



**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „Св. Климент Охридски”**

**БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ**

*Лаборатория по вирусология*



**НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ**

**ОТДЕЛ «ВИРУСОЛОГИЯ»**

*Лаборатория «Ретровируси»*

**АНТОН ВЕСЕЛИНОВ ХИНКОВ**

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА НОВОСИНТЕЗИРАНИ СТИРИЛХИНОЛИНИ ЗА  
АНТИ-HIV-1 АКТИВНОСТ В КЛЕТЪЧНА КУЛТУРА**

**за присъждане на образователната и научна степен “доктор”**

**професионално направление 4.3. Биологични науки**

**(Вирусология)**

**Научен ръководител:**

**Професор д-р Радка Аргирова д.м.н.**

*София, 2012*

**Дисертационният труд е написан на 195 стр. и съдържа 35 таблици и 41 фигури.**

**Настоящият дисертационен труд е изпълнен изцяло в Лаборатория «Ретровируси», отдел «Вирусология», Национален Център по заразни и паразитни болести, София**

## СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА

ЗТС – Ламивудин (Lamivudine)  
8SQs - 8-хидрокси-2-стирилхинолини (**8**-hydroxy-2-styryl **q**uinolines)  
АВС – Абакавир (**A**bacavir)  
АЗТ – Зидовудин (Zidovudine)  
FTC – Емтрицитабин (Etricitabine)  
Gp – Гликопротеин (**G**lycoprotein)  
НААART–Високоактивна антиретровирусна терапия (**H**ighly **A**ctive **A**ntiretroviral **T**herapy)  
HBV – Хепатит В вирус (**H**epatit **B** **V**irus)  
HCV – Хепатит С вирус (**H**epatit **C** **V**irus)  
HIV – Вирус на Човешкия Имунен Дефицит (**H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus)  
HTLV – Вирус на Човешката Т – клетъчна Левкоза/лимфома (**H**uman **T**-cell **L**eukemia **V**irus)  
IN – Интеграза (**I**ntegrase)  
INI – Интегразни инхибитори (**I**ntegrase **I**nhibitors)  
NNRTI – Ненуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза (**N**on **N**ucleoside **R**everse **T**ranscriptase **I**nhibitors)  
NRTIs – Нуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза (**N**ucleoside **R**everse **T**ranscriptase **I**nhibitors)  
PCR – Полимеразна верижна реакция (**P**olymerase **C**hain **R**eaction)  
PI – Протеазни инхибитори (**P**rotease **I**nhibitors)  
PR – Протеаза (**P**rotease)  
rRT – рекомбинантна обратна транскриптаза (**r**ecombinant **R**everse **T**ranscriptase)  
RT – Обратна транскриптаза (**R**everse **T**ranscriptase)  
TDF – Тенофовир (Tenofovire)  
АК – Аминокиселини  
АРТ – Анти Ретровирусна Терапия  
ДНК – Дезоксирибонуклеинова Киселина  
ЕПР – Ендоплазматичен Ретикулум  
ИК<sub>50</sub> - Инхибираща Концентрация 50  
МНК – Максимална Нетоксична Концентрация  
М- концентрация, изразена в мол  
Р – Протеин (**P**rotein)  
РНК – Рибонуклеинова Киселина  
СИ – Селективен Индекс  
СПИН – Синдром на Придобитата Имунна Недостатъчност  
ФТС– Фетален Телешки Серум  
ЦК<sub>50</sub> – Цитотоксична Концентрация 50

## ВЪВЕДЕНИЕ

Лечението на HIV/СПИН чрез въвеждането на антиретровирусната терапия (АРТ, HAART) се счита за един от най-големите успехи на съвременната медицина. Не са много областите на човешкото знание, а още по-малко на медицината, в които се отбелязва толкова бърз, но и драматичен прогрес. Драматичен, защото всяка следваща нова тенденция е предпоследна и краткотрайна както предшестващата, а докато е превъзнасяна от авторите си, вече е остаряла и е оборена от факти и опоненти. Всичко това е придружено с възторг, последван от разочарования, нови научни постижения, нови факти, нови терапии. Какви са фактите?

Към м. март 2010 г. медицината разполага вече с 28 индивидуални лекарства или фиксирани медикаментозни комбинации за третиране на инфекцията с HIV (по *C. Hoffmann, 2010*). Те се групират в пет класа:

1. Нуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза (NRTIs),
2. Ненуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза (NNRTIs),
3. Протеазни инхибитори (PIs),
4. Инхибитори на навлизането на вируса в клетката (корцепторни антагонисти и фузионни инхибитори),
5. Интегразни инхибитори (INIs).

На път са инхибиторите на узряването на вириона, инхибиторите на взаимодействието на CD4+ рецепторите с gp120 на HIV, усъвършенстват се фармакокинетичните характеристики на съществуващите инхибитори, въвеждат се т. нар. „инхибитори, резистентни на резистентността”, търсят се нови вирусни мишени, както и вътреклетъчни такива, „обсебени” от HIV. В резултат, HIV инфекцията е вече хронично, подлежащо на контрол заболяване, макар, че все още сме далеч от ерадикацията на причинителя. Но няма медицината се старее да ерадикира тъй често срещаната се херпес-вирусна инфекция или рано контаминиращата (над 90%) организма инфекция с полиомни вируси, проявяващи несъответстващо по-рядко и при „специални” обстоятелства онкогенните си потенции? Не е ли достатъчно тези вируси да бъдат държани под контрол?

Възможността за доживотен контрол на HIV инфекцията гарантира продължителност на живота при напълно приемливо качество на живота за лицата, живеещи с HIV. Така те стават в равностойно положение с останалото население, а в макромасщаб се предотвратява забавянето на икономическото развитие, както и нежеланото въздействие върху репродуктивните възможности дори и в най-засегнатите страни.

От друга страна, токсичността и възникването на резистентни мутанти често компрометират терапевтичните медикаменти. HAART драматично намали смъртността при СПИН, но не може да ерадикира напълно инфекцията с HIV-1. Придържането на пациентите към антивирусната терапия често пъти е трудно именно поради лекарствената токсичност, при която успешното приложение на HAART е затруднено и се създават условия за възникване на мутанти с множествена резистентност. Следователно, наложително е търсенето и откриването на нови анти-HIV вещества както срещу известните, така и срещу алтернативни мишени, възникващи в резултат на жизнения цикъл на вируса.

Сред най-перспективните медикаменти, използвани днес в терапията, са интегразните инхибитори, лицензирани за клинично приложение (raltegravir). Този клас инхибитори привлича с предизвикателството да се проникне и да се въздейства върху най-фината граница между вируса и клетката – там, където под вирусната команда провирусната ДНК се вгражда (интегрира) в клетъчната ДНК, като вирусната

от своя страна си осигурява безсмъртие в границите на човешкия живот. Стирилхинолините – описани като възможни интегразни инхибитори едва през 1998 г. (Mekouar, K. и съавт., 1998) продължават да бъдат в центъра на вниманието на изследователите.

Настоящият дисертационен труд е първият у нас, посветен на резултатите от изследователските усилия в направлението „инхибитори на HIV – изпитание в клетъчна култура”. Синтезирани са 17 нови 8SQs, 6 от които са получени целенасочено след подробни изпитания на други 11 „изходни” вещества. Новосинтезираните вещества са изпитани за цитотоксичност, митохондриална токсичност и анти-HIV активност в клетъчна култура, доказани са мишените им на действие чрез най-модерни молекулярно-биологични методи. Тъй като HIV/СПИН ще ни придружава и през следващите години, това оправдава нашия скромнен опит в изпитването за анти-HIV-ефект на синтезираните в България 8SQs. В процеса на работата бе проверен и допълнен и използвания в лабораторията алгоритъм за доказване на мишената на действие на новосинтезирани вещества с възможен анти-HIV ефект.

## **1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### **1.1. Цел**

Проучване за анти - HIV-1 активност на новосинтезирани в България 8-хидрокси-2-стирил хинолини (8SQs) в клетъчна култура.

### **1.2. Задачи:**

1.2.1. Определяне на цитотоксичността на новосинтезираните стирилхинолини, като се определи максималната нетоксична концентрация (МНК) и цитотоксичната концентрация (ЦК<sub>50</sub>) в клетъчна култура МТ4.

1.2.2. Определяне на въздействието на новосинтезираните стирилхинолини върху репликацията на HIV-1 чрез микротитърен тест за инфекциозност в клетъчна култура и концентрацията на веществата, инхибираща репликацията на вируса с 50% (ИК<sub>50</sub>).

1.2.3. Определяне мишената на антивирусната активност

1.2.3.1. вирусната RT като мишена на активността;

1.2.3.2. вирусната PR като мишена на активността;

1.2.3.3. вирусната IN като мишена на активността.

1.2.4. Определяне на профила на резистентност на HIV-1 ППВ чрез селектиране на мутанти след пасажи с нарастваща концентрация с антивирусните вещества, проявили анти-HIV-1 активност, но с неопределена мишена на действие.

1.2.5. Определяне на митохондриалната токсичност на антивирусните вещества, проявили антиинтегразна активност.

1.2.6. Алгоритъм за тестиране на новосинтезирани вещества за инхибиране на репликацията на HIV-1 в клетъчна култура и определяне на мишената им на действие.

## **2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

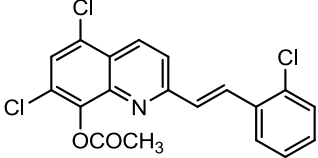
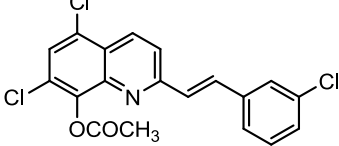
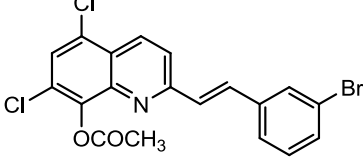
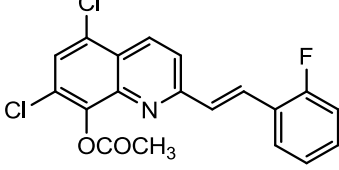
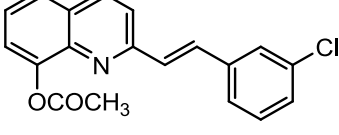
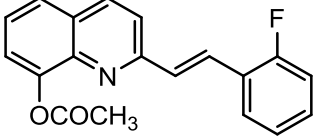
### **2.1. Материали**

#### **2.1.1. Новосинтезирани стирилхинолини**

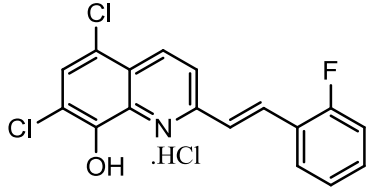
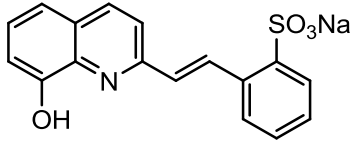
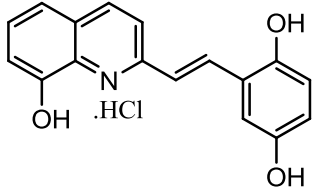
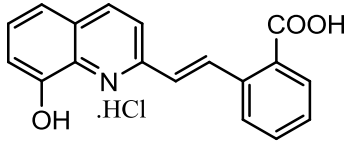
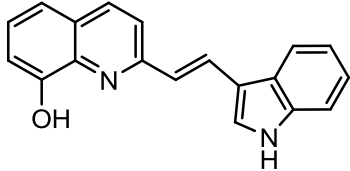
Представени са 17 вещества - всички синтезирани във Факултета по ветеринарна медицина на Тракийския университет, Стара Загора от А. Павлов и С. Червенков. Шест от тях са предмет на изследванията в настоящия дисертационен труд, синтезирани целенасочено след обобщаване на резултатите от изследването на други 11 8SQs (предварително тествани в лаборатория „Ретровируси” и означени като „първа група” – Табл.1 и „втора група” – Табл.2). Шестте новосинтезирани стирилхинолинови съединения са представени чрез своите структурни формули и молекулни маси в таблица 3. За улеснение те са означени символично с номера: 105B, 208, 241, 242, 300S и 303S. Така при съпоставянето на резултатите, получени за всички 17 съединения би била възможна интерпретацията на връзката между структура, цитотоксичност и антивирусна активност.

Тъй като посочените вещества са слабо разтворими във вода, най-напред всяко беше разтваряно в DMSO (диметилсулфоксид) до определена изходна концентрация, след което бе довеждано до необходимата за изследването концентрация в среда без ФТС.

**Таблица 1.** Структурни формули на първоначално синтезираните и изследвани стирилхинолини- от „първа група”.

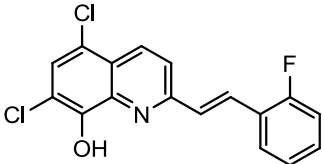
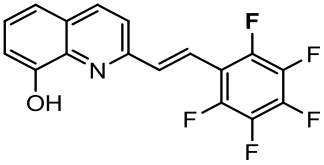
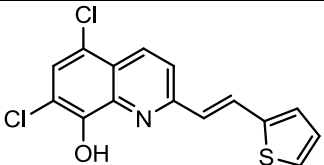
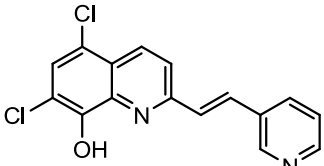
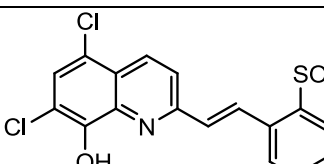
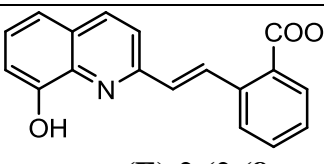
код	ХИМ. ФОРМУЛА И МОЛ. МАСА	СТРУКТУРНА ФОРМУЛА И НАИМЕНОВАНИЕ ПО IUPAC НОМЕНКЛАТУРА
100	Хим. формула: $C_{19}H_{12}Cl_3NO_2$ Мол. маса: 392,66	 <p><b>(E)-5,7-дихлоро-2-(2-хлоростирил) хинолин-8-ил ацетат</b></p>
101	Хим. формула: $C_{19}H_{12}Cl_3NO_2$ Мол. маса: 392,66	 <p><b>(E)-5,7-дихлоро-2-(3-хлоростирил) хинолин-8-ил ацетат</b></p>
103	Хим. формула: $C_{19}H_{12}BrCl_2NO_2$ Мол. маса: 437,11	 <p><b>(E)-2-(3-бромостирил)-5,7-дихлорохинолин-8-ил ацетат</b></p>
105	Хим. формула: $C_{19}H_{12}Cl_2FNO_2$ Мол. маса: 376,21	 <p><b>(E)-5,7-дихлоро-2-(2-флуоростирил)хинолин-8-ил ацетат</b></p>
201	Хим. формула: $C_{19}H_{14}ClNO_2$ Мол. маса: 323,77	 <p><b>(E)-2-(3-хлоростирил)хинолин-8-ил ацетат</b></p>
205	Хим. формула: $C_{19}H_{14}FNO_2$ Мол. маса: 307,32	 <p><b>(E)-2-(2-флуоростирил)хинолин-8-ил ацетат</b></p>

**Таблица 2.** Структурни формули на изследваните стирилхинолини (в кодовите наименования В – база, S – сол, Н - хидрохлорид) – вещества от „втора група”

код	ХИМ. ФОРМУЛА И МОЛ. МАСА	СТРУКТУРНА ФОРМУЛА И НАИМЕНОВАНИЕ ПО IUPAC НОМЕНКЛАТУРА
105H	Хим. формула: $C_{17}H_{11}Cl_3FNO$ Мол. маса: 370,63	 <p><b>(E)-5,7-дихлоро-2-(2-флуоростирил)хинолин-8-ол хидрохлорид</b></p>
301S	Хим. формула: $C_{17}H_{12}NNaO_4S$ Мол. маса: 349,34	 <p><b>натриев (E)-2-(2-(8-хидроксихинолин-2-ил)винил) бензенсулфонат</b></p>
302H	Хим. формула: $C_{17}H_{14}ClNO_3$ Мол. маса: 315,75	 <p><b>(E)-2-(2-(8-хидроксихинолин-2-ил)винил) бензен -1,4-диол хидрохлорид</b></p>
303H	Хим. формула: $C_{18}H_{14}ClNO_3$ Мол. маса: 327,76	 <p><b>(E)-2-(2-(8-хидроксихинолин-2-ил)винил) хидрохлорид на бензоевата киселина</b></p>
304B	Хим. формула: $C_{19}H_{14}N_2O$ Мол. маса: 286,33	 <p><b>(E)-2-(2-(1H-индол-3-ил)винил)хинолин-8-ол</b></p>



**Таблица 3.** Структурни формули на изследваните стирилхинолини (трета група) (В – база, S – сол), новосинтезирани след изпитване за анти-HIV-активност на веществата, представени в Табл. 1 и 2.

код	Хим. формула и мол. маса	СТРУКТУРНА ФОРМУЛА И НАИМЕНОВАНИЕ ПО IUPAC НОМЕНКЛАТУРА
105B	Хим. формула: $C_{17}H_{10}Cl_2FNO$ Мол. маса: 334,17	 <b>(E)-5,7-дихлоро-2-(2-флуоростирил)хинолин-8-ол</b>
208	Хим. формула: $C_{17}H_8F_5NO$ Мол. маса: 337,24	 <b>(E)-2-(2-перфлуоростирил)хинолин-8-ол</b>
241	Хим. формула: $C_{15}H_9Cl_2NOS$ Мол. маса: 322,21	 <b>(E)-5,7-дихлоро-2-(2-(тиофен-2-ил) винил)хинолин-8-ол</b>
242	Хим. формула: $C_{16}H_{10}Cl_2N_2O$ Мол. маса: 317,17	 <b>(E)-5,7-дихлоро-2-(2-(пиридин-3-ил) винил)хинолин-8-ол</b>
300S	Хим. формула: $C_{17}H_{10}Cl_2NNaO_4S$ Мол. маса: 418,23	 <b>натриев (E)-2-(2-(5,7-дихлоро-8-хидроксихинолин-2-ил) винил)бензенсулфонат</b>
303S	Хим. формула: $C_{18}H_{12}NNaO_3$ Мол. маса: 313,28	 <b>натриев (E)-2-(2-(8-хидроксихинолин-2-ил) винил)бензоат</b>

### 2.1.2. Вирус

**HIV-1.** Източник на HIV-1 бе културалната течност от хронично заразена и продуцираща HIV-1 щам III В клетъчна линия H9/HTLV III В.

