ISSN 0233-7657. Биополимеры и клетка. 1997. Т. 13. № 4

Порівняльне вивчення інгібуючої дії синтетичних, природних та комплексних препаратів на клінічні ізоляти ВІЛ-1, виділені в Україні

С. В. Антоненко, О. В. Барбашева, О. В. Карпов[1], М. Я. Співак[1]

Київський науково-дослідний інститут епідеміології та інфекційних захворювань ім. Л. В. Громашевського МЗ України
252038, Київ, узвіз Протасів Яр, 4

[1]Інститут мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України
252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 154

В дослідах in vitro на моделі гострої ВІЛ-інфекції з використанням клінічних ізолятів ВІЛ, виділених в Україні, вивчали в порівняльному плані протективну дію препаратів модифікованих нуклеозидів (АЗТ, Д4Т) різних виробників, а також індукторів інтерферону полірибонуклеотидної природи та молекулярного комплексу дріжджова РНК — тилорон. Встановлено, що за захисною дією та пригніченням синтезу p24-антигена препарати модифікованих нуклеозидів вітчизняного виробництва практично не відрізняються від закордонних аналогів, індуктори інтерферону менш ефективні, причому молекулярний комплекс дріжджова РНК — тилорон діє краще за останні, наближаючись по ефективності до нуклеозидних препаратів. З огляду на різницю в механізмі дії препаратів обох вказаних типів зроблено висновок про перспективність їх посднаного застосування в терапії СНІДу.

Вступ. У зв'язку з прогресуючим поширенням на території України захворювання на СНІД актуальними вважаються задачі виділення і характеристики регіональних ізолятів ВІЛ, а також вивчення пригнічення їх репродукції під дією як агентів, що широко розповсюджені в лікарській практиці, так і принципово нових. Найефективніші інгібітори репродукції ВІЛ з групи модифікованих нуклеозидів — 3′-дезокситимідин (АЗТ, ретровір, зидовудин, тимазид) та 2′,3′-дідезокси-2′,3′-дідегідротимідин (Д4Т, ставудин) дозволені для лікування хворих на СНІД [1]. В Україні випуск згаданих препаратів ще не налагоджено, але вже розроблено оригінальну технологію отримання АЗТ в заводських умовах та одержуються лабораторні зразки [2].

Одним з інших напрямків проти-ВІЛ терапії є застосування препаратів α-інтерферону [3] та його індукторів полірибонуклеотидної природи — ларифану (дсРНК фага f2) та ридостину (дсРНК дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*) [4], а також амплігена (модифікованої форми poly(I)-poly(C) [5] та poly(A)-poly(U) [6]). До останньої групи проти-ВІЛ препаратів можно віднести і молекулярні комплекси дріжджова РНК — тилорон, які мають здатність пригнічувати репродукцію ВІЛ в умовах *in vitro* [7].

Відомо також, що різні клінічні ізоляти ВІЛ мають неоднакову чутливість до дії відомих проти-ВІЛ агентів [8]. Тому метою даної роботи було порівняльне вивчення інгібуючої дії препаратів згаданих вище груп на клінічні ізоляти ВІЛ-1, виділені Україні.

Матеріали і методи. В роботі вивчали проти-ВІЛ активність наступних препаратів: 1) модифікованих нуклеозидів — дослідних зразків препаратів АЗТ та Д4Т виробництва ІБОНХ НАН України, надані для доклінічних досліджень Л. М. Шкарапутою, АЗТ та ретровіру «Wellcome» (США), а також тимазиду («Асоціація АЗТ», Росія); 2) інтерфероногенів полірибонуклеотидної природи — ридостину (дсРНК дріжджів *S. cerevisiae*, НПО «Вектор», Росія) та ларифану (лікарська

© С. В. АНТОНЕНКО, О. В. БАРБАШЕВА, О. В. КАРПОВ, М. Я. СПІВАК, 1997

форма дсРНК бактеріофага f2, Інститут мікробіології ім. А. Кірхенштейна, Латвія) і 3) молекулярного комплексу дріжджова РНК — тилорон (МК), який готували згідно [8]. Як компоненти останнього використовували комерційний препарат дріжджової РНК («Біохімреактив», Латвія) та тилорон гідрохлорид («Sigma», США).

