

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ”

ФАКУЛЬТЕТ БІОТЕХНОЛОГІЇ І БІОТЕХНІКИ

КАФЕДРА ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

"На правах рукопису"

УДК 547.622:57.083.23

МАГІСТЕРСЬКА ДИСЕРТАЦІЯ

з спеціальності 8.05140101 – промислова біотехнологія
(код та назва спеціальності)

на тему: Антивірусна та інтерфероніндукуюча активність похідних дифенілу

Студент групи БТ-31м
(шифр групи)

Шемендюк Олена Віталіївна
(прізвище, ім'я, по батькові)

Науковий керівник к.б.н., доц. Жолнер Л. Г.
(вчені ступінь та звання, прізвище, ініціали)

Консультанти: к.б.н., с.н.с. Жолобак Н. М.
(вчені ступінь та звання, прізвище, ініціали)

к.т.н., доц. Орленко А. Т.
(вчені ступінь та звання, прізвище, ініціали)

ВСТУП

Актуальність теми

В Україні гостро стоїть питання профілактики та лікування масових вірусних хвороб, що обумовлені вторинними імунодефіцитами різного походження, широким розповсюдженням латентного вірусносійства, порушенням обміну речовин, техногенними факторами, які послаблюють імунний статус організму. Розвиток тривалої інфекції різноманітної етіології призводить до супресії системи синтезу інтерферонів. Все це свідчить про необхідність застосування при комплексній терапії хворих препаратів, що володіють етіотропною противірусною та антибактеріальною дією і корегують імунний статус організму.

Низькомолекулярні синтетичні сполуки – індуктори ІФН на сьогоднішній день є найбільш перспективними. Вони стимулюють неспецифічну резистентність, володіють інтерфероніндукуючими, антивірусними, імуномодуючими та імуноад'ювантними властивостями. Акцентується увага на їх низькій вартості та вибірковості індукції різних типів ІФН, що дає змогу не переважувати імунну систему в цілому.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Магістерська дисертація виконана відповідно до напряму науково-дослідних робіт відділу проблем інтерферону та імуномодуляторів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України в межах бюджетної тематики: «Дослідження ролі інтерферону та інших цитокінів у процесах імунопатогенезу при інфекційних, передпухлинних, нейродегенеративних та інших захворювань» (державний реєстраційний номер 013U001218, 2013-2014), в рамках наукового проекту «Розробка науково-обґрунтованих методів доклінічного дослідження противірусного препарату широкого спектру дії й індуктору інтерферону МОРІНОКСІНу та проведення доклінічного дослідження препарату» (державний реєстраційний номер 0113U007496с, договір № І.3.13(353)-с від 01 серпня 2013р. Фізико-хімічним інститутом ім. О.В. Богатського НАН України).

Мета й завдання дослідження

Метою даної роботи є визначення антивірусної та інтерфероногенної активності низькомолекулярних індукторів інтерферону – аналогів аміксину, зокрема, вивчення їх біологічних властивостей в умовах *in vitro* та *in vivo*.

У відповідності з поставленою метою були сформульовані наступні **завдання**:

1. Вивчити на різних культурах клітин цитотоксичну дію нових сполук (структурних аналогів аміксину) для оцінки перспективності їх застосування.
2. Вивчити антивірусну дію відібраних низько токсичних сполук.
3. Дослідити їх інтерфероногенну здатність *in vitro* та *in vivo*.

Об'єкт дослідження – 3 принципово нові сполуки – похідні дифенілу, структурні аналоги аміксину, що синтезовані та люб'язно надані д.х.н. проф. акад. НАН України Андронаті С.А. та к.х.н. Ляховим С.А. (Фізико-хімічний

інститут НАН України, м. Одеса, Україна) у рамках виконання спільної теми, а також субстанція препарату Аміксину ІС (ВАТ «ІнтерХім», Україна).

Предмет дослідження – антивірусні та інтерфероногенні властивості низькомолекулярних сполук – похідних дифенілу, структурних аналогів аміксину.

Наукове та практичне значення основних одержаних результатів

Досліджено цитотоксичність похідних дифенілу з використанням декількох культур клітин. Вперше показана здатність досліджених сполук індукувати продукцію інтерферону та реалізувати антивірусний захист від РНК-вмісних вірусів.

Отримані в роботі результати лягають в основу комплексу доклінічних досліджень відібраних низькомолекулярних індукторів ІФН – структурних аналогів аміксину, що відносяться до похідних дифенілу, – що сприятиме їх впровадженню як нових перспективних та ефективних інтерфероніндукуючих антивірусних препаратів. Досліджені сполуки після завершення доклінічних досліджень можуть бути рекомендовані для проведення фармако-гігієнічних та клінічних випробувань.

Результати проведених досліджень допоможуть розшифрувати та інтерпретувати механізми дії сполук, що в подальшому дозволить цілеспрямовано їх застосовувати. Отримані знання відкривають перспективу для синтезу нових сполук із заданим механізмом дії. Такий підхід є принципово необхідним, оскільки дозволяє розширювати арсенал антивірусних засобів у боротьбі з небезпечними агентами.

