

З. Ю. Ткачук, Л. І. Семернікова, В. В. Ткачук,
Л. М. Решотько, І. О. Михайлопуло, Г. Х. Мацука

ПРОТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ ТРИМЕРА 2', 5'-ОЛІГОАДЕНІЛОВОЇ КИСЛОТИ ТА ДЕЯКИХ ЇЇ АНАЛОГІВ

Вивчали противірусну дію 2',5'-триолігоаденілата та його похідних на модельних системах культури мишачих фібробластів L929 із вірусом вісповакцини, на культурі перевитих клітин тестікула поросяти з вірусом хвороби Ауескі (штам «БУК-628») та референтним штамом вірусу трансмісивного гастроентериту свиней (штам «Пурдью-115»). Противірусну дію препаратів оцінювали за зниженням титру вірусу Ig ТЦД-50 (тканинна цитопатична дія).

За результатами проведеної роботи можна припустити, що 2',5'-триолігоаденілат та його похідні є перспективними противірусними препаратами, які діють на ДНК-та РНК-вмісні віруси.

Вступ. Припускають, що основний біохімічний механізм дії 5'-три- та дифосфорильованих 2',5'-олігоаденілатів (2',5'-А), синтез яких ініціюється інтерфероном шляхом активації 2',5'-олігоаденілатсинтетази, пов'язаний з активністю латентної рибонуклеази (РНКази L). Показано, що остання в присутності 2',5'-олігоаденілата розщеплює односпірально РНК як вірусного, так і клітинного походження переважно в місцях ланцюга після послідовностей UA, UG, UU [1]. Противірусну дію олігоаденілатів та їх похідних вивчали на різних групах вірусів. Показано, що аналог природного тримера 2',5'-олігоаденілової кислоти 2',5'-А₃, що містить 9-(β-D-ксилофуранозил)аденін замість аденозина 2',5'-(хулоА)₃, має потенційну противірусну активність щодо вірусів *Herpes simplex* 1 і 2 [2], а природний 2',5'-олігоаденілат, діючи на клітини, інфіковані вірусом *H. simplex* [3], пригнічує синтез вірусної мРНК і майже не впливає на ріст незаражених клітин. На культурі клітин ангіоми людини показано, що дефосфорильований «кор» 2',5'-олігоаденілата пригнічував реплікацію вірусу Сіндбіс та везикулярного стоматиту [4]. Пригнічення було пов'язане з гальмуванням синтезу вірусних білків. Синтез клітинних білків в інфікованих клітинах не змінювався. Фосфорильовані похідні олігонуклеотидів, що вивчалися, противірусного ефекту не виявили. Дослідження 2',5'-олігоаденілатів та їх похідних є важливим і перспективним, оскільки їх можна використовувати як інгібіторів репродукції ретровірусів. Знайдено, що аналог природного тримера 2',5'-А₃, який містить 3'-дезоксиаденозин замість аденозина (нуклеозидний антибіотик кордицепін),— 2',5'-(3'-d-А)₃ є інгібітором зворотної транскриптази вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ-1) [5, 6]. Необхідно відмітити, що далеко не в усіх випадках антивірусний ефект інтерферону корелює з антивірусною дією індукованого ним 2',5'-А, що вказує на можливість існування інших механізмів противірусної дії 2',5'-олігоаденілатів [1]. Із наведених літературних даних видно, що результати досліджень мають достатньо суперечливий характер. Можна припустити, що олігоаденілати та їх похідні реалізують різні механізми противірусної дії.

Метою наших досліджень було вивчення противірусних властивостей «кору» 2',5'-А₃ та його похідних на моделі культур клітин з різними групами вірусів.