Дослідження з визначення проти-ВІЛ активності препаратів здійснювали на культурах лімфобластоїдних клітин людини МТ-4, інфікованих лабораторним штамом ВІЛ-1/ІІІВ, люб'язно наданим проф. Кроном (Університет м. Тампере, Фінляндія), або одним з клінічних ВІЛ-ізолятів. Клінічні ізоляти ВІЛ-1/11 та ВІЛ-1/27 було виділено з фракції мононуклеарних клітин (МНК) периферичної крові ВІЛ-інфікованих осіб за розробленим нами методом [9]. Інфіковані клітини вирощували в середовищі RPMI-1640 з додаванням 10 % телячої ембріональної сироватки (попередньо інактивованої при 56 °С протягом 30 хв), 300 мкг/мл L-глютаміну, 100 мкг/мл гентаміцину при 37 °С та 5 % двоокису вуглецю в газовій фазі. Клітини культивували в 24-лункових культуральних пластикових планшетах та флаконах «Costar» (США). Посівна доза становила $0,5 \times 10^6$ клітин в 1 мл.

Аналіз пригнічення вірусної реплікації препаратами здійснювали на 4-ту та 8-му добу досліду. Проти-ВІЛ активність препаратів оцінювали за такими критеріями, як ступінь захисту клітин та рівень вмісту антигена *p24* ВІЛ-1.

Ступінь захисту клітин від цитодеструктивної дії ВІЛ-1 визначали за формулою [4]:

$$\text{Відсоток захисту} = \frac{A - B}{K - B} \cdot 100,$$

де A — кількість життєздатних клітин в дослідній культурі; B — те саме в інфікованій культурі (контроль вірусу); K — у контрольній неінфікованій культурі.

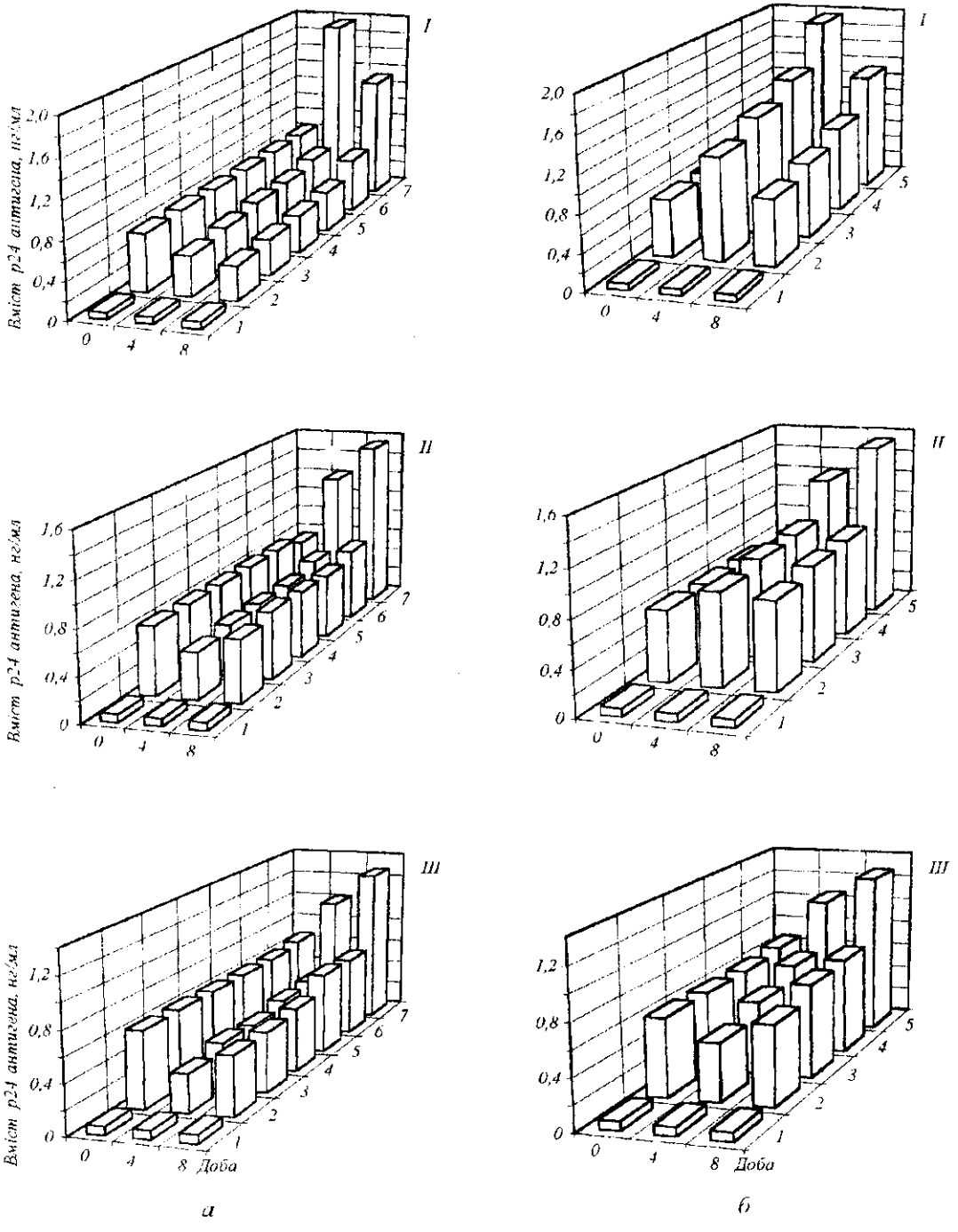
Вміст антигена *p24* ВІЛ-1 визначали за допомогою методу ІФА на тест-системах «Abbott» США згідно з рекомендацією фірми-виробника.

