

N-ариламіди триазинобензотіазинових кислот — інгібітори синтезу РНК, антимікробні та антивірусні агенти

О.В. Васильченко^{1,2}, Д.Б. Старосила², О.А. Тарасов³, М.О. Платонов¹,
О.М. Дерябин³, С.Л. Рибалко², Л.Г. Пальчиковська^{1*}

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

² ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського АМН України»
вул. Амосова, 5, Київ, 03038, Україна

³ Інститут ветеринарної медицини УААН
вул. Донецька, 30, Київ, 03151, Україна

Резюме. Уперше досліджено біологічну активність нових N-ариламідів 8-метилтриазинобензотіазин-6-(ТБТ-6)- і триазинобензотіазин-8-(ТБТ-8)-карбонових кислот. Сполуки **4, 5, 6, 12** і **13** виявилися ефективними інгібіторами синтезу РНК у межах IC_{50} 4,9–15,9 μ M. Сполуки **1, 4, 6, 9, 10, 12** показали значну антимікробну активність проти грампозитивних та грамнегативних бактерій у межах MIK 0,97–1,56 μ M, причому базові кислоти **1** і **9** продемонстрували множинний характер активності до обох видів бактерій. N-ариламіди **4, 5, 6, 12, 13** мають виразну активність проти РНК вірусу бичачої діареї в межах EC_{50} = 1,54–30 μ M. Сполука **5** виявилася найефективнішою з показниками EC_{50} = 1,54 μ M і SI > 80. Сполуки **4, 6, 12, 13** продемонстрували достатньо ефективну антимікробну й антивірусну дію. За результатами досліджень можна передбачити, що принаймні для N-ариламідів ТБТ-кислот **4, 5, 6, 12** і **13** їх вірогідними мішенями в бактеріях та вірусах є РНК-синтезувальні комплекси.

Ключові слова: N-ариламіди ТБТ-6- і ТБТ-8-карбонових кислот, інгібітори синтезу РНК, антимікробні та антивірусні агенти.

Вступ. Поліциклічні хромофори є перспективними базовими структурами для дизайну інгібіторів білково-нуклеїнових реплікативних, транскрипційних, трансляційних комплексів — найважливіших мішеней для антивірусної, антимікробної та протипухлинної терапії. Завдяки планарній гетероароматичній структурі вони здатні зв'язуватися як з ензимами, так і з нуклеїновими кислотами. Так, антибіотики актиноміцинового ряду, для яких спільним є феноксазиновий хромофор, запобігають реплікації і транскрипції через взаємо-

дію з ДНК [1, 2], похідні тетрацикліну блокують функціонування трансляційних комплексів, зв'язуючись із рибосомами [3]. Перелік поліциклічних гетероароматичних біологічно активних сполук продовжують похідні фенотіазину [4, 5], феназину [6], акридону [7] та ін. У роботах [8–10] представлено синтез, структурні й біологічні дослідження похідних біоізоостеру алоксазину — триазинобензотіазину (ТБТ), серед яких виявлено низку сполук із виразною антивірусною дією.

Нещодавно синтезовано нові серії похідних ТБТ, а саме: N-ариламідів 8-метил-ТБТ-6- та ТБТ-8-карбонових кислот [11]. Методом молекулярного докінгу з'ясовано вірогідний спосіб взаємодії синтезованих сполук із каталітичною кишенею транскрипційного комплексу РНК-

* Corresponding author.

Tel.: +38044-5265598

E-mail address: L.Palchykovska@imbg.org.ua

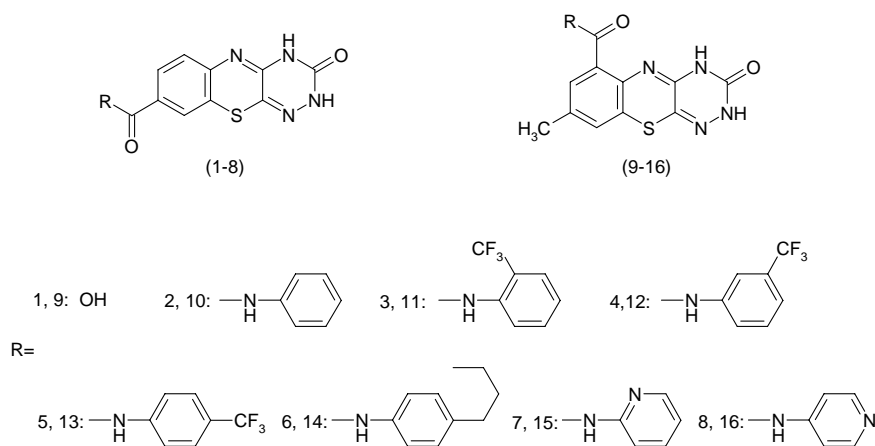


Рис 1. Структури досліджуваних похідних ТБТ.

