

УДК 577.21

РЕПЛИКАЦИОННО-КОМПЕТЕНТНЫЙ ГАММА-РЕТРОВИРУС Мо-MuLV, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЙ ГЕН ЗЕЛЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА, КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПОИСКА ИНГИБИТОРОВ РЕТРОВИРУСОВ, ИСПОЛЬЗУЮЩИХ ГЕПАРАНСУЛЬФАТЫ В КАЧЕСТВЕ ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

© 2012 г. О. А. Степанов¹, М. М. Прокофьева¹, С. Stocking², В. П. Варламов³, А. Н. Левов³, Г. А. Вихорева⁴, П. В. Спирин¹, С. Н. Михайлов^{1*}, В. С. Прасолов^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Heinrich Pette Institute - Leibniz Institute for Experimental Virology, Hamburg, 20251 Germany

³Центр “Биоинженерия” Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

⁴Московский государственный текстильный университет им. А.Н. Косыгина, Москва, 119071 Россия

Поступила в редакцию 16.09.2011 г.

Принята к печати 24.11.2011 г.

Изучали влияние сульфированных полисахаридов на эффективность заражения перевиваемых фибробластов мыши линий SC-1 и NIH-3T3 репликационно-компетентным рекомбинантным вирусом лейкоза мышей Молони (Mo-MuLV), несущим ген усиленного зеленого флуоресцирующего белка. Показано, что использованные полисахариды не оказывают цитостатического и цитотоксического действия на клетки SC-1 и NIH-3T3 в диапазоне концентраций от 0.01 до 100 мкг/мл и обладают вирулицидными свойствами в отношении вируса Mo-MuLV. Полисахариды в указанных концентрациях препятствуют заражению клеток вирусом Mo-MuLV, что предотвращает дальнейшее развитие вирусной инфекции. Установлено, что сульфированные полисахариды, ингибиторы простого ретровируса Mo-MuLV, эффективно ингибируют и другие ретровирусы, в том числе и лентивирусы, использующие в качестве первичных клеточных рецепторов гепарансульфаты.

Ключевые слова: вирус лейкоза мышей Молони (Moloney Murine Leukemia Virus, Mo-MuLV), сульфированные полисахариды, хитозан, противовирусная активность, гепарансульфаты, фибробласты линий SC-1 и NIH-3T3 мыши.

REPLICATION-COMPETENT GAMMA-RETROVIRUS Mo-MuLV EXPRESSING GREEN FLUORESCENT PROTEIN GENE AS AN EFFICIENT TOOL FOR SCREENING OF INHIBITORS OF RETROVIRUSES THAT USE HEPARAN SULFATE AS THE PRIMARY CELL RECEPTOR, by O. A. Stepanov¹, M. M. Prokofjeva¹, K. Stocking², V. P. Varlamov³, A. N. Levov³, G. A. Vikhoreva⁴, P. V. Spirin¹, S. N. Mikhailov^{1*}, V. S. Prassolov^{1*} (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; *e-mail: smikh@eimb.ru; prassolov45@mail.ru; ²Heinrich Pette Institute Leibniz Institute for Experimental Virology, Hamburg, 20251 Germany; ³Center “Bioengineering”, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia; ⁴Kosygin Moscow State Textile University, Moscow, 119071 Russia). The effect of sulfated polysaccharides on the efficiency of infection of mouse embryonic fibroblast cell lines SC-1 and NIH-3T3 by replication-competent recombinant Moloney murine leukemia virus (Mo-MuLV) carrying the eGFP gene was investigated. It was shown that used polysaccharides have no cytostatic and cytotoxic effects on SC-1 and NIH 3T3 cells in the concentrations from 0.01 to 100 µg/ml and have virucidal activity against Mo-MuLV. Polysaccharides in the indicated concentrations inhibit cell infection by Mo-MuLV, that prevents further expansion of viral infection. It was detected that sulfated polysaccharides are effective inhibitors of other retroviruses, including lentiviruses, that use heparan sulfate as cell receptors for non-specific binding.

Keywords: Moloney Murine Leukemia Virus (Mo-MuLV), sulfated polysaccharides, chitosan, antiviral activity, heparan sulfate, mouse embryonic fibroblast cell lines SC-1, NIH-3T3.

Принятые сокращения: Mo-MuLV – вирус лейкоза мышей Молони; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; eGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок; M_w – средневесовая молекулярная масса; M_n – среднечисловая молекулярная масса; IC_{50} – концентрация ингибитора, при которой активность вируса составляет 50% от исходной; СЭ КРС – сыворотка эмбрионов крупного рогатого скота; ВВС – вирус везикулярного стоматита; СЗ – степень замещения.

* Эл. почта: smikh@eimb.ru; prassolov45@mail.ru

Принято считать, что к настоящему времени выделена и охарактеризована лишь небольшая часть вирусов, “обитающих” на Земле. Несомненно, что среди еще не известных вирусов человека и животных заметную часть составляют простые и сложные ретровирусы. Об этом свидетельствуют представленные в геномах человека и других млекопитающих полные копии ретровирусных провирусов или их фрагментов [1, 2], доля которых в геномах человека и мыши составляет 8 и 10% соответственно. Недавно показали, что клетки мышевидного грызуна *Mus caroli* при их индукции 5-бром-2'-дезоксинуридином начинают продуцировать активированный амфотропный гамма-ретровирус [1], т.е. простой ретровирус, эффективно заражающий клетки человека. Из различных приматов выделены простые и сложные ретровирусы, способные инфицировать клетки человека или ставшие патогенными для человека в результате адаптивных мутаций (вирус лейкоза гиббонов (GALV), ретровирус шерстистых обезьян, вирус иммунодефицита зеленых мартышек).

