

ПОШУК ПЕРСПЕКТИВ ДЛЯ НОВИХ СХЕМ ПРОТИВІРУСНОЇ ТЕРАПІЇ

З. С. Клестова¹, В. С. Тацута², А. К. Вороніна³, Ш. Дгебуадзе⁴

¹Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

²Інститут ветеринарної медицини НААН

³Інститут фармакології та токсикології НАМН

⁴Технічний університет Грузії (м. Тбілісі, Грузія)

У статті представлено перспективу застосування нових індол-вмісних конденсованих тетрациклічних сполук, що призводить до змінення інфекційних властивостей ДНК- та РНК-вмісних вірусів у системі in vitro на моделі перещеплюваних культур клітин тварин (ВНК-21, СНЕВ, SK-6) за застосування їх у 5 схемах. Встановлено, що частина досліджуваних похідних індолу діють тільки в окремих схемах застосування або культурах клітин, а інші — в різних. Виявили для деяких тестованих похідних індолу (із 50 досліджених) значну противірусну активність (із зниженням титру вірусів у діапазоні від $1,51 \pm 0,06$ до $5,38 \pm 0,09$ lg ТЦД₅₀/см³) при застосуванні у двох і більше системах культивування, що свідчить про суттєвий біологічний ефект. Встановлено, що 18 похідних індолу мають здатність знижувати інфекційну активність обох груп вірусів, як ДНК-вмісного герпес-вірусу (на прикладі вірусу хвороби Ауескі), так і РНК-вмісного вірусу (на прикладі вірусу трансмісивного гастроентериту свиней), що дає підстави для проведення клінічних випробувань нових хімічних сполук в якості кандидатів у противірусні препарати.

Останніми роками спостерігається зростання числа нових інфекційних хвороб, що характеризуються незвичайними проявами або поява відомих інфекційних хвороб в нових змінених формах епідемічного процесу, прояву і течії, що виникли внаслідок змін збудника і поширюються на нову географічну зону або популяцію. У більшості випадків ці інфекції є спільними для людей і тварин, виникають спочатку у тварин, птахів, а потім у людини. Це так звані «емерджентні хвороби» (від англійського *emergency* — непередбаченість, надзвичайність, незвичайність), серед яких приблизно 75 % — це зоонози. Вони можуть виходити за межі ендемічних зон. До них відносяться збудники та хвороби, що виникають або з'являються раптово, які створюють напружену надзвичайну ситуацію. Часто такі інфекції виникають непередбачувано та стають для людства серйозною проблемою як щодо лікування, так й профілактики та їх ліквідації. Часто збудник тривалий час є не діагностований, оскільки немає до нього чутливих тест-систем, що сприяє швидкому його поширенню та зайняттю нових екологічних ніш. Відомими прикладами можуть бути такі інфекції як "атипова пневмонія", що була викликана появою нового корона-вірусу; ВІЛ, різні геморагічні лихоманки — Ласса, Ебола, Марбурга; хвороба НІПА та інші. Це є незначним переліком нових емерджентних інфекцій, викликаних вірусами. Як відомо, віруси є паразитами клітин і від швидкості їх реплікації та реакції противірусних сполук, в тому числі клітинного інтерферону, часто залежить існування клітин. Проблема сьогодення є не тільки відсутність швидких діагностичних методів виявлення нових збудників, але і дієвих засобів боротьби із ними. Стосовно вірусних інфекцій, нажаль, в світі розроблена незначна кількість комерційних противірусних препаратів, ефективних щодо збудників, особливо, які були б дієві і застосовані в противірусній терапії як проти ДНК-вмісних, так і проти РНК-вмісних вірусів. Особливо гостро постає питання наявності таких противірусних препаратів за швидкого поширення

нових вірусних інфекцій, або ремерджентних захворювань [1–9]. Це ми спостерігаємо зараз при розповсюдженні геморагічної лихоманки Ебола.

Вважають, що природними господарями вірусу Ебола є фруктові кажани родини *Pteropodidae*. Вірус Ебола потрапляє в популяцію людини в результаті тісного контакту з кров'ю, виділеннями, органами або рідинами організму інфікованих тварин, наприклад шимпанзе, горил, фруктових кажанів, мавп, лісових антилоп і дикобразів, виявлених мертвими або хворими у вологих лісах.

Незважаючи на те, що вірус вперше заявив про себе ще в 1976 році, в ході 2 одночасних спалахів — в Судані та Демократичній Республіці Конго (в селищі поруч з річкою Ебола, звідки і пішла назва) і досі не розроблена дієва терапія. Поточний спалах в Західній Африці (перші випадки на лихоманку Ебола були зареєстровані в березні 2014 р.) є найбільшим і складним із часу виявлення цього вірусу.

