

**С.Д. Загородня<sup>1</sup>, Н.В. Нестерова<sup>1</sup>, В.П. Даниленко<sup>2</sup>, Т.А. Бухтіарова<sup>2</sup>,  
Г.В. Баранова<sup>1</sup>, А.В. Головань<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

<sup>2</sup> Інститут фармакології і токсикології АМН України

## **ДІЯ ПОХІДНИХ ІЗОНІКОТИНОВОЇ КИСЛОТИ НА РЕПРОДУКЦІЮ ВІРУСУ ЕПШТЕЙНА-БАРР**

Сучасні підходи до лікування герпетичної інфекції, зокрема, вірусу Епіштейна-Барр (ВЕБ), включають застосування етіотропних препаратів, а також проведення сенсibiliзуючої терапії. Цей вірус відіграє значну роль в етіології назофарингіальної карциноми, аденокарциноми навколочушних залоз і шлунку, лімфому Беркітта і лімфопроліферативних синдромів [1, 2, 3]. Спектр препаратів активних проти ВЕБ залишається досить обмеженим і в медичній практиці застосовується ганцикловір і ацикловір, тому пошук нових сполук активних проти ВЕБ залишається актуальним. Метою даної роботи було дослідження антиВЕБ активності похідних ізонікотинової кислоти в культурах лімфобластоїдних клітин Raji, B95-8, Namalwa. Визначено показники цитотоксичності ( $CC_{50}$ ), які склали 840, 1250 та 3000 мкг/мл та концентрації препаратів, що інгібують репродукцію вірусу ( $IC_{50}$ ) – 0,1, 2,5 та 50 мкг/мл, відповідно, по культурам клітин. Виявлена здатність препарату 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридинію йодиду (ПВ-1) інгібувати репродукцію вірусу Епіштейна-Барр в усіх досліджуваних культурах клітин. Сполуки ПВ-2 та ПВ-10 є менш токсичними відносно вихідного препарату ПВ-1, але їх антивірусна активність проявлялась у концентраціях в 25 та 500 разів вищих, що впливало на зниження їх індексу селективності, який складав 8400 для ПВ-1, 400 та 440 – для ПВ-2 та ПВ-10. Такі дослідження дозволяють передбачити можливі шляхи подальшої модифікації молекули ПВ-1 для створення високоактивних специфічних інгібіторів вірусу Епіштейна-Барр.

*Ключові слова:* вірус Епіштейна-Барр, культури клітин, антивірусна дія.

Вірус Епіштейна-Барр (ВЕБ) відноситься до родини *Herpesviridae*. Клінічною формою первинного інфікування людини ВЕБ є інфекційний мононуклеоз. Цей вірус відіграє значну роль в етіології назофарингіальної карциноми, аденокарциноми навколочушних залоз і шлунку, лімфому Беркітта і лімфопроліферативних синдромів [1, 2, 3]. ВЕБ, поряд з іншими герпесвірусами, уражає центральну і периферійну нервову систему, викликаючи тяжкі менінгоенцефаліти, менінгіти, неврити і арахноенцефаліти [4].

Метою антивірусної терапії є розробка агентів, які вибірково пригнічують реплікацію вірусу в інфікованих клітинах без впливу на метаболічні процеси клітини-хазяїна. Більшість антивірусних сполук здатні до інтерференції з молекулярними процесами в клітині господаря, що заважає підбору потрібних препаратів для лікування вірусних захворювань. Адже, ідеальний противірусний препарат повинен взаємодіяти тільки на рівні вірусних процесів та не впливати на неінфіковані клітини. За способом дії антивірусні препарати можна поділити на 6 категорій: препарати, які впливають на клітинні процеси, що необхідні для реплікації вірусу; препарати, які вибірково зв'язуються або взаємодіють з вірус-кодованими ферментами, інгібуючи їх функцію; препарати, які зв'язуються або вбудовуються в вірусну нуклеїнову кислоту, пригнічуючи її експресію та функціонування; препарати, які запобігають процесингу вірусного попередника поліпептида; препарати, які інтерферують зі збіркою вірусу та пригнічують формування вірусного потомства; препарати, які модифікують вірусні білки на поверхні вірусної оболонки, таким чином попереджуючи інфікування нових клітин [5, 6].