В настоящий момент существуют два основных подхода к определению эффективности потенциальных противовирусных препаратов. Один ингибиторный анализ *in vitro* с использованием очищенных вирусных ферментов. Однако при работе с очищенными ферментами невозможно установить эффективность взаимодействия противовирусных препаратов с клеткой *in vivo*, а именно, оценить взаимодействие с клеточными рецепторами, способность проникать в клетку, стабильность, отсутствие цитотоксичности, эффективность и специфичность противовирусного действия. Второй подход предполагает работу с инфекционными вирусами, например с ВИЧ. Этот подход может применяться только в небольшом числе лабораторий, специально предназначенных для работы с патогенами человека [3]. Ограничения в работе с инфекционными вирусами существенно затрудняют поиск и тестирование противовирусных препаратов. Используемая нами система основана на репликационно-компетентном вирусе лейкоза мышей Молони (Mo-MuLV), т.е. это прямая и одновременно безопасная система, поскольку Mo-MuLV способен заражать только клетки грызунов (мышей и крыс).

С помощью системы, разработанной в ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, можно проводить скрининг потенциальных ингибиторов, препятствующих взаимодействию простых и сложных ретровирусов с первичными поверхностными клеточными рецепторами, что предотвращает заражение клеток. Побудительной основой для создания этой системы послужили результаты, свидетельствующие о том, что первичными клеточными рецепторами для большинства ретро-

вирусов, в том числе ВИЧ-1 и ВИЧ-2, служат гепарансульфаты, находящиеся на клеточной мембране [4]. Контакт ретровируса с первичными рецепторами необходим для последующего прочного взаимодействия с рецептором/корцептоном, специфичным для ретровирусов каждой группы интерференции. Таким образом, поиск эффективных ингибиторов, подавляющих взаимодействие ретровирусов с клеточными гепарансульфатами, представляется актуальной задачей, решение которой может привести к созданию препарата широкого спектра действия, эффективного в отношении различных групп патогенных ретровирусов.

Mo-MuLV, использованный в нашей системе, — это простой ретровирус, который, подобно всем другим ретровирусам, в том числе и ВИЧ, использует в качестве первичного рецептора гепарансульфаты, локализованные на поверхности клетки. На следующем этапе заражения вирусная частица переходит с неспецифического гепарансульфатного рецептора на вирусспецифический рецептор, функции которого могут выполнять различные трансмембранные белки. Например, рецептором для экотропных MuLV служит трансмембранный белок Cat, ответственный за перенос основных аминокислот, корцепторами ВИЧ могут быть рецепторы хемокинов CCR5 и CXCR4, а рецептором — T-клеточный рецептор CD4. Существенно, что гепарансульфаты являются первичными рецепторами и для вирусов других групп.

Мы использовали рекомбинатный ретровирус Mo-MuLV, в 3'-концевую область генома которого встроен ген усиленного зеленого флуоресцентного белка (eGFP), отделенный от предшествующего ему гена белка оболочки *env* последовательностью IRES (внутренний сайт посадки рибосомы, internal ribosome entry site). В ходе ретровирусной инфекции клетки, зараженные таким вирусом, приобретают способность флуоресцировать и, в свою очередь, становятся источником вновь образованных инфекционных частиц Mo-MuLV. Иными словами, создана модель инфекционного процесса *in vitro*. Такая система позволяет проводить скрининг потенциальных ингибиторов широкого спектра, направленных на подавление продуктивного контакта (взаимодействия) ретровируса и клетки-мишени с помощью эффективного и малозатратного метода проточной цитофлуориметрии.

На данный момент разработано множество противовирусных препаратов, одобренных для клинического использования. Однако это, в основном, ингибиторы одного из трех ферментов, необходимых для осуществления внутриклеточных этапов жизненного цикла ретровирусов (обратная транскриптаза, интеграна и протеаза [5, 6]), которые не всегда эффективны и безопас-

ны. В ходе длительного применения таких препаратов возникают лекарственно-устойчивые штаммы вируса. В силу этого необходим постоянный поиск и разработка новых лекарственных средств. В представленной работе изучено влияние ряда соединений полисахаридной природы на распространение вирусной инфекции в предложенной нами системе *in vitro*.

Mo-MuLV строго экотропный ретровирус, т.е. он способен заражать только клетки мышевидных грызунов, тогда как клетки человека к нему полностью устойчивы, поэтому работа с Mo-MuLV разрешена в обычных лабораторных условиях (S1) и не требует специальных мер защиты. Таким образом, тестирование новых ингибиторов, направленных на предотвращение продуктивного контакта ретровирусов с гепарансульфатными рецепторами, можно проводить непосредственно в лабораториях, где создаются антиретровирусные соединения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Полисахариды. В работе использовали гепарины (Литва и “Sigma”, H-7005), декстрансульфаты (“Sigma”, D4911 и D6924). Низкомолекулярный хитозан с $M_w 7.2 \pm 0.1$ кДа с соотношением средневесовой и среднечисловой молекулярной массы (M_w/M_n) 1.34 и степенью дезацетилирования $\geq 98\%$ получен в результате кислотного гидролиза высокомолекулярного хитозана 500 кДа (“Нерре Biomaterial GmbH”). Молекулярную массу хитозана определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. M_w , M_n и значения полидисперсности M_w/M_n низкомолекулярных хитозанов определяли при температуре 30°C с использованием колонки Ultrahydrogel 500 (“Waters”) в системе 0.05 М уксусной кислоты и 0.15 М ацетата аммония, при pH 5.2 и скорости элюции 0.5 мл/мин. Контроль и анализ хроматограмм осуществляли с помощью программы “Мультихром” в. 1.6 (“Амперсенд”). Для калибровки колонки использовали декстрановые стандарты молекулярных масс (1080, 4440, 9890, 43500, 66700, 123600 и 196300 кДа) (“Sigma”) [7]. Все производные получены на основе низкомолекулярного хитозана с $M_w 7.2 \pm 0.1$ кДа. Малеиноилхитозан и сульфосукциноилхитозан получены по методике [8]. Малеинирование хитозана осуществляли избытком малеинового ангидрида при комнатной температуре в 0.2 М ацетатном буфере. Сульфосукциноилхитозан синтезировали из малеиноилхитозана действием избытка пиросульфата натрия при pH 4.5 и температуре 50°C.