### 2.1.3. Клетки

В проведените експерименти бяха използвани два вида клетъчни линии от човешки произход.

**MT-4.** Клетки, трансформирани с човешки Т-клетъчен левкозно-лимфомен вирус тип – 1 (HTLV-1). Тя не е заразена с HIV и се използва като класически модел за възпроизвеждане на остра инфекция с HIV-1 и изследване на антивирусен ефект.

**H9 и H9/HTLV III В.** Незаразените с HIV човешки CD4+ лимфоидни клетки (H9) и техният хронично продуциращ HIV аналог - H9/HTLV III В са любезен подарък от д-р Р. Гало (NCI, Bethesda, Maryland, USA).

**2.1.4. Хранителни среди. RPMI 1640 с Hepes буфер (Sigma), обогатен с 10% ФТС (Invitrogene).** Тя се използваше при култивиране на всички използвани клетъчни линии.

**2.1.5. Разтвори, използвани при клетъчното култивиране. Разтвор на Поли-L-лизин (PLL – Sigma, m.w. 90 000)** – тъй като клетъчните линии, с които работихме са суспензионни, използвахме разтвор на PLL за прикрепването им върху дъното на 96-ямкова плака.

### 2.1.6. Разтвори, използвани при МТТ теста

Разтвор на МТТ {(3-4,5 диметилтиазолов-2-ил)-2,5дифенилтетразолов бромид} (Sigma) за определяне на живи и ранно апоптотични клетки.

Лизиращ разтвор за МТТ теста – DMSO и етанол в съотношение 1:1.

**2.1.7. Материали, използвани при определяне на RT-активност (на извънклетъчния вирус) и за директно изследване за инхибиращо действие върху rRT**

- Търговски тест **HS-Lenti RT Activity Kit, Cavid, Швеция** (Кат. № 52010)

**2.1.8. Реактиви, използвани при изследването на анти-PR действие на новосинтезираните 8SQs.**

#### Субстрат

HIV protease III (Bachem), 1 mg, MW 1314,5 g/mol (Табл. 4)

Разтворен в 100  $\mu$ l DMSO и съхраняван при - 20°C.

Концентрация: сток -10 mg/ml (7,6 mM)

Работно разреждане (непосредствено преди работа) 1:10

10  $\mu$ l stock + 90  $\mu$ l DMSO (концентрация 1  $\mu$ g/ $\mu$ l, 760  $\mu$ M)

**Таблица 4.** Състав и кинетична характеристика на използвания в експериментите субстрат (Bachem, Switzerland)

HIV протеаза субстрат	Състав	V <sub>max</sub> [ $\mu$ M s <sup>-1</sup> ]	K <sub>m</sub> [ $\mu$ M]	K <sub>cat</sub> [4.9 s <sup>-1</sup> ]
III	H-His-Lys-Ala-Arg-Val-Leu-p-nitro-Phe-Glu-Ala-Nle-Ser-NH <sub>2</sub>	2,29	63	13

**V<sub>max</sub>** – максимална скорост на ензимната реакция

**K<sub>m</sub>** е концентрацията на субстрата, при която се постига ½ от V<sub>max</sub>

**K<sub>cat</sub>** – „оборотен“ число, показващо броя на молекулите субстрат, преобразувани за единица време от молекула ензим

**Буферен разтвор за провеждане на ензимната реакция** (по *Brogia, R. и съавт., 2006*).

**Ензимен препарат - HIV-протеаза.** За целите на изследването бе използвана нативна HIV-протеаза, освободена след лизирането на 50x концентрат.

### **2.1.9. Материали, използвани при определяне на митохондриалната токсичност.**

#### **2.1.9.1. Екстракция на митохондриална ДНК (мтДНК)**

- Изолирането на митохондрии бе извършено с кита на **BioVision** (кат № 280-50, USA).

#### **2.1.9.2. Количествено определяне на митохондриална ДНК(мтДНК)**

Праймери за амплифициране на високо консервативната област от гена, кодиращ субединица II на цитохром С оксидаза (**COII**) в mtDNA:

- СAAACCACTTTTCACCGCTACAC (прав)
- GGACGATGGGCATGAAACTGT (обратен)

Сондите за хибридизация на същия ген бяха:

- 3'-флуоресцин белязан олигонуклеотид (5'-AACCAGGTGCACTTTTAGGAGATGACC-F3')
- 5'-LC Red 640 3'-фосфат-блокиран (5'-L-AATTTACAATGTTATCGTAACTGCCCATGC-P3')

#### **2.1.9.3. Количествено определяне на ядрена ДНК (ядДНК)**

Праймери за амплифициране на гена **ASPG**:

- (5'-GGAGGAGGCACTTTC TCAGC-3') (прав)
- (5'-GAAGACCTGCTCCCTGAACAC-3') (обратен)

Сондите за хибридизация на същия ген бяха:

- 3'-флуоресцин белязан олигонуклеотид (5'-GCGCTTTGGACSTTTGGGTGTAG-F3')
- 5'-LC Red 640 3'-фосфат-блокиран олигонуклеотид (5'-L-GTTACGAAAGAACCTAGCCTCACAGTGGT-P3').

### **2.1.10. Изолация и оценка на клетъчна ДНК за целите на PCR**

- ДНК за целите на PCR бе изолирана с помощта на **DNA Mini Kit** (Qiagen) (Кат. № 51306)

### **2.1.11. Реактиви, използвани при PCR за амплификация на интегративния ген:**

1. Геномна ДНК ~100 ng/μl;
2. Праймери (5' и 3') (всички от LKB, Sweden) 20 pmol/μl;
3. Разтвор на dNTP 5 mM  
всеки dNTP 1,25 ml
4. STS-ДНК полимераза 5U/μl  
в буфер за съхранение (50 mM Tris-HCl, pH= 8,0; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% (v/v) glycerol)
5. Буфер 10 x STS (100 mM Tris-HCl pH= 9,00; 300 mM KCl; 0,1% (w/v) желатин; 1% тритон X-100)
6. MgCl<sub>2</sub> 50mM
7. dd H<sub>2</sub>O;
8. Течен парафин.

Реактивите от позиции 3-8 са от Invitrogen.

За извършване на PCR използвахме две двойки праймери:

A. Integrase-External F = 5' CAGCACACAAAGGAATTGGA3'

B. Integrase-External R = 5' TCCCCTAGTGGGATGTGTACTT3'

C. Integrase-Internal F = 5' CAATCCCCAAAGTCAAGGAG 3'

D. Integrase-Internal R = 5' CCATTTGTA CTGTCTTAA3'

### 2.1.12. Реактиви, използвани при електрофоретичното разделяне на пробите след провеждане на PCR:

Агароза NA (Pharmacia)

**50xTAE електрофоретичен буфер**

(1 x 0,04 M Tris - acetate; 0,001 M EDTA )

Етидиев бромид - 10 mg/ml

**Разтвор за нанасяне на пробите**

(30% глицерол, 0,25% ксиленцианол, 0,25% бромфенол синьо, 2 mM EDTA)

### 2.1.13. Реактиви, използвани при секвениране на вирусната геномна ДНК

- При секвенционната реакция беше използван кит **Big Dye® Terminator kit v3.1.** (Applied Biosystems) (Кат. No.: 4337456)

## 2.2. Методи

### 2.2.1. Получаване на различни производни на 8-хидрокси-2-стирил хинолина

Получаване на заместени 2-стирил-8-ацетилоксихинолини – синтезите по 3.2.1. са правени от А.Павлов и С.Червенков от Тракийския Университет в Ст.Загора, за което им изказваме благодарност.

### 2.2.2. Определяне на цитотоксичната концентрация 50 (ЦК<sub>50</sub>) и максималната нетоксична концентрация (МНК) на новосинтезираните стирилхинолини върху клетъчната линия МТ-4.

Цитотоксична концентрация 50 (ЦК<sub>50</sub>) се дефинира като концентрацията на изследваното вещество, при която 50% от клетките умират в резултат на токсичното действие на веществото.

Максимална нетоксична концентрация (МНК) се дефинира като най-високата концентрация на изследваното вещество, която не предизвиква увреждане или смърт на третираните клетки. И двете величини се изразяваха в М.

ЦК<sub>50</sub> и МНК бяха изследвани чрез метода на поглъщане на МТТ, описан от Mosmann, T. (1983). Клетъчната преживяемост бе отчитана като % на живите клетки в ямките, третирани с различни концентрации от изследваното вещество в сравнение с контролните нетретирани с вещество клетки. За целта бе използвана следната формула:

$$\begin{array}{l} \text{\% клетъчна} \\ \text{преживяемост} \end{array} = \frac{\text{A540 оптична плътност на} \\ \text{третираните клетки}}{\text{A540 оптична плътност на} \\ \text{контролите}} \times 100$$

От построената крива “доза (концентрация)-клетъчна преживяемост” бе възможно да се изчислят ЦК<sub>50</sub> както и МНК.

**2.2.3. Изследване на въздействието на новосинтезирани 8SQs върху репликацията на HIV-1 в MT-4 клетки.** (Микротитърен тест за инфекциозност в клетъчна култура, базиран на отчитане на цитопатичното действие на вируса – *Montefiori, D. и съавт., 1988*)

Активността на веществото спрямо цитопатичния ефект на HIV-1 се изразяваше като % протекция (преживяемост) на клетките, определяна по следната формула:

$$\frac{[OD_B - OD_{KB}]}{[OD_{Kкл.} - OD_{KB}]} \times 100 (\%), \text{ където:}$$

OD<sub>B</sub> – абсорбция на заразените и третирани с вещество клетки

OD<sub>KB</sub> – абсорбция на заразените с вирус клетки (вирусна контрола без вещество)

OD<sub>Ккл.</sub> – абсорбция на незаразени и не третирани с вещество клетки (клетъчна контрола).

Инхибиращата концентрация 50 (**ИК<sub>50</sub>**) бе определяна като концентрацията на изследваното вещество в μМ, която инхибира с 50% вирусната репликация. При изчисляването на ИК<sub>50</sub> се вземаха предвид данните от микротитрационния МТТ тест по инфекциозност, както и тези от RT-активността на вируса. ИК<sub>50</sub> се определяше директно от кривата “доза (концентрация)–отговор-(анти-HIV ефект)”. Последният се изразяваше като % клетъчна преживяемост – при използване на МТТ теста или % инхибция по RT активност.

**Селективен индекс (СИ)** За да се определи селективността на едно вещество към вирусната мишена спрямо клетката се определяше и селективният индекс. Това бе отношението на ЦК<sub>50</sub> и ИК<sub>50</sub>.

$$СИ = \frac{ЦК_{50}}{ИК_{50}}$$

**2.2.4. Метод за определяне на RT активност (търговски тест HS-Lenti RT Activity Kit, Cavid, Швеция (Кат. № 52010))**

Репликацията на HIV-1 в клетъчна култура се измерваше освен с МТТ теста, и чрез отчитане на RT-активността в културалната течност (виж Материали 2.1.7.) Този тест показва и въздействие върху процеса на обратната транскрипция във вируса при съответните експериментални условия.

RT активността бе определяна:

- в културална течност на заразени с HIV-1 MT-4 клетки на 120-тия час след заразяването им (вирусна контрола);
- в културална течност на незаразени с вирус клетки на 120-тия час след култивирането и без добавяне на каквото и да е вещество (клетъчна контрола);
- в културална течност на заразени с HIV-1 MT-4 клетки на 120-тия час след заразяването им, в чиято растежна среда е била добавена определена концентрация от изследваното вещество.

### 2.2.5. Използване на теста **HS-Lenti RT Activity Kit, Cavid, Швеция** (Кат. № 52010) за директно изследване за инхибиращо действие на изследваните вещества върху **rRT**.

Тестът HS-kit Lenti RT предоставя възможност за директно определяне въздействието на дадено вещество върху активността на rRT, която е с предварително известна концентрация. В инкубационната смес за определяне активността на rRT се включваше изследваното вещество в концентрации, показали активност в предварително изследване върху MT-4 клетки. Такава възможност е предвидена от производителя на теста (*Shao, X. и съавт., 1997*).

### 2.2.6. Директно изследване на инхибиращо действие на веществата върху **PR на HIV-1**.

Антипротеазната активност на веществата бе определена чрез адаптиран от нас, по-рано описан в литературата, метод, при който се използва хромогенен пептиден субстрат (*Brogli, R. и съавт., 2006*). Субстратът има нитрофенилен остатък, разположен при мястото на срязване, което позволява спектрофотометрично мониториране на протеолитичната реакция (*Brogli, R. и съавт., 2006*). В експериментите бе използван субстрат III, тъй като той има висока стойност на  $K_m$ , което означава по-ниска специфичност спрямо протеолитичния ензим. Това е от значение в нашия случай, тъй като използваме тотален вирусен ензимен нативен препарат, а не рекомбинантен препарат, както в болшинството публикации. Като референтно вещество използвахме Pepstatin A (Sigma), доказан инхибитор на аспаратните протеази.

За обработване на получените резултати беше използван закона на Беер-Буге-Ламберт, като данните бяха използвани за определяне на описаните по-долу величини (Скорост/мин, Ензимна активност (%), Инхибиране (%), Инхибираща концентрация ( $IK_{50}$ )). Според този закон величината на лъчението, погълнато или пропуснато от един разтвор или среда, е експоненциална функция на концентрацията на присъстващото абсорбиращо вещество и на дължината на пътя на лъчението през пробата. Абсорбцията на непроцесирания субстрат е по-висока от тази на лизирания. Концентрацията на субстрата намалява в линеен порядък с абсорбцията. Тя отразява скоростта на реакцията, изразена чрез концентрацията на процесирания субстрат за минута ( $\mu M/min$ ).

Според този закон,  $A = a \cdot b \cdot c$ , където

**A** е абсорбцията ( $\lambda=300 \text{ nm}$ )

**a** е моларен абсорбционен коефициент ( $a_s = 3\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (*Brogli, R. et al., 2006*)

**b** е дебелина на слоя (cm)

**c** е концентрация (mol/l);  $c=A/a \cdot b$

**Скорост/мин** е величина, изчислена като разликата между абсорбцията в началния (нулев) момент ( $A_0$ ) и тази, отчетена след определено време, разделена на времето, за което протича реакцията – в нашия случай за 3 минути (180 секунди).

**Ензимна активност (%)** е величина, отразяваща скоростта на ензимната реакция (изразена чрез абсорбцията). Изчислява се като скоростта на реакцията в присъствие на инхибитор ( $dA/min_{inh.}$ ) се раздели на скоростта на реакцията в отсъствие на такъв ( $dA/min$ ) умножено по 100.

**Инхибиране (%)** е разликата между 100 % ензимна активност (стойността отчетена при реакцията в отсъствие на инхибитор) и % ензимна активност в присъствието на изследвано вещество или референтен инхибитор.

**Инхибираща концентрация 50 (ИК<sub>50</sub>)** за протеазната активност се дефинира като концентрацията на референтния инхибитор (или изследваното вещество), което намалява началната скорост на реакцията с 50% спрямо началната скорост на реакцията без изследвано или референтно вещество.

## 2.2.7. Определяне на митохондриална токсичност

### 2.2.7.1. Екстракция на тотална клетъчна ДНК

Приготвен бе клетъчен лизат (от  $2-3 \times 10^6$  клетки), който бе депротеинизиран чрез фенолова екстракция, последвана от обработка с DNAase-free RNase при 37°C за 3 часа и получената ДНК беше преципитирана в продължение на една нощ при -20°C с 1 обем изопропилов алкохол. Преципитатът беше разтворен в 10mM Tris-HCl, pH 8,0 и 1mM EDTA и съхраняван при -20°C до провеждане на експеримента.

### 2.2.7.2. Екстракция на митохондриална ДНК (мтДНК)

Изолирането на митохондрии бе извършено с кита на BioVision (кат № 280-50, USA). Този метод позволява получаването на 5–20 µg mtDNA при еднократно изолиране.

### 2.2.7.3. Количествено определяне на митохондриална ДНК(мтДНК) и ядрена ДНК (ядНК).

Количественото определяне на митохондриалната ДНК бе извършено чрез количествен real-time PCR като използвахме 20 ng от митохондриалната ДНК като матрица. При провеждането на реакцията използвахме TaqMan универсален Master Mix в тотален реакционен обем от 25µl. Количественото определяне на митохондриалната ДНК бе извършено чрез амплифициране на високо консервативна област от гена, кодиращ субединица II на цитохром С оксидаза (СОII) в мтДНК (*Pinti, M. и съавт., 2003*). Известно е, че в процеса на тази амплификация не се намножават последователности от ядрената ДНК (използваните праймери и сондите за хибридизация са описани в 2.1.9.2.).

За количественото определяне на ядрената ДНК бе амплифициран генът **ASPG** от тоталната ДНК (използваните праймери и сондите за хибридизация са описани в 2.1.9.3.).

## 2.2.8. Изолация и оценка на ДНК за целите на PCR

ДНК за целите на PCR бе изолирана с помощта на DNA Mini Kit (Qiagen, Кат. № 51306).

Измерването на концентрацията на изолираната ДНК се извършваше спектрофотометрично при  $\lambda=260$  nm и  $\lambda=280$  nm.

## 2.2.9. Полимеразна верижна реакция (PCR) – за намножаване на секвенции от *in* участъка на *pol* гена.

Стъпките, при които се извършваше реакцията, бяха следните:

**Термична денатурация (*denaturation*)** при 95°C за 30 сек.

**Хибридизация (*annealing*)** при 55°C за 60 сек.

**Синтез в посока 5'→3' (*extension*)** 72°C за 60 сек.

**Крайна фаза** на 72°C от 5 до 15 мин. След PCR епруветките се съхраняват при -20°C.

PCR, проведена от нас, се извършваше в 33 цикъла.

За извършване на PCR използвахме две двойки праймери (виж 2.1.8.). Те обхващат различни части от интегразния ген, като за по-голяма ефективност и след множество експерименти, които не са показани в настоящата работа, праймерите бяха комбинирани по следния начин –А + D, В + С.

