

Сравнение *in vitro* эффективности противовирусных препаратов в отношении герпесвируса кошек I типа

K. van der Meulen¹, B. Garr^{1,2}, S. Croubels² и H. Nauwynck¹

РЕФЕРАТ

ВВЕДЕНИЕ

Герпесвирус кошек I типа (FHV-1) – частая причина респираторных и глазных инфекций у кошек. Особенно подвержены инфицированию котята, не достигшие возраста вакцинации, но уже потерявшие материнский иммунитет. Вследствие этого возникает необходимость в эффективных противовирусных препаратах. В настоящем исследовании оценивалась активность шести противовирусных препаратов в отношении FHV-1: ацикловира, ганцикловира, цидофовира, фоскарнета, адефовира и 9-(2-фосфонилметоксиэтил)-2,6-диаминопурина (PMEDAP). В качестве субстрата использовалась культура клеток почки кошки Крэнделла-Риса (CRFK). Критериями эффективности служили снижение числа и размера бляшек.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наилучшую способность снижать количество бляшек продемонстрировали ганцикловир, PMEDAP и цидофовир. Значения IC_{50} (число) (концентрации вещества, необходимой для снижения числа бляшек на 50%) составили 3,2 мкг/мл (12,5 мкмоль), 4,8 мкг/мл (14,3 мкмоль) и 6 мкг/мл (21,5 мкмоль) соответственно. Адефовир и фоскарнет показали промежуточный результат с IC_{50} (число) 20 мкг/мл (73,2 мкмоль) и 27 мкг/мл (140,6 мкмоль) соответственно. Самым низкоэффективным препаратом оказался ацикловир: IC_{50} (число) 56 мкг/мл или 248,7 мкмоль. Все противовирусные препараты привели к существенному уменьшению размеров бляшек по сравнению с контрольными результатами. Эффективнее всего в плане уменьшения размеров бляшек, равно как и в снижении их числа, оказались ганцикловир, PMEDAP и цидофовир. Значения IC_{50} (размер) (концентрации вещества, необходимой для уменьшения размеров бляшек на 50%) составили 0,4 мкг/мл (1,7 мкмоль), 0,9 мкг/мл (2,7 мкмоль) и 0,2 мкг/мл (0,7 мкмоль) соответственно. Адефовир и фоскарнет показали умеренную эффективность с IC_{50} (размер) 4 мкг/мл (14,6 мкмоль) и 7 мкг/мл (36,4 мкмоль) соответственно. Наименее активным оказался ацикловир с IC_{50} (размер) 15 мкг/мл, или 66,6 мкмоль. Результаты показали, что значения IC_{50} (размер) были заметно меньше значений IC_{50} (число). Самыми эффективными препаратами оказались цидофовир и ганцикловир. Ни один препарат в противовирусных концентрациях не обладал токсичностью для клеток CRFK.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, измерение снижения числа бляшек и уменьшения их размеров является ценным и адекватным средством для оценки противовирусной активности препаратов. Оценивая по этим параметрам шесть выбранных препаратов, мы обнаружили, что ганцикловир, PMEDAP и цидофовир наиболее эффективно ингибируют репликацию FHV-1 в клетках CRFK. Следовательно, это наиболее подходящие кандидаты для лечения герпесвирусной инфекции у кошек.

ВВЕДЕНИЕ

Герпесвирус кошек I типа (FHV-1), или альфагерпесвирус, – один из самых распространенных вирусов у кошек [1–3]. Инфекция проявляется респираторными нарушениями и поражением глаз, в том числе кератитом, конъюнктивитом, секвестрацией роговицы, кератоконъюнктивитом и, в конечном итоге, потерей зрения [4, 5]. Вакцинация снижает тяжесть клинических симптомов, вызываемых инфекцией FHV-1 [6, 7]. Однако у котят, не достигших возраста вакцинации, но уже потерявших материнский иммунитет, заболевание может протекать тяжело. У котят, однажды поражённых вирусом, впоследствии может происходить его реактивация, приводящая к рецидиву заболевания и выделению вируса [8]. Эффективный противовирусный препарат помог бы контролировать течение заболевания в таких случаях.

