

СКРИНІНГ РЕЧОВИН МІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ З АНТИВІРУСНОЮ АКТИВНІСТЮ *IN VITRO*

Т. О. Бова

Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН України

Представлено результати дослідження антивірусної активності речовин мікробного походження *in vitro*. Всі досліджувані речовини знижували репродукцію тешовірусу в культурі клітин СНЕВ. Однак, β -глюкан і рамноліпід проявляли найвищу антивірусну активність в концентраціях, які лише в 5 разів перевищували токсичну для культури клітин. Глюкороноксидоманан і біокомплекс псевдомонад знижували репродукцію тешовірусу *in vitro* у концентраціях, які в 10 разів перевищували SD_{50} . Перспективними для подальших досліджень виявилися дріжджовий манан та трегалозоліпід. Їх максимальна антивірусна активність спостерігалася у концентраціях, які в 20 і більше разів були меншими токсичних для культури клітин СНЕВ.

Ключові слова: ГЛІКАНИ, БІОГЕННІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ, АНТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ, ТЕШОВІРУСИ, КУЛЬТУРА КЛІТИН

Тешовіруси свиней розповсюджені в навколишньому середовищі і за несприятливих умов можуть викликати енцефаломієліти [1], пневмонії [2], гастроентерити [3], пневмоентерити [4] та інші хвороби. Серед них найбільших збитків свинарству завдає ензоотичний енцефаломієліт (тешинська хвороба) свиней, який характеризується високою контагіозністю і ураженням нервової системи [5]. Основними заходами боротьби з цією хворобою на сьогодні залишаються специфічна профілактика і своєчасна діагностика [5, 6]. Відомо, що 2-(α -оксibenзил)-бензімідазол [7], похідні 4-аміноантипірину [8] та деякі нуклеозиди [9] суттєво знижують репродуктивну активність тешовірусів *in vitro*. Однак ефективних методів лікування тешинської хвороби не розроблено.

В останні роки мікробні продукти, такі як глікани та біогенні поверхнево-активні речовини, що за хімічною природою представлені гліколіпідами, фосфоліпідами, полісахаридами, стали об'єктом інтенсивних досліджень. На їх основі створено низку препаратів: сальмозан, продигіозан, достім, ліпополісахарид, які використовуються у ветеринарній і гуманній медицині для лікування вірусних гепатитів, інфекційних захворювань респіраторного і шлунково-кишкового трактів, гінекологічних захворювань, а також для підвищення поствакцинального імунітету і зменшення поствакцинальних ускладнень [11, 12].

Тому метою нашої роботи було провести скринінг речовин мікробного походження з антивірусною активністю до тешовірусу свиней 1-го серотипу *in vitro*.

Матеріали і методи

Досліджували цитотоксичність та антивірусну активність дріжджового манану (ДМ) — продукту біосинтезу культури *Candida maltosa*, глюкороноксидоманану (ГКМ) та β -глюкану, виділених із базидіоміцетів, а також біокомплексу (БК), рамноліпиду (РЛ) — продуктів біосинтезу бактеріальної культури *Pseudomonas* sp. PS-17, і трегалозоліпиду (ТЛ), виділеного з біомаси культури *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-2.

Вивчення токсичності проводили в перещеплюваній лінії культури клітин нирки ембріона свині (СНЕВ). У дослідах використовували 3–4-х денну культуру клітин СНЕВ, яку вирощували в пробірках з живильними середовищами 199 та 0,5 % гідролізату лактальбуміну у співвідношенні 1:1 з додаванням 10 % сироватки крові великої рогатої худоби. Сформований моношар клітин тричі відмивали розчином Хенкса і вносили розчини досліджуваних сполук у середовищі 199 з концентраціями від 1 до 1×10^{-8} мг/см³. Інкубували при 37 °С упродовж 7 діб. Мікроскопічно контролювали появу дегенеративних змін в моношарі СНЕВ і визначали концентрацію речовини, при якій спостерігається загибель 50 % клітин (СД₅₀).

Антивірусну активність досліджуваних сполук визначали до штаму «Дніпровський-34» тешовірусу свиней 1-го серотипу, який зберігається в колекції штамів тешоентеровірусів свиней Інституту сільськогосподарської мікробіології НААН України, в культури клітин СНЕВ.

Сформований моношар культури клітин СНЕВ, що вирощували в пробірках, відмивали розчином Хенкса і вносили досліджувані речовини у концентраціях, представлених у таблиці 1. Після інкубації при 37 °С упродовж 1 доби вносили вірус з розрахунку 100 ТЦД₅₀/см³. Через 24 години інкубації при 37 °С зразки переглядали під оптичним мікроскопом, тричі заморожували і розморожували. Інфекційну активність зразків визначали в моношарі культури клітин СНЕВ за методом Ріда Л. й Менча Х. [12].

