

Климова Р.Р.¹, Момотюк Е.Д.^{1,2}, Демидова Н.А.², Чернорыж Я.Ю.¹, Коваль В.С.^{3,5}, Иванов А.А.⁴, Жузе А.Л.³, Куц А.А.¹

ДИМЕРНЫЕ БИСБЕНЗИМИДАЗОЛЫ ПОДАВЛЯЮТ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ ВИРУСОМ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА И ЦИТОМЕГАЛОВИРУСОМ ЧЕЛОВЕКА, В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

¹ Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научный центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;

² ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина» Министерства сельского хозяйства России, 109473, г. Москва;

³ ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, 119991, г. Москва;

⁴ ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, подразделение НИИ канцерогенеза, 115478, г. Москва;

⁵ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, 117997, г. Москва

Изучена противовирусная активность новой серии АТ-специфичных флуоресцентных симметричных димерных бисбензимидазолов DBA(n) в модельных клеточных системах инфекций, вызванных вирусом простого герпеса 1-го типа (ВПГ1) и цитомегаловирусом человека (ЦМВ). В молекулах DBA(n) бисбензимидазольные фрагменты связаны олигометиленовым линкером с разным числом метиленовых групп в линкере ($n = 1, 3, 5, 7, 9, 11$). В отличие от синтезированной ранее серии димерных бисбензимидазолов DB(n) у серии DBA(n) концевые фрагменты молекул содержат вместо N-метилпиперазиновых групп N-диметиламинопропилкарбоксамидные группы. Соединения DBA(n) продемонстрировали существенно лучшую растворимость в воде, способность проникать через клеточную и ядерную мембрану и окрашивать ДНК в живых клетках. Данные, полученные при анализе противовирусной активности, показали, что соединения DBA(1) и DBA(7) обладают терапевтическими свойствами в отношении инфекции, вызванной ВПГ1 (ВПГ-инфекции) *in vitro*, причем DBA(7) полностью подавляет вирусную инфекцию. Соединение DBA(11) проявило лечебные свойства как в отношении ВПГ-инфекции, так и ЦМВ-инфекции *in vitro*. Кроме того, DBA(7) и DBA(1) проявили микробицидную активность. Таким образом, соединение DBA(11), проявляющее активность против двух широко распространенных вирусных инфекций, заслуживает дальнейших исследований. Высокая противовирусная активность DBA(7) во всех схемах воздействия указывает на перспективность этого соединения как основы для разработки новых препаратов против герпесвирусных инфекций.

Ключевые слова: димерные бисбензимидазолы, содержащие N-диметиламинопропилкарбоксамидные группы; вирус простого герпеса; цитомегаловирус человека; противовирусная активность; герпесвирусная инфекция *in vitro*.

Для цитирования: Климова Р.Р., Момотюк Е.Д., Демидова Н.А., Чернорыж Я.Ю., Коваль В.С., Иванов А.А., Жузе А.Л., Куц А.А. Димерные бисбензимидазолы подавляют инфекции, вызванные вирусом простого герпеса и цитомегаловирусом человека, в клеточных культурах. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(4): 162-168.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-162-168>

Klimova R.R.¹, Momotyuk E.D.^{1,2}, Demidova N.A.², Chernoryzh Ya.Yu.¹, Koval V.S.^{3,5}, Ivanov A.A.⁴, Zhuze A.L.³, Kushch A.A.¹

DIMERIC BISBENZIMIDAZOLES SUPPRESS THE HERPES SIMPLEX VIRUS AND HUMAN CYTOMEGALOVIRUS INFECTIONS IN CELL CULTURES

¹ D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;

² Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, 109473, Russian Federation;

³ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, 119991, Russian Federation;

⁴ Blokhin Russian Cancer Research Center, Research Institute of Carcinogenesis, Moscow, 115478, Russian Federation;

⁵ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, 117997, Russian Federation

Antiviral activity of new AT-specific fluorescent symmetric dimeric bisbenzimidazoles of DBA(n) series was assessed in the cell models of infections caused by type 1 herpes simplex virus (HSV1) and human cytomegalovirus (CMV). In DBA(n) molecules bisbenzimidazole fragments are bound to an oligomethylene linker with varied number of methylene groups in the linker ($n = 1, 3, 5, 7, 9, 11$). In contrast to DB(n) dimeric bisbenzimidazoles, in DBA(n) series terminal fragments of macromolecules contain N-dimethylaminopropylcarboxamide groups instead of N-methylpiperazine groups. DBA(n) compounds better dissolve in water, pass across plasma and nuclear membrane, and stain DNA in living cells. DBA(1) and DBA(7) produced therapeutic effects in HSV1 infection; DBA(7) completely suppressed the infection. DBA(11) displayed *in vitro* therapeutic activity in HSV1 and CMV infections. In addition, DBA(7) and DBA(1) showed microbicidal activity. Thus, DBA(11), which is active

Для корреспонденции: Климова Регина Рафаиловна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: regi.k@mail.ru

against two viruses causing severe diseases with serious health consequences for immunodeficient individuals, should be further investigated. High antiviral activity of DBA(7) in all test models indicates that this compound is a promising active agent for innovative antiviral drugs.