### Места на свързване на праймерите в интегразния ген

```
TTGTCCCCСТААСТААСАСААСАААТCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATTTATCT
AGCTTTGCAGGATTCGGGATTAGAAGTAAACATAGTAACAGACTCACAATATGCA
TTAGGAATCATTCAAGCACAACCAGATCAAAGTGAATCAGAGTTAGTCAATCAA
ATAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGCAAAAGGTCTATCTGGCATGGGTACCAGCA
CACAAAGGAATTGGA>GGAAATGAACAAGTAGATAAATTAGTCAGTGCTGGAAT
CAGGAAAAT[ACTATTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGATGAACATGAGAA
ATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTTAACTGCCACCTGTAGTA
GCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGAGAAGCCATG
CATGGACAAGTAGACTGTAGTCCAGGAATATGGCAACTAGATTGTACACATTTAG
AAGGAAAAGTTATCCTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAG
AAGTTATTCAGCAGAAACAGGGCAGGAAACAGCATAATTTTCTTTTAAAATTAGC
AGGAAGATGGCCAGTAAAAACAATACATACAGACAATGGCAGCAATTTTACCA
GTGCTACGGTTAAGGCCGCCTGTTGGTGGGCGGGAATCAAGCAGGAATTTGGAA
TTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAG>TAGTAGAATCTATGAATAAAGAATTA
AAGAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATC<TTAAGACAGCAGT
ACAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTA
CAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGA
ATTACAAAAACAATTTACAAAAATTTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGC
AGAAATCCACTTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCA
GTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAG
ATCATTAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGA
CAGGATGAGGATTAGAACATGGAAAAGTTTAGTAAAACACCATATGTATGTTTC]
AGGGAAAGCTAGGGGATGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGCCCTCATCCAA
GAATAAGTTCAG<AAGTACACATCCCACTAGGGGATGCTAGATTGGTAATAACA
ACATATTTGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGACTGGCATCTGGGTGAGGGAGTC
TCCATAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCCTGAACTAGCA
GACCAACTAATTCATCTGTATTACTTTGACTGTTTTTTCAGACTCTGCTATAAGAAA
GGCCTTATTAGGACACATAGTTAGCCCTAGGTGTGAATATCAAGCAGGACATAAC
AAGGTAGGATCTCTACAATACTTGG
```

#### 2.2.10. Хоризонтална агарозна гел-електрофореза

Чрез този метод бяха анализирани проведените PCR-и. Той ни позволи да разделим сместа от различни по дължина ДНК молекули. Разделянето ставаше на базата на молекулната им маса . Към разтвора на агароза, предварително бе добавян етидиев бромид поради свойството му да се свързва с нуклеиновите киселини и при облъчване на гела с UV-светлина те светят, като по този начин се визуализират. Определянето на дължината на фрагментите ставаше чрез сравняването им със смес от фрагменти с предварително установена дължина (т. нар. *DNA Ladder*).

##### 2.2.10.1. Техника за приготвяне на агарозен гел:

Използван бе 2% агарозен гел:

2g агароза

100ml 1xTBE буфер.



#### **2.2.10.2. Електрофоретично разделяне на пробите:**

1 об. част PCR - продукт (10 µl)

½ об. част разтвор за нанасяне на пробата

Пробите се нанасяха в стартовите ямки на агарозния гел. Фрагментите се визуализираха на UV при 315 nm. Резултатите могат да се документират върху полароидна фотографска плака.

#### **2.2.11. Секвениране на вирусната геномна ДНК**

##### **Директно Секвениране**

##### **Етапи:**

- Намножаване (амплификация) на ДНК фрагмента чрез PCR;
- Пречиствяване на продукта с ExoSAP;
- Секвенционна реакция;
- Преутаяване на продукта;
- Разтваряне на утайките.

#### **2.2.12. Селекция на резистентен вирус**

За да се получат резистентни мутанти на HIV-1, вирусът бе пасиран последователно в присъствие на покачващи се концентрации от изследваните 8SQs, към които е чувствителен. Пасажите започваха от ИК<sub>50</sub> за всяко вещество и се извършваха върху MT-4 клетъчна линия.

### 3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

#### 3.1. Определяне на цитотоксичност (ЦК<sub>50</sub>) и максимална нетоксична концентрация (МНК) на изследваните стирилхинолинови вещества върху клетъчната линия МТ-4.

Най-напред определяхме цитотоксичността на всяко вещество. Работехме изключително с клетъчната линия МТ-4. Използвахме МТТ теста, определящ живите и ранно апоптичните клетки (*Mosmann, T., 1983*). Данните от изследванията за цитотоксичност (ЦК<sub>50</sub>) на всяко изследвано вещество са представени на таблица 5, а на следващата таблица 6 тези данни са сумирани и съпоставени и с данните за МНК.

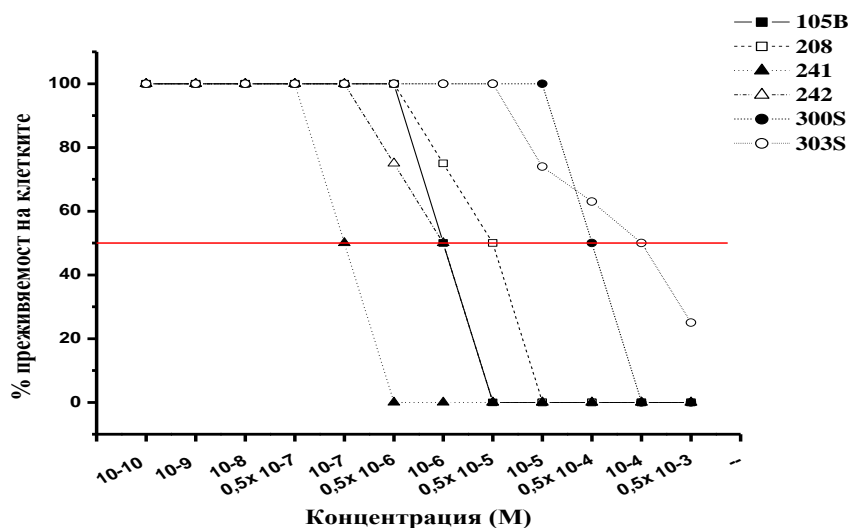
**Таблица 5.** Цитотоксичност (ЦК<sub>50</sub>): преживяемост на МТ-4 клетките (A540 nm, % живи клетки) според МТТ теста при въздействие със стирилхинолини кодирани като № 105B, 208, 241, 242, 300S и 303S.

Концентрация (M)	СТИРИЛХИНОЛИНИ - % преживяемост на клетките МТ-4 след 120-ия час на култивиране					
	105B	208	241	242	300S	303S
0,5x 10 <sup>-3</sup>	0	0	0	0	0	25
10 <sup>-4</sup>	0	0	0	0	0	50
0,5x 10 <sup>-4</sup>	0	0	0	0	50	63
10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	100	74
0,5x 10 <sup>-5</sup>	0	50	0	0	100	100
10 <sup>-6</sup>	50	75	0	50	100	100
0,5x 10 <sup>-6</sup>	100	100	0	75	100	100
10 <sup>-7</sup>	100	100	50	100	100	100
0,5x 10 <sup>-7</sup>	100	100	100	100	100	100
10 <sup>-8</sup>	100	100	100	100	100	100
10 <sup>-9</sup>	100	100	100	100	100	100
10 <sup>-10</sup>	100	100	100	100	100	100

**Таблица 6.** МНК (M) и ЦК<sub>50</sub> (M) на изследваните стирилхинолини (от Табл.3) след 120 часа на култивиране на МТ – 4 клетки според МТТ теста.

Вещество №	МНК (M)	ЦК <sub>50</sub> (M)
105B	0,5x 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>
208	0,5x 10 <sup>-6</sup>	0,5x 10 <sup>-5</sup>
241	0,5x 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7</sup>
242	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>
300S	10 <sup>-5</sup>	0,5x 10 <sup>-4</sup>
303S	0,5x 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>

Резултатите от цитотоксичността са представени графично на фигура 1.



**Фигура 1.** Графично представяне на резултатите за цитотоксичност – преживяемост на МТ-4 клетки под действието на изследваните 8SQs в различни концентрации.

Изследваните шест вещества са новосинтезирани производни на 8SQs. Те показват сравнително висока цитотоксичност, като най-ниска е тя за веществата 300S и 303S, а 303S е по – слабо токсичното от двете.

Ако построим йерархична редица, сравнявайки ЦК<sub>50</sub> на веществата, то тя би изглеждала по следния начин (от по – висока към по – ниска токсичност):

$$241 > 105B = 242 > 208 > 300S > 303S$$

Целта на насочения синтез на вещества е търсенето на производно/производни на изходните съединения, характеризиращи се освен с антивирусна активност, и с минимална цитотоксичност. Поради това съпоставихме получените резултати с данните от предшестващи експерименти с изходните субстанции (Таблица 7). Данните както за изходните, така и за новосинтезираните производни са по МНК, тъй като не от всички субстанции разполагахме с достатъчно количество.

**Таблица 7.** Сравнително представяне по МНК (M) на веществата първа и втора група според Табл.1 и 2, предшестващи новосинтезираните 8SQs в МТ – 4 клетки според МТТ теста.

Вещество №	МНК в МТ-4 кл.
100	2.5x10 <sup>-3</sup>
101	2,5x10 <sup>-3</sup>
103	2.5x10 <sup>-4</sup>
105	2.5x10 <sup>-4</sup>
201	1,25x10 <sup>-4</sup>
205	1.25x10 <sup>-4</sup>
105H	2.5x10 <sup>-6</sup>
301S	2.5x10 <sup>-4</sup>
302H	2.5x10 <sup>-6</sup>
303H	2.5x10 <sup>-6</sup>
304B	2.5x10 <sup>-6</sup>

Ако обобщим данните от всички изследвани до момента съединения, ясно се вижда, че първите шест изследвани вещества (таблица 1), имат най-ниска цитотоксичност в сравнение с останалите. Те притежават единично заместване в бензеновото ядро (при 2'С и 3'С) и ацетилирана хидроксилна група (при 8С) в хинолоновия пръстен. Известно е, че наличието на свободна хидроксилна група в молекулата на 8-хидроксихинолина (изходна молекула за синтез на останалите стирилхинолини) придава на съединенията известна токсичност и влошава поносимостта (толерантността) при използването им като лекарствени средства. Счита се, че един от начините за отстраняване на тези странични ефекти е естерифицирането (в нашият случай чрез оцетна киселина) на ОН групата на осмо място в хинолиновия пръстен. Това вероятно обяснява, защо вещества 105Н и 105В са по-токсични от 100. При останалите съединения 208 притежава ацетилирана при 8С в хинолона, хидроксилна група, но бензеновият остатък в молекулата е напълно заместен с флуор. Пълното халогениране на бензена повишава токсичността на това съединение. Вещество 301S има ниска токсичност въпреки липсата на ацетилирана -ОН. При него има единично заместване в бензена със сулфонова група (при 2'С), която вероятно компенсира липсата на това ацетилиране. 300S се различава от 301S по това, че при петия и седмия въглероден атом в хинолона има хлор. Това допълнително халогениране леко повишава токсичността. 303S се различава от 303Н по това, че 303Н е хидрохлорид, поради което вероятно е и по-токсичен.

В заключение, новосинтезираните 8SQs (представени на табл. 6) са по-токсични (според МНК) отколкото близките по структура до тях субстанции 105 и 205. Това е особено ясно изразено за производните, кодирани като 241, 242, 105В и 208.

## **3.2 Изследване ефекта на 8SQs върху репликацията на HIV-1**

Изследването на въздействието на всяко потенциално активно анти-HIV вещество започвахме винаги с определяне на биологичната активност на веществото върху репликацията на вируса, без да се интересуваме от механизма или мишената на този ефект. Изясняването на механизма и мишената на анти-HIV-1 ефекта следва алгоритъм, установен през дългогодишната практика на лабораторията по ретровируси и доразработен и допълнен в нашите изследвания.

### **3.2.1. Изследване ефекта на 8SQs върху репликацията на HIV-1 чрез определяне на цитопатичното действие на вируса върху МТ-4 клетки, заразени с HIV-1.**

Влиянието на стирилхинолиновите съединения върху репликацията на HIV-1 бе изследвано на клетъчната линия МТ-4 чрез МТТ теста за отчитане на цитопатичния ефект под действие на вируса. Всъщност тестът отчита процента на преживяемост на клетките, заразени с вирус и третирани с различни двукратно или десетократно различаващи се концентрации от изследваните вещества. Очакването е, че при антивирусен ефект, клетките ще бъдат протектирани от цитопатичното действие на вируса в сравнение с вирусната контрола (виж по-долу). Във всички случаи се правеше сравнение с преживяемостта на клетките, незаразени с вирус и без добавяне на инхибитори (клетъчна контрола), както и с клетки заразени с вирус, без добавяне на инхибитори (вирусна контрола).

На следващата таблица е показана преживяемостта на МТ-4 клетките, заразени с HIV-1 под действието на изследваните стирилхинолини.

**Таблица 8.** Преживяемост (% протекция) на МТ- 4 клетки, заразени с HIV–1 под действие на изследваните 8SQs. Под кода на всяко вещество в скоби е показана МНК за него.

Концентрация (М)	ИЗСЛЕДВАНИ 8SQs					
	105B (0,5x10-6)	208 (0,5x10-6)	241 (0,5x10-7)	242 (10-7)	300S (10-5)	303S (0,5x10-5)
	% протекция	% протекция	% протекция	% протекция	% протекция	% протекция
10 <sup>-5</sup>	* Не е правено	* Не е правено	* Не е правено	* Не е правено	60	* Не е правено
0,5x 10 <sup>-5</sup>	* Не е правено	* Не е правено	* Не е правено	* Не е правено	55	50
10 <sup>-6</sup>	* Не е правено	* Не е правено	* Не е правено	* Не е правено	50	50
0,5x 10 <sup>-6</sup>	100	60	* Не е правено	* Не е правено	47	25
10 <sup>-7</sup>	100	60	* Не е правено	66	45	25
0,5x 10 <sup>-7</sup>	90	55	75	55	0	0
10 <sup>-8</sup>	70	55	60	50	0	0
0,5x 10 <sup>-8</sup>	65	55	60	25	0	0
10 <sup>-9</sup>	60	50	55	0	0	0
0,5x 10 <sup>-9</sup>	50	0	50	0	0	0
10 <sup>-10</sup>	0	0	0	0	0	0
0,5x 10 <sup>-10</sup>	0	0	0	0	0	0

\* Съответната концентрация е цитотоксична, поради което не е използвана в експеримента.

Данните от таблица 8 показват каква е преживяемостта (протекцията) на МТ-4 клетките след заразяване с HIV-1 и третирани с изследваните вещества в различни концентрации, стартирани от МНК. По този начин бе определена не само биологичната активност на всеки изследван стирилхинолин, но и ИК<sub>50</sub> за всяко вещество по МТТ теста. Сумарно, ИК<sub>50</sub> на изследваните вещества според МТТ теста са представени на следващата таблица 9.

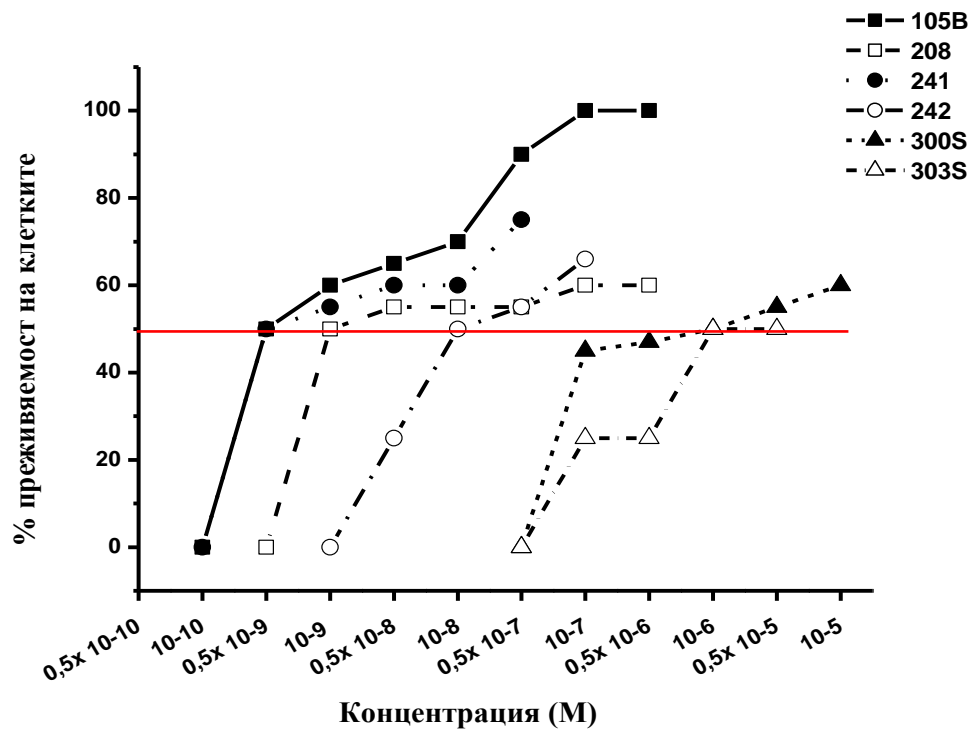
**Таблица 9.** Сравнение между протекцията на МТ-4 клетките (% преживяемост) в МНК (отбелязано в скоби за всяко вещество), ЦК<sub>50</sub>, ИК<sub>50</sub> и СИ (ЦК<sub>50</sub> / ИК<sub>50</sub>) на изследваните вещества в МТ– 4 клетки, заразени с HIV-1 според МТТ теста.

Вещество № (МНК (М))	% протекция на клетките в МНК	ИК <sub>50</sub> (М)	ЦК <sub>50</sub> (М)	Селективен индекс
105B (0,5x 10 <sup>-6</sup> )	100	0,5x 10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-6</sup>	2000
208 (0,5x 10 <sup>-6</sup> )	60	10 <sup>-9</sup>	0,5x 10 <sup>-5</sup>	5000
241 (0,5x 10 <sup>-7</sup> )	75	0,5x 10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-7</sup>	200
242 (10 <sup>-7</sup> )	66	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-6</sup>	100
300S (10 <sup>-5</sup> )	60	10 <sup>-6</sup>	0,5x 10 <sup>-4</sup>	50
303S (0,5x 10 <sup>-5</sup> )	50	0,5x10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	20

При сравняването на ефекта на концентрациите МНК и ИК<sub>50</sub> се вижда, че вещества 105B и 241 протектират клетките в най – висока степен в МНК, като 105B защитава клетките 100% дори и при концентрация 100 пъти по – ниска от МНК. Тези

данни обуславят и по-нататъшния ни интерес към 105В и 241.

