

**ВПЛИВ ПРОТИВІРУСНИХ РЕЧОВИН
РІЗНОЇ ХІМІЧНОЇ ПРИРОДИ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ
ІФНа, ПКР, ОАС1а І РНК-ази L**

О. О. ДРАГУЩЕНКО^{1,2}, І. Й. МІНЯ¹, Т. А. ПОЛЕЖАЄВА^{1,2}, Д. Б. СТАРОСИЛА³,
І. С. КАРПОВА¹, М. Ю. ОБОЛЕНСЬКА¹, С. Л. РИБАЛКО³

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;

²ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету
імені Тараса Шевченка, Україна;

³ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб
ім. Л. В. Громашевського АМН України», Київ;
e-mail: olena.imbig@gmail.com

Вивчали здатність декількох противірусних речовин різної хімічної природи індукувати в печінці щура експресію гену інтерферону α (ІФНа) і його генів-мішеней ПКР, ОАС1а і РНК-ази L. Досліджували препарати Амізон, Альтабор, Протефлазид, які використовуються в клінічній практиці; 3',7-диметилкверцетин, виділений із Протефлазиду, суміш хімічно синтезованих триметил- і тетраметилкверцетину, а також лектин хурми, які знаходяться відповідно на стадії доклінічних випробувань і експериментального дослідження.

Визначення вмісту відповідних мРНК у складі тотальної РНК методом зворотної транскрипції і кількісної ланцюгової полімеризації в реальному часі показало, що всі досліджувані речовини є індукторами експресії генів ІФНа, ПКР, ОАС1а і РНК-ази L, і кожна з них індукує з різною ефективністю зазначені гени. Комбінація речовин 3',7-диметилкверцетин + лектин хурми виявляє найбільший індукуючий ефект, який значно перевищує окрему дію кожної із речовин, а також дію препарату Геберон (рекомбінантного ІФНа2b) і ПоліІ-поліЦ, як стандартних індукторів генів-мішеней ІФНа. Здатність усіх речовин різною мірою індукувати експресію гену ІФНа, відсутність кореляції між експресією гену ІФНа і його генами-мішенями, а також поміж самими генами-мішенями свідчить про те, що механізм антивірусної дії досліджуваних речовин складний і не визначається тільки ІФНа і його опосередкованою дією.

Ключові слова: противірусні препарати, Амізон, Альтабор, Протефлазид, похідні кверцетину, лектин хурми, інтерферон α , гени-мішені.

Інтерферон α (ІФНа) – компонент системи вродженого імунітету, який виявляє імуномодулюючу, антивірусну і антипроліферативну активність [1, 2]. Він широко використовується в медичній практиці для противірусної терапії, зокрема разом із рибовірином у лікуванні вірусних гепатитів, і як допоміжний засіб при онкологічних захворюваннях. Внаслідок тривалого прийому терапевтичних (великих) доз ІФНа у пацієнтів спостерігаються побічні ефекти з боку центральної нервової і серцево-судинної систем, шлунково-кишкового тракту, органів відчуття, кровотворення тощо [3–5]. У зв'язку з цим актуальним є питання пошуку безпечніших препаратів, які б індукували синтез ендогенного ІФНа та компонентів його системи. Гіпотетичні індуктори мають бути нетоксичними і, окрім синтезу ІФНа, мають індукувати експресію генів-мішеней ІФНа,

здіяятих в антивірусному захисті. Антивірусна активність ІФНа реалізується опосередковано – через індукцію генів, продукти яких є безпосередніми лімітуючими факторами для реплікації вірусного геному та синтезу вірусних протеїнів. До них належать, зокрема, РНК-залежна протеїнкіназа Р (ПКР), 2'-5'-олігоаденілатсинтетаза (ОАС) та РНК-аза L.

На сьогодні розроблено українські противірусні препарати, які виявляють ІФН-індукуючу активність і використовуються в медичній практиці в комплексній терапії проти вірусів грипу, герпесу I і II типів, везикулярного стоматиту (Амізон [6], Альтабор [7], Протефлазид [8]), гепатиту С (Протефлазид [9]). За попередніми даними, 3',7-диметилкверцетин, виділений із Протефлазиду, та суміш хімічно синтезованих триметил- і тетраметилкверцетину також виявляють активність проти вірусів

грипу, герпесу, гепатиту С і ВІЛ, але ці сполуки знаходяться ще на стадії доклінічних випробувань. Лектин хурми (*Diospyros kaki Th.*), відкритий у 1986 р. [10], подібно до лектинів *Bacillus subtilis* [11, 12], виявився теж здатним блокувати репродукцію вірусів, зокрема вірусів грипу і герпесу, і є перспективним препаратом для дослідження. Перелічені речовини мають різну хімічну природу, і механізм їх дії на гени-мішені ІФНа раніше не був досліджений.

