

Дія 2',5'-триолігоаденілату та його епоксипохідного на репродукцію вірусу імунодефіциту людини та на активність зворотної транскриптази ретровірусів

З. Ю. Ткачук, С. Л. Рибалко¹, Л. І. Семерникова, В. В. Ткачук, М. П. Завелевич², Л. В. Ткачук, І. О. Михайлопуло³, Г. Х. Мацука

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

¹ Інститут епідеміології та інфекційних хвороб МОЗ України
Узвіз Протасів яр, 4, Київ, 03038, Україна

² Інститут експериментальної патології, онкології та радіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України
Вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна

³ Інститут біоорганічної хімії АН Беларусі
Вул. Жодінська, 5/2, Мінськ, 220067, Беларусь

Досліджено дію 2',5'-триолігоаденілату (2',5'ArArA) та його епоксипохідного (2',5'-A₂(rAA)) на репродукцію вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ-1). Показано, що 2',5'-олігоаденілати пригнічують репродукцію ВІЛ-1 у випадку їхньої попередньої інкубації з клітинами лімфобластоїдної лінії МТ-4. Вивчено можливі механізми противірусної дії 2',5'-олігоаденілатів, а саме: проаналізовано інтерферогенну дію цих препаратів. Показано, що 2',5'ArArA та 2',5'-A₂(rAA) підвищують рівень інтерферону в клітинах у 2 і 4 рази відповідно порівняно з контролем. Виявлено інгібуючу дію 2',5'-олігоаденілатів на активність зворотної транскриптази ендо- і екзогенних ретровірусів. Припускається, що 2',5'-триолігоаденілат та його епоксипохідне можуть використовуватися у боротьбі з ВІЛ-інфекцією.

Вступ. Відомо, що 2',5'-олігоаденілати (2-5A) відіграють основну роль у набутті клітиною стійкості до вірусів. Ключовими ферментами системи 2-5A є 2-5A-синтетаза, активність якої залежить від наявності вірусної або клітинної дволанцюгової РНК (dsРНК), і рибонуклеаза L, активована 2-5A. Дослідження останніх років показали, що система 2-5A є перспективною в боротьбі проти ВІЛ-інфекції [1—4]. До останнього часу застосування 2-5A похідних для підсилення цієї системи здавалося обмеженим, головним чином, через низьку спе-

цифічність РНКазы L до вірусної РНК [5]. У зв'язку з цим розроблено два нових підходи, які забезпечують вибірковий антивірусний ефект 2-5A системи, принаймні, проти ВІЛ-1 інфекції. Перший підхід полягає у внутрішньоклітинній імунізації з використанням кДНК 2-5A-синтетази, зв'язаної з елементом трансактивної реакції (відповіді) (TAR) ВІЛ, другий — пов'язаний з пригніченням ретровірусної активності зворотної транскриптази за допомогою аналогів 2-5A.

Метою даної роботи було вивчення дії 2',5'-олігоаденілату та його похідного на репродукцію ВІЛ-1, їхню інтерферогенну дію, а також впливу 2',5'-олігоаденілатів на активність зворотної транскриптази екзо- та ендогенних ретровірусів.

© З. Ю. ТКАЧУК, С. Л. РИБАЛКО, Л. І. СЕМЕРНИКОВА,
В. В. ТКАЧУК, М. П. ЗАВЕЛЕВИЧ, Л. В. ТКАЧУК,
І. О. МИХАЙЛОПУЛО, Г. Х. МАЦУКА, 1999

Матеріали і методи. В роботі використано «корові» 2',5'-олігоаденілати: 2',5'-АрАрА (2',5'-A₃) і 2',5'-A₂(_{РА}А) (2',5'-епоксиA₃), синтезовані в Інституті біоорганічної хімії АН Беларусі [6].