Key words: *dimeric bisbenzimidazoles containing N-dimethylaminopropylcarboxamide groups; herpes simplex virus; human cytomegalovirus; antiviral activity; herpes virus infection in vitro.*

For citation: Klimova R.R., Momotyuk E.D., Demidova N.A., Chernoryzh Ya.Yu., Koval V.S., Ivanov A.A., Zhuze A.L., Kushch A.A. Dimeric bisbenzimidazoles suppress the herpes simplex virus and human cytomegalovirus infections in cell cultures. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(4): 162-168. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-162-168>

For correspondence: Regina R. Klimova, PhD, leading researcher, D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: regi.k@mail.ru

Information about authors:

Klimova R.R., <http://orcid.org/0000-0002-4147-8444>

Momotyuk E.D., <http://orcid.org/0000-0002-6217-5311>

Demidova N.A., <http://orcid.org/0000-0003-1961-9789>

Chernoryzh Ya.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-9848-8515>

Koval V.S., <http://orcid.org/0000-0002-1181-104X>

Ivanov A.A., <http://orcid.org/0000-0002-6007-8286>

Zhuze A.L., <http://orcid.org/0000-0001-6230-8711>

Kushch A.A., <http://orcid.org/0000-0002-3396-5533>

Acknowledgments. This work was partially supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant No. 14-04-00388) and RAS Presidium Program for Molecular and Cell Biology.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 15 February 2017

Accepted 28 February 2017

Введение

Герпесвирусы ВПГ 1-го и 2-го типа и ЦМВ чрезвычайно широко распространены в человеческой популяции и могут поражать различные органы и ткани [1]. Герпесвирусные инфекции (ГВИ) представляют серьезную медико-социальную проблему, отрицательно воздействуя на течение беременности и являясь причиной перинатальной патологии [2]. Кроме того, они могут вызывать развитие вторичных иммунодефицитов, которые клинически проявляются хроническими рецидивирующими инфекционно-воспалительными процессами в различных органах. У лиц со сниженным иммунитетом ВПГ- и ЦМВ-инфекции часто приводят к тяжелым осложнениям, нередко со смертельным исходом. В терапии ГВИ применяется ряд патентованных препаратов — ацикловир и его производные. Основными недостатками этих препаратов являются их высокая токсичность, ограниченная биодоступность и при длительном использовании развитие лекарственной устойчивости. В связи с этим активно проводится разработка инновационных противовирусных препаратов с различной структурой и разными механизмами действия, позволяющими избежать побочных токсических эффектов при сохранении высокой противовирусной эффективности. Одним из актуальных подходов в этом направлении является создание низкомолекулярных соединений, которые образуют комплексы с АТ-парами нуклеотидов в двухцепочечной ДНК (дцДНК) и могут быть использованы в качестве ингибиторов ДНК-зависимых ферментов для изучения регуляции транскрипции генов. Наиболее перспективными в этом плане являются низкомолекулярные соединения, взаимодействующие нековалентно с азотистыми основаниями дцДНК по узкой бороздке. Узкобороздочные лиганды свободны от недостатков, присущих традиционным биологически активным препаратам на основе алкилирующих агентов и интеркаляторов. Они не повреждают ДНК, не вызывают значительного искажения ее пространственной структуры и свободны от побочного мутагенного эффекта [3, 4]. Создание соединений,

сайтспецифично узнающих нуклеотидные последовательности в дцДНК, открывает новые возможности для исследований в разных областях биологии и медицины. Такие мишень-направленные (target directed) соединения могут представлять особый интерес для фармакологии, однако их активность в отношении вирусных инфекций не изучена.

Цель настоящей работы состояла в оценке противовирусной активности новых димерных бисбензимидазолов **DBA(n)** в отношении двух ГВИ — ВПГ- и ЦМВ-инфекции в клеточных системах *in vitro*.

Материал и методы

Культуры клеток. В работе использовали перевиваемую линию клеток Vero, а также культуру фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ). Клетки Vero культивировали в среде Игла MEM, клетки ФЭЧ — в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, «ПанЭко», Россия), 2 мМ L-глутамина («ПанЭко», Россия), 50 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия).

Вирусы. Использовали референс-штаммы F ВПГ-1 и AD169 ЦМВ, полученные из коллекции вирусов при ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Вирусы размножали и определяли инфекционную активность на культуре клеток Vero (ВПГ-1) и ФЭЧ (ЦМВ). Инфекционный титр вирусов определяли в культуре клеток модифицированным методом бляшек. Для титрования готовили образцы вируса и вносили в 96-луночные панели с монослоем клеток. Панели с материалом инкубировали при 37 °С в течение 7 дней в присутствии 5% CO₂. Очаги инфицированных клеток (бляшки) выявляли и подсчитывали с использованием инвертированного микроскопа PrimoVert («Zeiss», Германия). Титр вируса определяли по формуле: $A = ab/v$, где A — число бляшкообразующих единиц на 1 клетку (БОЕ/кл); a — среднее число бляшек на одну лунку; b — разведение вируса; v — объем вносимого вирусосодержащего материала.

Вещества. Изучены 6 новых АТ-специфичных симметричных димерных бисбензимидазолов **DBA(n)**, у которых бисбензимидазольные фрагменты молекулы связаны олигометиленовым линкером с разным числом метиленовых групп в линкере ($n = 1, 3, 5, 7, 9, 11$), а также синтезированные ранее 3 димерных бисбензимидазолов **DB(n)** при $n = 1, 7, 11$, структурная формула которых представлена на рис. 1. Растворы соединений, прежде чем использовать, фильтровали через стерильные нейлоновые фильтры с диаметром пор 0,22 мкм («SPL», Корея). В качестве положительного контроля использовали вирусспецифический лицензированный препарат ацикловир, АЦВ (Зовиракс®, «ГлаксосмитКляйн Вэллком», Великобритания).

Изучение проникновения и внутриклеточной локализации соединений. Клетки Vero высаживали в 24-луночные планшеты в концентрации $2 \cdot 10^5$ кл/мл. После достижения субконфлюентного монослоя вносили соединения в концентрации 50 мкг/мл. Через 24, 48 и 72 ч клетки промывали, фиксировали охлажденным метанолом в течение 20 мин при -20°C и анализировали методом люминесцентной микроскопии с использованием инвертированного люминесцентного микроскопа AxioVert 1 («Zeiss», Германия).

