

14. Суббота А.Г., Захарченко В.О., Харкевич О.С., Наконечна Л.Т., Пашкевич Р.Ю., Карпенко Ю.В., Олішевська С.В., Жданова Н.М. Мікроскопічні гриби, що пошкоджують конструкції будинків // Фізико-хімічна механіка матеріалів. Проблеми корозії та протикорозійного захисту матеріалів. Львів, 2006. – 2. – Спец. вип. – № 5. – С. 932–936.
15. Ружинский С.И., Портник А.А., Савиных А.В. Все о пенобетоне. СПб.: Издательство ООО «Строй-Бетон», 2006. – 631 с.
16. Фомина М.О., Олишевская С.В., Кадошиников В.М., Злобенко Б.П., Подгорский В.С. Колонизация и деструкция бетона митоспоровыми грибами в модельном эксперименте // Микробиол. журн. – 2005. – 67, № 2. – С. 96–104.
17. Pugh G.K. Strategies in fungal ecology // Trans. Brit. Mycol. Soc. – 1980. – 75, N 1. – P. 1 – 16.

Отримано 23.11.2010

УДК 578.825.615.281.8

**С.Д. Загородняя¹, Н.В. Нестерова¹, А.В. Головань¹, И.В. Алексеева²,
Л.И. Пальчиковская², Г.В. Баранова¹**

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного 154, Киев ГСП, Д 03680, Украина

²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Академика Заболотного 150, Киев ГСП, Д 03680, Украина

АНТИВЭБ АКТИВНОСТЬ 6-АЗАЦИТИДИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) вызывает у человека ряд лимфопролиферативных заболеваний, поражение центральной и периферической нервной системы. Спектр этиотропных лекарственных препаратов против ВЭБ ограничен. В работе представлены антивирусные исследования модифицированного нуклеозида широкого спектра действия – 6-азацитидина (6-АЦ), а также его производных (2'-3'-секо-5-метил-6-АЦ, 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидро-6-АЦ и 2'-дезокси-6-АЦ) на модели вируса Эпштейна-Барр в лимфобластоидных клетках Raji. Определены показатели цитотоксичности (CC₅₀) для исследованных веществ, которые составили 120 мкг/мл, 180 мкг/мл, 500 мкг/мл, 330 мкг/мл и эффективные концентрации (EC₅₀) – 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 4 мкг/мл, 11 мкг/мл соответственно последовательности приведенных выше препаратов. Полученные результаты свидетельствуют о высокой антиВЭБ активности, поскольку индексы селективности (SI) для них составили 240, 180, 125, 30, что в 1,3-10 раз выше, чем для референс-препарата ациклоуазина. Выявлено апоптозстимулирующее действие 6-азацитидина и его производных. В инфицированных ВЭБ и обработанных исследуемыми препаратами клетках Raji через 24 часа наблюдали увеличение процента апоптотических клеток по сравнению с неинфицированными. Таким образом, полученные результаты открывают новые биологические свойства препаратов на основе 6-азацитидина.

Ключевые слова: вирус Эпштейна-Барр, антивирусное действие, 6-азацитидин, апоптоз.

На сегодняшний день в медицинской практике используется широкий спектр антигерпетических препаратов, из них вещества, которые обладают антивирусной активностью против вируса герпеса человека 4 типа (вирус Эпштейна-Барр, ВЭБ) составляют небольшой процент [2]. ВЭБ инфекция является актуальной проблемой для разных областей медицины, поскольку доказана его роль в этиологии развития инфекционного мононуклеоза, лимфопролиферативных заболеваний (лимфома Беркитта, неходжкинские лимфомы и др.), патологии центральной и периферической нервной системы [13]. Лекарственные препараты для использования в клинике против ВЭБ ограничиваются ацикловиром, ганцикловиром [2,11] и их применение усложняется рядом побочных эффектов, таких как высокая токсичность, приобретение вирусом резистентности к препаратам. Представленные вещества – это аналоги нуклеозидов, мишенью действия которых является вирусная ДНК-полимераза и тимидинкиназа. Ациклические нуклеозиды и аналоги фосфорилированных нуклеотидов встраиваются в вирусную ДНК, вызывая остановку синтеза вирусной ДНК-цепи, они могут действовать как конкурентные ингибиторы субстрат-связывающего сайта ДНК-полимеразы.

