

УДК: 578.7,615.281.8,547.752:547.83

**АНТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ ДЕЯКИХ ПОХІДНИХ
6Н-ІНДОЛО[2,3-В]ХІНОКСАЛІНУ НА МОДЕЛІ СИСТЕМНОЇ
ІНФЕКЦІЇ, ВИКЛИКАНОЇ ВІРУСОМ ВЕЗИКУЛЯРНОГО СТОМАТИТУ**

Г. В. АНТОНОВИЧ, здобувач*

Н. М. ЖОЛОБАК, кандидат біологічних наук, провідний науковий
співробітник

М. Я. СПІВАК, доктор біологічних наук, професор

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України

E-mail: g.antonovych@gmail.com

***Анотація** Метою дослідження було оцінити антивірусну дію *in vivo* двох похідних 6Н-індоло[2,3-*b*]хіноксаліну – потенційних антивірусних препаратів з імуномодулюючою дією. Сполуки вводили молодим мишам лінії BALB/c за профілактичною і терапевтичною схемами та модулювали у них системну інфекцію, зумовлену вірусом везикулярного стоматиту. Встановлено здатність дослідних похідних забезпечувати частковий захист тварин від суперлетальної інфекції. У випадку сублетальної інфекційної дози (LD30) тестовані сполуки повністю запобігали загибелі та захворюваності тварин.*

***Ключові слова** індохіноксаліни, противірусні імуномодулятори, індуктори інтерферону*

Похідні 6Н-індоло[2,3-*b*]хіноксаліну представляють групу низькомолекулярних трициклічних гетероароматичних сполук планарної конфігурації, для яких були показані антизапальні, протипухлинні, антимікробні, а також антивірусні властивості *in vitro* [7]. В останні кілька років серед ново-синтезованих і раніше запропонованих похідних цієї групи нами було проведено пошук потенційних антивірусних препаратів. Найбільш перспективними кандидатами виявилися 6-(2-морфолін-4-іл-етил)-6Н-індоло [2,3-*b*]хіноксалін (S1) і 6-[2-(4-метил-1-піперидиніл)етил]-6Н-індоло[2,3-*b*]хіноксалін (S2). Так, раніше для них були показані низька токсичність,

* Науковий керівник - доктор біологічних наук, професор М. Я. Співак

продовжена інтерфероіндукція *in vivo*, антивірусна дія *in vitro* в профілактичній і терапевтичній схемах застосування, потенціонування функціональної активності перитонеальних клітин, підвищення рівня моноцитарно-хемотаксичного протеїну 1, концентрації компонентів системи комплементу, а також кількості циркулюючих нейтрофілів і моноцитів [2, 3]. Продемонстрований спектр властивостей дозволив нам віднести S1 та S2 до імуномодуляторів. Для подальшої характеристики зазначених сполук як потенційних антивірусних препаратів необхідним було оцінити їх здатність запобігати репродукції вірусів саме на рівні *in vivo*.

Мета дослідження – оцінити ефективність S1 та S2 на моделі системної інфекції, викликаній РНК-вмісним вірусом везикулярного стоматиту (VBS).

Матеріали та методи досліджень. S1, S2 і препарат порівняння – аміксин (тилорон), були синтезовані під керівництвом та люб'язно надані С. А. Ляховим, старшим науковим співробітником відділу медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім. О. В. Богатського НАН України. Сполуки вводили внутрішньочеревно у вигляді водних розчинів згідно загальноприйнятих методик. Оптимальні діючі дози і схеми введення були визначені в попередніх дослідженнях за показниками інтерфероіндукції і склали: для S1 – 12,5 мг/кг одноразово; для S2 – 5 мг дворазово з інтервалом у 48 годин. Препарат порівняння використовувався в двох дозах, аналогічних дослідженим похідним індолохіноксаліна.

Вірус везикулярного стоматиту, серотип Індіана, був отриманий в Інституті епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського АМН України і підтримувався періодичними пасажами *in vitro* на культурі клітин L929. Перед початком експерименту життєздатність та видоспецифічність вірусу були підтверджені методами ПЦР- та ІФА-аналізу, а відсутність бактеріальної контамінації – мікробіологічними висівами на аеробні та анаеробні середовища.

Моделювання системної інфекції проводили на молодих мишах лінії Balb/c згідно методики, описаній в роботі [1]. Кількість тварин в групах

становила ≥ 7 . Всі маніпуляційні процедури проводились згідно міжнародним нормам роботи із хребетними тваринами (Страсбург, 1999).