Визначення анти-ВІЛ-активності. Для тестування анти-ВІЛ-активності 2',5'-A₃ та 2',5'-епоксиA₃ використовували лімфобластоїдну лінію клітин МТ-4. ВІЛ-1, штам В ІІІ, продукували в суспензійній культурі лімфоцитів, яку було отримано в Інституті ім. Івановського РАН (Москва). Клітини МТ-4 вирощували на середовищі RPMI-1640 з 10 % ембріональної сироватки і гентаміцином у дозі 100 од/мл. Клітини інфікували вірусом імунодефіциту людини в дозі 2 Іg ID₅₀. Здійснено дві серії дослідів. У першій — препарати в нетоксичній концентрації (10⁻⁴ М) вносили в клітини одночасно з вірусом та інкубували протягом 6 діб (37 °С, в атмосфері 5 % CO₂). У культуральному середовищі визначали концентрацію експресивного антигена р24 ВІЛ та його інфекційний титр [7]. Як контроль використовували азидотимідин, який широко застосовується в практиці при лікуванні людей, уражених ВІЛ. Друга серія дослідів передбачала попередню інкубацію клітин з препаратами. Препарати 2',5'-A₃ та 2',5'-епоксиA₃ вносили в концентрації 10⁻⁴ М у суспензію клітин МТ-4 та інкубували їх протягом 24 год. Далі клітини інфікували ВІЛ-1 та інкубували протягом 6 діб при температурі 37 °С в атмосфері 5 % CO₂. Потім у культуральному середовищі визначали концентрацію антигена р24 ВІЛ та його інфекційний титр [7].

Активність інтерферону визначали в культуральному середовищі методом пригнічення цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту [8].

Визначення активності зворотної транскриптази ретровірусів. Об'єктом дослідження були ендогенний ретровірус типу С, що продукується перевивними клітинами мишачої лімфоми ОН-1, та екзогенний ретровірус Молоні лейкозу мишей. Клітини ОН-1 вирощували на середовищі Ігла з глютаміном, 10 %-м вмістом телячої ембріональної сироватки та гентаміцину з розрахунку 100 од/мл середовища. Клітини вирощували протягом п'яти діб при температурі 37 °С. Вірус, продукований цими клітинами, є типовим ретровірусом типу С із щільністю віріона 1,16 г/см³ у градієнті щільності цукрози. Вірус містить високомолекулярну РНК та зворотну транскриптазу. Джерелом вірусу було культуральне середовище, яке звільняли центрифугуванням при 6000 g (15 хв) від уламків клітин. Далі вірус осаджували протягом 1 год при 100000 g крізь подушку 20 %-ї цукрози. Осад суспендували в буфері (1/100 відносно об'єму культурального

середовища): 50 мМ трис-НСІ, рН 7,8, 60 мМ КСІ і 2 мМ дитіотреїтол.

Для репродукції вірусу Молоні використовували культуру нормальних фібробластів мишей N1H 3Т3. Її вирощували на середовищі RPMI з 10 %-м вмістом ембріональної телячої сироватки та гентаміцину із розрахунку 100 од/мл середовища. Клітини пересівали через три доби (1:10) після обробки версеном з трипсином. Вірус лейкозу мишей Молоні одержували у вигляді 10 %-го фільтрату з гомогенату пухлин селезінки мишей лінії BALB/c, заражених вірусом Молоні. Фільтрат одержували з Інституту експериментальної онкології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Перед зараженням вірусом клітини N1H 3Н3 обробляли ДЕАЕ-декстраном (50 мкг/мл) в ростовому середовищі без сироватки протягом 4 год. Клітини промивали ростовим середовищем без сироватки та покривали моношар клітин фільтратом гомогенату пухлин в об'ємі 0,5 мл протягом 1 год. Фільтрат одержували центрифугуванням гомогенату при 6000 g. Надосадову рідину фільтрували через міліпорний фільтр ($d = 0,22$ мкм). Клітини після інкубації з фільтратом промивали середовищем без сироватки, заливали підтримуючим середовищем та інкубували до появи вірусу. Наявність вірусу визначали по активності зворотної транскриптази. Потім клітини пересівали, як звичайно, декілька разів, культуральні середовища збирали для одержання очищеного вірусу. Останні освітлювали центрифугуванням (6000 g, 30 хв), далі ультрацентрифугували при 100000 g (1 год). На дно центрифужної пробірки наносили 2 мл 20 %-го розчину цукрози. Осад суспендували в буфері в співвідношенні 1/100 до вихідного об'єму культурального середовища. Буфер містив трис-НСІ — 50 мМ, рН 8,1, NaCl — 40 мМ, дитіотреїтол — 2 мМ. Отриману суспензію використовували як вірусомісний матеріал.

