

## Скрининг протистоцидной активности новых веществ из ряда амидов жирных кислот

*М.А. Бодрякова, м.н.с., А.А. Зубенко, к.х.н., А.В. Коваленко, д.в.н., Л.Н. Фетисов, с.н.с., А.Н. Бодряков, к.в.н., Северо-Кавказский зональный НИВИ*

Экономический ущерб, причиняемый кокцидиозами (эймериозами), в животноводстве складывается из снижения привесов, снижения яичной продуктивности (в птицеводстве), падежа молодняка, дополнительных затрат на проведение санации помещений и лечебно-профилактических мероприятий [1]. В птицеводстве, к примеру, это заболевание широко распространено в связи с высокой устойчивостью ооцист эймерий к воздействию химических веществ, возможностью паразитирования нескольких видов кокцидий в одном организме, способностью эймерий вырабатывать резистентность к антиэймериозным препаратам.

Профилактика и терапия эймериозов включает применение антикокцидийных средств, которые должны предупреждать заболеваемость и гибель птицы от всех видов кокцидий, быть безвредными (отсутствие токсичности для птицы и человека), не оказывать отрицательного влияния на продуктивные и репродуктивные свойства птицы, не обладать кумулятивным действием, не вызывать развитие резистентности, быть устойчивыми при хранении, быть совместимыми с кормовыми ингредиентами, не изменять вкусовые качества корма [2, 3].

Действие различных кокцидиостатиков направлено на ингибирование процессов биосинтеза, замещение витаминов (тиамин, фолиевая кислота, витамин РР, рибофлавин, биотин, витамин К), замещение ферментов (цитохром) [2].

Способность кокцидий приобретать резистентность к химиопрепаратам становится всё более актуальной проблемой. Механизм развития устойчивости эймерий к кокцидиостатикам обуславливается следующими факторами:

образованием и выделением паразитами ферментов, разрушающих препарат; появлением мутагенных устойчивых форм; изменением характера метаболических процессов; размножением природно-резистентных штаммов и гибелью не-

резистентных форм на фоне селективного фактора, которым является кокцидиостатик [3].

Нужно отметить также, что сформированная резистентность к препарату генетически передаётся потомству и сохраняется у эймерий неопределённое время [2].

Начиная с 2000 г. исследователями практически не было разработано и на рынке не появилось ни одного нового противоккокцидиозного препарата [4].

При кокцидиозах чаще всего используют кокцидиостатики двух групп: химические (химкокцид, диклазурил и др.) и ионофорные антибиотики (одно- и двухвалентные). Механизм действия первых заключается в ингибировании биосинтеза тиамин (витамина В<sub>1</sub>) у паразитов. Химические кокцидиостатики по своему строению сходны с тиамином, необходимым для жизнедеятельности кокцидий, они быстро проникают в клетку паразита и блокируют активные центры связывания витамина, в результате углеводный обмен нарушается и паразит погибает. Антикокцидийное действие ионофоров обусловлено их способностью образовывать липофильные комплексы с ионами щелочных металлов и переносить их через клеточную стенку паразита, что приводит к нарушению осмотического баланса и гибели простейших [5].

В последние годы в СКЗНИВИ ведётся синтез и активный скрининг среди новых веществ различных классов органических соединений. Синтезы в ряду производных амидов жирных кислот позволили получить новые соединения, обладающие высокими антибактериальными свойствами. Мы предположили, что эти соединения могут обладать также протистоцидной активностью.

**Цель и задачи** — определить протистоцидную активность и токсичность новых веществ из ряда амидов жирных кислот, установить зависимость уровня протистоцидной активности от структурных особенностей новых веществ (наличие четвертичного атома азота, длина углеводородной цепи в формуле кислоты и структура аминного фрагмента).