Сукциноилхитозан получен ацилированием исходного хитозана янтарным ангидридом согласно [9]. N-2-гидрокси-3-метоксибензил-N-сукциноилхитозан получен из сукциноилхитозана со степенью

замещения 0.45 в результате взаимодействия с 2-гидрокси-3-метоксибензальдегидом и последующего восстановления имина боргидридом натрия [10]. N-2-гидрокси-3-(4-сульфофенилазо)бензилхитозан получен из низкомолекулярного хитозана в две стадии. На первой стадии в результате взаимодействия хитозана с салициловым альдегидом с последующим восстановлением боргидридом натрия получен N-2-гидроксибензилхитозан. Во втором этапе N-2-гидроксибензилхитозан сочетали с сульфатом 4-сульфофенилдиазония [11].

Сульфат хитозана получали сульфированием высокомолекулярного хитозана панцирей крабов (опытное производство ВНИРО, г. Москва) хлорсульфоновой кислотой в среде диметилформамида. Образцы с разной молекулярной массой и степенью замещения (СЗ) получали дробным осаждением из водного раствора ацетоном. Строение сульфата хитозана определяли методами элементного анализа, ИК- и ЯМР-спектроскопии и вискозиметрии [12].

Культура клеток. Использовали линию клеток HEK293 эмбриональной почки человека, эмбриональные фибробласты мышцы SC-1 и NIH-3T3, растущие на стандартной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (СЭ КРС), 4 mM L-глутамин, 1 mM пирувата натрия, стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед/мл, соответственно, и клетки линии Jurkat Т-лимфоцитарного лейкоза человека, которые культивировали на среде RPMI-1640, содержащей 20% СЭ КРС, 4 mM L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки растили при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Заражение и культивирование клеток проводили в 24-луночных планшетах.

Получение псевдолентивирусных частиц. В качестве упаковывающих клеток, в которых происходит сборка рекомбинантных лентивирусных частиц и их секреция в культуральную среду, использовали клетки HEK293, которые за 12–14 ч до начала трансфекции высевали на чашки Петри диаметром 100 мм по $(3.0–3.5) \times 10^6$ клеток на чашку.

ДНК лентивирусного вектора, содержащего маркерный ген *eGFP*, вместе с плазмидами, направляющими синтез белков, необходимых для формирования псевдовиральных частиц, вводили в клетки HEK293 методом Са-фосфатной трансфекции. Инфекционные псевдовиральные частицы начинали собирать через 24 ч после трансфекции с интервалом 10–12 ч [5].

Вирус титровали на клетках Jurkat, экспрессирующих рецепторы и корецепторы ВИЧ-1, высеванных в лунки 24-луночных планшетов (3×10^5 клеток на лунку) за 14–16 ч до заражения. Уровень флуоресценции измеряли на проточном цитофлуоримет-

ре Epics 4XL Beckman Coulter (США) через 48 ч после заражения клеток. Титр вируса рассчитывали по формуле $T = N \times P/V$, где N – число высеванных клеток, P – доля инфицированных клеток в популяции, V – количество добавленного супернатанта, содержащего псевдо-ВИЧ-1-частицы, T – титр вируса. В работе использовали сборы с титром вируса в диапазоне 5.4×10^6 мл⁻¹.

Получение репликационно-компетентных вирусных частиц. Сборку репликационно-компетентных ретровирусных частиц и их секрецию в культуральную среду осуществляли в клетках SC-1, которые за 12–14 ч до начала трансфекции высеивали на чашки Петри диаметром 100 мм по $(3.0–3.5) \times 10^6$ клеток на чашку.

Ретровирусный вектор, содержащий полно-размерный геном Mo-MuLV, а также маркерный ген *GFP*, вводили в клетки SC-1 методом трансфекции при помощи липофектамина. Репликационно-компетентные ретровирусные частицы начинали собирать через 48 ч после трансфекции с интервалом 10–12 ч.

Вирус титровали на клетках SC-1, за 14–16 ч до заражения высеванных в лунки 24-луночных планшетов (3×10^5 клеток на лунку), как описано выше для клеток Jurkat.

Определение противовирусной активности. Использовали хитозан, сукциноилхитозан, бензилхитозан, маленоилхитозан, сульфосукцинилхитозан, сульфат хитозана, хитозан с сульфаниловой кислотой, N-2-гидрокси-3-метоксибензил-N-сукциноилхитозан, N-2-гидрокси-3-(4-сульфофенилазо)бензилхитозан, гепарин, декстрансульфат (натриевые соли в концентрации 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 и 100 мкг/мл раствора на лунку).

Цитостатичность препаратов для неинфицированных клеток SC-1, NIH-3T3 и Jurkat определяли по изменению количества клеток в течение 7 дней. Для этого в культуральную среду в чашках Петри с выращиваемыми клетками наносили исследуемый препарат в концентрации 10 и 100 мкг/мл. Первый раз клетки подсчитывали через 48 ч после внесения препарата и далее через каждые 24 ч. Клетки SC-1 и NIH-3T3 снимали раствором трипсина и подсчитывали их количество в камере Ньюбауэра. Клетки линии Jurkat ресуспендировали в среде и также подсчитывали их количество. Контролем служили клетки, выращиваемые в идентичных условиях, но без полисахарида.

Цитотоксичность препаратов для неинфицированных клеток SC-1, NIH-3T3 и Jurkat определяли по изменению морфологии и количеству жизнеспособных клеток с использованием окрашивания раствором трипанового синего (“Invitrogen Corp.”, США). С этой целью в культуральную среду вносили препарат полисахарида до концентрации 10 и 100 мкг/мл. Через 48 ч клетки

SC-1 и NIH-3T3 снимали трипсином и прижизненно окрашивали 0.4%-м раствором трипанового синего в течение 5 мин. Клетки линии Jurkat ресуспендировали в среде и окрашивали 0.4%-м раствором трипанового синего в течение 5 мин. Затем подсчитывали число жизнеспособных (неокрашенных) и нежизнеспособных (окрашенных) клеток в камере Ньюбауэра. Число живых клеток в популяции оценивали по числу неокрашенных клеток (в процентах от общего числа).