Активність зворотної транскриптази визначали [9] на матриці poly(rA)·d(pT)₁₀ (полірибоаденілова кислота — дезокситимідинова кислота) («Calbiochem», США). Інкубаційна суміш в об'ємі 100 мкл містила 50 мМ трис-НСІ, рН 7,8, 60 мМ КСІ, 2 мМ дитіотреїтол, 0,2 мМ MnCl₂, 0,1 % об'єму тритону X-100, 0,02 опт. од. поглинання при 260 нм на пробу матриці, 1 мКі Н³ТТР (метил-Н³) (тимідин 5'-трифосфатамонієва сіль) («Amersham», Велика Британія), питома активність 64 Ки/ммоль та немічений тимідинтрифосфат («Calbiochem») в концентрації 10⁻⁵ М, а також 50 мкл 100-кратного концентрату вірусної суспензії. До контрольної проби матрицю не вносили. Досліджувані препарати 2',5'-олігоаденілатів: 2',5'-A₃ та 2',5'-епоксиA₃ вносили в реакційну суміш у

концентраціях 10^{-4} та 10^{-5} відповідно. Проби інкубували протягом 1 год при 37°C . По закінченні реакції до проби додавали 1 мл водного розчину БСА в концентрації 100 мкг/мл та ТХО кислоти до кінцевої концентрації 10 %. Пробу наносили під вакуумом на мембранні фільтри Синпор з діаметром пор 0,4 мкм, промивали 5 %-ю ТХО та фіксували 96 %-м спиртом, фільтри висушували та вміщували в сцинтиляційні флакони з сцинтилятором ЖС-107. Радіоактивність ТХО-нерозчинної фракції визначали на рідинному лічильнику «Intertechnique» (Франція).

Результати та обговорення. Результати дослідів із впливу 2',5'-олігоаденілатів на репродукцію (ВІЛ-1) показали, що при одночасному введенні препаратів у концентрації 10^{-4} М та вірусу в культуру клітин суттєвого впливу на репродукцію вірусу не відбувається.

Результати дослідів з попереднім введенням 2',5'-олігоаденілатів (за 24 год до внесення вірусу) показали, що препарати 2',5'- A_3 і 2',5'-епокси A_3 пригнічують інфекційність ВІЛ. Як видно з таблиці, інфекційний титр ВІЛ при попередній інкубації клітин з 2',5'- A_3 свідчить про пригнічення репродукції вірусу на $2 \lg \text{ID}_{50}$, а при інкубації з 2',5'-епокси A_3 — на $1 \lg \text{ID}_{50}$. Відомо, що препарат

2',5'-епокси A_3 є стійким до дії клітинних фосфодіестераз, у той час як 2',5'- A_3 менш стійкий до дії ферменту [10]. Для в'яснення механізму дії препаратів було проведено досліди на їхню інтерферогенну активність, яку вивчали в експериментах на клітинах МТ-4 з попереднім введенням (за 24 год) препаратів 2',5'- A_3 та 2',5'-епокси A_3 в концентрації 10^{-4} М перед інфікуванням ВІЛ.