полімерази бактеріофага Т7 (РНКП Т7). Отримані *in silico* дані дають змогу прогнозувати їх здатність інгібувати функціонування РНКП Т7, що узгоджується з попередніми експериментальними результатами. Тестування в модельній транскрипційній системі РНКП Т7 демонструє достовірне пригнічення синтезу РНК *in vitro* низкою досліджуваних сполук за концентрації 25 мкг/мл (~80 мкМ). З огляду на ці обнадійливі дані, мета нашої роботи полягала у виявленні серед N-ариламідів ТБТ-кислот ефективних інгібіторів синтезу РНК і сполук з антибактеріальною та антивірусною дією.

Матеріали і методи.

Препарати. Синтез досліджуваних феніламідів ТБТ-кислот описано в роботі [11]. Для проведення біологічних досліджень сполуки розчиняли в 100% ДМСО до концентрації стоківих розчинів 1 мг/мл.

З огляду на те, що ДМСО має виразні антимікробні властивості [12], його концентрація у пробах для тестування не перевищувала 2,5 % і не викликала видимого впливу на ріст досліджених бактерій та вірусу в порівнянні з контролем.

Реакція транскрипції *in vitro*. Перевірку впливу досліджуваних речовин на синтез РНК *in vitro* здійснювали в системі транскрипції Т7 РНКП [13], застосовуючи комерційні реагенти фірми «Fermentas™» (Литва). Транскрипцію проводили у 20 мкл реакційної суміші, яка містила 0,5 мкг модифікованої, лінеаризованої плазмідної ДНК рTZ19R, 2 мМ кожного з рибонуклеозидтрифосфатів, 20 од. акт. інгібітора РНК-аз RiboLock™ у присутності 40 мМ трис-НСl, рН 7,9; 6 мМ MgCl₂, 2 мМ спермидину,

10 мМ NaCl, 10 мМ ДТТ і 12 од. акт. Т7 РНК полімерази. Реакційну суміш витримували впродовж 45 хв за температури 37 °С та зупиняли охолодженням до -20 °С. Детекцію продуктів реакції проводили за допомогою гель-електрофорезу в 1%-й агарозі з додаванням 0,3 мкг/мл бромистого етидію. Візуалізацію РНК-транскриптів здійснювали на транслюмінаторі в УФ-світлі. Інтенсивність смуг РНК виміряли денситометрично за допомогою програми «Scion Image™» і визначили IC₅₀ — концентрацію інгібітора, необхідну для пригнічення ензиматичної активності на 50 %.

Мікробіологічні дослідження. У роботі використано штами мікроорганізмів із колекції Інституту ветеринарної медицини УААН (м. Київ) *Erysipelothrix rhusiopathiae* VR-2 var. IVM, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* sp, *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella holerae-suis* і *Pasteurella Multocida*.

Тест-культури бактерій отримували шляхом висіву на тверде поживне середовище та подальшого інкубування протягом 24 год. Колонії мікроорганізмів після мікроскопічного контролю суспендували у фізіологічному розчині до рівня каламутності, що відповідає 0,5 за стандартом McFarland.

Антимікробну активність N-феніламідів ТБТ-кислот вивчали методом двократних серійних розведень у рідкому поживному середовищі Мюллер-Хінтона і бульйоні ВНІ (Bio-Merieux™, Франція), які готували відповідно до рекомендацій виробника на 96-лункових планшетах [14-16].