Вирулицидную активность соединений в отношении вируса Mo-MuLV определяли путем инкубирования нетоксичных доз препаратов с вирусом, содержащим материалом в течение 15, 30, 45 и 60 мин перед добавлением к клеткам. Исследования проводили на линии клеток SC-1. Количество флуоресцирующих клеток определяли через 48 ч после заражения на проточном цитофлуориметре.

Противовирусную активность препаратов определяли на линиях клеток SC-1, NIH-3T3 и Jurkat, к которым добавляли различные количества анализируемых препаратов (20 мкл на лунку) перед заражением вирусом Mo-MuLV (SC-1 и NIH-3T3) или препаратом псевдолентивирусных частиц (Jurkat). Количество флуоресцирующих клеток подсчитывали на проточном цитофлуориметре через 48 ч после заражения. Полученные данные обрабатывали по методу Фишера–Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гепарансульфаты – компоненты плазматических мембран клеток, где они могут функционировать как рецепторы и участвовать в клеточной адгезии и межклеточных взаимодействиях. По своей структуре гепарансульфаты, как и гепарин, относятся к группе гликозаминогликанов, которые представляют собой длинные неразветвленные цепи гетерополисахаридов, построенные из повторяющихся дисахаридных единиц. Основные составляющие этих полимеров – гексуроновая кислота (*D*-глюкуроновая кислота или *L*-идуруновая) и *N*-ацетилглюкозамин. Структура основного дисахаридного фрагмента, гепарансульфата, представлена в табл. 1. Эти полимеры содержат *O*- и *N*-сульфатные группы, число которых в молекуле гепарансульфата достигает в среднем 2.7 на остаток дисахарида. Основное отличие гепарина от гепарансульфата состоит в меньшей степени сульфирования. Наличие сульфатных, а также карбоксильных групп определяет существенный отрицательный заряд этих биополимеров в нейтральных условиях [13, 14]

Известно, что сульфированные полисахариды проявляют высокую противовирусную активность, препятствуя проникновению в клетку

Таблица 1. Структура и характеристики гепарансульфата и использованных в работе полисахаридов*

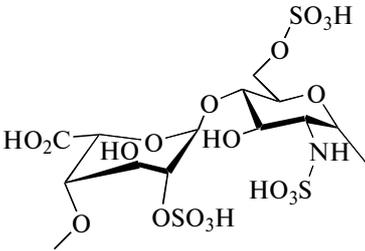
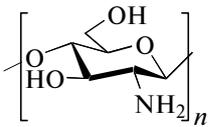
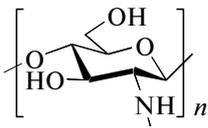
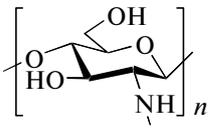
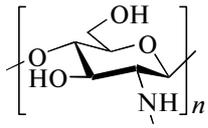
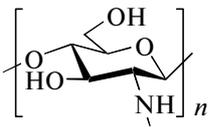
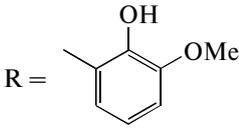
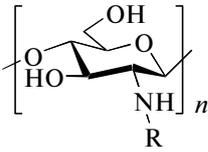
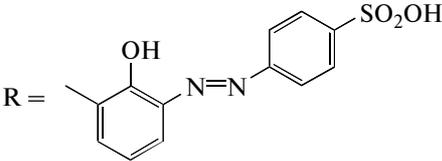
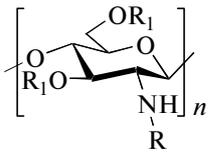
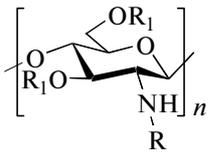
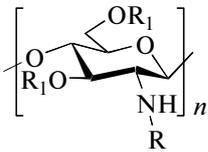
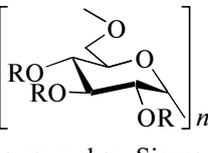
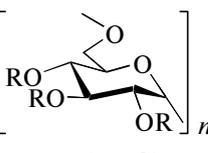
Соединение	Характеристика
 <p data-bbox="411 607 1182 638">Основной структурный дисахаридный элемент гепарансульфата</p>	
 <p data-bbox="411 815 512 846">Хитозан</p>	$M_w 7.2 \pm 0.1$ кДа
 <p data-bbox="347 1039 580 1070">Сукциноилхитозан</p>	$R = H, \text{---} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \overset{\text{OH}}{\text{C}} \text{---} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{---} \text{OH}$ (C3 0.45) $M_w 9.6 \pm 0.2$ кДа
 <p data-bbox="352 1263 576 1294">Маленоилхитозан</p>	$R = H, \text{---} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{---} \text{CH} = \text{CH} \text{---} \overset{\text{OH}}{\text{C}} \text{---} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{---} \text{OH}$ (C3 1.0) $M_w 11.3 \pm 0.2$ кДа
 <p data-bbox="304 1487 624 1518">Сульфосукциноилхитозан</p>	$R = \text{---} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \overset{\text{OH}}{\text{C}} \text{---} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{---} \text{OH}$ $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ OH (C3 1.0) $M_w 16.9 \pm 0.2$ кДа %S 8.2
 <p data-bbox="145 1771 783 1803">N-(2-гидрокси-3-метоксибензил)-N-сукциноилхитозан</p>	$R = \text{---} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \overset{\text{OH}}{\text{C}} \text{---} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{---} \text{OH}$ (C3 0.45) $R =$  (C3 0.55) $M_w 12.8 \pm 0.2$ кДа