Метою роботи було кількісно оцінити здатність перелічених речовин поодиноці і в комбінаціях індукувати *in vivo* експресію гену самого ІФНа, а також генів системи інтерферону – ПКР, ОАС1а і РНК-ази L в клітинах печінки щура. Активність речовин порівнювали з дією препарату рекомбінантного ІФНа2b – Геберону та класичного індуктора синтезу ІФНа – ПоліІ-поліЦ.

Одержані результати засвідчили, що досліджувані речовини є ефективними індукторами експресії генів ІФНа, ПКР, ОАС1а і РНК-ази L; що відсутня кореляція між експресією гену ІФНа і його генами-мішенями, а також відсутня кореляція поміж генами-мішенями ІФНа за інтенсивністю їх експресії. У разі застосування комбінації речовин 3',7-диметилкверцетин + лектин хурми спостерігається адитивний індукуючий ефект, що значно перевищує дію кожної з цих речовин, а також дію Геберону і ПоліІ-поліЦ. Таким чином, механізм антивірусної дії досліджуваних речовин складний і не визначається тільки ІФНа і його опосередкованою дією.

Матеріали і методи

У дослідах було використано ПоліІ-поліЦ (Calbiochem, USA), препарат рекомбінантного ІФНа2b – Геберон (Heber Biotec SA, Куба), препарати Амізон (ВАТ Фармак, м. Київ, Україна), Альтабор (Борщагівський ХФЗ ЗАТ НПЦ, м. Київ, Україна), Протефлазид, 3',7-диметилкверцетин (виділений із Протефлази-

ду), суміш хімічно синтезованих триметил- і тетраметилкверцетину (ТОВ НВК Екофарм, м. Київ, Україна), лектин хурми, а також 3',7-диметилкверцетин в комбінаціях з лектином хурми або з Альтабором. Вибір саме цих комбінацій речовин ґрунтується на результатах попередніх досліджень.

Експерименти проводили на 22 білих нелінійних щурах *Rattus norvegicus* з масою тіла 250–300 г. Речовини, розчинені в середовищі РРМІ 1640, вводили внутрішньочеревно в дозах, наведених в табл. 3, і через 18–20 год щурів декапітували під ефірним наркозом, печінку промивали від крові *in situ* через портальну вену холодним фізіологічним розчином, видаляли і одразу заморожували в рідкому азоті.

Визначення рівня експресії генів. Рівень експресії генів, що кодують ІФНа, ПКР, ОАС1а та РНК-азу L, оцінювали за вмістом специфічної мРНК у тотальній РНК шляхом кількісної реакції зворотної транскрипції і ланцюгової полімеризації в реальному часі (кЗТ-ПЛР). Тотальну РНК печінки виділяли за допомогою реагенту TRIzol® (Invitrogen, США) відповідно до інструкції виробника. Якість виділеної тотальної РНК перевіряли електрофорезом у денатуруючих умовах. РНК піддавали ензиматичній обробці ДНК-азою I (МВІ Fermentas, Литва) і використовували для синтезу кДНК із випадковими гексамерами (МВІ Fermentas, Литва). Одержана кДНК слугувала матрицею для кПЛР у реальному часі. Реакцію ПЛР проводили в об'ємі 25 мкл, що містив 2,5 одиниці Taq ДНК полімерази, буферний розчин (50 мМ КСl, трис-НСl рН 8,8, 2,5 мМ MgCl₂) із SYBR Green I та референтним барвником ROX (Синтол, Росія), 5 нмоль кожного з нуклеозидтрифосфатів, 10 пмоль кожного із праймерів та 200 нг препарату кДНК. Після закінчення реакції ампліфікації проводили плавлення амплікону для контролю специфічності реакції і відсутності можливих димерів праймерів. Умови проведення ампліфікації наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Умови проведення реакцій ампліфікації

Етап реакції	Кількість циклів	ІФНа	ПКР	ОАС1а	РНК-аза L
Первинна денатурація	1	95 °С – 4 хв	95 °С – 4 хв	95 °С – 3 хв	94 °С – 4 хв
		95 °С – 15 с	95 °С – 10 с	95 °С – 10 с	94 °С – 10 с
Ампліфікація	40	55 °С – 15 с	55 °С – 15 с	59 °С – 15 с	54 °С – 15 с
		72 °С – 15 с	72 °С – 15 с	72 °С – 15 с	72 °С – 15 с
Заключна елонгація	1	72 °С – 4 хв	72 °С – 4 хв	72 °С – 2 хв	72 °С – 4 хв

Праймери для ампліфікації підбирали за допомогою програми Vector NTI. Абсолютну кількість копій досліджуваних мРНК у складі тотальної РНК визначали через ампліфікацію різної вихідної кількості відповідних виділених ампліконів або ампліконів у складі рекомбінантних плазмід (табл. 2) через значення порогового циклу за допомогою програми Bio-Rad IQ5 Software.