© С.Д. Загородняя, Н.В. Нестерова, А.В. Головань, И.В. Алексеева, Л.И. Пальчиковская, Г.В. Баранова, 2011

К данному классу препаратов относится 6-азацитидин (6-АЦ), который представляет собой структурный аналог природного цитидина. Механизм действия 6-АЦ состоит в ингибировании репликации вирусной ДНК, а также угнетении синтеза структурных вирусных белков [4,8]. Синтезированы производные 6-АЦ с целью повышения его биологических свойств. В ряде работ [1,4,8,9] были проанализированы данный аналог нуклеозида и его производные, где было показано их ингибирующее действие на репродукцию аденовирусов серотипов 1, 2 и 5, вируса простого герпеса 1 типа, цитомегаловируса и вируса гриппа.

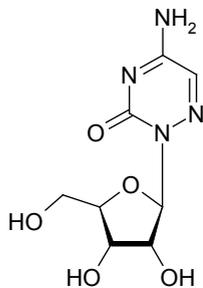
Целью данной работы было изучение антивирусной активности 6-азацитидина, относящегося к аномальным нуклеозидам, и его производных на репродукцию ВЭБ.

Материалы и методы. *Клетки.* Как модель ВЭБ-инфекции *in vitro* использовали линии лимфобластоидных клеток В-фенотипа Raji (В-лимфоциты человека, выделенные из лимфомы Беркитта) и В 95-8 – лимфоциты периферической крови обезьян – мармазеток. Клетки получены из банка культур Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (г. Москва).

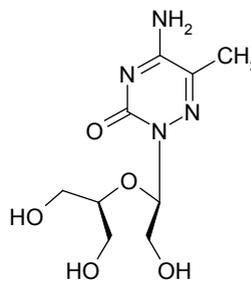
Культивирование клеток проводили в среде RPMI 1640 (Sigma, США) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки теленка (ЭТС) (Sigma, США) и антибиотиков в термостате (газоплотном инкубаторе) при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

Вирус Эпштейна-Барр выделяли из лимфобластоидной культуры клеток В 95-8, которая является продуцентом этого вируса. Очистку вируса осуществляли по методу Уоллза, Кроффорда [6].

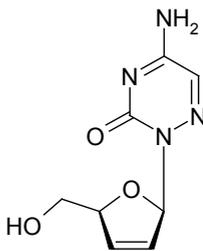
Исследуемые препараты:



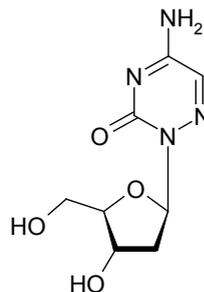
6-азацитидин, 2-β-D-рибофуранозил-5-амино-1,2,4-триазин-3(2H)-он (6-АЦ) (препарат №1);
мол. масса -244,2;



2'-3'-секо-5-метил-6-АЦ (препарат №2);
мол. масса -260,25;



2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидро-6-АЦ
(препарат №3); мол. масса -210,2;



2'-дезокси-6-АЦ (препарат №4);
мол. масса -228,2.

В качестве референс-препарата использовали ациклогуанозин (Sigma, США); мол. масса – 213,2. Все препараты растворяли в среде RPMI 1640.

Определение цитотоксического действия препаратов. Цитотоксичность исследуемых веществ, при которой жизнеспособность клеточной популяции Raji снижалась на 50 % (показатель CC₅₀) анализировали с использованием 0,4 % трипанового синего и МТТ-теста, представленного в работе [14].

Процент преобразования МТТ в его производное – формазан в каждой лунке вычисляли, сравнивая значения оптической плотности (ОП) при 540 нм с контролем. Каждая концентрация исследовалась в трех повторностях с вычислением среднего значения.

Определение антивирусного действия. Инфицирование лимфобластоидных клеток Raji проводили вирусным материалом, полученным из супернатанта клеток В95-8. Клетки осаждали низкоскоростным центрифугированием при 1500 об/мин. в течение 10 мин, дважды промывали средой RPMI 1640 без сыворотки для максимального удаления ЭТС, которая может мешать адсорбции вируса на поверхности клетки. Полученный осадок разводили в минимальном количестве среды без ЭТС и вносили вирусный препарат. Адсорбция вируса происходила 1 час при 37 °С. Далее клетки дважды промывали, как описано выше, и разводили питательной средой с 5 % ЭТС до посадочной концентрации 5×10^5 кл/мл. После этого в культуру клеток вносили исследуемые препараты, растворенные в среде RPMI 1640. Анализируемые пробы отбирали через 48 часов, учитывая, что данный временной отрезок оптимален как с точки зрения динамики роста клеточной линии Raji, так и репродуктивного цикла ВЭБ.

Уровень угнетения репродукции вируса Эпштейна-Барр в культуре клеток Raji определяли методом ПЦР, используя праймеры и реагенты “AMPLY-Senc-100R” (Россия) с последующей обработкой результатов в программе “Biotest A”. В данном наборе в качестве праймера использовался участок в 290 п.н., который кодирует капсидный антиген (VCA) ВЭБ. Анализ проводили согласно инструкции производителя.