У підготовлені стерильні планшети (Sars-

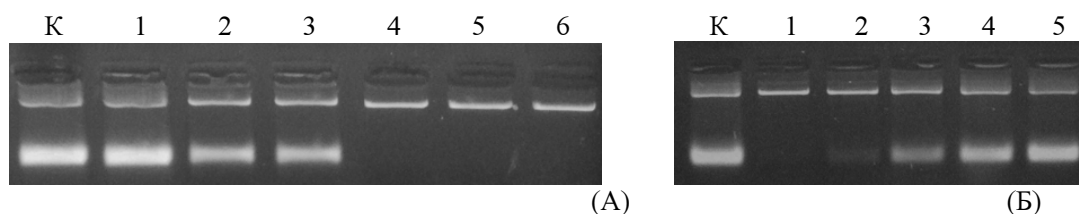


Рис 2. Вплив *N*-ариламідів ТБТ на синтез РНК *in vitro* (транскрипція РНКП Т7). Типова електрофореграма РНК-транскриптів із трьох незалежних експериментів: верхня смужка — ДНК-матриця, нижня — РНК-продукт. Повне інгібування визначається відсутністю РНК-продукту в агарозному гелі. К — позитивний контроль у присутності ДМСО; (А) доріжки 1-6 — РНК-продукти, одержані за дії сполук 1-6 (концентрація речовин 25 мкг/мл). (Б) Вплив *N*-ариламіду 5 на синтез РНК *in vitro* в залежності від концентрації: К — позитивний контроль, 1-5 — РНК-продукти, одержані за концентрацій 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78 мкг/мл відповідно.

tedt™, ФРН) асептично вносили 140 мкл середовища, додавали 50 мкл суспензії тест-мікроорганізму в кінцевій концентрації 1×10^7 КУО у 1 см^3 і 10 мкл тестових речовин у відповідних концентраціях та інкубували 18-24 год за температури $36,7 \pm 0,3$ °С. Як контроль використовували лунки з відповідним рідким середовищем і культурою мікроорганізму, але без тест-агента. В окремі лунки замість розчину тест-речовин додавали ДМСО для визначення його токсичності. Для кожної концентрації окремого зразка й контролю використовували по дві лунки. Результати враховували візуально за наявністю видимого росту бактеріальної культури.

Мінімальну інгібувальну концентрацію (МІК) визначали як найменшу концентрацію антимікробного агента, що повністю гальмувала видимий ріст тест-культури мікроорганізму.

Тест на цитотоксичність. Цитотоксич-

ність (CC_{50}) досліджували на моношаровій лінії перещеплюваної культури клітин МДВК (культура клітин нирки теляти). Культуру клітин вирощували на поживному середовищі RPMI-1640 (Sigma-Aldrich™, США) з 10% інактивованої ембріональної сироватки (Fetal Bovin Serum, Heat Inactivated, Sigma-Aldrich™, США) з антибіотиками пеніциліном і стрептоміцином (по 100 МО/мл) або каноміцином (50 МО/мл) на 96-лункових планшетах (Nunc™, Данія) в атмосфері з 5% CO_2 . Сформований через 24 години моношар клітин у лунках промивали та вносили в них підтримуюче середовище без сироватки, яке містило відповідну концентрацію досліджуваної сполуки. До контрольних лунок додавали підтримуюче середовище з розчинником (ДМСО). Облік результатів виконували протягом 120 год за допомогою мікроскопа (Leica DMIL™, ФРН), спостерігаючи за

Таблиця 1

Результати антимікробного (МІК μM) і ензиматичного (IC_{50} μM) скринінгу ТБТ-кислот та їх ариламідів

Сполуки	Erysipelothrix +rhusiopathiae	E.coli –	Salmonella – ±holera suis	Klebsiella spp –	Pasteurella Multocida-	St. + aureus	РНКПТ7 IC_{50} μM
1	1,56 μM			15,6 μM			>95
2	1,22 μM				1,22 мМ		~74
3							~65
4	1,0 μM		1,0 мМ	1,0 мМ	1,0 мМ		9,9±1
5	100 μM	10,0 μM		100 μM			4,9±0,5
6	1,0 μM					1,0 мМ	15,3±2
7							~74
8							15,9±2
9	1,48 мМ	14,8 μM	14,8 μM	14,8 μM	1,48 μM	148 μM	>91
10	1,17 μM			1,17 мМ			>71
11							~60
12	0,97 μM			97,0 μM	970 μM		8,4±1
13	9,7 μM			9,7 μM	970 μM		6,0±1
14							~61
15							>100
16	114 μM	14,0 μM	1,4 мМ	1,4 мМ	1,4 мМ	1,4 мМ	~71

Таблиця 2
Антивірусна й ензиматична активність ТБТ
карбонових кислот та їхніх ариламідів

№	Т7 РНКП IC ₅₀ (µM)	ВБВД (культура клітин МДВК)		SI
		CC ₅₀ (µM)	EC ₅₀ (µM)	
3	~65	>123,5	-	-
4	9,9±1	123,5±15	12,3±2	10
5	4,9±0,5	>123,5	1,5±0,3	>80
6	15,3±2	>127	12,7±2	>10
11	~60	>119	-	-
12	8,4±1	>119	29,8±3	>4
13	6,0±1	>119	29,8±3	>4
14	>61	12,3		-

появою або відсутністю дегенерації моношару культури клітин МДВК чи зміною їх морфології. Цитотоксичною концентрацією CC₅₀ вважалася така концентрація сполуки, яка зменшувала кількість живих клітин на 50 %.