Результати визначення вмісту мРНК наведено в абсолютних і відносних величинах (середнє арифметичне ± помилка середнього арифметичного) порівняно зі значеннями в контрольних зразках, одержаних від тварин, яким не вводили відповідних речовин.

Статистичну обробку даних проведено методом Стьюдента.

Виділення і характеристика лектину хурми. Сировиною для виділення лектину хурми слугували чашолистки, які відділяли від стиглих плодів (придбаних у торговій мережі протягом сезону – з жовтня по грудень) і висушували при кімнатній температурі. Схема виділення і очистки лектину включала такі етапи: гомогенізацію сировини, водно-сольову екстракцію протеїнів, фракційне висолювання протеїнів сульфатом амонію, ізоелектрофокусування [13]. У фракціях визначали концентрацію протеїну і гемаглютинувальну активність (ГАА) із використанням 2%-ї суспензії фіксованих формаліном еритроцитів людини за загальноприйнятою методикою [14]. Вуглеводну специфічність фракцій визначали за пригніченням ГАА у присутності вуглеводів [15]: L-фукози, DL-рамнози, D-фруктози, D-глюкози, D-манози, D-галактози, N-ацетил-D-галактозаміну, лактози, N-ацетилнейрамінової (сілової) кислоти і муцину підщелепної залози бика (Sigma, США). Останній є глікопротеїном із високим вмістом сілової кислоти. Чистоту і молекулярну масу фракціонованих протеїнів перевіряли методом електрофорезу в 10%-му ПААГ по Леммлі [16] з використанням стандартного набору маркерів молекулярних мас.

Результати та обговорення

Склад і хімічна природа протівірусних речовин, які використовуються в клінічній практиці або знаходяться на стадії доклінічних випробувань, наводяться за даними фірм-виробників (табл. 3). Застосований в роботі лектин хурми відрізняється від раніше описаного [10] завдяки додатковим операціям очистки. Його характеристика наводиться вперше.

Таблиця 2. Праймери і стандарти для кількісного визначення вмісту мРНК

Назва гену	Послідовності праймерів		Довжина продукту, пари нуклеотидів	Стандарт*	Діапазон концентрацій стандартів, амолі
	прямий	зворотний			
ІФН α	ТСТТГАТГТСССТГТGGTG	GCTTGAGCCCTCTGGATCTG	208	pUC19-ІФН α	1×10^{-4} – 1×10^{-2}
	САТАТААСАСААГААAGGСААAGC	САСТТССТТССАТАТАТССАСТААС			
ПКР	GAGCAGGAАСТCAGGAGCАС	GGGTGGACAGTATCTCGGAA	488	pUC19-ПКР	$2,5 \times 10^{-4}$ – $2,5$
	GAGTCCCTTCCATAAAGG	GTCTTTAGCAGGAGGGTTGG			
OAS1a	GAGTCCCTTCCATAAAGG	GTCTTTAGCAGGAGGGTTGG	155	Амплікон OAS1a	$7,5 \times 10^{-5}$ – $7,5 \times 10^{-2}$
	GAGTCCCTTCCATAAAGG	GTCTTTAGCAGGAGGGTTGG			
РНК-аза L	GAGTCCCTTCCATAAAGG	GTCTTTAGCAGGAGGGTTGG	229	Амплікон РНК-ази L	1×10^{-4} – 1
	GAGTCCCTTCCATAAAGG	GTCTTTAGCAGGAGGGTTGG			

*Стандарт – це рекомбінантна плазміда з відповідним ампліконом або виділений амплікон, які використовувались для визначення абсолютної кількості досліджуваних мРНК у складі тотальної РНК

Таблиця 3. Характеристика і дозування протівірусних речовин

№ п/п	Назва речовин	Хімічна природа діючої речовини	Вихідна концентрація речовини	Доза на 100 г маси тіла тварин
1	ПоліІ-поліЦ	ПоліІ-поліЦ	100 мкг/мл	25 мкг
2	Геберон	Рекомбінантний інтерферон α -2b	1 000 000 МО/мл	20 000 МО
3	Амізон	4-(N-бензил) амінокарбоніл-1-метилпіридиній йодид – похідний ізонікотинової кислоти	1 мг/мл	0,20 мг
4	Лектин хурми	Сіалоспецифічний глікопротеїн	1 мг/мл	0,21 мг
5	Альтабор	Комплекс поліфенолів із суцвіть вільхи сірої і клейкої на основі елагової, галової, дилактон валонієвої кислот. Основна діюча речовина препарату – елаготанін	1 мг/мл	0,27 мг
6	Протефлазид	Суміш флавоноїдних глікозидів, виділених із диких злаків <i>Deschampsia caespitosa</i> L. (щучка дерниста), <i>Calamagrostis epigeios</i> L. (війник наземний)	3,2 мг/мл (в перерахунку на рутин)	0,8 мг
7	3',7-Диметилкверцетин	Глікозильований 3',7-диметилкверцетин	0,48 мг/мл	0,12 мг
8	Суміш триметил- і тетраметилкверцетину	Суміш триметил- і тетраметилкверцетину	0,48 мг/мл	0,12 мг