Найбільшою проблемою антигерпетичної терапії є латентна форма інфекції. На даний час не існує препаратів, ліцензованих чи експериментальних, які б ефективно впливали на латентну форму ВЕБ чи інших герпесвірусів. Через епісому, яка є молекулярною основою латентної інфекції, ВЕБ реплікується, використовуючи клітинну ДНК-полімеразу, частіше, ніж вірусну ДНК-полімеразу. ВЕБ-інфекція характеризується трьома фазами: гострою, латентною та активацією. Периферійна кров та органи лімфоїдної тканини є, як правило, місцями спокою для латентно інфікованих ВЕБ лімфоцитів. Однак, якщо організм зазнає імуносупресії,

© С.Д. Загородня, Н.В. Нестеров, В.П. Даниленко, Т.А. Бухтіарова, Г.В. Баранова, А.В. Головань, 2011

латентно інфіковані клітини реактивуються, відновлюють клітинну проліферацію та вірусну реплікацію. Симптоми реактивованої ВЕБ-інфекції відрізняються від симптомів первинного інфікування, так як асоціюються в основному із злякисними пухлинами.

Відомі сполуки – нуклеозидні інгібітори 9-(2-гідроксиетоксиметил) гуанін (ацикловір), 9-(1,3-дегідрокси-2-пропоксиметил)гуанін (ганцикловір), (Е)-5-(2-бромвініл)-2' дезокси-уридин (бривудин), (S)-1-(3-гідрокси-2-фосфоніл-метоксипропіл)цитозин (цидофовір), які застосовуються для лікування хворих з ВЕБ-інфекцією. Серед наведених вище препаратів в Україні зареєстровані та отримали дозвіл на застосування в клінічній практиці лише ацикловір та ганцикловір. Однак недоліком цих препаратів, особливо ацикловіру, є швидкий розвиток резистентних до нього штамів вірусу [7, 8, 9].

Таким чином, завданням даної роботи було дослідити здатність похідних ізонікотинової кислоти інгібувати репродукцію вірусу Епштейна-Барр в культурі клітин Raji та порівняти цю дію в двох інших клітинних системах.

**Матеріали і методи.** *Культура клітин.* Інгібуючу активність препаратів щодо вірусу Епштейна-Барр вивчали в наступних культурах клітин:

Raji – культура клітин В-фенотипу з лімфоми Беркітта (лімфоцити людини, трансформовані вірусом Епштейна-Барр, які мають в своєму геномі 63 копії вірусного геному, і продукують лише окремі ранні антигени, а не цілі вірусні частки).

Namalwa – культура клітин В-фенотипу з лімфоми Беркітта, в якій відсутній геном ВЕБ.

B95-8 – клітинна лінія В-лімфоцитів мавп-мармозеток, що містить повний геном ВЕБ та продукує повноцінні вірусні часточки.

Культури клітин вирощували на ростовому середовищі, яке складалося з 90 % середовища RPMI 1640 (“Sigma”, США), 10 % розчину ембріональної сироватки теляти (“Sigma”, США), пеніциліну (100 мкг/мл), стрептоміцину (100 мкг/мл), L-глутаміну (2 мМ), в термостаті при 37 °С з додаванням 5 % CO<sub>2</sub>. Для контролю життєздатності клітин використовували барвник 0,4 % трипановий синій («Sigma», США).

Вірус Епштейна-Барр виділяли з лімфобластоїдної культури клітин B95-8 (В-лімфоцити мавп-мармозеток), яка продукує цей вірус, за методом Уоллза, Крофорда [10].

