

СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА ГЕНА НА СТРУКТУРНИЯ ПРОТЕИНЕН VP1 НА ДИЗОКСАРИЛОВИТЕ МУТАНТИ НА КОКСАКИВИРУС В1

Иванка Николова , Румена Петкова , Стоян Чакъров , Ангел С. Гълъбов

РЕЗЮМЕ

Извършен е анализ на РНК последователността на резистентните на дизоксарил и дизоксарил-зависими мутанти на *Coxsackievirus B1*. Дивият тип дизоксарил-чувствителен вирус (Connecticut 5), два дизоксарил-резистентни мутанта, единият от тях получен в FL клетки, а другият изолиран от мозъците на новородени мишки, заразени с коксакивирус В1 и лекувани с дизоксарил и дизоксарил-зависим мутант, получен от резистентния щам, претърпял 9 пасажа в клетъчната култура, са включени в настоящото проучване.

Извършен е RT-PCR анализ с праймери, избрани от регион на вирусния геном, кодиращ капсидния протеин VP1. Паралелен сравнителен анализ на последователностите на получените фрагменти от изследваните дизоксарилови мутанти и такива получени от бази данни (GenBank) на VP1 гена на коксакивирус В1 беше извършен BLAST анализ.

Установено е, че резистентният мутант, получен при мишки, е много подобен на щама, развит в клетъчни култури (97%). Наблюдава се и висока степен на сходство (97%) между резистентен мутант, произведен в клетъчни култури, и зависимия щам. Сходството на резистентните и зависимите мутанти с дивия щам е само 91-92%.

Дизоксарилите мутанти на Коксакивирус В1: Фенотипни характеристики и анализ на гена VP1

Иванка Николова, Ангел С. Гълъбов , Румена Петкова, Стоян Чакъров и Борис Атанасов

Z. Naturforsch. 66 с, 627 - 636 (2011); получена на 7 януари / 24 август 2011 г.

РЕЗЮМЕ

Дизоксарилът инхибира репликацията на ентеровирусите чрез свързване към хидрофобния джоб на VP1 протеина във вирусния капсид, като по този начин стабилизира вириона и блокира неговото разсъбличане. Резистентните на дизоксарил (RES) мутанти на Coxsackievirus B1 (CVB1 / RES) са получени от дивия чувствителен към диоксарил (SOF) щам (CVB1 / SOF), използвайки подхода на селекция. Получен е дизоксарил-зависим (DEP) мутант (CVB1 / DEP) след девет последователни пасажа на дизоксарил-резистентния мутант в присъствието на дизоксарил. Изследвани са фенотипни характеристики на дизоксарилите мутанти. Проучване на времето за репликацията на CVB1 / DEP показва, че при отсъствие на дизоксарил не става сглобяване на вирусните частици. VP1 последователностите на РНК на дизоксарилите мутанти бяха сравнени със съществуващата референтна структура на CV Bank на Gen Bank. Аминокиселинната последователност на пептида VP1 196 - 258 (дизоксарил-свързващ регион) на CVB1 / RES е значително по-различна от тази на CVB1 / SOF. Най-важните промени в CVB1 / RES бяха две точкови мутации, M213H и F237L, и двете в джоба, свързващ лиганда. Анализът на последователността на CVB1 / DEP показва известна реверсия към CVB1 / SOF. Представени са аминокиселинните последователности на трите VP1 протеина.

ПЕРСПЕКТИВИ ЗА ЕФЕКТИВНА ХИМОТЕРАПИЯ НА ЕНТЕРОВИРУСНИТЕ ИНФЕКЦИИ

А. С. Гълъбов, Л. Николаева-Гломб, И. Николова, Р. Василева- Пенчева

Департамент по вирусология, Институт по микробиология на Стефан Анджелов,

Българска академия на науките, София, България

РЕЗЮМЕ

Човешките ентеровируси, разпространени по целия свят, са причинители на широк спектър от заболявания с изключително висока заболеваемост, включително тежки заболявания на централната нервна система, сърцето, панкреаса, скелетните мускули и др. Тези вируси са причинители и на обикновената настинка, която допринася за развитие на хронични респираторни заболявания и хронична обструктивна белодробна болест. Тези заболявания са със значително висока честота и смъртност при деца, във високорисковите популации (имунодефицити, новородени) и налагат необходимостта за химиотерапия като основно средство за контрол на ентеровирусните инфекции. Понастоящем няма клинично ефективни антивирусни средства за лечение на ентеровирусна инфекция, въпреки многото работа, извършена в тази област. Основната причина за това е развитието на лекарствена резистентност.

Монотерапевтичните курсовете бяха единствения използван подход досега. За първи път в изследванията за анти-ентеровирусна терапия екипът ни въведе тестването на комбинирания ефект на селективните инхибитори на репликацията на ентеровирус с различен механизъм на действие. Ние проучихме успоредно с процеса на развитие на резистентност към най-силните инхибитори на ентеровируси, WIN съединения (VP 1 протеинови хидрофобни джобни блокери), особено в моделите *in vivo* - невротропна CVB1 инфекция при мишки. Въведохме проследяването на панел от фенотипни маркери (стойност на MIC50, форма и размер на плаката, стабилност при 50 ° C, патогенност при мишки) за характеризиране на лекарствените мутанти (резистентни и зависими) като много важен етап в изследването на ентеровируса инхибитори. Освен това, в резултат на анализ на последователността на VP1 РНК, извършена по модела на дизоксарилови мутанти на CVB1, ние определихме молекулната основа на лекарствената резистентност, две точкови мутации - M213H и F237L, и двете в джоба, свързващ лиганда. Анализът на последователността на зависимия от лекарството мутант показва известна реверсия към дивия чувствителен към лекарството вирус.

