

АНТИВИРУСНОЕ И ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ФОСФОНУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ

М. М. Зубаиров¹, Ю. О. Селянинов^{1}, А. В. Роцин², П. С. Хохлов²*

¹Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии, пос. Вольгинский, Владимирская область, Россия,
*e-mail: yusel1@yandex.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия

Поступила в редакцию 20.04.2017

Изучено антивирусное (вирусстатическое) действие 127 производных фосфонуksусной кислоты в культуре клеток костного мозга свиней, из которых для изучения лечебно-профилактического действия было отобрано и испытано 16 веществ. На основе анализа данных об эффективности синтеза, воспроизводимости и лечебной активности при африканской чуме свиней (АЧС) были отобраны три соединения - фосфонуksусная кислота, комплекс фосфонуksусной кислоты с 7-амино-1,3,5-триазаадамантаном (А-14) и калиевая пиридиновая соль фосфонуksусной кислоты (Ф-230), которые предохраняли от гибели более 80% зараженных животных при 100% гибели в контроле. Применение фосфонуksусной кислоты в комплексе с метисазоном в условиях микроэпизоотии предохраняло от гибели всех подсвинков, бывших в контакте с больными, при 100% гибели животных, которым соединение не вводили. Показана возможность (отработаны дозы, сроки и кратности введения химиопрепаратов) для снятия вирусоносительства при АЧС. Установлена возможность получения типоспецифических сывороток, минуя процесс аттенуации вирулентных штаммов. Это позволяет сократить время получения сыворотки в 3-12 раз, что имеет важное значение для серотипирования вируса, так как для аттенуации отдельных штаммов требуется от 6 до 12 и более месяцев. Результаты дают возможность разработки рекомендаций и мероприятий по борьбе с АЧС.

Ключевые слова: антивирусная активность, вирусстатическое действие, лечебно-профилактическое действие, максимально переносимая доза, минимальная эффективная доза, химиотерапевтический индекс, африканская чума свиней, фосфонуksусная кислота, метисазон.

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней – острая, особо опасная болезнь для европейских пород свиней и диких кабанов, вызывающая 100%-ную гибель животных. Возбудителем болезни является ДНК-содержащий вирус, единственный представитель семейства *Asfarviridae*. Геном вируса представлен двухцепочечной ДНК размером 170-190 тысяч пар оснований. В настоящее время известно 22 генотипа вируса и 9 сероиммунотипов. Большие экономические потери при АЧС складываются не только из-за гибели восприимчивого поголовья, но и в связи с запретом на перемещение любой

животноводческой продукции в неблагополучном регионе и карантинными мероприятиями. С момента заноса вируса АЧС в РФ в 2007 г., вопреки предпринимаемым мероприятиям, вирус продолжает распространяться с юга страны к ее центру и дальше на север.

Показано, что при АЧС единственным эффективным методом борьбы с болезнью является депопуляция восприимчивых животных в очаге инфекции и на прилегающей территории. Это обусловлено отсутствием средств специфической профилактики при АЧС и длительным или пожизненным вирусоносительством.

При болезнях вирусной этиологии наиболее эффективным методом предотвращения болезни является применение вакцинных препаратов, но как было указано, против АЧС они не разработаны. Другим способом борьбы с вирусными болезнями являются химиотерапия и химиопрофилактика. Так, для лечения и профилактики оспы в 70-е годы был предложен препарат метисазон (марборан), который подавлял синтез поздних белков [1], для лечения гриппа был предложен мидантан (адамантанамин, амантадин, симметрел и ремантадин), которые подавляли синтез вирусиндуцированной РНК-зависимой РНК полимеразы, вирусспецифических РНК и полипептидов и, следовательно, образование зрелых вирусных частиц [2], препарат триазамирин, который проходит клиническую апробацию [3], а для лечения герпеса применяют ацикловир, подавляющий синтез вирусспецифической ДНК-полимеразы [4]. Поскольку «специфической» мишенью для химиопрепаратов у ДНК-содержащих вирусов является ДНК-полимераза, рядом авторов [5-9] в качестве лечебного средства была испытана фосфонуксусная кислота (ФУК), являющаяся эффективным ингибитором активности указанного фермента. ФУК была одинаково эффективна как в опытах на культурах клеток, так и на животных. Поскольку вирус АЧС относится к ДНК-содержащим вирусам, для нас представляло интерес оценить эффективность ФУК в отношении лечебно-профилактического действия ФУК при этой инфекции.