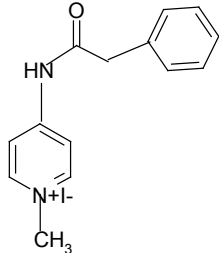
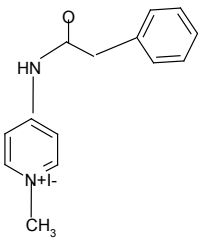
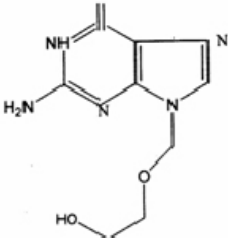
*Досліджувані речовини.* 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридинію йодид з м.в. 354 (ПВ-1), а також його похідний ПВ-2 (м.в. 235). Як референтний препарат використовували Ацикловір (Acycloguanosine (lot 117F0756), м.в. 225,2 (Sigma, США)). Препарат ПВ-2 є сумішшю ПВ-1 та ПВ-2 у рівних співвідношеннях 1:1. Структурні формули досліджуваних речовин наведено в табл. 1.

Досліджувані речовини розчиняли в середовищі RPMI-1640, фільтрували через стерилізуючі фільтри фірми “Sarstedt”, Німеччина, з розміром пор 0,22 мкм. Робочі розведення препаратів готували на ростовому середовищі (95 % середовища RPMI-1640 з 5 % сироватки ембріона теляти).

*МТТ-тест.* Цитотоксичну концентрацію визначали в системі лімфобластоїдних клітин Raji з використанням колориметричного МТТ методу. Даний метод широко застосовується для визначення СС<sub>50</sub> потенційних лікарських засобів при дослідженні цитопатичної дії вірусів *in vitro*. МТТ (3,4,5-диметилтріазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум бромід розчиняли в стерильному фосфатно-сольовому буфері (рН 7,4) при кімнатній температурі до концентрації 5 мг/мл та фільтрували (фільтри 0,22 мкм “Sarstedt”, Німеччина). Особливу увагу приділяли стандартизації умов експериментів.

**Таблиця 1**

**Структура досліджуваних препаратів похідних ізонікотинової кислоти  
та референс-препарату**

N-метил-4-бензил карбомідо-піридиній йодид (ПВ-1)	ПВ-2	ПВ-10	Ацикловір
		<p>Суміш речовин (1:1) ПВ-1 та ПВ-2</p>	

Клітини Raji розсівали в 96 лункові культуральні планшети по 100 мкл в лунку, додавали по 25 мкл МТТ (кінцева концентрація 5мкг/мл) та інкубували 3 год. при 37 °С в атмосфері 5 % CO<sub>2</sub>. Після інкубації клітини відмивали ФСБ та ресуспендували в 96 % етанолі для розчинення формазана. Результати аналізували спектрофотометрично на рідері «Dynatech» (Швеція) при довжині хвилі 540 нм.

*Полімеразна ланцюгова реакція.* Рівень впливу препаратів на репродукцію ВЕБ визначали за допомогою ПЛР-тест-систем «АмпліСенс-100-R». В якості ділянки геному вірусу Епштейна-Барр було вибрано фрагмент, що кодує білок VCA вірусу розміром 290 нуклеотидних послідовностей. Контролем слугували клітини, які після інфікування вірусом інкубували в ростовому середовищі без додавання речовин, що досліджувались. Визначали відсоток інгібування рівня накопичення вірусної ДНК в оброблених досліджуваними речовинами зразках щодо контрольного варіанта, значення якого приймали за 100 %.

*Статистичні методи*

За одержаними результатами аналізу проводили статистичні обчислення за стандартними підходами [11].

Для визначення показника CC<sub>50</sub> та IC<sub>50</sub> застосували метод регресійного аналізу (за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel), який дозволяє охарактеризувати зв'язок між двома ознаками, а саме прийнявши за основу одну з ознак (в нашому випадку концентрація препарату) дати оцінку варіювання зв'язаного з ним іншого показника (оптична густина дослідного зразка).