На следващата графика (Фиг.2) са представени резултатите от протекцията на заразени с HIV-1 MT-4 клетки, третирани с различните производни на 8SQs в различни концентрации.



**Фигура 2.** Протекция (%) на заразени с HIV-1 MT-4 клетки, третирани с различни стирилхинолини в различни концентрации.

Вижда се, че 105В защитава клетките 100% дори и при концентрации 100 пъти по-ниски от МНК. При всички вещества се наблюдава дозозависимо намаляване на клетъчната преживяемост в различна степен, като особено добре изразен е дозозависимият ефект при 105В и 241. Това показва, че с намаляване на концентрацията, намалява и преживяемостта на клетките, защото се проявява цитопатичното действие на вируса. От графиката се вижда още, че вещества 208 и 242 протектират клетките по-слабо в МНК, като ефектът им също намалява с намаляване на концентрацията. Най-слаб антивирусен ефект показват веществата 300S и 303S. Клетъчната преживяемост при тяхното въздействие е около 60%.

**Таблица 10.** Сравнение между протекцията на МТ-4 клетките (% преживяемост) в МНК по МТТ теста и ИК<sub>50</sub> на изследваните 8SQs от първата, втората и третата група (Табл. 1, Табл. 2, Табл. 3).

Вещество №	% протекция при МНК	ИК <sub>50</sub> (М)
<b>105B</b>	100,00	0,5x 10 <sup>-9</sup>
<b>208</b>	60,00	10 <sup>-9</sup>
<b>241</b>	75,00	0,5x 10 <sup>-9</sup>
<b>242</b>	66,00	10 <sup>-8</sup>
<b>300S</b>	60,00	10 <sup>-6</sup>
<b>303S</b>	50,00	0,5x10 <sup>-5</sup>
<b>100</b>	86,20	7,5 x 10 <sup>-2</sup>
<b>101</b>	81,40	15,85 x 10 <sup>-2</sup>
<b>105</b>	88,99	2,5 x 10 <sup>-7</sup>
<b>205</b>	98,01	0,5 x 10 <sup>-6</sup>
<b>105H</b>	34,83	-----
<b>301S</b>	47,43	-----
<b>302H</b>	78,51	0.5x10 <sup>-9</sup>
<b>303H</b>	54,75	0.1x10 <sup>-9</sup>
<b>304B</b>	69,87	0.5x 10 <sup>-9</sup>

Ако сравним антивирусната активност на всички изследвани съединения се вижда, че с най-висока активност в МНК са вещества 105B, 105 и 205. Вещества 100 и 101 също проявяват висока протектираща способност, но в изложените по-долу данни се вижда, че двете вещества използват RT на HIV-1 като мишена. Много е вероятно деацетилирането на -8ОН да запази протектиращото действие на веществото, но спрямо друга мишена от вируса (подобно на 105 и 105B). Вещества 105B, 105 и 205 имат единично заместване с флуор в бензеновото ядро (в позиция 2'С) (вж. Хим. структурни формули в «Материали и методи»). При 105B -8ОН не е ацетилирана, докато при другите две тази група е ацетилирана. 105H въпреки, че има структурно сходство с горните две съединения, проявява слаба антивирусна активност, вероятно поради факта, че е хидрохлорид. Вещество 208 сравнено с 205 проявява по-слаба протектираща способност. Възможно е обяснението да е свързано с факта, че бензенът е напълно халогениран с флуор. При вещество 105 има два хлорни атома в хинолоновият пръстен (халогениран е при 5С и 7С) за разлика от 205. Това халогениране не променя протектиращата способност на веществото, сравнена с тази на 205.

Съединенията с хетероциклени заместители имат по-ниска активност от тези с халогенирано бензеново ядро. Най-активно от тях е вещество 241.

Най-слаба протекция на заразените клетки се наблюдава при съединения 300S, 301S, 303S и 303H. Единичното заместване в бензена със сулфонова или карбоксилна групи, както и с техните соли, не повишават антивирусната активност. Тъй като веществата протектират клетките в различна степен, ние решихме да сравним по ИК<sub>50</sub>, тези от тях които имат близки стойности за (%) протекция.

Възможно е да бъдат построени два йерархични реда (от по-ниска към по-висока стойност за ИК<sub>50</sub>).

Над 70 % протекция:

**105B = 241 = 302H = 304B > 105 > 205 > 101 > 100**

От 50 % до 70 % протекция:

**303H > 208 > 242 > 300S > 303S**

### 3.2.2. Изследване ефекта на 8SQs върху репликацията на HIV-1 чрез определяне на RT активността

Измерването на RT активността е широко разпространен метод за количествено определяне на репликацията на ретровирусите. Измерва се преди всичко ендогенната активност в супернатанти – т.е. в културалната течност на заразени с вирус клетки, третирани/нетретирани с инхибитори след 120 ч. култивиране. За положителна контрола бе използван препарат с доказано антивирусно действие (в нашия случай Abacavir – прилаган в клиничната практика нуклеозиден инхибитор на RT). При наличие на инхибиция в RT теста се прави извода, че не само репликацията на вируса е инхибирана, но и най-вероятно мишената на инхибиторния ефект е RT. За да се потвърди такъв извод, необходимо е % на инхибиция на RT да съвпада с % на инхибицията при биологичното титриране (микротитрационния МТТ тест). За да се докаже това окончателно, фирмата-производител предлага тест и за екзогенна RT активност – т.е. приготвя се реакционната смес с добавен инхибитор в желаната за изследване концентрация, след което в сместа се прибавя rRT с известна активност и концентрация и след инкубация се определя дали активността на ензима се изменя (инхибира) под действие на изследваното вещество.

На таблица 11 е показано въздействието на 8SQs в различни концентрации върху репликацията на HIV-1 чрез измерване на ендогенната и екзогенната RT активност.

**Таблица 11.** Действие на различни концентрации (колона 2) на най-активните 8SQs на репликацията на HIV-1 в MT-4 клетки заразени с вируса. Въздействието е измерено чрез RT активност в културалната течност (ендогенна RT) (колона 3). и директно въздействие върху rRT (екзогенна RT) (колона 4). В скоби са номерата на колоните.

Вещество № (1)	Концентрация (M) (2)	RT – A405 RT/ RTк - A405 и (%) инх.* (3)	rRT – A405 rRT/ rRTк - A405 и (%) инх.** (4)
ABC	$35 \times 10^{-6}$	100	<sup>xx</sup> не е правено
	$7 \times 10^{-6}$	87.2	<sup>xx</sup> не е правено
	$3.5 \times 10^{-6}$	51.5	<sup>xx</sup> не е правено
	$0.7 \times 10^{-6}$	40.4	<sup>xx</sup> не е правено
105B	$0,5 \times 10^{-6}$	0,205/0,803 – (100,0)	1,105/1,300 – (0,0)
	$0,5 \times 10^{-7}$	0.250 /0.803 – (68,86)	1.117 / 1.300 – (0.0)
	$10^{-8}$	0.308/ 0.803 – (61,60)	<sup>x</sup> не е правено
	$10^{-9}$	0.390 /0.803 – (51,54)	<sup>x</sup> не е правено
	$10^{-10}$	0.765 /0.803 – (9.49)	<sup>x</sup> не е правено
241	$0,5 \times 10^{-7}$	0,225/0,803 – (71,99)	1.177 / 1.300 – (0.0)
	$10^{-8}$	0,320/0,803 – (60,15)	1.170 / 1.300 – (0.0)
	$10^{-9}$	0,402/0,803 – (50,04)	<sup>x</sup> не е правено
	$10^{-10}$	0.872 /0.803 – (0)	<sup>x</sup> не е правено

ABC – референтен инхибитор (NRTI)

<sup>xx</sup> Не е правено поради липсата на ABC трифосфат.

<sup>x</sup> Не е правено поради ограничени количества на използвания от нас кит, а и поради убедителността на резултатите в предшествашите разреждания.

\* - отрицателна контрола на теста за ендогенна RT активност е A405 = 0,216. Положителната контрола в единия експеримент е A405 = 0,803, а в другия – 2,168.т.е всеки опит има собствена контрола Експерименталните резултати са средно аритметично между 3–6 ямки, подбирани така, че екстинкциите им в МТТ теста (A540) да не се отличават повече от 10%



\*\* - отрицателна контрола на теста за rRT A405 = 0,232. Положителната контрола за rRT теста е A405 = 1,300 (стандарт № 5, от който сме добавяли към инкубационната смес, в която има означената концентрация изследвано вещество). За вещество 105 положителната контрола е A405 = 2,901 (стандарт № 2). Отново всеки опит има собствена контрола.

На следващите таблици 12 и 13 са представени резултатите от изследването на ендогенна и екзогенна RT активност на предварително изследваните 8SQs от първата и втората групи (Таблицы 1 и 2).

**Таблица 12.** Действие на предварително изследваните (изходни, от първа група) 8SQs в МНК върху репликацията на HIV-1 в МТ-4 клетки, заразени с вируса (колона 2). Въздействието е измерено чрез RT активност в културалната течност (ендогенна RT) (колона 3). и директно въздействие върху rRT (екзогенна RT) (колона 4). Номерата на колоните са в скоби.

Вещество № (1)	Концентрация (M= МНК) (2)	RT – A405 RT/ RTк - A405 и (%) инх.* (3)	rRT – A405 rRT/ rRTк - A405 и (%) инх.** (4)
100	$2.5 \times 10^{-3}$	0,204/2.901 (92.96)	0,315/2.901(90)
101	$2.5 \times 10^{-3}$	0,476/2.901 (83.59)	0,469/2.901 (84)
103	$2.5 \times 10^{-4}$	1,857/2.901 (36)	0,802/2.901(72)
105	$2.5 \times 10^{-4}$	0,531/2.901 (81.70)	1,072/2.901(63)
201	$1.25 \times 10^{-4}$	1,917/2.901 (33.91)	0,618/2.901(79)
205	$1.25 \times 10^{-4}$	2,114/2.901 (27.13)	1,118/2.901(61)

\* - отрицателна контрола на теста за ендогенна RT активност е A405 = 0,220. Положителната контрола е A405 = 2,901. Експерименталните резултати са средно аритметично между 3 – 6 ямки, подбрани така, че екстинкциите им в МТТ теста (A540) да не се отличават повече от 10%

\*\* - отрицателна контрола на теста за rRT A405 = 0,277. Положителната контрола за rRT теста е A405 = 2,901 (стандарт № 2).

**Таблица 13.** Действие на предварително изследваните 8SQs от група 2 в МНК (колона 2) върху репликацията на HIV-1 в МТ-4 клетки, заразени с вируса. Въздействието е измерено чрез RT активност в културалната течност (ендогенна RT) (колона 3) и директно въздействие върху rRT (екзогенна RT) (колона 4). Номерата на колоните са в скоби.

Вещество № (1)	Концентрация (M=МНК) (2)	RT – A405 RT/ RTк - A405 и (%) инх.* (3)	rRT – A405 rRT/ rRTк - A405 и (%) инх.** (4)
105H	$2.5 \times 10^{-6}$	2.964/2.950 (0)	1.204/1.000 (0)
301S	$2.5 \times 10^{-4}$	0.643/2.964 (78.31)	1.108/1.000 (0)
302H	$2.5 \times 10^{-6}$	0.744/2.964 (74.89)	0.968/1.000 (0)
303H	$2.5 \times 10^{-6}$	0.929/2.039 (54.43)	2.244/2.563 (0)
304B	$2.5 \times 10^{-6}$	0.794/2.964 (73.21)	1.043/1.000 (0)

\* - отрицателна контрола на теста за ендогенна RT активност е  $A_{405} = 0,216$ . Положителната контрола в единия експеримент е  $A_{405} = 2.950$ , във втория е 2,964 и в третия 2,039 .т.е всеки опит има собствена контрола Експерименталните резултати са средно аритметично между 3–6 ямки, подбирани така, че екстинкциите им в МТТ теста ( $A_{540}$ ) да не се отличават повече от 10%

\*\* - отрицателна контрола на теста за rRT  $A_{405} = 0,232$ . Положителната контрола за rRT теста при едните експерименти е  $A_{405} = 1,000$  (стандарт №5 добавен към инкубационната смес, в която има означената концентрация изследвано вещество), а при другите е  $A_{405} = 2,563$  (стандарт № 2) (при вещество 303Н). Отново всеки опит има собствена контрола.

Вещества 100 и 101 инхибират > 80% HIV-1 инфекциозността в MT-4 клетки (Таблица 12), което е в съответствие с инхибирането на активността на RT в супернатантите (ендогенна RT) и rRT. Това означава, че 100 и 101 използват RT на HIV-1 като мишена. Подобна е ситуацията при вещество 105, въпреки че инхибицията спрямо rRT е малко по – ниска в сравнение с инхибирането на ендогенната RT. При веществата от втората група (Табл.13) и най-активните новосинтезирани 8SQs (Табл.3 и Табл.11) инхибирането на ендогенната транскриптазна активност не съответства на въздействието върху рекомбинантния ензим (спрямо който няма никаква инхибиция). Но някои от веществата от първата група инхибират ендогенната активност умерено, а много силно – екзогенната – възможно е това да е израз на директна токсичност върху ензима. Именно по тази причина за нас са най-важни изследванията по инфекциозност в клетъчна култура.

Съединенията от първата група (таблица 1) проявяват инхибираща активност в различна степен спрямо rRT. По-подробният анализ позволява да се направят изводи за това, кои замествания намаляват или увеличават афинитета към rRT. Вещество 100 се различава от вещество 101 по позицията на халогенния елемент, в случая хлор, в бензеновия заместител. При 100 хлорът е в позиция 2'С, а при 101 - в 3'С. Тази разлика обуславя по-високата активност на вещество 100 спрямо 101. Ако хлорът при 3'С се замени с бром (съединение 103), то инхибиращата способност на веществото намалява (видимо е при сравняването на 101 и 103). В случай, че халогенният елемент при 2'С е флуор (вещество 105), активността на съединението намалява, което се вижда при сравняване с активността на вещество 100, при което в тази позиция има хлорен атом. Халогенирането на хинолиновия хетероцикъл при петия и седмия въглероден атом с хлор не влияе върху инхибиращата способност на съединенията спрямо рекомбинантния ензим. Това се вижда при сравняване на данните за вещества 101 и 201, както и 105 и 205. Липсата на хлорен заместител в хинолоновия пръстен (при 5С и 7С) на вещество 201 не променя активността му в сравнение с 105 и 205. Това показва, че от значение са вида и позицията на халогенният елемент в бензена.

При всички активни спрямо rRT съединения , хидроксилната група при осмия въглероден атом в хинолона е ацетилирана, а в бензеновия пръстен има единично заместване с халогенен елемент. Неактивни спрямо rRT са веществата 105В, 105Н и 208 (данните за 208 не са показани). Съединения 105В и 105Н имат единично заместване с флуор във бензена (позиция 2'С), но -8ОН не е ацетилирана. При вещество 208 хидроксилната група е ацетилирана, но в бензена има пълно заместване на всички въглеродни атоми с флуор. Това би могло да е обяснението защо трите вещества не инхибират рекомбинантния ензим.

Накратко казано, вещества 100,101 и 105 са инхибитори на репликацията чрез инхибиране на RT, докато останалите съединения инхибират репликацията на HIV-1,

но чрез въздействие върху други вирусни мишени извън RT – вероятни са вирусната протеаза и интегразата – предмет на следващите изследвания.

### 3.2.3. Изследване за инхибиращ ефект на новосинтезираните 8SQs върху PR на HIV-1.

Адаптираният от нас метод използва нативна вирусна PR от стандартизиран вирусен сток. В това се състои и основната разлика между описаните в литературата методи и въведения от нас. Като референтно вещество използвахме известния инхибитор на аспартатни протеази пепстатин (*Umezawa, H. и съавт., 1970; Marciniszyn, J. и съавт., 1976*).

#### Субстрати

Според литературата, и двата хромогенни пептидни субстрата произведени от фирмата Bachem - HIV-1 Substrate III (Кат. № Н-9035) и HIV-1 Substrate IV (кат. № Н-1048) - бяха тествани при ензимната реакция. На базата на кинетичните константи (показани в следващата таблица 14), а и на експериментални наблюдения (данните не са показани), избрахме да работим с HIV протеазен субстрат III, тъй като той има по – високи стойности на Vmax и Km (Таблица 14). Ниската субстратна специфичност (определяна от по–високата Km) е важна в нашия случай, защото се използва тотален нативен, а не рекомбинантен пречистен вирусен ензим.

**Таблица 14.** Състав и кинетична характеристика на използваните субстрати (Bachem).

HIV протеаза субстрат	Състав	Vmax [ $\mu\text{M s}^{-1}$ ]	Km [ $\mu\text{M}$ ]	Kcat [ $4.9 \text{ s}^{-1}$ ]
III	H-His-Lys-Ala-Arg-Val-Leu-p-nitro-Phe-Glu-Ala-Nle-Ser-NH <sub>2</sub>	2.29	63	13
IV	H-Lys-Ala-Arg-Val-Nle-p-nitro-Phe-Glu-Ala-Nle-NH <sub>2</sub>	0.88	15	4.9

Виждат се ясно предимствата на субстрат III, който и на практика се оказва подходящ за работа с нативния ензим.

#### Избор на буфер за провеждане на реакцията:

Според литературата съществуват два експериментални протокола, различаващи се по буфера, в който се провежда реакцията и рН, което той осигурява:

- Според (*Persichini, T. и съавт., 1998*) ензимната реакция се провежда в 50 mM ацетатен буфер, рН=4,9; 0.2M NaCl; 10%(v/v) глицерол.
- Според (*Brogliа, R. и съавт., 2006*) – ензимната реакция е оптимална в присъствие на 20 mM phosphate buffer, рН=6,0.