На основании изложенного, целью исследований являлась разработка подходов к лечению и профилактики африканской чумы свиней с использованием ФУК и ее производных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали эпизоотические вирусы африканской чумы свиней (АЧС) штамм «Л-57» - 1 серотипа и штамм «Ф-32» - 4 серотипа в виде вирусосодержащей культуральной жидкости с титром $10^{6,5} - 10^{7,5}$ ГАЕ₅₀/см³. Для культивирования вируса АЧС использовали культуру клеток костного мозга свиней (ККМС), ростовую и поддерживающую среду Игла-МЕМ. Штаммы вируса АЧС были получены из Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих особо опасные, опасные и не встречающиеся на территории страны болезни животных, ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Лечебно-профилактическое действие испытывали на подсвинках породы «Белая крупная» с живой массой тела 20-25 кг.

Фосфонукусную кислоту (ФУК) и 127 ее производных с органическими кислотами, эфирами, солями щелочных металлов, аминными солями, аминокалиевыми солями, солями аминокислот, синтезировали во ВНИИ фитопатологии Россельхозакадемии. Метисазон (N_1 -метилизатин- β -тиосемикарбазон, марборан) был произведен заводом «Акрихин».

Для определения инфекционной активности вируса АЧС готовили десятикратные последовательные разведения вирусосодержащей крови на среде Игла-МЕМ (с 10^{-1} до 10^{-8}), которые вносили в 4 чашки Карреля с 3-х суточной культурой клеток костного мозга свиней. Инфицированную ККМС инкубировали при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 72-144 часов. Наличие вируса в инфицированной культуре клеток определяли по феномену гемадсорбции (адсорбция эритроцитов свиней на инфицированных вирусом АЧС клетках). Титр вируса рассчитывали по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и выражали в $\lg \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$.

Скрининг соединений проводили в культуре клеток в определенной последовательности по следующим критериям – оценка максимально-переносимой дозы (МПД) и минимально-эффективной дозы (МЭД).

Для установления химиотерапевтического индекса (ХТИ), использовали производное от соотношения МПД/МЭД, т.е. $\text{ХТИ} = \text{МПД}/\text{МЭД}$.

За МПД соединений принимали 50%-ную дозу, которая при инкубировании в течение 72 часов не вызывала дегенеративных изменений в культуре клеток. За МЭД принимали дозу, подавляющую репродукцию вируса в ККМС не менее чем на $1,5 \lg \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$.

При испытании вирусстатического действия соединений ККМС инфицировали вирусом АЧС в дозе 100ГAE_{50} и инкубировали при 37°C . Соединения в различных дозах вносили в ККМС через 1-1,5 часа после заражения. На каждую дозу соединения брали по 4 чашки Карреля с ККМС. После внесения соединений чашки с ККМС инкубировали при 37°C в течение 72-144 часов до четкого проявления адсорбции эритроцитов на ККМС. Контролями служили ККМС, инфицированная вирусом, интактная культура клеток и ККМС, обработанная только испытываемыми химическими соединениями.

Вирусстатическое действие определяли по разнице титров вируса в опытных и контрольных культурах клеток, которое выражали в $\lg \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$.

Для полной характеристики ингибирующего действия соединений определяли химиотерапевтический индекс (ХТИ). Препараты с ХТИ больше 4 испытывали на животных.

