

Антиаденовирусное и иммуностимулирующее действие 6-азацитидина

Л. Н. Носач*, Н. С. Дяченко, А. С. Шаламай¹, И. В. Алексеева¹,
Л. Я. Кушко², И. И. Озвинчук², В. Л. Жовноватая, С. И. Бутенко,
И. А. Петровская², Г. Н. Дранник²

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины,
252143 Киев, ул. Академика Заболотного, 154

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
252143 Киев, ул. Академика Заболотного, 150

²НИИ урологии и нефрологии МЗ Украины,
252053 Киев, ул. Ю. Коцюбинского, 9а

Установлено, что оригинальный аналог цитидина — 6-азацитидин (6-АЦ) подавляет репродукцию аденовируса в широком диапазоне концентраций и имеет высокий химиотерапевтический индекс (62). В тех же концентрациях 6-АЦ присущиммуномодулирующий эффект, проявляющийся в повышении функциональной активности иммунокомпетентных клеток. Полученные данные свидетельствуют о перспективности 6-АЦ как полифункционального препарата для химиотерапии аденовирусной инфекции, в патогенезе которой существенная роль принадлежит иммунодепрессивному действию вируса.

Введение. Многолетний активный поиск антивирусных препаратов среди синтетических нуклеозидов, их производных и аналогов к настоящему времени завершился внедрением в медицинскую практику наиболее эффективных лекарственных средств и в первую очередь идоксуридина, видарабина, рибавирина, ацикловира и ганцикловира [1]. При значительной распространенности аденовирусной инфекции препараты для ее лечения, к сожалению, практически отсутствуют. Аденовирусная инфекция характеризуется не только разнообразием клинических форм, но и тяжелым течением заболевания у детей, у взрослых в закрытых коллективах, а также у больных с иммунодефицитным состоянием, вызванным предшествующим заболеванием или иммуносупрессивной терапией, применяемой при трансплантации органов. Кроме того, аденовирусы, как и другие вирусы, обладают иммуносупрессивными свойствами. В связи с этим создание оригинального препарата с аденовирусным действием, активирующего или восстанавливающего иммунную систему, представляется особенно важным.

В Институте молекулярной биологии и генетики НАН Украины синтезирован оригинальный структурный аналог цитидина — 6-азацитидин [6-АЦ, 2-β-D-рибофуранозил-5-амино-1, 2, 4-триазин-3(2H)-он] [2] и показан широкий спектр его биологической активности, в том числе антиви-

*Correspondens address.

русной [3—5], противоопухолевой [6] и противомикоплазменной [7]. Препарат эффективно подавляет репродукцию аденовируса, ингибируя синтез вирусных макромолекул [8—10].

Цель данной работы состояла в изучении влияния 6-АЦ на репродукцию аденовирусов, синтез нуклеиновых кислот в неинфицированных и инфицированных культурах клеток, а также в исследовании некоторых показателей, характеризующих состояние монослоя этих клеточных культур и функциональную активность различных популяций иммунокомпетентных клеток в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. Синтез 6-азацитидина. 6-АЦ получали по упрощенному методу "силильной конденсации" в два этапа, как описано в работе [2]. Первый этап включает реакции силилирования и последующего каталитического гликозилирования азапиримидинового основания 4-тио-6-азаурацила перацелированным сахаром; реакции проводили одновременно в одном реакторе.

На следующем этапе ацилированный 4-тио-6-азануклеозид аминировали безавтоклавным способом [11] и удаляли группировки, блокирующие гидроксилы рибозного остатка. По физико-химическим показателям полученный препарат был идентичен эталонному образцу.

Определение антиаденовирусной активности 6-АЦ. В работе использовали эталонный штамм аденовируса 1-го типа (АД 1) и культуру клеток HeLa. Антиаденовирусную активность 6-АЦ определяли цитоморфологическим методом, который основан на подсчете числа инфицированных клеток, содержащих вирусспецифические внутриядерные ДНК-содержащие включения [12]. Клетки выращивали в пробирках с полосками покровных стекол на среде с 10 % инактивированной сыворотки крупного рогатого скота. Через 48 ч клетки инфицировали Ад 1 (около 10 БОЕ на клетку), далее, после 60-мин адсорбции при комнатной температуре, отмывали раствором Хенкса и инкубировали в среде Игла, содержащей 6-АЦ в разных концентрациях. Контролем служили инфицированные клетки, не обработанные препаратом. Через 48 ч после заражения клетки фиксировали 96 %-м этиловым спиртом, промывали раствором Хенкса, флюорохромировали 0,01 %-м раствором акридинового оранжевого и исследовали в люминесцентном микроскопе МЛ-2 (ЛОМО). Инфицированные клетки выявляли по наличию характерных внутриядерных включений, просчитывая по 500 клеток на трех стеклах. Об ингибирующем влиянии препарата на репродукцию вируса судили по снижению числа инфицированных клеток в опыте по сравнению с контролем и выражали в процентах.

