МІНІСТЕРСТВО СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА І ПРОДОВОЛЬСТВА УКРАЇНИ

УКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

РЕШОТЬКО Леонід Миколайович

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ХІМІЧНИХ СПОЛУК НА ВІРУСИ, ЩО ВИКЛИКАЮТЬ ГАСТРОЕНТЕРИТИ У СВИНЕЙ

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, вірусологія, епізоотологія, мікологія та імунологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук

Київ – 1994

ЛВ 29.03

Робота виконана в Інституті ветеринарної медицини УААН

Науковий керівник: – доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент УААН СОВКО А.І.

Науковий консультант: – кандидат хімічних наук, ЯВОРСЬКИЙ О.Е.

Офіційні опоненти: – доктор біологічних наук, СТАРЧЕУС А.П.

– кандидат хімічних наук, доцент ВОЛОВЕНКО В.М.

Провідна організація – Київський державний університет ім. Т.Г.Шевченко

Захист дисертації відбудеться "23" грудня 1994 р. в 14[00] год. на засіданні спеціалізованої ради Д 120.71.03 в Українському державному аграрному університеті за адресою: 252041, м. Київ-41, вул. Потєхіна, 16 уч. корпус, 12, ауд. 412.

Просимо прийняти участь в обговоренні дисертації при її захисті або вислати Ваш відгук на автореферат в 1-му примірнику, засвідчений печаткою, за адресою: 252041, м.Київ-41, вул.Героїв оборони, 15, УДАУ, сектор захисту дисертацій.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Українського державного аграрного університету.

Автореферат розісланий "6" квітня 1994 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради, професор В.А.Бортнічук

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

ЛННБ України ім.В.Стефаника
00801747 (R)

Ав-29683

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність темп. Основним засобом боротьби з вірусами на сьогоднішній день є імунопрофілактика. Але відомий цілий ряд вірусних захворювань вплинути на хід епідемічного процесу яких за допомогою вакцин поки-що не вдається. До таких інфекцій в першу чергу відносяться захворювання, що викликаються вірусами групи герпеса, вірусом грипу, ретровірусами та багатьма вірусами сільськогосподарських тварин. Труднощі успішної імунопрофілактики при цьому в одних випадках пов"язані з тим, що вірус або є дуже мінливим, або має багато серотипів, в інших - зі складність будови самих вірусів, компоненти яких важко очистити для виготовлення суб"единичної або інактивованої вакцини, тим більше, що часто невідомо які саме структурні білки вірусу викликають продукцію антитіл, що захищають організм від захворювання. Не вирішує цю проблему і застосування інтерферону з його індукторами. Тому, що інтерферон хоч і проявляє універсально широкий спектр антивірусної дії-ефект від його застосування - короткочасний.

В зв"язку з цим все більші надії покладаються на застосування синтетичних противірусних препаратів серед яких знайдені селективні інгібітори репродукції ряду РНК - та ДНК-геномних вірусів. Враховуючи те, що на сьогодні практично відсутні противірусні препарати для боротьби з інфекційними захворюваннями сільськогосподарських тварин досить очевидна актуальність та перспективність представленої роботи, яка в основному присвячена вивченню антивірусної дії модифікованих аналогів нуклеозидів на основі бензімідазолу, оскільки похідні цього гетероциклу виключно специфічно впливають на репродукцію РНК вірусів. В роботі вивчалась активність і деяких інших класів хімічних сполук по відношенню до РНК- геномних вірусів тварин, а також розглядається перспективність комплек-

сного применення хіміопрепаратів для боротьби з цими інфекціями.

Мета досліджень. Вивчення противірусної активності ациклічних аналогів нуклеозидів на основі бензімідазолу та інших хімічних сполук по відношенню до ентеро- та коронавірусів свиней. А також активності комплексу, що складається з найбільш активного похідного бензімідазолу та хіміопрепарата широкого спектра дії - рибамідилу.

Основні завдання досліджень:

1. Провести скринінг серед аналогів нуклеозидів на основі бензімідазолу та серед інших хімічних сполук з метою виявлення речовин, активних по відношенню до РНК-геномних вірусів тварин - збудників вірусних гастроентеритів свиней.

2. Відібрати та вивчити найбільш активні сполуки проти збудників застроентеритів свиней.

3. Вивчити ефективність комплексної противірусної сполуки, що складається з найбільш активних хімічних речовин, які досліджувались, в дослідах на культурі клітин.

4. Перевірити ефективність комплексної сполуки в умовах експериментальної вірусної інфекції свиней.

5. Дати оцінку специфічності противірусної дії активних похідних бензімідазолу та комплексної сполуки з точки зору можливого механізму дії.

Наукова новизна. Вперше вивчена активність 146 хімічних сполук, 82 з яких відносяться до ациклічних аналогів ну леозидів на основі бензімідазолу, по відношенню до ентеро- та коронавірусів свиней.

Вперше виявлені та вивчені сполуки, активні по відношенню до ентеровірусів свиней, такі як: 1-/5-окси-3-оксапент-2-ил/-2-бензімідазол, 2-/4-метоксифеніл/-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-імідазо [1,2-а]

- азепін та його гідрохлорид.

Виявлений та вивчений активний інгібітор репродукції вірусу трансмісивного гастроентериту свиней - 1-/4-окси-2-оксабутил/-2-гептилтіометилбензімідазол.

Сконструйована та вивчена комплексна противірусна сполука, що складається з 1-/4-окси-2-оксабутил/-2-гептилтіометилбензімідазолу та рибамідилу. Показана його активність при експериментальній коронавірусній інфекції свиней, підібрані оптимальні концентрації його компонентів. Показано, що комплекс проявляє більш виражений терапевтичний ефект та запобігає утворенню інгібіторстійких мутантів коронавірусу.