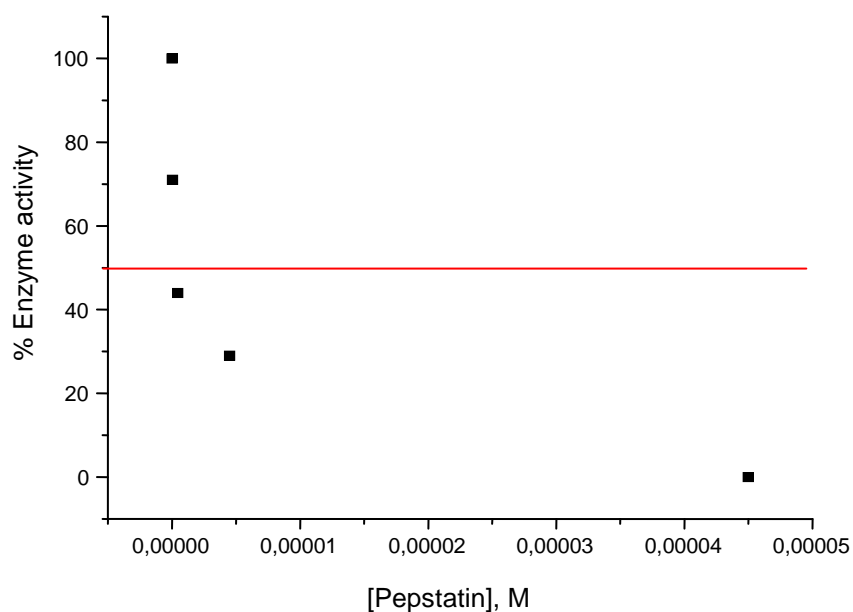
Началната скорост на реакцията беше по – висока, когато използвахме 20 mM фосфатен буфер, рН=6.0. Поради това той бе избран за целите на експериментите.

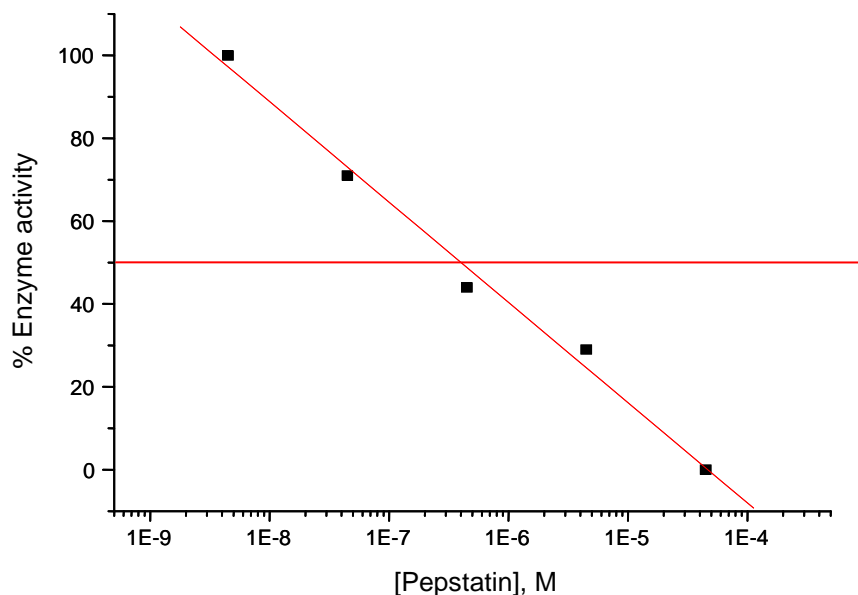
Таблица 15 показва отработването на протеолитичната реакция с нативна вирусна протеаза и референтен пепстатин.

**Таблица 15.** Обработване на протеолитичната реакция с нативна протеаза на HIV-1 и референтен инхибитор – pepstatin . В графата „Контрола” са показани няколко паралелни опита с различни концентрации пепстатин с цел проверка на възпроизводимостта на реакцията.

Репстатин, М	Скорост, dA/min	Средна скорост, dA/min	Количество лизиран субстрат, μM/min	% Инхибиция	% Ензимна активност
Контрола	0,0015	0,0017	0,566	0	100
	0,00175				
	0,00175				
	0,002				
	0,0015				
4,5x 10 <sup>-9</sup>	0,00175	0,00175	0,583	0	100
4,5x 10 <sup>-8</sup>	0,001	0,00117	0,39	29	71
	0,0015				
	0,001				
4,5x 10 <sup>-7</sup>	0,00075	0,00075	0,25	44	56
4,5x 10 <sup>-6</sup>	0,0005	0,0005	0,166	71	29
	0,0005				
4,5x 10 <sup>-5</sup>	0	0	0	100	0
	0				

По-долу получените резултати са изразени графично (Фигура 3).





**Фигура 3.** Графика, показваща инхибиращото действие на референтния инхибитор пепстатин в различни негови разреждания, и същата графика, но линеаризирана чрез логаритмуване на стойностите за концентрацията на пепстатин.

Стойността за  $IC_{50}$  (концентрацията на веществото, която намалява скоростта на реакцията с 50%) изчислена чрез линеаризацията на логаритмично-представените резултати е  $4 \times 10^{-7}$ .

В литературата най-често при скрининг за ефект на различни вещества върху HIV-1 протеаза се използва рекомбинантен ензим, експресиран в *E.coli* и съдържащ пет мутации, предотвратяващи автопротеолиза и окислителния процес цистеин-тиол. Предимството на рекомбинантния ензим е безспорно, позволява да се определи количествено протеазата в реакционната смес. Много често обаче активността на инхибиторите установена *in vitro* не се потвърждава *in vivo* (Broglia, R. et. al., 2006).

Модифицираният от нас метод използва за изследване нативната вирусна протеаза. Въпреки, че методът не определя концентрацията на ензима, резултатите от тестовите с референтния инхибитор пепстатин показват отлична възпроизводимост (Таблица 15). Както се вижда от Таблица 15, референтният инхибитор проявява ефекта си дозозависимо.

Разработеният от нас метод бе използван за изследване на инхибиращата способност на новосинтезираните стирилхинолини спрямо протеазата на HIV-1 ШВ. Получените резултати за всяко вещество са представени по-долу в отделни таблици.

**Таблица 16.** Ефект на 105В върху нативна вирусна протеаза според описания и въведен от нас метод (Hinkov, A. и съавт., 2010). Представени са два отделни опита с използване на два вирусни концентрата.

	Средна скорост, dA/min	Количество лизиран субстрат, μM/min	% Ихибиция	%Ензимна активност
<b>Контрола</b>	0,0017	0,567	0	100
<b>105В (10<sup>-6</sup>)</b>	0,0015	0,500	14	86
<b>Контрола</b>	0,0053	1,77	0	100
<b>105В (0,5x10<sup>-6</sup>)</b>	0,0044	1,47	20	80
<b>105В (10<sup>-7</sup>)</b>	0,0042	1,40	20	80

Вещество 105В беше изследвано в концентрации по – висока (**10<sup>-6</sup>М**), равна (**0,5x10<sup>-6</sup> М**) и по – ниска (**10<sup>-7</sup> М**) от МНК, установена експериментално в клетъчна култура. И при трите беше установена приблизително 20% инхибиране на ензимната активност. Липсва и дозозависима инхибиция. Вероятно този нисък процент на инхибиране на ензима се дължи на неспецифично взаимодействие на веществото с него. Тези резултати говорят, че протектиращият ефект на 105В, наблюдаван в клетъчната култура, не се дължи на използването на протеазата като негова мишена.

**Таблица 17.** Ефект на 208 върху нативна вирусна протеаза според описания от нас метод (Hinkov, A. и съавт., 2010). Представени са два отделни опита с използване на два вирусни концентрата.

	Средна скорост, dA/min	Количество лизиран субстрат, μM/min	% Ихибиция	%Ензимна активност
<b>Контрола</b>	0,0018	0,600	0	100
<b>208 (10<sup>-5</sup>)</b>	0,00097	0,323	48	52
<b>Контрола</b>	0,0017	0,566	0	100
<b>208 (0,5x10<sup>-6</sup>)</b>	0,0019	0,633	0	100
<b>208 (10<sup>-7</sup>)</b>	0,0019	0,633	0	100

Вещество 208 беше изследвано в концентрации – по–висока (**10<sup>-5</sup>М**), равна (**0,5x10<sup>-6</sup>М**) и по–ниска (**10<sup>-7</sup> М**) от МНК, установена експериментално в клетъчна

култура. Инхибиране на ензимната активност беше установена само при най – високата от изследваните концентрации (около 48%). Тя обаче е токсична в клетъчна култура. В МНК не се наблюдава инхибиране на протеазната активност. Тези резултати говорят, че установеният протектиращ ефект ( $\approx 60\%$ ) в клетъчна култура също не се дължи на използването на протеазата като мишена.

**Таблица 18.** Ефект на 241 върху нативна вирусна протеаза според описания от нас метод (Hinkov, A. и съавт., 2010). Представени са два отделни опита с използване на два вирусни концентрата.

	Средна скорост, dA/min	Количество лизиран субстрат, $\mu\text{M}/\text{min}$	% Ихибиция	%Ензимна активност
<b>Контрола</b>	0,0019	0,633	0	100
<b>241 (<math>10^{-5}</math>)</b>	0,0016	0.533	12	88
<b>Контрола</b>	0,0020	0,666	0	100
<b>241 (<math>0,5 \times 10^{-7}</math>)</b>	0,0020	0,666	7	93
<b>241 (<math>10^{-8}</math>)</b>	0,0019	0,633	6	94

Вещество 241 беше изследвано в две концентрации: по–висока ( $10^{-5}$  М), равна ( $0,5 \times 10^{-7}$  М) и по-ниска ( $10^{-8}$  М) от МНК установена експериментално в клетъчна култура. Инхибиращата активност беше много ниска и за трите изследвани концентрации. Тези резултати говорят, че ефектът на 241 не може да се обясни с въздействие върху вирусната протеаза.

**Таблица 19.** Ефект на 242 върху нативна вирусна протеаза според описания от нас метод (Hinkov, A. и съавт., 2010).

	Средна скорост, dA/min	Количество лизиран субстрат, $\mu\text{M}/\text{min}$	% Ихибиция	%Ензимна активност
<b>Контрола</b>	0,0017	0,567	0	100
<b>242 (<math>10^{-6}</math>)</b>	0,0012	0,400	28	72
<b>242 (<math>10^{-7}</math>)</b>	0,0014	0,467	17	83
<b>242 (<math>10^{-8}</math>)</b>	0,0017	0,567	0	100

Вещество 242 беше изследвано в концентрации: по – висока ( $10^{-6}$ М), равна ( $10^{-7}$  М) и по-ниска ( $10^{-8}$  М) от МНК, установена експериментално в клетъчна култура. Инхибиращата активност беше ниска и за трите изследвани концентрации. С

увеличаване на разреждането намаляваше и ефекта. При концентрацията, съответстваща на МНК се установи 17 % инхибиране на ензимното действие, но то е по-слабо от процента протекция, установен в клетъчна култура (66%). Въпреки дозозависимото инхибиране на протеазата в концентрациите 10 x МНК и МНК, то е твърде слабо изразено в сравнение с % протекция в клетъчна култура. Тези резултати говорят, че веществото 242 оказва много слабо въздействие (практически не оказва) върху протеазата.

**Таблица 20.** Ефект на 300S върху нативна вирусна протеаза според описания от нас метод (Hinkov, A. и съавт., 2010).

	Средна скорост, dA/min	Количество лизиран субстрат, μM/min	% Ихибиция	%Ензимна активност
<b>Контрола</b>	0,0042	1,40	0	100
<b>300S(10<sup>-5</sup>)</b>	0,0015	0,500	66	34
<b>300S (10<sup>-6</sup>)</b>	0,0034	1,13	20	80
<b>300S(10<sup>-7</sup>)</b>	0,0031	1,033	24	76
<b>300S(10<sup>-8</sup>)</b>	0,0042	1,40	0	100

Вещество 300S беше изследвано в концентрации: равна (10<sup>-5</sup> M (10 μM)) и по-ниски (10<sup>-6</sup>M; 10<sup>-7</sup> M) от МНК, установена експериментално в клетъчна култура. Инхибиращата активност при концентрацията, отговаряща на МНК (66%) беше практически идентична на установения процент протекция в клетъчна култура (60%). Данните предполагат, че веществото 300S използва като мишена вирусната протеаза, тъй като % на инхибицията на протеазата съответства на % на протекцията на клетките от вирусното въздействие в клетъчна култура.

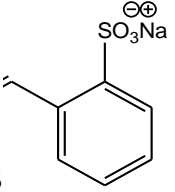
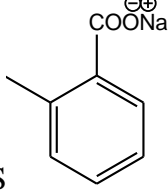
**Таблица 21.** Ефект на 303S върху нативна вирусна протеаза според описания от нас метод (Hinkov, A. и съавт., 2010).

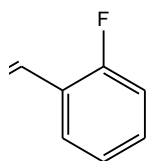
	Средна скорост, dA/min	Количество лизиран субстрат, μM/min	% Ихибиция	%Ензимна активност
<b>Контрола</b>	0,0015	0,500	0	100
<b>303S (0,5x10<sup>-5</sup>)</b>	0,000333	0,111	74	26
<b>303S (10<sup>-6</sup>)</b>	0,000666	0,222	54	46
<b>303S(10<sup>-7</sup>)</b>	0,0017	0,567	0	100



Вещество 303S беше изследвано в концентрации: равна ( $0,5 \times 10^{-5}$  M) и по-ниски ( $10^{-6}$  M;  $10^{-7}$  M) от МНК установена експериментално в клетъчна култура. Инхибиращата активност в МНК (74%) е дори по-висока от установената протекция в клетъчна култура (60%). Инхибицията в протеазния тест се изравнява с клетъчната протекция при концентрация десет пъти по – ниска от МНК. При по-голямо разреждане ефектът на веществото повече не се наблюдава и действието му изглежда дозозависимо. Според тези данни, най-вероятно и веществото 303S използва като мишена вирусната протеаза.

Веществата 300S и 303S имат сходно поведение в клетъчни култури по отношение на цитотоксичността и клетъчната протекция. Същото може да се каже и за количественото инхибиране в протеазния тест. Двете вещества имат и сходна структура. Различават се по заместителите във фенолния пръстен

(300S  и 303S ) и хинолиновия (300S има хлор при седмия и петия въглероден атом, а при 303S липсват). Вещество 105B показва висок процент протекция в клетъчна култура, но слабо инхибира протеазата в използваният от нас метод. Има сходна структура с 300S, но се различава от него по заместителя във



фенолния пръстен, . Наличието на полярна и разклонена химична група на това място най-вероятно оказва влияние върху антипротеазното действие на двете вещества.

Така в резултат на използването на въведения от нас метод за измерване на HIV-1 протеазната активност в нативен вирусен препарат, бе намерено, че две от стирилхинолиновите производни – 300S и 303S дължат антивирусната си активност на въздействие върху мишената „вирусна протеаза”.

Следователно, следвайки алгоритъма, разработен и използван от нас, изследванията бяха продължени към търсене на анти-интегразно действие на 8SQs, проявили биологична антивирусна активност, но без да е определена мишената им на действие (105B и 241). HIV-1 интегразата е мишена на други стирилхинолини, докладвани в литературата (*Bonnenfant, S. и съавт., 2004*) и търсенето на антиинтегразна активност и при тези 8SQs е напълно оправдано.

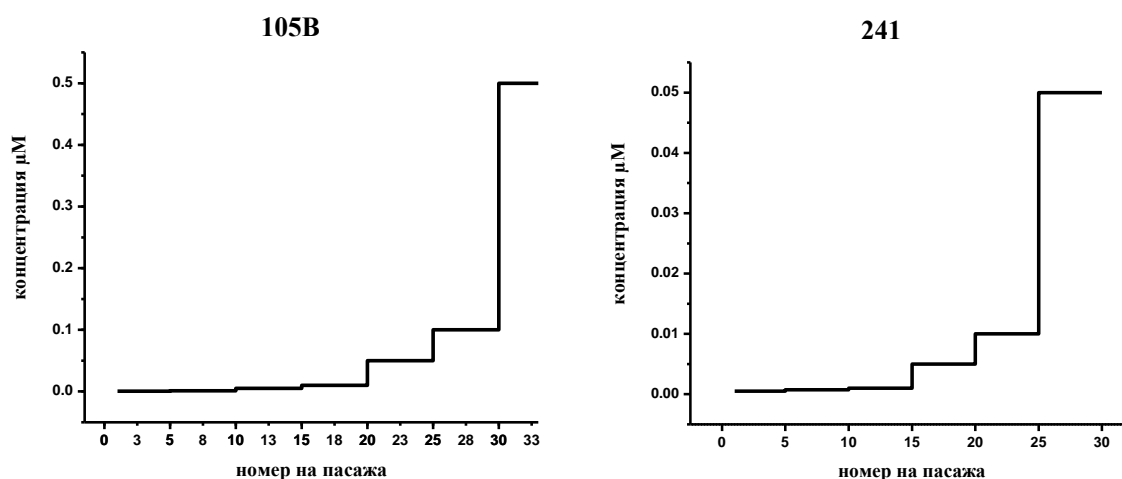
### 3.3. Селекция на резистентни мутанти на HIV-1 към две от веществата (105B и 241), показали висока антивирусна активност.

За да се изясни наличие или отсъствие на въздействие върху HIV-1 IN (както впрочем и върху останалите вирусни ензими), се предприема селекция на резистентни вирусни мутанти чрез пасирането на дивия вирус с покачващи се концентрации инхибитор. Това се прави още в предварителните изпитателни етапи с последващо секвениране, прецизиращо точното място на въздействие на активното вещество.

Доказването на мутации в гена *pol*, по-специално в частта му, кодираща *in*, би доказало, че действието на изучаваните вещества има за мишена именно вирусния

ензим IN. След като бе показано, че нито RT, нито PR са мишени на двата 8SQs, развитието на резистентност и определянето на основни фенотипни характеристики на резистентен/ни мутант/и от една страна, както и секвенционният анализ на генома на получените резистентни мутанти, от друга, би допринесло за изясняване на специфичния механизъм на антивирусното действие на двата 8SQs, както и уточняването на тяхната молекулна мишена в структурата на вируса.

С цел изолиране на максимално хомогенно вирусно потомство на HIV-1, което да е резистентно към антивирусния ефект на двата стирилхинолина, бяха направени тридесет и три за 105B и тридесет за 241 последователни пасажи на HIV-1 в MT-4 клетки в присъствие на високи и повишаващи се концентрации на всяко от двете вещества (Фигура 4 и Таблица 22). Пасирането бе продължено докато клетките издържат високите концентрации на изследваното вещество без прояви на цитотоксичност (смърт), а само с прояви на цитопатичност в случая – наблюдаване на синцитиообразуване.