Апробація результатів дисертації

Результати роботи оприлюднені на двох конференціях Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут»: на VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченій 200-й річниці з дня народження Т. Г. Шевченка та на IX Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченій 170-й річниці з дня народження І. І. Мечникова.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Матеріали і методи досліджень

1. Досліджувані сполуки та речовини. В роботі використовували синтезовані С.О. Занозою у відділі медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України (м. Одеса) сполуки: 4,4'-біс-(2-диметиламіно-етокси)біфеніл (1), 4,4'-біс-(2-4-метилпіперидино-етокси)біфеніл (2), 4,4'-біс-(2-[2-метил-2-(4-метилпіперазин-1-іл)-пропіл]аміно-етокси)біфеніл (3) люб'язно надані для дослідження в рамках співпраці між інститутами. Препаратом порівняння був Аміксин («Інтерхім», Україна) – відомий офіційний низькомолекулярний антивірусний препарат, що застосовується в клінічній практиці.

2. Культури клітин. У роботі використовували культури клітин: перещеплювану лінію клітин PST (перещеплювані тестикули поросяти), отриману з колекції Інституту ветеринарної медицини НААН України; нирок бика (MDBK), отриману з Клітинного Банку Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

3. Живильні середовища. Ростове середовище для культивування культур клітин на основі середовищ MEM і 199 («Sigma», США) в однакових співвідношеннях із додаванням сироватки ембріонів корів до 5,0 % («Sigma», США) та антибіотиків 100 од/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину (Penstrep, «Sigma», США) та підтримуюче середовище – на основі середовищ MEM і 199 без сироватки з додаванням антибіотиків.

4. Віруси. Вірус везикулярного стоматиту (ВВС) штам Індіана, отриманий з Депозитарію Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

5. Культивування культур клітин. Клітини вирощували у моношаровій культурі в пластикових флаконах з площею дна 38,5 см² у поживному середовищі 199, що містить 0,68 мМ L-глутаміну (НВП «Біо-Тест-Лабораторія», Україна) з додаванням 10% ембріональної сироватки телят (ЕСТ) («Sigma», США), 25 мМ NEPES (рН 7,4; «Serva», Німеччина) та 1,0 мкг/мл канаміцину при 37°C в умовах постійного рівня CO₂ (5%). Клітини пересівали при утворенні ними моношару. Оптимальна щільність клітин при пересіванні становила 1–3·10⁴ клітин/см².

6. Вивчення токсичності речовин *in vitro* досліджували за допомогою двох модельних систем: на клітинах ліній PST та MDBK. Токсичність сполуки визначали за величиною її максимально витримуваної концентрації (МВК) та значенням СС₅₀ (мкг/мл).

7. Антивірусна дія сполук *in vitro*. Антивірусну активність обраних сполук досліджували на клітинах ліній PST за двома стандартними схемами внесення препаратів. Сполуки додавали до середовища культивування у концентрації, що не перевищувала МВК, з послідовним двократним розведенням за 24 год до (профілактична схема) або через 30-40 хв після інфікування клітин ВВС (100 ТЦД₅₀ – тканинна цитопатична доза вірусу, яка спричинює ураження 50% клітин моношару у 50,0 мкл середовища 199).

Для оцінки антивірусної активності дослідних сполук використовували значення ефективних концентрацій: ЕС₅₀ та ЕС₁₀₀.

8. Визначення інтерферогенної активності сполук *in vitro*. Визначення інтерфероніндукуючої активності у відібраних зразках проводили методом мікротитрування на культурі клітин PST проти тест-вірусу ВВС.

9. Визначення ІФН-генної активності сполук *in vivo*. Тварини отримували сполуки 1, 2, 3 та аміксин у дозах 12,5 мг/кг. Для порівняння ІФН-генної активності сполук *in vivo* використовували модельні клітинні лінії L929. Для оцінки здатності клітин до продукції ІФН застосовували мікрометод.

10. Визначення впливу досліджених сполук на метаболічну активність клітин перитонеального ексудату мишей. Дослідження інтерферонпродукуючої активності макрофагальних клітин перитонеального

ексудату мишей, оброблених сполуками та препаратом порівняння, також проводили на п'яту добу після їх введення в стандартній дозі 12,5 мг/кг.

Результати і обговорення

Вивчення токсичності речовин *in vitro*. Ряд MBK клітин MDBK для аміксину та його структурних аналогів має вигляд: $2 > 3 > 1 >$ аміксин, а для клітин PST: $3 > 1=2 >$ аміксин. Тобто, для взятих у дослідження культур клітин сполуки **1**, **2** та **3** характеризуються нижчою токсичністю, ніж препарат порівняння – аміксин.