Практична цінність роботи. Відкриті противірусні сполуки, що по своїй активності по відношенню до РНК-геномних вірусів перевищують такі відомі противірусні препарати, як рибамідил та оксибензилбензімідазол /ОББ/. Найбільш активні з них можуть бути використані при вивченні механізмів репродукції коронавірусів, а також їх можна використовувати в процесі диференційної діагностики вірусних захворювань свиней. Позитивні результати, одержані в дослідах на тваринах, коли використовувалась комплексна сполука, вказують на можливість застосування її як профілактичного засобу при трансмісивному гастроентериті свиней.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідались на:

- республіканській науковій конференції "Состояние и перспективы развития биотехнологии в животноводстве", м.Харків.- 1988 р.;

- республіканській конференції "Ветеринарная медицина экономические, социальные и экологические проблемы", м.Харків.-1990 р.;

- XII Українському республіканському з"їзді мікробіологів, епідеміологів та паразитологів, м.Харків. - 1991 р.

Публікації. По темі дисертації опубліковано 4 статті, 7 тез

доповідей, одержано 2 авторських свідоцтва на винахід.

Об"єм і структура дисертації. Дисертація викладена на сторінках машинописного текста, ілюстрована 22 таблицями, 8 малюнками. Об"єм текстової частини роботи складає сторінок. Складається зі вступу, огляду літератури, особистих досліджень, обговорення результатів досліджень, висновків. Список використаної літератури включає 221 джерела, в тому числі 95 - вітчизняних та 126 - зарубіжних авторів.

ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріали та методи. В роботі були використані: а/ 2 епізотичні штами ентеровірусів свиней: ентеровірус 6-І сірогрупи штам "УНИВИ-1/77" - виділений З.08.77 року Вабіщевичем Ф.С. із тонкого відділу кишковика хворого одноденного поросяти, що належав радгоспу-комбінату "Калитянський" Київської області. Вірус адаптований до культури клітин СНЕВ і переданий для досліджень з лабораторії вірусології ІВМ з інфекційним титром 7,70±0,12 lg ЕУО/см^3 на рівні 69 пасажу; ентеровірус 8-І сірогрупи штам "В387/79" - виділений Вабіщевичем Ф.С. 12.10.79 з тонкого відділу кишковика пятиденного поросяти, що належав радгоспу-комбінату "Кременской" Кременського району Ворошиловградської області. Вірус адаптований до культури клітин СНЕВ. Його інфекційний титр на рівні 70 пасажу дорівнював 7,70±0,12 lg ЕУО/см^3; б/ референтний штам вірусу трансмісивного гастроентериту свиней ТГС/ - "Пурдью-115". Вірус одержаний із ВГНКІ ветпрепаратів з титром інфекційності 5,93±0,13 lg ЕУО/см^3 на рівні 31 пасажу в культурі клітин СПЕВ; в/ вакцинні штами вірусу ТГС: штам вірусу ТГС реізольований в культурі клітин СНЕВ із комерційної вакцини виготовленої в НДР серії 160 01 81, обозначений як "Римс"; штам "М-42" - одержаний із науково-дослідного інституту

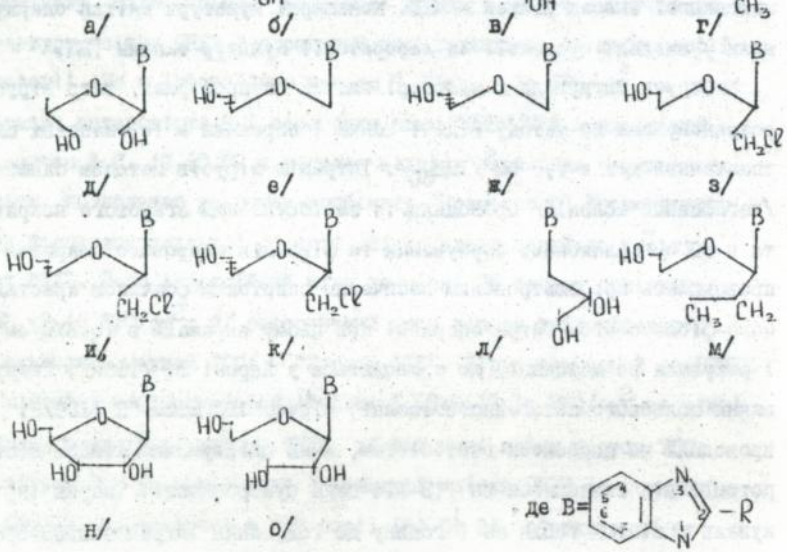
/референтного центру/ м.Брно ЧРСР; г/ штам вірусу ТГС -"П1439/81", виділений у 01.07.81 із тонкого відділу кишковика хворого поросяти, що належав радгоспу-комбінату "Поволжский" Куйбишевської області РРФСР. Переданий для досліджень із лабораторії вірусології ІЕМ з інфекційним титром 7,66±0,09 lg БУО/см^3 на рівні 99 пасажу в культурі клітин ПТП; д/ вірулентний штам вірусу ТГС - "П 1439/81",що підтримувався на одноденних поросятах-гнотобіотах. Вірус одержували із лабораторії вірусології ІЕМ з інфекційним титром 10^5ЛД$_{50}$; е/ вакцинний штам вірусу хвороби Ауєски - "БУК-628", одержаний із ВГНКІ ветеринарних препаратів і переданий для досліджень із лабораторії біохімії з інфекційним титром 7,50±0,12 lg БУО/см^3 в культурі клітин ПТП.

В роботі використовували: перещеплювані культури клітин нирки свиней - СНЕВ та НСП, тестикулів поросят - ПТП, та культуру щитовидної залози свиней - КЩС. Моношарні культури клітин одержували у вигляді суспензії із лабораторії культур тканин ІЕМ.

Віруси титрували в культурі клітин на пробірках, титр вірусу розраховували по методу Ріда і Менча і виражали в lg тканевих цитопатичних доз в 1,0 см^3/ТЦД$_{50}$/. Титрацію вірусів методом бляшок /негативних колоній/ проводили із застосуванням агарового покриття в 50 см^3 флаконах. Фарбування та фіксація агарового покриття проводилась профільтрованим насиченим спиртовим розчином кристалічного-фіолетового. Титри одержані при цьому виражали в lg БУО/см^3 і рахували по методиці, що приводиться у Лярскі З. /1980/. Титрування польового патогенного ізоляту вірусу ТГС штам "П 1439/81" проводили на поросятах-гнотобіотах, яких одержували методом гістеротомії від свиноматок на 113-114 день супоросності. Тварин інфікували у віці 8 годин за 1 годину до годування інтраназально-оральним способом. Час спостереження за поросятами дорівнював 10-ти

дням. Титр вірусу виражали в летальних дозах /$ЛД_{50}$/ і рахували за загальноприйнятою методикою.