Определение цитотоксичности. Цитотоксичность **DBA(n)** определяли по влиянию на жизнеспособность клеток, которую оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего через 24 ч (острая цитотоксичность) и 72 ч (хроническая цитотоксичность). Максимально переносимую дозу (МПД) определяли через 7 сут. Для определения 50% цитотоксической дозы (ЦД_{50}) вычисляли процентное отношение количества жизнеспособных (не окрашенных) клеток к общему количеству клеток в популяции. Значение ЦД_{50} рассчитывали графически методом линейной регрессии с использованием пакета документов Microsoft Excel.

Определение противовирусной активности. Для определения противовирусной активности **DBA(n)** использовали 4 схемы воздействия: микробицидную, профилактическую, лечебную и вирулицидную. Во всех опытах использовали ВПГ-1 с инфекционной множественностью (ИМ) 0,01 БОЕ/кл и ЦМВ с ИМ 0,001 БОЕ/кл.

Профилактическая схема. На клеточный монослой вносили культуральную среду с добавлением 2% ЭТС (среда поддержки), содержащую исследуемые соединения в различных концентрациях, и инкубировали в течение 48 ч при 37°C в присутствии 5% CO_2 . Затем соединения отбирали, клетки промывали средой без сыворотки и заражали клетки Vero ВПГ-1, клетки ФЭЧ — ЦМВ в течение 1 ч при 37°C в присутствии 5% CO_2 . Затем клетки дважды промывали средой и вносили среду поддержки.

Микробицидная схема, моделирующая экстренную профилактику. На клеточный монослой вносили среду без сыворотки, содержащую исследуемые соединения в различных концентрациях, инкубировали в течение 1 ч в условиях, описанных выше. Затем в культуру, не отбирая вещества, вносили ВПГ-1 или ЦМВ и инкубировали

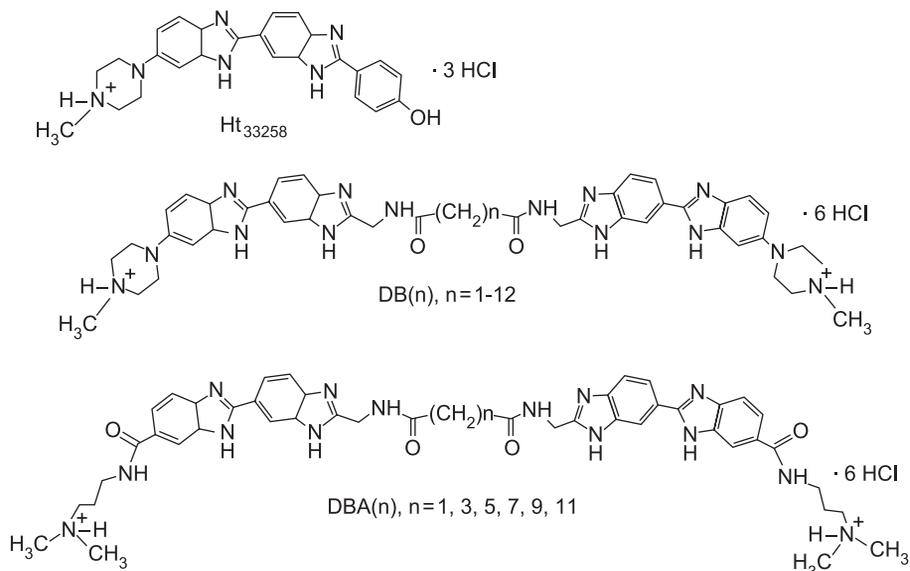


Рис. 1. Структурные формулы Хехста 33258 (**Ht**), **DB(n)** и **DBA(n)**.

1 ч при 37°C в присутствии 5% CO_2 . Монослой клеток промывали и вносили среду поддержки.

Лечебная схема. Монослой клеток заражали ВПГ-1 или ЦМВ и инкубировали в течение 1 ч в условиях, описанных выше. Затем после адсорбции вирусов клетки дважды промывали и вносили исследуемые соединения в различных концентрациях.

Вирулицидная схема. Вирусы инкубировали совместно с исследуемыми соединениями в различных концентрациях в течение 1 ч при 37°C . Затем инкубационную смесь (вирус + соединение) наносили на монослой клеток и выдерживали в течение 1 ч при 37°C в условиях, описанных выше. Монослой клеток промывали и вносили среду поддержки.

В качестве отрицательного контроля использовали зараженные клетки, не обработанные исследуемыми веществами. Для анализа противовирусной активности изученных соединений во всех схемах подсчитывали количество инфицированных клеток (бляшек) в опыте и контроле с использованием инвертированного микроскопа PrimoVert («Zeiss», Германия). Затем рассчитывали степень ингибирования цитопатогенного действия ВПГ и ЦМВ (бляшкообразования) в опыте по отношению к контролю по формуле Спирмена—Кербера [5]:

$$\text{Ингибирование вирусной активности (\%)} = \left(1 - \frac{\text{количество бляшек в опыте}}{\text{количество бляшек в контроле}}\right) \times 100\%$$

В качестве положительного контроля использовали АЦВ, в качестве отрицательного контроля — необработанные клетки Vero, зараженные ВПГ-1, и клетки ФЭЧ, зараженные ЦМВ.