Для изучения лечебно-профилактического действия препаратов подсвинков заражали внутримышечно вирусом АЧС 1 серотипа штамм «Л-57» в дозе $100 \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$. Испытуемые соединения вводили одновременно с заражением подсвинков внутримышечно, а метисазон - с кормом. Количество и кратность введения препаратов варьировали в зависимости от целей экспериментов, но не более, чем 7-14 введений за весь период лечения. Метисазон задавали с кормом в дозе 50 мг/кг массы тела в течение 5-7 дней. Эффективность лечебно-профилактического действия оценивали по

следующим критериям: количество выживших животных, тяжесть клинических признаков, продолжительность периода болезни и накопление вируса в крови по сравнению с контролем. Специфичность гибели животных подтверждали патолого-анатомическим обследованием и выявлением возбудителя в крови.

Для изучения профилактического действия производных ФУК с метисазоном в условиях смоделированной микроэпизоотии одного подсвинка заражали внутримышечно вирусом АЧС 4 серотипа штамм Ф-32 в дозе 10000 ГАЕ₅₀ и помещали в станок с интактными животными. Соединения начинали вводить интактным животным с момента повышения температуры тела у зараженного животного. Контролем заражаемости служили чистые животные, которым соединения не вводили. Эффективность профилактического действия соединений оценивали по количеству выживших животных, тяжести течения болезни и накоплению вируса в крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение вирусстатического (ингибирующего) действия производных ФУК на вирус АЧС *in vitro*

Поскольку в доступной литературе нам не удалось обнаружить данных по взаимосвязи химическая структура-антивирусное действие ФУК и его производных, было синтезировано 127 соединений ФУК: с органическими кислотами – 9, эфирами – 27, солями щелочных металлов – 12, аминными солями – 41, амино-калиевыми солями – 12, солями аминокислот – 26. Вирусстатическое действие определяли по снижению уровня вируса АЧС по сравнению с контролем и величине ХТИ. Активными считали соединения, ингибирующие репродукцию вируса в ККМС не менее чем на 1,5 lg ГАЕ₅₀/см³ и имеющие ХТИ не ниже 4. Результаты исследования вирусстатического действия наиболее активных соединений представлены в таблице 1.

Из данных таблицы 1 видно, что практически все аминные комплексы, соли и эфиры ФУК проявили высокую ингибирующую активность *in vitro* в отношении вируса АЧС и имели ХТИ от 20 до 400. Наиболее активными были соединения Ф-612, Ф-611, Ф-751 и АИ-41, которые имели ХТИ = 300-400.

Из 127 производных ФУК выраженным вирусстатическим действием обладали 96 веществ или 75,5%, что является высоким показателем в скрининге соединений по антивирусной активности и показывает правильность пути избранного направленного синтеза среди производных ФУК.

Таблица 1. Вирусстатическое действие ФУК и ее производных на вирус АЧС в ККМС

№ п/п	Шифр в-ва	МПД мкг/мл	Степень подавления репродукции в $\lg \Gamma A E_{50} / \text{см}^3$	МЭД мкг/мл	Степень подавления репродукции в $\lg \Gamma A E_{50} / \text{см}^3$	ХТИ
1.	ФУК	1000,0	7,25	5,0	1,75	200
2.	Ф-464	500,0	7,25	5,0	2,75	100
3.	Ф-473	500,0	6,5	10,0	3,0	50
4.	Ф-471	3000,0	6,5	25,0	2,0	120
5.	Ф-477	2000,0	7,25	25,0	3,75	80
6.	АИ-2	500,0	6,5	5,0	3,5	100
7.	Ф-230	2000,0	7,0	10,0	4,0	200
8.	Ф-508	500,0	6,5	5,0	2,5	100
9.	Ф-607	2000,0	7,5	25,0	3,5	80
10.	Ф-608	500,0	7,5	10,0	2,0	50
11.	Ф-609	2000,0	7,5	10,0	2,0	200
12.	Ф-610	1000,0	7,5	5,0	2,5	200
13.	Ф-611	2000,0	7,5	5,0	2,0	400
14.	Ф-612	1500,0	7,5	5,0	4,5	300
15.	Ф-613	100,0	7,5	5,0	4,5	20
16.	Ф-631	500,0	7,25	5,0	2,75	100
17.	Ф-633	500,0	7,25	5,0	2,25	100
18.	Ф-636	500,0	6,25	5,0	2,75	100
19.	Ф-646	500,0	6,5	5,0	2,25	100
20.	Ф-641a	1500,0	6,5	10,0	2,5	150
21.	АИ-41	2000,0	6,5	5,0	2,5	400
22.	ША-11	500,0	6,5	5,0	2,5	100
23.	ША-13	500,0	6,5	5,0	2,5	100
24.	Ф-751	2000,0	7,5	5,0	2,5	400