© З. Ю. ТКАЧУК, Л. І. СЕМЕРНІКОВА, В. В. ТКАЧУК, Л. М. РЕШОТЬКО,
І. О. МИХАЙЛОПУЛО, Г. Х. МАЦУКА, 1995

Матеріали і методи. В дослідях по визначенню дії олігоаденілатів використовували культуру клітин мишачих фібробластів L929, культуру клітин тестикул поросяти; вірус віспаковки; вірус хвороби Ауескі, штам «БУК-628», групи вірусів герпесу; референтний штам вірусу трансмісивного гастроентериту свиней, «Пурдю-115», групи коронавірусів. Вивчали противірусну дію природного тримера 2',5'-олігоаденілової кислоти 2',5'-A₃, а також два аналоги, що містять замість аденозина на 2',(3')-кінці 9-(2,3-ангідро-β-D-рибофуранозил)аденін, 2',5'-A₂(_{RAA}) та 9-(β-D-ксилофуранозил)аденін, 2',5'-A₂(хулоА). Вказані препарати одержані з Ін-ту біоорг. хімії АН Беларусі.

Вирощування клітин. Клітини мишачих фібробластів L929 вирощували на середовищі Ігла з глютаміном, що містило 10 % телячої ембріональної сироватки (попередньо інактивованої при температурі 59 °С протягом 30 хв), стрептоміцин та пеніцилін (100 од. у 1 мл середовища). Посівна доза клітин становила 300 000—500 000 клітин у 1 мл. Клітини культивували у флаконах або пробірках у термостаті при 37 °С протягом 48 год до утворення суцільного моношару. Клітини тестикул поросяти вирощували на середовищі з вмістом середовища 199 (45 %), гемогідролізату — 5 % (45 %), 10 % сироватки великої рогатої худоби (попередньо інактивованої при 59 °С протягом 30 хв), стрептоміцину і пеніциліну по 100 од./мл середовища. Умови для вирощування клітин тестикул поросяти аналогічні наведеним вище. Посівна доза клітин становила 50 000—70 000 кл./мл.

Визначення токсичної дії 2',5'-олігоаденілата та його похідних. Клітини мишачих фібробластів та тестикул поросяти вирощували у пробірках, додаючи до кожної з них по 1 мл клітинної суспензії (250 000—300 000 клітин). Пробірки ставили в термостат при 37 °С. Через 24 год контролювали ріст клітин під мікроскопом. При наявності суцільного моношару з пробірок виливали середовище росту і вносили 1 мл підтримуючого середовища (без сироватки), що містило досліджувані препарати в концентрації 10⁻⁴—10⁻⁷ моль/л. Препарати попередньо стерилізували через міліпорові фільтри (*d* = 0,32 мкм). Клітини з препаратами інкубували в термостаті при 37 °С протягом 5 днів. Про наявність токсичного ефекту дізнавалися за деструктивними змінами моношару клітин.

Визначення впливу 2',5'-олігоаденілата та його похідних на репродукцію вірусів. 48-год культуру з множинністю зараження культури 0,1 інф. од. на 1 клітину після контакту з вірусом (РНК-вмісним вірусом — 1 год, ДНК-вмісним — 1,5 год) промивали розчином Хенкса, далі у дослідні флакони вносили по 5 мл досліджуваних препаратів у підтримуючому середовищі. Цей момент приймається за нульовий час. Через 24 год культуру переглядали під мікроскопом, реєструючи інтенсивність ураження моношару клітин. При наявності цитопатичної дії у контрольних флаконах дослідні та контрольні флакони тричі заморожували і розморозували, центрифугували при 2000 об/хв протягом 15 хв, брали надсадову рідину і робили десяткові розведення. Потім заражали ними моношарову культуру, додаючи по 1 мл проби на пробірку. За цитопатичною дією визначали Іg титру вірусу [7].

Було також зроблено другу серію експериментів, яка передбачала внесення досліджуваних препаратів за 24 і 48 год до зараження клітин вірусом. Клітини інкубували з препаратами вказаний термін при 37 °С, після чого препарати вилучали з флаконів, клітини промивали підтримуючим середовищем і заражали вірусом з розрахунку 0,1 інф. од. на клітину. Вірус інкубували з клітинами протягом 24 год при 37 °С. Потім проводили всі операції, як описано вище.