**Результати та їх обговорення.** Визначення цитотоксичної та антивірусної дії похідних ізонікотинової кислоти вивчали в культурі клітин Raji. Дослідження цитотоксичності проводили в діапазоні концентрацій від 10 до 3000 мкг/мл з використанням МТТ-методу. Кожну концентрацію препарату вносили в три паралельні лунки з наступним вирахуванням середнього значення. Результати проведеної роботи показали (табл. 2), що рівень проліферації клітинної популяції при додаванні препарату ПВ-1 до концентрації 500 мкг/мл знаходиться практично на рівні контрольного значення. Далі йде поступове зменшення рівня життєздатності культури і при концентрації 800 мкг/мл даний показник зменшується на 48 % порівняно з контролем. З метою визначення дози препарату, яка зумовлює 50 % зниження проліферативної активності лімфобластоїдної культури клітин, був використаний регресійний аналіз. Визначено коефіцієнт кореляції, який становить – 0,97, що свідчить про наявність тісного зв'язку між концентрацією препарату і рівнем його впливу на проліферацію клітин, тобто підтверджується дозозалежна дія ПВ-1. Визначений показник CC<sub>50</sub>, котрий склав 840 мкг/мл, свідчить про низьку токсичність досліджуваного препарату в системі лімфобластоїдної клітинної лінії Raji. Показник середнього відхилення був на рівні 0,049. Стандартне відхилення по трьом паралельним значенням становило 0,003–0,05, що свідчить про достовірність отриманих результатів. Також визначено показник CC<sub>100</sub> (концентрація препарату, яка повністю інгібує життєздатність клітин), який склав 1534 мкг/мл. При проведенні досліджень цитотоксичності препаратів ПВ-2 та ПВ-10 показано, що досліджувані зразки є менш токсичними порівняно з ПВ-1.

Цитотоксична дія препаратів в культурі клітин Raji. Метод МТТ

Концентрація ПВ-1 (мкг/мл)	Середнє значення ОГ при довжині хвилі 540 нм ПВ-1	Концентрація ПВ-2 і ПВ-10 (мкг/мл)	Середнє значення ОГ при довжині хвилі 540 нм	
			ПВ-2	ПВ-10
10	0,246	50	0,262	0,251
20	0,257	100	0,217	0,245
40	0,247	250	0,217	0,221
80	0,239	500	0,217	0,219
100	0,218	750	0,204	0,207
300	0,231	1000	0,204	0,206
500	0,169	1250	0,203	0,202
800	0,115	1500	0,194	0,186
1000	0,098	2000	0,088	0,112
		3000	0,058	0,054
Контроль клітин не оброблених препаратами	0,231			
Результати статистичної обробки результатів та визначені показники цитотоксичності				
Коефіцієнт кореляції	-0,97799		-0,92291	-0,96536
Квадратичне відхилення	0,034645		0,035646	0,033832
Стандартне відхилення	0,021856		0,020865	0,040605
CC <sub>50</sub>	841,7489		2102,344	2238,085
CC <sub>100</sub>	1534,055		3598,409	3844,374

Визначено, що показник  $CC_{50}$  становить 2200 мкг/мл для ПВ-2 та 2400 мкг/мл для ПВ-10. Це свідчить про те, що ці препарати є в 2,5 рази менш токсичними порівняно з ПВ-1. Показник середнього відхилення не перевищував 0,05.

Даним методом також був проаналізований референс-препарат Ацикловір. Показано, що в концентрації 444–222 мкМ йде зниження проліферативної активності клітин на 4 %. Потім в діапазоні 3300–444 мкМ даний показник залишається незмінним. В концентрації 4400 мкМ він знижується ще на 4 %, що порівняно з контролем складає 17 %. Застосувавши рівняння лінійної регресії, обчислили показник  $CC_{50}$ , який склав 22000 мкМ.

Таким чином, визначені показники цитотоксичності ПВ-1, двох його похідних та референс-препарату ацикловір МТТ-методом, який включає колориметричне виявлення живих клітин. З використанням лінійного регресійного аналізу обчислено показники  $CC_{50}$ , що склали: для ПВ-1 – 840 мкг/мл, речовини ПВ-2 – 2200 мкг/мл, речовини ПВ-10 – 2400 мкг/мл, для Ацикловіру – 5 000 мкг/мл.

Для визначення антивірусної дії кожного досліджуваного зразка було визначено інгібуючу концентрацію ( $IC_{50}$ ), тобто концентрацію, яка знижує рівень репродукції вірусу на 50 %.