Таблица 1. Окончание

Соединение	Характеристика
 <p>N-2-гидрокси-3-(4-сульфофенилазо)бензилхитозан</p>	 <p>(C3 0.7) M_w 15.9 ± 0.2 кДа %S 8.6</p>
 <p>Сульфат хитозана</p>	<p>R = Ac (C3 0.08) R = SO₃H (C3 0.3) R₁ = SO₃H (C3 1.25) n = 230 %S 15.5 M_w 100 ± 10 кДа</p>
 <p>Сульфат хитозана</p>	<p>R = Ac (C3 0.05) R = SO₃H (0.25 C3) R₁ = SO₃H (1.2 C3) %S 14.8 M_w 75 ± 10 кДа</p>
 <p>Сульфат хитозана</p>	<p>R = Ac (0.05 C3) R = SO₃H (0.15 C3) R₁ = SO₃H (1.1 C3) %S 13.5 M_w 25 ± 2 кДа</p>
<p>Гепарин НФГ по Госреестру 2008[B01AB01]</p>	<p>Эндокринное предприятие (Литва) M_w 17–30 кДа Степень сульфирования около 1.0 (в среднем один отрицательный заряд на моносахаридный остаток) %S 9.57</p>
 <p>Декстрансульфат, Sigma D4911</p>	<p>R = SO₃H (C3 2.3) M_w 6.5–10.0 кДа</p>
 <p>Декстрансульфат, Sigma D6924</p>	<p>R = SO₃H (C3 2.3) M_w 9–20 кДа</p>

* Во всех случаях, за исключением хитозана, в работе использовали натриевые соли.

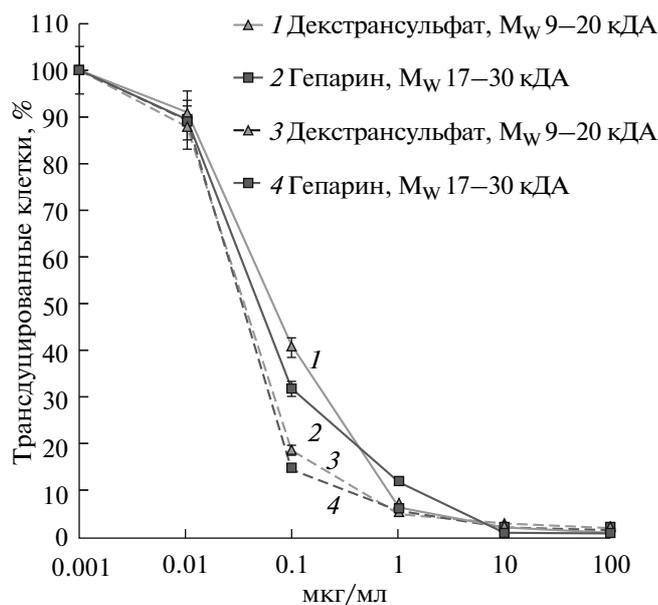


Рис. 1. Зависимость количества флуоресцирующих клеток от концентрации добавленного ингибитора. Сплошная линия — культура клеток SC-1, штриховая линия — культура клеток НИИ-3Т3.

ДНК- и РНК-содержащих вирусов (вирус простого герпеса, цитомегаловирус человека, вирус Синдбис, ВИЧ) [15, 16]. Как правило, полисахариды с высокой молекулярной массой и степенью сульфирования обладают более выраженной противовирусной активностью [17].

Цель настоящей работы состояла в изучении противовирусной активности ряда сульфированных полисахаридов (табл. 1), структура которых подобна структуре гепарансульфатов, в отношении репликационно-компетентного рекомбинантного вируса Мо-MuLV. Изучены также различные производные хитозана, не содержащие сульфатные группы.

Цитотоксическое и цитостатическое действие препаратов

Анализ цитотоксического и цитостатического действия препаратов на культуры клеток SC-1 и НИИ-3Т3 показал, что из всех проверенных препаратов цитотоксичностью обладает только хито-

зан в концентрации более 10 мкг/мл. Остальные препараты (в концентрации от 0.01 до 100 мкг/мл) не влияли на скорость пролиферации клеток, а также на их морфологию на протяжении всего времени наблюдения (7 дней).

Определение адекватности системы

Пригодность системы на основе вируса Мо-MuLV с встроенным геном *eGFP* для изучения и тестирования потенциальных противовирусных препаратов оценивали с использованием известных препаратов — гепарина и декстрансульфата (рис. 1, табл. 2). Установленная нами величина IC_{50} для этих препаратов составила 0.07 и 0.08 мкг/мл соответственно, что согласуется с данными [18], согласно которым величина IC_{50} для гепарина и декстрансульфата при заражении вирусом MuLV клеток НИИ-3Т3 равна 0.01 и 0.02 мкг/мл соответственно. Эти данные позволяют сделать вывод о возможности использования нашей системы для тестирования потенциальных противовирусных препаратов.

Определение вирулицидной активности

Важно было оценить способность препаратов влиять непосредственно на инфекционные частицы вируса Мо-MuLV (вирулицидная активность). С этой целью вирус, перед тем как добавить к клеткам, инкубировали с гепарином, декстрансульфатом и сульфатом хитозана. Как следует из представленных данных (табл. 3), препараты обладают вирулицидной активностью и препятствуют заражению клеток вирусом Мо-MuLV, причем степень подавления инфекционной активности вируса прямо пропорциональна времени инкубирования препарата с вирусосодержащим материалом. Полученные результаты согласуются с данными [19] о том, что сульфированный полисахарид (SP-2A) из бурой водоросли *Sargassum patens* подавлял репликацию вируса простого герпеса типа 2 *in vitro*, действуя эффективно на стадии адсорбции, и в высоких концентрациях проявлял вирулицидную активность.