Лечебно-профилактическое действие ФУК и ее производных *in vivo* на подсвинках, зараженных вирусом АЧС

На основании анализа данных, полученных *in vitro*, был проведен направленный синтез 16 наиболее активных и перспективных в синтезе соединений среди производных ФУК, а также испытано их лечебно-профилактическое действие на подсвинках. Соединения вводили внутримышечно и с кормом 1 раз в сутки в течение 7-14 дней. Эффективность соединений или их комбинаций оценивали по выживанию животных, клиническому проявлению болезни и виремии. Результаты экспериментов представлены в таблице 2.

Из данных таблицы 2 видно, что из 16 производных ФУК в комплексе с метисазоном, 9 или 56,22% обладали лечебно-профилактическим действием на подсвинках, зараженных вирусом АЧС, что подтверждает правильность выбранного пути направленного синтеза среди производных ФУК. Наиболее активными были соединения фосфонуксусная кислота (ФУК), комплекс фосфонуксусной кислоты с 7-амино-1,3,5-триазаадамантаном (А-14) и калиевая пиридиновая соль фосфонуксусной кислоты (Ф-230), в комплексе с метисазоном, которые предохраняли 80, 80 и 85,7%, соответственно. Необходимо отметить, что соединение Ф-230 вводили в течение 7 суток вместо

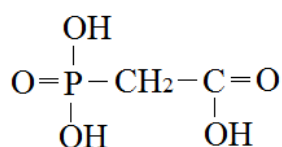
14. В отличие от ФУК, соединения Ф-230 и А-14 были не реактогенны и не вызывали местных стерильных абсцессов при внутримышечном введении.

Таблица 2. Лечебно-профилактическое действие ФУК и ее производных

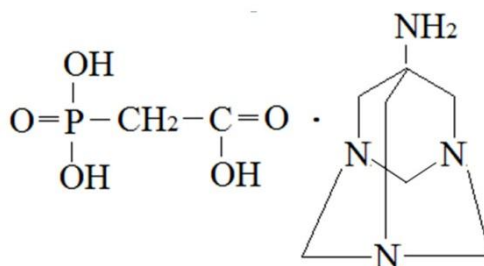
№ п/п	Соединения (шифр)	Доза соединения мг/кг	Количество введений	Способ введения	Кол-во животных в опыте	Выжило/% выживания	Сроки гибели (сутки)
1	ФУК метисазон	100,0 50,0	14 7	в/м* с/к*	30	24/80	12-15
2	А-14 метисазон	200,0 50,0	14 7	в/м с/к	30	24/80	12-15
3	Ф-230 метисазон	200,0 50,0	7 7	в/м с/к	14	12/85,7	12-16
4	Ф-468 метисазон	200,0 50,0	14 7	в/м с/к	2	0	9-11
5	Ф-470 метисазон	200,0 50,0	14 7	в/м с/к	2	0	7-9
6	Ф-464 метисазон	200,0 50,0	14 7	в/м с/к	2	0	7-9
7	Ф-476 метисазон	200,0 50,0	14 7	в/м с/к	2	0	6-8
8	Ф-470 метисазон	500,0 50,0	14 7	в/м с/к	2	0	8
9	Ф-473 метисазон	200,0 50,0	14 7	в/м с/к	2	0	15-18
10	Ф-631 метисазон	200,0 50,0	14 7	в/м с/к	2	2	-
11	Ф-636 метисазон	200,0 50,0	14 7	в/м с/к	2	0	16-18
12	Ф-609 метисазон	200,0 50,0	10 7	в/м с/к	4	3/75,0	18
13	Ф-612 метисазон	200,0 50,0	10 7	в/м с/к	6	2/33,3	14-16
14	Ф-614 метисазон	200,0 50,0	10 7	в/м с/к	2	2	-
15	Ф-675 метисазон	200,0 50,0	8 7	в/м с/к	2	0	12-13
16	Ф-103 метисазон	100,0 50,0	10 7	в/м с/к	2	0	14-15
17	Контроль	-	-	-	12	0	5-8