Ранее проводились исследования эффективности нескольких противовирусных препаратов, подавляющих репликацию FHV-1, в которых оценивалось снижение количества бляшек. Особенно эффективным на основании показателей IC_{50} (концентрации, необходимой для снижения числа бляшек на 50%) выглядит (S)-9-(3-гидрокси-2-фосфонилметоксипропил)-аденин (HPMPA) из группы ациклических фосфонатов нуклеозидов (ANP) [9]. Также эффективно снижают число

¹ Лаборатория вирусологии

² Кафедра фармакологии, фармацевтики и токсикологии факультета ветеринарной медицины Гентского университета, Бельгия



• ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

герпесвирусных бляшек *in vitro* цидофовир [10] из группы ANP и аналоги нуклеозидов ганцикловир, пенцикловир [10], идоксуридин [10, 11], трифлюридин [9,11] и видарабин [11]. Ацикловир и фоскарнет, несмотря на доказанную эффективность против вируса герпеса человека, оказывают незначительный эффект на снижение количества бляшек, образованных FHV-1 [9–11].

Помимо снижения числа индуцированных герпесвирусом бляшек, противовирусное действие препарата, как указано выше, может проявляться в уменьшении их размеров [12, 13]. Этот параметр потенциально может отражать способность противовирусного агента ограничивать макроскопические повреждения *in vivo* [12]. Исследований, в которых оценивалась бы способность противовирусных средств ограничивать размеры бляшек, образованных FHV-1, до сих пор не проводилось.

Целью настоящего исследования было сравнение *in vitro* эффективности по отношению к FHV-1 шести противовирусных препаратов. Критериями, по которым оценивалась эффективность, были выбраны: способность ограничивать число бляшек (выраженная через подавляющую концентрацию, или IC (число) и способность уменьшить их размер (выраженная через IC (размер) на инфицированной FHV-1 культуре клеток почки кошки Крэндалла-Риса (CRFK).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Воздействие противовирусных средств на количество бляшек

На рис. 1 представлены графики отношения доза/эффект. Непрерывная линия отражает подавляющий эффект противовирусного препарата на количество бляшек. В табл. 1 даны значения IC_{50} (число). Способность снизить количество бляшек сильнее всего выражена у ганцикловира, PMEDAP и цидофовира. Адефовир и фоскарнет показали промежуточный результат, а ацикловир оказался наименее эффективным.

Значимой разницы в количестве бляшек, полученных при заражении

клеток FHV-1 в различных концентрациях среды RPMI-1640, и в количестве бляшек в контрольных образцах выявлено не было (минимально значимое различие (LSD), 95% доверительный интервал (ДИ).

Воздействие противовирусных препаратов на размер бляшек

Известно, что при выращивании FHV-1 *in vitro* размеры бляшек могут заметно отличаться между собой. И для того, чтобы удостовериться в том, что вариации размеров бляшек на разных образцах значимо превосходят вариации внутри одного образца, мы подвергли результаты экспериментов проверке с использованием критерия Фишера (95% ДИ). Другими словами, мы использовали критерий Фишера для выяснения, являются ли вариации размеров бляшек артефактом или они связаны с действием противовирусных препаратов. Было выявлено, что противовирусные препараты оказывают значимое воздействие на размер бляшек ($p \leq 0,001$). При применении метода апостериорных сравнений (post hoc LSD-теста) было зарегистрировано статистически значимое уменьшение размеров бляшек для всех препаратов и всех концентраций по сравнению с контролем (95% ДИ). Вариации размеров бляшек на зараженных клетках в средах RPMI различной концентрации значимо не отличались от таковых на контрольных клетках (критерий Фишера, 95% ДИ).

На рис. 1 представлены графики отношения доза/эффект. Пунктирная линия отражает подавляющий эффект противовирусного препарата на размеры бляшек. В табл. 1 даны значения IC_{50} (размер). Способность уменьшать размеры бляшек сильнее всего выражена у ганцикловира, PMEDAP и цидофовира, что соответствует способности их воздействия на количество бляшек. Адефовир и фоскарнет показали промежуточный результат, а ацикловир оказался наименее эффективным. Для всех препаратов IC_{50} (размер) была заметно ниже, чем IC_{50} (число) (рис. 1, табл. 1). Наиболее впечатляющий эффект показали

цидофовир и ганцикловир.