Метод выявления апоптических клеток. Развитие процесса апоптоза в инфицированных и неинфицированных ВЭБ клетках, обработанных препаратами в концентрации 100 мкг/мл, исследовали с помощью цитоморфологического метода окрашивания клеток, используя флуоресцентный краситель Hoechst 33342 (Sigma, США). Этот ДНК-тропный краситель интеркалирует в ДНК клеток в местах А-Т – пар, позволяя выявлять в люминисцентном микроскопе состояние хроматина клеток. Нормальные живые клетки имеют равномерное темно-зеленое окрашивание ядер, а для апоптических клеток характерны конденсация хроматина и фрагментация ядра – «апоптические тельца» ярко-зеленого цвета. Для проведения анализа клетки (5×10^5) отмывали фосфатно-солевым буфером, рН 7,2, (ФСБ) и центрифугировали при 1500 об/мин. 5 мин. Далее проводили инкубирование клеток с 100 мкл Hoechst 33342 (0,1 мг/мл) в течении 30 минут при 37 °С. Отмытые в ФСБ клетки ресуспендировали в 50 % растворе глицерина с 4 % параформальдегидом и наносили на предметные стекла. Анализ наличия апоптических клеток в препаратах проводили, используя люминисцентный микроскоп МЛ-2 (Россия) при увеличении $\times 900$.

Статистическую обработку данных выполняли согласно стандартным подходам с вычислением статистической ошибки, исследованием корреляционной зависимости, проведением регрессионного анализа и построением регрессионной прямой, используя компьютерную программу Microsoft Excel и Origin 6.0 [3].

Результаты и их обсуждение. Исследование цитотоксичности препаратов (показатель CC_{50}) проводили в 96-луночных культуральных планшетах, на каждую концентрацию вещества использовали три параллельные лунки.

Влияние препаратов 1 и 2 на жизнеспособность клеточной популяции изучали с помощью 0,4 % трипанового синего, который способен проникать в мертвые клетки, окрашивая их в синий цвет, а живые клетки интактны к нему. Диапазон исследованных концентраций составил 4-250 мкг/мл. Цитотоксичность препаратов №3 и №4 исследовали МТТ-методом. Уровень жизнеспособности клеток Raji под действием препаратов рассчитывали относительно показателя контроля необработанных клеток, который принимали за 100 %. Диапазон концентраций составлял 4-500 мкг/мл. Результаты представлены на рис. 1.

Полученные данные свидетельствуют о дозозависимом действии препаратов, т.е. увеличение концентрации вещества ведет к постепенному угнетению жизнеспособности клеток. Был определен показатель CC_{50} , который для препарата №1 составил 120 мкг/мл. Показатель CC_{50} для препарата №2 составил 180 мкг/мл. Как следует из приведенных данных, эти препараты вызывали гибель клеток Raji на 50 % и 60 %, соответственно, для препарата №3 и №4 в наибольшей исследуемой концентрации. Более низкие дозы веществ приводили к угнетению жизнеспособности культур клеток менее чем на 30 %. Уровень цитотоксичности (CC_{50}) 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидро-6-азациитидина составил 500 мкг/мл, а 2'-дезокси-6-азациитидина – 330 мкг/мл.

Ациклоуанозин был малотоксичным препаратом, его CC_{50} составил 5000 мкг/мл.

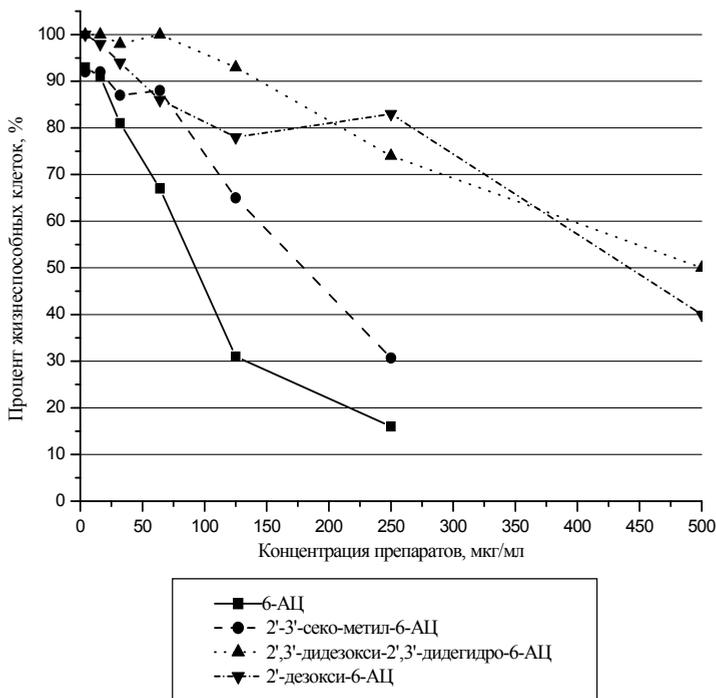


Рис. 1. Цитотоксическое действие препаратов на клеточную культуру Raji под действием 6-Азацитина и его производных

