

Доклад на научной конференции Сочинского института РУДН

ОНИЩУКА Филиппа Давидовича- доктора биологических наук, профессора кафедры ветеринарной медицины и ветсанэкспертизы.

ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА ЛОЗЕВАЛЬ В ВЕТЕРИНАРНОЙ ПРАКТИКЕ

Поводом для создания препарата лозеваль явилось то, что эффективность лекарственных препаратов постоянно снижается из-за изменения биологических свойств инфекционных агентов. Устойчивые, не поддающиеся или очень трудно поддающиеся уничтожению обычно применяемыми лекарственными препаратами формы возбудителей в качестве новой биологической популяции циркулируют в природе и инфицируют как животных, так и людей. Возрастает роль новых инфекций, вызванных условно-патогенными микроорганизмами и вирусами. Болезни приобретают характер смешанных бактериально-вирусных инфекций. (По образному выражению проф. Э.К.ДЖИКИДЗЕ- вирусы пробивают дорогу патогенным бактериям)

Все это требует постоянного поиска и разработки новых химиотерапевтических средств с широким спектром действия – эффективных в борьбе с заразными заболеваниями различной этиологии.

Для практической ветеринарии нами предложен оригинальный препарат лозеваль, являющийся представителем новой группы химиотерапевтических средств – производных триазола и тиосемикарбазона, являющимися антиметаболитами синтеза нуклеиновых кислот.

Преимуществом этого препарата является то, что он объединяет в себе и противовирусное, и антибактериальное, и противогрибковое действие.

Нами получен патент на изобретение (рис.1)



разработаны ТУ по применению лозеваля в ветеринарии (рис.2.),



На него получено Регистрационное удостоверение Россельхознадзора РФ №02-3-2,0-0240 от 24.02.11 г. (рис. 3),



Сертификат соответствия № 0743661 от 28.02. 2012 г., (рис. 4),



Лицензия Россельхознадзора РФ №00-12-1-001487 от 15.11.12 г. (рис.5),



а также Наставление , утвержденное Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода РФ №13-5-2/1089 от 24.11.97 г. (рис. 6),

Наставление утверждено Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода РФ №13-5-2/1089 от 24.11.97 г.

Рег. удостоверение Россельхознадзора РФ №02-3-2,0-0240 от 24.02.11 г.

Лицензия Россельхознадзора РФ №00-12-1-001487 от 15.11.12 г.

ЛОЗЕВАЛЬ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРИИ

Общие сведения:

Лозеваль является комплексным препаратом для профилактики и лечения вирусных, бактериальных и грибковых болезней животных, птиц и пчел, представляет собой маслянистую жидкость от желтого до желто-коричневого цвета со специфическим запахом. В его состав входят

N-метил-изатин-3-тиосемикарбазон, морфолоний 3-метил-1,2,4-триазаолин-5-тиоацетат, 1,2-этилен-бис-(N-диметил-карбдецил-оксиметил)-аммония дихлорид, диметилсульфоксид и полиэтиленгликоль-9. Лозеваль относится к группе веществ со слабо выраженными токсическими свойствами. Препарат стойкий, не изменяет своих лечебных свойств в интервалах температур от – 10 °С до +50 °С. При температуре ниже +10 °С образуется вязкая эмульсия, которая при разогревании превращается в жидкость не изменяя своих лечебных свойств.

Механизм действия:

Лозеваль нанесенный на пораженные места или введенный внутрь легко проникает через кожу, слизистые оболочки и другие биологические барьеры. Попадая в клетку лозеваль блокирует ДНК, РНК и протеин вирусных частиц, в результате чего подавляется репродукция и вирулентность вирусов. Также лозеваль губительно действует на грамотрицательные и грамположительные бактерии и на дрожжеподобные и плесневые грибки. При этом способствует повышению резистентности организма животных за счет стимулирования клеточного и гуморального иммунитета – усиления синтеза иммуноглобулинов, повышения фагоцитарной активности мононуклеаров и уровня лизоцима. Препарат быстро выводится из организма и не накапливается в органах и тканях животных.

