

УДК:619:615.37

Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор

Ковалев Н.А., доктор ветеринарных наук, академик НАН Беларуси

Бучукури Д.В., кандидат ветеринарных наук

Усеня М.М., кандидат ветеринарных наук

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск

КОМПЛЕКСНЫЙ ПРЕПАРАТ «ФЕРОНОВИРИН» ДЛЯ ТЕРАПИИ И ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ

Сообщение 1. Конструирование препарата и испытание его ингибирующих свойств против вируса инфекционного гепатита плотоядных на культуре клеток и морских свинок

Резюме

В работе приводятся данные литературы и собственные исследования авторов по проблеме инфекционных вирусных заболеваний плотоядных животных, таких как бешенство, чума, парвовирусный энтерит и инфекционный гепатит в мире и Республике Беларусь. Для специфической профилактики этих заболеваний разработаны достаточно эффективные зарубежные и отечественные моно- и поливалентные вакцины. А вот средств и методов лечения указанных заболеваний плотоядных животных в настоящее время недостаточно. Для лечения вирусных заболеваний в медицинской практике применяют химиотерапевтические противовирусные препараты и видовые рекомбинантные интерфероны различных модификации. Особого внимания в этом ряду уделяется рибавирину. В статье показаны методические подходы при конструировании комплексного препарата и его эффективности при лабораторных испытаниях.

Summary

The paper presents data of literature and own researches of authors on infectious viral diseases of carnivorous animals, such as rabies, plague, parvovirus enteritis, and infectious hepatitis in the world and the Republic of Belarus. For specific prophylaxis of these diseases developed sufficiently effective foreign and domestic mono - and polyvalent vaccines. But the means and methods of treatment of these diseases in carnivores is currently not enough. For the treatment of viral diseases in clinical practice using chemotherapeutic drugs and anti-virus species of recombinant interferons of various modifications. Special attention in this series is paid for the ribavirin. The article shows the methodological approaches in the design of the integrated product and its effectiveness in laboratory tests.

Поступила в редакцию 28.05.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Из инфекционных вирусных заболеваний плотоядных животных в Беларуси основной удельный вес кроме бешенства занимают чума, парвовирусный энтерит и инфекционный гепатит. Из домашних животных указанными заболеваниями болеют собаки, а из пушных зверей – лисицы, песцы, енотовидные собаки, норки, хорьки, соболи и др. Данные заболевания представляют большую угрозу и наносят большой экономический ущерб пушному звероводству и собаководству.

Для специфической профилактики этих заболеваний разработаны достаточно эффективные зарубежные и отечественные

моно- и поливалентные вакцины, которые широко применяются в республике для вакцинации пушных зверей и собак, ежегодно охватывая до 2-х млн. животных.

Что касается средств и методов лечения указанных заболеваний, то разработка их находится в зачаточном состоянии. В настоящее время для лечения вирусных заболеваний в медицинской практике все чаще применяют химиотерапевтические противовирусные препараты и видовые рекомбинантные интерфероны различных модификаций [1–9].

Из противовирусных химиотерапевтических препаратов особого внимания заслуживает рибавирин, который подавляет ви-

руссы ряда семейств как ДНК-, так и РНК-содержащих (вирусы герпеса, гриппа, гепатита, ВИЧ инфекции и др.), а интерферон активизирует иммунную систему организма. Поэтому рибавирин и интерферон взяты нами для конструирования комплексного противовирусного препарата для профилактики и лечения вирусных инфекций плотоядных животных.

При выполнении данной работы ставились следующие задачи:

- подобрать оптимальные дозы и соотношения рекомбинантного интерферона и рибавирина в препарате и проверить его на безвредность на культурах клеток и лабораторных животных.

- приготовить лабораторный образец комплексного препарата и изучить эффективность его в опытах на культурах клеток и лабораторных животных, зараженных вирусом инфекционного гепатита.

- разработать лабораторный регламент на изготовление препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали собачий рекомбинантный интерферон под названием «Фанниферон», представляющий собой смесь собачьего гамма- и альфа-интерферона и фармацевтический препарат «Рибавирин» в виде белого порошка, содержащего 97% активной субстанции.

Рекомбинантные интерфероны получены из сконструированных штаммов-продуцентов *E. coli*, наследующих плазмиды с генами собачьего α - и γ -интерферона. Бактерии культивируются в LB-бульоне с 20 мкг/мл канамицина при температуре 37°C до оптической плотности $OP_{600}=0,6-0,8$, после чего в среду добавляется индуктор изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 ммоль/л, культивируются еще 4 ч; клетки осаждают центрифугированием в течение 5 мин при 7000g. Клеточный осадок промывают в буфере следующего состава: 15 ммоль Na-фосфат, 1 ммоль ЭДТА, pH 7,5 и ресуспендируют в том же буфере.