Оцінка антивірусної активності проводилася в профілактичній і терапевтичній схемах із використанням різних інфекційних доз вірусу ВВС. Профілактична схема передбачала введення сполук за 24 години до моделювання інфекції. У терапевтичній схемі сполуки вводили через 24 години після інфікування тварин. Інфекційну дозу вірусу визначали попереднім титруванням *in vitro* на культурі мишачих фібробластів L929. На рівні *in vivo* в профілактичній схемі вона склала 2- 4 LD₁₀₀ (10^7 ТЦД₅₀); в терапевтичній схемі – LD₃₀ ($10^{4.5}$ ТЦД₅₀). Рівень антивірусної активності сполук оцінювали згідно джерела [1] за наступними параметрами: виживаність тварин, середня тривалість життя особин, що пали, кратність захисту (КЗ) та індекс ефективності (ІЕ).

Результати дослідження та їх обговорення. У профілактичній схемі активність сполук проти ВВС вивчали за суперлетальної інфекційної дози 2-4 LD₁₀₀. Під впливом високої дози вірусу перебіг інфекції у контрольних тварин проходив досить швидко. З моменту настання перших клінічних симптомів інфекції – кінець III доби після інфікування, і до загибелі 50 % особин минуло менше 24 годин. У тварин відмічали проблеми з координацією рухів, больові реакції, часткову паралізацію кінцівок. Розвиток захворювання у мишей, стимульованих дослідними індолохіноксалінами, був більш повільним. Перші симптоми реєстрували в той самий період, що і на контролі, однак випадки загибелі відмічали на добу пізніше (рис. 1). Загалом обидва дослідних індолохіноксаліни забезпечили лише частковий захист тварин. У випадку 12,5 мг/кг сполуки S1 вижило 3 з 8-ми тварин групи (37,5 %) за середньої тривалості життя 6,2 доби. У випадку двократного введення I2 – 3 із 7-ми тварин (42,5 %), за середньої тривалості життя 6,3 доби. Результати можна вважати співставними. Водночас в контрольній групі середня тривалість життя тварин склала 4,5 доби. Отже, підтвердженням антивірусної дії тестованих

похідних є не лише загальна виживаність, але й подовження життя тварин, що загинули.