**Фигура 4.** Усилване на селективния натиск чрез повишаване на концентрацията на 105B и 241 в хода на последователните пасажи.

**Таблица 22.** Усилване на селективния натиск чрез повишаване на концентрацията на 105B и 241 в хода на последователните пасажи.

Концентрация (M) 105B	µM	Пасаж	Концентрация (M) 241	µM	Пасаж
$0,5 \times 10^{-9}$	0.0005	1-5	$0,5 \times 10^{-9}$	0.0005	1-5
$10^{-9}$	0.001	5-10	$0,75 \times 10^{-9}$	0.00075	5-10
$0,5 \times 10^{-8}$	0.005	11-15	$10^{-9}$	0.001	11-15
$10^{-8}$	0.01	16-20	$0,5 \times 10^{-8}$	0.005	16-20
$0,5 \times 10^{-7}$	0.05	21-25	$10^{-8}$	0.01	21-25
$10^{-7}$	0.1	26-30	$0,5 \times 10^{-7}$	0.05	26-30
$0,5 \times 10^{-6}$	0.5	31-33			

Известно е, че в присъствието на инхибитора, резистентните мутанти имат репликативно преимущество над дивия вирус. Това е така, защото за да „избягат” от лекарствената преса, вирусите трябва да развият мутации в гените, кодиращи

вирусните ензими и протеини (RT, протеаза, интегразата, вирусната обвивка), които имат отношение към вирусната репликация и вирусната инфекциозност, т.е. към вирусния фитнес. Вирусният фитнес е комплексен параметър, чрез който се описва репликативната адаптируемост на вируса в изменената околна среда – в случая – съдържаща инхибитор. За да се докаже възникването на мутанта/тите, е необходимо да се сравнят репликативната кинетика и инфекциозността на дивия вирус и получените мутанти, т.е. вирусния фитнес на дивия тип и мутантите.

### **3.3.2. Определяне на вирусния фитнес на резистентните мутанти.**

Изследванията на 8SQs, инхибиращи интегразата, до момента сочат, че в активния център на интегразата те взаимодействат с металния йон в него и с контактните групи, отговорни за свързването на клетъчната и провирусната ДНК (3' процесингът и верижния трансфер). При селектирането на резистентна вирусна популация се размножават тези вируси, които имат ниска чувствителност (резистентност) към изследвания инхибитор. Тъй като аминокиселините от активния център на интегразата са високо консервативни, то мутациите в тях биха били летални за вируса. Мутации, които биха позволили на вируса да се реплицира в присъствието на 8SQs трябва да се очакват в аминокиселините, отговорни за свързването с клетъчната и провирусната ДНК, така че да намалят афинитета на ензима към веществото, но все още да могат да се свързват с нативния си субстрат. Очаква се, че такива вируси ще имат промяна в репликативната си кинетика и потомството им е ще е по-малобройно при изследване в постановка без добавен инхибитор след заразяването.

#### **3.3.2.1. Репликативна кинетика на резистентните мутанти в сравнение с дивия вирус HIV-1 III В.**

Репликативната кинетика за всеки вирусен пасаж поотделно (в случая див тип вирус – wt, 10 пасаж, 30 пасаж за 241 и wt, 10 пасаж и 33 пасаж за 105В) се определя след заразяване на клетъчни култури (в случая МТ-4 клетки) и проследяване на продукцията на р24 антигена или RT активността в културалната течност без добавен инхибитор на определени периоди от време (Ho, D. и съавт., 1994; Nicastri, и съавт., 2004).

Клетките бяха разсявани, както е описано в «Материали и методи» и след 24 h заразявани с 50 µl HIV-1 III В (3 колони с HIV-1 III В<sup>wt</sup>, 3 колони с HIV-1 III В 10 пасаж, 3 колони с HIV-1 III В 30 пасаж за 241 и HIV-1 III В 10 пасаж и 33 пасаж за 105В, всички в разреждане 10<sup>-1</sup>). Експериментът бе проведен в отделни плаки – във всяка с див тип и съответно с вирусите от описаните вирусни пасаж и контроли. Последната колона служеше като контрола клетки. След адсорбцията клетките бяха заливани с растежна среда без добавка на инхибитор. При тази експериментална постановка (таблица 23) с преимущество се реплицират дивите вируси, т.е. тези, които не са въздействани от съответния инхибитор. На третия, четвъртия, петия и шестия ден бяха събирани супернатантите от всяка колонка поотделно – по 3 ямки за всеки ден след задължително микроскопско проследяване на състоянието на клетките. Репликацията се отчиташе по RT активността за супернатантите от всеки срок и пасаж (чрез търговски тест на HS-kit LentiRT-Cavidi, Швеция) (таблица 24).

**Таблица 23.** Експериментална постановка-схема на теста за репликативна кинетика на HIV-1 в хода на пасирането му с повишаващи се концентрации на инхибиторите.

*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
*	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	Клетъчна контрола	*
*	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	Клетъчна контрола	*
*	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	Клетъчна контрола	*
*	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	Клетъчна контрола	*
*	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	Клетъчна контрола	*
*	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ див тип	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ 10п.	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	HIV-1/ IIIВ последен пасаж	Клетъчна контрола	*
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

\*RPMI 1640 без серум

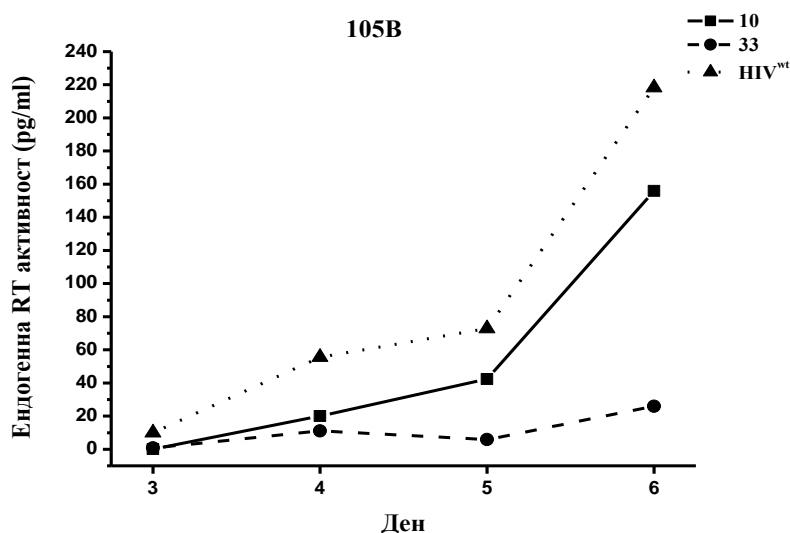
**Таблица 24.** Репликативна кинетика на HIV-1 III В по RT активност (pg/ml) в хода на пасирането на вируса с покачващи се концентрации от стирилхинолините 105В и 241 (див тип, 10 пасаж и 33 пасаж за 105В и 10 пасаж и 30 пасаж за 241). Заразените с вирус клетки са култивирани в растежна среда без добавка на инхибитор. Резултатите за всеки срок и пасаж са средно аритметично от три ямки, супернатантите от които са взети след микроскопско наблюдение (преживяемостта на заразените клетки винаги бе сравнявана с контролите).

Вирус	HIV/105В 10 п. RT-pg/ml	HIV/105В 33 п. RT-pg/ml	HIV/241 10 п. RT-pg/ml	HIV/241 30 RT-pg/ml	HIV <sup>wt</sup> RT-pg/ml
Ден след заразяване					
3	0.10	0.8	6.87	0.85	10
4	20	11	52.4	0.7	55.6
5	42.4	5.87	631.6	0.7	72.75
6	155.90	26	550	12	218.3

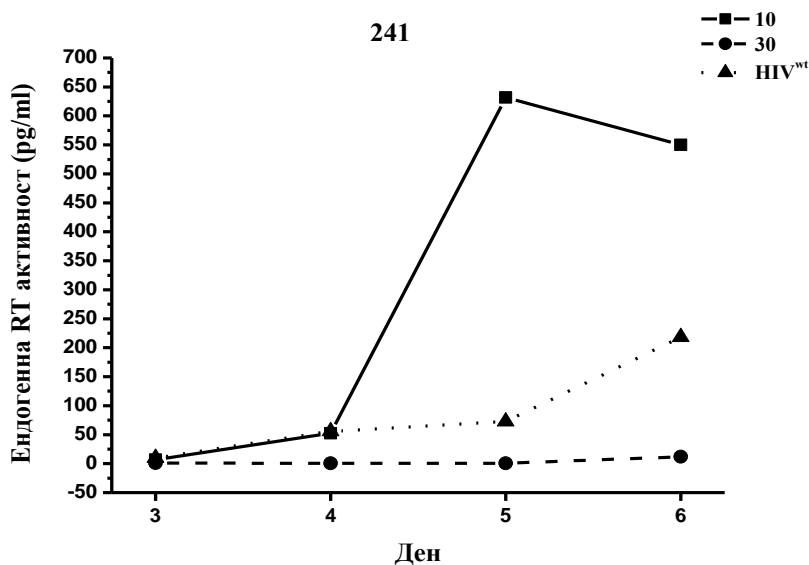
\* - отрицателна контрола на теста за ендогенна RT активност е А405 = 0,216.

Положителната контрола е A405=2,168 (стандарт № 2). Експерименталните резултати са средно аритметично между 3 – 6 ямки. Съдържанието в pg/ml е според rRT/pg/ml, приложено от производителя в кита (вж. Материали и методи).

Получените и показани в Табл. 24 резултати са графично представени на Фигура 5 за 105В и на фигура 6 за 241.



**Фигура 5.** Графично изображение на репликативната кинетика на HIV-1 III В в хода на пасирането на вируса с покачващи се концентрации от стирилхинолина 105В. Репликацията е измерена чрез RT активността – стойностите са показани в таблица 24 (pg/ml).



**Фигура 6.** Графично изображение на репликативната кинетика на HIV-1 III В в хода на пасирането на вируса с покачващи се концентрации от стирилхинолина 241. Репликацията е измерена чрез RT активността –стойностите са показани в таблица 24 (pg/ml).

Получените резултати при 105В показват, че репликативната кинетика на десетия пасаж все още следва тази на дивия вирус, докато тази на последния пасаж е променена (занижена). В 10-тия пасаж все още делът на дивия вирус е висок (58% на 5-ия ден), а делът на резистентните вируси е все още по-нисък (42%) (Тези цифри се получават от формулата (RT активността на 5-ия ден на вируса на 10-ия пасаж / RT-активността на 5-ия ден на дивия тип) x 100 – т.е. (42,4/72,75) x 100 – получените стойности се изразяват в проценти (%)). Продукцията на дъщерни вируси от клетките, заразени с HIV-1 III B<sup>wt</sup> е близка до тази от клетките, заразени с вирус от 10-тия пасаж, поради което и активността на обратната транскриптаза в супернатантите на дивия вирус и този на 10 пасаж е сходна на 5-ия и 6-ия ден при 105В. При 241 обаче репликативната кинетика на 10 пасаж следва тази на дивия тип до 4-ия ден, след което третирият вирус явно превъзхожда по репликация дивия тип. С напредване на пасажите и повишаване на инхибиторната преса дивият вирус развива мутация/и, за да избегне тази преса, а резистентният вирус получава репликативно преимущество над дивия тип. По-нататък, при последните пасажи и с двете вещества делът на дивия вирус намалява (8% при 105В 33 пасаж и 0% на 5-ия ден при 241 30 пасаж), респ. делът на резистентните вируси във вирусната популация се покачва (съответно 92% за 105В и 100% за 241). Това е така, защото при приложената експериментална постановка се определя репликацията на дивия вирус, респ. делът му в цялостната вирусна популация. Появилите се мутации в генома на вируса му дават преимущество да оцелее при пасирането в присъствие на инхибитора, с постепенно развиващо се репликативно преимущество над дивия вирус.

### **3.3.2.2. Титриране на вирусите от различните пасажи в присъствие на МНК на веществата с цел доказване динамиката на възникването на мутантите и степента на резистентност**

Проверяваше се достигнатата степен на резистентност чрез титриране на съответния вирусен пасаж в присъствие на МНК (последната концентрация, до която сме пасирали клетките) на веществата 105В и 241. Клетките бяха посявани в концентрация, както бе описано в МАТ И МЕТОДИ, като 24 h след посяването им бяха заразявани с 50 µl HIV-1 ШВ (2 колони с HIV-1 ШВ<sup>wt</sup> (в разреждане 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> и 10<sup>-4</sup>, по две ямки от два реда), 2 колони с HIV-1 ШВ 10- пасаж (в разреждане 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> и 10<sup>-4</sup>, по две ямки от два реда), 2 колони с HIV-1 ШВ 20- пасаж (в разреждане 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> и 10<sup>-4</sup>, по две ямки от два реда), 2 колони с HIV-1 ШВ 30 – ти пасаж за 241 и HIV-1 ШВ 10-пасаж и 33- ти пасаж за 105В. Последните две колони не бяха заразявани и служеха като контрола клетки. След изтичане на адсорбцията в заразените ямки се добавяше по 200 µl растежна среда, съдържаща изследваното вещество в концентрация, съответстваща на МНК. В колоните, които служеха за контрола клетки, се добавяше хранителна среда без инхибитор. На 120<sup>-ия</sup> час супернатантите бяха събирани, и на всяка проба се определяше обратно-транскриптазната активност. При тази експериментална постановка се определят само резистентните към МНК на дадения стирилхинолин вируси на съответния пасаж и в съответното разреждане. На таблица 25 е показана схематично експерименталната постановка на описания по – горе опит.

**Таблица 25.** Експериментална постановка-схема. След заразяване с вируса клетките са третирани с МНК на съответния стирилхиолин.

*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
*	HIV-1/ ШВ див тип $10^{-2}$	HIV-1/ ШВ див тип $10^{-2}$	HIV-1/ ШВ 10п. $10^{-2}$	HIV-1/ ШВ 10п. $10^{-2}$	HIV-1/ ШВ 20п. $10^{-2}$	HIV-1/ ШВ 20п. $10^{-2}$	HIV-1/ ШВ последен пасаж $10^{-2}$	HIV-1/ ШВ последен пасаж $10^{-2}$	Клетъчна контрола	Клетъчна контрола	*
*	HIV-1/ ШВ див тип $10^{-2}$	HIV-1/ ШВ див тип $10^{-2}$	HIV-1/ ШВ 10п. $10^{-2}$	HIV-1/ ШВ 10п. $10^{-2}$	HIV-1/ ШВ 20п. $10^{-2}$	HIV-1/ ШВ 20п. $10^{-2}$	HIV-1/ ШВ последен пасаж $10^{-2}$	HIV-1/ ШВ последен пасаж $10^{-2}$	Клетъчна контрола	Клетъчна контрола	*
*	HIV-1/ ШВ див тип $10^{-3}$	HIV-1/ ШВ див тип $10^{-3}$	HIV-1/ ШВ 10п. $10^{-3}$	HIV-1/ ШВ 10п. $10^{-3}$	HIV-1/ ШВ 20п. $10^{-3}$	HIV-1/ ШВ 20п. $10^{-3}$	HIV-1/ ШВ последен пасаж $10^{-3}$	HIV-1/ ШВ последен пасаж $10^{-3}$	Клетъчна контрола	Клетъчна контрола	*
*	HIV-1/ ШВ див тип $10^{-3}$	HIV-1/ ШВ див тип $10^{-3}$	HIV-1/ ШВ 10п. $10^{-3}$	HIV-1/ ШВ 10п. $10^{-3}$	HIV-1/ ШВ 20п. $10^{-3}$	HIV-1/ ШВ 20п. $10^{-3}$	HIV-1/ ШВ последен пасаж $10^{-3}$	HIV-1/ ШВ последен пасаж $10^{-3}$	Клетъчна контрола	Клетъчна контрола	*
*	HIV-1/ ШВ див тип $10^{-4}$	HIV-1/ ШВ див тип $10^{-4}$	HIV-1/ ШВ 10п. $10^{-4}$	HIV-1/ ШВ 10п. $10^{-4}$	HIV-1/ ШВ 20п. $10^{-4}$	HIV-1/ ШВ 20п. $10^{-4}$	HIV-1/ ШВ последен пасаж $10^{-4}$	HIV-1/ ШВ последен пасаж $10^{-4}$	Клетъчна контрола	Клетъчна контрола	*
*	HIV-1/ ШВ див тип $10^{-4}$	HIV-1/ ШВ див тип $10^{-4}$	HIV-1/ ШВ 10п. $10^{-4}$	HIV-1/ ШВ 10п. $10^{-4}$	HIV-1/ ШВ 20п. $10^{-4}$	HIV-1/ ШВ 20п. $10^{-4}$	HIV-1/ ШВ последен пасаж $10^{-4}$	HIV-1/ ШВ последен пасаж $10^{-4}$	Клетъчна контрола	Клетъчна контрола	*
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

\* RPMI 1640 без серум

**Таблица 26. Титрация, изразяваща динамиката на възникване на резистентността (чрез определяне на RT-активността) на HIV-1 ПШВ<sup>wt</sup>, култивиран в присъствие на покачващи се концентрации на веществото 105В. Клетките в този експеримент са третирани с МНК за 105В.**

	<b>HIV/105В 10 п. + в-во RT-pg/ml</b>	<b>HIV/105В 10 п. без в-во RT-pg/ml</b>	<b>HIV/105В 20 п. + в-во RT-pg/ml</b>	<b>HIV/105В 20 п. без в-во RT-pg/ml</b>	<b>HIV/105В 33 п. + в-во RT-pg/ml</b>	<b>HIV/105В 33 п. без в-во RT-pg/ml</b>	<b>HIV<sup>wt</sup> + 105В (0,5x10<sup>-6</sup> М) RT-pg/ml</b>	<b>HIV<sup>wt</sup> без 105В (0,5x10<sup>-6</sup> М) RT-pg/ml</b>
<b>HIV 10<sup>-2</sup></b>	24.6	32.3	90.1	124.8	1420	1420	21.2	72.75
<b>HIV 10<sup>-3</sup></b>	11.0	21.2	28.3	29.45	1390	1300	4.87	17.8
<b>HIV 10<sup>-4</sup></b>	3.0	7.9	14.4	25.0	280	282	0	5,1

\* - отрицателна контрола на теста за ендогенна RT активност е A405=0,216. Положителната контрола е A405=2,168 (стандарт № 2). Експерименталните резултати са средно аритметично между 3 – 6 ямки (вж. Материали и методи).