Антивірусна активність препаратів. Антивірусну активність препаратів *in vitro* вивчали проти вірусу бичачої вірусної діареї (ВБВД). Для визначення ефективної інгібувальної концентрації EC₅₀ (найменша концентрація препарату, яка у 50 % інфікованих клітин знижувала інфекційний титр вірусу на 1,75-2,0 lgID₅₀) тест вірусу в дозі 100 ТЦД₅₀/0,1 мл вносили в культуру клітин МДВК та інкубували протягом 1 год за температури 37 °С. Після адсорбції вірусу на клітинах через 1 год його видаляли, клітини відмивали поживним середовищем, після чого в підтримуюче середовище RPMS-1640+2 % фетальної сироватки (Sigma-Aldrich™, США) вносили препарати в різних концентраціях. Репродукцію вірусу визначали за спеціальною цитопатогенною дією та інфекційним титром для кожної концентрації препарату.

Результати й обговорення. У нашій попередній роботі [11] докладно описано одержання двох серій нових N-ариламідів 8-метил-ТБТ-6- і ТБТ-8-карбонових кислот. Загалом синтезовано 16 сполук, які підлягали біологічному тестуванню. Арильні фрагменти обох серій сполук представлено ароматичними системами з різними екзоциклічними групами в певних положеннях кільця (рис. 1). Результати ензиматичного, антибактерійного й антивірусного скринінгу синтезованих сполук представлено в табл. 1 та 2.

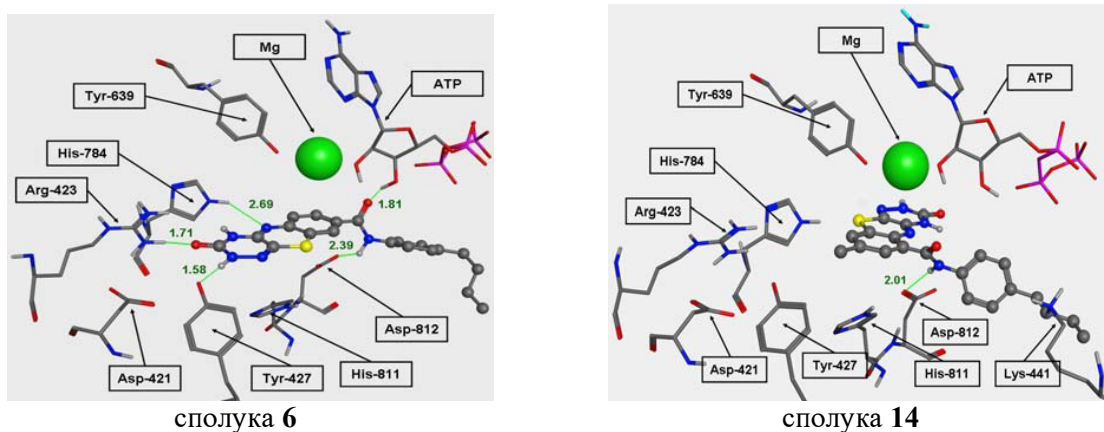
Транскрипційний комплекс РНКП Т7 використовується нами давно як модельна скринінгова система для пошуку інгібіторів синтезу РНК. Такий підхід має вагомні підстави, а саме наявність спільних консервативних мотивів, подібність просторових структур, однаковість типів каталітичних реакцій, особливо ідентичність хімізму й структурної організації синтезу фосфодиефірного зв'язку для всіх ДНК- і РНК-залежних ДНК- та РНК-полімераз за відсутності високого ступеня їхньої гомології [17]. До того ж ДНК- і РНК-синтезувальні комплекси є одними з головних мішеней для протимікробної та противірусної терапії.

Первинне тестування проводили за концентрації синтезованих сполук 25 мкг/мл (70-80 мкМ залежно від структури). Ариламідів 4-6 повністю блокують функціонування транскрипційної системи, натомість РНКП Т7 виявилася нечутливою до сполук 1, 2 і 3 (рис. 2А).

Для детальнішого дослідження інгібіторної дії активних сполук застосовували метод подвійних розведень. Як видно з даних табл. 1, шість сполук ефективно пригнічують синтез РНК у межах концентрацій IC₅₀ 4,9-15,9 µM. Найефективнішим виявився п-CF₃-феніламід ТБТ-8-карбонової кислоти (5) рис. 2 Б, IC₅₀=4,9 µM.

