем чтобы целевая популяция подвергалась обоим видам воздействия. Опрыскивание жилых помещений также направлено против самок комаров, поэтому и данный метод можно сочетать с выпуском стерильных самцов.

Перспективы. Работа над производством генетически измененных комаров, неспособных переносить малярию, с целью замещения популяции имеет высокий приоритет у многих организаций, включая ВОЗ, несмотря на определенную долю скептицизма со стороны энтомологов-медиков. Предлагается производить такое замещение путем подселения к целевой популяции относительно малого числа генетически измененных комаров, которые будут затем активно распространять в популяции неспособность переносить заболевание.

В настоящее время не существует проверенного механизма для осуществления такого замещения, и не исключено, что понадобятся массовые выпуски фертильных комаров. В таком случае станут необходимы описанные в данной статье методы разведения и выпуска.

Серьезно рассматривается также возможность применения стерильных самок комаров для переноски вакцин. В этом случае тоже потребуются технологии массового разведения и выпуска. □