УДК 578.72:579.66:615.1

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 $СД_{50}$. *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-оксибензил)-бензімідазол [7], похідні 4-аміноантипирину [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), рамноліпіду (РЛ) — продуктів біосинтезу бактеріальної культури *Pseudomonas* sp. PS-17, і трегалозоліпіду (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/см^3. 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 ($СД_{50}$).

Антивірусну активність досліджуваних сполук визначали до штаму «Дніпровський-34» тешовірусу свиней 1-го серотипу, який зберігається в колекції штамів тешо- ентеровірусів свиней Інституту сільськогосподарської мікробіології НААН Ураїни, 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 $ТЦД_{50}$/см^3. 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)			
	C_1	C_2	C_3	C_4
дріжджовий манан	0,1	50	100	500
глюкороноксидоманан	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 $СД_{50}$ — 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/см^3. Клітини зменшувалися у розмірі, збільшувався міжклітинний простір і, зрештою, частково або повністю клітини відшаровувалися від скла. Розчини трегалозоліпіду в усіх досліджуваних концентраціях не впливали на морфологію клітин. Концентрації 10 мкг/см^3 для ГКМ і РЛ, а також 100 мкг/см^3 для β-глюкану і БК виявилися критичними.

Отже, $СД_{50}$ для трегалозоліпіду становить більше 1 мг/см^3, для дріжджового манану — 1 мг/см^3, для β-глюкану та біокомплексу псевдомонад — 100 мкг/см^3, глюкороноксидоманану та рамноліпіду псевдомонад — 10 мкг/см^3.

Титр тешовірусу штам «Дніпровський-34» у культурі клітин СНЕВ без внесення досліджуваних речовин становив 7,5 lg $ТЦД_{50}$/см^3.

При дослідженні впливу дріжджового манану на репродукцію тешовірусу в культурі клітин СНЕВ встановлено, що найвища його антивірусна активність спостерігалась у концентрації 50 мкг/см^3 у підтримуючому середовищі. Інфекційний титр тешовірусу знижувався на 3,0 lg $ТЦД_{50}$/см^3 (рис. 1). Концентрація 0,1 мкг/см^3 не вплинула на репродукцію тешовірусу в культурі клітин СНЕВ. Додавання ДМ у середовище в концентрації 100 та 500 мкг/см^3 знижувало інфекційну активність тешовірусу на 2,5 та 2,0 lg $ТЦД_{50}$/см^3 відповідно.

Максимальний антивірусний ефект глюкороноксидоманану спостерігався при додаванні 1 мкг/см^3. Інфекційний титр тешовірусу знижувався на 2,25 lg ТЦД$_{50}$/см^3. Концентрації 0,1 та 2 мкг/см^3 знижували репродуктивну активність тешовірусу на 1,25 lg ТЦД$_{50}$/см^3. Концентрація 10 мкг/см^3 ГКМ у підтримуючому середовищі, яка є токсичною для культури клітин, знижувала інфекційність тешовірусу на 2,0 lg ТЦД$_{50}$/см^3.