Широкомащабно проучване на комбинирания ефект на серия от анти-ентеровирусни агенти с различен механизъм на действие доведе до подбора на редица много ефективни *in vitro* двойни комбинации, които показаха синергичен характер на комбинирания ефект при широк спектър от чувствителни ентеровируси. В тези експерименти бяха включени и два ентеровирусни инхибитора, чийто ефект бе доказан за първи път при наши предишни изследвания - RTU-23 и оксоглауцин. Най-перспективното постижение на нашите проучвания бе прилагането на нова схема за комбинирано прилагане на анти-ентеровирусни вещества при коксаки В невроинфекция в новородени мишки. Тази схема се състои в последователно редуващо се, а не едновременно, прилагане на веществата в комбинацията. Бе подбрана една тройна комбинация - оксоглауцин-гванидин HCl-оксоглауцин (DGO), показваща добра антивирусна активност. Нейната ефективност се изразява в отчетливо намаляване на смъртността на заразените животни, при сравнение с плацебо групата, с групите третирани ежедневно с монотерапевтичен курс от партниращите си в комбинацията вещества, както и с комбинацията DGO при ежедневно едновременно прилагане на трите съединения.

ПРИЛОЖЕНИЕ НА АНТИВИРАЛНАТА КОМБИНАЦИЯ: ПЕРСПЕКТИВА В БОРБАТА С ЕНТЕРОВИРУСНИТЕ ИНФЕКЦИИ

Ангел С. Гълъбов, Иванка Николова, Ралица Василева-Пенчева и Аделина Стоянова

Институтът по микробиология на Стефан Анжелоф, БАН, София, България

Кореспондент: Ангел С. Гълъбов, Институт по микробиология на Стефан Анжелоф, БАН, София, България, ул. Георги Бончев 26, София 1113, България, Тел. +359 2 9 79 31 57; Факс: +359 2 8 70 01 09, E-mail: micb@microbio.bas.bg

РЕЗЮМЕ

Човешките ентеровируси, разпространени по целия свят, са причинители на широк спектър от заболявания с изключително висока заболеваемост, включително серия от тежки заболявания на централната нервна система, сърцето, панкреас, скелетните мускули и др., както и обикновената настинка, която допринася за развитие на хронични респираторни заболявания, включително хронична обструктивна белодробна болест. Гореспоменатите заболявания заедно със значително високата заболеваемост и смъртност при деца, както и при високорисковите популации (имунодефицити, новородени) определено формулират химиотерапията като основно средство за борба с ентеровирусните инфекции. Понастоящем няма клинично ефективни антивирусни средства за лечение на ентеровирусна инфекция, въпреки големия обем на работа в тази област. Основната причина за това е развитието на лекарствена резистентност. Изследвахме процеса на развитие на резистентност към най-силните инхибитори на ентеровируси, WIN съединения (VP1 протеин хидрофобни джобни блокери), особено при моделите *in vivo*, Coxsackievirus B (CV-B) инфекции при мишки. Въведохме проследяване на панел от фенотипични маркери (стойност на MIC50, форма и размер на плаката, стабилност при 50°C, патогенност при мишки) за характеризиране на лекарствените мутанти (резистентни и зависими) като много важен етап в изследването на ентеровирусните инхибитори. Освен това, в резултат на анализ на последователността на VP1 РНК, извършена по модела на дизоксарилови мутанти на CVB1, ние определихме молекулната основа на лекарствената резистентност.

Курсовете за монотерапия бяха единственият подход, използван досега. За първи път в изследването на анти-ентеровирусни съединени екипът ни въведе тестването на комбинирания ефект на селективните инхибитори на репликацията на ентеровирус с различен начин на действие. Това проучване доведе до избор на редица много ефективни *in vitro* двойни комбинации със синергичен ефект и широк спектър от чувствителни ентеровируси. Най-перспективното постижение при нашите изследвания в тази област беше разработването на нова схема за комбинирано приложение на анти ентеровирусни вещества при невроинфекция с Коксакивирус В1 при новородени мишки. Той се състоеше от последователни, редуващи се и не едновременно прилагане на веществата в комбинацията. Тройната комбинация - диоксарил-гуанидин. НСI-оксоглауцин (DGO) показва висока ефективност, изразена в подчертаното намаляване на смъртността при заразени мишки в сравнение както с плацебо групата, така и с партньорските съединения, използвани самостоятелно ежедневно, и същата комбинация, прилагана едновременно всеки ден. Проучванията за лекарствената чувствителност на вирусни мозъчни изолати от мишки, третирани с комбинация DGO, показват не само запазена, но дори повишена чувствителност към лекарствата, включени в комбинацията. Очевидно последователното редуващо приложение на анти ентеровирусни вещества възпрепятства появата на лекарствена резистентност в хода на експерименталните ентеровирусни инфекции при мишки.

Откриване на цитомегаловирусна ДНК (CMV) чрез PCR при пациенти с неизвестни възпалителни очни заболявания

Адрес на авторите: Петър Грозданов, Иванка Николова, Ангел С. Гълъбов
Институтът по микробиология на Стефан Анджелов,
Българска академия на науките, София, България.

РЕЗЮМЕ

Цитомегаловирусът (CMV) е добре известен като патогенен агент на вътреочните възпалителни заболявания. Микроскопските и имунохистохимични изследвания имат ограничения при идентифицирането на този вирус, но откриването и типизирането на вирусна ДНК с полимеразна верижна реакция (PCR) е бързо, високо специфично и лесно интерпретируемо средство за идентифициране на CMV при пациенти с офталмологични лезии. Двама пациенти (34-годишен мъж и 48-годишен мъж), които развиват ретинит с неизвестен причинител, са изследвани за наличие на CMV ДНК. Използвахме PCR реактиви за качествено откриване на цитомегаловирус (CMV 500/800 IC), предоставен от „Sacace Biotechnologies“. Целта на PCR реакцията е генът MIE. Използвани са положителни и отрицателни контроли, за да се избегнат фалшиви резултати. Нашият PCR анализ показва наличието на CMV-ДНК в пробите.