Примечание: * стандартная ошибка $\pm 0,05$

Исследование анти-ВЭБ активности. Антивирусную активность исследуемых нуклеозидов оценивали полуколичественным методом ПЦР в диапазоне концентраций от 0,1 до 125 мкг/мл в трех повторностях. Уровень ингибирования накопления вирусной ДНК в инфицированных клетках, обработанных разными концентрациями веществ, определяли по отношению к контрольным инфицированным клеткам, в которых накопление вирусной ДНК принимали за 100 %. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Уровень ингибирования экспрессии ДНК ВЭБ в клетках Raji, обработанных 6-азацитидином и его производными

Название препарата	6-азацитин* [*]	2'-3'-секо-5-метил-6-АЦ* [*]	2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидро-6-АЦ* [*]	2'-дезокси-6-АЦ* [*]
	Процент ингибирования накопления ДНК ВЭБ, %			
Концентрация, мкг/мл				
0,1	10	6	0	0
0,5	50	29	0	0
1	52	49	0	0
2	77	58	27	18
4	88	85	52	32
16	88	88	53	67
32	87	88	53	68
64	88	88	59	71
125	91	91	71	73

Примечание: * стандартная ошибка $\pm 0,05$

Показано дозозависимое ингибирование накопления вирусной ДНК под действием препаратов №1 и №2, то есть, при увеличении концентраций веществ – уменьшается нагрузка ДНК ВЭБ в клетках. Эффективная концентрация (EC_{50}) – концентрация препарата, которая на 50 % ингибирует репродукцию вируса Эпштейна-Барр, составила 0,5 мкг/мл для 6-АЦ, для „секо”-5-метил-6-АЦ – 1 мкг/мл.

Исследование анти-ВЭБ действия модифицированных соединений 6-азациитидина, а именно, 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидро-6-АЦ и 2'-дезокси-6-АЦ показало, что ингибирующая активность этих производных 6-АЦ против ВЭБ снижается. Их эффективные концентрации (EC_{50}) составили 4 мкг/мл и 11 мкг/мл, соответственно для 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидро-6-АЦ и 2'-дезокси-6-АЦ, которые в 8 и в 22 раза выше по сравнению с 6-АЦ.

Референс препарат тестировали аналогично. Показатель EC_{50} ациклогуанозина составил 220 мкг/мл, что в 440 раз выше, чем для 6-АЦ.

Критерием оценки специфической антивирусной активности веществ в культуре клеток является показатель индекса селективности (SI), который определяется соотношением цитотоксической концентрации (CC_{50}) и эффективной концентрации (EC_{50}). Данные представлены в табл. 2.

Таблица 2

Сравнительная характеристика активности 6-азациитидина и его производных

Показатель	6-азациитидин	2' 3'- секо-5-метил-6-АЦ	2'3'-дидезокси-2'3'-дидегидро -6-АЦ	2'-дезокси 6-АЦ	Ациклогуанозин
CC_{50}	120 мкг/мл	180 мкг/мл	500 мкг/мл	330 мкг/мл	5000 мкг/мл
EC_{50}	0,5 мкг/мл	1 мкг/мл	4 мкг/мл	11 мкг/мл	220 мкг/мл
SI	240	180	125	30	23

Как следует из приведенной таблицы, индексы селективности 6-АЦ и его производных выше, чем аналогичный показатель референс препарата в 1,3–10 раз. Согласно существующим нормативным документам по исследованию антивирусных препаратов *in vitro*, вещество, показатель SI которого превышает 16, считается перспективным для дальнейших исследований [7]. Так как SI для 6-АЦ и его производных выше рекомендуемого нормативного показателя, поэтому эти препараты можно считать перспективными для дальнейших исследований.

Исследование апоптоза в культуре клеток Raji под действием аналогов нуклеозидов. Современный подход к скринингу антивирусных препаратов обуславливает исследования веществ как потенциальных ингибиторов репродукции вирусов, а также изучение их апоптостимулирующих свойств.

Развитие процесса апоптоза исследовали через 3, 24 и 48 часов после инфицирования клеток и внесения препаратов с помощью флуоресцентного красителя Hoescht 33342 (рис. 2). Результаты исследования представлены на рис. 3 (А-В).