Результати і обговорення. Порівняльне вивчення інгібуючої дії досліджуваних препаратів проводили на моделі гострої ВІЛ-інфекції, що, як вважається, найадекватніше відповідає меті скринінгу біологічно активних речовин на проти-ВІЛ дію [1, 3]. Щодо клінічних ізолятів ВІЛ-1, які ми використовували в роботі, то вони значною мірою відрізнялися один від одного за інфекційною активністю та характером цитопатичної дії. Так, ізолят ВІЛ-1/11 належав до типу rapid/high і був здатний викликати утворення синцитіїв в лімфобластоїдних клітинах МТ-4. Інфекційний титр цього вірусу становив 0,5 lg $ТЦД_{50}$ в 0,1 мл. Ізолят ВІЛ-1/27 характеризувався підвищеною реплікативною активністю в моноцитоїдних клітинах, де викликав переважно цитодеструктивний ефект. Його інфекційний титр становив 4,2 lg $ТЦД_{50}$ в 0,1 мл.

На восьму добу культивування в інфікованих культурах (контроль вірусу) відмічалися морфологічні зміни, характерні для цитопатичної дії кожного ізолята (утворення синцитіїв, дезагрегація клітин, цитодеструкція). В усіх культурах реєструвалася значна кількість загиблих клітин (80—85 %). У той же час дія досліджуваних препаратів суттєво впливала як на зменшення згаданих вище морфологічних клітинних змін, так і на загальний показник життєздатності клітин. Виходячи з наведених у таблиці даних щодо ступеню захисту інфікованих клітин препаратами, що вивчалися, можна відмітити, по-перше, що препарати модифі-

Захисна дія досліджуваних проти-ВІЛ препаратів на клітини МТ-4, інфіковані референс- та клінічними ізолятами ВІЛ-1

Препарат	Концентрація, мкг/мл	Ступінь захисту, %		
		ІІІВ (референс)	Ізолят № 27	Ізолят № 11
АЗТ «Wellcome»	5	87,8±2,4	78,5±2,5	89,1±1,7
Ретровір «Wellcome»	5	76,1±3,7	75,2±5,8	81,9±6,3
АЗТ ІБОХН НАН України	5	76,6±9,2	74,1±6,7	80,1±3,7
Д4Т ІБОХН НАН України	5	75,3±2,7	73,8±9,4	84,3±3,4
Тимазид «Асоціація АЗТ»	5	75,6±3,4	72,8±7,8	84,6±2,6
Ридостин	100	55,3±1,7	64,9±6,1	49,9±8,9
Ларифан	100	48,9±5,1	52,1±5,3	42,8±6,4
МК	100	67,9±8,1	74,3±5,9	54,1±2,7



Вплив препаратів модифікованих нуклеозидів (*а*) та препаратів — індукторів інтерферону (*б*) на вміст *p24*-антигена в культуральному середовищі клітин МТ-4, інфікованих референс-штамом ВІЛ-1/ІІІВ (*I*) та клінічними ізолятами ВІЛ-1/11 (*II*) і ВІЛ-1/27 (*III*). *а*: *1* — контроль клітин; *2* — АЗТ «Wellcome»; *3* — ретровір «Wellcome»; *4* — АЗТ ІБОНХ; *5* — Д4Т ІБОНХ; *6* — тимазид «Асоціація АЗТ»; *7* — контроль вірусу; *б*: *1* — контроль клітин; *2* — МК; *3* — ридостин; *4* — ларифан; *5* — контроль вірусу