Определение 50% ингибирующей дозы (ИД_{50}). Для вычисления концентрации веществ, вызывающих подавление вирусного цитопатического действия (бляшкообразования) на 50%, — ИД_{50} , строили графики зависимости степени ингибирования вирусной активности от концентраций соединения. Значения ИД_{50} рассчитывали методом линейной регрессии с использованием пакета документов Microsoft Excel. Химиотерапевтический индекс (ХТИ) рассчитывали как отношение ЦД_{50} к ИД_{50} .

Статистический анализ. Для статистической об-

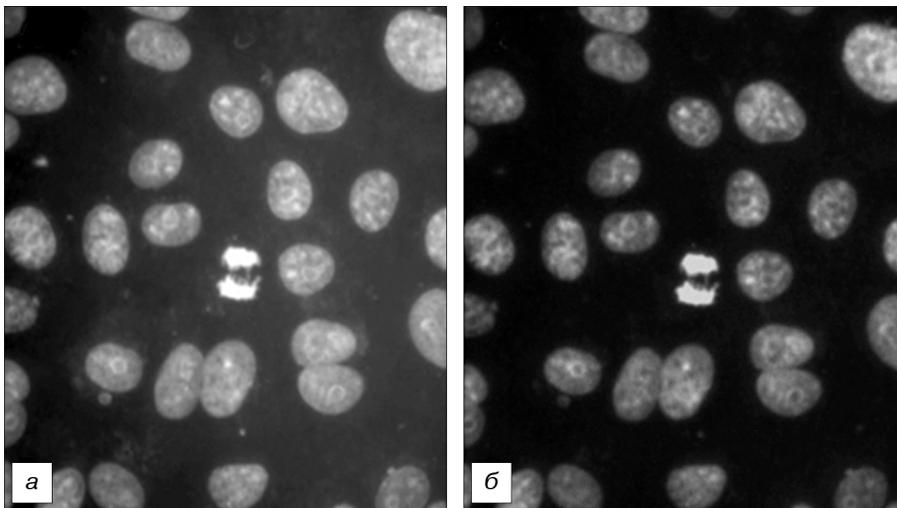


Рис. 2. Локализация **DBA(7)** в ядрах клеток Vero через 48 ч после внесения в культуральную среду.

a — **DBA(7)**; *б* — ядерный краситель DAPI; ок. 10 × об. 100.

работки результатов использовали пакет прикладных компьютерных программ Statistica 6.0. Для вычисления и сравнения средних значений использовали критерий Стьюдента (*t*-критерий). Различия показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

На первом этапе были проанализированы флуоресцентные и мембранотропные свойства **DBA(n)** и **DB(n)**, полученных на основе красителя Хехста 33258 (Ht), структурная формула которых представлена на рис. 1. Результаты показали, что все изученные соединения проникали в клетки Vero и ФЭЧ и флуоресцировали, но с разной интенсивностью. Максимальную интенсивность флуоресценции проявили соединения **DBA(1)**, **DBA(7)** и **DBA(9)**, минимальную — **DBA(3)**. Флуоресценция выявлена в интервале 465—475 нм. Было установлено, что через 24 ч **DBA** локализуется в цитоплазме, через 48 ч выявляются в ядрах клеток и Vero, и ФЭЧ и наблюдаются в клетках в течение 7 сут (время наблюдения) (рис. 2). Отметим, что флуоресценция соединений распределена в ядрах диффузно.

На следующем этапе были изучены цитотоксические и противовирусные свойства исследуемых соединений. При определении цитотоксичности использовали концентрации соединений от 100 до 2500 мкг/мл. 50% значения острой ($ОЦД_{50}$) и хронической цитотоксичности ($ЦД_{50}$), а также МПД для каждого соединения **DBA(n)** в отношении клеток Vero представлены в табл. 1. Анализ цитотоксических свойств показал, что в течение 72 ч воздействия наи-

более низкую цитотоксичность из 6 исследованных веществ проявляло **DBA(7)** ($ЦД_{50} > 1000$ мкг/мл), что сопоставимо с АЦВ. Наиболее токсичным оказалось **DBA(5)**, у остальных соединений данный показатель находился в диапазоне от 288 до 607 мкг/мл.

Анализ цитотоксичности соединений **DB** ($n = 1, 7, 11$) показал, что соединения с концентрацией 500, 250 и 125 мкг/мл выпадали в осадок через 24 ч после добавления на клеточный монослой и проявляли токсичность при концентрации менее 125 мкг/мл ($ЦД_{50} < 125$ мкг/мл).

Противовирусную активность соединений в отношении ВПГ- и ЦМВ-инфекции изучали в 4 схемах воздействия, используя концентрации 10, 1 и 0,1 мкг/мл. На рис. 3 представлены данные о противовирусных свойствах изученных соединений в микробицидной и терапевтической схемах воздействия ВПГ-1. Анализ количества инфицированных клеток (бляшек) показал, что соединения **DBA(1)**, **DBA(7)** и **DBA(9)** статистически значимо снижали количество инфицированных клеток по сравнению с контролем в обеих схемах воздействия, **DBA(11)** — в терапевтической схеме воздействия (см. рис. 3). Данные рис. 3 позволяют оценить степень ингибирования инфекционной активности ВПГ-1 под действием изученных соединений. Наиболее высокую микробицидную и терапевтическую противовирусную активность проявляло соединение **DBA(7)**. Кроме того, это соединение оказы-