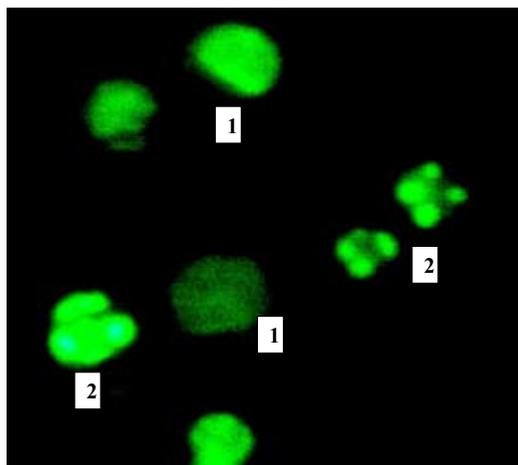


Рис. 2. Выявление апоптических клеток с фрагментированными ядрами («апоптические тельца») в культуре клеток Raji, обработанных 6-азациитидином, в люминисцентном микроскопе x900 (метод окрашивания Hoescht 33342)

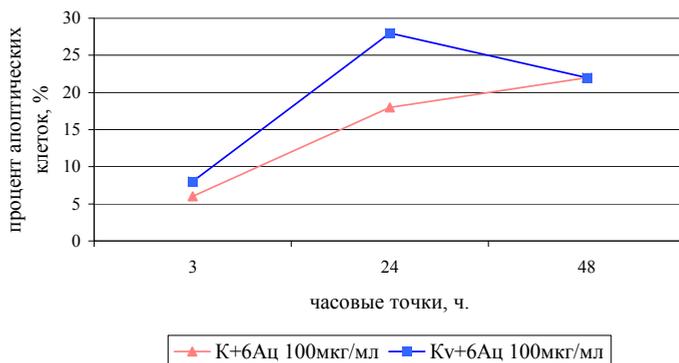
- 1 – клетки с нормальными ядрами;
- 2 – клетки с характерной апоптической фрагментацией ядра.

Контролями в эксперименте служили неинфицированные и инфицированные ВЭБ клетки Raji, не обработанные препаратами. Процент клеток с апоптическими проявлениями в контролях не превышал 10 % во всех временных точках отбора проб.

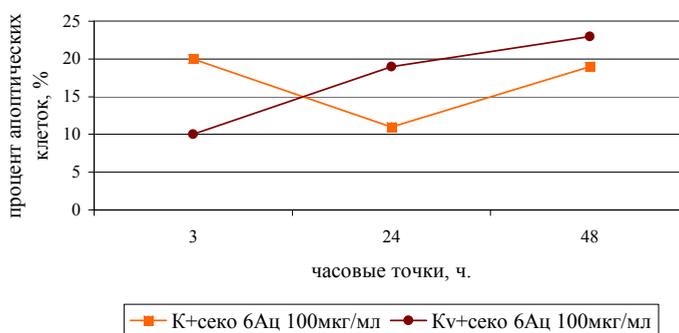
Для 6-АЦ (рис. 3А) через 24 часа развитие апоптотических признаков в клетках Raji наблюдается в 18 % клеточной популяции, при этом при инфицировании их ВЭБ данный показатель возрастает до 28 %. Через 48 часов уровни апоптотических клеток сравниваются.

Препарат секо-6-АЦ стимулирует развитие апоптоза на ранней временной точке (рис. 3,Б), так через 3 часа 20 % клеток имеют апоптотические проявления в неинфицированных клетках с постепенным выравниванием показателей к 48 часам (17 % и 22 % соответственно).

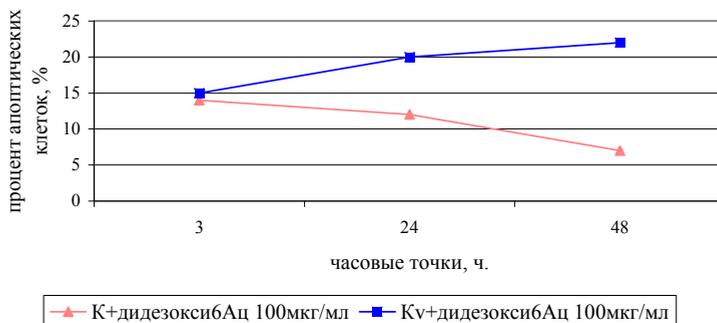
Для 2'-дезоксидезокси-6АЦ (рис. 3,В) через 3 часа процент апоптотических клеток в образцах с вирусом и без него был почти одинаковый (14-15 %), в то время как через 24 часа этот показатель в инфицированных клетках превышал в 1,6 раза, а через 48 часов – в 3 раза таковой в неинфицированных клетках, который был на уровне контроля, т.е. препарат проявлял апоптозстимулирующее действие только в вирус-инфицированных клетках, но не превышал 22 % в 48 часовой точке.



