

## ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ПРЕПАРАТІВ У ВІДНОШЕННІ ДО РНК ВМІСНИХ ВІРУСІВ РИБ

Інститут рибного господарства НААН (м. Київ)

Дана робота виконувалась відповідно до НТП НААН на 2011-2013 «Удосконалити систему лікувально-профілактичних заходів у рибництві, спрямовану на підвищення резистентності об'єктів культивування та зниження стресової дії на них екологічних і технологічних чинників», шифр 28. 00. 03. 04П, № держ. реєстрації 0111U006974.

**Вступ.** Пошук та розробка способів застосування нових безпечних та ефективних препаратів, що мають імуномодулюючий вплив на організм риби та виражену антивірусну дію у відношенні до РНК-вмісних вірусів є одним із сучасних напрямків рибогосподарської науки. Розвиток цього напрямку нерозривно пов'язаний з рішенням багатьох питань. До них належать критерії відбору препаратів, вивчення їх впливу на організм риб в цілому та зокрема на фактори вродженої резистентності, складання та обґрунтування схем практичного застосування цих препаратів.

Синтезується велике різноманіття речовин, що можуть бути використані у гуманній та ветеринарній медицині з метою лікування та профілактики різних патологій, у тому числі вірусної етіології [3,10]

Препарати антивірусної дії широко застосовують у гуманній медицині для лікування різноманітних вірусних інфекцій [8]. Викликає інтерес дослідників можливість застосування цих препаратів у рибництві, що може виявитись ефективним методом боротьби з вірусними інфекціями, які є причиною значної загибелі риби [2].

Це і обумовило **мету** наших досліджень – вивчити цитотоксичність та антивірусну дію препаратів антивірусної дії щодо РНК-вмісних вірусів риб. Така інформація актуальна і необхідна для оцінки стану здоров'я риб

### Об'єкт і методи досліджень.

**Віруси:** український ізолят VF-08 (7,2 Іг ТЦД<sub>50</sub><sup>мл<sup>-1</sup></sup>) вірусу інфекційного панкреатичного некрозу форелі (IPNV) та ізолят VCH-1(6,8 Іг ТЦД<sub>50</sub><sup>мл<sup>-1</sup></sup>) вірусу весняної віремії коропа (SVCV). Віруси підтримували в лабораторній колекції ІРГ НААН

**Вірусологічні методи.** Накопичення вірусу в культурах клітин, титрування вірусу в культурах клітин проводили згідно міжнародних нормативних документів [6,11] Титр вірусів визначали методом статистичного обліку і виражали в тканинних цитопатогенного дозах в 1 мл (ТЦД 50<sub>мл<sup>-1</sup></sub>) [6].

**Препарати:** Протефлазид – препарат розроблено НПК «Екофарм», Україна, м. Київ. Препарат містить: суми карбонових кислот в перерахунку на яблучну кислоту – 6. 3 г, флавоноїдів в перерахунку на рутин – 0. 32 г (флавоноїдні глікозиди, виділені з диких злаків *Deschampsia caespitosa L.* та *Calamagrostis epigeios L.*)[1]. Для дослідження був використаний концентрат препарату 20 мл якого розчиняли у 4 мл поживного середовища ДМЕМ [8].

«Ізатізон» – комплексний препарат, до складу якого входять речовини, що застосовуються як самостійні засоби у медичній практиці, а саме метисазон (марборан), диметилсульфоксид (димексид) і поліетиленгліколь з молекулярною масою 400. Під час роботи використовували препарат «Ізатізон», виготовлений в умовах лабораторії МСБАР ІМБІГ НАН України, чистота продукту доведена методами хімічного аналізу [3].

Препарат «Гропрінозин» (Inosine pranobex). Активною речовиною Гропрінозину є інозин пранобекс – молекулярний комплекс інозину та 1-(диметил аміно)-2- пропанол- 4- ацетамінобензоату у співвідношенні 1:3. Препарат має противірусну та імуностимулюючу активність [4,12].