Изследване на антиоксидантни и антивирусни свойства на гераниол

Милка Милева^{1*}, Иванка Николова¹, Надя Николова¹, Лукия Мукова¹, Алмира Георгиева², Анна Добрева³ и Ангел С. Гълъбов¹

¹ Катедра по вирусология, Института по микробиология на Стефан Анджелов, БАН

² Катедра "Биологични ефекти на природни и синтетични вещества", Институт по невробиология, БАН

³ Институт за розови и ароматни растения, Казанлък, България

РЕЗЮМЕ

Гераниол е ацикличен монотерпенов алкохол с характерен мирис на роза. Той е важна съставна част от етеричните масла на българската *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. Целта на настоящото проучване е да се изследва антиоксидантната активност, както и да се разкрие потенциала за антивирусна активност на гераниол срещу репликацията на вируси, принадлежащи към различни таксономични групи, които са важни човешки патогени. Гераниол показва добра способност да улавя 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) радикали и да инхибира липидната пероксидация в моделна система от яйчени липозоми. Гераниол демонстрира ниска цитотоксичност към HEp-2 клетки. In vitro беше тествата неговата активност срещу вируси, които са важни човешки патогени, принадлежащи към различни таксономични групи: Коксаки В1 вирус (CV-B1) от семейство Picornaviridae, респираторен синцитиален вирус (RSV) от семейство Paramyxoviridae и грипен вирус A/Aichi/68/ H3N2 от семейство Orthomyxoviridae. Антивирусният ефект беше изследван in vitro в постановка на многоциклов ЦПЕ (цитопатичен ефект)-инхибиращ тест. Гераниол показва антивирусно действие само срещу CVB1 - селективният индекс е 3.9. Изследваните биологични свойства на гераниол, сред които са добрата антиоксидантна и антивирусна активност срещу някои вирусни семейства, заедно с незначителната токсичност, налагат провеждането на допълнителни изследвания, за да се проучи приложимостта на гераниол-съдържащите продукти.

Анти ентеровирусна тройна комбинация от инхибитори на вирусна репликация: активност срещу невроинфекция с Коксакивирус В1 при мишки

Аделина Стоянова, Иванка Николова¹, Герхард ПУрстингер, Георги Добриков, Владимир Димитров, Стефан Филипов³ и Ангел С Гълъбов¹

РЕЗЮМЕ

Предистория: Химиотерапията е важен инструмент за борба с ентеровирусните инфекции, но клинично ефективни антиентеровирусни лекарства понастоящем не съществуват, главно поради развитието на лекарствена резистентност. Изследвахме комбинираните ефекти на инхибиторите на репликация на ентеровирус, за да ограничим този процес. В предишни проучвания показахме ефикасността на последователно редуващо приложение на тройните комбинации дизоксарил / гуанидин / оксоглауцин и плеконарил / гуанидин / оксоглауцин срещу инфекция с Коксакивирус В1 при новородени мишки. Тестовите за чувствителност към лекарства на вирусни мозъчни изолати показват, че тези комбинации от лекарства предотвратяват развитието на лекарствена резистентност.

Методи: В настоящото проучване сме заменили гуанидин-НСI с инхибитор на ентеровирусна синтеза на РНК MDL-860, за да проверим ефекта на нова тройна комбинация - плеконарил / MDL-860 / оксоглауцин - прилагана чрез последователно редуващо приложение при новородени мишки, инфектирани подкожно с 20 MLD₅₀ на Коксакивирус В1.

Резултати: Комбинацията плеконарил / MDL-860 / оксоглауцин чрез последователно редуващо се приложение показва висока активност при 75 mg / kg MDL-860 доза: протективен ефект 50% и изразено потискане на титрите на мозъчния вирус. Освен това, наред с профилактиката на лекарствената резистентност, беше установено повишена чувствителност към лекарства. Чувствителността на MDL-860 към плеконарил / MDL-860 / оксоглауцин се увеличава 8,2 пъти спрямо плацебо (29 пъти срещу монотерапия) на 7-ия ден и чувствителността към оксоглауцин - 4,9 пъти спрямо плацебо (6,8 пъти спрямо монотерапия) на 13-ия ден. Що се отнася до плеконарил, е регистрирана демонстративна превенция на лекарствена резистентност без повишаване на чувствителността към лекарства. Ежедневното едновременно приложение на плеконарил / MDL-860 / оксоглауцин не показва зпротективен ефект и води до бързо развитие на лекарствена резистентност.

Изводи: Тези резултати подкрепят използването на последователни курсове на лечение с редуващо приложение, за да се постигне клинично ефективна химиотерапия на ентеровирусните инфекции.

Ефект от последователно редуващо приложение (САА) на тройна анти-ентеровирусна комбинация върху невроинфекция с Coxsackievirus B1 при мишки

Аделина Стоянова, Иванка Николова, Ангел С. Гълъбов

Катедра по вирусология, Институт по микробиология на Стефан Анджелов, БАН, 26
Акад. Ул. Г. Бончев 1113 София, България

РЕЗЮМЕ

Понастоящем не съществуват клинично ефективни антивирусни средства за лечение на ентеровирусни (EV) инфекции. Основната причина е развитието на лекарствена резистентност, основната пречка в развитието на химиотерапия с EV инфекция, основана до сега на монотерапията. Най-важното постижение на нашите предишни проучвания беше разработването на нова схема за прилагане *in vivo* на тройна комбинация от EV инхибитори с различни механизми на действие срещу Coxsackievirus B (CVB) инфекции при мишки. Състои се от последователно редуващо се приложение (САА) на веществата в комбинацията. Тук тествахме ефекта на тройната комбинация плеконарил, гуанидин-НС1 и оксоглауцин (PГО) чрез САА при новородени мишки, заразени с невротропен щам на CVB1 (20 LD50 на мишка). Тази комбинация показва благоприятен протективен ефект с дози от плеконарил от 25-200 mg / kg: намаляване на смъртността (индекс на защита, PI, между 31,3% и 67,7%) и увеличаване средното време на преживяване (MST) с 4-6 дни, Монотерапията с Pleconaril демонстрира активност, подобна на тази на PГО чрез САА, измерена чрез стойности на PI, но стойностите на MST са малко по-ниски. Въпреки това, това съединение значително потиска растежа на заразени кърмачки, особено при 200 mg / kg. Този токсичен ефект беше избегнат с САА на PГО при дози на плеконарил от 25-100 mg / kg. Монотерапията с плеконарил, прилагана на всеки 3 дни, е неефективна. PГО с курс на лечение с САА намалява съдържанието на инфекциозни вируси, докато монотерапията с плеконарил не го прави. Анализ на лекарствена чувствителност в мозъчни проби от мишки, заразени с CVB1, въз основа на стойности на IC50 (50% инхибиторна концентрация) от експерименти с клетъчна култура, показва, че курсът на САА противодейства на развитието на лекарствена резистентност към плеконарил и оксоглауцин в тройната комбинация на PГО и се увеличава чувствителност към лекарства. За разлика от тях, монотерапиите с плеконарил и оксоглауцин водят до лекарствена резистентност. Тези данни ясно доказват ефективността на предложения нов подход - курс на лечение с САА - за комбинирано приложение на инхибитори на репликацията на ентеровирусите.