Однак, конкретної вакцини досі не існує. Фармацевтичні компанії не хочуть вкладатися в проект із створення вакцини, в силу його попередньої незатребуваності, оскільки за 36 років, з моменту виявлення вірусу, було всього 2200 хворих. Проте, в даний час проводиться оцінка ряду потенційних засобів лікування, включаючи продукти крові. Ліцензованих вакцин поки не існує, проте 2 потенційні вакцини проходять тестування на безпеку для людей [10].

Таким чином, актуальність питання створення нових противірусних засобів не викликає сумнівів.

Серед великої різноманітності хімічних сполук із потенційною противірусною активністю, похідні індолу можна розглядати як одні з найбільш перспективних в боротьбі з вірусними інфекціями. Широкий спектр фізіологічної активності численних індол-вмісних тетрациклічних сполук — як природного, так і синтетичного походження — свідчать на користь такого припущення [11,12].

Мета досліджень — виявлення придатності впливати на інфекційну активність вірусів нових індол-вмісних конденсованих тетрациклічних сполук у доклінічних дослідженнях (в системі *in vitro*).

Матеріали і методи. Дослідження нових індол-вмісних тетрациклічних сполук, синтезованих групою науковців з Грузинського технічного університету під керівництвом Шоти Дгебуадзе, проводили в системі *in vitro* у 3-х перещеплюваних культурах клітин (КК) тварин, таких як ВНК-21 (нирка сирійського новонародженого хом'яка), SK-6 (нирка свині), СНЕВ (нирка ембріона свині версенізована). Цією дослідницькою групою для синтезу нових тетрациклічних конденсованих систем постійно був застосований індол як основна біциклічна система, а в якості другої біциклічної системи були використані бензотіофен, бензофуран, бензотіоксин, бензотіазин або його діоксид, бензодитиїн, кумарин тощо (важливі системи з фармакологічної точки зору). Культури клітин були отримані з Клітинного банку ліній з тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України. Виявляли противірусну активність похідних індолу щодо вірусів хвороби Ауескі (псевдосказ) та трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС), які були надані Національним центром штамів мікроорганізмів України Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. Перещеплювану культуру клітин вирощували в 96-лункових культуральних плоскодонних планшетах у CO₂-інкубаторі за температури 37 °С, 5% вмісті CO₂ та 88 % вологості повітря. Через 24-48 год. при формуванні моношару клітин використовували 5 різних схем внесення похідних індолу до моношару клітин, що дало змогу спробувати подіяти на різноманітні етапи репродукції вірусів. Дослідними хімічними сполуками обробляли моношар клітин за 24 години до (профілактична схема), під час (лікувально-профілактична схема) та через 1,5 години після (лікувальна схема) адсорбції вірусу на клітинах. Також у двох варіаціях віруліцидної схеми до внесення вірусу на моношар клітин його змішували з хімічною сполукою з експозицією 1 година. В контролях

проводили заміну поживного середовища на середовище без речовини та середовище з розчинником. В якості розчинника похідних індолу застосовували диметилсульфоксид.

Відбір хімічних препаратів проводили на підставі пригнічення вірус-індукованого ЦПЕ у культурі клітин тварин. Стан клітин на наявність цитопатичної дії контролювали кожні 24 години в інвертованому мікроскопі, а через 96 годин визначали титр інфекційної активності вірусів в дослідних та контрольних лунках. Визначали мінімально активну концентрацію (МАК) індол-вмісних сполук, тобто таку, що знижує інфекційний титр вірусу не менше ніж на $1,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ порівняно з титром вірусу в контролі без додавання хімічної сполуки. Після визначення показників цитотоксичності та противірусної дії обчислювали ХТІ (хіміотерапевтичний індекс), який є основним критерієм оцінки ефективності речовин у культурі клітин при первинному відборі і доцільності подальших випробувань *in vivo*. ХТІ визначали як відношення МДК (максимально допустимої концентрації) до МАК. Виражену активність проявляють сполуки, застосування МДК яких призводить пригнічення репродукції вірусу в умовах одно циклового досліду не менше ніж на $1,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ [13,14]. Такі сполуки вважаються високоактивними та перспективними для подальшого дослідження на тваринах. Статистичну обробку результатів проводили методом Стюдента.