Визначення цитотоксичного впливу проводили у системі in vitro: у перещеплюваних лініях клітин ЕРС (epidermal neoplasm of carp) та RTG-2 (rainbow trout gonads) Для культивування клітин використовували середовища Ігла MEM, RPMI-16 з подвійний набір амінокислот і вітамінів і ДМЕМ/F12 (Sigma), з додаванням ембріональної бичачої сироватки (FBS) та антибіотики (гентаміцин, канаміцин, пеніцилін, ампіцилін). Для отримання суспензії клітин для подальшого пересіву використовували суміш, трипсин / ЕДТА (0,25 / 0,02%), 1М Нерес-буфера (pH 7,0) Всі культури клітин були тестовані на відсутність контамінації мікроорганізмами [7,9]

Для визначення максимально допустимої концентрації (МДК) препаратів використовували вказані вище клітини. В дослідках застосовували не менш, ніж десять лунок в плашках з культурою клітин для кожного розведення препарату в поживному середовищі. Плашки з культурою клітин інкубували при 15-21 ° С протягом 96 годин. Щодня проводили дослідження дослідних та контрольних культур з метою встановлення наявності або відсутності цитотоксичної дії.

Таблиця 1

**Визначення максимально допустимої концентрації  
гропрінозину в культурах клітин EPC та RTG-2**

КК	n	Тестовані концентрації, мкг/мл										МДК, мкг/мл
		2250	1125	562	281	140	70	35	17	8	4	
EPC	10	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	562
RTG-2	10	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	562

Примітка: P 2264 > 0,01.

Таблиця 2

**Визначення максимально допустимої концентрації  
ізатизону в культурах клітин EPC та RTG-2**

КК	n	Тестовані концентрації, мкг/мл										МДК, мкг/мл
		800	400	200	100	50	25	12,5	6,3	3,2	1,5	
EPC	10	±	±	±	±	±	±	-	-	-	-	12,5
RTG-2	10	±	±	±	±	±	±	-	-	-	-	12,5

Примітка: P 2264 > 0,05.

Таблиця 3

**Визначення максимально допустимої концентрації  
протефлазиду в культурах клітин EPC та RTG-2**

КК	n	Тестовані концентрації, мкг/мл										МДК, мкг/мл
		312,4	156,2	78,1	39,1	19,1	9,8	4,9	2,4	1,2	0,6	
EPC	10	±	±	±	±	-	-	-	-	-	-	19,1
RTG-2	10	±	±	±	±	-	-	-	-	-	-	19,1

Примітка: КК – культура клітин; МДК – максимально допустима концентрація; n – повторність; «-»- дегенерація моношару клітин; «±»- моношар клітин без ознак дегенерації (через 96 год.); P 2264 > 0,05.

Таблиця 4

**Вплив досліджуваних препаратів на РНК  
вмісні віруси риб**

препарат	Вірус IPN		Вірус SVC	
	Інфекційний титр вірусу Ig ID <sub>50</sub>	Показник інгібування Ig ID <sub>50</sub>	Інфекційний титр вірусу Ig ID <sub>50</sub>	Показник інгібування Ig ID <sub>50</sub>
Протефлазид	1 ± 0,02	6,0 ± 0,02	1 ± 0,01	5,0 ± 0,02
Ізатизон	5,0 ± 0,03	2,0 ± 0,02	3,0 ± 0,03	3,0 ± 0,02
Гропрінозин	1 ± 0,05	6,0 ± 0,03	1 ± 0,05	5,0 ± 0,03
Контроль	7,0 ± 0,04		6,0 ± 0,02	

Примітка: \* – P 2264 > 0,05.

Ступінь цитотоксичності визначали за зміною морфології клітин (округлення, зморщування клітин, відторгнення від поверхні лунок клітин, що зазнали дегенеративних змін). За максимально допустиму концентрацію (МДК) препарату приймали його найбільшу кількість, яка не викликала дегенерацію клітин [7,9].

Для визначення антивірусної дії препаратів вірусну суспензію змішували з кожним препаратом (1:1), в контроль вірусу вносили відповідну кількість середовища. Через 1 годину контрольний вірус та

вірус, оброблений препаратами розтитровували мікрометодом у 96-лункових планшетах з моношаром культур клітин за загальноприйнятою методикою для визначення титру інфекційної активності вірусу. [7]

**Результати досліджень та їх обговорення.** Нами визначено максимально допустимі концентрації (МДК) досліджуваних препаратів для роботи в культурах клітин, що було важливо для оцінки можливості їх подальшого використання в якості антивірусних речовин. Результати досліджень вказані у **табл. 1-3.**