Вплив 2',5'- A_3 та 2',5'- $\text{A}_2(\text{RAA})$ на рівень інтерферону та репродукцію ВІЛ-1 у культурі лімфобластоїдної лінії клітин МТ-4

Препарат	Антиген р24, А492	Інфекційний титр				lg ID ₅₀	Рівень інтерферону, МО
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}		
2',5'- A_3	1,473	1,410	0,654	0,130	—	2	80
2',5'- $\text{A}_2(\text{RAA})$	1,520	1,376	0,836	0,230	—	3	160
Азидотимідин	0,455	0,399	0,137	—	—	1	—
Контроль ВІЛ	1,422	1,546	1,015	0,323	0,192	4	40

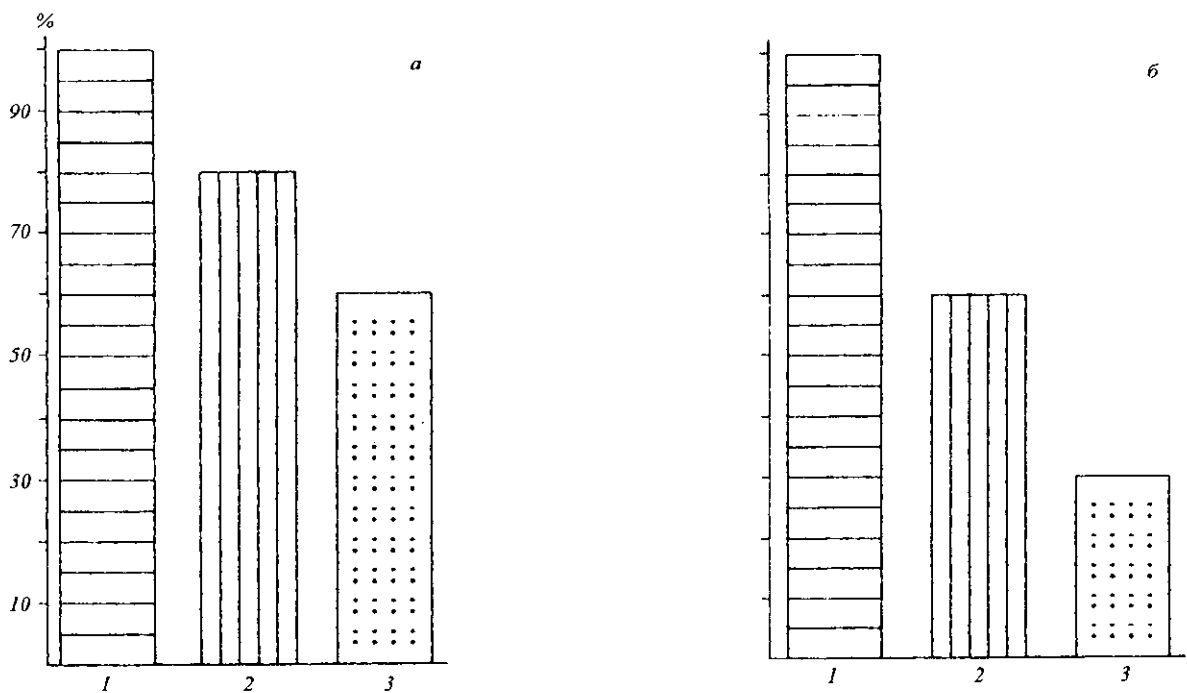


Рис. 1. Дія 2',5'-олігоаденілатів на активність зворотної транскриптази ендogenous ретровірусу типу С (а, б): 1 — контроль; 2 — концентрація 2',5'- A_3 $1 \cdot 10^{-4}$ М (а) і $1 \cdot 10^{-5}$ М (б); 3 — 2',5'-епокси A_3 — $1 \cdot 10^{-5}$ М (а) і $1 \cdot 10^{-4}$ М (б)

Було показано, що в зразках, оброблених препаратом, значно збільшується синтез інтерферону порівняно з контролем. Із даних таблиці випливає, що при обробці клітин препаратом 2',5'- A_3 кількість інтерферону вища в 2 рази порівняно з контролем. Препарат 2',5'-епокси A_3 підвищує рівень інтерферону в 4 рази. Ще одним із можливих пояснень противірусної дії цих речовин відносно ВІЛ-1 може бути вплив 2',5'-олігоаденілатів на активність зворотної транскриптази ретровірусів. Для цього вивчали дію 2',5'-оліго A_3 на активність зворотної транскриптази ендо- та екзогенних ретровірусів.