Клетки разрушаются при 150 атм. на проточном дезинтеграторе типа «френч-пресс». Полученную суспензию центрифугируют 20 мин при 10000g и +4°C, супернатант сливают. Осадок телец включений отмывают в том же буфере и растворяют в буфере следующего состава: 7M гуанидин-гидрохлорид, 20 ммоль Na-фосфат, 1 ммоль ЭДТА, pH 7,5. Инкубируют 2 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Добавляют сульфит натрия до 30 г/л, раствор инкубируют 12 часов при комнатной температуре при интенсивном перемешивании.

Белки обессоливают хроматографией на колонке с Sephadex G25 Medium в буфере состава: 50 ммоль Na-фосфат, 1 ммоль ЭДТА, 100 ммоль NaCl, pH 7,5. Далее белок очищают с помощью ионообменной хроматографии на Toyopearl SP-550. Концентрацию белка измеряют по Лоури, чистоту оценивают с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза по Laemmli [6].

Рибавирин – фармацевтический химический препарат, ингибирующий многие ДНК- и РНК-содержащие вирусы, превращающийся в клетках в моно- и трифосфат, которые тормозят синтез вирусных ДНК и РНК. При приеме внутрь препарат быстро и почти полностью всасывается из ЖКТ, биодоступность – 44 – 64%. При внутривенном введении C_{max} достигается к концу инфузии. Распределяется в плазме, секретах дыхательных путей и эритроцитах. Выводится в форме метаболитов и в неизменном виде с мочой и фекалиями.

Для определения предельно допустимой дозы рекомбинантного интерферона и рибавирина на культуре клеток использовали 96-луночные плоскодонные планшеты, культуру клеток МДСК на которой хорошо репродуцируется вирус инфекционного гепатита, белых мышей массой 18–20 г, морских свинок массой 300–350 г и собак массой 10–15 кг.

Для приготовления рабочего раствора к 10 мл стерильного физраствора добавляли 10 мкл (100МЕ) интерферона. Следовательно в 10 мкл раствора содержалось ин-

терферона 0,1МЕ. Рабочий раствор рибавирина готовили на физрастворе в соотношении 1:10000.

При определении предельно допустимой токсической дозы препарата использовали семь рядов лунок (8 лунок в каждом ряду) с монослоем клеток МДСК. В первый ряд вносили по 0,1МЕ, второй – 0,2МЕ, третий – 0,3МЕ, четвертый – 0,4МЕ; пятый – 0,5МЕ, шестой – 0,6МЕ, седьмой ряд лунок служил контролем. Наблюдение за клетками проводили в течение 96 часов. Результаты учитывали по наступлению ЦПЭ.

С целью определения токсической дозы интерферона в опыт были взяты четыре группы белых мышей по 10 в каждой. Первой группе мышей водили подкожно раствор интерферона, содержащий 100 МЕ, второй группе – 200МЕ, третьей группе – 500МЕ, четвертая группа служила контролем. Наблюдение за животными вели в течение десяти суток. О токсичности препарата судили по выживаемости, общему состоянию животных и наличию патологических изменений на месте введения препарата.

Для определения токсической дозы рибавирина на культуре клеток в опыте использовали 7 рядов лунок планшета по 8 лунок в каждом с монослоем культуры клеток МДСК. В первый ряд лунок вносили по 10,0 мкг препарата, во второй – по 20,0 мкг, в третий ряд – по 30,0 мкг, в четвертый – 40,0 мкг, в пятый – 50,0 мкг, в шестой – 60,0 мкг, седьмой ряд лунок служил контролем. Наблюдение за клетками вели в течение четырех суток. Результаты учитывали по наступлению ЦПЭ.

Для определения токсической дозы рибавирина в опыт были взяты три группы белых мышей по 6 голов в каждой. Первой группе мышей подкожно вводили по 4,0 мкг препарата в растворе, второй – 40 мкг, третья группа служила контролем. Наблюдение за животными вели в течение десяти суток. О токсичности препарата судили по выживаемости, общему состоянию

животных и наличию патологических изменений на месте введения препарата.

Для изучения токсичной дозы конструируемого препарата на культуре клеток МДСК он был приготовлен в следующих соотношениях компонентов из расчета на одну лунку культуры клеток:

- рибавирин 10,0мкг + интерферон 0,1 МЕ;
- рибавирин 20,0 мкг + интерферон 0,2 МЕ;
- рибавирин 30,0мкг + интерферон 0,3 МЕ;
- рибавирин 40,0 мкг + интерферон 0,4 МЕ;
- рибавирин 50,0 мкг + интерферон 0,5 МЕ.

Каждый образец препарата вносили в отдельный ряд по 8 лунок со сформированным монослоем клеток. Результаты учитывали по наличию ЦПЭ.

Изучение антивирусной активности комплексного препарата первоначально проводили на культуре клеток МДСК. Для этого использовали планшеты с плоскодонными лунками. В каждую лунку вносили вирус инфекционного гепатита собак (КАВ-1) по 100 мкл и сорбировали его при комнатной температуре в течение часа. После этого без слива питательной среды в лунки добавляли комплексный препарат в подобранных нетоксических дозах. Наблюдение ввели в течение 96 часов с ежедневной микроскопией. Результаты учитывали по наличию ЦПЭ.