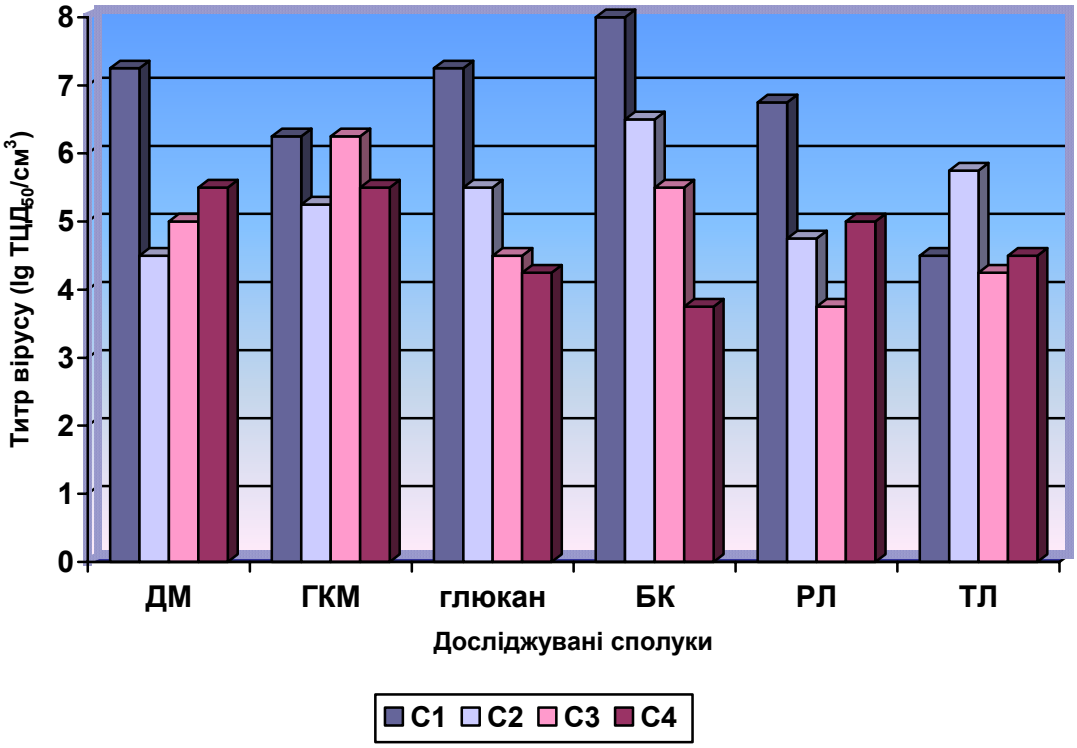

Рис. 1. Вплив досліджуваних сполук в різних концентраціях на інфекційну активність тешовірусу в культурі клітин СНЕВ

У порівнянні з контролем β-глюкан значно зменшував інфекційність тешовірусу при додаванні в середовище 100 та 20 мкг/см^3. Титри вірусу знижувалися на 3,25 та 3,0 lg ТЦД$_{50}$/см^3 відповідно. Зменшення концентрації до 10 мкг/см^3 призвело до зниження інфекційності на 2 lg ТЦД$_{50}$/см^3. Концентрація 0,1 мкг/см^3 не вплинула на репродукцію тешовірусу в культурі клітин СНЕВ.

Біокомплекс псевдомонад проявив найвищу антивірусну активність у концентрації 10 мкг/см^3. Інфекційний титр тешовірусу знижувався на 3,75 lg ТЦД$_{50}$/см^3. Зменшення його концентрації в підтримуючому середовищі до 2 та 1 мкг/см^3 призвело до зменшення впливу на репродуктивність тешовірусу в культурі клітин СНЕВ. Інфекційність знижувалася лише на 2 та 1 lg ТЦД$_{50}$/см^3 відповідно. У концентрації 0,1 мкг/см^3 біокомплекс псевдомонад суттєво не вплинув на вірус.

При додаванні 2 мкг/см^3 рамноліпіду в підтримуюче середовище спостерігалося зниження репродуктивної активності тешовірусу на 3,75 lg ТЦД$_{50}$/см^3. Концентрації 1 та 10 мкг/см^3, що є токсичною для культури клітин, знижували інфекційну активність тешовірусу на 2,75 та 2,5 lg ТЦД$_{50}$/см^3.

Всі досліджувані концентрації трегалозоліпіду значно знижували репродуктивність вірусу в культурі клітин СНЕВ. Концентрації 1, 100 та 1000 мкг/см^3 знижували титр вірусу на 3,0–3,75 lg ТЦД$_{50}$/см^3. Лише в концентрації 10 мкг/см^3 ТЛ знижував інфекційність тешовірусу в культурі клітин на 1,75 lg ТЦД$_{50}$/см^3.

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. Глюкороноксидоманан і біокомплекс псевдомонад знижували репродукцію тешовірусу in vitro у концентраціях, які в 10 разів перевищували $СД_{50}$. 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.

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 embrionted 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 CD_{50}. 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.

Т А. Бова

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 $СД_{50}$ 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'янко 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 diseaes 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'янко С. В.* Синтез та перевірка противірусної активності похідних 4-аміноантипирину in vitro [Текст] / С. В. Дерев'янко, О. І. Полевік, 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.