Спектр действия:

Герпесвирусы, вирус гриппа А и А-2, герпес лабиалис, герпес зостер, вирус экстремелии, энтеровирусы водоплавающей птицы, вирус энтерита свиней, собак, пушных зверей, вирус венесуэльского энцефаломиелита лошадей, вирус оспы, парагриппа-3, Эффективен при лечении болезни Марека, инфекционного ларинготрахеита, болезни Ньюкасла, бронхопневмонии лошадей, телят, крупного рогатого скота, пастереллеза, колибактериоза, аспергиллеза, кандидамикоза, микоплазмоза, хламидиоза, а также всех стрептококковых, стафилококковых и колипаратифозных инфекций животных и птицы.

Лозеваль эффективно и быстро излечивает такие острые болезни пчел, как мешотчатый расплод, филаментовирус, гнильцовые заболевания, острый паралич, паратиф и колибактериоз.

Показания к применению и дозировки:

- При бронхопневмонии бактериальной и вирусной этиологии у телят и жеребят, парагриппе-3 телят проводятся аэрозольные обработки в дозе 1-2 мл/м³, продолжительность экспозиции 40-50 минут ежедневно в течение 5-6 дней. Для усиления лечебного эффекта, при тяжелом, запущенном состоянии, лозеваль задается внутрь в дозе 0,5 мл/10 кг массы тела в разведении 1:2 на физрастворе (дополнительно к аэрозольной обработке).
- При колибактериозе, сальмонеллезе, пастереллезе, паратифе телят препарат задается внутрь в дозе 1-2 мл/10 кг массы тела в разведении 1:2 на физрастворе 3-5 дней подряд.
- При диарее у поросят различной этиологии, включая вирусный энтерит, дисбактериозе у поросят отъемышей задается внутрь в дозе 0,5-1 мл/10 кг массы тела 2 раза в день вместе с диетическим кормлением (овсяным отваром) ежедневно в течение 3-5 дней.
- При гнойных эндометритах у коров вводить внутриматочно 10% раствор лозевала на физрастворе 200-300 мл ежедневно 1 раз в сутки, всего 5-6 введений. Для профилактики эндометрита, при задержке последа и отделения его вручную, лозеваль вводится однократно, в той же дозе.
- При маститах лозеваль втирается в пораженные доли 3-4 раза в день до полного выздоровления. Коровам лозеваль вводится в разведении 1:1 с подсолнечным маслом интерцистерально в дозе 5-10 мл 2 раза в день в течение 4-5 дней.

- При дерматитах инфекционного и неинфекционного происхождения, экземах, роже, гнойных ранах, ожогах, послеоперационных ранах, стоматитах – смазывать пораженные места 2-3 раза в день 5-7 дней подряд.
- При конъюнктивитах закапывать 30% раствор лозевала на физрастворе 2-3 раза в день 3-5 дней подряд.
- При некробактериозе, копытной гниле, асептическом пододерматите и др. гнойно-некротических процессах в области пальцев, после механической и хирургической обработки очага поражения, накладывается ватно-марлевая повязка, пропитанная лозевалем. Повязка меняется через 2-3 суток (2-4 перевязки).
- В звероводстве при пастереллезе, колибактериозе, сальмонеллезе, энтеротоксемии лозеваль задается с кормом в дозе 2 мл на 10 кг массы тела животных ежедневно 5-7 дней.
- В птицеводстве при различных инфекционных болезнях и дисбактериозе лозеваль задается внутрь в дозе 0,2-0,3 мл на 1 кг массы тела в виде 1% водного раствора или с кормом, а также аэрозольно в дозе 2-3 мл/м³ один раз в день 3-4 дня подряд.
- При аспергиллезе и кандидамикозе лозеваль задается аэрозольно в дозе 3-4 мл/м³, продолжительность экспозиции 40-50 минут ежедневно в течение 5 суток, затем с водой или кормом в дозе 0,2-0,3 мл/кг массы тела ежедневно в течение 2-3 дней.
- В пчеловодстве при различных вирусных и бактериальных инфекциях, а также с профилактической целью весной после первого облета, летом после первого медосбора и обязательно перед зимовкой лозеваль распыляют в виде раствора – 5 мл на 300 мл кипяченой воды на одну семью, 3 раза с интервалом 48 часов (при температуре воздуха не ниже 18 °С). При более низкой температуре окружающей среды скармливают с сахарным сиропом в соотношении 5 мл препарата на 1 л сиропа в дозе 50 мл на улочку пчел, 2-3 раза с интервалом 4-7 суток.

Использование продуктов животноводства:

Животных и птицу обработанных лозевалем разрешается забивать на мясо через двое суток после последнего введения препарата. Лозеваль не накапливается в продуктах пчеловодства!