Присутність трифторметильних замісників у мета- й пара-положеннях ариламідного фрагмента відповідних похідних обох серій (сполуки 4, 5 і 12, 13) підвищує ефективність пригнічення синтезу РНК у модельному транскрипційному комплексі РНКП Т7 в порівнянні з ТБТ-кислотами та їх незаміщеними ариламідами. Як і прогнозувалося докінгом, бутильна похідна ТБТ-8 (сполука 6, IC₅₀=15,3 µM) та пара-CF₃-ариламіди (сполука 5, IC₅₀=4,9 µM, сполука 13, IC₅₀=6,0 µM) виявилися значно ефективнішими за аналогічну похідну 8-метил-ТБТ-6-карбонової кислоти (сполука 14, IC₅₀~60 µM) [11]. Серед піридиламідів тільки сполука 8 (N4-піридиламід ТБТ-8-кислоти) продемонструвала достатньо високу інгібувальну активність із значенням IC₅₀=15,9 µM.

Антибактеріальний скринінг ариламідів ТБТ-кислот показав, що найчутливішою виявилася грампозитивна бактерія *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Шість досліджуваних тест-агентів 1, 2, 4, 6, 10, 12 повністю пригнічували її ріст у межах МІК 0,97-1,56 µM. Натомість



сполука 6

сполука 14

Рис. 2. Розміщення ТБТ-8-пара-бутил-феніламіду (6) і ТБТ-6- пара-бутил-феніламіду (14) у моделі активного сайту РНКП T7.

друга грамполозитивна бактерія *St. aureus* була практично стійкою до цього класу сполук.

Щодо грамнегативних бактерій досліджували ариламідні продемонстрували вибірково активність. Сполуки 5, 8, 9 повністю блокують ріст бактерії *E.coli* за МІК у межах 10–14,8 μM , а сполуки 1, 9, 13 у тому ж діапазоні концентрацій інгібують ріст бактерії *Klebsiella spp.*

Порівняння значень МІК та IC_{50} , які знаходяться у близьких межах для сполук 4, 5, 6 та 12 і 13, дає змогу припустити, що механізм їх антибактерійної дії полягає в пригніченні синтезу нуклеїнових кислот.

Варто зазначити, що базові ТБТ-кислоти проявляють множинну антимікробну активність — ТБТ-8-кислота (1) ефективно пригнічує грамполозитивну бактерію *Erysipelothrix rhusiopathiae* і грамнегативну — *Klebsiella spp.* (МІК=1,56 μM), а 8-метил-ТБТ-6-кислота (9) — усі чотири грамнегативні бактерії — *E.coli*, *Salmonella choleraesuis* і *Klebsiella spp.* за МІК 14,8 μM та *Pasteurella Multocida* за МІК 1,48 μM . Напевно, кислота 1 впливає на клітинний процес, спільний для грамполозитивних та грамнегативних бактерій, тоді як кислота 9 має виразну специфічність до грамнегативних бактерій. Можна припустити, що клітинними мішенями для цих сполук не є РНК-синтезувальна система через їх слабку активність у транскрипційному комплексі РНКП T7 (IC_{50} >95 і >91 μM відповідно).

РНК-вмісний вірус бичачої вірусної діареї (ВБВД) є представником роду *Pestivirus* із родини *Flaviviridae*. ВБВД викликає низку важких клінічних проблем, включаючи ранню

ембріональну загибель, дисфункцію імунної системи, що загалом призводить до значного рівня смертності [18, 19] у скотарстві всього світу. Попри це, нині не існує офіційних препаратів для контролю ВБВД у лабораторіях і на фермах, хоча в усьому світі інтенсивно розробляють інгібітори цього вірусу [20–24]. Серед селективних анти-ВБВД агентів сполука VP32947 (3-[(2-дипропіламіно)етил]тіо]-5H-1,2,4-триазино[5,6-*b*]індол) — інгібітор РНК-залежної РНК-полімерази ВБВД [20] — має структуру, яка дещо подібна до похідних ТБТ, що теж пригнічують синтез РНК у модельній системі транскрипції РНКП T7 [9].