кованих нуклеозидів відзначалися сильнішою захисною дією, ніж індуктори інтерферону (приблизно на 30—35 %), при цьому препарати вітчизняного виробництва практично не відрізнялися від закордонних аналогів. По-друге, найчутливішим до дії модифікованих нуклеозидів виявився ізолят ВІЛ-1/11, а до індукторів інтерферону — ізолят ВІЛ-1/27. Слід зазначити, що останній був виділений від хворого на СНІД з хронічною герпетичною інфекцією в клінічній стадії захворювання. І, нарешті, можно відзначити помітно підвищену захисну дію молекулярного комплексу дріжджової РНК з тилороном (МК) (54—74 %) в порівнянні з іншими індукторами інтерферону.

Дані стосовно динаміки вмісту *p24*-антигена в культуральному середовищі клітин МТ-4, заражених референтним та клінічними ізолятами ВІЛ, під впливом досліджуваних агентів представлені на малюнку. Як видно, наведені вище закономірності пригнічення ВІЛ-інфекції під дією препаратів, що вивчалися, практично повністю збігаються з даними щодо накопичення *p24*-антигена. При цьому слід відмітити, що в разі лабораторного штама ВІЛ-1/ШВ, на відміну від клінічних ізолятів, під дією препаратів модифікованих нуклеозидів відбувається більш подовжене пригнічення синтезу *p24*-антигена, яке, на наш погляд, пояснюється послабленням впливу цього штама внаслідок багаторазового пасування в лабораторних умовах. Можна відзначити також і те, що індуктори інтерферону проявляють інгібуючу дію повільніше, ніж модифіковані нуклеозиди. Останнє стає зрозумілим з огляду на механізм дії обох типів згаданих препаратів.

Відомо, що головною мішенню дії АЗТ, Д4Т та інших препаратів цього типу є обернена транскриптаза — ключовий фермент у циклі репродукції ВІЛ [11]. Однак поряд із значною вірусінгібуючою дією вказаним препаратам притаманна відносно висока цитотоксичність та метаболічна активність, внаслідок чого вони досить швидко деградують у клітині [8]. На відміну від них, індуктори інтерферону діють опосередковано — шляхом накопичення клітинного інтерферону, що, у свою чергу, викликає включення циклу клітинних процесів, які зумовлюють противірусну резистентність [3, 4]. Встановлено також, що полірибонуклеотиди можуть конкурувати зі специфічними білками ВІЛ за клітинні рецептори, перешкоджаючи, таким чином, подальше інфікування [6]. До того ж токсичність індукторів інтерферону полірибонуклеїнового типу, у в тому числі молекулярного комплексу дріжджової РНК з тилороном, досить низька [4, 7]. При використанні цього комплексу, який виявляв підвищений порівняно з іншими індукторами інтерферону проти-ВІЛ ефект, окрім інтерфероногенезу [7, 11], на пригнічення ВІЛ може діяти додатково ще один чинник, а саме: здатність одного з компонентів комплексу (тилорону) до безпосереднього пригнічення оберненої транскриптази [10].

Все наведене вище пояснює, на наш погляд, отримані в роботі результати і дає підставу зробити висновки, по-перше, про перспективність впровадження препаратів АЗТ та Д4Т вітчизняного виробництва в терапію протиклінічних ізолятів ВІЛ, виявлених в Україні, і, по-друге, про доцільність подальшого вивчення можливості поєднаного застосування модифікованих нуклеозидів і індукторів інтерферону для підсилення загального терапевтичного ефекту. Останнє збігається з тенденцією створення комплексних схем застосування препаратів з різним механізмом дії, що переважає в сучасній ВІЛ-терапії [1].