Таблиця 1

Концентрації досліджуваних сполук в середовищі 199, використані в експерименті

Сполука	Концентрації сполук (С, мкг/см ³)			
	С ₁	С ₂	С ₃	С ₄
дріжджовий манан	0,1	50	100	500
глюкороноксиDOMANAN	0,1	1	2	10
β-глюкан	0,1	10	50	100
біокомплекс	0,1	1	2	10
рамноліпід	0,1	1	2	10
трегалозоліпід	1	10	100	1000

Результати й обговорення

Основною проблемою антивірусних препаратів є висока токсичність діючої речовини, тому на початковому етапі їх створення насамперед необхідно визначити СД₅₀ — концентрацію речовини, при якій спостерігається загибель 50 % клітин.

Більшість досліджуваних сполук, крім ТЛ, проявили токсичну дію до культури клітин СНЕВ у концентрації в підтримуючому середовищі 1 мг/см³. Клітини зменшувалися у розмірі, збільшувався міжклітинний простір і, зрештою, частково або повністю клітини відшаровувалися від скла. Розчини трегалозоліпід у усіх досліджуваних концентраціях не впливали на морфологію клітин. Концентрації 10 мкг/см³ для ГKM і РЛ, а також 100 мкг/см³ для β-глюкану і БК виявилися критичними.

Отже, СД₅₀ для трегалозоліпід становить більше 1 мг/см³, для дріжджового манану — 1 мг/см³, для β-глюкану та біокомплексу псевдомонад — 100 мкг/см³, глюкороноксиDOMANAN та рамноліпід псевдомонад — 10 мкг/см³.

Титр тешовірусу штаму «Дніпровський-34» у культурі клітин СНЕВ без внесення досліджуваних речовин становив 7,5 lg ТЦД₅₀/см³.

При дослідженні впливу дріжджового манану на репродукцію тешовірусу в культурі клітин СНЕВ встановлено, що найвища його антивірусна активність спостерігалась у концентрації 50 мкг/см³ у підтримуючому середовищі. Інфекційний титр тешовірусу

знижувався на 3,0 lg ТЦД₅₀/см³ (рис. 1). Концентрація 0,1 мкг/см³ не вплинула на репродукцію тешовірусу в культурі клітин СНЕВ. Додавання ДМ у середовище в концентрації 100 та 500 мкг/см³ знижувало інфекційну активність тешовірусу на 2,5 та 2,0 lg ТЦД₅₀/см³ відповідно.

Максимальний антивірусний ефект глюконооксиDOMанану спостерігався при додаванні 1 мкг/см³. Інфекційний титр тешовірусу знижувався на 2,25 lg ТЦД₅₀/см³. Концентрації 0,1 та 2 мкг/см³ знижували репродуктивну активність тешовірусу на 1,25 lg ТЦД₅₀/см³. Концентрація 10 мкг/см³ ГКМ у підтримуючому середовищі, яка є токсичною для культури клітин, знижувала інфекційність тешовірусу на 2,0 lg ТЦД₅₀/см³.