Характеристика на геномните промени в цервикалните предракови лезии и тумори, индуцирани от различни видове човешки папиломавируси

Петър Грозданов, Савина Хаджидекова, Иванка Димова, Иванка Николова, Драга Тончева, Ганчо Ганчев, Виктор Златков, Ангел С. Гълъбов

РЕЗЮМЕ

Ракът на маточната шийка е второто най-често срещано злокачествено заболяване сред жените по честота и смъртност. Въпреки, че се знае много за етиологията и лечението на рака на шийката на матката, ролята на генетичните промени в многостъпалния път на цервикалната туморогенеза е до голяма степен неизвестна. Целта на това проучване беше да се характеризират геномните промени в цервикалните предракови лезии и тумори, предизвикани от различни видове човешки папиломавируси. В това изследване се използва BlueGnome CytoChip олиго 2 x 10⁵ К микрочипове за цялостен геномен CGH анализ. Извършен е анализ на CGH на Microarray на 40 проби - 12 проби от пациенти с ранен стадий на плоскоклетъчни карциноми; 19 проби от пациенти с лека до умерена дисплазия и 9 с тежка дисплазия. Първо извършихме CGH анализ на пет ДНК групи, които съдържаха ДНК от хомогенна група от пациенти. Резултатите разкриха наличие на микрохромозомни аберации в хромозомна област 14q11.2. Според базата данни за геномите тези аберации представляват полиморфизми. Анализът на ДНК карциномни лезии разкри общо 26 аберации в 14 хромозоми на девет пациенти. Нашите резултати показаха предимствата на чиповете с висока разделителна способност при клиничната диагностика на пациенти с ракови и предракови лезии, причинени от вирусна инфекция с HPV, но също така подчертават необходимостта от широки популационни изследвания, разкриващи молекулярната природа и клиничното значение на различните CNV и създаването на подробни карти на вариации в българското население. Това би улеснило изключително прецизно тълкуване на специфични геномни дисбаланси в клиничния аспект.

Синтез и анти-ентеровирусна активност на нови аналози на MDL-860

Георги М. Добриков³, Ивайло Славчев³, Иванка Николова^б, Аделина Стоянова^б, Надя Николова^б, Лусия Мукова^б, Росица Николова^б, Борис Шивачев^б, Ангел С. Гълъбов¹³*^а

Институт по органична химия с Център по фитохимия, БАН, бл. 9, Акад. Ул. Г. Бончев, София 1113, България
^б Институт по микробиология на Стефан Анджелов, БАН, бл. 26, Акад. Ул. Г. Бончев, София 1113, България
^а Институт по минералогия и кристалография, БАН, бл. 107, Акад. Ул. Г. Бончев, София 1113, България

РЕЗЮМЕ

Ентеровирусите (EV) са едновирежни (+) РНК вируси, принадлежащи към семейство Picornaviridae. Това голямо семейство включва няколко патогена, които са отговорни за широк спектър от клинични прояви, засягащи както хора, така и животни. Всъщност ентеровирусите (EV) са отговорни за поне 10-15 милиона симптоматични инфекции годишно. EV могат да бъдат свързани и с още по-сериозни заболявания, които впоследствие могат да бъдат животозастрашаващи. Такива заболявания включват менингит, енцефалит, миокардит и инсулинозависим диабет и т.н. Коксакивирусите и по-специално тези от група В често са свързани с развитието на миокардит, което може да доведе до внезапна смърт при млади индивиди или да прогресира до дилатативна кардиомиопатия. През последните десетилетия има съобщения, че няколко класа непептидни съединения са селективни инхибитори на ентеровирусна репликация при тестове *in vitro* (експерименти с клетъчна култура). Съществува обаче остра разлика между антивирусната активност, установена *in vitro* и *in vivo* (експерименти с лабораторни животни). За разлика от стотиците инхибитори на репликацията на вируса, показващи *in vitro* ефекти, то тези които проявяват *in vivo* активност са под двадесет. За съжаление, все още не е установена ефективната анти-ентеровирусна химиотерапия за клинична употреба. Развитието на лекарствена резистентност е основната причина за липсата на антивирусни лекарства при клинична употреба при ентеровирусни инфекции. Въпреки това някои анти ентеровирусни съединения са навлезли в клинични изпитвания - изоксазоли („WIN съединения“ - диоксарил, плеконарил), пиродавир и неговите аналози, имидазолидинони, халки, флавани, диарилетери и др.

Диарилетер производно съединение MDL-860 (2- (3,4-дихлорофенокси) -5-нитробензонитрил, известен също като DNB) е съобщено за първи път през 1980 г. В действителност MDL-860 притежава широк спектър на *in vitro* активност срещу пикорнавируси, като инхибира началния стадий на репликация на вируса. Механизмът на действие на MDL-860 беше изяснен в нашата неотдавнашна публикация – взаимодействие с фосфатидилинозитол-4 киназа III бета (PI4KB). MDL-860 показва ефект *in vivo* при модел на миокардит, предизвикан от coxsackievirus B3 (CVB3). Обещаващите резултати са насочили интереса към синтеза на много аналози на MDL-860 през миналите десетилетия. Например, Markley et al. синтезира и тества над 70 диарилетера (и техните изостерични аналози) срещу няколко пиконавируси. Най-новото произведение на Piirstinger et al. доклади за синтеза на 60 нови диарилетера и тяхната активност срещу репликация на CVB3. Всички получени резултати ясно показват, че 2- циано-4-нитрофенокси групата е съществен градивен елемент за антивирусна активност на този клас съединения. Обаче варирането на заместителите в другия ароматен пръстен може да има значително влияние както върху антивирусната активност, така и върху цитотоксичността. Хитичните съединения, които са свързани с Idden, обикновено съдържат два до три халогенни атома във втория ароматен пръстен.