Параллельно изучали влияние 6-АЦ на синтез гексона, используя непрямой метод флюоресцирующих антител. Данный метод также позволяет определять число инфицированных клеток: о заражении свидетельствует наличие в ядрах специфического вирусного антигена. Клетки фиксировали ацетоном на холоду, на первом этапе обрабатывали кроличьей антисывороткой к структурному белку капсида аденовириона гексону, а на втором - мечеными антикроличьими антителами производства Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАН (Москва). Принцип расчета аналогичен описанному выше.

Люминесцентная микроскопия неинфицированной культуры клеток. Клетки выращивали в течение 48 ч в пробирках на полосках покровных стекол, в которые затем вносили 6-АЦ в разных концентрациях в составе среды. Спустя 24 и 48 ч клетки фиксировали спиртом и флюорохромировали 0,01 %-м раствором акридинового оранжевого для определения цитодеструктивного действия 6-АЦ и выявления митотических клеток. Число митозов подсчитывали на 1000 клеток в препарате.

Определение влияния 6-АЦ на ростовую способность клеток. Клетки

выращивали в пробирках. Через 48 ч роста проводили замену ростовой среды на среду, содержащую 6-АЦ в разных концентрациях. Спустя 24 и 48 ч клетки снимали трипсином с трех пробирок и определяли их число в камере Горяева, используя нейтральный красный для дифференциации живых и мертвых клеток [13].

Определение влияния 6-АЦ на синтез ДНК и РНК. Клетки выращивали на дне сцинтилляционных флаконов. Через 24 ч после обработки неинфицированных и инфицированных клеток 6-АЦ определяли активность синтеза ДНК и РНК, используя [^3H]тимидин и [^3H]уридин. Клетки метили в течение 1 ч. Монослой клеток тщательно отмывали холодным раствором Хенкса, фиксировали кислотонерастворимый материал на дне флаконов 5 %-м раствором ТХУ, затем последовательно отмывали ТХУ, смесью этилового спирта с эфиром (2:1), эфиром и высушивали. Радиоактивность определяли, используя сцинтилляционный счетчик Beckman LS-7800. Интенсивность синтеза ДНК и РНК выражали в имп/мин на флакон, ингибирование синтеза — в процентах по отношению к контролю, принимаемому за 100 %.

Определение функциональной активности иммунокомпетентных клеток. В экспериментах по изучению влияния 6-АЦ на клетки иммунной системы были использованы мыши линии BALB/c.

Активность естественных киллеров (ЕК) в пуле клеток селезенки определяли по отношению к эритромиелоидной клеточной линии К-562, меченной ^{51}Cr . В лунки круглодонных планшетов помещали по 10^4 этих клеток в 0,1 мл культуральной среды RPMI 1640, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина. Затем в лунку вносили по 0,1 мл взвеси лимфоидных клеток и по 0,025 мл раствора 6-АЦ в исследуемых концентрациях. Соотношение клеток-мишеней и клеток-эффекторов составляло 1:25. По истечении срока инкубации планшеты центрифугировали при 1500 об/мин (5 мин). Из каждой лунки отбирали по 0,1 мл супернатанта и определяли радиоактивность на гамма-счетчике. Результаты обрабатывали по общепринятой формуле и выражали в виде процента цитотоксичности.

Функциональную активность фагоцитирующих клеток выявляли по их способности поглощать частицы латекса. Для этого 0,1 мл клеток перитонеального экссудата, суспендированных в 0,5 мл среды 199, инкубировали с 6-АЦ при 37 °С в течение 2 ч в различных концентрациях. Затем в пробирку вносили по 0,05 мл суспензии латекса, содержащей $2,5 \cdot 10^5$ частиц в 1 мкл, и инкубировали еще в течение 1 ч. Осажденные центрифугированием клетки наносили на предметные стекла. Высушенные и фиксированные метанолом мазки окрашивали азури-эозином. В препаратах подсчитывали процент фагоцитирующих клеток и фагоцитарное число — количество поглощенных частиц латекса на один фагоцит.

Пролиферативную активность клеток селезенки оценивали по включению [^3H]тимидина. Для этого в 96-луночные планшеты помещали по 0,1 мл взвеси лимфоцитов в концентрации $5 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл и инкубировали в течение 72 ч при 37 °С в CO_2 -инкубаторе в присутствии 6-АЦ. Для культивирования клеток использовали среду RPMI 1640, содержащую 10 % эмбриональной сыворотки, $5 \cdot 10^{-5}$ М 2-меркаптоэтанол, 40 мкг/мл гентамицина и 2 мМ L-глутамин. В качестве митогенов использовали ConA и PWM, которые вносили в лунки в объеме 0,025 мл при конечной концентрации 5 и 10 мкг/мл соответственно. За 4 ч до окончания культивирования в лунки добавляли по 37 кБк [^3H]тимидина. Содержимое лунок переносили на фильтры, которые промывали физиологическим раствором, затем 5 %-й ТХУ и фиксировали этанолом. Высушенные фильтры помещали в сцинтилляционную жидкость ЖС-8 и радиометрировали на

счетчике Бета-2. Данные по интенсивности метки (имп/мин) в трех параллельных измерениях усредняли.