Результати та обговорення. Досліди по вивченню токсичної дії 2',5'-A₃ та його похідних на культурі клітин мишачих фібробластів L929 показали, що всі досліджувані препарати в концентрації 10⁻⁴ моль/л мають слабку токсичну дію через 96 год інкубації з клітинами. Препарати в концентрації 10⁻⁵—10⁻⁷ моль/л є нетоксичними. У випадку куль-

тури клітин тестикул поросяти всі досліджувані препарати в концентрації 10^{-4} — 10^{-7} моль/л також є нетоксичними (табл. 1).

Вплив 2',5'- A_3 та його похідних на репродукцію РНК-вмісних вірусів (гастроентеровірусу свиней, штам «Пурдюю-115») і ДНК-вмісних вірусів (вірус вісповакцини, вірус хвороби Ауескі) вивчали у максимально нетоксичних концентраціях. Показано, що 2',5'- A_3 і 2',5'- A_2 (RAA) у концентрації 10 мкг/мл знижують lg титру вірусу вісповакцини на 3,54 і 2,54 lg ТЦД (тканинних цитопатичних доз) відповідно (табл. 2),

Таблиця 1

Визначення токсичної дії 2',5'-триолігоаденілата та його похідних на клітини мшачих фібробластів L929 та на клітини перевитих тестикул поросяти (ПТП)

Препарат	Концентрація, моль/л	Цитопатична дія				
		Час інкубації, год				
		24	48	72	96	120
L929						
2',5'- A_3	10^{-4}	—	—	—	+	+
То же	10^{-5}	—	—	—	—	—
»	10^{-6}	—	—	—	—	—
»	10^{-7}	—	—	—	—	—
2',5'- A_2 (RAA)	10^{-4}	—	—	—	+	+
То же	10^{-5}	—	—	—	—	—
»	10^{-6}	—	—	—	—	—
»	10^{-7}	—	—	—	—	—
2',5'- A_2 (хулоА)	10^{-4}	—	—	—	+	+
То же	10^{-5}	—	—	—	—	—
»	10^{-6}	—	—	—	—	—
»	10^{-7}	—	—	—	—	—
ПТП						
2',5'- A_3	10^{-4}	—	—	—	—	—
То же	10^{-5}	—	—	—	—	—
»	10^{-6}	—	—	—	—	—
»	10^{-7}	—	—	—	—	—
2',5'- A_2 (RAA)	10^{-4}	—	—	—	—	—
То же	10^{-5}	—	—	—	—	—
»	10^{-6}	—	—	—	—	—
»	10^{-7}	—	—	—	—	—
2',5'- A_2 (хулоА)	10^{-4}	—	—	—	—	—
То же	10^{-5}	—	—	—	—	—
»	10^{-6}	—	—	—	—	—
»	10^{-7}	—	—	—	—	—

Таблиця 2

Вплив 2',5'-триолігоаденілата та його похідних на репродукцію вірусу вісповакцини в культурі клітин мшачих фібробластів L929 вірусу хвороби Ауескі (штам «БУК-628») і вірусу трансмісивного гастроентериту свиней (штам «Пурдюю-115») в культурі клітин тестикул поросяти (ПТП)

Вірус	Препарат	Концентрація, мкг/мл	Титр вірусу lg ТЦД-50	Зниження титру вірусу lg ТЦД-50	Достовірність різниці, P
Вісповакцини	—	—	$4,77 \pm 0,2$	—	—
	2',5'- A_3	10	$1,23 \pm 0,12$	3,89	0,001
	2',5'- A_2 (RAA)	10	$2,23 \pm 0,11$	2,54	0,001
БУК-628	—	—	$6,0 \pm 0,1$	—	—
	2',5'- A_3	100	$4,23 \pm 0,16$	1,77	0,01
	2',5'- A_2 (RAA)	100	$5,34 \pm 0,09$	0,66	0,05
	2',5'- A_2 (хулоА)	100	$6,0 \pm 0,1$	9	—
Пурдюю-115	—	—	$6,67 \pm 0,12$	—	—
	2',5'- A_3	100	$6,67 \pm 0,12$	0	—
	2',5'- A_2 (RAA)	100	$5,17 \pm 0,12$	1,5	0,01
	2',5'- A_2 (хулоА)	100	$6,67 \pm 0,12$	0	—