Отримані результати свідчать, що препарат 2',5'- A_3 в концентрації 10^{-5} М пригнічує активність зворотної транскриптази ендогенного ретровірусу типу С на 20 %, а препарат 2',5'-епокси A_3 у тій же концентрації — на 41 % (рис. 1, а). Збільшення концентрації препаратів до 10^{-4} М знижує активність ферменту, у випадку 2',5'- A_3 на 42 %, 2',5'-епокси A_3 — на 68 % (рис. 1, б).

Експерименти, проведені із зворотною транскриптазою екзогенного вірусу Молоні лейкозу мишей, також показали інгібуючу дію досліджуваних препаратів. Препарат 2',5'- A_3 в концентрації 10^{-5} М пригнічує активність ферменту на 25 %, а препа-

рат 2',5'-епокси A_3 — на 57 % (рис. 2, а). Збільшення концентрації препаратів до 10^{-4} М посилило дію 2',5'- A_3 до 41 %, а 2',5'-епокси A_3 — до 71 % (рис. 2, б). Таким чином, з'ясовано, що дефосфорильований «кор» 2',5'-оліго A_3 , а також його епоксипохідне пригнічують активність зворотної транскриптази обох вірусів, але епоксипохідне має значно більшу інгібуючу дію. Виявлено концентраційну залежність даного ефекту.

Слід відмітити, що дія досліджуваних препаратів на зворотну транскриптазу ендо- та екзогенного ретровірусів майже однакова. З літератури відомо, що кордиципінові аналоги 2',5'-олігоаденілатів також пригнічують активність зворотної транскриптази різною мірою — залежно від концентрації та хімічної будови препаратів [11].

Вивчено кінетику інгібування зворотної транскриптази 2-5A [8]. Кінетичне пригнічення було змішаного типу, де 2-5A не жорстко конкурентне з dTTP. Іншими авторами було показано, що 2-5A та їхні похідні є неконкурентними інгібіторами утворення комплексу: праймер (HIV) — зворотна транскриптаза [12]. Механізм та специфічність пригнічуючої дії 2-5A та його похідних залежали від модифікацій в рибозильній частині молекули, довжини ланцюжка, ступеню 5'-фосфорилування.