Для изучения эффективности ингибции вируса инфекционного гепатита плотоядных конструируемым комплексным препаратом в опыт были взяты 12 морских свинок, которых разделили на три группы, по три в каждой. Всех животных заразили вирусом гепатита плотоядных подкожно в дозе 1000 LD₅₀. Через 72 часа после заражения опытным животным первой и второй групп вводили комплексный препарат подкожно в следующих дозах: 1 группа – фаниферон 5000МЕ + рибавирин 100 мкг на голову; 2 группа – фаниферон 6000МЕ + рибавирин 130 мкг на голову.

Третьей группе препарат не вводили, она служила контролем. Наблюдение за животными вели в течение 10 дней.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В проведенных опытах было установлено, что собачий рекомбинантный интерферон в дозах 0,1 – 0,5 МЕ на лунку 96 и 24-луночного планшета с монослоем клеток МДСК не вызывает их дегенерацию и в дозах 100–500 МЕ при подкожном введении не вызывает заболевание и гибель белых мышей.

Фармацевтический химический антивирусный препарат «Рибавирин» в дозах 10,0–50,0 мкг на лунку 96 луночного планшета для клеток МДСК и в дозах 4,0–40,0 мкг для белых мышей при подкожном введении является нетоксичным. Полученные данные явились исходными для конструирования комплексного противовирусного препарата и изучения его нетоксичных доз для культуры клеток, безвредности и эффективности для животных.

Лабораторный образец комплексного противовирусного препарата, названного нами «Фероновирином», был приготовлен путем смешивания интерферона и рибавирина в нетоксичных для культур клеток и белых мышей дозах (соотношениях). При исследовании его безвредности и эффективности установлено, что препарат с содержанием рибавирина 10–50 мкг и интерферона 0,01–0,05 МЕ на лунку планшета является нетоксичным для культур кле-

ток МДСК.

Сконструированный препарат с содержанием рибавирина 20–50 мкг и интерферона 0,2–0,5 МЕ на лунку планшета задерживает развитие ЦПЭ в зараженной вирусом инфекционного гепатита культуре клеток МДСК на 24 часа, но полностью не предотвращает его проявления.

Препарат, содержащий рибавирина 100–130 мкг и интерферона 5000–6000МЕ на голову, при однократном подкожном введении предотвращает заболевание у зараженных вирусом инфекционного гепатита морских свинок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сконструированный препарат «Фероновирином» является безвредным для животных и обладает выраженным вирулицидным действием на возбудителя инфекционного гепатита плотоядных животных.

Проведенные исследования дают основание на продление исследований по данному препарату, в частности, по разработке технологии его изготовления, доз и схем применения, эффективности при различных вирусных заболеваниях плотоядных животных и т.д.

На основании проведенных исследований разработан лабораторный регламент на комплексный препарат.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Инструкция по применению: интерферон бычий рекомбинантный.
- 2 Левагина, Г.М., Аликин, Ю.С., Масычева, В.И., Даниленко, Е.Д., Индуктор интерферона пролонгированного действия Заявка: 99121277/14, 08.10.1999 Опубликовано: 27.08.2001.
- 3 Потапович, М.И., Прокулевич, В.А. // *Материалы Междунар. науч. конф. «От классических методов генетики и селекции к ДНК-технологиям»*. Мн., 2007. – С. 117.
- 4 Потапович, М.И., Николайчик, Е.А., Прокулевич, В.А. // *Материалы Междунар. науч. конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии»*, Минск, 2–6 июня 2008 г. в 2 т. Мн., 2008. – Т.1. – С. 301.
- 5 Прокулевич, В.А. [и др.]. Препарат, обладающий антивирусным и антимикробным действиями: пат. РБ а20080606 от 10.02.2010.
- 6 Прокулевич В.А. [и др.]. Препарат на основе интерферона: пат. 014669 ЕвразЭС/. заявл. 08.06.2009; опубл. 30.12.2010.
- 7 Helen Karlberg, Gunnel Lindegren and Mirazimi Comparison of Antiviral activity of recombinant and natural Interferons against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *The Open Virology Journal*, 2010, 4, 38–41 1874–3579/10 2010.
- 8 Nakamura, O., Shitara, N., Matsutani, M., Takakura, K., Machida, H. [Effect of interferon inducer (poly ICLC) in the treatment of malignant brain tumor (author's transl)]. *No To Shinkei*. 1982 Mar;34(3):267–73.
- 9 Yue, Yi, Zhiwen, Xu, *Bijinformatic s Analisis and Characteristic of the giant panda Interferon-alpha 2011*, 1, 45–54 Published Online February 2011 in MECS (<http://www.mecspress.org/>).