Въпреки отчетените обещаващи резултати, наскоро този клас съединения е пренебрегнат по отношение на по-нататъшно изследване по отношение на тяхната антивирусна активност.

ОТКРИВАНЕ НА ОРАЛНИ ЧОВЕШКИ ПАПИЛОМАВИРУСИ (HPV)

Грозданов С.1, Симеонова Л.2, Николова И.2, Гълъбов А.С.2

„Лабораторен център Пастьор, 2 Отдел по вирусология, Институт по Микробиология
„Стефан Ангелов“, Българска академия на науките

РЕЗЮМЕ

Плоскоклетъчните карциноми (SCCs) са най-често срещаните злокачествени заболявания в областта на главата и шията. Често срещаните рискови фактори при плоскоклетъчен карцинома на главата и шията (HNSCC) са тютюнопушенето и злоупотребата с алкохол, но в нарастващ процент от случаите не се съобщава за история на тютюнопушене или злоупотреба с алкохол.

Преди около 35 години ролята на човешкия папиломен вирус (HPV) при рак на шийката на матката е постулирана. Днес е добре установено как това много хетерогенно семейство от вируси представлява важен канцероген за човека, причинявайки не само огромното мнозинство от тумори на маточната шийка и аногениталиите, но и променлив брой ракови заболявания в други области на човешкото тяло, включително главата и шията. Петата водеща причина за смъртността от рак е орофарингеалния плоскоклетъчен карцином (OP-SCC) - рак на гърлото, свързан с положителни резултати за наличието на HPV. Ракът свързан с вирусна етиология е по-труден за откриване, отколкото този свързан с тютюнопушенето, тъй като симптомите не винаги са очевидни за индивида, който развива заболяването, или за специалистите, които го търсят. Симптомите могат да бъдат много фини и безболезнени. Представяме случаи на трима пациенти (47-годишен мъж, 48-годишен мъж и 55-годишен мъж) с диагноза доброкачествени брадавици в устната кухина са изследвани за наличието на HPV ДНК. Използвахме PCR комплект за качествено откриване на човешки папиломавируси (REF V-10 / 14-50F), предоставен от „Sacace Biotechnologies“. Мишените на PCR реакцията са E6, E2, E1, C1 гени. Използвани са положителни и отрицателни контроли, за да се избегнат фалшиви резултати. Нашият PCR анализ показва наличието на HPV-ДНК (HPV 6) в пробите.

Тестване на Силани за антивирусна активност

Ангел С. Гълъбов¹, Любомира Николаева-Гламб¹, Аделина Стоянова¹, Иванка Николова¹, Николай Петров², Нели Вилхелмова-Илиева¹, Лукия Мукова¹, Ралица Василева-Пенчева¹, Зосер Б. Салама³

¹Институтът по микробиология на Стефан Анджелов, БАН, София, България;

²Нов български университет; ³Siogen Biotech SDN BHD, Берлин, Германия

РЕЗЮМЕ

Четиридесет и три съединения от класа органосиликони бяха изпитани за антивирусна активност чрез широко-спектърна скринингова програма *in vitro*, състояща се от осем моделни щамове на вируси, принадлежащи към седем таксономични групи, включващи причинители на инфекции, при които е показано приложение на химиотерапия. Получените резултати показваха отчетлива активност на ди(хексаноилокси)дифенилсилан (съединение 27) само срещу човешкия цитомегаловирус (SI = 30.9). Отчетлива активност спрямо този вирус при ниска множественост на инфекцията бе отчетена също от 1-о-диметил(октадецил)силил-(2,3,4,6-о-Р^Λ-глюкопиранозид) (съединение 20). Слаб до граничен ефект спрямо този вирус бе намерена при силани 2, 7, 15, 19 и 34, при силани 2, 3 и 25 срещу грипен вирус А(Н3N2) и при силан 9 срещу вирус вакциние. Що се касае до цитотоксичността, установено бе силно вариране спрямо различните използвани клетъчни кул-тури, като най-висока чувствителност бе отчетена при клетки HEp-2.

ИЗПИТВАНЕ НА МЕРОЦИАНИНИ ВЪРХУ РЕПЛИКАЦИЯТА НА ХЕРПЕС СИМПЛЕКС ВИРУС
ТИП 1 В КЛЕТКИ

Иванка Николова, Нели Вилхелмова-Илиева, Цонко Колев, Петър Грозданов,

1 Департамент по вирусология, Институт по микробиология на Стефан Анжелов,
Българска академия на науките, Акад. Ул. Г. Бончев, бл. 26, 1113 София, България 2 Институт по
молекулярна биология „Румен Цанев”, БАН

РЕЗЮМЕ

Определя се цитотоксичността на четири мероцианина (L-6, L-8, L-9 и L-10) върху
монослойната клетъчна култура MDBK. Най-ниската токсичност от всички съединения показва L-
9 (CC50 = 843.5pM), последван от L-10 (CC50 = 603.5pM). Най-висока токсичност показва L-8 (CC50
= 11 pM).

Определена е антивирусната активност на веществата върху репликацията на вируса на
херпес симплекс тип 1 (HSV-1). Значителният ефект върху репликацията на вътреклетъчния HSV-
1 показва вещества L-10 със селективен индекс (SI) = 20,8.

Изследван е и ефектът на тестваните вещества върху активността срещу вирулентността
на извънклетъчните HSV-1 вириони. Активността се определя на пет времеви интервала: 15, 30,
60, 90 и 120 минути. Най-силната активност показва L-8, който намалява титъра на вируса с Alg =
2, последван от L-6, L-9 и L-10 с Alg = 1.75.