Препарат ПВ-1 досліджували в концентраціях 0,1, 0,5, 1, 5, 10 мкг/мл. Кожну концентрацію досліджували в трьох повторах. Препарат залишався в середовищі протягом всього циклу дослідження. Для визначення рівня репродукції ВЕБ в досліджуваних клітинах застосовували метод полімеразної ланцюгової реакції. Аналіз антивірусної дії препаратів здійснювали через 48 годин, оскільки дана часова точка є оптимальною як з точки зору динаміки росту клітинної лінії Raji, так і репродуктивного циклу ВЕБ. Результати наведено на рис. 1. Показано, що доза препарату, яка інгібує репродукцію ВЕБ на 50 % ( $IC_{50}$ ), для ПВ-1 становить 1 мкг/мл.

Дані стосовно визначення антивірусної активності препаратів ПВ-2 та ПВ-10 подано в табл. 3. Встановлено, що  $IC_{50}$  даних препаратів становить 5 мкг/мл, для референс-препарату Ацикловір – 222 мкг/мл.

Таблиця 3

**Рівень інгібування репродукції вірусу Епштейна-Барр під впливом різних концентрацій досліджуваних препаратів. Метод ПЛР**

Концентрація мкг/мл	Рівень інгібування репродукції вірусу Епштейна-Барр (%)		
	ПВ-2	ПВ-10	Ацикловір
0,1	0	20	0
0,5	10	47	0
1	54	47	0
5	60	47	0
10	65	60	10

Отже, визначено, що 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридинію йодид у діапазоні досліджуваних концентрацій є малотоксичним в культурі клітин Raji. Зниження проліферативної активності на 50 % спостерігається при 840 мкг/мл речовини, що відповідає значенню показника  $CC_{50}$ . Для Ацикловіру  $CC_{50}$  становив 5000 мкг/мл. При вивченні антивірусної активності досліджуваних препаратів в культурі клітин Raji визначена їх ефективна концентрація  $EC_{50}$ , тобто концентрація, яка знижує рівень репродукції вірусу Епштейна-Барр на 50 %. Показано, що  $EC_{50}$  для ПВ-1 становить 1 мкг/мл, для ПВ-2 та ПВ-10 – 5 мкг/мл, для референс-препарату Ацикловір – 222 мкг/мл.

Індекс селективності (SI) визначали за співвідношенням  $CC_{50}$  до  $EC_{50}$ . SI 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридинію йодиду становив 8400, ПВ-2 – 400, ПВ-10 – 440, а референс-препарату Ацикловір – 22,6.

Антивірусні препарати, які мають SI вище 16 при дослідженні інгібуючого впливу на репродукцію вірусу в системах *in vitro* вважаються активними та можуть бути рекомендовані для подальшого дослідження на тваринах [12]. Показано, що ПВ-1 має вищу антивірусну активність порівняно з референс-препаратом Ацикловір і може бути перспективним препаратом для лікування хвороб, спричинених ВЕБ.

Зважаючи на різний розвиток вірусної інфекції при різних захворюваннях залежно від локалізації в організмі, ми вважали за доцільне провести дослідження, направлені на вивчення особливості взаємодії даного препарату та вірусу в різних культурах клітин.

Для проведення досліджень була використана клітинна лінія Namalwa, що не містить гену вірусу Епштейна-Барр, як лінія, де відбувається реплікація вірусу за літичною схемою та культура клітин B95-8 – клітинна лінія В-лімфоцитів мавп-мармозеток, що містить повний геном ВЕБ та продукує повноцінні вірусні часточки.

Відповідно до наведених вище методичних підходів була проаналізована цитотоксична та антивірусна дія 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридинію йодиду в клітинах B95-8. Визначено, що в діапазоні концентрацій 50–500 мкг/мл даний препарат незначно впливає на життєздатність клітин. Концентрація, яка на 50 % знижує життєздатність клітинної популяції, становить близько 1250 мкг/мл. В мінімальній досліджуваній концентрації 0,5 мкг/мл спостерігається до 20 % інгібування репродукції вірусу. Таким чином, віруспродукуюча культура клітин B95-8 є малочутливою до цитотоксичної дії препарату ПВ-1, при цьому він є активним інгібітором репродукції ВЕБ. Індекс селективності в даній системі для ПВ-1 склав 500. В результаті визначення його антиВЕБ активності в культурі клітин Namalwa методом ПЛР встановлено, що концентрація препарату 50 мкг/мл знижує рівень накопичення ДНК ВЕБ на 50 %. Виходячи з його цитотоксичної концентрації в даній культурі клітин, яка становить 3000 мкг/мл, індекс селективності становить 60. Отже, в даній культурі клітин антиВЕБ активність є помірною.