що свідчить про перспективність використання цих препаратів як противірусних речовин, оскільки зниження \lg ТЦД на 1,25—1,5 є мінімальною активною концентрацією сполуки. Аналіз впливу 2',5'-A₃; 2',5'-A₂(_{RAA}) та 2',5'-A₂(хулоА) у концентрації 100 мкг/мл на репродукцію гастроентеровірусу свиней (штам «Пурдю-115») і вірусу хвороби Ауескі (штам «БУК-628») показав, що досліджувані препарати діють по-різному. Так, у випадку ДНК-вмісного вірусу хвороби Ауескі, який відносять до вірусів герпесу, потенційно перспективним противірусним препаратом є 2',5'-A₃, що знизив титр вірусу на 1,77 \lg ТЦД. У випадку РНК-вмісного гастроентеровірусу свиней (штам «Пурдю-115») препарат 2',5'-A₂(_{RAA}) у концентрації 100 мкг/мл дав зниження титру вірусу \lg ТЦД 1,5, що свідчить про його можливу перевагу при використанні відносно коронавірусів (табл. 2).

Нами також було проведено серію дослідів, у яких препарати 2',5'-A₃ і 2',5'-A₂(_{RAA}) контактували з клітинами тестикул поросяти протягом 24 і 48 год, після чого препарати вилучали і клітини заражали вірусом хвороби Ауескі і гастроентеровірусом свиней. Результати дослідів показали (табл. 3), що у випадку вірусу хвороби Ауескі 2',5'-A₃ знижував титр вірусу \lg ТЦД на 1,77 і 2,0 при 24- і 48-год інкубації відповідно, у той час як 2',5'-A₂(_{RAA}) знижував титр вірусу \lg ТЦД на 1,5 тільки при 48 год інкубації препарату з клітинами. Що стосується гастроентеровірусу свиней, то 2',5'-A₃ знизив титр вірусу \lg ТЦД на 4,0 при 24- і 48-год інкубації з клітинами, а 2',5'-A₂(_{RAA}) за тих же умов зменшував його на 1,5.

Таким чином, з порівняння результатів табл. 2 і 3 випливає, що у випадку вірусу хвороби Ауескі схема введення препарату 2',5'-A₃ до клітин не впливала на його противірусну активність, у той час як 2',5'-A₂(_{RAA}) мав противірусний ефект тільки за попереднього 48-год контакту з клітинами. Щодо гастроентеровірусу свиней, то препарат 2',5'-A₃ пригнічував репродукцію вірусу тільки при контактуванні його з клітинами протягом 24 і 48 год, але зниження \lg ТЦД було досить значне, тоді як 2',5'-A₂(_{RAA}) мав противірусний ефект за будь-якої схеми введення препарату до клітин. Препарат 2',5'-A₂(хулоА) не виявив противірусного ефекту ні у випадку вірусу хвороби Ауескі, ні у випадку гастроентеровірусу свиней в умовах відсутності попередньої інкубації препарату з клітинами (табл. 2).

Таким чином, одержані результати дозволяють припустити, що досліджувані препарати реалізують свою противірусну дію на різних групах вірусів за допомогою різних механізмів. Із попередніх робіт нашої лабораторії відомо, що 2',5'-A₃ впливає на вторинну структуру ДНК, і це призводить до утворення локально розплетених одноланцюгових ді-

Таблиця 3

Вплив 2',5'-олігоаденілати та його похідних на репродукцію вірусу хвороби Ауескі (штам «БУК-628») та вірусу трансмісивного гастроентериту свиней (штам «Пурдю-115») в первитих клітинах тестикул поросяти при попередній інкубації клітин з препаратом

Вірус	Препарат	Час інкубації, год	Титр вірусу \lg ТЦД-50	Зниження титру вірусу \lg ТЦД-50	Достовірність різниці, P
БУК-628	—	—	6,5 ± 0,1	—	—
	2',5'-A ₃	24	5,33 ± 0,2	1,77	0,05
	»	48	4,50 ± 0,14	2,0	0,05
	2',5'-A ₂ (_{RAA})	24	5,33 ± 0,18	1,17	0,05
	»	48	5,0 ± 0,22	1,50	0,05
	Пурдю-115	—	—	6,0 ± 0,12	—
	2',5'-A ₃	24	2,0 ± 0,14	4,0	0,01
	»	48	2,0 ± 0,12	4,0	0,01
	2',5'-A ₂ (_{RAA})	24	5,0 ± 0,16	1,5	0,05
	»	48	4,5 ± 0,12	1,5	0,05

Примітка. Дію препаратів вивчали в концентрації 100 мкг/мл.