Досліджені хімічні сполуки були одержані: а/ аномальні нуклеозиди -6-азауридин та 6-азацитидин з відділу хімії нуклеотидів, нуклеозидів та нуклеїнових кислот Інституту молекулярної біології та генетики АН УРСР; б/ рибамідил - виробництво дослідного заводу Інституту органічного синтезу Латвійської РСР; в/ 2-/*N*-оксибензил/бензімідазол /ОББ/, похідні азепіну, піридину, імідазолу, бензтриазолу, 2-заміщені бензімідазоли, їх рибо̊фуранозиди та ациклонуклеозиди були предоставлені співробітниками кафедри органічної хімії Київського держуніверситету. Вуглеводні залишки ациклонуклеозидів бензімідазолу мали слідуючу конформацію:



Замісники, що стояли в положенні 2 бензімідазолу / Р /:
H /1/, CF_3/2/, SCF_3/3/, CH_2SCF_3/4/, $CH_2C_6H_5$/5/, CH/OH/C_6H_5/6/, CH_2CN/7/, CH_2OH /8/, $SCH{=}CH{-}CH_3$ /9/, CH_2SH /10/, $CH_2SC_7H_{15}$ /11/, $SCH_2C_6H_5$ /12/, CH_2-Амантадін /13/, $CH_2SCH_2C_6H_5$ /14/, SC_8H_{17} /15/, $CH_2SC_3H_7$ /16/, $CH_2SC_5H_{11}$ /17/, $CH_2SCH{=}CH{-}CH_3$ /18/.

Щоб не писати формули та назви хімічних сполук в таблицях і тексті, ми обозначили ациклічні аналоги нуклеозидів на основі бензімідазолу слідуючим чином: спочатку цифрою позначався замісник, що стоїть в положенні 2 бензімідазолу, а потім буквою позначалась природа вуглеводнього залишку. Наприклад: 1-/5-окси-3-оксапент--2-іл/-2-бензімідазол обозначався як + 5г і т.д.

Вивчення противірусної активності хімічних сполук "in vitro" починали з определення їх токсичності для культури клітин. Для цього готували ряд концентрацій досліджуваної сполуки: 500, 250... 31 мкг/мл, або 800, 400 ... 25 мкг/мл. Погано розчинні сполуки попередньо розчиняли в невеликому об"ємі диметилсульфоксиду. Спостереження за появою цитопатичних змін проводили через 72 години після внесення сполуки в живильне середовище. Концентрацію сполуки, яка дорівнювала половині концентрації, що не викликала видимих цитотоксичних змін в моношарі клітин приймали за максимально переносиму концентрацію /МПК/.

Первинний скринінг противірусної активності всіх досліджуваних сполук проводили в культурі клітин СНЕВ по відношенню до ентеровіруса свиней 8-І сіротруп штам "В386/79", та вірусу ТГС штам "Пурдью-115". Всі сполуки при первинному скринінгу досліджували в МПК. Для цього 48 годинну культуру клітин, з повністю сформованим моношаром інфікували вірусом за загально прийнятою методикою. Після процесу вірусної адсорбції, клітини промивали розчином Хенкса і в дослідні проби вносили живильне середовище, в якому міс-

тилась досліджувана сполука, а в контрольні проби вносили тільки живильне середовище. Через 24-48 годин культуру клітин продивлялись під мікроскопом і фіксували інтенсивність враження клітинного моношлов, потім 3 рази заморожували та розморожували, центрифугували 15 хвилин при 2 т.об/хв. і знаходили величину інфекційної активності в дослідних та контрольних пробах.

Сполуки, які знижували інфекційний титр вірусу на 2,0 lg $ТЦД_{50}$, і більше вважали вираженно активними, визначали їх мінімально активну концентрацію /МАК/- концентрацію, що знижує титр інфекційності вірусу на 1,25-1,50 lg в порівнянні з контролем, та вираховували їх хіміотерапевтичний індекс /ХТІ/. Величина останнього визначалась діленням МТК на МАК. Крім того, сполуки, що проявляли виражену антивірусну активність досліджувались на наявність у них віруліцидної дії та вивчалась їх ефективність в умовах одноциклового досліду. /Детально методи описані у Галегова Г.А і співавт. /1974/, Ільенко В.П. /1977/, Tonew M., Tonew E. /1980/, Hu J.M. and Hsiung G.D./1989/ .

Дослідження хімічних сполук "in vivo" починали з визначення їх гострої токсичності для білих мишей, при внутрічеревному введенні, та при одно- і триразовому пероральному приміненні для однодених поросят-сисунів. $ЛД_{50}$ сполуки рахували на 10-й день досліду по методиці, що описана у Беленького М.Л. /1963/.

Захисну дію активних сполук вивчали на поросятах-гнотобіотах. Тварин інфікували перорально 30 $ЛД_{50}$ вірулентного штаму вірусу ТГС - "П 1439/81" у віці 10 годин через 3 години після першого годування. Досліджувані сполуки вводили перорально за 2 години до і через 2 та 24 години після інфікування поросят вірусом. Дослідні тварини утримувались в окремих стерильних герметичних боксах. Усі матеріали, що доставлялись в бокси стерелізувались в шлозовій камері роз-

чином перуксусної кислоти. Годування проводили через кожні 4 години сумішшю "Малютка", що готувалась згідно інструкції. Період спостереження за тваринами дорівнював 10 дням.

Ефективність сполук оцінювали по проценту поросят, що вижили та подовженню середньої тривалості їх життя за час спостереження, згідно методиці, яка описана у Ільенко В.П. /1977/.