Оценка на антимикробни, инхибиращи биофилми и цитотоксични активности на нов хиперразклонен полимер, модифициран с 1,8-нафталимидни единици

Евгения Василева-Тонкова 1 *, Петър Грозданов, Иванка Николова, Десислава Станева 2, Паула Бош 3, Сандра Медел 3, Иво Грабчев 4 '*

1 Институтът по микробиология на Стефан Анжелоф, БАН, София, България

2 Университет по химични технологии и металургия, София, България

3 Институт за наука и технологии на полимерите, Мадрид, Испания

4 СУ „Св. Климент Охридски”, Медицински факултет, София, България

РЕЗЮМЕ

Нов хиперразклонен полимер, модифициран с шест 1,8-нафталимидни единици (P1000-Napht), е тестван ин витро за антимикробна активност срещу грам-положителни бактерии *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus*, грамотрицателни бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter johnsonii* и дрождите *Candida lipolyt*. Новият модифициран полимер показва умерен до добър антимикробен потенциал спрямо тестваните щамове. Ефектът на P1000-Napht върху мембранната пропускливост на бактериални клетки се оценява и се провежда анализ на цитотоксичност срещу HEp-2 клетъчна линия. Антибактериалното покритие на третираната памучна тъкан и филм от полилактична киселина се оценява спрямо грам-положителни и грам-отрицателни бактерии. Получените резултати предполагат, че новият модифициран дендритен полимер може да бъде разработен като обещаваща антимикробна алтернатива за биомедицинско приложение.

ДВЕ СОЛИ НА ВИОЛУРОВАТА КИСЕЛИНА КАТО ИНХИБИТОРИ НА РЕПЛИКАЦИЯТА НА ХЕРПЕС СИМПЛЕКС ВИРУС ТИП I

Нели Вилхелмова-Илиева, Петър Грозданов, Цонко Колев, Иванка Николова

Департамент по вирусология, Институт по микробиология на Стефан Анджелов, български

2Институт по молекулярна биология „Румен Цанев“, Българска академия на науките,

РЕЗЮМЕ

Определя се цитотоксичността на две соли на виолуровата киселина (K-12 и K-98) върху монослойната клетъчна култура MDBK. И двете вещества показват близки стойности на токсичност K-12 (CC50 = 640 pM) и K-98 (CC50 = 630 pM).

Определена е антивирусната активност на веществата върху репликацията на вируса на херпес симплекс тип 1 (HSV-1). По-силен ефект върху репликацията на вътреклетъчния HSV-1 показаха вещества K-98 със селективен индекс (SI) = 74. Значителна активност демонстрира и другото вещество K-12 (SI = 64).

Изследван е и ефектът на тестваните вещества върху активността срещу вирулентността на извънклетъчните HSV-1 вириони. Активността се определя на пет времеви интервала: 15, 30, 60, 90 и 120 минути. Отбелязва се нисък вирусоциден ефект на 30 минути с Alg = 1,5 за двете съединения. K-12 показва по-висока стойност на инхибиране на Alg = 1,75, когато се измерва на 90та минута.

Анти ентеровирусна активност на нови MDL-860 аналози: синтез, *in vitro* / *in vivo* изследвания и QSAR анализ

Иванка Николоваб, Ивайло Славчева, Мартин Равуцова, Мирослав Дангалова, Яна Николоваа, Ирена Загранярска, Аделина Стояноваб, Надя Николоваб, Лусия Муковаб, Петър Грозданов, Росица Николовач, Борис Шивачевц, Виктор Е. Кузьминд, д, Людмила Н. Огниченкод, д, Ангел С. Гълъбов ^ *, Георги М. Добриков ^ *

Институт по органична химия с Център по фитохимия, БАН, бл. 9, Акад. Ул. Г. Бончев, София 1113, България б Институт по микробиология на Стефан Анджелов, БАН, бл 26, Акад. Ул. Г. Бончев, София 1113, България с Институт по минералогия и кристалография, БАН, бл 107, Акад. Ул. Г. Бончев, София 1113, България d A.V. Богатски физико-химичен институт НАН на Украйна, Катедра по молекулярна структура и химиоинформатика, Одеса, Украйна и Национален политехнически университет в Одеса, Катедра на теоретичната основа на химията, Одеса, Украйна

РЕЗЮМЕ

Бяха синтезирани серия от 60 нитробензонитрилни аналози на антивирусното вещество MDL-860 (50 от които са нови) и оценени за тяхната активност срещу три вида ентеровируси (coxsackievirus B1, coxsackievirus B3 и poliovirus 1). Сред тях, шест диарилови етери (20e, 27e, 28e, 29e, 33e и 35e) демонстрират висока *in vitro* активност ($SI > 50$) спрямо поне един от тестваните вируси и много ниска цитотоксичност спрямо човешките клетки. Съединение 27e притежава най-широк спектър на активност спрямо всички тествани вируси подобно на MDL-860. Най-активните производни (27e, 29e и 35e) срещу Coxsackievirus B1 бяха тествани *in vivo* при новородени мишки, експериментално заразени с 20 MLD50 на Coxsackievirus B1. Съединение 29e показва обещаваща *in vivo* активност (индекс на защита 26% и 4 дни удължаване на средното време на преживяване). QSAR анализ на субституиращите ефекти върху *in vitro* цитотоксичността (CC50) и антивирусната активност на нитробензонитриловите производни е проведен и са създадени адекватни QSAR модели за антивирусна активност на съединенията срещу полиовирус 1 и coxsackievirus B1.

Антимикробна, антибиофилмова и цитотоксична активност на нов хидринразклонен полимер в акридин в разтвор и върху памучна тъкан

Евгения Василева-Тонкова, Десислава Станева², Сандра Медел³, Паула Бош³, Петър Грозданов¹, Иванка Николова¹, и Иво Грабчев⁴ *

Институтът по микробиология на Стефан Анжелоф, БАН, София 1113, България
2Университет по химична технология и металургия, София 1756, България 3Институт за наука и технологии на полимери, ICTR-CSIC, Мадрид 28006, Испания 4Факултет по медицина, Софийски университет “ св. Климент Охридски “, София 1407, България

РЕЗЮМЕ

За първи път флуоресцентен хиперразклонен полимер, модифициран с акридин (P1000-Acrid), е тестван *in vitro* за антимикробна активност срещу различни моделни патогени. Резултатите показват силна активност на съединението срещу използваните Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии и дрожди. Ефектът на цитотоксичност на P1000-Acrid е проучен към HEp-2 клетъчна линия. Антибактериалното завършване на памучна тъкан, обработена с P1000-Acrid, беше оценено спрямо грам-положителни и грам-отрицателни бактерии. Доказано е, че изследваният полимер P1000-Acrid намалява растежа на бактериите и предотвратява образуването на биофилм. Получените резултати показват, че изследваният P1000-Acrid хиперразклонен полимер притежава добър антимикробен потенциал с най-голяма ефективност спрямо използваните Грам-положителни щамове.