Мажорний лектин із чашолистків хурми випадає в осад за насичення 0,5 М сульфатом амонію, а за умов ізоелектрофокусування концентрується у слабокислій зоні (рН 4,5–5,0). Препарат не містить гемолізину і виявляє гемаглютинувальну активність щодо формалінованих еритроцитів людини в мінімальній концентрації 4 мкг/мл. Найактивнішими інгібіторами активності лектину виявились N-ацетилнейрамінова кислота і муцин. Їх мінімальна пригнічуюча концентрація становила 0,78 мМ і 1 мкг/мл відповідно, що свідчить про сіалоспецифічність цього лектину. Слабку здатність до зв'язування з лектином хурми виявили також L-фукоза і DL-рамноза, їх мінімальна пригнічуюча концентрація відповідно становила 25 і 100 мМ. Електрофоретичне дослідження в 10%-му ПААГ показало, що препарат утворює одну смугу, яка відповідає мол. масі ~30 кДа. Отже, препарат за даними електрофорезу є гомогенним.

Вміст мРНК ІФНа, ПКР, ОАС1а і РНК-ази L в тотальній РНК із печінки контрольних і

дослідних щурів. Результати визначення вмісту мРНК в печінці контрольних тварин показали, що найпредставленішою є РНК, яка кодує ПКР, приблизно в 4 рази менше виявлено копій РНК, яка кодує ІФНа, й іще менше – копій РНК, які кодують ОАС1а і РНК-азу L (табл. 4).

Класичні індуктори синтезу ІФНа – ПоліІ-поліЦ і ІФНа в складі Геберону – зумовлюють 4–5-кратне зростання вмісту мРНК ІФНа порівняно з його рівнем у контрольних тварин. Лектин хурми, 3',7-диметилкверцетин і 3',7-диметилкверцетин в комбінації з Альтабором або лектином хурми спричинюють 3-кратне зростання вмісту мРНК ІФНа. Всі інші сполуки займають проміжне положення за своєю здатністю стимулювати експресію гену ІФНа і не відрізняються один від одного зі статистичною вірогідністю. Таким чином, досліджені сполуки індукують експресію гену ІФНа на рівні РНК, але дещо з різною ефективністю (табл. 4).

Можна припустити, що внаслідок дії протівірусних речовин підвищення вмісту

Таблиця 4. Вплив протівірусних речовин на вміст індивідуальних РНК у складі тотальної РНК із печінки щурів

№ п/п	Назва речовин	Кількість копій мРНК в абсолютних* і відносних (дослід/контроль) одиницях			
		<i>ІФНа</i>	<i>ПКР</i>	<i>ОАС1а</i>	<i>РНК-ази L</i>
1	Контроль	64 ± 6,2*	247 ± 88,3*	36 ± 9,9*	38 ± 12,1*
2	ПоліІ-поліЦ	5 ± 0,9	17 ± 2,6	15 ± 6,9	20 ± 8,0
3	Геберон	4 ± 0,9	18 ± 6,1	12 ± 4,6	34 ± 3,1
4	Амізон	4 ± 0,4	16 ± 3,0	12 ± 5,4	44 ± 14,6
5	Лектин хурми	3 ± 0,7	14 ± 2,3	14 ± 4,4	22 ± 3,5
6	Альтабор	4 ± 0,2	17 ± 6,6	10 ± 1,9	34 ± 14,3
7	Протефлазид	3 ± 0,6	23 ± 6,8	12 ± 5,3	22 ± 3,6
8	3',7-Диметилкверцетин	3 ± 0,2	7 ± 3,1	1 ± 0,2	11 ± 3,2
9	Суміш триметил- і тетраметилкверцетину	4 ± 0,9	17 ± 4,4	4 ± 0,6	19 ± 4,3
10	3',7-Диметилкверцетин + Альтабор	3 ± 0,5	16 ± 1,5	13 ± 2,3	35 ± 5,3
11	3',7-Диметилкверцетин + лектин хурми	3 ± 0,9	36 ± 9,7	37 ± 14,5	74 ± 27,6

*Кількість копій мРНК на мкг тотальної РНК

мРНК *ІФНа* сприятиме інтенсивнішому утворенню *ІФНа* і через нього активації експресії генів-мішеней *ІФНа* – *ПКР*, *ОАС1а* і *РНК-ази L*. Проте якою мірою будуть активуватися ці гени у разі застосування кожної конкретної речовини невідомо. Крім того, нас цікавила можливість сумації індукуючого ефекту за застосування комбінацій сполук із різною хімічною природою. Ми обрали лише деякі комбінації (3',7-диметилкверцетин + Альтабор, 3',7-диметилкверцетин + лектин хурми), які за попередніми даними виявили найбільший протівірусний ефект.