При статистичній обробці результатів використовували загальноприняті методи /определення середньої арифметичної, середнього квадратичного відхилення, середньої квадратичної похибки результату/, а також формули, викладені в "Руководство по ветеринарной вирусологии" під редагуванням Сюріна В.П. /1966/.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Скринінг хімічних сполук з противірусною активністю по відношенню до збудників ВГС

На наявність антивірусної активності по відношенню до ентеровіруса свиней штам "В386/79" та вірусу ТГС штам "Пурдью-115" досліджувались: 82 ациклічних аналоги нуклеозидів на основі бензімідазолу, бензтриазолу та їх основи, 13 - похідних бензімідазолу та бензтриазолу, 3 - похідних імідазолу, 9 - похідних піридину, 8 - похідних азепіну, 5 - ациклонуклеозидів природніх основ. А також, відомі інгібітори репродукції ДНК-геномних вірусів, такі як: ацикловір, рибамідил, ациклорибавірин, аденінарабінозид, 6-азаурудин та 6-азацитідин, а також, відомі інгібітори реплікації РНК-геномних вірусів - гуанідин гідрохлорид та азідотимідин. Решта досліджених сполук відноситься до різних класів хімічних речовин.

В результаті досліджень установлено, що відомі інгібітори репродукції ДНК-геномних вірусів суттєво не впливали на репродукцію корона- та ентеровіруса. Як виняток був рибамідил. Препарат мало-

токсичний для культури клітин СНЕВ, його МПК дорівнювала 400 мкг/мл. В цій концентрації рибамідил пригнічував інфекційну активність вірусу ТГС на 3,25 lg $ТЦД_{50}$ /$P < 0,001$/, а ентеровірусу-на 3,17 lg $ТЦД_{50}$ /$P < 0,001$/. Нашими дослідженнями не підтвердились дані Хадлика Э./1976/, котрий спостерігав значне пригнічення репродукції вірусу ТГС 6-азауридином. В нашому випадку ця сполука знижувала інфекційний титр коронавірусу тільки на 1,39 lg $ТЦД_{50}$ /$P < 0,001$/. Незначна противірусна ефективність виявлялась і у азідотимідина. Противірусну активність по відношенню до ентеровірусу свиней штам "В386/79" проявляли гуанідин гідрохлорид та ОББ їх МПК в культурі клітин СНЕВ складала 300 мкг/мл. В цій концентрації гуанідин гідрохлорид знижував інфекційність ентеровірусу на 3,32 lg $ТЦД_{50}$ /$P < 0,001$/ і практично не впливав на репродукцію вірусу ТГС. Дещо менш активним по відношенню до ентеровірусу був ОББ, він знижував його інфекційний титр на 3,01 lg $ТЦД_{50}$ /$P < 0,001$/. Інфекційність вірусу ТГС ОББ зменшував на 1,39 lg $ТЦД_{50}$ /$P < 0,05$/. Але потрібно відмітити, що ОББ та гуанідин гідрохлорид були ефективні по відношенню до ентеровірусу тільки в досить високих концентраціях - 300-250 мкг/мл, зі зниженням концентрації до 200 мкг/мл і нижче активність їх швидко зменшувалась.

Не вдалося виявити суттєвої противірусної активності серед похідних піридину та ациклонуклеозидів природніх основ. Помірна ефективність виявлена у таких сполук, як: ✓-/3-/5-нітрофурил-2/-акриліл-2-піридилацетонітрил; 2,3-дифенілімідазо [1,2-в] бензотіазін-1,3-ОН-5; 12-метил-11-цианобензімідазодо [1,2-в] ізохінолінон-6; 3-/фенокси-7/-ізопропоксіхромона, які знижували інфекційний титр ентеровірусу свиней в середньому на 1,50-2,17 lg $ТЦД_{50}$. А також у сполуки - 2-/β-Д-галактопіридазіл-4-хлор-5-метоксіпіридазінон-3 яка зменшувала інфекційність вірусу ТГС на 1,50 lg ТЦД

/$P < 0,001$/.

Перспективними в антивірусному плані, на нашу думку, є похідні азепіну. В усіх досліджених нами сполук цієї групи виявлена виражена активність по відношенню до ентеровірусу. Найбільш ефективними були сполуки - 2-/4-метоксифеніл/-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-імідазо [1,2-а] азепін, та його гідрохлорид, які знижували інфекційний титр вірусу відповідно на 1,70 lg $ТЦД_{50}$ /$P < 0,001$/ та 2,61 lg $ТЦД_{50}$ /$P < 0,001$/.

Серед похідних бензімідазолу та бензтриазолу виражена противірусна активність виявлена тільки у 2-меркаптобензімідазолу. Ця сполука в концентрації 62,5 мкг/мл /МІК/ пригнічувала інфекційність ентеровірусу свиней на 2,00 lg $ТЦД_{50}$ /$P < 0,001$/. У решти хімічних сполук цієї групи противірусної активності по відношенню як до ентеро- так і до коронавірусу не виявлено, або вона була незначна. Виражену ефективність по відношенню до ентеровірусу проявляли похідні імідазолу, сполуки - 4,5-диметил-2-меркаптоімідазол та 4,5-дифеніл-2-меркаптоімідазол знижували його інфекційний титр відповідно на 1,52 і 1,90 lg $ТЦД_{50}$ /$P < 0,001$/.

Самою чисельною групою досліджених хімічних сполук були ациклічні аналоги нуклеозидів на основі бензімідазолу, 2-заміщеного бензімідазолу та бензтриазолу /82 сполуки/. Результати досліджень показали, що ациклонуклеозиди бензтриазолу /7 сполук/ та бензімідазолу / 11 сполук/ як і самі бензтриазол та бензімідазол при відносно невисокій цитотоксичності для культури клітин СНЕВ /МІК - 250 -31,2 мкг/мл/ значного антивірусного ефекта по відношенню як до ентеро- так і до коронавірусу не проявляли. Рибофуранозиди 2-заміщеного бензімідазола - сполуки 2н - 7н теж були малотоксичні для культури клітин і практично не впливали на інфекційність обох вірусів. Серед самих же 2-заміщених бензімідазолів та їх ациклонуклеозидів було виявлено ряд сполук, що значно впливали на інфекцій-

ність ентеровірусу свиней. При ньому три 2-заміщені бензімідазоли-сполуки 9, 13, 18 та чотири їх ациклонуклеозиди - сполуки 5г, 11е, 11м, 14ж пригнічували інфекційність ентеровірусу в більшій мірі, ніж ОББ. Крім того, серед цієї групи виявлені два ациклонуклеозиди - сполуки 11а та 15м, які значно знижували інфекційну активність вірусу ТГС штам "Пурдью-115". Так, сполука 11а в МТК зменшувала інфекційний титр коронавірусу на 4,85 lg $ТЦД_{50}$ /$P < 0,001$/, а сполука 15м - на 3,05 lg $ТЦД_{50}$ /$P < 0,001$/.