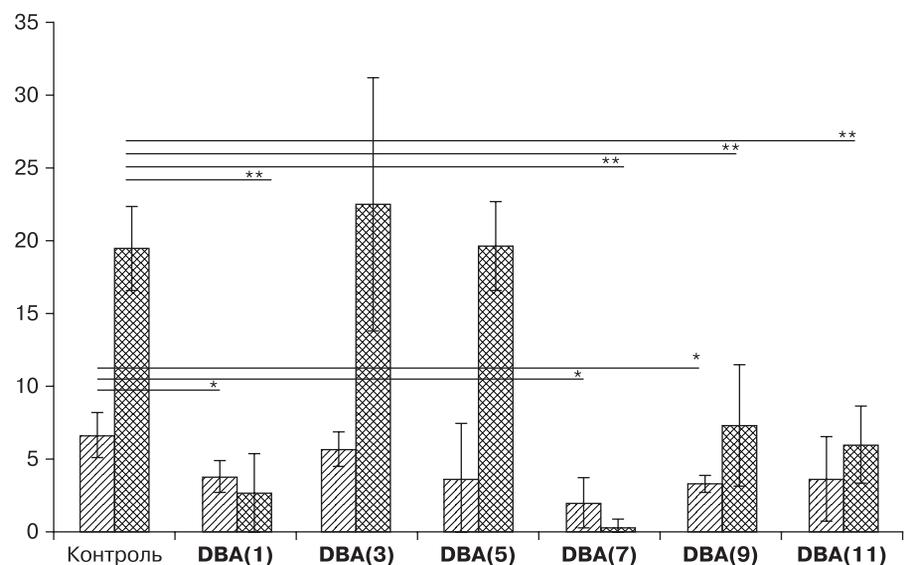


Рис. 3. Противовирусные свойства изученных соединений в микробицидной и лечебной схемах воздействия.

По оси ординат — количество вирусспецифических бляшек, содержащих инфицированные клетки Vero. Столбики с одной штриховкой — микробицидная схема воздействия: оценка через 24 ч после заражения; столбики с двойной штриховкой — лечебная схема воздействия: оценка через 48 ч после заражения; контроль — клетки, инфицированные ВПГ-1 и не обработанные соединениями **DBA(n)**; *, ** — различия, статистически значимые по сравнению с контролем при $p < 0,05$ (*t*-критерий).

Таблица 1

Цитотоксические свойства исследуемых соединений

Соединения	Цитотоксичность, мкг/мл		МПД***, мкг/мл
	ОЦД ₅₀ *	ЦД ₅₀ **	
DBA(1)	667	350	50
DBA(3)	670	375	50
DBA(5)	950	179	< 50
DBA(7)	> 2500	1083	500
DBA(9)	1759	288	100
DBA(11)	> 2500	607	250
АЦВ	2500	1100	250

Примечание. * — доза рассчитана через 24 ч после внесения соединения; ** — доза рассчитана через 72 ч после внесения соединения; *** — доза рассчитана через 7 сут после внесения соединения.

вало также профилактическое и вирулицидное действие: количество инфицированных клеток снижалось в 12 раз ($p < 0,002$) и в 18 раз ($p < 0,0001$) соответственно; инфекционная активность ВПГ-1 была подавлена в профилактической схеме на 91,7%, в вирулицидной — на 98,3% по сравнению с контролем — инфицированной культурой без соединений.

Соединения из серии **DB(n)** — **DB(1)**, **DB(7)** и **DB(11)**, изученные в тех же условиях, что и соединения серии **DBA(n)**, не проявили противовирусные свойства.

Наиболее информативным показателем противовирусного действия является ХТИ, характеризующий отношение цитотоксичности соединения к ингибирующей активности. В табл. 2 приведены рассчитанные значения ХТИ для каждого соединения.

Полученные данные показали, что наиболее активным является соединение **DBA(7)**, которое проявило противовирусную активность в отношении ВПГ-инфекции во всех изученных схемах с ХТИ > 100. Соединения **DBA(1)** и **DBA(11)** также обладали лечебными противовирусными свойствами, хотя и менее выраженными.

Цитотоксическое действие и противовирусная активность 3 соединений серии **DBA(n)** были изучены в отношении инфекции, вызванной ЦМВ человека. Для анализа цитотоксического действия на чувствительные к ЦМВ клетки ФЭЧ определяли значения ЦД₅₀. Они составили 184 мкг/мл для **DBA(3)**, 75 мкг/мл — для **DBA(7)** и 1696 мкг/мл — для **DBA(11)**. Противовирусную

активность показало только соединение **DBA(11)** и только в лечебной схеме. ИД₅₀ в лечебной схеме составила 30 мкг/мл, ХТИ = 56,5. Таким образом, соединение **DBA(11)** обладало умеренными лечебными свойствами против как ВПГ-инфекции, так и ЦМВ-инфекции.

Соединения из серии **DB(n)** — **DB(1)**, **DB(7)** и **DB(11)**, изученные в тех же условиях, что и соединения **DBA(n)**, не проявили противовирусные свойства в отношении ЦМВ-инфекции.

Обсуждение

В работе исследована новая серия флуоресцентных **DBA(n)**, полученных на основе красителя Хехста 33258 (**Ht**), широко используемого в клеточной биологии в качестве ДНК-специфичной флуоресцентной метки [6]. Известно, что **Ht** нековалентно и АТ-специфично связывается с ДНК по узкой бороздке [7, 8]. Он ингибирует ТАТА-бокс-связывающий белок [9, 10], является эффективным ингибитором топо-I [11, 12], топо-II [13] и ДНК-хеликаз [14] и, кроме того, обладает радиопротекторным свойством [15, 16]. Молекула **Ht** состоит из двух ковалентно связанных бензимидазольных фрагментов. При взаимодействии с ДНК каждый бензимидазольный фрагмент образует бифуркационную (трехцентровую) водородную связь с О2-атомом тимина и/или N3-атомом аденина двух соседних АТ-пар, накрывая при этом участок приблизительно в 1,5 пары оснований [7, 8]. Связывание **Ht** с ДНК стабилизируется также за счет электростатических и интенсивных ван-дер-ваальсовых взаимодействий со стенками узкой бороздки ДНК.