Таблица 2. Значения IC_{50} (мкг/мл) для гепарина и декстрансульфата, опубликованные и полученные в данной работе

Соединение	Эксперимент		Опубликованные данные
	НИИ 3Т3	SC-1	НИИ-3Т3
Гепарин, M_w 17–30 кДа	0.06 ± 0.01	0.35 ± 0.05	0.01–1
Декстрансульфат, M_w 9–20 кДа	0.08 ± 0.01	0.23 ± 0.03	0.01–1

Таблица 3. Вирулицидные свойства препаратов в отношении вируса Мо-MuLV

Препарат*	Титр вируса, $\times 10^5$ /мл, после инкубации с препаратом, мин				
	0	15	30	45	60
Сульфат хитозана, M_w 100 кДа	8.0 ± 0.4	5.0 ± 0.5	3.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	0.6 ± 0.1
Декстрансульфат, M_w 9–20 кДа	7.8 ± 0.3	5.5 ± 0.4	3.1 ± 0.1	1.9 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Гепарин, M_w 17–30 кДа	8.1 ± 0.2	5.3 ± 0.2	2.9 ± 0.4	2.1 ± 0.3	0.7 ± 0.1

*Препараты использовали в концентрации, обеспечивающей снижение титра вируса на 50% (IC_{50}).

Примечание. Контрольное значение титра вируса, равное $(16.0 \pm 0.5) \times 10^5$ /мл, определяли на клетках, не обработанных ингибиторами.

Определение противовирусной активности сульфированных полисахаридов

На следующем этапе работы оценили способность производных хитозана препятствовать заражению клеток линий SC-1 и НИН-3Т3 вирусом Мо-MuLV. Были проверены хитозан, сукциноилхитозан, маленоилхитозан, сульфосукциноилхитозан, сульфат хитозана, N-2-гидрокси-3-метоксибензил-N-сукциноилхитозан, бензилхитозан, N-2-гидрокси-3-(4-сульфофенилазо)бензилхитозан, которые добавляли в концентрации от 0.01 до 100 мкг/мл в культуру клеток за 1 ч до заражения (табл. 4, рис. 2). В качестве контрольных соединений использовали гепарин и декстрансульфат. Через 48 ч после вирусной трансдукции клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Оказалось, что сукциноилхитозан, N-2-гидрокси-3-метоксибензил-N-сукциноилхитозан, маленоилхитозан и хитозан в использованных концентрациях не обладают противовирусной активностью. Интерес представляют сульфаты хитозана

и N-2-гидрокси-3-(4-сульфофенилазо)бензилхитозан, поскольку IC_{50} для них находится в пределах 0.05–0.1 мкг/мл, при этом в концентрации до 100 мкг/мл эти соединения не проявляют цитостатической и цитотоксической активности.

Мы проверили также, как молекулярная масса и степень замещения могут влиять на противовирусную активность препаратов. С этой целью использовали сульфаты хитозана с M_w 25, 75 и 100 кДа и декстрансульфат с M_w 6.5–10 и 9–20 кДа. Из представленных в табл. 4 данных видно, что чем больше молекулярная масса и степень замещения, тем выше противовирусная активность препаратов. Эти результаты хорошо согласуются с данными других авторов [20–23], которые показали, что такие сульфированные полисахариды, как агараны, каррагенаны, фуканы обладают тем большей активностью в отношении вируса герпеса простого типа 2, чем больше их молекулярная масса и степень замещения.

Таблица 4. Противовирусная активность сульфированных полисахаридов в отношении вируса Мо-MuLV

Соединение	IC_{50} , мкг/мл	
	SC-1	НИН 3Т3
Хитозан, M_w 7.2 кДа	>100	>100
N-2-гидрокси-3-метоксибензил-N-сукциноилхитозан, M_w 12.8 кДа, СЗ 0.7	>100	>100
Сукциноилхитозан, M_w 9.6 кДа, СЗ 0.55	>100	>100
Маленоилхитозан, M_w 11.3 кДа, СЗ 0.98	>100	>100
Сульфосукциноилхитозан, M_w 16.9 кДа, СЗ 0.64	0.34 ± 0.05	0.90 ± 0.01
Сульфат хитозана, M_w 25 кДа, СЗ 1.25	0.45 ± 0.07	0.25 ± 0.03
Сульфат хитозана, M_w 75 кДа, СЗ 1.45	0.10 ± 0.02	0.08 ± 0.01
Сульфат хитозана, M_w 100 кДа, СЗ 1.55	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.01
N-2-гидрокси-3-(4-сульфофенилазо)бензилхитозан, M_w 15.9 кДа, СЗ 0.7	0.10 ± 0.02	0.08 ± 0.01
Гепарин натриевая соль, Grade II "Sigma" (H-7005)	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Гепарин натриевая соль, M_w 17–30 кДа, СЗ 1.0	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Декстрансульфат натриевая соль, "Sigma" (D4911), M_w 6.5–10.0 кДа, СЗ 2.3	0.23 ± 0.03	0.08 ± 0.01
Декстрансульфат натриевая соль, "Sigma" (D6924), M_w 9.0–20.0 кДа, СЗ 2.3	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.01

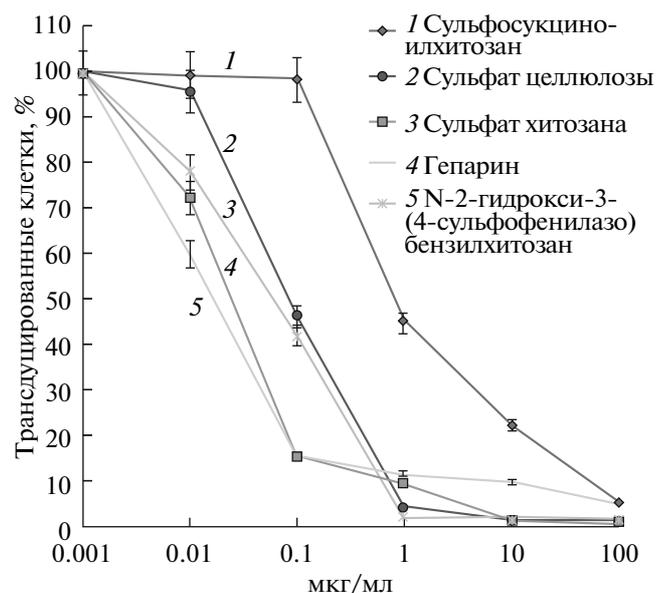


Рис. 2. Противовирусная активность препаратов на клеточной линии NIH-3T3 через 48 ч после добавления вируса. 1 – Сульфосукциноилхитозан; 2 – сульфат целлюлозы; 3 – сульфат хитозана, M_w 100 кДа; 4 – гепарин, M_w 13–20 кДа; 5 – N-2-гидрокси-3-(4-сульфофенилазо)бензилхитозан.