Проводячи аналіз залежності протівірусної активності похідних бензімідазолу від їх будови потрібно відмітити, що як правило спостерігалась слідуюча закономірність: якщо 2-заміщений бензімідазол проявляв активність, то і активним був і його ациклонуклеозид. Ефективність сполук залежала як від групи, що містилась в положенні 2 бензімідазолу, так і від природи глікозидного залишку. Так, 2-заміщені бензімідазоли та їх ациклонуклеозиди, що містили в положенні 2 бензімідазолу фтор /всього 15 сполук/ вираженої активності по відношенню до досліджуваних вірусів не проявляли. Коли ж в положенні 2 бензімідазолу знаходились групи: $-S-CH=CH-CH_3$, $-CH_2SC_7H_{15}$, $-CH_2SCH_2C_6H_5$, $-SC_8H_{17}$, $-CH_2SC_3H_7$, $-CH_2SC_5H_{11}$ та $-CH_2-SCH=CH-CH_3$ сполуки виявляли ефективність як по відношенню до ентеро-, так і до коронавірусу. Як видно, всі вони в своєму складі несуть сірку. Дещо окремо стоять сполуки, що в положенні 2 бензімідазолу несуть групу $-CH_2$Амантадин. Сама основа - сполука 13 проявляла найбільшу противірусну активність, серед всіх перевірених нами речовин, по відношенню до ентеровірусу знижуючи його інфекційний титр на 5,28 lg $ТЦД_{50}$ /$P < 0,001$/. Високу активність основи можна пояснити тим, що вона складається з двох активних антивірусних сполук - бензімідазолу та амантадину. Що ж до природи глікозидного залишку, то найбільше активних антивірусних сполук

виявлено серед ациклонуклеозидів бензімідазолу, що несли глікон а або м.

2. Противірусна активність 2-заміщених бензімідазолів та їх ациклонуклеозидів

По результатам проведеного скрінінгу для подальших досліджень нами було відібрано 14 самих активних хімічних сполук, всі вони виявились похідними бензімідазолу. П"ять з них відносяться до групи 2-заміщених бензімідазолів, а решта дев"ять - до ациклонуклеозидів 2-заміщених бензімідазолів. При цьому сполуки 11а та 15м проявляли активність по відношенню до вірусу ТГС, а решта - сполуки: 5, 5г, 7, 9, 9а, 11е, 11м, 13, 14м, 17а, 17м та 18 - по відношенню до ентеровірусу свиней. З метою виявлення серед відібраних речовин потенціальних противірусних препаратів для практичного використання усі вони вивчались більш детально. При определенні їх МПК для різноманітних культур клітин свинного походження виявлено, що серед клітинних культур: СНЕВ, НСП, КЦС та ПТП, СНЕВ виявилась найменш чутливою до цитопатичної дії, сполук, що вивчались. Було також установлено, що для всіх цих культур клітин ациклонуклеозиди були взагалому більш токсичніші ніж їх основи.

Усі сполуки, ефективні по відношенню до ентеровірусу свиней 8-і сірогрупи штам "В386/79" також в значній мірі знижували інфекційність і ентеровірусу свиней 6-і сірогрупи штам "УНИВИ-1". Сполуки 11а та 15м теж зберігали свою активність по відношенню до різних штамів вірусу ТГС, таких як: "М-42", "Римс" та "П 1439/81". Однак необхідно відмітити, що чутливість цих штамів до дії інгібіторів була різною. Так, якщо штами "М-42", "Пурдью-115" та "П 1439/81" інгібірувались ациклонуклеозидами 11а та 15м приблизно в однаковій мірі, то чутливість до них у штаму "Римс" була на порядок нижче ніж у вищеперерахованих штамів.

Вивчення противірусної дії похідних бензімідазолу в умовах одноциклового досліду показало, що із 12 сполук, активних по відношенню до ентеровірусу, тільки 8 знижували інфекційний титр штаму "В386/79" більш як на 1,25 lg БУО/см^3. Сюди відносяться: 2-заміщені бензімідазолу - сполуки 5, 7, 13 та 18, та їх ациклонуклеозиди - сполуки 5г, 11е, 11м та 17м. Найбільш активними із них були сполуки 5г та 13, вони знижували інфекційний титр вірусу відповідно на 2,40 lg БУО/см^3 /$P < 0,01$/ та 2,52 lg БУО/см^3 /$P < 0,001$/. Обидва нуклеозиди, що ефективні по відношенню до вірусу ТГС - сполуки 11а та 15м знижували інфекційний титр коронавірусу відповідно на 2,18 та 1,80 lg БУО/см^3 /$P < 0,01$/. ОББ в умовах одноциклового досліду зменшував інфекційність ентеровірусу на 1,70 lg БУО/см^3 /$P < 0,01$/ і коронавірусу на 0,46 lg БУО/см^3 /$P > 0,05$/, тобто по відношенню до вірусу ТГС активним не був.

Із 12 сполук, що були ефективні по відношенню до ентеровірусу, ХТІ вище 8,0 мали речовини - 5г, 11е, 11м та 13, для яких цей показник відповідно дорівнював - 25,0; 8,6; 16,0 та 26,0. Із двох сполук, ефективних по відношенню до вірусу ТГС тільки сполука 11а мала ХТІ вище 8,0, цей показник у неї рівнявся 16,0. По показнику ХТІ, вищеназвані речовини, значно перевищували ОББ, який у останнього для ентеровірусу свиней штам "В386/79" дорівнював 2,5, а по відношенню до вірусу ТГС - 1,7.