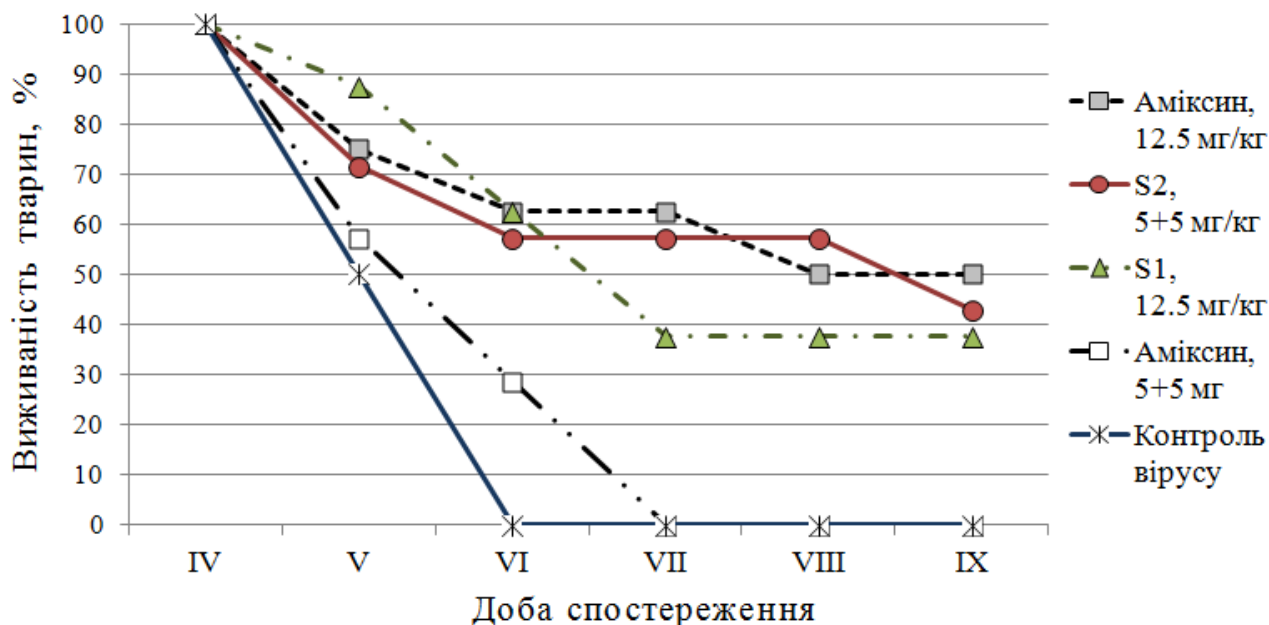


Рис. 1. Профілактична антивірусна дія сполук на моделі системної інфекції ВВС

Показники кратності захисту для S1 та S2 склали 1,6 та 1,72. Індекс ефективності за стовідсоткової летальності мишей в контрольній групі дорівнює показнику виживаності тварин із дослідних груп. Відповідно для тестованих похідних індолохіноксаліну він склав близько 40, в той час як мінімально значущим рівнем вважається результат ≥ 60 . Слід зазначити, що аміксин також не відповідає даній вимозі, однак за меншої дози (подвійне введення 5 мг/кг) характеризується нижчим рівнем захисту, аніж S1 чи S2.

Спираючись на результати вивчення імуномодулюючої дії дослідних похідних *in vivo*, отримані нами у попередніх експериментах [2, 3], максимальний рівень інтерферонів та інших цитокінів в організмі гризунів відмічається на третю добу після стимуляції індолохіноксалінами. Водночас цикл реплікації ВВС є надзвичайно коротким – 4-8 годин [6] а стратегія репродукції вірусу включає експресію декількох факторів, що інгібують імунну відповідь організму-господаря, починаючи зі стадії активації трансляції інтерферонів, протеаз та РНКаз і закінчуючи інгібіторами, які діють

на етапі аутокринної цитокінової регуляції [5]. Отже, реалізація імуномодулюючих ефектів S1 та S2 могла бути скомпрометована імуносупресуючими факторами ВВС.

Симптоми захворювання, які відмічались у інфікованих особин, говорять про церебральний перебіг інфекції. Згідно джерела [5] штаму вірусу Індіана властива тропність до нервових клітин, а отже забезпечення антивірусного захисту вимагало б проникнення тестованих сполук, або індукованих ними антивірусних факторів крізь гематоенцефалічний бар'єр. Останній варіант є можливим лише за досягнення високої концентрації інтерферонів, інтерлейківнів та хемокінів у сироватці [4]. А у випадку пригнічення їх продукції на фоні репродукції ВВС імуностимулюючих ефектів, викликаних дослідними речовинами, виявляється недостатньо для забезпечення ефективного антивірусного захисту. Це може слугувати додатковим поясненням недостатньо високого рівня антивірусного захисту дослідних похідних та препарату порівняння.

Отже, в профілактичній схемі застосування сполук викликаного ними імуномодулюючого впливу не було достатньо для забезпечення більш ефективного захисту тварин, або ж реалізація їх стимулюючої дії була пригнічена вірусами. Не виключено, що за меншої інфекційної дози або за умови збільшення періоду між введенням сполук та інфікуванням тварин їх антивірусні властивості проявились б у вищій мірі. На користь останнього припущення свідчить той факт, що за відношенням до S1 та S2 аміксин характеризується більш швидкою динамікою індукції ІФН та факторів неспецифічного антивірусного захисту [6], що на ранніх етапах репродукції ВВС може мати вирішальну роль.

Терапевтичне застосування I1 та I2 на фоні значно меншого інфекційного навантаження продемонструвало здатність дослідних індолохіноксалінів зумовлювати повноцінний захист щонайменш від LD₃₀ ВВС (табл. 1). Окрім зазначених випадків загибелі тварин, у 3-х з 10-ти мишей контрольної групи, що вижили, спостерігали ознаки перебігу інфекції (згорбленість, зниження

рухливості, звуження очної щілини). Примітно, що в жодної із тварин дослідних груп, починаючи із другої доби спостереження, жодних змін поведінки чи стану організму не відмічали.

1. Антивірусна ефективність сполук проти ВВС (лікувальна схема)

	Тварин у групі	Доба після введення вірусу ВВС					Смертність, %	Захворюваність, %
		IV	V	VI	VII	VIII-IX		
Контроль	10	-	1	1	1	-	30	60
I1, 12.5 мг/кг	7	-	-	-	-	-	0	0
I2, 5+5 мг/кг	7	-	-	-	-	-	0	0
Аміксин, 5+5 мг/кг	7	-	-	-	-	-	0	0
Аміксин, 12,5 мг/кг	7	-	-	-	-	-	0	0

Висновки

За суперлетального вірусного навантаження ВВС (4-10 LD100) профілактичне застосування дослідних похідних забезпечило виживаність $\approx 40\%$ тварин. Також було відмічено тенденцію подовження середньої тривалості життя інфікованих особин під впливом сполук. Це свідчить на користь того, що репродукція вірусу пригнічувалась навіть в організмі тих мишей, які пали. Однак показники кратності захисту й індексу ефективності для тестованих похідних були меншими за рівень, що вважається значним, та поступались таким препаратом порівняння аміксину.