*в/м – внутримышечное введение, **с/к - введение с кормом

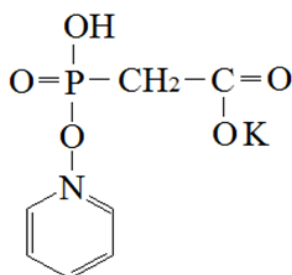
Структуры трех наиболее активных соединений приведены на рисунке 1.



Фосфонукусная кислота (ФУК)



Комплекс фосфонуksусной кислоты с 7-амино-1,3,5-триазаадамантаном (А-14)



Калиевая пиридиновая соль фосфонуksусной кислоты (Ф-230)

Рис. 1. Химические формулы трех отобранных соединений с наиболее эффективным лечебно-профилактическим действием.

Профилактическое действие ФУК и метисазона в условиях микроэпизоотии

Одним из наиболее вероятных способов заражения животных в природных условиях вирусом АЧС является контактный. Поэтому нами были смоделированы условия, наиболее приближенные к естественным – микроэпизоотия, вызванная контактным способом заражения.

Лечебно-профилактическое действие ФУК и метисазона изучали на 10 головах подсвинков в условиях вивария. Для снижения кислотности ФУК (рН 3,0) ее разводили в трис-буфере в соотношении 1 : 2, при этом величина рН раствора была равна 6,0. Раствор ФУК вводили внутримышечно в дозе 100,0 мкг/кг, а метисазон – с кормом в дозе 50,0 мкг/кг массы тела.

Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Профилактическое действие соединений в условиях микроэпизоотии

№	Группы животных	Доза соединения, мг/кг	Кратность введения	Способ заражения	Кол-во животных/выжило голов	Сроки наблюдения (сут)	Титр вируса у павших lgГАЕ ₅₀ /см ³
1	ФУК-трис + метисазон	100,0 50,0	14 7	Контактный	7/7	21	-
2	Контроль заражаемости	-	-	Контактный	2/0	14-15	6,5
3	Контроль вируса	10000 ГАЕ 50 Штамм Ф-32	-	в/м*	1/0	9	7,0

*в/м – внутримышечное введение

Из данных таблицы 3 видно, что применение ФУК на трис-буфере в комплексе с метисазоном предохраняло от гибели всех использованных в опыте подсвинков, бывших в контакте с больными, при 100% гибели животных, которым соединение не вводилось. Результаты этого эксперимента свидетельствуют о подавлении репродукции вируса АЧС в организме зараженных подсвинков при циркуляции ФУК в крови в терапевтической дозе.

Влияние химиопрепаратов на уровень вирусносительства при АЧС

Установлено, что некоторые изоляты вируса АЧС способны к длительной персистенции в организме свиней, являясь потенциальным очагом эпизоотии. Поэтому санация организма от вируса является весьма актуальной. Кроме того проблема снятия вирусносительства обусловлена соображениями санитарного порядка, эпизоотической опасностью таких животных при убойе и использовании мясопродуктов.

Поэтому нами была изучена возможность санации организма свиней от АЧС с помощью химиопрепаратов. В опытах были использованы 22 головы подсвинков, предварительно инокулированных аттенуированными штаммами вируса АЧС «ФК-135» в количестве 15 голов, «МК- 262» в количестве 7 голов, и в последующем контрольно зараженных вирулентными штаммами «Ф-32» и «М-78», соответственно. Химиопрепараты ФУК вводили подсвинкам внутримышечно в дозе 100,0 мг/кг, а метисазон с кормом в дозе 50,0 мг/кг. Результаты представлены в таблице № 4.