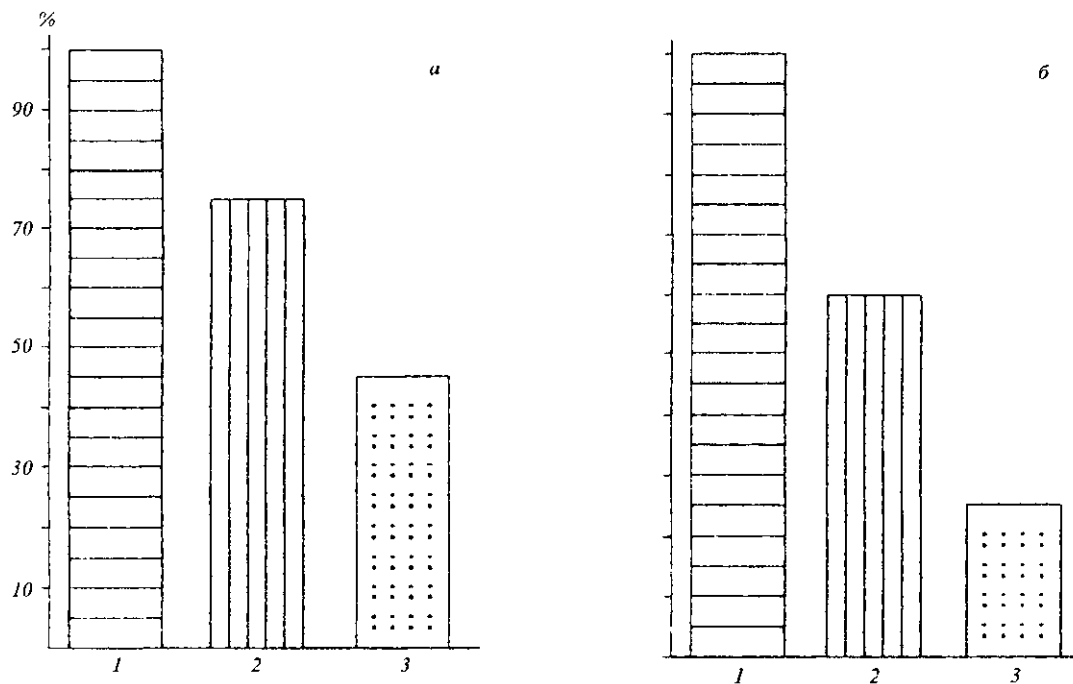


Рис. 2. Дія 2',5'-олігоаденілатів на активність зворотної транскриптази ендогенного ретровірусу Молоні (а, б): 1 — контроль; 2 — концентрація 2',5'- A_3 $1 \cdot 10^{-5}$ М (а) і $1 \cdot 10^{-4}$ М (б); 3 — 2',5'-епокси A_3 — $1 \cdot 10^{-5}$ М (а) і $1 \cdot 10^{-4}$ М (б)

Це пригнічення є специфічним для 2',5'-міжнуклеотидного зв'язку, і 2',5'-похідні не мали інгібуючої активності.

В усіх випадках пригнічення праймер ВІЛ-1 транскриптазного комплексу показало перевагу 5'-трифосфатної частини. Нефосфорильовані похідні не були інгібіторами зворотної транскриптази. Ці результати не узгоджуються з нашими даними, які показали, що дефосфорильований «кор» 2',5'-олігоаденілат та його епоксипохідне є інгібіторами зворотної транскриптази ретровірусів. Таким чином, противірусна дія досліджуваних препаратів відносно ВІЛ-1 може пояснюватися також пригніченням активності зворотної транскриптази.

Оцінюючи отримані результати, можна зробити припущення стосовно того, що 2',5'-оліго-А можуть бути перспективними у боротьбі зі СНІДом та супутніми вірусними інфекціями.

З. Ю. Ткачук, С. Л. Рыбалко, Л. И. Семерникова, В. В. Ткачук, М. П. Завелевич, Л. В. Ткачук, И. А. Михайлопуло, Г. Х. Мацука

Действие 2',5'-триолигоаденилата и его эпоксипроизводного на репродукцию вируса иммунодефицита человека и на активность обратной транскриптазы ретровирусом

Резюме

Исследовано действие 2',5'-триолигоаденилата (2',5'-АрАрА) и его эпоксипроизводного (2',5'-А₂)(_{РА}А) на репродукцию вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1). Показано, что 2',5'-олигоаденилаты угнетают репродукцию ВИЧ-1 в случае их предварительной инкубации с клетками лимфобластоидной линии МТ-4. Изучали возможные механизмы противовирусного действия 2',5'-олигоаденилатов, а именно: интерферогенное действие этих препаратов. Показано, что 2',5'-АрАрА и 2',5'-А₂(_{РА}А) увеличивают количество интерферона в клетках в 2 и 4 раза соответственно по сравнению с контролем. Показано ингибирующее действие 2',5'-триолигоаденилатов на активность обратной транскриптазы эндо- и экзогенных ретровирусом. Предполагается, что 2',5'-триолигоаденилат и его эпоксипроизводное могут быть использованы в борьбе против ВИЧ-инфекции.