Действие сульфированных полисахаридов на другие вирусы

Мы использовали модельную систему на основе лентивирусных векторов [5], чтобы установить как сульфированные полисахариды действуют на другие виды ретровирусов. Псевдолентивирусы представляют собой рекомбинантные лентивирусы на основе ВИЧ-1. Они содержат набор ферментов ВИЧ-1 (обратную транскриптазу и интегразу), но при этом псевдолентивирусные частицы не являются репликационно компетентными, поскольку вместо вирусных генов несут в своем геноме ген *eGFP*. По сути, это “одноразовые” вирусы, что делает безопасной работу с ними. Мы использовали псевдолентивирусные частицы, содержащие на мембране белок оболочки gp160 ВИЧ-1 или белок оболочки G вируса везикулярного стоматита (ВВС).

Выбор белков оболочки обусловлен тем, что у этих вирусов различается механизм проникновения в клетку. У ВИЧ-1, как и у Mo-MuLV, клеточными рецепторами для первичного неспецифического связывания вируса с клеткой служат гепарансульфаты, в то время как ВВС проникает в клетку путем эндоцитоза, опосредованного контактом белка оболочки G с фосфолипидами клеточной мембраны [24]. Опыт проводили на линии клеток Jurkat T-лимфоblastного лейкоза человека. В этой системе протестировали сульфат хитозана, маленоилхитозан, сульфосукцинилхитозан, сукциноилхитозан и гепарин. Были отобраны препараты, которые эффективно подавляли инфекцию Mo-MuLV (гепарин, сульфат хитозана, сульфосукцинилхитозан), а для сравнения – препараты, не показавшие активности против Mo-MuLV (маленоилхитозан и сукциноилхитозан).

Показано (табл. 5), что гепарин, сульфат хитозана и сульфосукцинилхитозан препятствуют трансдукции клеток псевдолентивирусными частицами с белком оболочки gp160 (ВИЧ-1). Сукциноилхитозан и маленоилхитозан не обладали активностью против псевдолентивирусных частиц с белком оболочки gp160 (ВИЧ-1). Эти результаты коррелируют с данными, полученными с использованием вируса Mo-MuLV (табл. 4). Ни один из препаратов не проявил противовирусной активности в отношении псевдолентивирусных частиц с белком оболочки G ВВС. Как сказано выше, ВВС проникает в клетку без использования гепарансульфатов в качестве первичных рецепторов, поэтому можно сделать вывод, что действие этих препаратов специфично в отношении ретровирусов, первичными клеточными рецепторами которых служат гепарансульфаты.

На основании наших результатов можно утверждать, что противовирусная активность названных препаратов зависит от вида вируса, точнее от белка оболочки, осуществляющего контакт с клеточным рецептом/рецепторами.

Гепарансульфаты служат первичными рецепторами и таких вирусов, как вирус простого герпеса [25, 26], цитомегаловирус человека [27], ви-

Таблица 5. Противовирусная активность сульфированных полисахаридов на псевдовидных частицах с белком оболочки ВИЧ-1 или белком оболочки вируса везикулярного стоматита (ВВС)

Соединение	IC_{50} , мкг/мл	
	ВИЧ-1	ВВС
Гепарин, M_w 17–30 кДа, СЗ 1.0	0.06 ± 0.01	>100
Сульфат хитозана, M_w 100 кДа, СЗ 1.55	0.02 ± 0.01	>100
Сульфосукцинилхитозан, M_w 16.9 кДа, СЗ 0.64	0.80 ± 0.12	>100
Сукциноилхитозан, M_w 9.6 кДа, СЗ 0.55	>100	>100
Маленоилхитозан, M_w 11.3 кДа, СЗ 0.98	>100	>100

рус японского энцефалита [28], вирус Синдбис [29] и ряда других альфа-, флави-, ретро-, парво-, пикорно- и папилломавирусов [30–34]. Это позволяет предположить, что рассмотренные нами соединения будут обладать ингибиторной активностью и в отношении перечисленных вирусов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе доказана возможность использования репликационно-компетентного гамма-ретровируса Mo-MuLV, экспрессирующего ген *eGFP*, как эффективного инструмента для поиска противоретровирусных препаратов – ингибиторов проникновения вируса в клетку. Анализируемые в нашей работе потенциальные противовирусные препараты в концентрации до 100 мкг/мл включительно не проявляют цитотоксической и цитостатической активности в отношении культуры клеток SC-1, NIH-3T3 и Jurkat. Они характеризуются вирулицидными свойствами в отношении вируса Mo-MuLV и в концентрации от 0.02 до 0.5 мкг/мл способны подавлять продукцию вируса на 50%. Показана специфичность воздействия сульфированных полисахаридов на вирусы, клеточными рецепторами которых служат гепарансульфаты.

Система на основе вируса Mo-MuLV малозатратна и удобна для предварительного отбора противовирусных препаратов. В силу своей простоты она позволяет быстро проводить скрининг, а поскольку в системе используется вирус, специфично заражающий клетки грызунов (мышей, крыс), работа с ним безопасна. При помощи системы на основе Mo-MuLV можно проводить поиск ингибиторов не только простых гамма-ретровирусов, но и других групп вирусов, в том числе патогенов человека, использующих в качестве первичных рецепторов клеточные гепарансульфаты.