З метою виключення "помилкового" антивірусного ефекту що пов"язується з впливом досліджуваної сполуки на клітинний метаболізм, а не впливом її на репродукцію самого вірусу вивчалась активність усіх відібраних сполук на інфекційність віруса хвороби Ауески штам "БУК-628". Контрольним препаратом в цих дослідах використовували рибамідил. Одержані результати показали, що ні одне із похідних бензімідазолу, ні ОББ сутт"єво не впливали на реп-

родукцію ДНК-геномного вірусу. В той час, як рибамідил значно зменшував інфекційність вірусу хвороби Ауески, знижуючи його інфекційність на 3,83 lg БУО/см^3 /$P < 0,001$/. Таким чином противірусна активність відібраних похідних бензімідазолу не пов"язана з їх впливом на метаболізм клітини, а є результатом впливу на репродукцію самого вірусу.

Вважаємо, що виявлена противірусна активність 2-заміщених бензімідазолів та їх ациклонуклеозидів не пов"язана з їх інтерфероногенною активність та впливом на процеси адсорбції і проникнення вірусу в клітину тому, що обробку культури клітин препаратами ми проводили через І час після інфікування її вірусом. А як відомо, процес адсорбції та проникнення в клітину ентеро- та коронавірусів на цей період уже в основному завершуються. Для стимулювання продукції інтерферону культуру клітин необхідно обробляти сполукою до інфікування її вірусом. Крім того, нами установлено, що досліджувані сполуки не проявляють віруліцидної активності. Скоріше за все, противірусна ефективність 2-заміщених бензімідазолів та їх ациклонуклеозидів, по аналогії з найбільш вивченим похідним бензімідазолу - ОББ /теж 2-заміщений бензімідазол/, пов"язана з внутріклітинним впливом сполук на синтез РНК-залежної РНК-полімерази.

3. Противірусна дія 1-/4-окси-2-оксабутіл/-2-гептилтіометилбензімідазола та його комплексу з рибамідилом на збудник ТГС

В результаті наших досліджень установлено, що ациклонуклеозид 2-заміщеного бензімідазолу - сполука IIа /1-/4-окси-2-оксабутил/-2-гептилтіометилбензімідазол/ та хіміопрепарат широкого спектру дії - рибамідил /1-β-Д-Рибофуранозіл-1,2,4-триазол 3-карбоксамід/ є найбільш активними, із перевірених сполук, по відношенню

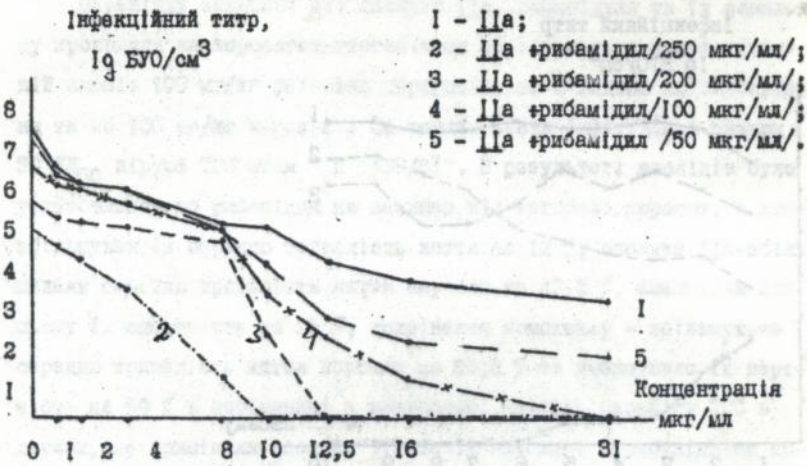
о вірусу ТГС. Обидві сполуки відносяться до різних класів хімічних речовин і їм властиві різні механізми противірусної дії. Останнє дозволило припустити про можливість одержати високий противірусний ефект в разі їх одноразового применення. Тому в подальшому ми більш детально вивчали ефективність як окремо взятих цих сполук, так і їх комплекса.

Інфекційний титр вірусу ТГС штам "Пурдью-115" знижувався в одинаковій мірі, якщо сполуку IIа вносили за 24 і 1 годину до інфікування, водночас з інфікуванням, або через 1-1,5 години після інфікування культури клітин вірусом. В цей період інфекційність вірусу знижувалась на 4,20 lg ЕУО/см^3 /$P < 0,001$/. Найбільш вразливим періодом вірусної інфекції до дії інгібітора був проміжок з 2-1 по 4-у годину після інфікування культури клітин вірусом. На цей час припадає пік його активності - 3-година перебігу інфекції, коли інфекційність вірусу зменшувалась на 4,60 lg ЕУО/см^3/$P<0,001$/. Починаючи з 3 години від початку вірусної інфекції активність сполуки IIа знижується. Сполука, внесена через 6 годин після інфікування культури клітин вірусом уже практично не зменшує його інфекційність.

Комплексне применення сполуки IIа та рибамідилу в дослідах на культурі клітин привело до значного противірусного ефекту. По ріжню снижения інфекційної активності вірусу ТГС, активність комплексу завжди була вища ніж у окремо взятих речовин. Так комплекси: -рибамідил+сполука IIа: 250+31,0; 250+16,0; 250+12,5; 250+10,0; 200+31,0; 200+16,0; 200+12,5; 100+31,0 /мкг/мл/ знижували репродукцію вірусу на 100 % /Мал.1 /. В усіх цих випадках взаємодія обох препаратів носила синергідний характер. Другим позитивним моментом комплексного применення двох сполук було те, що в цьому випадку удавалось значно знизити концентрації обох компонентів, зберіг-

ши при цьому високу ефективність комплексу.

З1 збільшенням дози інфікування культури клітин вірусом з 0,001 БУО/клітина до 1,0 БУО/клітина активність обох сполук та комплексу помітно зменшувалась. Однак при усіх дозах інфікування: 0,001; 0 01; 0,1 та 1,0 /БУО/клітина/ - ефективність сполуки Ца продовжувала залишатись вищою за активність рибамідилу, а ефективність комплексу - активності окремо взятих сполук. При цьому характер взаємодії обох речовин, що входили до складу комплексу, продовжував залишатись синергідним.