Статистическую достоверность результатов определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Влияние 6-АЦ на аденовирусную инфекцию в культуре клеток. Разработанным нами [12] цитоморфологическим методом показано ингибирующее влияние 6-АЦ на репродукцию Ад 1 в культуре клеток, что выражалось в снижении числа инфицированных клеток в зависимости от концентрации препарата (рис. 1). В концентрации 125—62 мкг/мл 6-АЦ почти полностью предотвращал образование в ядрах

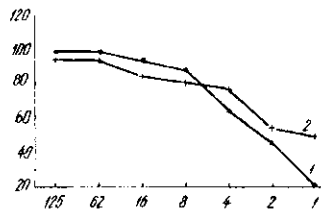


Рис. 1. Влияние 6-азациитидина на число инфицированных клеток, выявляемых по наличию в них антигена гексона (1) и вирусных внутриядерных ДНК-содержащих включений (2). По оси ординат: выраженность ингибирования в процентах по отношению к контролю; по оси абсцисс: концентрация 6-азациитидина, мкг/мл

характерных вирусоспецифических включений, снижая их число с 77 % в инфицированной контрольной культуре, не обработанной препаратом, до 6 % ($p < 0,01$). С уменьшением концентрации препарата число клеток с включениями возрастало, однако ингибирующий эффект был еще значительным. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) препарата, снижающая число инфицированных клеток на 50 %, составляла 2 мкг/мл. Сходный ингибирующий эффект 6-АЦ был обнаружен и при определении числа инфицированных клеток по наличию вирусного антигена, выявляемого методом флюоресцирующих антител (рис. 1). В целом процесс ингибирования репродукции Ад 1 в культуре клеток 6-АЦ имеет дозозависимый характер.

Влияние 6-АЦ на состояние и ростовые показатели монослоя культуры клеток. Максимальная концентрация 6-АЦ, не влияющая на морфологию клеток и целостность монослоя, составляла 125 мкг/мл; она обозначена как максимально переносимая концентрация (МПК).

Определено влияние 6-АЦ на митотическую активность культуры клеток, инкубированной с 6-АЦ в течение 24 и 48 ч (рис. 2). Наблюдается резкое снижение числа митотических клеток в культурах, инкубированных с 6-АЦ в концентрации 125—31 мкг/мл, вплоть до полного их исчезновения при действии первой дозы. В течение суточной инкубации 6-АЦ в концентрации 8—0,1 мкг/мл также резко снижает число митотических клеток, а в культурах, обработанных наименьшей исследованной дозой (0,01 мкг/мл), этот показатель уже не отличается от контрольной культу-

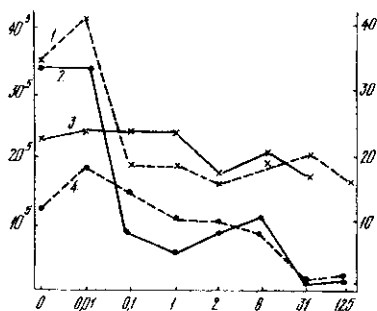


Рис. 2. Влияние 6-азациитидина на число клеток (1, 3) и митотическую активность (2, 4) культуры клеток HeLa. Время после заражения (ч): 2, 3 — 24 ч; 1, 4 — 48 ч. По оси ординат: слева — число клеток, справа — число митозов на 1000 клеток; по оси абсцисс: концентрация 6-азациитидина, мкг/мл; 0 — в отсутствие 6-азациитидина (контроль)

ры. В условиях двухсуточной инкубации 6-АЦ в концентрации 8—0,1 мкг/мл уже практически не влияет на митотическую активность исследуемых культур, а в присутствии 0,01 мкг/мл 6-АЦ наблюдается некоторое увеличение числа митотических клеток.

Число клеток в монослое, инкубированном в течение 24 ч с 6-АЦ в концентрации 125—0,01 мкг/мл, фактически не отличалось от контрольного показателя (культуры, не инкубированной с веществом). Ингибирующее влияние 6-АЦ на прирост клеток проявляется в культурах, инкубированных с препаратом в течение 48 ч, причем эффект не имеет дозовой зависимости и одинаково выражен при действии 6-АЦ в концентрациях от 125 до 0,1 мкг/мл. Наименьшая исследованная доза (0,01 мкг/мл) уже не оказывала эффекта.

Следовательно, 6-АЦ в концентрациях, в разной степени ингибирующих репродукцию Ад (125 мкг/мл и ниже), не оказывал цитодеструктивного влияния на монослойную культуру клеток, но подавлял ее митотическую активность через 24 ч и последующий прирост клеток еще спустя сутки. Полученные материалы свидетельствуют о том, что в присутствии 6-АЦ не развивается характерный для нормальной культуры пик митоза через 24 ч и последующий пик прироста клеток через 1 сут.