В созданной нами ранее серии **DB(n)** бензимидазольные фрагменты соединены олигометиленовым линкером различной длины (см. рис. 1), обеспечивающим им структуру, изометричную узкой бороздке ДНК. Таким образом, были сконструированы бидентатные лиганды, способные узнавать нуклеотидные последовательности, содержащие блоки из двух АТ-пар, находящихся на разных расстояниях друг от друга. **DB(n)** в низких молярных концентрациях оказались ингибиторами ряда ДНК-зависимых ферментов: эукариотической топо-I [17], ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a мыши [18], хеликазной активности белка NS3 вируса гепатита С человека [19]. Исследования **DB(n)** показали, что они являются новыми перспективными флуоресцентными красителями, способными как к проникновению через клеточную и ядерную

Таблица 2

Противовирусные свойства в отношении ВПГ-инфекции

Вещества	ЦД ₅₀	Схемы введения соединений							
		до заражения				после заражения, 1 ч, лечебная схема		Смесь ВПГ + соединение, вирулицидная схема	
		48 ч, профилактическая схема		1 ч, микробицидная схема		ИД ₅₀	ХТИ	ИД ₅₀	ХТИ
		ИД ₅₀ *	ХТИ**	ИД ₅₀	ХТИ				
DBA(1)	350	—	—	1,1	318	5,7	61	4,9	71
DBA(3)	375	—	—	33,9	11	—	—	23	16
DBA(5)	179	—	—	30	6	—	—	—	—
DBA(7)	1083	5,7	190	4	271	4,9	221	5,1	212
DBA(9)	288	5,3	54	9,8	30	8	36	7,2	40
DBA(11)	607	9,6	63	10,6	57	7,2	84	8,1	75
АЦВ	1100	н/и	—	1,2	916	0,9	1222	—	н/и

Примечание. * — концентрация соединения, ингибирующая бляшкообразующую способность вируса на 50%, мкг/мл; ** — ХТИ, рассчитанный как отношение 50% цитотоксической дозы к 50% ингибирующей дозе (ХТИ = ЦД₅₀/ИД₅₀); «—» — не обладает противовирусными свойствами (количество инфицированных клеток в опыте больше или равно таковому в контроле); жирным шрифтом выделены значения ХТИ > 100; н/и — не исследованы.

мембраны с эффективным окрашиванием ядер клеток, так и к дифференциальной окраске хромосом [20]. Однако из-за склонности к образованию агрегатов эти соединения имели низкую растворимость в воде, что очень существенно для проведения биологических, в том числе биохимических и особенно цитологических исследований.

Для улучшения растворимости в водных растворах и увеличения аффинности к ДНК в структуре молекулы **ДВ(n)** была произведена замена концевых групп и получена новая серия флуоресцентных хорошо растворимых в воде **ДВА(n)** (см. рис. 1). В настоящей работе было установлено (см. рис. 2), что молекулы **ДВА(n)**, как и молекулы **ДВ(n)**, способны проникать через клеточную и ядерную мембрану и окрашивать ДНК в живых клетках. Таким образом, создана новая серия флуоресцентных ДНК-специфичных бидентатных лигандов **ДВА(n)**, способных узнавать нуклеотидные последовательности, содержащие блоки из двух АТ-пар, находящихся на разных расстояниях друг от друга.

В настоящей работе впервые изучены противовирусные свойства вновь синтезированных **ДВА(n)** в отношении двух наиболее распространенных герпесвирусных инфекций *in vitro*. Инфекции, вызванные ВПГ 1-го и 2-го типа, а также ЦМВ, являются глобальной проблемой здравоохранения в мире. По данным ВОЗ, в мире распространены клинические проявления ВПГ-1-инфекции среди населения в возрасте до 49 лет составила 67%, распространенность рецидивирующего генитального герпеса, вызванного ВПГ-2, среди населения в возрасте 15–49 лет — 11,8% [1, 21]. ЦМВ только в одной группе риска — новорожденные дети — обнаружен у 1% всех живых новорожденных и особо опасен для недоношенных и маловесных младенцев, среди которых ЦМВ встречается значительно чаще [22].

Изученные соединения проявили противовирусные свойства с разной активностью и разными механизмами действия. Два соединения **ДВА(1)** и **ДВА(7)** обладали микробицидными свойствами (значения ХТИ превышали 100). Согласно существующим представлениям, ХТИ = 100/> 100 позволяет рекомендовать препарат к проведению доклинических и клинических испытаний. Создание микробицидов — доконтактных (pre-exposure prophylaxis) средств экстренной профилактики для интравагинального и/или интаректального использования признано ВОЗ как приоритетное направление в борьбе с ВИЧ-инфекцией и другими инфекциями, передающимися половым путем (ИППП). В последнее время стало очевидно, что недостаточно использовать микробициды узкого действия, направленного только на ВИЧ. Доказано, что генитальный герпес является одним из важнейших факторов риска приобретения ВИЧ-1 [23]. Необходимо, чтобы такие препараты также эффективно нейтрализовали ВПГ-1, так как установлено, что в настоящее время до 50% случаев генитального герпеса вызвано ВПГ-1 [1]. Можно предположить, что разработка микробицидов на основе **ДВА(1)** и **ДВА(7)** сможет предотвращать заражение ВПГ 1-го и 2-го типа, развитие генитального герпеса и будет способствовать также снижению распространения ВИЧ-инфекции.