Визначено, що при концентраціях протефлазиду – 19,1 мкг/мл, ізатизону – 12,5 мкг/мл, гропрінозину – 16 мкг/мл та нижчих концентраціях в культурах клітин через 96 годин не спостерігали дегенеративні зміни моношару та усі лінії клітин зберігали здатність до подальшого культивування. При застосуванні у культурах клітин EPC, RTG-2 вказані концентрації і становили МДК. При тестуванні вищих концентрацій у обох лініях клітин вже через 24-28 годин спостерігали дегенерацію клітинного моношару: клітини округлювались, відокремлювались від поверхні лунок, змінювалось рН середовища в кислу сторону. Таким чином вищі дози досліджуваних препаратів володіли цитотоксичною дією.

Для визначення антивірусної дії у якості тест-об'єкта було обрано РНК-вмісні українські ізоляти вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) VF-08 та вірусу весняної віремії коропа VCH-1. За результатами наших попередніх досліджень саме віруси цих систематичних груп, являють собою

найбільшу загрозу для прісноводної аквакультури України [5].

Для тестування препаратів в умовах *in vitro* використовуючи перещеплювальні культуру EPC, що є оптимальною для репродукції вірусу SVC та культуру RTG-2, яка є оптимальною для репродукції та накопичення вірусу IPN Результати досліджень наведені у **табл. 4.**

Аналізуючи отримані результати можна констатувати, що досліджувані препарати мали противірусну активність від 1 до 6. Речовини, які знижують

титр інфекційного вірусу за умов одно циклового до- сліду на  $1,25-2 \lg ID_{50}$  вважаються активними та пер- спективними для подальших досліджень [9,7]. Таким чином в результаті проведених досліджень показана висока антивірусна активність по відношенню до PNV препаратів групи флавоноїдів (протеклазид) та препарату гропрінозин. Препарат ізатізон також має виражені антивірусні властивості.

Показана висока антивірусна активність по від- ношенню до SVC препаратів групи флавоноїдів (протеклазид), препарату гропрінозин та ізатізон, вони знижували вірусну репродукцію на 3-5 lg. Ви- ходячи із економічних міркувань для профілактики та лікування рабдовірусної інфекції коропа доціль- но застосовувати препарат ізатізон, а для плідни- ків можливе використання препарату гропрінозин. Застосування цих препаратів необхідно проводити у контексті розроблених комплексних заходів та методів профілактики та лікування вірусних хвороб риб.

### Висновки.

1. Встановлені МДК досліджуваних препаратів в культурах клітин риб EPC та RTG-2, які становлять: для препарату протеклазид – 19,1 мкг/мл, ізатізон – 12,5 мкг/мл, гропрінозину – 16 мкг/мл. сир- ватки крові райдужної форелі експериментально інфікованої

2. За результатами експериментальних до- сліджень, встановлено, що запропоновані препа- рати володіють вираженою антивірусною дією у відношенні до вірусу весняної віремії коропа та інфекційного панкреатичного некрозу форелі та знижують титр інфекційного вірусів від 2 до 6  $\lg ID_{50}$  у культуральних системах.

**Перспективи подальших досліджень поля- гають у подальшому дослідженні запропонованих препаратів та їх впливу на організм та імунну систе- му риб, що дозволить проводити профілактику і лі- кування вірусних інфекцій риб та розробити схему їх застосування у риборицтві.**