Влияние 6-АЦ на синтез нуклеиновых кислот в неинфицированных и инфицированных аденовирусами культурах клеток. Материалы по влиянию 6-АЦ на синтез ДНК и РНК представлены на рис. 3. Для получения более полной картины нам представляется целесообразным проанализировать эти процессы раздельно: в неинфицированных и инфицированных культурах. Наблюдается резкое снижение синтеза ДНК в неинфицированной культуре клеток под воздействием 6-АЦ в концентрации 62 мкг/мл; оно менее выражено, но отмечается и при воздействии в концентрации вещества 31 мкг/мл.

Таким образом, 6-АЦ в обеих дозах, почти полностью подавляющих репродукцию Ад 1, также значительно снижает уровень синтеза клеточной ДНК в неинфицированных клетках. 6-АЦ в дозах 16—2 мкг/мл, ингибирующих репродукцию Ад более чем на 50 %, стимулирует синтез клеточной ДНК, причем выраженность эффекта нарастает с уменьшением дозы вещества и достигает максимума в клетках, инкубированных в течение суток с 6-АЦ в концентрации 2 мкг/мл. Следующая исследованная доза препарата — 1 мкг/мл, ингибирующая репродукцию вируса менее чем на 50 %, обладает более слабым стимулирующим эффектом, а дозы 0,1 и 0,01 мкг/мл практически не влияют на репродукцию вируса и синтез ДНК в неинфицированных клетках.

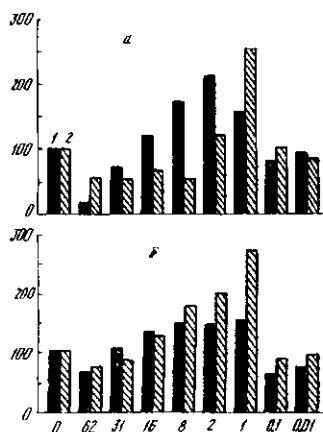


Рис. 3. Влияние 6-азациитидина на синтез ДНК (а) и РНК (б) в неинфицированной (1) и инфицированной (2) культуре клеток HeLa. По оси ординат: интенсивность синтеза в процентах по отношению к контролю; по оси абсцисс: концентрация 6-азациитидина, мкг/мл

Характер влияния 6-АЦ на синтез ДНК в культуре клеток, инфицированной Ад, несколько иной. 6-АЦ в концентрациях 62—8 мкг/мл примерно в равной степени ингибирует синтез ДНК в инфицированной культуре клеток; при воздействии препарата в концентрации 2 мкг/мл этот процесс приближается к уровню контрольной культуры. Стимулирующий эффект в инфицированной культуре наблюдается при воздействии 6-АЦ в концентрации 1 мкг/мл, а при действии еще меньших исследуемых доз процесс приближается к уровню, соответствующему контролю. Ранее [9] нами с помощью метода молекулярной гибридизации ДНК — ДНК показано снижение уровня синтеза вирусной ДНК при воздействии 6-АЦ в концентрациях 62—8 мкг/мл, наиболее выраженное в присутствии первой дозы ингибитора. В препаратах, обработанных 6-АЦ в концентрации 1 мкг/мл, синтез вирусной ДНК отмечается примерно на уровне инфицированных клеток, не инкубированных с ингибитором. Вероятно, в инфицированных клетках в присутствии средних доз 6-АЦ могут одновременно происходить ингибирование синтеза вирусной ДНК и стимулирование синтеза клеточной ДНК; выраженность этих процессов неодинакова при воздействии разных доз препарата, что отражается на общем уровне синтеза ДНК. Так, при воздействии 6-АЦ в концентрации 16—8 мкг/мл первый процесс, вероятно, превалирует, что проявляется в падении общего уровня синтеза ДНК. При снижении концентрации 6-АЦ до 2 и 1 мкг/мл ингибирующее воздействие его на синтез вирусной ДНК уменьшается.

Значительное возрастание общего уровня синтеза ДНК в инфицированной культуре в присутствии 6-АЦ в концентрации 1 мкг/мл обусловлено, видимо, как стимуляцией синтеза клеточной ДНК, так и достаточно высоким уровнем синтеза вирусной ДНК, приближающимся к уровню в инфицированной культуре без ингибитора.

По нашему мнению, некоторые особенности ингибирующего влияния 6-АЦ в средних дозах (8 мкг/мл) могут быть выяснены при сопоставлении общих уровней синтеза ДНК в неинфицированной и инфицированной культуре клеток, а также уровня синтеза вирусной ДНК. Как указывалось ранее, в неинфицированных культурах в подобных условиях синтез клеточной ДНК не только не подавляется, но и в определенной степени стимулируется, т. е. ингибирующего воздействия 6-АЦ не наблюдается. С другой стороны, общий уровень синтеза в инфицированной культуре при такой концентрации 6-АЦ значительно снижен, здесь также снижен синтез вирусной ДНК, как это показано нами ранее [9].