Антивірусна дія сполук *in vitro*. При умові застосування профілактичної схеми досліду виявлено, що сполука **2** проявляє антивірусну активність в концентраціях однакових, порівняно з аміксином ($EC_{100} = 12,5$ мкг/мл). Сполуки **1** та **3** забезпечували позитивний антивірусний ефект в дещо вищих концентраціях: $EC_{100} = 50$ мкг/мл, проте при цьому спостерігається сталий захист клітин від цитопатичної дії вірусу. За умов застосування терапевтичної схеми досліду, були отримані схожі на попередні результати. Сполуки **2** та **3** забезпечували 100%-вий захист від цитопатичної дії вірусу в концентраціях 6,25 мкг/мл та 12,5 мкг/мл відповідно, що є вдвічі та в 4 рази вищими, ніж у аміксину ($EC_{100} = 3,13$ мкг/мл). Сполука **1**, на відміну від попередньої схеми застосування, проявила антивірусну активність в концентраціях рівних концентраціям аміксину.

Інтерфероніндукуюча дія сполук. Препарат порівняння аміксин викликає продукцію ІФН (титр ІФН склав 32) в культурі PST в діапазоні концентрацій 25,0 – 50,0 мкг/мл. Сполука **1** викликає в таких же концентраціях і таку ж, як і аміксин, за інтенсивністю продукцію ІФН в клітинах PST. Сполука **2** виявилась більш ефективним індуктором інтерферону, ніж аміксин, оскільки викликає інтерферогенез у значно нижчій концентрації – 6,25 мкг/мл. Сполука **3** не індукуює ІФН у клітинах PST.

Визначення інтерферогенної активності сполук *in vivo*. Отримані результати свідчать про те, що сполука **3** виявилася активнішою порівняно зі стандартним індуктором ІФН і ця різниця є значущою. Високі титри сироваткового ІФН тварин свідчать про пролонгований активуючий вплив сполуки **3** на імунну відповідь організму.

Визначення впливу досліджених сполук на метаболічну активність клітин перитонеального ексудату мишей. Ряд метаболічної активності макрофагальних клітин перитонеального ексудату мишей, які доочередно отримували аміксин чи його структурні аналоги має вигляд: сполука **3** > аміксин > сполука **1** > сполука **2**.

ВИСНОВКИ

У роботі досліджено інтерферогенні та антивірусні властивості низькомолекулярних індукторів інтерферону, що відносяться до похідних дифенілу. На основі отриманих результатів було зроблено наступні висновки:

1. Встановлено, що перспективні низькомолекулярні індуктори інтерферону, що відносяться до похідних дифенілу, є значно менш токсичними, ніж препарат порівняння аміксин.

2. Показано здатність похідних дифенілу пригнічувати розвиток вірусного цитопатичного ефекту на моделі PST-BBC як при профілактичній, так і при лікувальній схемі введення сполук. Вперше в умовах *in vitro* показано вищу, ніж у аміксину, лікувальну та профілактичну ефективність сполуки **2** проти вірусу везикулярного стоматиту, що свідчить про перспективність подальших доклінічних досліджень похідного дифенілу, сполуки **2** як нового ефективного антивірусного препарату.

3. На моделі перещеплюваних культур клітин PST показано, що сполуки **1**, **2**, як і аміксин, на відміну від сполуки **3**, здатні до індукції інтерферону. Перевагою сполуки **2**, на відміну від аміксину, є ширший діапазон ефективних інтерферогенних концентрацій. Сполука **1** за своїми інтерфероніндукуючими властивостями не поступається аміксину, а її перевагою також є значно нижча токсичність.

4. Виявлено, що введення експериментальним тваринам досліджених сполук **1**, **2** та **3** супроводжується збільшенням інтерференової відповіді клітин. ІФН-генна активність речовин виявилась кращою за аміксин. Під впливом сполуки **3** підвищення титрів сироваткового ІФН на V добу було найвищим.

5. Серед досліджених низькомолекулярних сполук можна виділити сполуку **3**, яка стимулює діє на систему фагоцитів в організмі та має ряд переваг перед аміксином, що дозволяє розглядати її як перспективний індуктор ІФН та противірусний препарат.

Ключові слова: АМІКСИН, АНТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ, ВІРУС ВЕЗИКУЛЯРНОГО СТОМАТИТУ, ІНТЕРФЕРОНІНДУКУЮЧА ДІЯ, ПОХІДНІ ДИФЕНІЛУ

Публікації:

1. Шемендюк О. В. Визначення токсичності солей церію / О. В. Шемендюк, Н. М. Жолобак, Л. Г. Жолнер // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 200-й річниці з дня народження Т. Г. Шевченка. – К.: НТУУ «КПІ». – 2014. – С. 75-76.
2. Шемендюк О. В. Інтерферогенна активність аміноетоксидифенілів – структурних аналогів аміксину / О. В. Шемендюк, Л. Г. Жолнер, Т. І. Бикова, Н. М. Жолобак // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей IX Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 170-й річниці від дня народження І. І. Мечникова. – К.: НТУУ «КПІ». – 2015. – С. 95.
3. Шемендюк О. В. Аміноетоксидифеніли – перспективні сполуки з антивірусною та інтерфероніндукуючою дією / О. В. Шемендюк, Л. Г. Жолнер, Н. М. Жолобак, М. Я. Співак // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2015. – №3. – [подано до друку]