### Література

1. Богоявленский А. П. Противовирусные препараты растительного происхождения. Институт микробиологии и вирусологии, Алматы / А. П. Богоявленский, А. С. Турмагамбетова, В. Э. Березин // Биологические науки. Фундаментальные исследования. – 2013. – №6. – С. 1141-1145.
2. Головина Н. А. Ихтиопатология / Н. А. Головина, О. Н. Бауэр. – М.: Мир, 2007. – 448 с.
3. Заика Л. А. Противовирусные, противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства лечебного препарата изатизон : Монография / Л. А. Заика, О. И. Болсунова, А. И. Потопальский. – К.: Колообиг, 2010. – 212 с.
4. Земсков В. М. Иммуномодулирующие свойства препаратов инозина и их аналогов / В. М. Земсков // Успехи современной биологии. – 1989. – № 107 (1). – С. 69-78.
5. Матвієнко Н. М. Моніторинг вірусних захворювань риб у рибогосподарських водоймах України / Н. М. Матвієнко // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. – 2013. – №3 (56). – С. 67-73.
6. Мейхи Б. Вирусология. Методы / Б. Мейхи [пер. с англ.]. – М.: Мир, 1988. – 344 с.
7. Методичні рекомендації з визначення та контролю антивірусних властивостей в системі in vitro / З. С. Клестова, О. С. Зоз. – Київ, 2009. – 33 с.
8. Порва Ю. И. Моделирование инфекции вирусного гепатита С in vivo и изучение антивирусного действия препаратов группы флавоноидов и эллаготанинов : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. биол. наук : спец. 03.00.06 / Порва Юлия Ивановна; Киевский Национальный университет им. Тараса Шевченко, 2010. – 19 с.
9. Щербинская А. М. Изучение антивирусного действия потенциальных лекарственных средств: Доклинические исследования лекарственных средств: методические рекомендации / А. М. Щербинская, Н. С. Дяченко, С. Л. Рыбалко; под ред. А. В. Стефанова. – Киев, 2002. – С. 394-420.
10. Golebiowska-Wawrzyniak M. Immunological and clinical study on therapeutic efficacy of inosine pranobex / M. Golebiowska-Wawrzyniak, K. Markiewicz, A. Kozar [et al.] // Pol. Merkuriusc. Lek. – 2005. -Vol. 19. – P. 379-382.
11. OIE. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. Fourth Edition, - Paris:Word Organization for Animal Health, 2003. – (Chapter 2. 1. 8.) - P. 142-152 <http://www.oie.int/doc/ged/D6505.PDF>.
12. Siwicki A. K. Anti-Birnavirus Activity of Methisoprinol – in vitro Study with Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) / A. K. Siwicki, M. Morand, F. Pozet [et al.] // Acta Vet. Brno. – 2002. – Vol. 71. – P. 543-547.

УДК 578: 597. 2/. 5

### ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ПРЕПАРАТІВ У ВІДНОШЕННІ ДО РНК ВМІСНИХ ВІРУСІВ РИБ

**Матвієнко Н. М.**

**Резюме.** У статті представлені результати вивчення цитотоксичності та антивірусної дії досліджуваних препаратів по відношенню до РНК-вмісних вірусів риб.

У роботі були використані антивірусні препарати вітчизняного виробництва: «Протеклазид», «Ізатізон» та препарат «Гропрінозин». Викликає інтерес дослідників щодо можливості застосування цих препаратів у риборицтві, що може виявитись ефективним методом боротьби з вірусними інфекціями, які є причиною значної загибелі риби.

Для визначення антивірусної дії у якості тест-об'єкта було обрано українські ізоляти вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) VF-08 та вірусу весняної віремії коропа VCH-1. За результатами наших попередніх досліджень саме віруси цих систематичних груп, являють собою найбільшу загрозу для прісноводної аквакультури.

Встановлені МДК досліджуваних препаратів в культурах клітин риб ЕРС та RTG-2, які становлять: для препарату протекфлазид – 19,1 мкг/мл, ізатизон – 12,5 мкг/мл, гропрінозину – 16 мкг/мл. За результатами експериментальних досліджень, встановлено, що запропоновані препарати володіють вираженою антивірусною дією у відношенні до вірусу весняної віремії коропа та інфекційного панкреатичного некрозу форелі та знижують титр інфекційного вірусів від 2 до 6 lg ID<sub>50</sub> у культуральних системах.

**Ключові слова:** антивірусні препарати, культури клітин риб, вірус весняної віремії коропа, вірус інфекційного панкреатичного некрозу.

УДК 578: 597. 2/. 5

### ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ РНК СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ РЫБ

Матвиенко Н. Н.

**Резюме.** В статье представлены результаты изучения цитотоксичности и антивирусной действия исследуемых препаратов по отношению к РНК-содержащим вирусам рыб.

В работе были использованы антивирусные препараты отечественного производства: «Протекфлазид», «Изатизон» и препарат «Гропрінозин». Вызывает интерес исследователей о возможности применения этих препаратов в рыбоводстве, что может оказаться эффективным методом борьбы с вирусными инфекциями, которые являются причиной значительной гибели рыбы.

Для определения антивирусного действия в качестве тест-объекта был избран украинский изолят вируса инфекционного панкреатического некроза (IPNV) VF – 08 и вируса весенней виремии карпа VCH - 1. По результатам наших предыдущих исследований именно вирусы этих систематических групп представляют собой наибольшую угрозу для пресноводной аквакультуры.