**Материалы и методы.** Протистоцидную активность изучали по разработанной нами методике

на культурах: *Tetrachimena piriformis*, *Paramecia caudatum*, *Colpoda steinii* и др. на средах, описанных ранее [6–8]. Протистоцидную активность изучали методом серийных разведений. Наиболее удобным и доступным тест-объектом оказались колподы вида *C. steinii*. Работу выполняли в микропланшетах, например для постановки ИФА. В качестве среды для переживания простейших использовали смесь кипячёной водопроводной воды и стерильной дистиллированной воды в равных объёмах. Первоначальное разведение вещества готовили на дистиллированной воде. Серийные разведения новых соединений готовили следующим образом:

Раствор № 1 : 5 мг вещества + 50 мкл 70-процентного водного раствора ДМСО (диметилсульфоксид) + 5 мл дистиллированной при перемешивании стеклянной палочкой – учитываемая концентрация – 1000 мкг/мл.

Растворы № 2–12 – со второй по двенадцатую лунки автоматической восьмиканальной пипеткой вносят по 150 мкл воды (смесь кипячёной водопроводной и дистиллированной воды), затем во вторую лунку приливают 150 мкл раствора № 1 и после перемешивания переносят 150 мкл в третью лунку и так далее до конца ряда, из двенадцатой лунки после перемешивания удаляли 150 мкл. В первую лунку вносили 150 мкл раствора № 1.

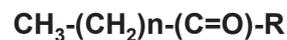
Во все лунки с подготовленными разведениями веществ вносили по 30 мкл взвеси простейших трёхсуточного возраста. Взвесь простейших готовили таким образом, чтобы в каждом поле зрения при микроскопии на малом увеличении насчитывалось 10–15 активных особей. После внесения простейших планшет накрывали крышкой и оставляли при комнатной температуре (20–22°C) на 18–20 часов. Для учёта результатов автоматической микропипеткой с разовым наконечником набирали после перемешивания из последней лунки ряда 30 мкл содержимого, наносили этот объём на чистое предметное стекло и просматривали под микроскопом на малом увеличении (10×15). Отмечали наличие или отсутствие живых простейших. Просмотр производили справа налево. Первая лунка, где нет ни одной живой особи, считается содержащей минимальную протистоцидную концентрацию изучаемого вещества. Ставили контроли: контроль среды – вода для переживания + простейшие (5 лунок); контроль растворителя (используется при изучении активности водонерастворимых веществ) – 50 мкл ДМСО 70% + 5 мл дистиллированной воды и далее серийные разведения как для вещества, затем в лунки вносили по 30 мкл взвеси простейших. Таким образом, в одном планшете (8×12 лунок) проводили испытания 8 веществ.

Острую токсичность новых соединений изучали на лабораторных крысах по следующей методике [8]: в предварительном опыте на малом количестве лабораторных животных (по три крысы в группе) устанавливали максимально переносимую

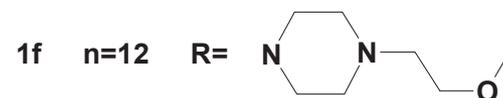
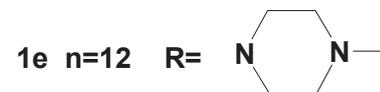
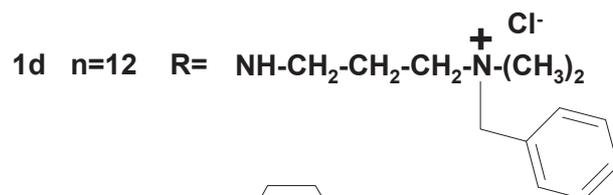
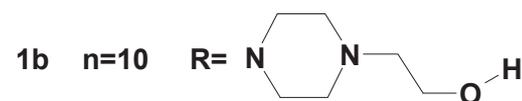
дозу (МПД) и дозу, вызывающую 100-процентную гибель животных (ЛД<sub>100</sub>). Затем в основном опыте каждую из 5–7 доз препарата, лежащую в интервале между МПД и ЛД<sub>100</sub>, вводили пяти лабораторным крысам. Расчёт ЛД<sub>50</sub> производили по методу Кербера. В предварительном и основном опытах соединения вводили внутривентрикулярно с помощью зонда в виде водных растворов или суспензии в изотоническом растворе хлорида натрия (0,85-процентный р-р по NaCl).