Препарати ПоліІ-поліЦ і Геберон використано як препарати порівняння. За кількісними показниками вони приблизно однаково впливають на експресію генів *ПКР* і *ОАС1а*, стимулюючи дещо більше зростання вмісту мРНК *ПКР*, ніж *ОАС1а* та ще більше зростання вмісту мРНК *РНК-ази L*. За вмістом мРНК *РНК-ази L* Геберон із статистичною вірогідністю випереджає ПоліІ-поліЦ ($P < 0,05$).

Вміст мРНК *ПКР* і *ОАС1а* за індукції речовинами Амізон, Альтабор, Протефлазид і лектином хурми, а також комбінацією 3',7-диметилкверцетин + Альтабор схожий з тим, який спостерігається за дії ПоліІ-поліЦ і препарату Геберон. Варіабельнішим виявляється вплив цих речовин на вміст мРНК *РНК-ази L*. Він підвищується в більшій мірі, ніж мРНК *ПКР* і *ОАС1а*. За цим показником Амізон перевищує

дію лектину хурми, Протефлазиду та суміші триметил- і тетраметилкверцетину ($P < 0,05$) і 3',7-диметилкверцетину ($P < 0,01$). Статистично вірогідної різниці між дією інших сполук на вміст мРНК *РНК-ази L* не виявлено.

В окрему групу за характером дії можна виділити 3',7-диметилкверцетин і суміш триметил- і тетраметилкверцетинів. Вони значно менше, ніж інші сполуки, впливають на рівень мРНК *ОАС1а*, а 3',7-диметилкверцетин і на вміст мРНК *ПКР*. Вміст мРНК *РНК-ази L* за дії досліджуваних похідних кверцетину теж нижчий серед відповідних показників за дії вищезгаданих речовин.

Серед випробуваних протівірусних речовин особливо промовисто вирізняється комбінація речовин 3',7-диметилкверцетин + лектин хурми, яка за здатністю індукувати експресію всіх трьох генів значно перевищує ПоліІ-поліЦ, Геберон і, тим більше, кожну з її складових, взятих окремо. Суттєво, що рівень мРНК *ІФНа* за дії комбінації нижчий, ніж за дії ПоліІ-поліЦ і Геберон.

Привертає увагу відсутність кореляції між активацією експресії гену *ІФНа* і активацією експресії його генів-мішеней. Крім того, очевидна відсутність кореляції між експресією трьох генів-мішеней *ІФНа* за дії досліджуваних речовин.

Механізм дії препаратів ПоліІ-поліЦ та *ІФНа* у складі Геберону, обраних для

порівняння, відомий. ПоліІ-поліЦ як кожна дволанцюгова РНК розпізнається рецептором TLR-3, який розташований у внутрішньоклітинних органелах (ендосомах і лізосомах), і через MyD88-сигнальний каскад або TRIF-залежний шлях і регульований інтерфероном фактор 3 (IRF3) передає сигнал до ДНК, спричинюючи активацію транскрипції генів системи інтерферону [17].

Діючою речовиною препарату Геберон є ІФН α , який взаємодіє з рецептором, що знаходиться на поверхні клітини. На внутрішньоклітинній ділянці рецептора формується комплекс ISGF-3 (Interferon Stimulated Genes Factor 3), який є транскрипційним фактором; він проникає в ядро, зв'язується зі специфічними ділянками ISRE (Interferon Stimulated Response Element) у промоторах генів-мішеней ІФН і запускає (регулює) їх транскрипцію [18].

Оскільки всі досліджувані речовини в різній мірі є індукторами експресії гену ІФН α , то дуже ймовірно, що їх антивірусна дія частково реалізується через ІФН α -залежний шлях за механізмом, описаним вище. І як наслідок такої дії активуються гени ефекторної ланки системи ІФН. Очевидно, що ця властивість є спільною для всіх досліджуваних речовин, незважаючи на їхню різну природу. Однак відсутність кореляції між змінами в експресії гену ІФН α та іншими трьома генами свідчить про складніший механізм впливу досліджуваних речовин на гени-мішені ІФН α .