Результати й обговорення. Поява нових емерджентних та ремерджентних вірусних хвороб вимагає створення нових заходів з їх ліквідації та профілактики. Одними із засобів, що можуть використовуватись у боротьбі з вірусними інфекціями тварин є нові противірусні препарати, пошуки яких тривають у всьому світі. Але вони у більшості своїй базуються на так званому сліпому скринінгу. Багато природніх та хімічних сполук і їх сумішей були протестовані щодо антивірусної активності як в культурах клітин, так і інших біологічних моделях. Активні сполуки чи суміші, які блокували вірусну реплікацію *in vitro*, потім очищували, фракціонували та тестували за допомогою різних методів та культур клітин, а також модельних тварин щодо їх активності та безпечності.

Нами тестовані похідні індолу (50) в системі *in vitro*, для чого використані три види культур клітин тварин та п'ять схем застосування речовин: дві схеми з віруліцидною дією, профілактична, лікувально-профілактична та лікувальна. Виявили противірусну дію дослідних сполук, що за проявом впливу на інфекційні властивості вірусів була різною. Тому, нами було умовно поділено досліджувані речовини на три групи за ступенем вираженості інгібіції інфекційних властивостей дослідних РНК- та ДНК-вмісних вірусів (корона-вірусу трансмісивного гастроентериту свиней та герпес-вірусу хвороби Ауескі). Результати наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Перелік похідних індолу, здатних вірогідно знижувати активність як вірусу хвороби Ауескі, так і вірусу ТГС

| Віруси | Похідні індолу з противірусним ефектом | | | Кількість |
|-----------------------|---|---|--|-----------|
| | Достатньо виражений ($1,5-2,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) | Помірно виражений ($2,3-3,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) | Виражений ($3,1 \geq \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) | |
| Хвороби Ауескі | №: 32; 41; 42; 173; 174; 183; 194 | №: 178; 197; 204; 205; 206; 207. | №: 179; 181; 203; 208; 209; 210; 211; 212 | 21 |
| ТГС | №: 34; 180; 183; 184; 191; 192; 194; 195; 196; 198; 199; 208 | №: 14; 29; 41; 42; 168; 169; 175; 176; 198 | №: 173; 178; 179; 181; 197; 203; 204; 205; 206; 209; 210; 211; 212 | 33 |
| Хвороби Ауескі та ТГС | №: 41; 42; 173; 178; 179; 181; 183; 194; 197; 203; 204; 205; 206; 208; 209; 210; 211; 212 | | | 18 |

Досліджуючи різноманітними схемами противірусні властивості 50 похідних індолу (всього 3468 експериментів), встановлено, що індол-вмісні сполуки під номерами GTU (Georgian Technical University): №: 41; 42; 173; 178; 179; 181; 183; 194; 197; 203; 204; 205; 206; 208; 209; 210; 211; 212 (всього 18 сполук) значно знижували активність обох вірусів, як вірусу

хвороби Ауескі та і вірусу ТГС. Крім того, слід зазначити, що ми спостерігали таке явище — сполуки, які не впливали суттєво на зниження титру одного з вірусів, у той же час показували протівірусну дію щодо іншого. Так, похідні індолу під номерами GTU: 14, 29, 34, 168, 169, 175, 176, 180, 184, 191, 192, 195, 196, 198, 199 взагалі або достатньо не знижували активність вірусу хвороби Ауескі, а, у свою чергу, протівірусну активність щодо вірусу ТГС не виявили лише у 3-х похідних індолу: GTU-32, GTU-174, GTU-207.

Крім того, виявили групу сполук, яка здатна знижувати титри вірусів більше, ніж на $3,10 \lg$ ТЦД₅₀/см³. Такими сполуками для вірусу хвороби Ауескі була група сполук: №: 179; 181; 203; 208; 209; 210; 211; 212 (всього 8 похідних індолу). Для вірусу трансмісивного гастроентериту — це була група сполук: №: 173;178; 179; 181;197;203;204; 205;206; 209; 210; 211; 212 (всього 13 похідних індолу). Такі значні значення зниження титрів інфекційної активності вірусів свідчить про досить високий потенціал сполук для можливого застосування у клінічних дослідженнях в системі *in vivo*. Якщо буде знайдена кореляція між дослідженнями в системі *in vitro* за умови безпечності цих сполук для тварин (за результатами гострої та хронічної токсичності), то можливо запропонувати застосування цих сполук у протівірусних препаратах.

Нами вже проведено частину дослідів з деякими перспективними вищевказаними сполуками в дослідях на лабораторних тваринах при проведенні встановлення гострої та хронічної токсичності. Доки не виявлено значної токсичної дії, але досліді тривають і результати будуть повідомленні окремо.

