

Молекулярно- биологические механизмы противовирусного действия препарата лозеваль

ОНИЩУК Филипп Давидович - ведущий научный сотрудник Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института, доктор биологических наук, профессор.

В статье приведены результаты молекулярно- биологических исследований препарата лозеваль и его активноедействующего компонента морфолиния в перевиваемой вируспродуцирующей культуре клеток павиана гамадрила.

Ключевые слова: комплексная химиотерапия, вирусно-бактериальные заболевания, респираторные инфекции, производные триазола, лозеваль , морфолиний, ДНК-полимеразы.

Эффективность лекарственных препаратов в последнее время значительно снизилась из-за появления новых форм широко циркулирующих в природе возбудителей резистентных к обычно применяемым лекарственным средствам. Возрастает роль новых инфекций, вызванных условно-патогенными микроорганизмами и вирусами. Болезни приобретают характер смешанных бактериально-вирусных инфекций. Все это требует 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, обладающий высокой лечебной и профилактической эффективностью. Активным противовирусным компонентом этого препарата является морфолиний- 3-метил-1,2,4-триазолил—5-тиоацетат, проявляющий гепатозащитную и противовирусную активность . Предварительные исследования вирусингибирующей активности этого соединения на культуре клеток куриных фибробластов в отношении вируса гриппа типа А и в развивающихся куриных эмбрионах, инфицированных вирусом типа А и А2 показали, что при инфекционной активности вируса в 6 Lg ТЦД50 для клеток куриных фибробластов и 6-7 Lg ЭИД50 (эмбрион инфицирующая доза) для клеток эмбрионов кур, препарат лозеваль проявлял вирусингибирующее действие в отношении вируса гриппа А (WSN) на 3,3 lg, а репродукция вируса штамм А (Англия) 42/72 на 4 lg. Аналогичные результаты были получены при изучении противооспенного и антигерпетического действия этого препарата .

В связи с этим нами проведено изучение молекулярных механизмов противовирусного действия лозевала и его активного компонента морфолиния в опытах *in vitro* на модели вируспродуцирующей культуры 594- S/F9. С этой целью определялось их селективное воздействие на активность ДНК зависимых ДНК полимераз - клеточной и вирусной, а также экспрессию в них некоторых функций ассоциированного с клетками этой культуры герпесного вируса павианов (ГВП).

На первом этапе исследований была проведена синхронизация клеток культуры с целью одновременного вступления максимально большего количества их в митоз. Для этого через день после субпассажа к культуре, имеющей плотность $1 \cdot 10^6$ клеток/мл, добавляли 0,2 мг/мл раствор 12-о-тетрадеcanoилфорбол-1,3-ацетата /ТФА/ и ЦГ (циклогексамида) в ДМСО до концентрации 20,0 нг/мл (оба раствора фирмы "Sigma"). Концентрация морфолина и лозеваль соответствовала 1:10 ЛД 50. Клетки инкубировали в этой среде на протяжении 24-96 часов. К концу 3-дневной синхронизации клетки дважды отмывали от несвязавшихся ТФА и ЦГ и помещали в свежую среду с исследуемыми препаратами - известных блокаторов клеточной ДНК-полимеразы ТФА и, особенно, ИДУ, а также изучаемых нами морфолина и препарата лозеваль.

В результате проведенных исследований установлено, что в течение первых 24 часа скорость клеточной ДНК –полимеразы интенсивнее блокировалась, как и предполагалось, в присутствии ИДУ (9,1 %) и ТФА (34,8 %). Морфолин в этих условиях блокировал клеточную полимеразу на 39,7 %, а лозеваль на 40,2 % при 100% активности этого энзима в контроле. Спустя 72 часа блок синтеза клеточной полимеразы значительно ослабевал в присутствии ИДУ и ТФА и постепенно нормализовался в среде морфолина и лозеваль.

Следует отметить, что в этих условиях совсем по иному проявила себя вирусная ДНК- полимеразы. В течении первых суток после удаления из культуральной среды тормозящего клеточное деление ТФА+ЦГ наступает интенсивный синтез вирусной ДНК как в пробах с ТФА+ЦГ (контроль сравнения), так и в среде индукторов синтеза вирусной полимеразы- ТФА (743,3 %) и ИДУ (996,5 %) в сравнении со 100% интактным контролем. Напротив, скорость синтеза этого фермента в присутствии морфолина составляла всего 2,5 %, а лозеваль- 2,1 %. К третьим суткам культивирования клеток в присутствии сравниваемых агентов активность вирусной полимеразы снизилась в половину с контролем в среде с препаратами сравнения (ТФА и ИДУ), в то же время в присутствии морфолина и лозеваль этот блок еще более усилился (табл. 1).

Таблица 1. Активность вирусной ДНК- полимеразы в клетках культуры

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
Морфолин	1,4±0,09 0,001	2,5	0,45±0,002 0,001	0,7
Лозеваль	1,2±0,05 <0,001	2,1	0,5±0,004 <0,001	0,8

Полученные результаты согласуются с данными непрямо́й иммунофлуоресценции при люминесцентно-микроскопических исследованиях. Так установлено, что по сравнению с интактным контролем, где процент светящихся клеток в перевиваемой культуре не превышает 8,1- 10,1, совместное внесение ТФА+ЦГ приводит к достоверному увеличению количества клеток с вирусными антигенами (12,8- 13,3 %), что сохраняется и после удаления из среды этих агентов.

Действие исследуемых препаратов на клетки, в которых был дополнительно индуцирован синтез вирусной ДНК-полимеразы различно. Так после первых 24 часов некоторое увеличение процента светящихся клеток отмечается прежде всего в опыте с ИДУ, где скорость синтеза полимеразы увеличилась почти в 10 раз по сравнению с интактным контролем. Спустя 72 часа количество светящихся клеток уже увеличивается более чем в 2 раза, и это сохранялось до 96 часов. Сходные результаты получены и в опыте с другим индуктором полимеразного синтеза -ТФА.

Обратная картина наблюдалась в опытах с морфолинием и препаратом лозеваль. К 24 часам в их присутствии процент светящихся клеток по сравнению с контролем был идентичным, но к 72 часам количество клеток с вирусными антигенами снизилось почти в 3 раза в обоих опытах, и это сохранялось даже спустя 96 часов (табл. 2).

Таблица 2. Процент вирусодержащих клеток в реакции непрямо́й иммунофлуоресценции

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
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

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что препараты морфолиний и лозеваль селективно тормозят активность вирусной ДНК- полимеразы, при этом обратимо блокируя активность клеточной ДНК- полимеразы. Этим можно объяснить тот факт, что в опытах *in vitro* и *in vivo*, морфолиний и лозеваль обладают выраженным избирательным противовирусным эффектом.

Практическая ценность препарата лозеваль подтверждена положительными результатами широких производственных испытаний. Наставление по применению

его в ветеринарии утверждено Департаментом ветеринарии в установленном порядке. Препарат зарегистрирован Федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору (N 000096 от 24.02.2011г.). Производство лекарственной формы лозеваль освоено ООО «Биостим».

Широкие производственные испытания этого препарата показали, что он обладает бактериостатическими и бактерицидными свойствами по отношению к кишечной палочке, золотистому стафилококку, сальмонеллам, стрептококку. Одновременно лозеваль проявляет выраженное противовирусное действие по отношению к вирусам - возбудителям оспы, вирусу гриппа А, вирусу инфекционного ларинготрахеита кур.