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, Министерством образования и науки РФ (ГК 02.740.11.0706) и Российским фондом фундаментальных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stocking C., Kozak C.A. 2008. Murine endogenous retroviruses. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 3383–3398.
2. Jern P., Coffin J.M. 2008. Effects of retroviruses on host genome function. *Annu. Rev. Genet.* **42**, 709–732.
3. De Clercq E. 2009. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **33**, 307–320.
4. Cladera J., Martin I., O’Shea P. 2001. The fusion domain of HIV gp41 interacts specifically with heparan sulfate on the T-lymphocyte cell surface. *EMBO J.* **20**, 19–26.
5. Прокофьева М.М., Степанов О.А., Иванов А.В., и др. 2011. Система безопасного скрининга потенциальных ингибиторов репликации ВИЧ-1. *Acta Naturae* **3**, 61–71.
6. Спиринов П.В., Вильгельм А.Э., Прасолов В.С. 2008. Лентивирусные векторы. *Молекуляр. биология.* **42**, 913–926.
7. Лопатин С.А., Дербенева М.С., Куликов С.Н., и др. 2009. Фракционирование хитозана методом ультрафильтрации. *Журн. анал. химии.* **64**, 666–670.
8. Budanova N., Shapovalova E., Lopatin S., et al. 2004. N-(3-sulfo, 3-carboxy)-propionylchitosan as new chiral selector for enantioresolution of basic drugs by capillary electrophoresis. *Chromatographia.* **59**, 709–713.
9. Yamaguchi R., Arai Y., Itoh T., Hirano S. 1981. Preparation of partially N-succinylated chitosans and their cross-linked gels. *Carbohydrate Res.* **88**, 172–175.
10. Koutroumanis K.P., Avgoustakis K., Bikiaris D. 2010. Synthesis of cross-linked N-(2-carboxybenzyl)chitosan pH sensitive polyelectrolyte and its use for drug controlled delivery. *Carbohydrate Polymers.* **82**, 181–188.
11. Guo Z., Chen R., Xing R., et al. 2006. Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities *in vitro*. *Carbohydrate Res.* **341**, 351–354.
12. Горбачева И.Н., Скорикова Е.Е., Вихорева Г.А., и др. 1991. Строение и свойства сульфата хитозана. *Высокомолекуляр. соед.* **33**, 1899–1904.
13. Rabenstein D. 2002. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat. Prod. Rep.* **19**, 312–331.
14. Malavaki C.J., Theocharis A.D., Lamari F.N., et al. 2011. Heparansulfate: biological significance, tools for biochemical analysis and structural characterization. *Biomed. Chromatogr.* **25**, 11–20.
15. Baba M., Snoeck R., Pauwels R., De Clercq E. 1988. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemoth.* **32**, 1742–1745.
16. Pirrone V., Wigdahl B., Krebs F.C. 2011. The rise and fall of polyanionic inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1. *Antiviral Res.* **90**, 168–182.
17. Ghosh T., Chattopadhyay K., Marschall M., et al. 2009. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure–activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology.* **19**, 2–15.
18. Walker S. J., Pizzato M., Takeuchi Y., Devereux S. 2002. Heparin binds to murine leukemia virus and inhibits env-independent attachment and infection. *J. Virol.* **76**, 6909–6918.
19. Zhu W., Chiu L., Vincent C., et al. 2006. Antiviral property and mechanisms of a sulphated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 1. *Phytomedicine.* **13**, 695–701.
20. Duarte M.E., Cauduro J.P., Noseda D.G., et al. 2004. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. *Carbohydr. Res.* **339**, 335–347.

21. Carlucci M.J., Scolaro L.A., Errea M.I., et al. 1997. Antiviral activity of natural sulphated galactans on herpes virus multiplication in cell culture. *Planta Med.* **63**, 429–432.
22. Pujol C.A., Estevez J.M., Carlucci M.J., et al. 2002. Novel dl-galactan hybrids from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* are potent inhibitors of herpes simplex virus and dengue virus. *Antivir. Chem. Chemther.* **13**, 83–89.
23. Nyberg K., Ekblad M., Bergstrom T., et al. 2004. The low molecular weight heparan sulfate-mimetic, PI-88, inhibits cell-to-cell spread of herpes simplex virus. *Antivir. Res.* **63**, 15.
24. Coil D.A., Miller A.D. 2004. Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **78**, 10920–10926.
25. Long D., Berson J.F., Cook D.G., Doms R.W. 1994. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 gp120 binding to liposomes containing galactosylceramide. *J. Virol.* **68**, 5890–5898.
26. WuDunn D., Spear P.G. 1989. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* **63**, 52–58.
27. Compton T., Nowlin D.M., Cooper N.R. 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology.* **193**, 834–841.
28. Su C.M., Liao C.L., Lee Y.L., Lin Y.L. 2001. Highly sulfated forms of heparin sulfate are involved in Japanese encephalitis virus infection. *Virology.* **286**, 206–215.
29. Klimstra W.B., Ryman K.D., Johnston R.E. 1998. Adaptation of Sindbis virus to BHK cells selects for use of heparan sulfate as an attachment receptor. *J. Virol.* **72**, 7357–7366.
30. Byrnes A.P., Griffin D.E. 1998. Binding of Sindbis virus to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **72**, 7349–7356.
31. Chen Y., Maguire T., Hileman R.E., et al. 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* **3**, 866–871.
32. Fry E.E., Newman J.W., Curry S., et al. 2005. Structure of foot-and-mouth disease virus serotype A10 61 alone and complexed with oligosaccharide receptor: receptor conservation in the face of antigenic variation. *J. Gen. Virol.* **86**, 1909–1920.
33. Kroschewski H., Allison S.L., Heinz F.X., Mandl C.W. 2003. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. *Virology.* **308**, 92–100.
34. Pinon J.D., Klasse P.J., Jassal S.R., et al. 2003. Human T-cell leukemia virus type I envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Virol.* **77**, 9922–9930.