Правила хранения и транспортировки: Хранят препарат в защищенном от света месте при температуре от –10 до +40 °С. Транспортируют всеми видами транспорта с соблюдением санитарных правил, предъявляемых к перевозке жидких лекарственных форм. Срок годности – 3 года.

Практическая ценность лозевала подтверждена положительными результатами широких производственных испытаний. Производство лекарственной формы лозеваль освоено ООО «Биостим».

Так как препарат лозеваль относится к соединениям комплексного действия, разрешите остановиться только на экспериментальном изучении механизма его противовирусного действия.

Начало этих исследований было заложено во Львовском мединституте в Лаборатории синтеза и апробации новых противоопухолевых препаратов Группой химиков были синтезированы различные соединения и мне довелось изучать их противоопухолевое действие на экспериментальных моделях опухолей у мышей и крыс. Сначала это были различные цитостатики, но из-за их высокой токсичности, впоследствии синтезировать стали производные триазола и тиосемикарбазона- антиметаболитов синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований.

Это было очень существенно, особенно для лечения вирусиндуцированных опухолей (лимфом различной этиологии) и гемобластозов, с целью блокирования развития онкогенных вирусов на начальных этапах развития опухоли.

Специфическую противовирусную активность лозеваля сначала изучали в опытах на модели осповакцинального процесса у кроликов и в системе «куриный эмбрион + вирус инфекционного ларинготрахеита», при моделировании экспериментального инфекционного ларинготрахеита кур.

Цель опытов заключалась в следующем:

1. Изучить непосредственное воздействие препаратов на вирус ларинготрахеита кур в среде вирус+ препарат на протяжении 6-12- и 24 часов- до заражения и после заражения куриных эмбрионов.
2. Аналогично провести исследования с вирусом осповакцины до заражения и после заражения кроликов.

Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1. Сравнительный анализ противовирусной активности лозеваля и его аналогов in vivo (1/2 от МПК)

Группа опыта	Показатели защиты %											
	вирус инфекционного ларинготрахеита						вирус осповакцины					
	до заражения			после заражения			до заражения			после заражения		
	6 ч	12 ч	24 ч	6 ч	12 ч	24 ч	6 ч	12 ч	24 ч	6 ч	12 ч	24 ч
Лозеваль	92,5	95,0	98,0	86,6	82,0	82,0	75,0	78,0	85,0	75,0	77,0	56,0
	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01
Морфолиний	67,8	62,0	64,0	58,0	42,0	25,0	71,0	84,0	50,0	67,0	52,0	39,0
	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,1	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,01	<0,05
Изатоний	62,0	68,0	75,0	60,0	55,0	40,0	69,0	75,0	77,0	56,0	56,0	48,0
	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	<0,01

Из приведенных данных следует , что :

1. Лозеваль обладает защитным действием в большей степени , чем другие производные-морфолиний и изатоний,
2. Защитное действие лозеваля проявляется и до заражения вирусами и после заражения, что свидетельствует о его профилактическом и терапевтическом действии.

Это имело впоследствии большое практическое значение, так как при групповом содержании птицы, молодняка и взрослых животных эффект от лечения лозевалем суммируется как от терапии , так и от профилактики того или иного заболевания.

Изучение селективных механизмов противовирусного действия лозевала

Эти исследования были проведены несколько позже- в Сухумском НИИЭПит АМН СССР благодаря поддержке и проявленному научному интересу к этим исследованиям академика Б.А.ЛАПИНА . в лаборатории экспериментальной онкологии под руководством Л.А.Яковлевой в модельных опытах на вируспродуцирующей перевиваемой клеточной культуре 594- S полученной от больных лимфомой павианов гамадрилов Б.А.Лапиным, Л.А.Яковлевой , В.З.Агрба.

Для этого изучалось избирательное - воздействие лозевала на активность ДНК зависимых ДНК полимераз- отдельно клеточной и собственно вирусной, т.к. используемая нами культура клеток была вируспродуцирующей. Для этого использованы различные методы.

Сначала выращивалась вирусинфицированная клеточная культура 594-S, затем проводили ее синхронизацию с помощью 12-о-тетрадеканоилфорбол-1,3-ацетата /ТФА/ и ЦГ (циклогексамида) в ДМСО в течение 72 часа , К концу 3-дневной синхронизации клетки дважды отмывали от не связавшихся ТФА и ЦГ и помещали в свежую среду с исследуемыми препаратами, что служило стартом для одновременного вступления всех клеток в митоз.