**Таблица 27. Дял на резистентното вирусно потомство (%) към вещество 105В при различните пасаж. Култивирането е извършено в среда, съдържаща МНК на 105В. Резистентното потомство за всеки пасаж и вирусно разреждане е представено като процент на стойността на RT (pg/ml) получена експериментално спрямо RT (pg/ml) на вирусната контрола, която е без инхибитор в поддържащата среда, според данните от таблица 26.**

<b>Разреждане Вирус</b>	<b>Дял на резистентното вирусно потомство (%) към 105В</b>		
	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>
<b>HIV-1 ПШВ<sup>wt</sup></b>	29.1	27.3	19.9
<b>HIV-1 ПШВ 10 п.</b>	38.0	51.8	76.1
<b>HIV-1 ПШВ 20 п.</b>	72.2	96.2	100
<b>HIV-1 ПШВ 33 п.</b>	100	100	100

При разглеждане на експерименталните резултати се вижда, че докато при дивия вирус 105В в МНК (0,5x 10<sup>-6</sup> М) инхибира вирусната репликация почти 100% (Табл. 11 и Табл.26), то при десетия пасаж инхибирането намалява приблизително на 50% (Табл.



26 и 27), т.е. това е ИК<sub>50</sub> за възникналия мутант/и. При по-високите пасажни чувствителността към инхибитора намалява до пълно изчезване. Докато ИК<sub>50</sub> за изходния вирус е 0,16 µg/µl (0,5x 10<sup>-9</sup> M) то за резистентния вирус тази концентрация се повишава на 167,08 µg/µl (0,5x 10<sup>-6</sup> M) (около 1000 пъти).

**Таблица 28.** Динамика на възникване на резистентността (определяне на активността) на HIV-1 ШВ wt, култивиран в присъствие на покачващи се концентрации на вещество 241. Клетките в този експеримент са третираны с МНК за 241.

	HIV/241 10 п. + в-во	HIV/241 10 п. без в-во	HIV/241 20 п. + в-во	HIV/241 20 п. без в-во	HIV/241 30 п. + в-во	HIV/241 30 п. без в-во	HIV <sup>wt</sup> + 241 (0,5x10 <sup>-7</sup> M)	HIV <sup>wt</sup> без 241 (0,5x10 <sup>-7</sup> M)
HIV 10 <sup>-2</sup>	123	210	1421	1421	213	220	17.8	72.75
HIV 10 <sup>-3</sup>	36	117	75.6	202,75	20	17,8	4.87	17.8
HIV 10 <sup>-4</sup>	18	40	21.2	34,3	3,50	3,51	2	3,8

\*- отрицателна контрола на теста за ендогенна RT активност е A405=0,216. Положителната контрола е A405=2,168 (стандарт № 2). Експерименталните резултати са средно аритметично между 3 – 6 ямки (вж. Материали и методи).

**Таблица 29.** Дял на резистентното вирусно потомство (%) към стирилхиолин 241 при различните пасажни. Култивирането е извършено в среда, съдържаща МНК на 241. Резистентното потомство за всеки пасаж и вирусно разреждане е представено като процент на стойността на RT (pg/ml) получена експериментално спрямо RT (pg/ml) на вирусната контрола, която е без инхибитор в поддържащата среда според данни от таблица 27.

Разреждане Вирус	Дял на резистентното вирусно потомство (%) към 241		
	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
HIV-1 ШВ <sup>wt</sup>	24,46	26,96	52,63
HIV-1 ШВ 10 п.	58,57	30,7	45
HIV-1 ШВ 20 п.	100	37,7	61,8
HIV-1 ШВ 30 п.	100	100	100

Подобно на вещество 105B, при вещество 241 на десетия пасаж съединението в МНК ( $0,5 \times 10^{-7}$  M) инхибира около 50% вирусната репликация (Табл.28), т.е. това е ИК<sub>50</sub> за възникналия мутант/и, а при по-високите пасажи чувствителността към инхибитора намалява до пълно изчезване. Докато ИК<sub>50</sub> за изходния вирус е  $0,16 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ( $0,5 \times 10^{-9}$  M) то за мутантния вирус тази концентрация се повишава на  $16,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ( $0,5 \times 10^{-7}$  M) (т.е. около 100 пъти).

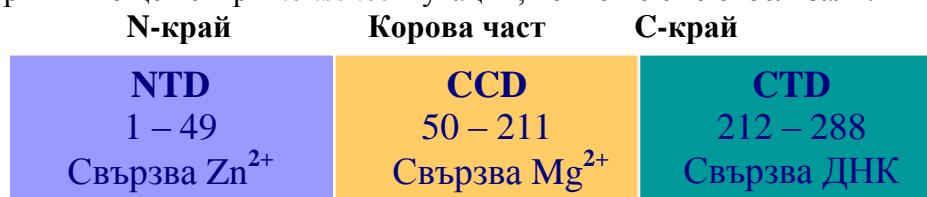
Анализът на получените резултати показва, че пасирането в присъствие на покачващи се концентрации на изследваните вещества (105B и 241) води до селекция на резистентно вирусно потомство. Чувствителността към изследваните 8SQs се губи едва след 30 последователни пасажа в присъствие на МНК на двете вещества. Едва при последните пасажи може да се твърди, че се изолира почти хомогенно поколение от резистентни мутанти на HIV-1 ШВ под действието и на двете вещества.

### 3.4. Секвениране на *in* областта на *pol* гена

Резултатите от фенотипното охарактеризиране на вирусите от различните пасажи, в присъствие на покачващи се концентрации на съответния инхибитор, ни накараха да потърсим мутации в *in* областта на *pol* гена. Секвенирането на нуклеотидните последователности ( за 105B – на 33-ия пасаж , за 241 – на 30-ия пасаж съответно) показва наличието на следните точкови мутации:

<b>105B</b>	<b>241</b>
N17S	E10D
D231I	D231I

Бяха открити и още четири *nonsense* мутации, които не сме отбелязали.



**Фигура 7.** Схематично представяне на трите домена – NTD, CCD и CTD на интегразния участък на гена *pol*. С цифри са отбелязани номерата на аминокиселинните остатъци в полипептидната верига в тази област (вж. Литературния обзор).

Получени са двойни мутанти под действието и на двете изследвани вещества. Първата мутация (и за двете вещества) показва аминокиселинни замени в N- крайната част. Втората мутация е обща и за двата резистентни вируса, вероятно поради това, че и двете вещества са близки по структура. Мутацията е локализирана в C-края, което показва, че веществото се конкурира с нативния субстрат на ензима за ДНК свързващия домен. Двете мутации се намират в различни домени на ензима, което говори, че веществата инхибират интеграцията чрез взаимодействие и с двата домена.

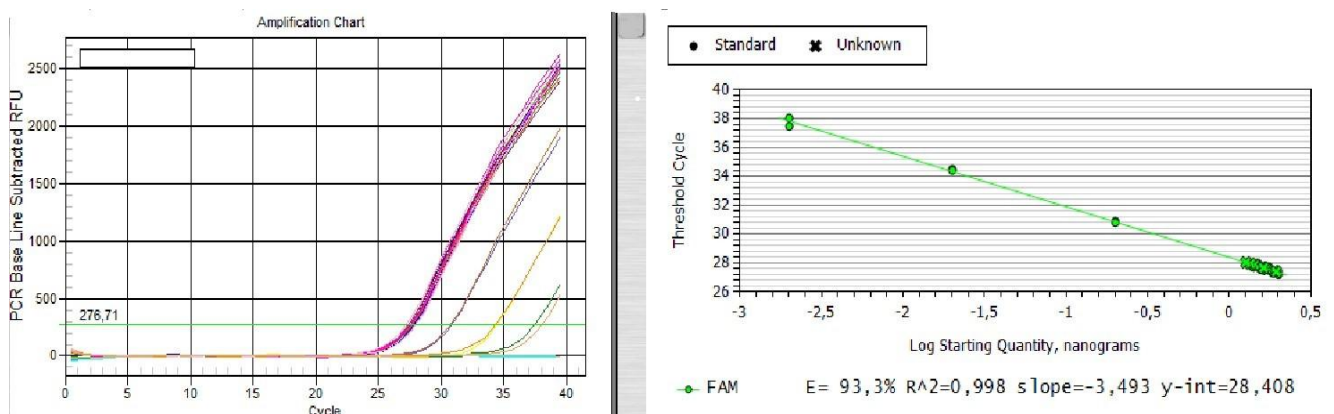
Фактът, че изследваните от нас вещества генерират мутации в интегразния ген означава, че те са инхибитори именно на интегразата, т.е. използват ензима като мишена на действието си. Тези мутации са резултат от селективният натиск на инхибитора. В съответствие с установените мутации, резистентните вируси към 105B и 241, са с понижен вирусен фитнес в сравнение с дивия вирус. Тези мутации обаче, дават репликативно преимущество на мутантния вирус пред дивия при репликация в присъствие на инхибитор.

### 3.5. Митохондриална токсичност на веществата 105В и 241 в МТ-4 клетки

Днес е известно, че редица PIs и NRTIs водят до метаболитни нарушения на клетъчно ниво, последвано от органна токсичност, в основата на които е митохондриалната токсичност. Следователно, понижението на мтДНК от който и да е агент, води до дефектно функциониране на дихателната верига, често с тежки клинични прояви.

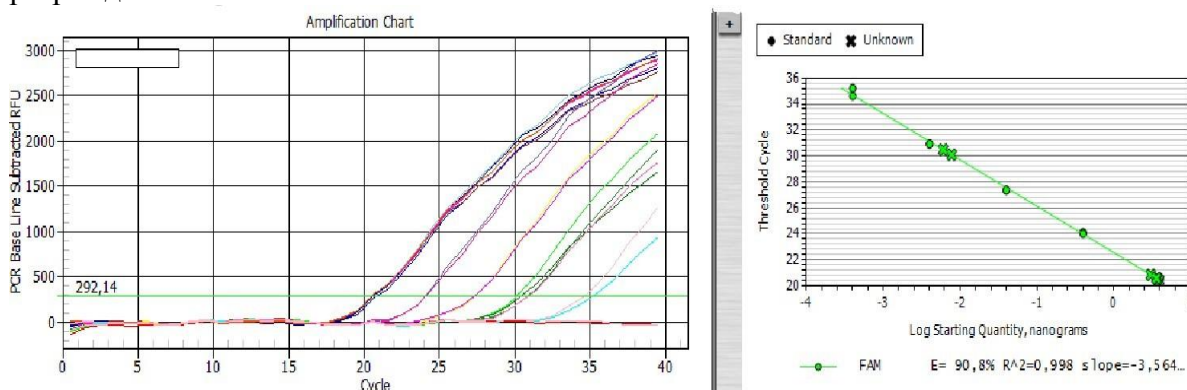
Едно от предложенията, възприети днес при изпитание на нови лекарствени средства за инфекциите с HBV, HCV и HIV, е изпитването им за митохондриална токсичност още преди въвеждането им в практиката (Pinti, M. и съавт., 2003). За целта се използват клетки (клетъчни култури) от различен произход, като най-подходящи се считат човешките hepatoma G2 клетки поради чернодробния си произход и поради факта, че растат като монослой (т.е. в отличие от суспензионните култури, при смяна на средата клетките, растящи като монослой се запазват, а с тях и ефектът от действието на препарата. По тази причина преди работа със суспензионни култури, „залепваме“ клетките с PLL –виж «Материали и методи»). Ето защо от особена важност е в какви клетки се определя митохондриалната токсичност.

Тъй като всички експерименти, включително селекцията на резистентни мутанти към 105В и 241, сме провели на чувствителната към HIV суспензионна култура МТ-4, използвахме същата клетъчна линия и за търсене на митохондриална токсичност под действието на веществата. Използвахме real time PCR (верижна полимеразна реакция в реално време), чрез която определяхме количествено нуклеарната ДНК (ядНК) и митохондриалната ДНК (мтДНК). За да се определят поотделно двете ДНК, използвахме специални праймери, намножаващи само яДНК (ASPG гена) или само мтДНК (COX II гена) (вж. „Материали и методи“ 2.1.9.2 и 2.1.9.3.). На следващите фигури е показан real-time PCR за нуклеарна (Фиг. 8) и митохондриална ДНК (Фиг. 9), като вляво са показани стандартните прави и получените концентрации яДНК и мтДНК в един експеримент.



**Фигура 8.** Real-time PCR на ядрена ДНК (ядНК) (вляво) и стандартна крива на процента на флуоресценция при различни концентрации яДНК (вдясно). На абсцисата в левия панел са показани PCR праговите цикли, зелената права линия е фонов сигнал на флуоресценция, на ординатата е нанесен флуоресцентния сигнал, генериран при амплификацията. На абсцисата в десния панел са нанесени разрежданията на яДНК, преизчислени в ng, с които е построена стандартната крива. Виждат се и нанесени

експерименталните стойности. На ординатата са нанесени праговите цикли за всяко разреждане.



**Фигура 9.** Real-time PCR на митохондриална ДНК (мтДНК) (вляво) и стандартна крива на процента на флуоресценция при различни концентрации мтДНК (вдясно). На абсцисата в левия панел са показани PCR праговите цикли, зелената права линия е фонов сигнал на флуоресценция, на ординатата е нанесен флуоресцентния сигнал, генериран при амплификацията. На абсцисата в десния панел са нанесени разрежданията на мтДНК, преизчислени в ng, с които е построена стандартната крива. Виждат се и нанесени експерименталните стойности. На ординатата са нанесени праговите цикли за всяко разреждане.

От резултата ясно се вижда, че концентрацията на мтДНК е винаги по-висока и „в излишък“ спрямо яДНК. Двете стандартни криви вдясно на фигури 8 и 9 показват количествено концентрацията на яДНК и мтДНК съответно, като и в двете е отбелязана концентрацията и на неизвестната (изследваната) ДНК.

В резултат на 4-кратни измервания (2 експеримента по 2 дубликата) бе получена и осреднена концентрацията (ng) на двете ДНК за всяка от изследваните клетъчни системи. От така получените концентрации за всяка система поотделно се получава съотношението мтДНК / яДНК , показано на Табл. 30.

**Таблица 30.** Митохондриална токсичност на МТ4 клетките под действие на изследваните вещества (стойностите са средни от 2 експеримента, всеки проведен в два дубликата)

Клетки	мтДНК / яДНК
Неинфектирани МТ4 – контрола	4,87 / 5,03 = 0,97
МТ4 заразени с HIV	4,92 / 4,89 = 1,00
105В – 11 пасаж	2,30 / 2,79 = 0,82
241 – 10 пасаж	4,24 / 4,20 = 1,00

Данните ясно показват, че 105В – 11 пасаж индуцира митохондриална токсичност, тъй като съотношението между мтДНК и яДНК е под 1(това съотношение нормално се счита за около 1,0). Този резултат е още едно доказателство, за цитотоксичността на 105В, вече показано в предишните изследвания. Допълнително, под действие на същото вещество силно намалява както концентрацията на мтДНК, така и на яДНК. Съвсем различно е съотношението между двете изследвани ДНК-и за веществото 241 – това съотношение е 1, като не се различава съществено от същото съотношение в контролните МТ-4 клетки и тези заразени с HIV-1. Въпреки, че според

литературата самият HIV-1 при заразяване на клетките упражнява митохондриално токсично действие, то е твърде слабо и не се отразява в съотношението на двата вида ДНК. Освен това, прави впечатление, че митохондриалната токсичност, намерена за 105B е съпроводена с ясно изразено намаляване на концентрацията и на двете изследвани нуклеинови киселини.

В експериментите сме работили специално с 10-ти (241), респ. 11-ти пасаж (105B), за да се даде време на двете вещества да упражнят трайно измеримо въздействие върху митохондриите, ако такава има. При тези пасажки концентрации и на двете вещества е 3 пъти по-висока от ИК<sub>50</sub> за тях, практически са преминали не помалко от 30 дни на пасиране на вируса и преса върху него, с което се съобразяваме с вече известните правила за възникване на митохондриална токсичност, установени *in vivo*. Сравнението с контролните и заразените клетки само потвърждава, че митохондриалната токсичност на 105B е действително в зависимост от концентрацията и времето на култивиране.

Следователно, изследваните вещества 105B и 241, които показват слабо изразена анти-протеазна и добре изразена анти-интегразна активност, макар и близки по химически състав, се различават по своя потенциал да предизвикват митохондриална токсичност.

### **3.6. Алгоритъм за тестиране на новосинтезирани вещества за инхибиране на репликацията на HIV-1 в клетъчна култура и определяне на мишената им на действие.**

В лаборатория „Ретровируси“ от много години се работи със синтезирани чрез рационален синтез вещества за тестиране на въздействието им върху репликацията на HIV-1 в клетъчна култура и определяне мишената им на действие. В резултат на работата с 8SQs, които показват различни въздействия върху HIV-1, успяхме да формулираме следния алгоритъм за тестиране на неизвестни (новосинтезирани) вещества – кандидати за инхибитори на HIV-1 в клетъчна култура. В този алгоритъм различаваме предварителен етап, определящ дали изследваното вещество изобщо инхибира вирусната репликация и етап на търсене мишената на антивирусната активност.

- I. **Предварителен етап** – през този етап се определят параметри на цитотоксичността в различни клетъчни системи, като се подбират най-адекватните от тях. Изследват се ЦК<sub>50</sub> и МНК за всяка клетъчна култура поотделно, на различни часове след въздействие с различни концентрации от изследваните вещества, построяват се иерархични редици за цитотоксичност, като още на този етап се прави опит цитотоксичността да се свърже с химичната структура.
- II. **Етап, определящ инхибиторния капацитет на веществото/ веществата върху репликацията на HIV-1** – това се прави с помощта на микротитрационния тест за инфекциозност, отчитащ преживяемостта на клетките, изложени на цитопатичното действие на вируса след третиране с различни концентрации от изследваното вещество. Преживяемостта на клетките се отчита чрез използване на витални бои. Когато този етап завърши, може да се каже дали и кое от изследваните вещества има изразен анти- HIV-1 ефект, без обаче да е ясна мишената на действие на активното вещество. Като резултат от този етап идват и първите стойности на ИК<sub>50</sub>,

показващи концентрацията на веществото, при която вирусният цитопатичен ефект е редуциран с 50%, т.е. репликацията на вируса е инхибирана с 50%.