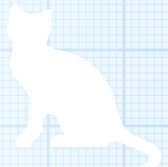
Влияние противовирусных препаратов на жизнеспособность клеток CRFK

Было обнаружено, что при выращивании клеток CRFK в присутствии среды RPMI в концентрации 2% или более относительная жизнеспособность клеток была значительно ниже, чем у контрольных клеток CRFK, выращенной в полной среде (LSD, 95% ДИ). С целью выявления цитотоксического эффекта тестируемых препаратов мы сравнили среднюю относительную жизнеспособность клеток CRFK, выращенных в присутствии противовирусных агентов, с этим же показателем у клеток CRFK, выращенных в соответствующей концентрации RPMI (критерий Стьюдента, 95% ДИ). Ацикловир не оказывал никакого значимого эффекта на жизнеспособность клеток CRFK вплоть до концентрации 500 мкг/мл (2220,2 мкмоль), ганцикловир – до концентрации 1000 мкг/мл (3918,5 мкмоль), цидофовир – до 160 мкг/мл (573,1 мкмоль), фоскарнет – до 320 мкг/мл (1666,7 мкмоль), адефовир – до 160 мкг/мл (585,7 мкмоль), а PMEDAP – до 160 мкг/мл (476,6 мкмоль). Эти концентрации с большим запасом превосходят и IC_{100} (число), и IC_{100} (размер) для всех препаратов (рис. 1). Эти данные свидетельствуют, что ни один из препаратов не был токсичен для клеток CRFK в противовирусных концентрациях.

ОБСУЖДЕНИЕ

За прошедшие годы был разработан впечатляющий арсенал противовирусных средств для лечения герпесвирусных инфекций человека [14]. Многие из них уже изучались на предмет эффективности против FHV-1 [15, 16]. В настоящем исследовании эффективность шести выбранных препаратов против FHV-1 сравнивалась на культуре клеток CRFK по двум разным параметрам: снижение количества бляшек и уменьшение их размера.

Наше исследование показало, что по способности снижать количество бляшек препараты распределяются следующим образом: ганцикло-



вир (относительная противовирусная эффективность 1) > PMEDAP (ОПЭ 1,1) > цидофовир (ОПЭ 1,7) > адефовир (ОПЭ 5,9) > фоскарнет (ОПЭ 11,2) > ацикловир (ОПЭ 19,9). Результаты для ганцикловира и цидофовира сходны с полученными в исследовании Maggs и Clarke [10], которые сравнивали способность четырех противовирусных препаратов снижать количество бляшек в клетках CRFK. Они установили, что IC_{50} (число) для ганцикловира составляла 5,2 мкмоль, а для цидофовира 11 мкмоль (ОПЭ 1 и 2,1 соответственно). Относительно активности фоскарнета и ацикловира наши результаты немного отличаются от полученных Maggs и Clarke [10]. Эти авторы обнаружили более низкую активность фоскарнета (IC_{50} (число) 232,9 мкмоль, ОПЭ 44,8) и более высокую активность ацикловира (IC_{50} (число) 57,9 мкмоль, ОПЭ 11,1). Другие авторы также получали различные результаты активности ацикловира против FHV-1 с разбросом уровня IC_{50} (число) от 44,4 до 109 мкмоль [9,11,17]. Возможное объяснение выявленных расхождений может быть связано со штаммом вируса. Действительно, в сравнительном исследовании Nasisse и пр. [11] IC_{50} (число) для ацикловира в клетках CRFK отличалось почти в два раза, в зависимости от использовавшегося штамма FHV-1. Может иметь значение также различие в методиках тестирования. При использовании одного и того же штамма FHV-1 727 на клетках CRFK Nasisse и пр. [11] полу-

чили заметно более высокую IC_{50} (число) для ацикловира, чем Maggs и Clarke [10] (109 мкмоль и 57,9 мкмоль соответственно).