Амізон належить до групи ненаркотичних анальгетиків і виявляє протизапальну, жарознижуючу, анальгетичну та імуномодулюючу активність. Дія Амізону як імуномодулятора проявляється в посиленні гуморального (збільшення титру антитіл та ендogenous ІФН у плазмі крові у 3–4 рази) та клітинного (стимуляція функціональної активності Т-лімфоцитів та макрофагів) імунітету [19–21]. Здатність цього препарату підвищувати експресію генів-мішеней ІФН α показано вперше, особливо помітною є підвищена експресія гену РНК-азу *L*, яка щонайменше в півтора рази перевищує активацію, яку зумовлює Геберон. Тому можна припустити, що молекулярний механізм противірусної дії Амізону частково реалізується через ІФН-залежний шлях, а частково – через індукцію генів, принаймні РНК-азу *L*, за поки що нез'ясованим механізмом.

ІФН-індукуючу дію деяких із досліджуваних препаратів (Альтабор, Протефлазид) встановлено порівняно недавно [22], а для інших речовин (лектин хурми, 3',7-диметилкверцетин і суміш триметил- і тетраме-

тилкверцетину) доведено вперше, хоча їхня противірусна активність була зареєстрована в попередніх дослідженнях.

Лектин хурми згідно з проведенням тестом на вуглеводну специфічність взаємодіє переважно з N-ацетилнейраміною (сіаловою) кислотою і муцином підшелепної залози бика, який багатий на сіалову кислоту. Остання об'єднує N- і O-заміщені похідні нейрамінової кислоти, що входить до складу глікопротеїнів, зокрема, розташованих на поверхні клітинних мембран еукаріотів. Зв'язуючись із сіалоспецифічними рецепторами, лектин хурми, таким чином, конкурує з вірусами за ці самі рецептори і протидіє їм. Крім того, на лейкоцитах людини було показано, що трансдукція сигналу від сіалоспецифічних лектинів, зв'язаних із вуглеводними детермінантами глікопротеїнових рецепторів клітинної мембрани, опосередковується PI3'-кіназним шляхом. Клітинна відповідь на дію лектину, як показано на нейтрофілах і мононуклеарах, реєструється як тимчасова транслокація регуляторної субодиниці ензиму PI3'-кінази від мембрани в цитоплазму [23]. Внаслідок активації PI3'-кіназного шляху синтезується вторинний месенджер фосфатидилінозитол-3-фосфат (PIP3), який активує протеїнкіназу C δ (PKC δ), фосфорилує протеїни родини STAT за серином і через них регулює транскрипцію генів відповіді на дію ІФН [24].

Механізм дії поліфенольних сполук, які є діючою речовиною препарату Альтабор (елаготаніни), відрізняється від попереднього. На модельних системах культури моноцитів показано, що поліфенольні сполуки здатні інгібувати гістонацетилтрансферазу і, таким чином, підвищувати рівень гістонів у деацетильованому стані [25]. Це призводить до зниження загального рівня транскрипції, проте гени відповіді на дію ІФН є винятком – їх транскрипція активується [26]. Здатність до такої епігенетичної модифікації характерна для поліфенольних сполук, у тому числі для елаготанінів.

Речовини 3',7-диметилкверцетин, виділений із Протефлазиду, і суміш синтезованих триметил- і тетраметилкверцетину належать до групи флавоноїдів і як типові представники цієї групи є антиоксидантами [27]. Порівняно з іншими сполуками ряду флавоноїдів вони вирізняються нетоксичністю і антибактеріальними властивостями [28]. Очищені з вихідного Протефлазиду і хімічно синтезовані, вони виявляють суттєво меншу порівняно з ним й іншими речовинами

здатність до активації генів-мішеней ІФНа. Це означає, що похідні кверцетину не є єдиною діючою речовиною у складі Протефлазиду. Проте 3',7-диметилкверцетин у комбінації з лектином хурми значно перевищує дію кожної із цих речовин, взятих окремо, а також дію ПоліІ-поліЦ і Геберону. Це засвідчує той факт, що активація експресії генів *ПКР*, *ОАС1а* і *РНКази L* відбувається різними шляхами, зокрема антиоксидантні властивості флавоноїдів і властивості лектину хурми істотно взаємно підсилюються.

Розкриття детальніших механізмів впливу досліджених противірусних речовин на гени системи інтерферону, як і регуляції експресії цих генів, є темою для подальших досліджень.

Таким чином, в роботі вперше показано здатність низки противірусних речовин (Амизон, Альтабор, лектин хурми, Протефлазид, диметил-, триметил- і тетраметилкверцетин) підвищувати експресію гену *ІФНа* і його генів-мішеней – *ПКР*, *ОАС1а* і *РНК-азы L*. Кожна із цих речовин окремо і в комбінації з іншими речовинами по-різному впливає на експресію досліджуваних генів.