Коинфекция ЦМВ/ВИЧ усиливает воспалительные процессы и иммунные расстройства, ускоряя развитие заболевания и часто являясь причиной смерти больных СПИДом. Активность **ДВА(11)** в лечебной схеме против ЦМВ-инфекции *in vitro* была относительно невысокой (ХТИ > 50 < 100). Однако с учетом негативной роли

ЦМВ при ВИЧ-инфекции детей [24] и взрослых [25], а также в связи с тяжелыми последствиями для новорожденных детей соединение **ДВА(11)** заслуживает дальнейших исследований как перспективный препарат для терапии ЦМВ-инфекции.

Заключение

Таким образом, создана новая серия флуоресцентных ДНК-специфичных бидентатных лигандов **ДВА(n)**, хорошо растворимых в воде, способных узнавать нуклеотидные последовательности, содержащие блоки из двух АТ-пар, находящихся на разных расстояниях друг от друга. Молекулы **ДВА(n)** могут проникать через клеточную и ядерную мембрану и окрашивать ДНК в живых клетках. В настоящей работе впервые изучены противовирусные свойства вновь синтезированных **ДВА(n)** в отношении двух наиболее распространенных герпесвирусных инфекций *in vitro*. Установлено, что соединение **ДВА(7)** проявило высокую противовирусную активность *in vitro* в отношении инфекции, вызванной ВПГ-1. Это соединение обладает не только лечебными и профилактическими свойствами в отношении клеток культуры, но также нейтрализует инфекционную активность вируса (вирулицидная схема) и может рассматриваться как микробицид — кандидатный препарат для экстренной профилактики. Следует отметить, что **ДВА(11)** проявило умеренную терапевтическую активность на модели как ВПГ-, так и ЦМВ-инфекции. Это позволяет надеяться, что данное соединение сможет стать основой для создания инновационного препарата для лечения двух широко распространенных вирусных инфекций человека.

Финансирование. Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант № 14-04-00388) и Программы Президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–4, 6–16, 18, 19, 21, 23–25 см. REFERENCES)

- Мейхи Б. *Вирусология*. Методы: Пер. с англ. М.: Мир; 1988.
- Сусова О.Ю., Иванов А.А., Моралес Руисс С.С., Лессовая Е.А., Громыко А.В., Стрельцов С.А. и др. Узкобороздочные димерные бисбензимидазолы ингибируют *in vitro* связывание с ДНК эукариотической ДНК топоизомеразы I. *Биохимия*. 2010; 75(6): 781–8.
- Попов К.В., Егорова Е.И., Иванов А.А., Громыко А.В., Жузе А.Л., Большева Н.Л. и др. Димерные бисбензимидазольные красители на основе Ноеchst 33258 новые ДНК-специфичные флюорохромы для цитогенетики человека и растений. *Биологические мембраны. Журнал мембранной и клеточной биологии*. 2008; 25(3): 173–80.
- Климова Р.Р., Малиновская В.В., Гусева Т.С., Паршина О.В., Гетия Е.Г., Дегтярева М.В. и др. Влияние герпесвирусных инфекций на уровень провоспалительных цитокинов у недоношенных новорожденных детей. *Вопросы вирусологии*. 2011; (4): 23–6.

REFERENCES

- Looker K.J., Magaret A.S., May M.T., Turner K.M., Vickerman P., Gottlieb S.L. et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. *PLoS One*. 2015; 10(10): e0140765.
- James S.H., Kimberlin D.W. Neonatal herpes simplex virus infection: epidemiology and treatment. *Clin. Perinatol*. 2015; 42(1): 47–59.
- Barrett M.P., Gemmell C.G., Suckling C.J. Minor groove binders as anti-infective agents. *Pharmacol. Ther.* 2013; 139: 12–23.
- Wilson W. D., Nguyen B., Tanious F. A., Mathis A., Hal J.E., Stephens C.E. et al. Dications that target the DNA minor groove: compound design and preparation, DNA interactions, cellular distribution and biological