В терапевтичній схемі на фоні низької інфекційної дози LD30 похідні S1 та S2 повноцінно попереджали смертність мишей. Окрім того, під впливом сполук знижувалась доля тварин, у яких спостерігались симптоми розвитку інфекційного процесу.

Отримані результати свідчать про принципову здатність сполук S1 та S2 зумовлювати антивірусну дію *in vivo* проти ВВС та дають підставу для більш

масштабного дослідження антивірусної дії зазначених індолохіноксалинів як проти цього, так і проти інших РНК-вмісних вірусів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вивчення антивірусної дії потенційних антивірусних засобів [Текст] / Доклінічне дослідження лікарських засобів / А. М. Щербінська, Н. С. Дяченко, С. Л. Рибалко [та ін.]; під ред. О. В. Стефанова. К., 2001. – 528 с.
2. Dose-dependent IFN-stimulating and immunomodulating properties of 6H-indolo[2,3-b]quinoxaline derivatives [Text] / G. V. Antonovych, N. M. Zholobak, S. A. Lyakhov [et al.] // Мікроб. журнал. – 2012. – Т. 74, № 4. – С. 80-86.
3. The effect of antiviral substance 6-(2-morpholin-4-yl-ethyl)-6H-indolo[2,3-b]quinoxaline upon biomarkers of inflammation [Text] / G.V. Antonovych, N. M. Zholobak, M. O. Shibinska, M. Ya. Spivak // Biopolymers and Cell. – 2015. – Vol. 31, Issue 4. – P. 264–271.
4. Banks W. A. Blood-brain barrier transport of cytokines: mechanism for neuropathology [Text] / W. A. Banks // Current Pharmaceutical Design. – 2005. – Vol. 11. – P. 973-984.
5. Fultz P. N. Differing responses of hamsters to infection by vesicular stomatitis virus Indiana and New Jersey serotypes [Text] / P. N. Fultz , J. J. Holland.// Virus Res. – 1985. – Vol.3, Issue 2. – P.129-140.
6. Letchworth G. J. Vesicular stomatitis. [Text] / G. J. Letchworth , L. L. Rodriguez, J. Del Cbarrera. // Veterinary Journal. – 1999. – Vol.157, Issue3. – P.239-260.
7. Synthesis, cytotoxicity, antiviral activity and interferon inducing ability of 6-(2-aminoethyl)-6H-indolo[2,3-b]quinoxalines / M. O. Shibinskaya, S. A. Lyakhov, A. V. Mazepa , S. A. Andronati [et al.]. // Eur J Med Chem. – 2010. – Vol.45, Issue 3. – P.1237-1243.

АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 6Н-ИНДОЛО[2,3-В]ХИНОКСАЛИНА НА МОДЕЛИ СИСТЕМНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ВЕЗИКУЛЯРНОГО СТОМАТИТА

Г. В. Антонович, Н. М. Жолобак, Н. Я. Спивак

Аннотация. Целью исследования была оценка антивирусной эффективности *in vivo* двух производных 6Н-индоло[2,3-в]хиноксалина – потенциальных антивирусных препаратов с иммуномодулирующим действием. Соединения вводили молодым мышам линии BALB/c согласно профилактической и терапевтической схемам, модулируя у них системную инфекцию, обусловленную вирусом везикулярного стоматита. Установлена способность исследованных производных обеспечивать частичную защиту животных от суперлетальной инфекции. В случае сублетальной инфекционной дозы (LD30) тестируемые соединения полностью предотвращали гибель и заболеваемость животных.

Ключевые слова: индолохиноксалины, противовирусные иммуномодуляторы, индукторы интерферона

ANTIVIRAL ACTIVITY OF SEVERAL 6H-INDOLO[2,3-B]QUINOXALINE DERIVATIVES ON THE MODEL OF HERPETIC MENINGOENCEPHALITIS

G. V. Antonovych, N. M. Zholobak, M. Ya. Spivak

Abstract. The aim of the study was to evaluate antiviral activity *in vivo* of two 6H-indolo[2,3-b]quinoxaline derivatives – potential antiviral drugs with immunostimulating action. Compounds were administered in prophylactic and therapeutic schemes to young BALB/c mice, in which systemic infection with vesicular stomatitis Indiana virus was induced. Tested derivatives granted partial protection against supralethal VSV infection. In the case of sub-lethal infectious dose (LD30) both indoloquinoxalines ensured full protection of animals and completely prevented disease incidence.

Keywords: indoloquinoxalines, antiviral immunomodulators, interferon inducers