3',7-Диметилкверцетин у комбінації з лектином хурми порівняно з іншими речовинами максимально індукує експресію генів *ПКР*, *ОАС1а* і *РНК-азы L*, але істотно не підвищує експресію гену самого *ІФНа*. Ця комбінація речовин є перспективною для подальшого дослідження.

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РАЗНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ *ИФНа*, *ПКР*, *ОАС1а* И *РНК-азы L*

*Е. О. Драгущенко^{1,2}, И. И. Миня¹,
Т. А. Полежаева^{1,2}, Д. Б. Старосила³,
И. С. Карпова¹, М. Ю. Оболенская¹,
С. Л. Рыбалко³*

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;

²УНЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, Украина;

³ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л. В. Громашевского АМН Украины», Киев;
e-mail: olena.imbig@gmail.com

В работе изучали способность нескольких противовирусных соединений разной химической природы индуцировать в клетках печени крысы экспрессию гена интерферона α (*ИФНа*)

и его мишеней *ПКР*, *ОАС* и *РНК-азы L*. Исследовали препараты Амизон, Альтабор, Протефлазид, применяющиеся в клинической практике, и 3',7-диметилкверцетин, выделенный из Протефлазида, смесь химически синтезированных триметил- и тетраметилкверцетина, а также лектин хурмы, которые находятся соответственно на стадии доклинических испытаний и экспериментального исследования.

Определение содержания соответствующих мРНК в составе тотальной РНК методом обратной транскрипции и количественной цепной полимеризации в реальном времени показало, что все исследуемые препараты являются в разной степени индукторами экспрессии генов *ИФНа*, *ПКР*, *ОАС* и *РНК-азы L*. Комбинация препаратов 3',7-диметилкверцетин + лектин хурмы проявляет наибольший индуцирующий эффект, который значительно превышает действие каждого вещества в отдельности, а также действие препарата Геберон (рекомбинантного *ИФНа2b*) и ПолиИ-полиЦ как стандартных индукторов генов-мишеней *ИФНа*.

Способность всех веществ в разной степени индуцировать экспрессию гена *ИФНа*, отсутствие корреляции между экспрессией гена *ИФНа* и его генами-мишенями, а также между самими генами-мишенями свидетельствует о том, что механизм антивирусного действия исследуемых веществ сложный и не определяется только *ИФНа* и его опосредованным действием.

Ключевые слова: противовирусные препараты, Амизон, Альтабор, Протефлазид, производные кверцетина, лектин хурмы, интерферон α , гены-мишени.

INFLUENCE OF CHEMICALLY DIFFERENT ANTIVIRAL SUBSTANCES ON THE EXPRESSION OF *IFN α* , *PKR*, *OAS1a* AND *RNase L* GENES

O. O. Dragushchenko^{1,2}, I. I. Minia¹,
T. A. Poliezhayeva^{1,2}, D. B. Starosyla³,
I. S. Karpova¹, M. Yu. Obolenska¹,
S. L. Rybalko³

¹Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²Taras Shevchenko Kyiv National University,
Institute of Biology, Ukraine;

³State Institution L. V. Gromashevskiy Institute
of Epidemiology and Infectious Diseases, National
Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: olena.imbig@gmail.com

S u m m a r y

The aim of the study was to determine the ability of several chemically different antiviral substances to induce the expression of interferon α (*IFN α*), *PKR*, *OAS1a* and *RNase L* genes in the rat liver. The investigated substances included Amizon, Altabor and Proteflasid, which are already used in practical medicine, and 3',7-dimethylquercetin extracted from Proteflasid, the mixture of synthesized trimethyl- and tetramethylquercetin and Sialospecific lectin from persimmon, which are at the stage of preclinical trial and experimental research respectively.

The content of corresponding mRNAs in total RNA was detected with the help of reverse transcription and polymerase chain reaction in real time. The results have shown that all investigated substances induce the expression of genes *IFN α* , *PKR*, *OAS* и *RNase L* in specific manner. The combination of 3',7-dimethylquercetin + lectin from persimmon had the highest stimulating effect exceeding the effect of each component of the mixture and the influence of Heberon (recombinant *IFN α 2b*) and PolyI-polyC as the standard inducers of *IFN α* and its target genes.

The ability of all substances to specifically induce the expression of *IFN α* and its target genes, the absence of correlation between the levels of *IFN α* and its target genes expression as well as between target genes themselves indicate that the mechanism of antiviral activity of the investigated substances is connected not only with up-regulation of *IFN α* and potential *IFN α* mediated effects.

Key words: antiviral medicines, Amizon, Altabor, Proteflasid, derivatives of quercetin, lectin from persimmon, interferon α , target genes.