Изложенный выше материал свидетельствует о большей чувствительности к 6-АЦ синтеза ДНК именно в инфицированных клетках, в частности, о воздействии препарата на синтез вирусной ДНК. Обнаруживается, таким образом, некоторая избирательность его антиаденовирусного действия, если понимать под этим влияние на процессы, происходящие в инфицированной Ад клетке и проявляющиеся в ингибировании репродукции вируса. Механизмы этого процесса требуют самостоятельного детального изучения.

Результаты экспериментов по изучению влияния 6-АЦ на синтез РНК представлены на рис. 3. В неинфицированной культуре клеток 6-АЦ в концентрации 62 мкг/мл лишь незначительно ингибирует синтез РНК, а при снижении концентрации ингибитора в два раза (31 мкг/мл) интенсивность процесса возвращается к таковой в контрольных клетках без вещества. В присутствии 6-АЦ в средних дозах (16—8 мкг/мл) уровень синтеза РНК несколько возрастает и остается в таких пределах при дальнейшем уменьшении концентрации 6-АЦ (2—1 мкг/мл). В клетках, инкубированных с 6-АЦ в концентрации 0,1 и 0,01 мкг/мл уровень синтеза РНК практически не отличался от контрольных показателей. Следует обратить внимание на одинаковые показатели включения меченых тимидина и

уридина в неинфицированных и инфицированных культурах клеток в присутствии 1 мкг/мл 6-АЦ.

Таким образом, выявлены некоторые общие тенденции во влиянии 6-АЦ на синтез ДНК и РНК, но в целом его воздействие на синтез РНК выражено слабее, что можно рассматривать как свидетельство большей устойчивости этого процесса к действию ингибитора. Подобная закономерность наблюдалась и при изучении влияния 6-АЦ на синтез ДНК и РНК микоплазмами [7].

Нам представлялось целесообразным сравнить результаты влияния 6-АЦ на синтез нуклеиновых кислот, митотическую и ростовую активность культуры клеток тем более, что соответствующие эксперименты проводили в сопоставимых условиях. Как описано выше, в присутствии 6-АЦ достаточно отчетливо подавляется митотическая активность культуры после 24-ч инкубации, что проявляется через сутки в снижении ростовых потенциалов культуры. Указанный эффект не имеет дозовой зависимости и развивается в условиях действия 6-АЦ в концентрациях как ингибирующих, так и стимулирующих синтез нуклеиновых кислот. Это свидетельствует о достаточно высокой чувствительности процесса митоза к действию 6-АЦ и подтверждает наличие у препарата определенных цитостатических свойств.

Влияние 6-АЦ на некоторые показатели, характеризующие функциональную активность иммунокомпетентных клеток. Учитывая то, что при аденовирусной инфекции наблюдается подавление активности ЕК, макрофагов, угнетение пролиферативного ответа лимфоцитов на митогены [14], мы сопоставили противоаденовирусный эффект 6-АЦ с его влиянием на функциональную активность указанных иммунокомпетентных клеток.

Проведенные эксперименты продемонстрировали выраженную способность 6-АЦ усиливать функциональную активность ЕК *in vitro* в достаточно широком диапазоне доз — от 5 до 50 мкг/мл. Максимальное усиление цитотоксического действия ЕК ($5,6 \pm 1,4$; $p < 0,01$) отмечается уже при действии 5 мкг/мл препарата. Эффект этой дозы без существенных изменений сохраняется при возрастании концентрации 6-АЦ до 50 мкг/мл. Как видно из данных, представленных на рис. 4, стимулирующее действие 6-АЦ на активность ЕК не носит дозозависимого характера. Более того, под влиянием препарата в дозе 100 мкг/мл наблюдается снижение цитотоксичности ЕК до уровня контроля.

После инкубации клеток перитонеального экссудата с 6-АЦ *in vitro* отмечается усиление функциональной активности фагоцитирующих клеток. Это проявляется в способности этих клеток поглотить большее количество частиц латекса; при этом изменений числа фагоцитирующих клеток не

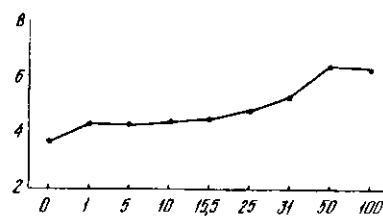
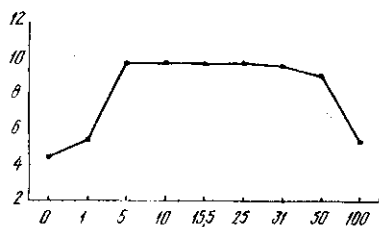


Рис. 4. Влияние 6-азациитидина на активность естественных киллеров. По оси ординат: процент цитотоксичности; по оси абсцисс: концентрация 6-азациитидина, мкг/мл

Рис. 5. Влияние 6-азациитидина на функциональную активность фагоцитирующих клеток. По оси ординат: фагоцитарное число; по оси абсцисс: концентрация 6-азациитидина, мкг/мл

наблюдается. Стимулирующий эффект препарата наиболее выражен и носит достоверный характер при воздействии в концентрациях от 31 до 100 мкг/мл (рис. 5).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что 6-АЦ способен усиливать функциональную активность иммунокомпетентных клеток, осуществляющих первую линию противинфекционной защиты и играющих важную роль в формировании и развитии иммунного ответа.