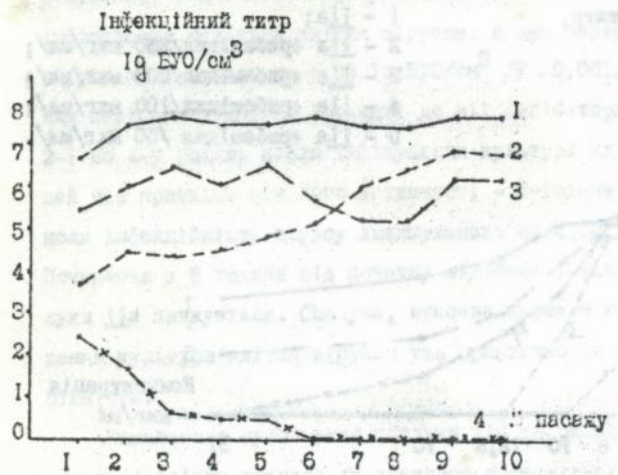


Малюнок 1. Вплив Ца та його комплексу з рибамідилом на інфекційний титр вірусу ТГС штам "Пурдью-115" в культурі клітин СНЕВ.

Відомо, що практично до усіх сполук, що проявляють специфічний механізм противірусної дії можуть бути одержані інгібіторрезистентні мутанти вірусів. Використовуючи культури клітин СНЕВ та НСП ми вивчали розвиток резистентності у вірусу ТГС штам "Пурдью-115" до сполуки Ца, рибамідилу та їх комплексу. Протягом 7 паса-

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

ків в культурі клітин НСП та IO - в культурі клітин СНЕВ розвитку резистентності у вірусу ТГС до рибамідилу ми не виявили. Резистентність вірусу до сполуки IIа в культурі клітин СНЕВ розвивалась з 7-го пасажу /Мал.2/, а в культурі клітин НСП - з 4-го. Використання комплексу, що складався з обох сполук, не тільки не сприяло розвитку до нього резистентності, а навпаки, поступово вело до зниження інфекційності вірусу з кожним послідуючим пасажем аж до пригнічення його репродукції на IOO %.



Малюнок 2. Розвиток резистентності у вірусу ТГС штам "Пурдью-115" до сполуки IIа в культурі клітин СНЕВ

I - контроль вірусу; 2 - IIа /I6 мкг/мл/; 3 - рибамідил /200 мкг/мл/; 4 - IIа + рибамідил /I6 + 200 мкг/мл/

Висока противірусна активність сполуки IIа особливо її комплекса з рибамідилом, виявлена в дослідах на культурі клітин, по відношенню до вірусу ТГС, послужила поштовхом для перевірки їх ефективності в дослідах на тваринах. При визначенні токсичності

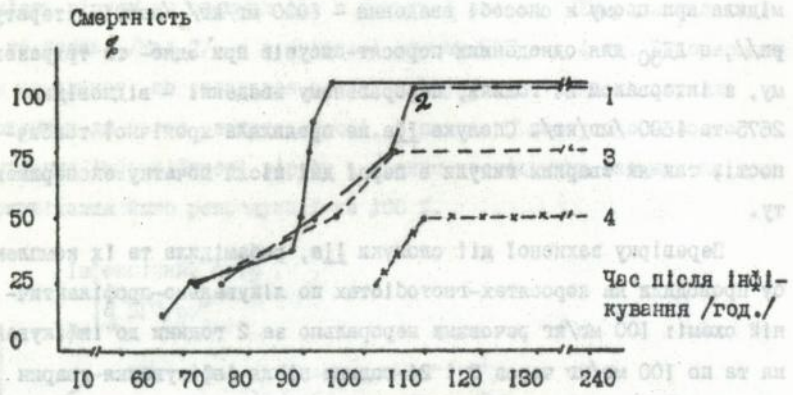
сполуки IIа установлено, що його $ЛД_{50}$ для білих мишей вагою 10-12 гр при внутрічеревному введенні складає 560 мг/кг /$ЛД_{50}$ рибамідила при цьому ж способі введення - 1000 мг/кг/ /данні літератури//, а $ЛД_{50}$ для однодених поросят-сисунів при одно- та триразовому, з інтервалом 24 години, пероральному введенні - відповідно 2675 та 1600 /мг/кг/. Сполука IIа не проявляла хронічної токсичності, так як тварини вижили в перші дні після початку експерименту.

Перевірку захисної дії сполуки IIа, рибамідила та їх комплексу проводили на поросятах-гнотобіотах по лікувально-профілактичній схемі: 100 мг/кг речовини перорально за 2 години до інфікування та по 100 мг/кг через 2 і 24 години після інфікування тварин 30 $ЛД_{50}$ віруса ТГС штам " П 1439/81". В результаті дослідів було установлено, що рибамідил не захищав від загибелі поросят, а лише збільшував їх середню тривалість життя на 12 %; сполука IIа-збільшувала середню тривалість життя поросят на 43,5 %, зменшуючи при цьому їх смертність на 25 %; применіння комплексу - збільшувало середню тривалість життя поросят на 89,5 % та зменшувало їх мертність на 50 % в порівнянні з контролем. Клініка перебігу ТГС в групах, де приміняли сполуку IIа та її комплекс з рибамідилом носила стертий характер в порівнянні з контролем, і перші симптоми захворювання поросят в цих групах з"являлись пізніше /Мал. 3/.

В И С Н О В К И

1. Проведено скринінг на противірусну активність по відношенню до ентеровірусу свиней 8-І сірогрупи штам "В386/79" та вірусу ТГС штам "Пурдью-115" 146 хімічних сполук, 82 із яких відносяться до групи ациклічних аналогів нуклеозидів на основі бензімідазолу. При цьому виявлено 42 сполуки активні по відношенню до ентеровіру-

су та 10 – по відношенню до вірусу ТГС.



Малюнок 3. Противірусна дія IIа, рибамідила та їх комплекса в дослідах на поросятах-гнотобіотах

1 – контроль вірусу; 2 – рибамідил /100 мг/кг/;
3 – IIа /100 мг/кг/; 4 – IIа+рибамідил /100+100 мк/кг/.