Таблица 4. Влияние химиопрепаратов на уровень вирусносительства при АЧС

№ п/п	Аттенуированные штаммы/ кол-во животных (гол)	Срок после КЗ (сутки)	Титр вируса в крови lgГAE ₅₀ /см ³	Доза препаратов мг/кг	Титр вируса после 4-х введений в 3-х пассажах lg ГAE ₅₀ /см ³	Титр вируса после 8-х введений в 3-х пассажах lg ГAE ₅₀ /см ³
1	ФК-135/15	20-25	1,75-3,0	ФУК-100,0	0	0
2	МК-262/7	20-25	3,75-4,0	+ Метисазон- 50,0	1,25-2,0	0

Из данных таблицы видно, что на 20-25 сутки после контрольного заражения при наличии вируса в крови в титре 1,75-3,0 lg ГAE₅₀/см³, достаточно 4-х введений химиопрепаратов ФУК и метисазона, после чего вирус не обнаруживался в крови, лимфоузлах и селезенке в 3-х последовательных пассажах в ККМС. Если титр вируса в крови у животных находился в титре 3,75-4,0 lg ГAE₅₀/см³, то после 4-х введений химиопрепаратов его титр снижался на 1,25-2,0 lg ГAE₅₀/см³, а после 8-ми введений – не обнаруживался в 3-х последовательных пассажах в ККМС.

Таким образом, показана возможность (отработаны дозы, сроки и кратности введения химиопрепаратов) снятия вирусносительства у животных при АЧС. Последствие введения химиопрепаратов имеет важное практическое значение. Результаты данных экспериментов могут быть использованы в различных исследованиях при разработке мер борьбы и средств специфической профилактики, а также для соблюдения мер санитарной безопасности при убойе животных в угрожаемой зоне и переработке мясо продуктов.

Влияние ФУК на формирование протективного иммунитета при АЧС

В разработке мер борьбы с инфекционными болезнями сельскохозяйственных животных определенное значение может иметь комбинированное применение вакцин и химиопрепаратов, т.е. химиопрепарат должен защищать животных в период начала формирования иммунитета, создаваемого вакциной.

С целью определения возможности влияния ФУК на формирование протективного иммунитета при АЧС проведены эксперименты на 12 головах подсвинков, разбитых на 3 группы. Животным 1 и 2 групп (по 5 голов) была введена эмульгированная вакцина ФК-135 в объеме 1 мл внутримышечно, затем подсвинкам 1 группы в течение 7 суток вводили ФУК в дозе 100 мг/кг массы тела 1 раз в сутки, 3 группа (2 головы) – контрольная. Контрольное заражение вирусом АЧС штамм Ф 32 в дозе 10000 ГАЕ 50 было проведено на 10 сутки после вакцинации. В результате контрольного заражения из 5 голов животных 1 группы на 12 сутки пал один подсвинок. Во второй группе падежа животных не наблюдалось. В контрольной группе пали все животные на 7 сутки. Известно, что ФУК подавляет синтез вирусного фермента ДНК-полимеразы, что должно приводить к нарушению формирования полноценных вирионов.

Однако результаты данного эксперимента свидетельствуют о том, что, несмотря на одновременное введение аттенуированного штамма «ФК-135» с ФУК, у подсвинков индуцировался протективный иммунитет: из 5 животных 1 группы после контрольного заражения выжило 4 головы.

Разработка схем получения типоспецифических сывороток при АЧС с использованием ФУК

В настоящее время установлено, что вирус АЧС гетерогенен в серо- и генотиповом отношении. На данный момент в коллекции ГНУ ВНИИВВиМ имеются паспортизированные штаммы 8 серотипов и 5 генотипов [10].

Для определения серотипа вновь выделяемых изолятов применяется реакция задержки гемадсорбции для постановки, которой необходимо наличие серотипоспецифических сывороток. Однако процесс получения указанных сывороток длителен и затратен, т.к. требуется проведение многократной иммунизации свиней аттенуированными штаммами вируса АЧС, которая может продолжаться до 60 и более дней. Кроме того, получение аттенуированного референс штамма может занимать 2 и более года. С целью сокращения сроков получения типоспецифических сывороток, содержащих

антитела, задерживающие гемадсорбцию при АЧС, и снижения отхода животных при иммунизации были использованы химиопрепараты, обладающие лечебно-профилактическим действием.