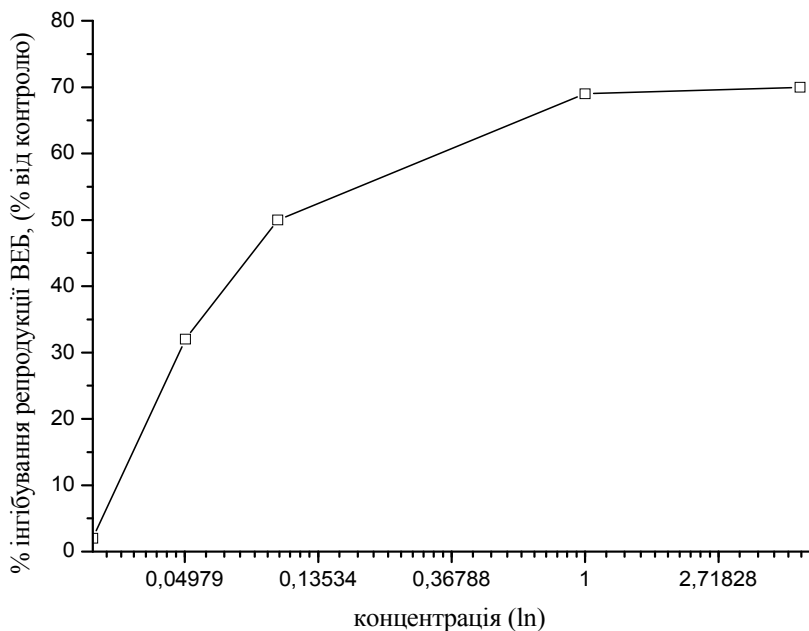
В табл. 4 наведено визначені показники  $CC_{50}$ ,  $EC_{50}$  та SI для ПВ-1 на культурі клітин B95-8 і Namalwa.

Таблиця 4

**Порівняння показників  $CC_{50}$  та  $EC_{50}$  для ПВ-1 на культурах клітин B95-8 і Namalwa.**

Досліджувані показники	Культура клітин	
	B95-8	Namalwa
$CC_{50}$	1250 мкг/мл	3000 мкг/мл
$EC_{50}$	2,5 мкг/мл	50 мкг/мл
IS	500	60

Отже, виходячи з отриманих результатів, показано, що препарат N-метил-4-бензил карбо-мідо-піридиній йодид здатен інгібувати репродукцію вірусу Епштейна-Барр в культурах клітин Raji, B95-8 та Namalwa. Спектр активності 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридинію йодиду, який в лікарській формі має назву «Амізон» («Фармак», м. Київ) є досить широким, зокрема, показана його дія проти цитомегаловірусу [13], вірусу вітряної віспи [14], а також встановлена його ефективність як протизапального [15] та інтерферогенного препарату. Відомо, що він стимулює функціональну активність Т-лімфоцитів, макрофагів, природних клітин-кілерів, збільшує кількість Т-хелперів, підвищує фагоцитарну активність моноцитів периферійної крові та альвеолярних макрофагів [16]. Усі ці фактори прискорюють процеси інактивації вірусів, елімінацію (виведення) їх з організму хворих, попереджують тяжкий перебіг хвороби, розвиток вторинних ускладнень. Визначено, що препарат має найвищу активність в культурі клітин Raji (SI 8400) і найнижчу в клітинах Namalwa (SI 60), хоча, виходячи з одержаного значення показника індексу селективності, препарат є досить перспективним щодо антиВЕБ активності. Простежується закономірність в тому, що він більш ефективно, тобто в менших дозах, впливає на репродукцію вірусу в клітинах B95-8, які є моделлю латентної ВЕБ-інфекції і продукують віріони, та Raji, які містять повний геном вірусу, але продукують лише білки латентного циклу. На протипагу цьому, в клітинах Namalwa за умов експериментального зараження ВЕБом препарат діє в більш високих дозах. Такі дані свідчать про потенцію ПВ-1 діяти саме на інтегровану форму інфекції в клітині, спричинену вірусом Епштейна-Барр, яка часто недоступна навіть для специфічних препаратів, що діють на вірус лише при гострій формі інфекції. Препарат ПВ-2, який не має йодної частини молекули і є менш токсичним на культурі клітин Raji, але його 50 % ефективна доза, хоча і нижче його цитоксичної 50 % концентрації, але в 50 разів вища за аналогічний показник для ПВ-1. Такі дослідження дозволяють передбачити можливі шляхи подальшої модифікації молекули ПВ-1 для створення високоактивних специфічних інгібіторів вірусу Епштейна-Барр.