Анти-херпес симплекс вирус тип 1 активност на специално подбрани групи танини

Автори

Neli Vilhelmova-Ilieva¹, Remi Jacquet², Denis Deffieux², Laurent Pouysegu², Tahiri Sylla², Stefan Chassaing², Ivanka Nikolova¹, Stephane Quidou², Angel S. Galabov¹

¹ Катедра по вирусология, Института по микробиология на Стефан Анжелов, БАН, София, България

² Унив. Бордо, ISM (CNRS-UMR 5255), Cedex, Франция

РЕЗЮМЕ

Анти-херпес вирус симплекс тип 1 (HSV-1) активност на 9 елагитанини, включващи 6 естествени съединения (касталин, вескалин, акутисимин А, епиакутисимин А и В, монголикаин) и 3 синтетични производни на вескалагин (VgSBuSH, VgSOctSH, VgOMe) и 13 галотанинови съединения [Gal-01A, Gal-01B, Gal-02A, Gal-02B, Gal-03M, Gal-04A, Gal-04B, Gal-05M, Gal-07, Gal-08, Gal-09, Gal-11M (танинова киселина), както и Gal-12 (галова киселина), Gal-13 и Gal-14 (елагинова киселина)] бяха изследвани в монослойна клетъчна култура MDBK. Тяхната антивирусна активност се определя от инхибирането на цитопатичния ефект (CPE) и тяхната цитотоксичност се оценява чрез спектрофлуориметричен анализ. По принцип серията елагитанини показва значително по-силна активност върху репликация на HSV-1 в сравнение с тази на галотанините. Шест от тестваните елагитанини проявяват добре изразена активност: епиакутисин-симин В (индекс на селективност, SI > 60,6), епиакутисимин А (SI > 55,5), акутисисимин А (SI > 34,8), монголицин (SI > 32,5), VgSBuSH (SI > 24,6) и VgOMe (SI > 22,0). Четири галотанинови компреси инхибират репликацията на HSV-1 в по-ниска, но все още значителна степен: Gal-04B (SI > 35,7), Gal-04A (SI > 28,5), Gal-11M (танинова киселина) (SI > 25) и Gal-05M (SI = 15,6).

Геномен анализ на изолатите на coxsackievirus B1 по време на последователния редуващ курс на прилагане на тройна антивирусна комбинация при новородени мишки

Петър Грозданов, Мари-Лайн Жофрет, Аделина Стоянова¹, Патси Полстън, Емна Ачури, Иванка Николова, Франсис Делпейрукс² и Ангел S Гълъбов¹®

РЕЗЮМЕ

Предистория: Разработихме нов подход за лечение на ентеровирусни инфекции, алтернативно последователно редуващо приложение (CAA) на комбинация от ентеровирусни инхибитори. На модела на Coxsackievirus B1 (CVB1) при мишки бяха наблюдавани два явления: липса на лекарствена резистентност и повишена чувствителност към антивирусни лекарства. Това проучване има за цел да изясни генетичната основа на тези явления.

Методи: Мозъчни проби от мишки, инфектирани с CVB1, подложени на CAA курс с комбинацията плеконарил / MDL-860 / оксоглауцин, се използват за екстракция на вирусна РНК последвано от пълно геномно секвениране. Успоредно с това бяха изследвани проби от монотерапевтични курсове на трите вещества, включени в комбинацията. Цялостен геномен анализ бе проведен на всички проби.

Резултати: Пробите от монотерапия с плеконарил показват мутации в 5' нетранслиращата област, VP3, 2C, 3C и 2A области на вирусна РНК, проявена в заместване на аминокиселина в структурата на 2A протеина. Курсът на третиране с MDL-860 предизвика промени в CVB1 РНК в областите VP3 и 2C. Монотерапевтичните проби от оксоглауцин показват мутация на РНК и заместване на аминокиселини в областта VP1 и заместване на нуклеотиди в 3D региона. В пробите, взети от мишки, подложени на курс на CAA с плеконарил / MDL-860 / оксоглауцин, са установени следните РНК мутации: 5' нетранслиращия регион, 2A и 2B и замествания на аминокиселини в VP3 и 2A, които се различават от тези споменати по-горе. Тези промени могат да бъдат причина за предотвратяване на развитието на лекарствена резистентност, а също и да се считат за основа на явлението повишена чувствителност към лекарства.

Изводи: Резултатите показват, че високата анти-ентеровирусна ефикасност на курса на CAA се подкрепя от появата на специфични промени във вирусния геном.

Антивирусни, цитотоксични и антиоксидантни ефекти на суров екстракт от *Tanacetum vulgare* L. *in vitro*

Нели Вилхелмова¹, Лора Симеонова¹, Надя Николова¹, Елица Л. Павлова², Златина Господинова³, Георги Антоv³, Ангел С. Гълъбов¹, Иванка Николова¹ *

¹Институтът по микробиология на Стефан Ангелов, БАН, ул. Георги Бончев 26, 1113 София, България

²Софийски университет "Св. Климент Охридски", Физически факултет, бул. Джеймс Баучер 5, 1164 София, България

³Институт по физиология и генетика на растенията, БАН, 21 Георги Бончев, 1113 София, България

Въведение: Поради голямото разпространение на вирусни инфекции, които нямат специфично лечение и постоянното развитие на резистентни вирусни мутанти, търсенето на ефективни антивирусни съединения е от съществено значение. Настоящата работа изследва *in vitro* антивирусната активност на етанолен екстракт от въздушните части на *Tanacetum vulgare* L. срещу вирусни щамове от три таксономични групи, включително агенти, които причиняват социално значими заболявания при хора, за които е наложителна антивирусна химиотерапия, а именно Coxsackievirus B1 (семейство Picornaviridae), вирус херпес симплекс тип 1 (семейство Herpesviridae) и вирус на грип А (семейство Orthomyxoviridae).