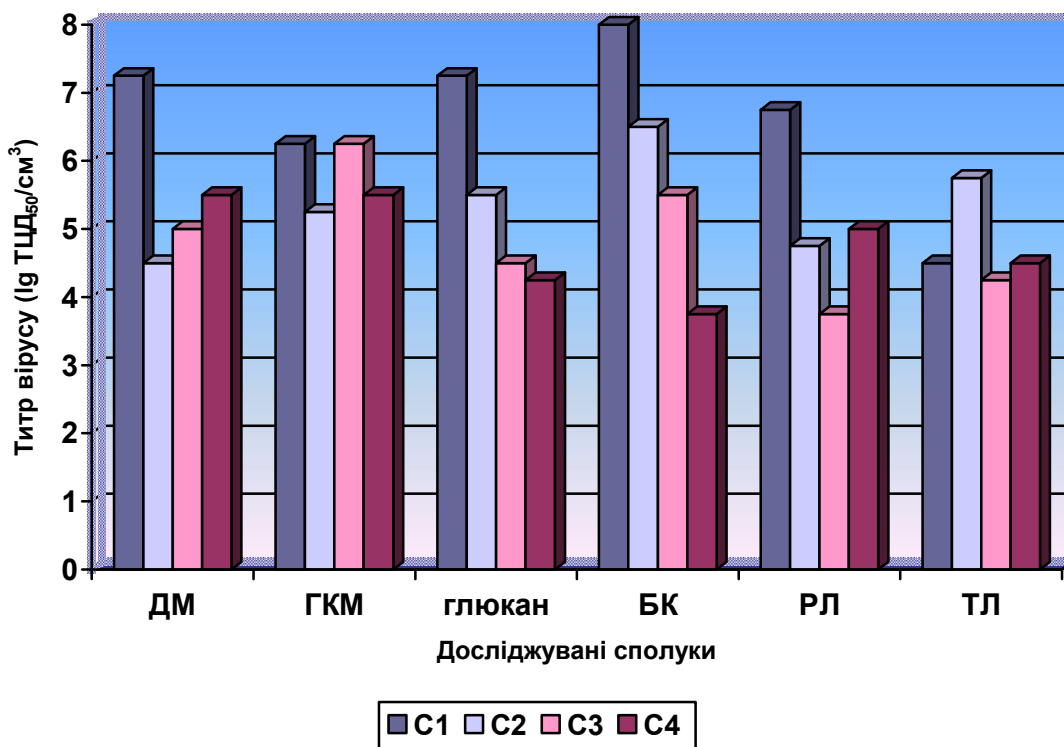


Рис. 1. Вплив досліджуваних сполук в різних концентраціях на інфекційну активність тешовірусу в культурі клітин СНЕВ

У порівнянні з контролем β-глюкан значно зменшував інфекційність тешовірусу при додаванні в середовище 100 та 20 мкг/см³. Титри вірусу знижувалися на 3,25 та 3,0 lg ТЦД₅₀/см³ відповідно. Зменшення концентрації до 10 мкг/см³ призвело до зниження інфекційності на 2 lg ТЦД₅₀/см³. Концентрація 0,1 мкг/см³ не вплинула на репродукцію тешовірусу в культурі клітин СНЕВ.

Біокомплекс псевдомонад проявив найвищу антивірусну активність у концентрації 10 мкг/см³. Інфекційний титр тешовірусу знижувався на 3,75 lg ТЦД₅₀/см³. Зменшення його концентрації в підтримуючому середовищі до 2 та 1 мкг/см³ призвело до зменшення впливу на репродуктивність тешовірусу в культурі клітин СНЕВ. Інфекційність знижувалася лише на 2 та 1 lg ТЦД₅₀/см³ відповідно. У концентрації 0,1 мкг/см³ біокомплекс псевдомонад суттєво не вплинув на вірус.

При додаванні 2 мкг/см³ рамноліпиду в підтримуюче середовище спостерігалось зниження репродуктивної активності тешовірусу на 3,75 lg ТЦД₅₀/см³. Концентрації 1 та 10 мкг/см³, що є токсичною для культури клітин, знижували інфекційну активність тешовірусу на 2,75 та 2,5 lg ТЦД₅₀/см³.

Всі досліджувані концентрації трегалозоліпиду значно знижували репродуктивність вірусу в культурі клітин СНЕВ. Концентрації 1, 100 та 1000 мкг/см³ знижували титр вірусу на 3,0–3,75 lg ТЦД₅₀/см³. Лише в концентрації 10 мкг/см³ ТЛ знижував інфекційність тешовірусу в культурі клітин на 1,75 lg ТЦД₅₀/см³.

Висновки

Всі досліджувані речовини знижували репродукцію тешовірусу в культурі клітин СНЕВ. Однак, β-глюкан і рамноліпід проявляли найвищу антивірусну активність в концентраціях, які лише в 5 разів перевищували токсичну для культури клітин. ГлюкороноксиDOMANAN і біокомплекс псевдомонад знижували репродукцію тешовірусу *in vitro* у концентраціях, які в 10 разів перевищували СД₅₀. Перспективними для подальших досліджень виявилися дріжджовий манан та трегалозоліпід. Їх максимальна антивірусна активність спостерігалася у концентраціях, які в 20 і більше разів були меншими токсичних для культури клітин СНЕВ.

Перспективи подальших досліджень. Дані дослідження є частиною проекту 4973 Українського науково-технічного центру, спрямованого на створення комплексних препаратів з антивірусної активністю.