Отработаны две схемы получения типоспецифических сывороток с использованием ФУК.

Первая схема: получение типоспецифических сывороток на основе введения аттенуированных штаммов с последующим контрольным заражением на фоне введения ФУК. Данная схема была апробирована с вирусами 1, 2, 3 и 4 серотипов. На основе этой схемы было получено несколько серий сывороток 2 и 4 серотипов с титрами 1 : 160-1 : 640.

Вторая схема основана на лечении ФУК животных, зараженных свежeweыделенными изолятами вируса АЧС. Серотипоспецифические сыворотки получали на 30 сутки после начала эксперимента. По такой схеме были получены типоспецифические сыворотки на изоляты Родезия, Килан, Девис в титре от 1 : 40 до 1 : 160.

При указанных способах получения типоспецифических сывороток максимальные затраты времени составляют около 60 дней, а сохранность животных достигает 80%.

Проведенными исследованиями показана возможность получения типоспецифических сывороток, минуя процесс аттенуации вирулентных штаммов, что позволяет сократить время приготовления в 3-12 раз, т.к. для аттенуации отдельных штаммов требуется от 6 до 12 и более месяцев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ данных литературы и предварительных результатов собственных исследований по изучению противовирусного действия *in vitro* химических соединений различных классов показал, что наиболее активными являются фосфоновые соединения, а именно фосфонукусная кислота. Однако при испытании *in vivo* было установлено, что ФУК наряду с высокой вирусстатической активностью обладает сильным раздражающим действием, вызывая стерильные абсцессы при внутримышечном введении. С целью снятия раздражающего действия и повышения лечебно-профилактической активности было синтезировано 127 производных ФУК путем введения в молекулу аминных комплексов, солей и эфиров.

Испытания вирусстатического действия производных ФУК *in vitro* на вирус АЧС показали, что ингибирующим действием в той или иной степени обладали все испытанные соединения. Высоко активными оказались 96 веществ или 75,5%, ХТИ которых колебался в пределах 20-400, что является высоким показателем в скрининге соединений по вирусстатическому действию *in vitro*.

На основании анализа ингибирующей активности и структуры соединений для испытаний лечебно-профилактического действия на подсвинках, зараженных вирусом АЧС, было отобрано 16 веществ, из которых после испытаний были выбраны 3 соединения – ФУК, Ф-230 и АИ-14, последние из которых в отличие от ФУК были не реактогенны, не вызывали

местных стерильных абсцессов при внутримышечном введении и имели ХТИ = 200-400. Исследуемые соединения в комплексе с метисазоном предохраняли от гибели 80, 80 и 85,7% животных, соответственно, при 100% гибели в контроле.

Основным механизмом действия ФУК и ее производных является ингибирование активности вирусспецифической ДНК-полимеразы и, следовательно, синтеза вирусной ДНК. Вирус АЧС обладает высокой изменчивостью, в связи с чем возможно формирование ингибиторрезистентных мутантов. Поэтому с целью предотвращения этого процесса в комплексе с ФУК применялся химиопрепарат метисазон, который действует на синтез «поздних» вирусспецифических белков, таким образом, нарушая образование морфологически оформленной инфекционной вирусной частицы.

В условиях микроэпизоотии в виварных помещениях было установлено, что ФУК в комплексе с метисазоном предохраняла от гибели всех использованных в опыте подсвинков, бывших в контакте с больными, при 100% гибели контрольных животных. Это свидетельствует о том, что вирулентный вирус АЧС не приживляется в организме свиней, в крови которых присутствуют химиопрепараты в терапевтической дозе.

Известно, что аттенуированные и вирулентные изоляты вируса АЧС способны длительное время персистировать в организме свиней, являясь потенциальным очагом эпизоотии, и поэтому проблема санации организма от вируса является весьма актуальной. В экспериментах показана возможность (отработаны дозы, сроки и кратность введения химиопрепаратов) снятия вирусносительства при АЧС посредством введения химиопрепаратов, что имеет важное практическое значение.