- cal activity. *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents.* 2005; 5(4): 389-408.
5. Mahy B.W.J., ed. *Virology: A Practical Approach.* Oxford: IRL Press; 1985.
 6. Latt S.A. Optical studies of metaphase chromosome organization. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1976; (5): 1-37.
 7. Teng M.K., Usman N., Frederick C.A., Wang A.H. The molecular structure of the complex of Hoechst 33258 and the DNA dodecamer d(CGCGAATTCGCG). *Nucleic. Acids. Res.* 1988; (16): 2671.
 8. Vega M.C., Saez I.G., Aymami J., Eritja R., van der Marel G.A., van Boom J.H., et al. Three-dimensional crystal structure of the A-tract DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) complexed with the minor-groove-binding drug Hoechst 33258. *Eur. J. Biochem.* 1994; 222: 721.
 9. Chiang S.Y., Welch J.J., Rauscher F.J., Beerman T.A. Effects of minor groove binding drugs on the interaction of TATA box binding protein and TFIIA with DNA. *Biochemistry.* 1994; (33): 7033-40.
 10. Chiang S.Y., Welch J.J., Rauscher F.J., Beerman T.A. Effect of DNA-binding drugs on early growth response factor-1 and TATA box-binding protein complex formation with the herpes simplex virus latency promoter. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 23999-4004.
 11. Chen A.Y., Yu C., Gatto B., Liu L.F. DNA minor groove-binding ligands: a different class of mammalian DNA topoisomerase I inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1993; 90: 8131-5.
 12. Zhang X., Zhang S.C., Sun D., Hu J., Wali A., Pass H., et al. New insight into the molecular mechanisms of the biological effects of DNA minor groove binders. *PLoS One.* 2011; 6(10): e25822.
 13. Woynarowski J.M., McHugh M., Sigmund R.D., Beerman T.A. Modulation of topoisomerase II catalytic activity by DNA minor groove binding agents distamycin, Hoechst 33258, and 4',6-diamidine-2-phenylindole. *Mol. Pharmacol.* 1989; 35: 177-82.
 14. Soderlind K.J., Gorodetsky B., Singh A.K., Bachur N.R., Miller G.G., Lown J.W. Bis-benzimidazole anticancer agents: targeting human tumour helicases. *Anticancer. Drug Design.* 1999; 14: 19-36.
 15. Martin R.F., Broadhurst S., D'Abrew S., Budd R., Sephton R., Reum M., et al. Radioprotection by DNA ligands. *Br. J. Cancer Suppl.* 1996; 74(27): 99-101.
 16. Lyubimova N.V., Coultas P.G., Yuen K., Martin R.F. In vivo radioprotection of mouse brain endothelial cells by Hoechst 33342. *Br. J. Radiol.* 2001; 74: 77-82.
 17. Susova O.Yu., Ivanov A.A., Morales Ruiss S.S., Lessovaya E.A., Gromyko A.V., Strel'tsov S.A., et al. Minor groove dimeric bisbenzimidazoles inhibit in vitro DNA binding to eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biokhimiya.* 2010; 75(6): 781-8. (in Russian)
 18. Cherepanova N.A., Ivanov A.A., Maltseva D.V., Minero A.S., Gromyko A.V., Strel'tsov S.A., et al. Dimeric bisbenzimidazoles inhibit the DNA methylation catalyzed by the murine Dnmt3a catalytic domain. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2011; 26(2): 295-300.
 19. Tunitskaya V.L., Mukovnya A.V., Ivanov A.A., Gromyko A.V., Ivanov A.V., Strel'tsov S.A., et al. Inhibition of the helicase activity of the HCV NS3 protein by symmetrical dimeric bis-benzimidazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011; 21(18): 5331-5.
 20. Popov K.V., Egorova E.I., Ivanov A.A., Gromyko A.V., Zhuze A.L., Bol'sheva N.L., et al. Dimeric bisbenzimidazole Hoechst 33258-related dyes as novel AT-specific DNA-binding fluorochromes for human and plant cytogenetics. *Biologicheskie membrany. Zhurnal membrany i kletchnoy biologii.* 2008; 25(3): 173-80. (in Russian)
 21. Looker K.J., Magaret A.S., Turner K.M., Vickerman P., Gottlieb S.L., Newman L.M. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. *PLoS One.* 2015; 10(1): e114989.
 22. Klimova R.R., Malinovskaya V.V., Guseva T.S., Parshina O.V., Getiya E.G., Degtyareva M.V., et al. Influence of herpesvirus infection on the levels of proinflammatory cytokines in preterm newborns. *Voprosy virusologii.* 2011; (4): 23-6. (in Russian)
 23. Moore M.D., Bunka D.H., Forzan M., Spear P.G., Stockley P.G., McGowan I., et al. Generation of neutralizing aptamers against herpes simplex virus type 2: potential components of multivalent microbicides. *J. Gen. Virol.* 2011; 92(7): 1493-9.
 24. Slyker J.A. Cytomegalovirus and paediatric HIV infection. *J. Virus Erad.* 2016; 2(4): 208-14.
 25. Lichtner M., Cicconi P., Vita S., Cozzi-Lepri A., Galli M., Lo Caputo S., et al. Cytomegalovirus coinfection is associated with an increased risk of severe non-AIDS-defining events in a large cohort of HIV-infected patients. *J. Infect. Dis.* 2015; 211(Pt. 2): 178-86.

Поступила 15.02.17
Принята в печать 28.02.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.281.8.03:616.98:578.832.1].015.44

Санин А.В., Дерябин П.Г., Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Кожевникова Т.Н.

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ФОСПРЕНИЛ И ГАМАПРЕН В ОТНОШЕНИИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ГРИППА А(Н5N1) В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Изучали противовирусную активность фоспренила и гамапрена *in vitro* в отношении высокопатогенного штамма вируса гриппа А(Н5N1). Внесение вируса в культуру клеток почки эмбриона свиньи сопровождалось развитием интенсивного цитопатогенного эффекта. Предварительное внесение фоспренила и гамапрена за 1 ч до заражения клеток в дозе 10 ТЦД₅₀ полностью подавляло цитопатогенную активность вируса. При повышении дозы вируса до 100 ТЦД₅₀ также наблюдали выраженное угнетение инфекционной активности вируса: 70% инфицированных клеток выживало под действием фоспренила и 90% — под действием гамапрена. При введении препаратов одновременно с заражением клеток вирусом в дозе 10 ТЦД₅₀ выживало фактически 100% зараженных клеток, в то время как в контрольных культурах наблюдалась гибель 100% клеток. После инфицирования вирусом в дозе 100 ТЦД₅₀ фоспренил и гамапрен вызывали 50% защиту клеток. Противовирусный эффект препаратов фоспренил и гамапрен может быть связан не только с их вирулицидными, но и с противовирусными свойствами.

Ключевые слова: птичий грипп; вирус; культуры клеток; фоспренил; гамапрен; противовирусная активность.

Для цитирования: Санин А.В., Дерябин П.Г. Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Кожевникова Т.Н. Противовирусная активность препаратов фоспренил и гамапрен в отношении инфекции, вызванной вирусом гриппа А(Н5N1) в культуре клеток. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(4): 168-173.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-168-173>

Контактная информация: Кожевникова Татьяна Николаевна, канд. мед. наук, н.с. ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: tatiana@micro-plus.ru