Сравнивали действие известных противоконцидийных препаратов байкоккс, ампролиум, и фуразолидон, часто рекомендуемых для лечения животных, больных кокцидиозом (эймериозом).

**Результаты исследований.** Синтезированы соединения ряда амидов жирных кислот общей формулы 1 (a-f):



1 (a-f)



где n – число метиленовых звеньев.

Изучена активность 150 новых соединений на простейших вида *Colpoda steinii*. Минимальная протистоцидная концентрация и установленная величина ЛД<sub>50</sub> некоторых изученных нами соединений представлены в таблице.

Протистоцидная активность новых соединений (от 0,48 до 7,8 мкг/мл) превосходит активность известных препаратов (62,5–250 мкг/мл). Обращает на себя внимание тот факт, что соеди-

Минимальные протистоцидные концентрации новых веществ и сравниваемых препаратов

Соединения	Уровень протистоцидной активности в отношении <i>Colpoda steinii</i> , мкг/мл	Токсичность, ЛД <sub>50</sub>
1a	0,9	>2 г/кг
1b	3,9	>2 г/кг
1c	0,48	>2 г/кг
1d	3,125	>2 г/кг
1e	1,9	>2 г/кг
1f	7,8	>2 г/кг
Байкокс	62,5	–
Ампролиум	62,5	–
Фуразолидон	>250	–

нения 1a (производное лауриновой кислоты), 1c и 1e (производные миристиновой кислоты), содержащие некваaternизованную аминогруппу, значительно более активны, чем соединение 1d (производное лауриновой кислоты). Возможно, это связано с лучшей проницаемостью в клетку простейших из-за более высокой липофильности этих структур. Все изученные соединения малотоксичны для лабораторных крыс.

**Выводы.**

1. Высокая протистоцидная активность веществ из ряда амидов жирных кислот в отношении *Colpoda*

*steinii* даёт основание для дальнейшего их изучения в качестве антипротозойных средств.

2. Учитывая высокую протистоцидную активность и низкую токсичность, данные соединения могут быть отобраны для дальнейшего изучения в качестве активно действующих веществ в составе противококцидиозных препаратов.

**Литература**

1. Никитин И.Н., Анчиков В.В. Эффективность мероприятий при кокцидиозе // Ветеринария. 1984. № 9. С. 42–44.
2. Елисеева Е.Н. Эффективные препараты для профилактики и лечения кокцидиоза птицы. 2008. URL: <http://geum.ru/nexth/refit-60761.html> / (дата обращения 3.09.14 г.).
3. Хованских А.Е., Илюшечкин Ю.П., Кириллов А.И. Кокцидиоз сельскохозяйственной птицы. Л.: Агропромиздат. Ленингр. отд., 1990. 152 с.
4. Гинберг Э. Вакцина – параккок: крупное достижение в области контроля кокцидиоза птиц // Информационный бюллетень Schering-Plough Animal Health Poultry focus, 2008. Вып. 4. URL: [www.intervet.ru/](http://www.intervet.ru/) (дата обращения 3.09.2014 г.).
5. Беспалова Н.С. Современные противопаразитарные средства в ветеринарии. М.: КолосС, 2006. 192 с.
6. Зубенко А.А., Фетисов Л.Н., Бодряков А.Н. и др. Определение протистоцидной активности новых соединений в ряду азотсодержащих гетероциклов // Научное обеспечение инновационного развития отечественного животноводства: матер. Всеросс. науч.-практич. конф. ГНУ СКЗНИВИ. Новочеркасск, 2011. С. 162–165.
7. Першин Г.Н. Методы экспериментальной химиотерапии. М.: Медицина, 1971. С. 24–26, 528–530.
8. Фетисов Л.Н., Зубенко А.А., Бодрякова М.А. и др. Изыскание новых протистоцидных средств // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии: матер. междунар. симпозиума «Проблемы общей и частной паразитологии». СПб., 2012. С. 70–73.