Таким образом, в результате экспериментов установлена принципиальная возможность профилактики АЧС и получения типоспецифических сывороток с применением химиопрепаратов, что имеет важное практическое значение при формировании планов и схем профилактических мероприятий в очаге и угрожаемой по АЧС зоне, а также при разработке диагностических препаратов.

Список литературы:

1. *Bauer D.J.* In: *Chemotherapy of virus diseases* / Ed. by D.J. Bauer. Oxford: Pergamon Press, 1972. V. 1. P. 35.
2. *Oxford J.S., Galbraith A.* // *Pharmacol. Therapy.* 1981. V. 11. P. 181.
3. *Деева Э.Г., Русинов В.Л., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н., Киселев О.И.* // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014 № 2 (7). С. 147.
4. *Bauer D.J.* Laboratory studies on acyclovir: - In: *Developments in antiviral therapy* / Ed. by L.H. Collier, J. Oxford. London: Acad. Press, 1980. P. 43.
5. *Hay J.H., Subar-Sharpe I.H.* // *J. Gen. Virol.* 1976. V. 31. No. 1. P. 145.
6. *Helgstrand E., Flodh H., Lernestedt J. O. et al.* In: *Developments in antiviral therapy* / Ed. by L. H. Collier, J. Oxford. London: Acad. Press, 1980. P. 63.
7. *Зубаиров М.М., Митин Н.И., Хохлов П.С., Чупахин О.Н., Чарушин В.Н.* // Материалы научной конференции ВНИИВВиМ, 1992. С. 47.
8. *Зубаиров М.М., Митин Н.И., Хохлов П.С., Савенков Н.Ф., Кашемиров В.А., Кузнецов А.И., Космаков В.А.* // Материалы научной конференции ВНИИВВиМ, 1992. С. 48.

9. Зубаиров М.М., Митин Н.И., Хохлов П.С., Кашемиров В.А., Савенков Н.Ф. // Материалы научной конференции ВНИИВВиМ, 1992. С. 50.
10. Бальшиев В.М., Болгова М.В., Бальшиева В.И., Князева Н.В., Живодеров С.П. // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2015. № 2. С. 23.

ANTIVIRAL ACTIVITY AND THERAPEUTIC AND PREVENTIVE EFFECT OF PHOSPHONOACETIC ACID AND ITS DERIVATIVES

M. M. Zubairov¹, Yu. O. Selyaninov^{1}, A. V. Roshchin², and P. S. Khokhlov²*

¹State Science Institution National Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Volginsky, Vladimir region, Russia,
*e-mail: yusel1@yandex.ru

²Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Received April 20, 2017

Abstract – Antiviral (virustatic) activity of 127 derivatives of phosphonoacetic acid was examined in porcine bone marrow cell culture; consequently, 16 of them were selected and tested for studying their therapeutic and prophylactic effect. Analysis of combined data on their synthesis efficiency, reproducibility, and therapeutic activity against African swine fever (ASF) resulted in choosing three compounds, i.e. phosphonoacetic acid, phosphonoacetic acid complex with 7-amino-1,3,5-triazaadamantane, and potassium pyridine salt of phosphonoacetic acid, all of which prevented mortality of more than 80% of infected animals versus 100% mortality of animals in control group. The use of phosphonoacetic acid in combination with metisazone under microepizootic conditions prevented mortality of all piglets contacted with the diseased ones, in comparison to 100% mortality in untreated animals. A possibility for virus carriage removal under ASF was shown (dosages, terms and frequency of chemotherapeutic agent administration were determined). The possibility of obtaining type-specific sera was established which left out the step of attenuation of virulent strains. The result allowed to shorten the serum preparation time by 3-12 times which might be crucial for serotyping the virus, since attenuation of individual strains can take up to 6-12 months or more. The results contribute to developing recommendations and measures against ASF.

Keywords: antiviral activity, virustatic action, therapeutic and preventive effect, maximum tolerated dose, minimum effective dose, chemotherapeutic index, African swine fever, phosphonoacetic acid, metisazone.