Вірус гепатиту С (ВГС) належить до роду *Hepaciviridae* тієї ж родини *Flaviviridae*, що і ВБВД, та вважається однією з найнебезпечніших хвороб людства [25]. Складність розробки лікарських препаратів полягає у відсутності адекватних клітинних і тваринних моделей для селекції інгібіторів ВГС [26, 27]. Через подібність геномної організації, реплікативної стратегії та хімізму функціонування РНК-залежної РНК-полімерази пестивіруси є близькими «родичами» ВГС, тому ВБВД був адаптований як сурогатна модель ВГС для оцінки антивірусних агентів [28]. З огляду на це цілком вірогідно, що виявлені інгібітори ВБВД можуть бути й антигепатитними агентами.

Для оцінки антивірусних властивостей і з'ясування взаємозв'язку між функціональною активністю та структурою феніламідів до тестування залучено орто-, мета-, пара- CF_3 -феніламіди і пара-бутил-феніламіди обох кислот. Для оцінки ефективності й безпечності

тест-агентів використовують поняття хіміо-терапевтичного індексу, або індексу селективності ($XTI=SI$), який розраховується як відношення CC_{50} до EC_{50} . Чим вище значення SI , тим безпечнішою та ефективнішою є досліджувана речовина. Результати досліджень представлено в табл. 2.

Зіставлення результатів впливу вибраних *N*-ариламідів на синтез РНК у модельній системі транскрипції й антивірусного скринінгу демонструє істотну кореляцію між цими даними. Обидва орто- CF_3 -феніламіди **3** і **11** мають слабку здатність інгібувати синтез РНК та практично не впливають на репродукцію ВБВД, вірогідно, через просторові ускладнення, які створює трифлуорометильна група в орто-положенні.

Найефективнішим інгібітором як синтезу РНК, так і репродукції ВБВД виявився *N*-ариламід ТБТ-8-карбонової кислоти з трифлуорометильною групою в пара-положенні (сполука **5**, $IC_{50}=4,9$ μM , $EC_{50}=1,5$ μM). *N*-ариламіди 8-метил-ТБТ-6-карбонової кислоти з трифлуорометильною групою в мета- й пара-положеннях (**12** і **13**) продемонстрували більш ніж удвічі меншу противірусну активність у порівнянні з аналогічними похідними ТБТ-8-карбонової кислоти.

Для пара-бутил-феніламіду **14** справдився прогноз, зроблений у роботі [11] на основі до-

кінгу. Топологія аміду **14** (рис. 2), зумовлена подовженим бутильним «хвостом», спричиняє слабе зв'язування його молекули з активним сайтом транскрипційного комплексу Т7РНКП і не дає належних підстав очікувати ефективного блокування синтезу РНК цією сполукою, що підтвердилося в експерименті — $IC_{50}>61$ μM . До того ж пара-бутил-феніламід **14** не виявив і антивірусної активності.

Загалом, похідні ТБТ-8-карбонової кислоти показали більш виразну антивірусну дію, дещо меншу токсичність та більшу ефективність, ніж аналогічні похідні 8-метил-ТБТ-6-кислоти.

Сполуки **4**, **6** і **12** продемонстрували достатньо високу антимікробну активність по відношенню до грампозитивної бактерії *Erysipelothrix rhusiopathiae* в межах МІК 1 μM , а амід **13** за МІК 9,7 μM повністю пригнічував ріст згадуваної бактерії та грамнегативної — *Klebsiella spp.* Варто підкреслити, що більшість ариламідів з антибактеріальними й антивірусними властивостями достовірно блокують синтез РНК у модельній системі транскрипції Т7 РНКП. Таким чином, вірогідними клітинними мішенями для більшості активних *N*-ариламідів ТБТ-кислот у бактерій і вірусів є їх РНК-синтезувальні комплекси.

Надійшла в редакцію 12.05.2013 р.

N-arilamides of triazinobenzotiazine-carboxylic acids — inhibitors of RNA synthesis as antimicrobial and antiviral agents

O.V. Vasylychenko^{1,2}, D.B. Starosyla², O.A. Tarasov³, M.O. Platonov¹, S.L. Rybalko², O.M. Deriabin³, L.G. Palchykovska¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Zabolotnoho Str., Kyiv, 03680, Ukraine

² Gromashevsky L.V. Institute of Epidemiology and Infection Diseases, AMS of Ukraine
5, Amosova Str., Kyiv, 03038, Ukraine

³ Institute of Veterinary Medicine, NAAS of Ukraine
30, Donetska Str., Kyiv, 03151, Ukraine