**Рис. 1. Рівень інгібування репродукції вірусу Епштейна-Барр під впливом різних концентрацій ПВ-1.**

Вісь абсцисс – концентрація (ln)

Вісь ординат – % інгібування репродукції ВЕБ (% від контролю)

*С.Д. Загородняя<sup>1</sup>, Н.В. Нестерова<sup>1</sup>, В.Ф. Даниленко<sup>2</sup>, Т.А. Бухтиярова<sup>2</sup>, Г.В. Баранова<sup>1</sup>,  
А.В. Головань*

*<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев*

*<sup>2</sup>Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины*

## **ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР**

Резюме

Современные подходы к лечению герпетической инфекции, в частности вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), включают применение этиотропных препаратов, а также проведение сенсибилизирующей терапии. Этот вирус играет важную роль в этиологии назофарингиальной карциномы, аденокарциномы околоушных желез, карциномы желудка, лимфомы Беркитта и лимфопролиферативных синдромов [1, 2, 3]. Спектр препаратов активных против ВЭБ остается весьма ограниченным и в медицинской практике применяются ганцикловир и ацикловир, поэтому поиск новых соединений активных против ВЭБ остается актуальным. Целью данной работы было исследование антиВЭБ активности производных изоникотиновой кислоты в культурах лимфобластоидных клеток Raji, B95-8, Namalwa. Определены показатели цитотоксичности (CC<sub>50</sub>), которые составила 840, 1250 и 3000 мкг/мл и концентрации препаратов, ингибирующие репродукцию вируса (IC<sub>50</sub>) – 0,1, 2,5 и 50 мкг/мл, соответственно, по культурам клеток. Выявлена способность препарата 4-(N-бензил) аминокарбонил-1-метилпиридиния йодид (ПВ-1) ингибировать репродукцию вируса Эпштейна-Барр во всех исследуемых культурах клеток. Соединения ПВ-2 и ПВ-10 являются менее токсичными относительно исходного препарата ПВ-1, но их противовирусная активность проявлялась в концентрациях в 25 и 500 раз выше, что, соответственно, влияло на снижение их индекса селективности, составивших 8400 для ПВ-1, 400 и 440 – для ПВ-2 и ПВ-10. Такие исследования позволяют предположить возможные пути дальнейшей модификации молекулы ПВ-1 для создания высокоактивных специфических ингибиторов вируса Эпштейна-Барр.

Ключевые слова: вирус Эпштейна-Барр, культуры клеток, противовирусное действие.

*S.D.Zagorodnya<sup>1</sup>, N.V.Nesterova<sup>1</sup>, V.P.Danilenko<sup>2</sup>, T.A.Bukhtiarova<sup>2</sup>, G.V.Baranova<sup>1</sup>,  
A.V.Golovan<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Institute of Microbiology and Virology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