2. Вивчена противірусна ефективність 14 самих активних, із перевірених, ациклонуклеозидів бензімідазолу по відношенню до рівноманітних штамів ентеровірусів свиней, вірусу ТГС і вірусу хвороби Ауески.

3. Вперше установлена висока противірусна активність по відношенню до ентеровірусів свиней у 1-/5-окси-3-оксапент-2-ил/-2-бензілбензімідазолу, 2-/4-метоксіфеніл/-6,7,8,9- тетрагідро-5Н-імідазо [1,2-а] азепіну та його гідрохлориду.

4. Виявлена висока противірусна ефективність по відношенню до вірусу ТГС у 1-/4-окси-2-оксабутил/-2-гептилтіометилбензімідазолу.

5. Вивчена ефективність по відношенню до вірусу ТГС комплексного препарата, що складається із 1-/4-окси-2-оксабутил/-2-гептилтіометилбензімідазолу та рибамідилу. Установлено, що вза"емодія

обох сполук при комплексному застосуванні носить адитивний характер, що переходить у синергізм. Використання обох сполук одночасно запобігає утворенню резистентних мутантів вірусу ТГС до ациклонуклеозида бензімідазолу.

6. Установлено, що противірусна активність І-/4-окси-2-оксабутил/-2-гептилтіометилбензімідазолу та його комплекса з рибамідилом зберігається "in vivo".

ПРАКТИЧНІ ПРОПОЗИЦІЇ

Результати досліджень дозволили більш ефективно проводити направлений синтез ациклічних нуклеозидів на основі бензімідазолу, що проявляють противірусну активність по відношенню до РНК-геномних вірусів тварин.

Деякі вивчені сполуки можуть бути використані при розробці ефективних засобів боротьби з вірусними гастроентеритами свиней, на три із них одержані авторські свідоцтва №I5I9I8I від 23.II.87 року та №I704442 від 28.02.I990 року. Сполука - І-/4-окси-2-оксабутил/-2-гептилтіометилбензімідазол може використовуватись при вивченні механізму репродукції вірусу ТГС.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ЯКІ БУЛИ ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

I. Фролов А.Ф., Радолицкая Л.С., Решотько Л.Н., Чернецкий В.П. Действие аномальных нуклеозидов на экспериментальную гриппозную инфекцию // В сб.: Вирусы и вирусные заболевания. - I986. - Вып. I4. - Киев., "Здоровье". - С. 3-6.

2. Решотько Л.Н., Огняник С.С., Тарнавский С.С. Влияние различных групп производных 6-азаурацила на ингибирование некоторых вирусов //Физические, химические и математические методы в современной биологии: Тез. докл. республиканской школы-семинара молодых ученых и специалистов.-I987. -Кишенев, "Штиинца".-С.I08-I09.

3. Яворский А.Э., Решотько Л.Н., Кучерявенко А.А., Завгородний С.Г., Флорентьев В.Л. 1-/5-окси-3-оксапент-2-ил/-2-бензимидазол, обладающий активностью против энтеровируса свиней // Авт. свид. №1519181 от 23.11.87.

4. Яворский А.Э., Решотько Л.Н., Кучерявенко А.А., Флорентьев В.Л. Ациклические аналоги нуклеозидов: синтез и изучение противовирусной активности in vivo оксиалкильных производных бензимидазола и бензтриазола // Химико-фармацевтический журнал. - 1988. - Т. 22., №6. - С. 714-719.

5. Яворский А.Э., Решотько Л.Н., Кучерявенко А.А., Флорентьев В.Л. Синтез и противовирусная активность оксиалкильных производных 2-бензил- и 2-/-оксибензил/бензимидазолов // Химико-фармацевтический журнал. - 1988. - Т. 22, №7. - С. 833-836.

6. Решотько Л.Н., Кучерявенко А.А., Чернецкий В.П., Хоменко В.Г. Антивирусное действие аномальных нуклеозидов и родственных соединений на корона- и энтеровирусы свиней // Тез. докл. мат. республ. научной конф. " Состояние и перспективы развития биотехнологии в животноводстве", 21-22 сентября 1988. - Харьков. - С. 245-246.

7. Решотько Л.Н., Кучерявенко А.А., Яворский А.Э., Вишнякова Н.Н. Пошук противірусних препаратів, активних відносно ентеровірусів свиней // Тез. доп. науково-теоретичної конф. молодих вчених і аспірантів. - 1989. - Кам"янець-Подільський. - С. 58-59.

8. Яворский А.Э., Решотько Л.Н., Туров А.В., Флорентьев В.Л. Синтез, конформационный анализ и изучение противовирусной активности рибофуранозидов бензимидазола // Биоорганическая химия. 1990. - Т. 16, №7. - С. 963-968.

9. Решотько Л.Н., Яворский А.Э. Антивирусное действие ациклических аналогов нуклеозидов на основе бензимидазолв // Тез.докл.

республ. конф. "Ветеринарная медицина. Экономические, социальные и экологические проблемы", 20-22 ноября 1990 г. -Харьков.-С.263.

10. Решотько Л.Н., Кобылинская В.И., Дашевская Т.А., Шаламай А.С. Антивирусная активность 5-фторактилтио-6-азауридинов // В об.: Вирусы и вирусные заболевания. - 1990. Вып. 18. - Киев., "Здоровье". - С. 108-109.

11. Решотько Л.М., Яворський О.Е., Немазаний О.Г. Антивірусна дія 2-ціанометилбензімідазолу на ентеровірус свиней // Тез. доп. XII Українського з"їзду мікробіологів, епідеміологів і паразитологів. - 1991. - Київ. - Ч. I. - С. 227.

12. Тацька В.Н., Решотько Л.М., Яворський О.Е. Пошук хімічних сполук з противірусною активністю // Там же. Частина II. - С. 38.

13. Купчевская И.П., Решотько Л.Н., Яворский А.А., Кучерявенко А.А. 2-/4-метоксифенил/-6,7,8,9-тетрагидро-5Н-имидазо[1,2-а]-азепин и его гидрохлорид, обладающие активностью против энтеровируса свиней // Авт. свид. № 1704442 от 28.02.1990.

1994 УВК УДАУ.-141.-100

Ав 29.683