

# АКТИВНІСТЬ ІЗАТІЗОНУ ЩОДО АДЕНОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ІН ВІТРО

Болсунова О.І., Пацковський Ю.В., Рибалко С.Л.\*,  
Заїка Л.А., Потопальський А.І.

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна  
Інститут епідеміології і інфекційних хвороб ім. Л.В.Громашевського АМН  
України\*, Київ, Україна*

Метил-ізатін- $\beta$ -тіосемикарбазон, або метисазон – сполука, яка має широку противірусну дію і апробована як препарат для попередження натуральної віспи. Проте він має високу токсичність. 2% розчин 1-метилізатін- $\beta$ -тіосемикарбазону в універсальному розчиннику одержав назву ізатизон. Це препарат нетоксичний, має широкий антивірусний спектр, і з успіхом застосовується у ветеринарії для лікування і профілактики респіраторних вірусних інфекцій і хвороби Марека у птахів.

**Мета дослідження** - вивчення молекулярно-біологічних механізмів антивірусної дії ізатизону

## **Матеріали та методи досліджень**

У роботі використовували аденовірус людини 1 і 2 серотипу. Цитотоксичність препаратів на інфікованих аденовірусом клітинах оцінювали методом люмінесцентної мікроскопії, включаючи флюорохромію фіксованих клітин акридиновим оранжевим, що дозволяє судити про морфологію клітини й одночасно виявляти в ній ДНК і РНК .

Для тестування синтезу вірусного гексону (основного білку оболонки) використовували імуоферментний метод аналізу з застосуванням МКАТ до гексону аденовірусу людини 1 типу, антисыворотку кролика до аденовірусу б типу і кон'юговані з пероксидазою антитіла проти імуноглобулінів кролика. Для клонування гену VAI РНК HindIII-фрагмент (6231-11555 нп по карті Ad2) вирізували і клонували в складі плазмиди pUC19 (pAdH5.3). На наступній стадії AluI-фрагмент (548 пн) виділяли і клонували за SmaI-сайтом

pUC19 (pVAI548). На третій стадії видаленням XbaI-фрагменту одержували плазмиду pVA224, що містить повну копію гена VAI РНК.

### **Результати досліджень**

Отримані дані свідчать про відсутність істотних розбіжностей між ізатізоном і метисазоном *in vitro*.

Ми перевірили антивірусну дію ізатізону на різних лініях клітин: Hela, Vero і HEp-2, і виявилось, що він пригнічує репродукцію вірусу (по числу інфікованих клітин на 50% і рівню синтезу гексону) тільки на клітинах лінії HEp-2. Рекombінантний людський інтерферон  $\alpha$ -2(r-IFN) у концентрації до 2000 одиниць/мл не мав антивірусної дії, проте різко стимулював антивірусну дію метисазону та ізатізону, що проявлялося в різкому зменшенні цитопатичної дії вірусу і зниженні на 2 порядки рівня синтезу білку оболонки. Зниження синтезу вірусного гексону спостерігалось в оброблених ізатізоном Ad1-інфікованих клітинах лінії HEp2. Необхідно відзначити, що антивірусний ефект виявлявся тільки в тому випадку, коли ізатізон, метисазон і інтерферон вносили на ранній стадії вірусної інфекції - до 8 годин після зараження, і зникав при більш пізньому внесенні препарату. Отже, антивірусна активність ізатізону і метисазону потребує з одного боку, присутності в середовищі інтерферону, а з іншого боку - активації ранніх вірусних генів.

Ізатізон впливає на індукцію інтерферону тільки в Ad1-інфікованих клітинах HEp2. Синтез інтерферону був низький до 8 години після інфікування, а потім різко зростає і зменшується вже після 12-14 годин. Цитопатичний ефект з'являється тільки після 96 годин. Метисазон і ізатізон не індукують синтез інтерферону ні *in vitro*, ні *in vivo*, і не мають прямої дії на трансляцію, це вказує на те, що препарат може впливати на транскрипцію ранніх вірусних генів, в результаті модифікуючи експресію інтерферону в клітинах HEp2.

Встановлено, що антивірусна активність ізатізону визначається здатністю аденовірусу індукувати  $\alpha$ -інтерферон в інфікованих клітинах *in vitro*. Внесення екзогенного інтерферону, яке не діє на інфіковані аденовірусом клітини, викликало антивірусний ефект тільки в присутності ізатізону.

Вивчення молекулярного механізму порушення вірусної стійкості до інтерферону показало, що ізатізон блокує активацію транскрипції ранніх аденовірусних генів, затримуючи початок реплікації і синтезу VAI РНК (остання визначає стійкість аденовірусу до дії інтерферону). Резистентність вірусу до інтерферону різко зменшується, що призводить до антивірусного ефекту.

На культурі клітин HEp-2 токсичність ізатізону не відрізняється від зазначеної в попередніх дослідженнях. Не виключено, що клітини використаної лінії Hela генетично не чутливі до препаратів цього типу. Про можливість такого факту свідчать і раніше опубліковані дані.

Проведений цитоморфологічний аналіз фіксованих зразків клітин дозволив виявити, що його вплив пов'язаний із затримкою розвитку вірусної інфекції, припиненням репродукції вірусу на ранніх стадіях процесу.

Встановлено, що ефект метисазону та ізатізону пов'язаний із наявністю інтерферону в середовищі, або з його індукцією вірусом у заражених клітинах. Проте, аденовіруси стійкі до дії інтерферону, оскільки мають, як і багато інших вірусів, специфічну систему захисту. Згадана стійкість вірусу, можливо, обумовлена синтезом великих кількостей так званих VAI РНК. Ця низькомолекулярна РНК утворюється шляхом транскрипції відповідного гена клітинною РНК-полімеразою III на пізній стадії репродукції аденовірусів. Показано, що вона спроможна блокувати протеїнкіназу активність P1/eIF2 залежної протеїнкінази, що активується інтерфероном і малими кількостями dsРНК. Протеїнкіназа фосфорилує чинник ініціації eIF2, блокуючи трансляцію і викликаючи розпад полісом у зараженої вірусом клітині. За допомогою VAI РНК вірус блокує протеїнкіназу, і трансляція

вірусного білку протікає з однаковою швидкістю, як у присутності інтерферону, так і без нього.

Ізатізон у комбінації з інтерфероном блокує синтез гексону аденовірусу, а сам по собі не впливає на трансляцію, отже, ми висловили думку, що він якимось чином пригнічує вірусний захист проти інтерферону. Оскільки вірусна реплікація в присутності ізатізону затримується, а VAI РНК транскрибується переважно після початку реплікації вірусу, то саме тут можлива затримка і синтезу VAI РНК. Дійсно, в інфікованих клітинах, оброблених антивірусними концентраціями ізатізону, синтез VAI РНК починається з запізненням на декілька годин, і в результаті її рівень у досліді в 4-5 разів нижче від контролю. Дані Нозерн-гібридизації підтверджують результати, отримані методом доту-аналізу.

#### **Висновки.**

Антиаденовірусна активність ізатізону може залежати від генетичних особливостей тест-клітинної культури.

Механізм дії ізатізону полягає в затримці експресії ранніх вірусних генів, реплікацій і синтезу VAI РНК, що призводить до різкого ослаблення захисту вірусів від впливу інтерферону. Отже, мішенню для ізатізону є вірусний ген.