Результаты изучения активности вирусной ДНК-полимеразы представлены в таблице 2 .

Таблица 2.Активность вирусной ДНК полимеразы в клетках культуры 594 S после действия препаратов.

Индуктор	24 часа		72 часа	
	имп/мин/10 ³ клеток	%	имп/мин/10 ³ клеток	%
Контроль интактный	56,4±0,6	100	53±5,2	100
Контроль после ТФА+ ЦГ	706,0±16,6<0,001	1176,6	24,6±2,5<0,02	46,4
ИДУ	598±10<0,001	996,5	7,0±0,6<0,001	13,2
ТФА	445,8±9,8<0,001	743,3	32,0±3,3<0,05	60,4
Изатоний	4,3±10,3<0,001	7,6	2,6±0,05<0,02	4,9
Лозеваль	1,2±0,05<0,001	2,1	0,5±0,004<0,001	0,8

Проведенные исследования показали, что в присутствии известных индукторов вирусной трансформации, какими являются ТФА, ЦГ и ИДУ, активность этого фермента резко возрастает уже после первых суток контакта. Вирусиндуцированная ДНК полимеразная активность сохраняется на очень высоких цифрах также и в синхронизированных клетках, даже после удаления из среды ТФА и ЦГ. В этих же условиях морфолиний, изатоний и лозеваль напротив, практически полностью выключают функции этого фермента. К 72 часам контакта клеток с исследуемыми препаратами вирусная ДНК полимеразы резко теряет свою активность, а в опыте с препаратами морфолиний и лозеваль так и не восстанавливается.

Эти результаты согласуются с результатами иммунофлуоресцентных исследований антигенных свойств клеток 594 S , то есть, по количеству клеток несущих на себе вирусные антигены методом непрямой иммунофлуоресценции. При этом установлено, что по сравнению с интактным контролем, где процент светящихся клеток не превышает 8,1-10,1, совместное

внесение ТФА и ЦГ приводит к достоверному увеличению количества клеток с вирусными антигенами (12,8-13,3%), что сохраняется и после удаления из среды препаратов (табл. 3)

Таблица 3. Процент вирусодержащих клеток линии 594 S после воздействия исследуемых препаратов

Индуктор	24 часа	72 часа	96 часов
Контроль интактный	8,1±0,9	8,7±0,5	10,1±0,5
Контроль после ТФА+ ЦГ	12,8±0,5<0,02	13,3±0,9<0,02	12,7±0,7<0,05
ИДУ	14,9±1,2<0,02	17,6±0,6<0,01	20,1±0,8<0,01
ТФА	13,9±1,1<0,02	13,2±0,3<0,02	17,5±1,1<0,01
Изатоний	7,2±0,6>0,5	5,4±0,5<0,02	5,0±0,9<0,02
Лозеваль	7,9±0,8<0,5	3,4±1,5<0,05	4,1±0,4<0,05
Морфолиний	7,2±1,0>0,5	2,9±0,4<0,05	3,4±1,3>0,05

Действие исследуемых препаратов на клетки, в которых был предварительно индуцирован синтез вирусных антигенов различно, что особенно заметно, после 72 часов инкубирования. Так, после первых 24 часов некоторое увеличение процента светящихся клеток отмечается в опыте с ИДУ. Спустя 72 часа ТФА и особенно ИДУ вызывают уже достоверное увеличение количества светящихся клеток. В опытах с препаратами изатоний, лозеваль и морфолиний процент светящихся клеток наоборот значительно снижался. К 96 часам контакта количество клеток с вирусными антигенами в опытах с ТФА и ИДУ продолжает увеличиваться. В случае с препаратами лозеваль, изатоний и морфолиний эти показатели оставались достоверно ниже по сравнению с контролем.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что препараты морфолиний, лозеваль и изатоний селективно тормозят активность вирусной ДНК полимеразы, обратимо блокируя активность клеточной ДНК полимеразы, синтез ДНК, РНК и белка. Этим можно объяснить тот факт, что в опытах *in vitro* и *in vivo*, эти препараты, особенно ЛОЗЕВАЛЬ, обладают выраженным противовирусным эффектом.