Summary. Biological activity of the newly synthesized 6-methyl-triazinobenzotiazine-6-(ТБТ-6-) and triazinobenzotiazine-8-(ТБТ-8-)carboxylic acids *N*-arilamides was investigated for the first time. Compounds **4**, **5**, **6**, **12** and **13** appeared to be an effective inhibitors of RNA synthesis and had IC_{50} value in the range from 4,9 to 15,9 μM . Row of compounds, namely **1**, **4**, **6**, **9**, **10**, **12** showed significant antimicrobial activities against both Gram-positive and Gram-negative bacteria in the MIC value interval from 0,97 to 1,56 μM . The base acids **1** and **9** showed plural character of activity against both types of bacteria. *N*-Arilamides **4**, **5**, **6**, **12** and **13** demonstrated pronounced activity against Bovine viral diarrhea with the value of EC_{50} from 1,54 to 30 μM . Compound **5** proved to be the most effective with EC_{50} equals 1,54 μM and $SI>80$. It is important that substances **4**, **6**, **12**, **13** revealed rather effective antimicrobial and antiviral activity. According to the result obtained, assumption can be made that, at least in the case of *N*-arilamides of TBT acids **4**, **5**, **6**, **12** and **13** their probable targets in bacteria and viruses are RNA synthesizing complexes.

Keywords: *N*-arylamides of TBT-6 and TBT-8-carboxylic acids, inhibitors of RNA synthesis, antimicrobial and antiviral agents.