А



Б



В

Рис. 3 (А-В). Результаты исследования апоптозстимулирующих свойств анализируемых препаратов в инфицированной и неинфицированной ВЭБ культуре клеток Raji (метод окрашивания Hoescht 33342).

Сравнительный анализ антивирусной активности 6-азациитидина и его новых производных в отношении вируса Эпштейна-Барр показал, что 6-азациитидин эффективно угнетает репродукцию ВЭБ и является перспективным для разработки на его основании нового лечебного средства с широким спектром действия. Среди производных 6-азациитидина наибольший уровень антивирусной активности проявил 2'-3'-секо-5-метил-6-азациитидин, другие производные 6-азациитидина имели лучшую переносимость, но проявляли активность в более высоких концентрациях, т.е. были менее активны. Полученные нами результаты согласуются с данными, полученными при исследовании этих нуклеозидов против аденовирусов [4, 8, 9]. Проведенные авторами исследования антиаденовирусной активности 6-АЦ и его производных показали, что наиболее эффективно ингибировал репродукцию аденовирусов 1, 2 и 5 типов именно 6-АЦ. Модификации структурных элементов исходной молекулы, гетерооснования или сахарного остатка, или замена рибозы на сахар другой природы, снижают антивирусное действие веществ [8]. Препараты с измененным сахарным остатком проявляли меньшую антиаденовирусную активность (Ад 5 типа) чем 6-АЦ, для которого минимальная ингибирующая концентрация (МИК) составляла 0,5 мкг/мл, тогда как для 2'-дезоксидеко-6-азациитидина МИК была в пределах 8–16 мкг/мл, а для 2'3'-дидезокси-2',3'-дидегидро-6-азациитидина – 8 мкг/мл. Полученные нами данные по антиВЭБ действию этих нуклеозидов совпадают. То есть, замещение ОН-группы в сахарном остатке приводит к снижению ингибиторной активности веществ, что может быть вызвано значительным отличием их пространственной структуры [8, 9].

Аналоги нуклеозидов имеют как антивирусную активность, так и являются индукторами апоптоза [10,12,15,16]. Механизм индукции апоптоза различный, так, например, цидофовир, ганцикловир запускают каспазный каскад апоптоза [10,17], азидотимидин действует через ингибирование ядерного фактора NF-κB [12]. В ряде работ [10,15,17] показано, что аналоги нуклеозидов индуцируют апоптоз лимфобластоидных и эпителиальных опухолевых клеток, этиологию которых связывают с ВЭБ. Mignolo et al [15] на культуре клеток рака носоглотки показали, что апоптоз, индуцированный цидофовиром, не зависел от влияния препарата на ДНК-полимеразу ВЭБ, который не экспрессируется в этих клетках. Eun et al [10] индуцировали экспрессию литических генов в ВЭБ-положительных линиях клеток рака желудка с последующей обработкой ганцикловиром, в результате чего авторы выявили включение каспазно-зависимого апоптоза. В работе Kurokawa et al [12] показано, что антивирусный препарат азидотимидин индуцирует апоптоз в ВЭБ-положительных линиях клеток из лимфомы Беркитта. В этих клетках происходит спонтанная реактивация вируса, то есть происходит экспрессия генов ВЭБ, в частности вирусной тимидинкиназы. Этот фермент фосфорилирует азидотимидин до его монофосфатной формы. В ответ на реактивацию вируса в этих клетках повышается уровень NF-κB, происходит их активная пролиферация. Показано, что азидотимидин в монофосфатной форме угнетает ядерный фактор, индуцируя апоптотическую программу гибели клетки.

6-Азациитидин и его производные являются аномальными аналогами нуклеотидов, которые влияют на процесс синтеза нуклеиновых кислот, как ДНК [4,9] так и синтез РНК [5].

В нашей работе использованы лимфобластоидные клетки Raji, которые являются латентно инфицированными ВЭБ и содержат 50-60 копий вирусного генома в эписомальной форме на клетку, но экспрессируют лишь некоторые гены, необходимые для поддержания латентности. В результате проведенных исследований по изучению апоптозстимулирующего влияния аналога цитидина 6-АЦ и его производных в культуре клеток Raji не инфицированных ВЭБ выявили индуцирующее действие препаратов, которое приводило к гибели 15–20 % клеточной популяции путем апоптоза. При инфицировании клеток вирусом с последующей обработкой их исследуемыми препаратами наблюдали увеличение процента апоптотических клеток для 6-АЦ и секо-6-АЦ через 24 часа на 12 % и 8 %, соответственно, по сравнению с неинфицированными, а для 2'-дезоксидеко-6АЦ в 2-3 раза. Литическая инфекция и антивирусное действие препаратов в инфицированных ВЭБ клетках увеличивают процент апоптотических клеток, то есть, ингибирование репродукции вируса стимулирует элиминацию зараженных клеток путем апоптоза, что согласуется с литературными данными [12,15].