С. В. Антоненко, Е. В. Барбашева, А. В. Карпов, Н. Я. Спивак

Сравнительное изучение ингибирующего действия синтетических, природных и комплексных препаратов на клинические изоляты ВИЧ-1, выделенные в Украине

Резюме

В опытах in vitro на модели острой ВИЧ-инфекции с использованием клинических изолятов ВИЧ, выделенных в Украине, изучали в сравнительном плане протективное действие препаратов модифицированных нуклеозидов (АЗТ, Д4Т) различного производства, а также индукторов интерферона полирибонуклеотидной природы и молекулярного комплекса дрожжевая РНК — тилорон. Установлено, что по защитному действию и подавлению синтеза p24-антигена препараты модифицированных нуклеозидов отечественного производства практически не отличаются от заграничных аналогов, индукторы интерферона менее эффективны, причем молекулярный комплекс дрожжевая РНК — тилорон действует лучше последних, приближаясь по эффективности к нуклеозидным препаратам. Учитывая различие механизма действия препаратов обоих указанных типов, сделан вывод о перспективности их сочетанного применения в терапии СПИДа.

S. V. Antonenko, O. V. Barbasheva, A. V. Karpov, N. Ya. Spivak

Comparative studies of inhibitory action of synthetic, natural and complex preparations on HIV-1 clinical isolates obtained in Ukraine

Summary

In in vitro experiments using an acute HIV-infection model and clinical HIV isolates the authors have made comparative studies of modified nucleosides (AZT, D4T) protective action, the preparation being of different producers, as well as of polyribonucleic interferon inducers and of molecular complex yeast RNA — tilorone. It was found that modified nucleosides producted in Ukraine do not significantly differ from foreign ones in their protective effect and their inhibitory action on p24-antigen synthesis, whereas interferon inducers is less effective, moreover yeast RNA — tilorone molecular complex acts better latest ones, and approach to nucleoside

preparations according this effectivity. Taking into account the difference in the both type preparations mechanisms of action it was done conclusion about effectivity of their combined usage in AIDS therapy.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Johnston M., Holt D. F.* Present status and future prospects for HIV therapies // Science.—1993—260.—P. 1286—1293.
2. *Шкарапута Л., Язловицький А., Кононов О.* Розробка технології дослідно-промислового виробництва азидотимідину // І Національна науково-практична конференція з проблем ВІЛ/СНІДу (Київ, січень 1995 р.): Тез. доп.— Київ, 1995.— С.
3. *Poli G., Orensten J. M., Kinter A. et al.* Interferon-α, but not AZT suppresses HIV expression in chronically infected cell lines // Science.—1989.—244, N 4904.—P. 575—577.
4. *Носик Н. Н., Носик Д. Н., Кузнецова И. В.* Ингибирующее действие индукторов интерферона на размножение вируса иммунодефицита человека // Вопр. вирусологии.—1992.— № 2.—С. 92—94.
5. *Montefiori D. C., Mitchell W. M.* Antiviral activity of mismatched double-stranded RNA against human immunodeficiency virus *in vitro* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84, N 9.—P. 47—56.
6. *Crust B., Callebaut C., Hovanessian A. G.* Inhibition of entry of HIV into cells by poly(A)-poly(U) // AIDS Res. Hum. Retrovirus.—1992.—9, N 11.—P. 1087—1090
7. *Karpov A. V., Antonenko S. V., Barbacheva Y. V., Spivak N. Ya.* Cell genome stabilization by yeast RNA — tilorone complex in *in vitro* HIV-infected cells // XI Int. Conf. on AIDS (Vancouver, july 7—12, 1996): Abstrs.—Vancouver, 1996.— Vol. II, Pub. A. 1022.—P. 441.
8. *Карамов Э. В., Лукашов В. В.* Резистентность к азидотимидину при инфекции вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) // Молекуляр. биология.—1994.—28, № 1.— С. 7—20.
9. *Барбашева О. В., Антоненко С. В., Гринь О. В.* Удосконалення методів виділення регіональних ізолятів вірусу імунодефіциту людини // Укр. наук.-мед. молодіжн. журн.—1995.—№ 2.—С. 30—32.
10. *Chandra P., Zunino F., Götz A.* Bis-DEAE-fluorenone: a specific inhibitor of DNA polymerases from RNA tumor viruses // FEBS Lett.—1972.—22.—P. 161—164.
11. *Карпов О. В., Жолобак Н. М.* Інтерфероногенні властивості комплексів дріжджова РНК — тилорон // Доп. НАН України.—1996.—№ 3.—С. 128—131.

УДК 616.98:578.828.6/-02:615.339.578.245/-036
Надійшла до редакції 24.12.96