1. Samuel Ch. E. // Clin. Microbiol. Rev. — 2001. — 14, N 4. — P. 778–809.
2. Brassard D. L., Grace M. J., Bordens R. W. // J. Leukoc. Biol. — 2002. — 71, N 4. — P. 565–581.
3. Okanoue T., Sakamoto Sh., Itoh Y. et al. // J. Hep. — 1996. — 25, N 3. — P. 283–291.
4. Tamam L., Yerdelen D., Ozpoyraz N. // Ann. Pharmacother. — 2003. — 37, N 3. — P. 384–387.
5. Loftis J. M., Hauser P. // Psychosomatics. — 2003. — 44, N 6. — P. 524–255.
6. Патент 6752 UA. 4-(N-бензил)-аминокарбонил-1-метилпиридиний йодид — обезболивающее средство с интерферогенными, противовоспалительными и жаропонижающими свойствами / Тринус Ф. П., Даниленко В. Ф., Бухтиарова Т. А., Рыбалко С. Л., Аркадьев В. Г., Клебанов Б. М., Максимов Ю. Н. и др. — Оpubл. 29.12.1994, Промислова власність. — № 8-1.
7. Патент 63674 UA. Антивірусний препарат Альтабор та спосіб його одержання / Бікбулатова Т. Н., Шаламай А. С., Безпалько Л. В., Кобилінська В. І., Сова Е. О., Рибалко С. Л., Дядюн С. Т. — Оpubл. 17.04.2006, Бюл. № 4.
8. Брежнева Ю. В. // Иммунология и аллергология. — 2002. — № 3. — С. 38.
9. Матяш В. І., Шевчук В. Б., Власик Т. Л. та ін. // Вісн. Він. держ. мед. унів. — 2002. — № 2. — С. 313–314.
10. Патент 3060 UA, С 1 G 01 N 33/53. Спосіб діагностики новоутворень / Є. Л. Голинська, Н. О. Петруша, І. В. Шатунова. — Оpubл. 26.12.1994, Бюл. № 5–1.
11. Патент 68373 UA. Застосування сіалоспецифічного лектину із штаму *Vac. subtilis* 668 ІМВ для інгібіції репродукції ВІЛ / Підгорський В. С., Рибалко С. Л., Коваленко Е. О., Шарикіна Н. І., Гетьман К. І., Максименок О. В., Іванська Н. В. — Оpubл. 15.12.2004, Бюл. № 12.
12. Kishko Ya. G., Vasilenko M. I., Podgorsky V. S. et al. // Микробиол. журн. — 1997. — 59, № 6. — С. 20–26.
13. Sova O. // J. Chromatography. — 1985. — 320, N 1. — P. 15–22.
14. Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела — Львів, 2005. — 554 с.
15. Луцик М. Д., Панасюк Е. І., Антонюк В. А. Методи исследования углеводной специфичности лектинов (методические рекомендации). — Львов, 1983. — 22 с.
16. Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — 5259, N 227. — P. 680–685.

17. *Mogensen T. H.* // Clin. Microbiol. Rev. – 2009. – **22**, N 2. – P. 240–273.
18. *Platanias L. C.* // Nat. Rev. Immunol. – 2005. – **5**. – P. 375–386.
19. *Пловецкая И. А.* // Вестн. гиг. эпид. – 2005. – **9**, № 1. – С. 138–141.
20. *Фролов А. Ф., Фролов В. М., Лоскутова И. В.* // Журн. практ. лікаря. – 1999. – № 4. – С. 47–49.
21. *Фролов А. Ф., Фролов В. М., Лоскутова И. В.* // Укр. мед. часопис. – 2000. – **15**, № 1. – С. 78–80.
22. *Гошко Е. Л., Рыбалко С. Л., Матяш В. И. и др.* // Лаб. диагн. – 2005. – № 4. – С. 30–35.
23. *Здіорук М., Бродяк І., Сибірна Н.* // Вісн. Львів. унів. Сер. біол. – 2011. – Вип. 56. – С. 28–41.
24. *Kaur S., Uddin Sh., Platanias L. C.* // J. Interf. Cyt. Res. – 2005. – **25**, N 12. – P. 780–787.
25. *Kiss A. K., Granica S., Stolarczyk M. et al.* // Food Chem. – 2012. – **131**, N 3. – P. 1015–1020.
26. *Chang H.-M., Paulson M., Holko M. et al.* // PNAS. – 2004. – **101**, N 26. – P. 9578–9583.
27. *Eldahshan O. A., Ayoub N. A., Singab A.-N. B. et al.* // Afr. J. Pharm. Pharmac. – 2009. – **4**, N 3. – P. 158–164.
28. *Martini N. D., Katerere D. R. P., Eloff J. N.* // J. Ethnopharmac. – 2004. – **93**, N 2–3. – P. 207–212.

Отримано 24.01.2012