Крім того, нами були визначені хіміотерапевтичні індекси деяких із тестованих сполук, що проявили значну протівірусну дію. Дані наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Мінімально активна концентрація та хіміотерапевтичний індекс похідних індолу в системі *in vitro*, n=5

| № похідного індолу | Віруси | Культура клітин | МДК, мкг/см ³ | МАК, мкг/см ³ | ХТІ |
|--------------------|---------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|-----|
| 179 | ТГС | ВНК-21 | 100 | 50 | 2 |
| 179 | ТГС | СНЕВ | 12,5 | 6,25 | 2 |
| 179 | Хвороби Ауескі | ВНК-21 | 100 | 25 | 4 |
| 178 | ТГС | ВНК-21 | 25 | 12,5 | 2 |
| 178 | Хвороби Ауескі | СНЕВ | 25 | 25 | 1 |
| 181 | ТГС | ВНК-21 | 25 | 12,5 | 2 |
| 181 | Хвороби Ауескі | СНЕВ | 25 | 12,5 | 2 |
| 181 | Хвороби Ауескі | SK-6 | 25 | 25 | 1 |
| 197 | ТГС | СНЕВ | 50 | 25 | 2 |
| 203 | ТГС | ВНК-21 | 1,56 | 0,78 | 2 |
| 209 | ТГС, Хвороби Ауескі | СНЕВ | 50 | 25 | 2 |
| 210 | ТГС, Хвороби Ауескі | ВНК-21 | 50 | 25 | 2 |
| 212 | ТГС, Хвороби Ауескі | ВНК-21, СНЕВ | 25 | 12,5 | 2 |

Незважаючи на те, що ХТІ коливався від 1 до 4 у досліджуваних похідних індолу, слід зауважити на такий момент як їх значення з максимально допустимої концентрації. Як свідчать дані, наведені в таблиці 2, МДК для наведених у ній сполук коливалась у діапазоні 1,56 - 100 мкг/мл, що слід надалі враховувати. Причому, для однієї і тієї ж речовини МДК в різних культурах клітин становила часто різні значення, що свідчило про різну чутливість певної біологічної моделі до тієї сполуки. Тому нами і застосовувалось більше, ніж одна біологічна модель і більше схем застосування речовин.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що при застосуванні в системі *in vitro* нових індол-вмісних конденсованих тетрациклічних сполук можливо досягти значного зниження інфекційної активності вірусів-збудників інфекційних хвороб тварин.

2. Встановлено, що частина досліджуваних похідних індолу мають вплив на той чи інший вірус тільки в окремих схемах застосування або в культурах клітин, а інші - в різних. Встановлено, що 18 похідних індолу мають здатність знижувати інфекційну активність як представника ДНК-вмісних вірусів (вірусу хвороби Ауескі), так і РНК-вмісних вірусів (вірусу трансмісивного гастроентериту свиней), що дає підстави для проведення клінічних випробувань з їх застосуванням в якості кандидатів у противірусні препарати.

Перспективи подальших досліджень. Отримані дані дають змогу рекомендувати нові досліджені індол-вмісні конденсовані тетрациклічні сполуки щодо подальшого їх доклінічного (на лабораторних тваринах) та клінічного дослідження з метою відбору найбільш ефективних для створення антивірусних препаратів проти герпес-вірусів та корона-вірусів, які є збудниками небезпечних захворювань людини і тварин.

Подяка. Висловлюємо щиру вдячність співробітницям Інституту ветеринарної медицини НААН Реуцькій Т. Є., Мельниченко О. М. та аспірантці ІВМ НААН Дремух Ю. Ю. за всебічну допомогу при виконанні цієї роботи, яка проведена за фінансової підтримки Українського науково-технологічного центру (проект Р450).

PROSPECTS SEARCH FOR A NEW SCHEMES OF ANTIVIRAL THERAPY

Z. S. Klestova¹, V. S. Tashuta², A. K. Voronina³, S. Dgebuadze⁴

¹State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains Microorganism

²Institute of Veterinary Medicine NAAS

³Institute of Pharmacology and Toxicology NAMS

⁴Georgian Technical University (Tbilisi, Georgia)

S U M M A R Y

The paper presents the perspective of the application of new indole-containing condensed tetracyclic compounds resulting in change of infectious properties of DNA and RNA-containing viruses *in vitro* system to model animals inoculated cell cultures (BHK-21 SNEV, SK-6) for their use in 5 circuits. Found that of indole derivatives are studied only in some schemes use or cell cultures, and others — different. Discovered some indole derivatives tested (from 50 studies) significant antiviral activity (reduction of virus titer in the range of $1,51 \pm 0,06$ to $5,38 \pm 0,09$ lg TTSD₅₀/cm³) when used in two or more cell cultures, indicating that a significant biological effect. Found that 18 derivatives of indole with the ability to reduce infectious activity of both groups of viruses as DNA-containing herpes-virus (for example Aujeszky's disease virus) and RNA-containing viruses (for example, transmissible gastroenteritis virus of pigs) that gives grounds for clinical trials new chemical compounds as candidates for antiviral drugs.