Исходя из полученных данных можно предположить, что при антивирусном действии веществ включаются дополнительные механизмы апоптической гибели клеток, инфицированных ВЭБ, например, возможно прекращение синтеза антиапоптических вирусных белков в связи с ингибированием репродукции вируса, а в случае неинфицированных клеток – с блокированием транскриптов латентных генов.

Таким образом, можно сделать вывод, что 6-АЦ и его производные, обладающие выраженным анти-ВЭБ действием, способны индуцировать развитие апоптического процесса, увеличивая элиминацию зараженных клеток.

**С.Д. Загородня¹, Н.В. Нестерова¹, А.В. Головань¹, , I.V. Алексеева²,
Л.Г.Пальчиковська², Г.В. Баранова¹**

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

²-Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ, Київ

АНТИВЕБ АКТИВНІСТЬ 6-АЗАЦИТИДИНУ ТА ЙОГО ПОХІДНИХ

Резюме

Вірус Епштейна-Барр (ВЕБ) викликає у людини ряд лімфопроліферативних захворювань, ураження центральної та периферійної нервової системи. Спектр етіотропних лікарських препаратів проти ВЕБ обмежений. У роботі представлені антивірусні дослідження модифікованого нуклеозиду широкого спектру дії - 6-азацитину, а також його похідних (2'-3'-секо-5-метил-6-АЦ, 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегідро-6-АЦ і 2'-дезокси-6-АЦ) на моделі ВЕБ в лімфобластоїдних клітинах Raji. Визначено показники цитотоксичності (CC₅₀) для досліджених речовин, які склали 120 мкг/мл, 180 мкг/мл, 500 мкг/мл, 330 мкг/мл та ефективні концентрації (EC₅₀) – 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 4 мкг/мл, 11 мкг/мл відповідно до послідовності наведених вище препаратів. Отримані результати свідчать про високу антиВЕБ активність, оскільки індекси селективності (SI) для них склали 240, 180, 125, 30, що в 1,3-10 разів вище, ніж для референс-препарату ациклоганозину. Виявлено апоптозстимулюючу дію 6-АЦ і його похідних. В інфікованих ВЕБ і оброблених досліджуваними препаратами клітинах Raji через 24 години спостерігали збільшення відсотка апоптичних клітин порівняно з неінфікованими. Таким чином, отримані результати відкривають нові біологічні властивості препаратів азацитину.

Ключові слова: вірус Епштейна-Барр, антивірусна дія, 6-азацитин, апоптоз.

**S.D. Zagorodnya¹, N.V. Nesterova¹, A.V. Golovan¹, I.V. Alexeeva²,
L.G. Palchykovska², G.V. Baranova¹**

¹ Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

AntiEBV ACTIVITY OF 6-AZACYTIDINE AND ITS DERIVATIVES

S u m m a r y

Epstein-Barr virus (EBV) causes several lymphoproliferative diseases, lesions of the central and peripheral nervous systems. Spectrum of etiotropic medicines against EBV is limited. The paper presents the anti-virus research of modified nucleoside with a wide spectrum of action – 6-azacytidine and its derivatives (2'-3'-seco-5-methyl-6-AC, 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-6-AC and 2'-deoxy-6-AC) on the model of Epstein-Barr virus in Raji lymphoblastoid cells. Parameters of cytotoxicity (CC₅₀) for the investigated substances were determined which amounted to 120 µg/ml, 180 µg/ml, 500 µg/ml, 330 µg/ml, and the effective concentration (EC₅₀) – 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 4 µg/ml, 11 µg/ml, in accordance with the sequence of preparations listed above. The results indicate a high antiEBV activity since their selectivity indexes (SI) were 240, 180, 125, 30 that is 1.3–10 times higher than the reference substance acycloguanosine. Apoptosis-stimulating action of 6-azacytidine and its derivatives was revealed. An increase of percentage of apoptotic cells in EBV-infected Raji cells and those treated with investigated substances as compared to uninfected ones was observed after 24 hours. Thus, our results provide new biological properties of the azacytidine substances.

The paper was presented in Russian.

K e y w o r d s: Epstein-Barr virus, antiviral effect, 6-azacytidine, apoptosis.