Наряду с описанными выше свойствами 6-АЦ может также стимулировать пролиферацию лимфоидных клеток. Как видно из данных, представленных на рис. 6, препарат усиливает пролиферацию лимфоцитов как спонтанную, так и индуцированную митогенами. Во всех условиях достоверный эффект стимуляции зарегистрирован при использовании высоких доз препарата (50—100 мкг/мл). Необходимо отметить, что уровень спонтанной пролиферации лимфоцитов под влиянием 6-АЦ увеличивается в большей степени (на 97 %, $p < 0,01$), чем в условиях активации клеток митогеном. В последнем случае усиление пролиферативного ответа на PWM (митоген, преимущественно активирующий В-клетки) происходит более

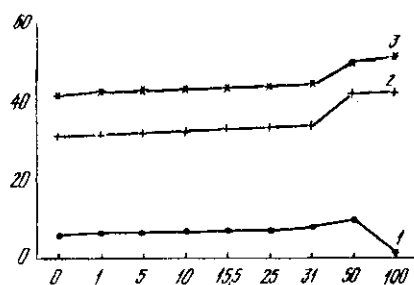


Рис. 6. Влияние 6-азациитидина на пролиферативную активность лимфоцитов: 1 — спонтанная пролиферация; 2 — индуцированная PWM; 3 — индуцированная КонА. По оси ординат: (имп/мин) · 10²; по оси абсцисс: концентрация 6-азациитидина, мкг/мл

выраженно, чем на КонА-Т-клеточный митоген (соответственно на 37 и 25 %). Представленные результаты свидетельствуют о способности 6-АЦ в определенных дозах активировать различные популяции иммунокомпетентных клеток, что позволяет его характеризовать как препарат, обладающий иммуномодулирующими свойствами.

Анализируя данные по влиянию 6-АЦ на функциональную активность иммунокомпетентных клеток, следует обратить внимание на некоторые особенности этого воздействия. Так, 6-АЦ повышает исследуемые показатели, в первую очередь, пролиферативную активность В-лимфоцитов, причем в отдельных случаях процесс имеет дозозависимый характер, т. е. его выраженность возрастает с увеличением концентрации 6-АЦ. Исследуемые концентрации 6-АЦ по-разному влияют на синтез клеточной ДНК в эпителиальных клетках: от стимулирования (средние и малые дозы, 16—1 мкг/мл) до ингибирования (высокие дозы 62—32 мкг/мл); препарат в высоких концентрациях блокирует митоз и прирост клеток. Следовательно, полученные результаты могут рассматриваться как свидетельство того, что стимулирующее влияние 6-АЦ на иммунокомпетентные клетки, вероятно, связано с функциональным, метаболическим и структурным своеобразием этих клеток.

Важно также отметить, что все анализируемые в данном аспекте дозы 6-АЦ не были цитотоксическими и в разной степени подавляли репродукцию Ад 1, причем дозы 6-АЦ, максимально усиливающие пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов и другие исследуемые показатели, полностью ингибировали репродукцию аденовируса.

Таким образом, полученные данные подтверждают тот факт, что 6-АЦ в равной мере обладает антиаденовирусной и иммуномодулирующей актив-

ностью.

Способность изменять активность клеток иммунной системы выявлена у некоторых производных других нуклеозидов, таких как гуанозин и аденозин. Биологическое действие этих модифицированных нуклеозидов на иммунокомпетентные клетки проявляется как в усилении, так и подавлении иммунного ответа, при этом механизмы реализации такого действия существенно отличаются. В частности, некоторые производные гуанозина усиливают активность В-клеточного звена иммунной системы в результате рекрутирования незрелых предшественников В-лимфоцитов. Производные аденозина оказывают ингибирующий эффект на иммунный ответ, активируя Т-супрессоры [15]. Эти отличия могут быть обусловлены особенностями метаболизма нуклеозидов в иммунокомпетентных клетках, отдельные популяции которых различаются количеством и соотношением всевозможных типов ферментов, вовлекаемых в их метаболизм. Последнее обстоятельство, возможно, и определяет зависимость от дозы 6-АЦ при воздействии на разные популяции клеток иммунной системы.