ПОИСК ПЕРСПЕКТИВ ДЛЯ НОВИХ СХЕМ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

З. С. Клестова¹, В. С. Ташута², А. К. Воронина³, Ш. Дзгбуадзе⁴

¹Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов

²Институт ветеринарной медицины НААН

³Институт фармакологии и токсикологии НАМН

⁴Грузинский технический университет (г. Тбилиси, Грузия)

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье представлены перспективы применения новых индол-содержащих конденсированных тетрациклических соединений, что приводит к изменению инфекционных свойств ДНК и РНК-содержащих вирусов в системе *in vitro* на модели перевиваемых культур клеток животных (ВНК-21, СПЭВ, СК-6) при применении их в 5 схемах. Установлено, что часть исследуемых производных индола действует только в отдельных схемах применения или культурах клеток, а другие — в разных. Обнаружили для некоторых тестируемых производных индола (из 50 исследованных) значительную противовирусную активность (со снижением титра вирусов в диапазоне от $1,51 \pm 0,06$ до $5,38 \pm 0,09$ lg ТЦД₅₀/см³) при применении в двух и более системах культивирования, что свидетельствует о существенном биологическом эффекте. Установлено, что 18 производных индола обладают способностью снижать инфекционную активность обеих групп вирусов, как ДНК-содержащего герпес-вируса (на примере вируса болезни Ауески), так и РНК-содержащего вируса (на примере вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней), что дает основания для проведения клинических испытаний новых химических соединений в качестве кандидатов в противовирусные препараты.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Каришева А. Ф.* Спеціальна епізоотологія / А. Ф. Каришева. — Київ : Вища Освіта, 2002. — 703 с.
2. *Ташута С. Г.* Вірусна патологія тварин / С. Г. Ташута. — Київ : Аграр Медіа Груп, 2013. — 399 с.
3. Вирусные болезни животных / В. Н. Сюрин [та ін.]. — М. : ВНИТИБП, 1998. — 928 с.
4. *Shallendra K Saxena.* Advances in antiviral drug discovery and development: Part 1: Advancements in antiviral drug discovery / Shallendra K Saxena, Niraj Mishra & Rakhi Saxena // Future Virology. — 2009. — V. 4(2). — P. 101–107.
5. *Hugh J Field.* Antiviral drug development / Hugh J Field, Mark A Wainberg // Future Virology. — 2011. — 6(5). — P. 545–547.
6. *Erik De Clercq.* Antivirals: current state of the art / Erik De Clercq // Future Virology. — 2008. — V. 3(4). — P. 393–405.
7. Drug development as preventive measures of animal viral infections : proceedings of the 5th European Congress of Virology (September 11–14, 2013, Lyon, France). — Lyon : John Libbey Eurotext, 2014. — P. 203.
8. In vitro assay by bioengineering of new antiviral drugs : proceedings of the 16th European Congress on Biotechnology (July 13–16, 2014, Edinburgh, Scotland). — Edinburgh: [w.p.], 2014. — P. 113.
9. Infection diseases as factor of Ukrainian population health risks and new antivirus drugs development: proceedings of the 18th European Bioenergetics Conference (12-17 July, 2014, Lisbon, Portugal.). — Lisbon : [w.p.], 2014. — P. 49–50.

10. Ebola virus disease [Electronic resource]. — Mode of access: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/en/>. — Title from the screen.
11. *Timothy C. Barden*. Indoles: Industrial, Agricultural and Over-the-Counter Uses / Timothy C. Barden // *Top Heterocycl Chem.* — 2011. — V. 26. — P. 31–46.
12. *Srivastava Anupam*. “Indole” a versatile nucleus in Pharmaceutical Field / Srivastava Anupam, Pandeya S. N. // *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research.* — 2011. — V. 1(3). — 17 p.
13. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. редакцией член-корр. РАМН, проф. Р. У. Хабриева. — [2-изд., перераб. и доп.]. — Москва: Медицина, 2005. — С. 532–557.
14. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / ред. О. В. Стефанов. — Київ : Авіцена, 2001. — С. 371–384.