The author's address: Zagorodnya S.D., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Абдуллаева М.В., Фролов А.Ф., Алексеева И.В., Пальчиковская Л.И., Федорова Н.Е. Ингибирующее действие 6-азациитидина на цитомегаловирусную инфекцию человека в клеточной системе // Биополимеры и клетка. – 2004. – **20**, № 4. – С. 337-342.
2. Дяченко Н.С. Актуальні вірусні інфекції: принципи та нові шляхи до хіміопрофілактики. Інфекції, спричинені вірусами з родини Herpesviridae//Посібник з хіміотерапії вірусних інфекцій під ред. Дзюблик І.В. Київ: Київська медична академія післядипломної освіти, 2004. — С.107—124.
3. Лопач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel.//К.: Морион, 2001. – 320 с.
4. Носач Л.Н., Дяченко Н.С., Шаламай А.С., Алексеева И.В., Кушко Л.Я., Озвничук И.И., Жовноватая В.Л., Бутенко С.И., Петровская И.А., Дранник Г.Н. Антиаденовирусное и иммуностимулирующее действие 6-азациитидина // Биополимеры и клетка. – 1996. – **12**, № 1. – С. 75–85.
5. Пальчиковская Л.И., Гарманчук Л.В., Алексеева И.В., Усенко Л.С., Шестакова Т.С., Соляник Г.И., Швед А.Д., Чехун В.Ф. N₁-глікозидні аналоги 6-Азациитидину. Цитотоксична дія та вплив на транскрипцію *in vitro* // Біополімери і клітина. – 2005. –**21**, № 5. – С. 433–439.
6. Уоллз Э., Крофорд Д. Культивирование клеток В95-8 // Лимфоциты. Методы – М.: Мир, 1990. – С.230–249.
7. Щербинська А.М., Дяченко Н.С., Рибалко С.Л. та ін. Вивчення антивірусної дії потенційних лікарських засобів / Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) //– К.: Видавничий дім «Авіцена», 2001. – С. 371–390.
8. Alexeeva I., Palchikovskaya L., Shalamay A., Nosach L., Zhovnovataya V., Povnitsa O., Dyachenko N. N₁-Amino-acid derivatives of 6-azacytidine: Structure-activity relationship // Acta Biochim. Pol. – 2000. – **47**, N 1. – P. 95–101.
9. Alexeeva I., Dyachenko N., Nosach L., Zhovnovataya V., Rybalko S., Lozitskaya R., Fedchuk A., Lozitsky V., Gridina T., Shalamay A., Palchikovskaya L., Povnitsa O. 6-Azacytidine – compound with wide spectrum of antiviral activity // Nucleosides, Nucleotides and Nucl. Acids. – 2001. – **20**, N 4-7. – P. 1147–1152.
10. Eun J. J., You M. L., Byung L.L., Mee S.Ch., Woo H.K. Lytic induction and apoptosis of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer cell line with epigenetic modifiers and ganciclovir // Cancer Letters. – 2007. – **247**, N 1. – P.77–83.
11. Humar A., Hebert D., Davies H.D., Humar A., Stephens D., O'Doherty B., Allen U. A randomized trial of ganciclovir versus ganciclovir plus immune globulin for prophylaxis against Epstein-Barr virus related posttransplant lymphoproliferative disorder // Transplantation. – 2006. –**81**, N 6. – P. 856–861.
12. Kurokawa M., Ghosh S.K., Ramos J.C., Mian A.M., Toomey N.L., Cabral L., Whitby D., Barber G.N. Azidothymidine inhibits NF-B and induces Epstein-Barr virus gene expression in Burkitt lymphoma // Blood. – 2005. – N 106. – P.235–240.
13. Kutok J.L., Wang E. Spectrum of Epstein-Barr Virus-Associated Diseases // Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. – 2006. – N 1. – P. 375–404. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods. –1983. – N 65. – P. 55–63.
14. Muroso Sh., Raab-Traub N., Pagano J.S. Prevention and inhibition of nasopharyngeal carcinoma growth by antiviral phosphonated nucleoside analogs // Cancer Research. – 2001. – N 61. – P.7875–7877.
15. Tomicic M.T., Bey E., Wutzler P, Thust R., Kaina B. Comparative analysis of DNA breakage, chromosomal aberrations and apoptosis induces by the anti-herpes purine nucleoside analogues aciclovir, ganciclovir and penciclovir // Mutation Research. – 2002. –**71**, N 1-2. – P.1–11.
16. Wakisaka N., Yoshizaka T., Raab-Traub N., Pagano J.S. Ribonucleotide reductase inhibitors enhance cidofovir-induced apoptosis in EBV-positive nasopharyngeal carcinoma xenografts // Int. J. Cancer. 2005. – N 116. – P. 640–645.

Отримано 23.11.2010