Установленные МДК исследуемых препаратов в культурах клеток рыб ЕРС и RTG -2, которые составляют: для препарата протекфлазид – 19,1 мкг / мл, изатизон – 12,5 мкг / мл, гропрінозин – 16 мкг / мл. По результатам экспериментальных исследований установлено, что предложенные препараты обладают выраженным антивирусным действием в отношении вируса весенней виремии карпа и вируса инфекционного панкреатического некроза форелі, снижая при этом инфекционный титр вирусов от 2 до 6 lg ID<sub>50</sub> в культуральных системах.

**Ключевые слова:** антивирусные препараты, культуры клеток рыб, вирус весенней виремии карпа, вирус инфекционного панкреатического некроза.

UDC 578: 597. 2/. 5

### Study of Antiviral Activity of Drugs Against RNA-Containing Viruses of Fish

Matvienko N.

**Abstract.** The article contains results of a study of cytotoxicity and antiviral effect of investigated drugs against RNA-containing viruses of fish.

Search for and development of means of application of new safe and effective drugs, which have an immunomodulating effect on fish, is one current trends of fisheries science.

Following drugs have been used in this work:

Protetflazid – a drug developed by the SPC “Ecofarm” Ukraine, Kyiv. The drug contains: sums of carboxylic acids as equivalent to apple acid – 6. 3 g, flavonoids as equivalent to rutin – 0. 32 g (flavonoid glycosides extracted from wild cereals *Deschampsia caespitosa* L. and *Calamagrostis epigeios* L.). Flavonoid glycosides contained in wild cereals *Deschampsia caespitosa* L. та *Calamagrostis epigeios* L. are able to inhibit virus-specific enzymes DNA-polymerase and thymidine kinase in virus-infected cells. We used a drug concentrate, 20 ml of which were dissolved in 4 ml of Eagle’s medium DMEM.

Groprynozyn (Inosine pranobex). Active drug substance is inosine pranobeks – molecular complex of inosine and 1 – (dimethyl amino) -2 – propanol-4 – atsetaminobenzoatu at a ratio of 1:3. The drug has antiviral and immunostimulatory activity

Izatzion is a complex drug, which contains substances used as independent medicinal products in medical practice, namely Metisazon (Marboran), Dimethylsulfoxide (Dimexid), and Polyethylene glycol with a molecular weight of 400. During the work we used the drug Izatzion manufactured in conditions of the laboratory of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine.

All above-mentioned drugs are widely used in human medicine for treatment of various viral infections. A possibility of their use in aquaculture attracts interest in scientists that can be an effective method for controlling viral infections, which are a cause of high death rate of fish.

For determining antiviral effect, as a test object we selected Ukrainian isolates of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) VF-08 and isolate VCH- 1 of spring viraemia of carp virus (SVC). Based on results of our previous studies, viruses of these systematic groups are the highest threat for freshwater aquaculture.

For testing the drugs in conditions in vitro, we used a passaged EPC culture, which is optimal for SVC virus reproduction, and RTG-2 culture, which is optimal for IPN virus reproduction and accumulation.

Results of determination of maximum acceptable concentrations (MAC) of the studied drugs in fish cell cultures are presented. It was found that at concentrations of Proteflazid – 19.1 mcg/ml, Iztazon – 12.5 mcg/ml, Groprinozid – 16 mcg/ml and lower concentrations, no degenerative changes of monolayer were observed in cell cultures in 96 hours and all cell lines preserved their ability for further cultivation.

According to results of experimental studies, it was found that the proposed drugs have pronounced antiviral effects against spring viraemia of carp virus and infectious pancreatic necrosis virus and reduce the titer of infection viruses from 2 to  $\lg ID_{50}$  in cultural systems.

Based on economic considerations, for prevention and treatment of rhabdovirus infection of carp, it is advisable to use the drug Iztazon, while the drug Groprinozin can be used for brood fish. Application of these drugs should be performed in the context of developed complex measures and methods.

**Key words:** antiviral drugs, fish cell cultures, spring viraemia of carp virus, infectious pancreatic necrosis virus.

*Рецензент – проф. Дубінін С. І.*

*Стаття надійшла 14. 02. 2014 р.*