Предполагаемым механизмом антивирусного действия 6-АЦ как структурного аналога цитидина является его фосфорилирование в клетках до 6-азацитидинмонофосфата и ингибирование оротатфосфорибозилтрансферазы, что, как и при воздействии 6-азауридина, ведет к нарушению синтеза нуклеиновых кислот. В клетке, возможно, происходит дезаминирование 6-АЦ до 6-азауридина с последующим антивирусным эффектом, который возникает вследствие действия его как конкурентного ингибитора оротидилатдекарбоксилазы [16]. Для понимания ингибиторного эффекта 6-АЦ важны результаты сравнительного изучения его влияния на репликацию и трансляцию генома микоплазм, которое исследовали в системе *in vitro* с включением соответствующих ферментов. Оказалось, что наиболее чувствителен к действию 6-АЦ процесс репликации ДНК, так как сам 6-АЦ или его метаболит значительно подавляет активность ДНК-зависимой ДНК-полимеразы уже в концентрации 5 мкг/мл, а также, но в меньшей степени—процесс трансляции на рибосомах в системе *in vitro* [7].

Сопоставляя результаты влияния 6-АЦ в средних и малых концентрациях на синтез аденовирусных белков (структурных и растворимых вирусиндуцированных) и аденовирусной ДНК, мы видим, что более чувствителен к действию ингибитора первый процесс. Так, 6-АЦ в концентрации 8 мкг/мл значительно, но не полностью ингибирует синтез аденовирусной ДНК; при этом как в физиологических условиях, так и гипертоническом солевом режиме, благоприятном для синтеза вирусных белков, полностью подавляется синтез аденовирусных белков за исключением одного низкомолекулярного вирусиндуцированного, вероятно, раннего полипептида. Подобная закономерность наблюдается и при действии 6-АЦ в концентрации 1 мкг/мл: синтез вирусной ДНК практически не нарушен, а синтез вирусных белков в обоих режимах подавлен значительно. Эти материалы свидетельствуют, по нашему мнению, о том, что существенным моментом антиаденовирусного действия 6-АЦ является его влияние на синтез вирусных структурных и растворимых (вирусиндуцированных) белков [9, 10].

Важным показателем, характеризующим перспективность 6-АЦ как химиотерапевтического препарата, является ХТИ (химиотерапевтический индекс), т. е. отношение МПК и МИК. Для 6-АЦ он достаточно высок и равен 62, что свидетельствует о его выраженной специфической активности и перспективности.

6-АЦ также обладает противоопухолевой активностью и низкой токсичностью по сравнению с другими препаратами аналогичного действия [6, 17]. При однократном внутривенном введении LD_{50} для мышей составляет 14 600, для крыс — 9200 мг/кг. Он не оказывает выраженного влияния на

гемопоез у здоровых животных при многократном введении в терапевтических дозах. Срок полувыведения препарата при внутривенной инъекции составляет 63 мин [18]. В отличие от 5-АЦ, он не обладает мутагенным действием [19].

Таким образом, 6-АЦ присущ широкий спектр биологического действия, характеризующийся влиянием на синтез нуклеиновых кислот и белка, процесс митоза, наличием противоопухолевой активности на фоне низкой цитотоксичности и отсутствия мутагенности. Наиболее важным представляется антивирусное действие 6-АЦ, в частности, его способность подавлять репродукцию аденовирусов в широком диапазоне концентраций и высокий показатель ХТИ, а также иммуномодулирующий эффект, проявляющийся в повышении функциональной активности иммунокомпетентных клеток. Все вышесказанное свидетельствует о перспективности 6-АЦ как полифункционального средства для химиотерапии аденовирусной инфекции и обуславливает целесообразность его дальнейшего изучения в подобном аспекте.

Исследования выполнены по теме 01.02.02/023-92 направления 1.2 программы ГКНТ Украины «Здоров'я людини».

Л. М. Носач, Н. С. Дяченко, А. С. Шаламай, І. В. Алексеева, Л. Я. Кушко, І. І. Озвинчук,
В. Л. Жовновата, С. І. Бутенко, І. О. Петровська, Г. Н. Дранник

Протиаденовірусна та імуностимулююча дія 6-азацитину

Резюме

У роботі встановлено, що оригінальний аналог цитидину — 6-азацитин (6-АЦ) пригнічує репродукцію аденовірусу в широких межах концентрацій та має високий хіміотерапевтичний індекс (62). При тих же концентраціях 6-АЦ притаманий імуномодулюючий ефект, який виявляється у зростанні функціональної активності імунокомпетентних клітин. Отримані результати свідчать про перспективність 6-АЦ як поліфункціонального препарату для хіміотерапії аденовірусної інфекції, у патогенезі якої значна роль належить імунодепресивній дії вірусу.