Перелік літератури

1. Koba M., Konopa J. Actinomycin D and its mechanisms of action // *Postepy Hig Med Dosw.* (online). — 2005. — Vol. 59. — P. 290-298.
2. Kang H.J., Park H.J. Novel molecular mechanism for actinomycin D activity as an oncogenic promoter G-quadruplex binder // *Biochemistry.* — 2009. — Vol. 48, No. 31. — P. 7392-8.
3. Chopra I., Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance // *Microbiology and molecular biology reviews.* — 2001. — Vol. 65, No. 2. — P. 232-260.
4. Sujata G. Dastidar, Jette E. Kristiansen, Joseph Molnar and Leonard Amaral. Role of phenothiazines and structurally similar compounds of plant origin in the fight against infections by drug resistant bacteria // *Antibiotics.* — 2013. — Vol. 2, No. 1. — P. 58-72.
5. Warman A.J., Rito T.S., Fisher N.E., Moss D.M., Berry N.G., O'Neill P.M., Ward S.A., Biagini G.A. Antitubercular pharmacodynamics of phenothiazines // *J Antimicrob Chemother.* — 2013. — Vol. 68, No. 4. — P. 869-80.
6. Laursen J.B. and Nielsen J. Phenazine. Natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity // *Chem. Rev.* — 2004. — Vol. 104, No. 3. — P. 1663-1685.
7. Goodell J.R., Madhok A.A., Hiasa H., Ferguson D.M. Synthesis and evaluation of acridine- and acridone-based anti-herpes agents with topoisomerase activity // *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* — 2006. — Vol. 14, No. 16. — P. 5467-5480.
8. Алексеева І.В., Пальчиковська Л.Г., Рибалко С.Л., Усенко Л.С., Кобко А.С., Попова Л.А., Дядюн С.Т., Швед А.Д. Нуклеозиди з трициклічним агліконом. Рибонуклеозиди конденсованого 1,2,4-триазину — синтез і протигерпетична активність // *Біополімери і клітина.* — 2006. — Т. 22, № 6. — С. 468-474.
9. Пальчиковська Л.Г., Алексеева І.В., Платонов М.О., Костенко О.М., Усенко Л.С., Негруцька В.В., Швед А.Д. Нові сполуки конденсованого 1,2,4-триазину: молекулярне моделювання, синтез та біотестування // *Біополімери і клітина.* — 2009. — 25, № 6. — С. 491-598.
10. Golovan A.V., Nesterova N.V., Zagorodnya S.D., Alexeeva I.V., Palchykovska L.I., Usenko L.S., Baranova G.V. Inhibitors of Epstein-Barr virus reproduction — ribonucleosides of 3-substituted 1,2,4-triazino[5,6-B][1,4]benzotiazines // *Mikrobiol Z.* — 2010. — Vol. 72, No. 2. — P. 36-42.
11. Васильченко О.В., Платонов М.О., Говорун Д.М., Пальчиковська Л.Г. Інгібітори транскрипції на основі *N*-ариламідів 6-етилтриазинобензотіазин-6- та триазинобензотіазин-8-карбонових кислот: синтез та докінг // *Ukrainica Bioorganica Acta.* — 2012. — Т. 10, № 2. — P. 30-38.
12. Basch H., Gadebusch H.H. *In vitro* antimicrobial activity of dimethylsulfoxide // *Appl. Microbiol.* — 1968. — 16, No. 12. — P. 1953-1954.
13. Stankiewicz-Drogon A., Palchykovska L.G., Kostina V.G., Alexeeva I.V., Shved A.D., Boguszewska-Chachulska A.M. New acridone-4-carboxylic acid derivatives as potential inhibitors of hepatitis C virus infection // *Bioorg. Med. Chem.* — 2008. — 16, No. 19. — P. 8846-8852.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically / Third ed. // Approved Standard NCCLS Document M7-A3. 1993. — 13, N25, NCCLS, Villanova, PA, December 1993.
15. Luber P., Bartelt E., Genschow E., Wagner J., Hahn H. Comparison of broth microdilution, E Test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* // *J. Clin. Microbiol.* — 2003. — 41, No. 3. — P. 1062-1068.
16. Jorgensen J.H., Turnidge J.D., Washington J.A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods // *Manual of clinical microbiology* / Eds P.R. Murray et. al., 9th ed. — Washington: Am. Soc. Microbiol. publ., 2007. — P. 1152-1172.
17. Delarue M., Poch O., Tordo N., Moras D., Argos P. An attempt to unify the structure of polymerases // *Protein Eng.* — 1990. — Vol. 3, No. 6. — P. 461.
18. Goens S.D. The evolution of bovine viral diarrhoea // *Can. Vet. J.* — 2002. — 43, No. 12. — P. 946-954.
19. Pellerin C., van den Hurk J., Lecomte J., Tijssen P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus stari associate with severe outbreaks and high mortalities // *Virology.* — 1994. — Vol. 203, No. 2. — P. 260-268.
20. Baginski S.G., Pevear D.C., Seipel M., Sun S.C.C., Benetatos C.A., Chunduru S.K., Rice C.M., Collett M.S. Mechanism of action of a pestivirus antiviral compound // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2000. — Vol. 97, No. 14. — P. 7981-7986.
21. Paeshuysse J., Leyssen P., Mabery E., Boddeker N., Vrancken R., Froeyen M., Ansari I.H., Dutartre H., Rozenski J., Gil L.H.V.G., Letellier C., Lanford R., Canard B., Koenen F., Kerkhofs P., Donis R.O., Herdewijn P., Watson J., De Clercq E., Puerstinger G., Neyts J. A novel, highly selective inhibitor of pestivirus replication that targets the viral RNA-dependent RNA Polymerase // *J. Virol.* 2006. — Vol. 80, No. 1. — P. 149-160.
22. Vrancken R., Paeshuysse J., Haegemana A., Puerstinger G., Froeyen M., Herdewijn P., Kerkhofs P., Neyts J., Koenen F. Imidazo[4,5-c]pyridines inhibit the *in vitro* replication of the classical swine fever virus and target the viral polymerase // *Antiviral Res.* — 2008. — Vol. 77, No. 2. — P. 114-119.
23. King R.W., Scarnati H.T., Priestley E.S., De Lucca I., Bansal A., Williams J.K. Selection of a thiazole urea-resistant variant of bovine viral diarrhoea virus that maps to the RNA-dependent RNA polymerase // *Antiviral Chem. Chemother.* — 2002. — Vol. 13, No. 5. — P. 315-323.
24. Sun J.-H., Lemm J.A., O'Boyle D.R. II, Racela J., Colonno R., Gao M. Specific inhibition of bovine viral diarrhoea virus replicase // *J. Virol.* — 2003. — Vol. 77, No. 12. — P. 6753-6760.
25. Kim W.R., Brown R.S. Jr., Terrault N.A., El-Serag H. Burden of liver disease in the United States: summary of a workshop // *Hepatology.* — 2002. — Vol. 36, No. 1. — P. 227-242.
26. Tan S.-L., Pause A., Shi Y., Sonenberg N. Hepatitis C therapeutics: current status and emerging strategies // *Nat. Rev. Drug Discov.* — 2002. — Vol. 1, No. 11. — P. 867-881.
27. Shimizu Y.K., Yoshikura H. Cell culture systems for the detection of HCV infection // *Methods Mol. Med.* — 1999. — 19. — P. 483-488.
28. Buckwold Victor E., Beer Brigitte E., Donis Ruben O. Bovine viral diarrhoea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents // *Antiviral Research.* — 2003. — Vol. 60, No. 1. — P. 1-15.