Цел: Целта на настоящото проучване е да се оцени антивирусната активност на етанолен екстракт от тревисто растение *Tanacetum vulgare* L. срещу някои важни човешки вируси, за които е необходима антивирусна химиотерапия, и да се характеризира екстрактът за неговата антиоксидантна активност *in vitro*.

Материали и методи: Суровият воден етанолов екстракт от въздушните части на *Tanacetum vulgare* L. съдържа: флавоноиди, определени като апигенин; кумарини, определени като ескулантанови съединения, определени като танин и други. Антивирусната активност на етанолен екстракт от тревисто растение *Tanacetum vulgare* L. срещу Coxsackievirus B1, грип А и Herpes simplex вирус тип 1 се оценява чрез вирусна техника за намаляване на добива. Общата антиоксидантна активност се определя чрез измерване на способността на пробата да инхибира генерирането на реактивни вещества с тиобарбитурова киселина (TBARS).

Резултати: Резултатите показват най-ниската токсичност на екстракта по клетъчната линия на MDBK и близка цитотоксичност при Herp-2, докато в клетките на MDCK показват повече от два пъти най-висока токсичност. Тестване на антивирусната активност на екстракт от *Tanacetum vulgare* L. показва леко инхибиране на репликацията на HSV-1 със селективен индекс 7.07 и IAV / H3N2 (SI = 3.69), но не се съобщава за специфичен антивирусен ефект срещу репликацията на CVB1. Оценката на антиоксидантната активност показва голяма антиоксидантна активност на етаноловия екстракт от *T. vulgare* - 26 mmol / l за прилагания 20 mg / ml екстракт.

Изводи: Суровият екстракт от въздушните части на лечебното растение *Tanacetum vulgare* L. демонстрира ниска цитотоксичност при Herp-2, MDBK и умерен цитотоксичен ефект в MDCK клетки. Той проявява значителна антивирусна активност срещу HSV-1, както е определено от записаното инхибиране на вирусна репликация, блокиране на влизане на вируса - етап на абсорбция и директни вируцидни ефекти върху извънклетъчните вириони. Наблюдаваният ефект при тестване на екстракта на *Tanacetum* върху грип инфекция с вируса на H3N2 *in vitro* е по-мек, който вероятно е резултат от намесата на клетъчните пътища, участващи

в цикъла на репликация. Наличието на активност, потискаща вируса и адсорбция, но отсъствието на инхибиращи ефекти на вирусна репликация срещу CBV-1 предполага възможно взаимодействие на компонентите на екстракта с вирусни капсидни протеини или свързани клетъчни рецептори.

Характеристика на бактериоцин, произведен от *Streptococcus thermophilus* 81

И. Иванова, В. Митеваб, Цв. Стефановац, А. Пантева, И. Будаков, С. Дановаа, П. МончеваЗ, И. Николоваб, Х. Дусед, П. Боявале

а Катедра по микробиология, Биологически факултет, Софийски университет, бул. Драган Цанков 8, 1421 София, България бИнститут по микробиология, БАН, 26 Акад. Ул. Бончев, 1113 София, България cELBY Bulgaricum PLC, комплекс Lagera 44 A, 1612 София, България dENITIAA, Laboratoire de Microbiologie, Rue de la Geraudiere, 44072 Nantes Cedex, Франция eINRA, Laboratoire de Recherches de Technologie Laitiere, 65 Rue de Saint- Brieuc, 35042 Rennes Cedex, Франция

РЕЗЮМЕ

Нов бактериоцин, произведен от *Streptococcus thermophilus* 81, е изолиран, пречистен и характеризиран. По своята топлинна чувствителност и широк инхибиторен спектър не прилича на никакъв друг *S. thermophilus* бактериоцин. Начинът на действие е бактериостатичен. Този пептид от 32 аминокиселини е ефективен срещу няколко вида *Bacillus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*. Този бактериоцин е топлинно лабилен, но неговата активност не се променя при промяна на рН от 3 до 10. Шест месеца на съхранение при 40 ° С не влияят на активността. Инактивирането чрез детергенти и невъзможността за разделяне на протеина в SDS-PAGE предполага по-сложна структура или възможен стабилизиращ ефект на други молекули. Ниската чувствителност на *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* към изолирания бактериоцин предполага, че *S. thermophilus* 81 може да се използва в предястия с кисело мляко.

Нов полипропилен имин дендример, модифициран с акридин и неговия Cu (II) комплекс:
синтез, характеристика и антимикробна активност

Паула Бош ^{1*}, Десислава Станева, Евгения Василева-Тонкова, Петър Грозданов ³,

Иванка Николова ³, Росица Кукева, Радостина Стоянова ⁴ и Иво Грабчев ^{5*}

¹ Институт за наука и технология на полимерите, Институт за наука и технологии на полимерите
- Испански национален изследователски съвет (ICTP-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Мадрид,
Испания

² Катедра по химическа технология, Университет по химична технология и металургия,
1756 София, България

³ Институтът по микробиология на Стефан Анджелов, БАН, 1113 София, България

⁴ Институт по обща и неорганична химия, БАН, 1113 София, България

⁵ Медицински факултет на СУ "Св. Климент Охридски", 1407 София, България

РЕЗЮМЕ

Второ поколение поли (пропилен имин) дендример, модифициран с акридин и неговия Cu (II) комплекс, са синтезирани за първи път. Установено е, че два медни йона образуват комплекси с азотните атоми на дендримерното ядро чрез координатни връзки. Новите съединения са изследвани с ядрено-магнитен резонанс (ЯМР), електронен парамагнитен резонанс (EPR), инфрачервена спектроскопия с преобразуване на фурие (FTIR) и флуоресцентна спектроскопия. Спектралните характеристики на модифицирания дендример са измерени в различни органични разтворители и е наблюдаван отрицателен флуоресцентен солватохромизъм. Антимикробната активност на дендримерите е тествана срещу моделни патогенни микроорганизми в агар и чрез метод на разреждане с бульон. Памучната тъкан, обработена с двата дендримера, е оценена спрямо патогенни микроорганизми. Доказано е, че получените модифицирани памучни тъкани възпрепятстват растежа на бактериите и предотвратяват образуването на биофилми. Цитотоксичността на дендример е изследвана *in vitro* в клетъчната линия HEp-2.