**III. Определяне мишената на антивирусната активност** – това е важен етап, тъй като без него не може да се твърди, че разполагаме с вещество с анти-HIV ефект. Този етап съдържа няколко последователни стъпки:

1. *Търсене на анти RT-активност* – при това както на ендогенна, т.е. резултат от въздействието на веществото върху вируса след или преди заразяване на клетките с вируса (търси се обикновено в културалната среда), така и на екзогенна – т.е. в инкубационна смес с добавено изследваното вещество в нея с последващо провеждане на RT – реакцията с рекомбинантен ензим. Ако в такава «безклетъчна» система се получи инхибиция, сравнима с тази при ендогенната реакция и микротитрационния тест, това означава, че мишената на антивирусната активност е именно RT. Такъв е случаят с вещества кодирани под номер 100, 101 и 105. Макар и в различна степен, те показват изразена инхибиция спрямо RT както в ендогенна, така и в екзогенна RT реакция. Изследването трябва винаги да се провежда сравнително – с референтен инхибитор – в нашия случай – абакавир. Трябва да се има предвид, че ако веществото е от класа на нуклеозидните инхибитори на RT, за проявяване на активността му е необходимо фосфорилиране от клетъчни кинази, което не е възможно да се осъществи в „безклетъчна“ система – т.е. при изпълнение на екзогенната RT реакция. Последната би била възможна само, ако се работи с три-фосфат на изследваното вещество. По тази причина не е проведена екзогенна RT за абакавира. Това обаче се отнася само за нуклеозидните аналози, а стирилхинолините не са такива. При липса на RT активност, следва да се насочим към търсене на други активности – антипротеазна и/или антиинтегразна активност.

2. *Търсене на анти-протеазна активност* – вирусната протеаза често е търсена мишена на анти-HIV-ефекта. Въздействието върху нея се изследва най-често чрез използване на рекомбинантен ензим. Тъй като обаче резултатите *in vitro* не винаги съвпадат или само частично покриват тези *in vivo*, ние разработихме и внедрихме тест за определяне на антипротеазна активност с използване на нативна вирионна протеаза, освободена от 50x вирусен концентрат чрез специфичен буфер, съдържащ нейонни детергенти и чрез който се разрушава бислойната липидна обвивка на вируса и неговите компоненти се освобождават. Като референтен инхибитор бе използван пепстатинът – инхибитор на аспартатните протеази, каквато е и тази на HIV-1. В случай, че се открие анти-протеазна активност, съответстваща на степента на инхибиране на вирусната репликация в микротитрационния тест, това означава, че мишената на антивирусното действие е именно вирусната протеаза. В нашите изследвания веществата 300 S и 303S показват (Таблицы 20 и 21) анти-протеазна активност, с която протеазата се определя като мишена на тяхното действие. В случай, че не се открива нито RT, нито анти-протеазна активност, се пристъпва към търсене на анти-интегразна активност.

3. *Търсене на анти-интегразна активност* – използвахме класическия вирусологичен подход – селектиране на мутанти чрез пасиране на дивия щам с повишаващи се концентрации от двете вещества – 105B и 241 – с все още неясна мишена на действие. Доказахме, че селектираните мутанти стават резистентни и на двете вещества след 30, респ. 33 пасажа, а техните ИК<sub>50</sub> се увеличават многократно (около 1000 пъти за 105B и около 100 пъти за 241) (Таблицы 26 и 28).

4. В редица случаи обаче, активността на изследваните вещества не може да се обясни с въздействие върху вирионните ензими. Тогава е необходимо *да се потърси въздействие върху някой от етапите на навлизане на вируса в клетката* –

взаимодействие между CD4+/gp120, повлияване на корецепторите или фузията. Всяка от тези стъпки изисква специфични методи.

Така, в резултат на дългогодишна работа с инхибитори на HIV-1 на модел клетъчни култури, алгоритъмът за изследване на предполагаем анти-HIV ефект се утвърди и показва полезността си. Именно благодарение на развитието на този алгоритъм, в лабораторията бяха внедрени методът за търсене на анти-протеазна активност, както и селектирането на мутанти на HIV-1 чрез въздействие с покачващи се концентрации от активните вещества.

#### **4. РЕЗЮМЕ НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ (ИЗВОДИ)**

1. Изследвани са 17 новосинтезирани у нас стирилхинолини за анти-HIV-1 ефект в клетъчна култура, шест от които (означени като трета група) са рационално синтезирани след изпитване на инхибиращите потенции на изходните вещества. Намерени са 7 нови инхибитора на репликацията на HIV-1.
2. Стирилхинолините са изследвани за цитотоксичност, антивирусна активност в микротитрационен тест за инфекциозност и мишена и механизъм на действие в човешката суспензионна лимфобластоидна линия MT-4. Три от изследваните вещества (100,101 и 105) показаха инхибиране на обратно- транскриптаната активност, други две (300S и 303S) – на протеазната активност и две – 105B и 241 – на интегразната активност на HIV-1.
3. Анти-протеазното действие на 300S и 303S бе доказано чрез модифициран от нас метод за изследване на ефекта върху вирусната протеаза, използващ нативен, а не рекомбинантен вирусен ензим.
4. Анти-интегразното действие на 105B и 241 бе доказано след селектиране на резистентни вирусни мутанти (30 и 33 пасажа съотв.) чрез покачващи се концентрации на двата инхибитора. Документирана бе репликативната кинетика на мутантите, динамиката на възникването им и бе секвениран *in* домена на *pol* гена. И към двете вещества бяха селектирани двойни мутанти – N17S и D231I (за 105 B) и E10D и D231I (за 241).
5. Общността в структурите на двете вещества обяснява най-вероятно идентичните мутации в STD домена на интегразния ген. Наличието на двойни мутанти в различни домени на *in* означава, че инхибиращият ефект на стирилхинолините се осъществява чрез взаимодействие и с двата домена.
6. Двата интегразни инхибитора – 105B и 241 – са изследвани и за митохондриална токсичност в MT-4 клетки. Инхибиторът 105B показва митохондриална токсичност, докато другият инхибитор – 241 – не показва такава.
7. Разработен и приложен е алгоритъм за изследване на анти-HIV-ефект на новосинтезирани вещества в клетъчна култура. Алгоритъмът е отворен и може да се обогатява с нови методи и мишени за изследване.

#### **5. ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ (ПРИНОСИ)**

1. Намерени са 7 нови инхибитори на репликацията на HIV-1 в клетъчна култура след изследване на 17 новосинтезирани у нас стирилхинолини. Доказаните нови инхибитори на HIV-1 имат различни мишени , респ. механизъм на действие. Три от тях са инхибитори на обратната транскриптаза, два – на протеазата и два – на вирусната интеграза.
2. Модифициран е и е въведен метод за определяне на вирусната протеазна активност, респ. антипротеазното действие на нови инхибитори. Методът

използва нативна, а не рекомбинантна вирусна протеаза и пепстатин като референтен инхибитор на аспартатната протеаза.

3. Въведено е изследване на митохондриалната токсичност в клетъчна култура за нови антивирусни (анти-HIV) инхибитори.
4. Въведен е алгоритъм за изследване на анти HIV-1 ефекта на новосинтезирани кандидат-инхибитори на вирусната репликация. Алгоритъмът е използван и в процеса на тестирането на новосинтезираните стирилхинолини в клетъчна култура. Алгоритъмът е отворен и може да се допълва с нови методи на изследване и нови мишени на въздействие върху вирусната репликация.

## 6. ЛИТЕРАТУРА:

1. **Bonnenfant, S.**, Thomas, C.M., Vita, C., Subra, F., Deprez, E., Zouhiri, F., Desmaele, D., d'Angelo, J., Mouscadet, F., Leh, H. (2004): Styrylquinolines, Integrase Inhibitors Acting Prior to Integration: a New Mechanism of Action for Anti-Integrase Agents. *J. Virol.*, 78 (11): 5728–5736.
2. **Broglia, R.**, D. Provasi, F. Vasile, G. Ottolina, R. Longhi, G. Tiana (2006): A folding inhibitor of the HIV-1 protease. *Proteins*, 62 (4): 928-933.
3. **Carr, A.**, Samaras, K., Burton, S. et al. (1998): A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS*, 12:F51-F58.
4. **Espeseth, A. S.** et al. (2000): HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 11244–11249.
5. **Hinkov, A.**, Atanasov, V., Raleva, S., Argirova, R. (2010): Modified rapid screening method for evaluation of HIV-1 protease inhibitors. *C.R. de l'Academie bulgare des Sciences*, 63 (10):1455-1462.
6. **Ho, D. D.**, T. Toyoshima, H. Mo, D. J. Kempf, D. Norbeck, C. M. Chen, N. E. Wideburg, S. K. Burt, J. W. Erickson, and M. K. Singh. (1994): Characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants with increased resistance to a C2-symmetric protease inhibitor. *J. Virol.*, 68:2016-2020.
7. **Hoffmann, C.** (2010): HIV 2010, Chapter 6 ART, 6.2. Overview of antiretroviral agents, *Medizin Fokus Verlag*, Berlin, 58.
8. **Lewis, W.**, Brian, D., Copeland, W. (2003): Mitochondrial toxicity from nucleoside reverse transcriptase inhibitors: an integrated cellular perspective. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2:812-822.
9. **Marciniszyn, J.**, Hartsuck, J.A., Tang, J. (1976): Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin. *J. Biol. Chem.*, 251 (22):7088–94.



10. **Mekouar, K.** (1998): et al. Styrylquinoline derivatives: a new class of potent HIV-1 integrase inhibitors that block HIV-1 replication in CEM cells. *J. Med. Chem.*, 41:2846– 2857.
11. **Montefiori, D.** et al. (1998): Evolution of Antiviral Drugs and Neutralizing Antibodies by Rapid and Sensitive Microtiter Infection Assay. *J. Clin. Microbiol.*, 26 (2):231-235.
12. **Mosmann, T.** (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65:55.
13. **Nicastri, E.,** Sarmati, L., Dori, L., Montano, M., d’Ettorre, G., Buonomini, A.R., Parisi, S.G., Concia, E., Vullo, V., Andreoni, M. (2004): Viral growth assay to evaluate the replicative capacity of HIV-1 isolates. *J. Virol. Methods*, 115,199-205.
14. **Persichini T.,** M. Colasanti, G. Lauro, P. Ascenzi (1998): Cysteine nitrosylation inactivates the HIV-1 protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 250(3):575-6.
15. **Pinti, M.,** Troiano, L., Nasi, M., Ferraresi, R., Dobrucki, J., Cossarizza, A. (2003): Hepatoma HepG2 cells as a model for in vitro studies on mitochondrial toxicity of antiviral drugs: which correlation with the patient? *J. Biol. Regulators and Homeostatic Agents*, 17:166-171.
16. **Shao X.** et al. (1997): A non-radioactive microtitre plate reverse transcriptase (RT) assay, based on immobilized template, for screening of RT activity inhibitors and evaluation of the mode of action. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 8 (2):149-159.
17. **Umezawa, H.,** Aoyagi, T., Morishima, H., Matsuzaki, M., Hamada, M. (1970): Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes. *J. Antibiot.*, 23 (5): 259–62.
18. **Venhoff, N. & Walker, U.** (2010): Mitochondrial Toxicity of NRTIs, in HIV 2010, 280-283.
19. **Walker, U.,** Bickel, M., Lutke Volksbeck, S.I., et al. (2002): Evidence of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor-associated genetic and structural defects of mitochondria in adipose tissue of HIV-infected patients. *J. AIDS*, 29,117-121.

#### **ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:**

1. **Хинков, А.В.,** Рачев, П.Л., Генов, К.А., Аргирова, Р.М. (2008). Съвременна терапия на HIV инфекцията. Съвременна Медицина, 6/2008/том 59
2. **А. Хинков, V. Atanasov, S. Raleva, R. Argirova** (2010): Modified rapid screening method for evaluation of HIV-1 protease inhibitors. Доклади на Българската академия на науките (Comptes rendus de l’Academie bulgare des Sciences), Том 63, № 10, p. 1455-1462 (IF=0,219 за 2010).
3. **А. Хинков, L. Yosifova, E. Todorova, S. Raleva, A. Pavlov, S. Chervenkov, D. Dundarova, R. Argirova** (2010): Newly synthesized 2-styryl-8-hydroxyquinolines (SQS) and

their derivatives: inhibition of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) replication in cell culture. *Autonomic & Autacoid Pharmacology*, 30, Plenary lectures, p. 107–110.

4. S. Stanchev, Jensen, F., **Hinkov, A.**, Atanasov, V., Genova-Kalou, P., Argirova, R., Manolov, I. (2011): Synthesis and Inhibiting Activity of Some 4-Hydroxycoumarin Derivatives on HIV-1 Protease. *ISRN Pharmaceutics*, Vol. 2011, Article ID 137637, 9 pages, doi:10.5402/2011/137637.

#### УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ:

1. Pavlov, A., Chervenkov, S., Raleva, S., Borissov, K., **Hinkov, A.**, Yosifova, L., Todorova, E., Dundarova, D., Argirova, R. (2007). Newly synthesized 2- styryl-8-hydroxyquinolines and their derivatives: inhibition of HIV-1 replication in cell culture. 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention incorporating the 19th ASHM Conference. 22-25 July 2007, Sydney, Australia. Poster Exhibition Topic: HIV drug development. Poster WEPEA097.

2. **Hinkov, A.**, Pavlov, A., Chervenkov, S., Raleva, S., Borissov, K., Yosifova, L., Todorova, E., Dundarova, D., Argirova, R. (2007). Suppression of HIV-1 replication *in vitro* by newly synthesized 2- styryl-8-hydroxyquinolines and their derivatives. The 17th Session of the Balkan Medical Days. 12-14 September 2007. Craiova, Roumanie. Proceedings and Abstracts, Oral Presentation, p. 59.

3. Raleva, S., Iordanova, A., Savov, A., Froloshka, L., Genova, P., **Hinkov, A.**, Borissov, K., Dochev, S., Manolov, I., Dundarova, D., Argirova, R. (2008). Newly synthesized 4-hydroxycoumarin (4-hc) – an integrase inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV- 1) in cell culture. 2nd Congress of Virology (Days of Virology in Bulgaria) with International Participation, Sofia (Bulgaria), 28 – 31 May. Proceedings and Abstracts, Oral Presentation, p. 111.

4. **Hinkov, A.**, Pavlov, A., Chervenkov, S., Raleva, S., Borissov, K., Dundarova, D., Argirova, R. (2008). 2-Styryl-8-hydroxyquinolines and their derivatives: inhibition of HIV-1 replication in cell culture. 2nd Congress of Virology (Days of Virology in Bulgaria) with International Participation, Sofia (Bulgaria), 28 – 31 May. Proceedings and Abstracts, Oral Presentation, p. 112.

5. Raleva, S., Iordanova, A., Savov, A., Froloshka, L., Genova, P., **Hinkov, A.**, Borissov, K., Dochev, S., Manolov, I., Dundarova, D., Argirova, R. (2008). Mutations in integrase region of *pol*-gene of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) after long-term pressure of newly synthesized 4-hydroxycoumarin (4-hc) derivative inhibiting viral replication, 17th IAS Conference on HIV/AIDS, Mexico City (Mexico), 3-8 august. Abstract book, Poster TUPE0008.

6. Genova-Kalou, P., Raleva, S., **Hinkov, A.**, Manolov, I., Gurkova, S., Argirova, R. (2009): Rare-earth metal complexes with 4-hydroxycoumarins are more active agents against HIV-1 in cell culture. 7th International Symposium on Trace Elements in Human: New Perspectives, Athens, Greece, 13-15 October.

7. **Hinkov, A.**, Atanasov, V., Genova-Kalou, P., Raleva, S., Pavlov, A., Chervenkov, S., Dundarova, D., Argirova, R. (2009): Testing of Newly Synthesized Compounds for Anti-HIV Activity in Cell Culture: Exploring Reverse Transcriptase, Protease and Integrase Targets. 6th Balkan Congress of Microbiology, *Microbiologia Balkanica*, 28-31 October, 2009, Ohrid, Macedonia.

8. **Hinkov, A.**, K. Stanoeva, V. Atanasov, P. Genova –Kalou, S. Raleva, A. Pavlov, S. Chervenkov, R. Argirova, Sofia. (2010): Two newly synthesized 2-styryl-8-hydroxyquinolines (8-SQs) derivatives with anti-HIV-1 activity targeting viral integrase and

protease. Twelfth Congress of the Bulgarian Microbiologists with International Participation, Yundola, Bulgaria, October 11-14, 2010.

**9.** Antcheva, N., A. Tossi, M. Vasileva, R. Gavazova, **A. Hinkov**, R. Argirova (2010): Defensins – the novel putative antiretroviral tool. The Fifth workshop on biological activity of metals and metal compounds with satellite symposium – Advanced materials in biology and medicine: Challenges and perspectives. 24-25 November, 2010, Sofia, Bulgaria.

**10. Hinkov, A.,** V. Atanasov, S. Dochev, S. Raleva, P. Genova – Kalou, R. Gavazova, I. Manolov, A. Pavlov, S. Chervenkov, D. Dundarova, R. Argirova (2010): Mechanism of action of newly synthesized derivatives of 8-hydroxy-2-styrylquinolines (8SQs) in cell culture: evidence for impact on more than one HIV-1 target. 1st SEEC chemotherapy and infection 2010, Varna, Bulgaria, 6 – 9 May 2010.

**11. Hinkov, A.,** K. Stanoeva, S. Raleva, V. Atanasov, P. Genova-Kalou, R. Argirova (2011): Novel 2-Styryl-8-Hydroxyquinolines (8sqs) Derivatives With Anti-HIV-1 Activity Targeting Viral Integrase and Protease. 24th International conference for antiviral research, Sofia, 8-11 May, 2011. Abstracts Poster № 52.

**12. Hinkov, A.,** K. Stanoeva, S. Raleva, V. Atanasov, P. Genova-Kalou, R. Argirova (2011): 2-Styryl-8-Hydroxyquinolines (8sqs) With Anti-HIV-1 Activity in cell culture (Tupe 084), 6<sup>th</sup> IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, 17-20 July-2011 Rome, Italy, Abstract (Poster TuPE 084).