лянок, які стають доступними для дії нуклеаз [8]. Цим можна пояснити вплив 2',5'-олігоаденілатів на ДНК-вмісні віруси. Не виключається також, що олігоаденілати та їх похідні мають інтерфероногенну дію.

Отже, ми вважаємо, що препарати 2',5'-A₃ та 2',5'-A₂(_{RNA}) є перспективними противірусними речовинами для використання їх при лікуванні та профілактиці вірусних захворювань.

Z. Yu. Tkachuk, L. I. Semernikova, V. V. Tkachuk,
L. M. Resholko, I. A. Mikhailopulo, G. Kh. Matsuka

ANTIVIRAL ACTIVITY OF TRIMERIC 2',5'-OLIGOADENYLIC ACID AND SOME OF ITS ANALOGUES

Summary

The authors have studied the antiviral effect of 2',5'-triligoadenylate and of its derivatives using several model cell culture systems and viruses: L929 murine fibroblast cells infected by vaccine virus, established testicular piglet cells inoculated by Aueszki disease virus (ADV) (strain BUK-628), and the same culture infected with Purdue-115 strain (reference strains of transmissible gastroenteritis virus (TGEV)).

So, it is possible to suppose that both 2',5'-triligoadenylate and its derivative are perspective antiviral preparations acting against DNA- and RNA-containing viruses.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Иткес А. В., Туницкая В. Л., Северин Е. С. Механизмы регуляции биологической активности клетки с участием 2',5'-олигоаденилата // Биохимия.— 1985.— 50, № 4.— С. 531—542.
2. Eppstein D. A., Marsh J. V., Schryver B. B. Mechanism of antiviral activity of (Xylo A2'p)2 Xylo A1 // Virology.— 1983.— 131.— P. 341—354.
3. Mitsuhiro Fujihara, Milligan J. R., Akira Kaji. Effect of 2',5'-oligoadenylate on Herpes simplex virus-infected cells and preventive action of 2',5'-oligoadenylate on the lethal effect of HSV-2 // J. Interferon Res.— 1989.— 9, N 6.— P. 691—707.
4. Tominaga Akihiro, Saito Sakura, Kohno Seiya et al. Antiviral effect of 2',5'-oligoadenylates (2',5'A₃) and related compounds // Microbiol. and Immunol.— 1990.— 34, N 9.— P. 737—747.
5. Muller W. E. J., Weiler B. E., Charubala Ramamurthy et al. Cordycepin analogues of 2',5'-oligoadenylate inhibit human immunodeficiency virus infection via inhibition of reverse transcriptase // Biochemistry.— 1991.— 30, N 8.— P. 2027—2033.
6. Montefiori D. C., Sobol R. W., Li Shi Wu et al. Phosphorothionate and cordycepin analogues of 2',5'-oligoadenylate: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and infection *in vitro* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1989.— 86, N 18.— P. 7191—7194.
7. Топчий М. К., Корнюшенко Н. П. Руководство к практическим занятиям по вирусологии.— Киев: Изд-во КГУ, 1967.— С. 230—237.
8. Ткачук З. Ю., Ткачук Л. В., Козлов А. В. та ін. Вплив 2',5'-олігоаденілатів на гідроліз комплексу нуклеази S-1 ДНК *in vitro* // Доп. АН УРСР. Сер. Б.— 1988.— № 12.— С. 59—62.

Ін-т молекуляр. біології і генетики НАН України, Київ
Ін-т біорг. хімії АН Біларусі, Мінськ

Одержано 22.12.94