*<sup>2</sup>Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv*

## **ACTION OF ISONICOTINIC ACID DERIVATES ON REPRODUCTION OF EPSTEIN-BARR VIRUS**

S u m m a r y

Current approaches to the treatment of herpes infection, particularly Epstein-Barr virus (EBV), include the use of etiotropic medicines, as well as sensitizing therapy. This virus plays an important role in the etiology of nasopharyngeal carcinoma, adenocarcinoma of the parotid glands, gastric carcinoma, Burkitt's lymphoma and lymphoproliferative syndromes [1, 2, 3]. The spectrum of drugs active against EBV remains very limited, and gancyclovir and acyclovir are used in medical practice, so the search of new compounds active against EBV remains urgent. The purpose of this work was to study antiEBV activity of isonicotinic acid derivatives in the cultures of lymphoblastoid Raji cells, B95-8, Namalwa. The indices of cytotoxicity (CC<sub>50</sub>) which amounted to 840, 1250 and 3000 µg/ml and the concentration of drugs, which inhibit the virus (IC<sub>50</sub>) reproduction is 0.1, 2.5 and 50 µg/ml, respectively, in cell cultures were identified. It was detected, the drug 4-(n-benzyl)aminocarbonyl-1-methylpyridinium iodide (PV-1) had an ability to inhibit reproduction of the Epstein-Barr virus in all studied cells cultures. The compounds PV-2 and PV-10 were less toxic in respect of the initial preparation PV-1, but their antiviral activity was manifested at 25 and 500 times higher concentrations. It, respectively, influenced the decrease of their selectivity index, which was 8400 for PV-1, 400 and 440 – for PV-2 and PV-10. These studies suggest possible ways of further modification of the PV-1 molecule to create highly specific inhibitors of Epstein-Barr virus.

The paper is presented in Ukrainian.

**Key words:** Epstein-Barr virus, cultures of cells, antiviral action.

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

1. *Jung-Chung Lin*. Antiviral therapy for Epstein-Barr virus-associated diseases // *Tzu Chi Med. J.* – 2005. – 17, N 1. – P. 379–385.
2. *Kutok J.L., Wang F.* Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* – 2006. – 1. – P. 375–404.
3. *Hiroshi Uozaki and Masashi Fukayama*. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma – viral carcinogenesis through epigenetic mechanisms. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2008. – 1, N 3. – P. 198–216.
4. *Кононенко В.В.* Епштейна-Барра інфекція з ураженням нервової системи: клініка, діагностика, класифікація та лікування // *Український нейрохірургічний журнал.* – 2003. - № 1. – С. 105–110.
5. *Thompson M.P, Kurzrock R.* Epstein-Barr virus and cancer. // *Clinical Cancer Research.* – 2004. – 10, N 3. – P. 803–821.
6. Апоптоз і рак: від теорії до практики // *Фільченков О.О., Стойка Р.С.* Тернопіль: Укрмедкнига, 2006. – 15–16с.
7. *Pagano J.S., Gershburg E.* Epstein-Barr virus infections: prospects for treatment // *J. Antimicrobial Chemotherapy.* – 2005. – 56, N 2. – P. 277–281.
8. *Practical guidelines in antiviral therapy* / Ed. by C.A.B.Boucher, G.J.Galasso. – Elsevier, 2002. – 344 p.
9. *De Clercq E.* Antivirals and antiviral strategies // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2004. – 2, N 9. – P. 704–720.
10. *Уоллз Э., Крофорд Д.* Культивирование клеток В95-8 // *Лимфоциты. Методы* – М: Мир, 1990. – С. 230–249.
11. *Лопач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – 2001. – 320 с.
12. *Щербинська А.М., Дяченко Н.С., Рибалко С.Л.* та ін. Вивчення антивірусної дії потенційних лікарських засобів / Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації). – К.: Авіцена, 2001. – С. 371–390.
13. Декларційний патент на корисну модель № 10889. Застосування 4-(N-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридиній йодиду як профілактичного інгібітора цитомегаловірусної інфекції людини. 15.12.2005. Бюл. № 12.
14. *Лоскутова І.В.* Вплив антралю та амізону на інтерферогенез у хворих на тяжкі та ускладнені форми вітряної віспи /Український медичний альманах. – 2006. – 9, № 1. – С. 12–14
15. Патент України №6752. 4-(N-бензил)аміно карбоніл-1-метилпіридиній йодид – знеболуючий засіб з інтерферогенними, протизапальними та жарознижжувачими властивостями. 29.12.94. Бюл. № 8-1.
16. *Бухтіарова Т.А.* Експериментальне дослідження впливу нового неопіоїдного анальгетика амізон на периферичну кров та кровотворення // *Ліки.* – 1997. – № 6 – С. 69–73.

Отримано 20.06.2010