L. N. Nosach, N. S. Dyachenko, A. S. Shalamay, I. V. Alekseeva, L. Ya. Kushko, I. I. Ozvinchuk,
V. L. Zhovnovataya, S. I. Butenko, I. A. Petrovskaya, G. N. Drannik

Antiadenovirus and immunostimulating actions of 6-azacytidine

Summary

The influence of an original cytidine analogue, 6-azacytidine (6-AC), on the reproduction of a human type I adenovirus in HeLa cell cultures, on a synthesis of nucleic acids as well as on some characteristics showing the state of the cell culture monolayer and functional activity of various populations of immunocompetent cells in vitro has been studied. It was established that the 6-AC effectively inhibits the adenovirus reproduction in a wide concentration range, has a high antiviral index (62), and in vitro conditions it possesses the immunomodulating action stimulating the T-lymphocyte proliferation, phagocytic activity and activity of natural killers. Depending on the concentration, the 6-AC exerts a variable action on a synthesis of nucleic acids, particularly on DNA in the non-infected and infected cells: its high concentrations, which completely or almost completely inhibit the adenovirus reproduction, decrease nucleic acids synthesis; less concentrations stimulate it suppressing adenovirus reproduction for 50% or less. The 6-AC concentrations differently inhibiting the adenovirus reproduction did not exert the cytotoxic effect on the monolayer cell culture, but they inhibit its mitotic and growth activities.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Еришов Ф. И., Чижов Н. П., Тазулахова Э. Б. Противовирусные средства.— С.-Петербург, 1993.—104 с.
2. А. с. 1625881 А1, СССР. Способ получения 6-азацитина / А. С. Шаламай, С. С. Огняник, И. В. Алексеева, В. С. Гончаренко // Открытия.—1991, № 5.

3. Старчеус А. П., Чернецкий В. П. Вплив 6-азауридину, 6-азацитидину та 8-азагуаніну на репродукцію аденовірусу 4-го типу в культурі тканини // Мікробіол. журн.—1967.—29, № 2.—С. 157—160.
4. Бектемиров Т. А., Линицкая Г. А., Чернецкий В. П., Галегов Г. А. Ингибирующее действие 6-азацитидина на репродукцию вируса осповакцины в культуре ткани // Вопр. мед. химии.—1974.—20, № 3.—С. 50—52.
5. Фролов А. Ф., Радолицкая Л. С., Решотько Л. Н., Чернецкий В. П. Действие аномальных нуклеозидов на экспериментальную гриппозную инфекцию белых мышей // Вирусы и вирус. заболевания: Респ. сб. — Киев: Здоровья, 1986.—Вып. 14.—С. 3—6.
6. Петруша Н. А. Противоопухолевые свойства некоторых аномальных нуклеозидов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1969.—15 с.
7. Скрипаль И. Г., Бабичев В. В., Безуглый С. В. и др. Ингибиторное действие 6-азацитидина на молликуты и его предполагаемый механизм // Микробиол. журн.—1993.—55, № 2.—С. 99—104.
8. Носач Л. Н., Дяченко Н. С., Жовноватая В. Л. и др. Влияние аномальных нуклеозидов на репродукцию аденовируса I и синтез вирусных полипептидов // Антивирусные вещества: Тез. V. Междунар. симпоз. соц. стран.— Рига, 1982.—С. 151—152.
9. Носач Л. Н., Бутенко С. И., Тимофеева М. Я. и др. Анализ ДНК, синтезированной в инфицированных аденовирусом клетках при воздействии аналогов нуклеозидов // Микробиол. журн.—1989.—51, № 6.—С. 73—75.
10. Носач Л. Н., Дяченко Н. С., Бутенко С. И. и др. Влияние 6-азацитидина на экспрессию аденовирусного генома // Новые подходы к химиотерапии вирусных инфекций.— Рига: Зинатне, 1991.—С. 87—93.
11. Алексеева И. В., Сидоров Г. В., Шаламай А. С. и др. Синтез тритий-меченных 6-азауридина и 6-азацитидина // Методы молекуляр. биологии: Сб. науч. тр.— Киев, 1986.—С. 52—58.
12. Носач Л. Н., Дяченко Н. С. Цитопатология аденовирусной инфекции.— Киев: Наук. думка, 1982.—124 с.
13. Анджапаридзе О. Г., Гаврилов В. И., Семенов Б. Ф., Степанова Л. Г. Культура ткани в вирусологических исследованиях.— М.: Медгиз, 1962.—24 с.
14. Дяченко Н. С., Нас И., Беренчи Д. и др. Аденовирус, клетка, организм.— Киев: Наук. думка, 1988.—232 с.
15. Земсков В. М. Иммуномодулирующие эффекты нуклеозидов и их производных. Дефекты нуклеинового метаболизма и иммунодефициты // Иммунология.—1990.— № 3.—С. 4—7.
16. Преображенская М. Н., Мельник С. Я. Аналоги компонентов нуклеиновых кислот — ингибиторы нуклеинового обмена // Итоги науки и техники.—М.: ВИНТИ, 1984.—244 с.— (С. Биоорг. химия; Т. 1).
17. Петруша Н. А. Некоторые токсикофармакологические свойства 6-азацитидина // Фармакология и токсикология.—1987.— № 2.—С. 75—76.
18. Galushko S. V., Shishkina N. P. Reversed-phase ion-paired high-performance liquid chromatographic determination of 6-azacytidine in blood // Chromatography.—1985.—345, N 1.—P. 157—161.
19. Landolph J. R., Jones P. A. Mutagenicity of 5-azacytidine and related nucleosides in C3H/10T 1/2 clone 8 and V79 cells // Cancer Res.—1982.— 42.—P. 817—823.