Z. Yu. Tkachuk, S. L. Rybalko, L. I. Semernikova, V. V. Tkachuk, M. P. Zavelevich, L. V. Tkachuk, I. O. Mikhailopulo, G. Kh. Matsuka

The effect of trimeric 2',5'-oligoadenylic acid and its epoxyderivative on the human immunodeficiency virus reproduction and retroviruses reverse transcriptase activity

Summary

The study of the effect of trimeric 2',5'-oligoadenylic acid (2',5'-АрАрА) and its epoxyderivative (2',5'-А₂(_{РА}А)) on both human immunodeficiency virus (HIV-1) reproduction and retroviruses reverse transcriptase activity was conducted. 2',5'-oligoadenylates were shown to suppress HIV-1 reproduction in case of

their pre-incubation with the lymphoblastoid cells of MT-4 line. The possible mechanisms of antiviral action of 2',5'-oligoadenylates were under investigation, in particular, the interferonogenic effect of the substances was examined. 2',5'-АрАрА and 2',5'-А₂(_{РА}А) were shown to increase amounts of interferon in cells two and four-fold respectively compared to control. The inhibitory effect of 2',5'-oligoadenylates on activity of endogenous and exogenous retroviruses reverse transcriptase was demonstrated. The trimeric 2',5'-oligoadenylic acid and its epoxyderivative may be used against HIV infection.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Muller W. E., Schroeder H. C. Alteration of (2'-5')oligoadenylate metabolism and ribonuclease L activity in H-9 cells by HIV // Int. Conf. AIDS.—1989.—P. 667.
2. Schroeder H. C., Wender R., Kuchino Y., Muller W. E. Modulation of nuclear matrix-associated 2',5'-oligoadenylate metabolism and ribonuclease L activity in H9-cells by human immunodeficiency virus // J. Biol. Chem.—1989.—264, N 10.—P. 5669—5673.
3. Ueda M., Higasa S., Suehiro A., Kakishita E. Evaluation of immuno-status in HIV disease using serum 2',5'-oligoadenylate synthetase activity // Int. Conf. AIDS.—1994.—10, N 1.—P. 158.
4. Schroder H. C., Kelve M., Muller W. E. The 2-5A system and HIV infection // Progr. Mol. and Subcell. Biol.—1994.—14.—P. 176—197.
5. Schroder H. C., Suhadolnik R. J., Pfeleider W., Charubala R., Muller W. E. (2',5')-oligoadenylate and intracellular immunity against retrovirus infection // Int. J. Biochem.—1992.—24, N 1.—P. 56—63.
6. Mikhailopulo I. A., Baran E. A., Tkachuk L. V. Synthesis and use in kidney transplantations in rabbits and monkeys of (2',5')oligoadenylate trimers modified at the 2'-terminus // 4th Int. symp. on Molecular aspects of chemotherapy (23—25 June, 1993, Gdansk).—Gdansk, 1993.—P. 61.
7. Viscidy R., Farthadegun H., Laiyster F. et al. Enzyme immunoassay for detection of human immunodeficiency virus antigen in cell cultures // J. Clin. Micro.—1988.—26.—P. 453—458.
8. Соловьев В. Д., Пектемиров Т. А. Интерфероны в теории и практике медицины.—М.: Медицина, 1981.—С. 85—90.
9. Liu D. K., Owens G. F. Inhibition of viral reverse transcriptase by 2',5'-oligoadenylates // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1987.—145, N 1.—P. 219—297.
10. Козлов А. В., Ткачук З. Ю. Изучение устойчивости различных аналогов 2',5'-олигоаденилатов к действию фосфодиэстераз // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 1.—С. 47—52.
11. Montefiori D. C., Sobol R. W., Li Shi Wu, Reichenbach N. L. Phosphorothioate 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.—P. 7191—7194.
12. Sobol R. W., Fisheer M. I., Reichenbach N. L., Kumar A., Beard W. A., Wilson S. H., Charubala R., Pfeleiderer W., Suhadolnik R. J. HIV-reverse transcriptase: inhibition by 2',5'-oligoadenylates // Biochemistry.—1993.—32, N 45.—P. 12112—12118.

УДК 578.828:278.245.2
Надійшла до редакції 22.04.98