T. O. Bova

SCREENING OF MICROBIAL ORIGIN SUBSTANCE HAVING ANTIVIRAL ACTIVITY *IN VITRO*

S u m m a r y

The results of research of anti-virus activity of microbial origin substances *in vitro* are presented in this article. All substances under test reduced reproduction of teshovirus in continuous line of embryonated pig kidney cell culture. However, β-glucan and rhamnolipid showed the greatest anti-virus activity in concentrations only 5 times exceeding toxic ones for the culture of cells. Glucuronoksidomanan and biocomplex of pseudomonades reduced reproduction of teshovirus *in vitro* in concentrations 10 times exceeding CD₅₀. Zymic manan and tregalozolipid turned out to be perspective for further research. Their maximal anti-virus activity was observed in 20 and more times less toxic concentrations than for EPK cell culture.

T. A. Bova

СКРИНИНГ ВЕЩЕСТВ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ *IN VITRO*

А н н о т а ц и я

Представлены результаты исследования антивирусной активности веществ микробного происхождения *in vitro*. Все исследованные вещества снижали репродукцию тешовируса в культуре клеток СПЭВ. Однако, β-глюкан и рамнолипид проявили наивысшую антивирусную активность в концентрациях, в 5 раз превышающих токсичную для культуры клеток. Глюкороносидоманан и биокомплекс псевдомонад снижали репродукцию тешовируса *in vitro* в концентрациях, превышающих СД₅₀ в 10 раз. Перспективными для дальнейших исследований оказались дрожжевой манан и трегалозолипид. Их максимальная антивирусная активность наблюдалась в концентрациях, которые в 20 и больше раз были меньше токсических для культуры клеток СПЭВ.

1. Романенко В. Ф. Этиология энзоотической пневмонии свиней [Текст] / В. Ф. Романенко, А. А. Бокун, Н. В. Бабич и др. // Ветеринария. — 1988. — № 2. — С. 35–37.
2. Романенко В. Ф. Этиология энтеровирусного гастроэнтерита свиней [Текст] / В. Ф. Романенко, Е. И. Полевик // Ветеринария. — 1992 — № 3. — С. 29–30.
3. Романенко В. Ф. Особенности эпизоотологии энзоотического энцефаломиелита (болезни Тешена) свиней [Текст] : сб. ст. Междунар. научн. конф. «Общая эпизоотология: иммунологические, экологические и методологические проблемы» / В. Ф. Романенко, В. И. Сорока. — Харьков, 1995. — С. 92–95.
4. Романенко В. Ф. Диагностика энтеровирусных пневмоэнтеритов свиней [Текст] : сб. ст. Междунар. научно-практич. конф. «Актуальные вопросы диагностики и профилактики наиболее распространенных болезней животных» / В. Ф. Романенко, О. Г. Прусс, В. И. Сорока, Е. И. Полевик и др. — Ставрополь, 1999. — С. 116–119.
5. Сорока В. І. Рекомендації з діагностики, профілактики та ліквідації тешо-, ентеровірусних енцефаломієлітів свиней / В. І. Сорока, А. О. Бокун, С. В. Дерев'яно та ін. — Чернігів : ЦНТЕІ, 2006. — 28 с.
6. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees) // OIE. — 5th Ed. — Paris. — 2004. — Vol. II. — P. 785–791.
7. Dardiri A. H. Effect of 2-(α -hydroxybenzyl)-benzimidazole on Teschen disease virus, pig enteric viruses, and foot-and-mouth disease virus in kidney cell cultures [Текст] / A. H. Dardiri, D. P. D. Delay, H. L. Bachrach // Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci. — 1964. — V. 28, № 7. — P. 161–168.
8. Дерев'яно С. В. Синтез та перевірка противірусної активності похідних 4-аміноантипирину *in vitro* [Текст] / С. В. Дерев'яно, О. І. Полевик, Т. О. Бова, А. М. Демченко // Ветеринарна медицина. — 1999. — Вип. 76. — С. 35–37.
9. Собко А. И. Поиск химических соединений с противовирусной активностью [Текст] : мат. науч. конф. «Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии» Часть II. / А. И. Собко, В. Н. Тацкая, Л. Н. Решотько, А. Э. Яворский. — Покров, 1992. — С. 303.
10. Санин А. В. Применение иммуномодуляторов при вирусных заболеваниях мелких домашних животных [Текст] / А. В. Санин // Рос. ж-л вет. медицины. — 2005. — № 1. — С. 38–42.
11. Ершов Ф. И. Антивирусные препараты: справочник (2-е издание) / Ф. И. Ершов. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. — С. 192–225.
12. Reed L. J. A simple method of estimating fifty per cent endpoints [Текст] / L. J. Reed, H. Muench // Amer. J. Hyg. — 1938. — V. 27. — P. 493–497.

Рецензент: завідувач лабораторії мікробіології тварин, к. вет. н., с. н. с. Дяченко Г. М.