Противовирусные агенты не только снижают количество герпесвирусных бляшек, но также способствуют уменьшению их размеров [12,13]. В нашем исследовании впервые изучалось это свойство противовирусных препаратов. Относительная способность уменьшать размеры бляшек распределяется таким образом: цидофовир (1) > ганцикловир (2,4) > PMEDAP (3,9) > адефовир (20,9) > фоскарнет (52) > ацикловир (95,1), что почти полностью соответствует распределению по воздействию на количество бляшек. Последнее демонстрирует, что измерение размеров бляшек служит полезным и адекватным средством для оценки противовирусной активности вещества.

Интересно, что концентрация, необходимая для уменьшения размеров бляшек, для всех шести препаратов была заметно ниже концентрации, снижающей количество бляшек (рис. 1, табл. 1). Наиболее замечательный эффект в этом смысле продемонстрировал цидофовир. Его IC_{50} (размер) в 30 раз ниже, чем IC_{50} (число). Для ганцикловира разница была восьмикратной, а для прочих препаратов подавляющие концентрации отличались в 4–5 раз. Значение этой находки для защиты кошек от заболеваний, вызванных FHV-1, еще предстоит оценить. Во всяком случае Mikloska и Cunningham [12] предположили, что

уменьшение размеров бляшек *in vitro* потенциально может отражать способность противовирусного препарата ограничивать объем поражения тканей вирусом *in vivo*.

Обнаружено, что способность адефовира подавлять репликацию FHV-1 значительно отличается от таковой PMEDAP. Такой результат оказался довольно неожиданным, учитывая, что оба препарата относятся к группе ациклических фосфонатов нуклеозидов, схожи по строению и имеют общий механизм действия, основанный на ингибировании вирусной ДНК-полимеразы аналогичными активными производными дифосфатов. Возможным объяснением могут быть различия в захвате препарата клетками CRFK. Однако Kramata и Downey [18] не обнаружили значительной разницы в захвате адефовира и PMEDAP Т-лимфоцитами человека линии CCRF-CEM. В качестве альтернативного объяснения высказывается предположение, что вирусная ДНК-полимераза может обладать большей чувствительностью по отношению к производным дифосфатов, содержащимся в структуре PMEDAP, чем к содержащимся в адефовире, как это описано для точной ДНК-полимеразы [18]. Помимо этого, может различаться внутриклеточная стабильность метаболитов этих препаратов, как отмечалось у других противовирусных средств [19, 20]. Маловероятным объяснением служит разница в эффективности фосфорилирования клеточными ферментами и, следовательно, в количестве активных дифосфатов. Фосфорилирование обоих препаратов катализируется митохондриальными и цитозольными изоферментами АМФ-киназы [21, 22].

Ни один из препаратов не проявил токсичности по отношению к клеткам CRFK в противовирусных концентрациях. Однако результаты исследования цитотоксичности не могут быть просто так перенесены на саму кошку, поскольку чувствительность клеток организма и лабораторной клеточной линии к конкретному препарату могут различаться. Например, в то время как мы не отмечали значимого

Таблица 1. Эффект исследуемых противовирусных препаратов на число и размер герпесвирусных бляшек на культуре клеток CRFK

| Противовирусный препарат | IC_{50} (число) | IC_{50} (размер) |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Ацикловир | 56 мкг/мл (248,7 мкмоль) | 15 мкг/мл (66,6 мкмоль) |
| Ганцикловир | 3,2 мкг/мл (12,5 мкмоль) | 0,4 мкг/мл (1,7 мкмоль) |
| Цидофовир | 6 мкг/мл (21,5 мкмоль) | 0,2 мкг/мл (0,7 мкмоль) |
| Фоскарнет | 27 мкг/мл (140,6 мкмоль) | 7 мкг/мл (36,4 мкмоль) |
| Адефовир | 20 мкг/мл (73,2 мкмоль) | 4 мкг/мл (14,6 мкмоль) |
| PMEDAP | 4,8 мкг/мл (14,3 мкмоль) | 0,9 мкг/мл (2,7 мкмоль) |

IC_{50} (число) — концентрация вещества, необходимая для снижения количества бляшек на 50% по сравнению с контрольными клетками
 IC_{50} (размер) — концентрация вещества, необходимая для снижения количества бляшек на 50% по сравнению с контрольными клетками



• ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

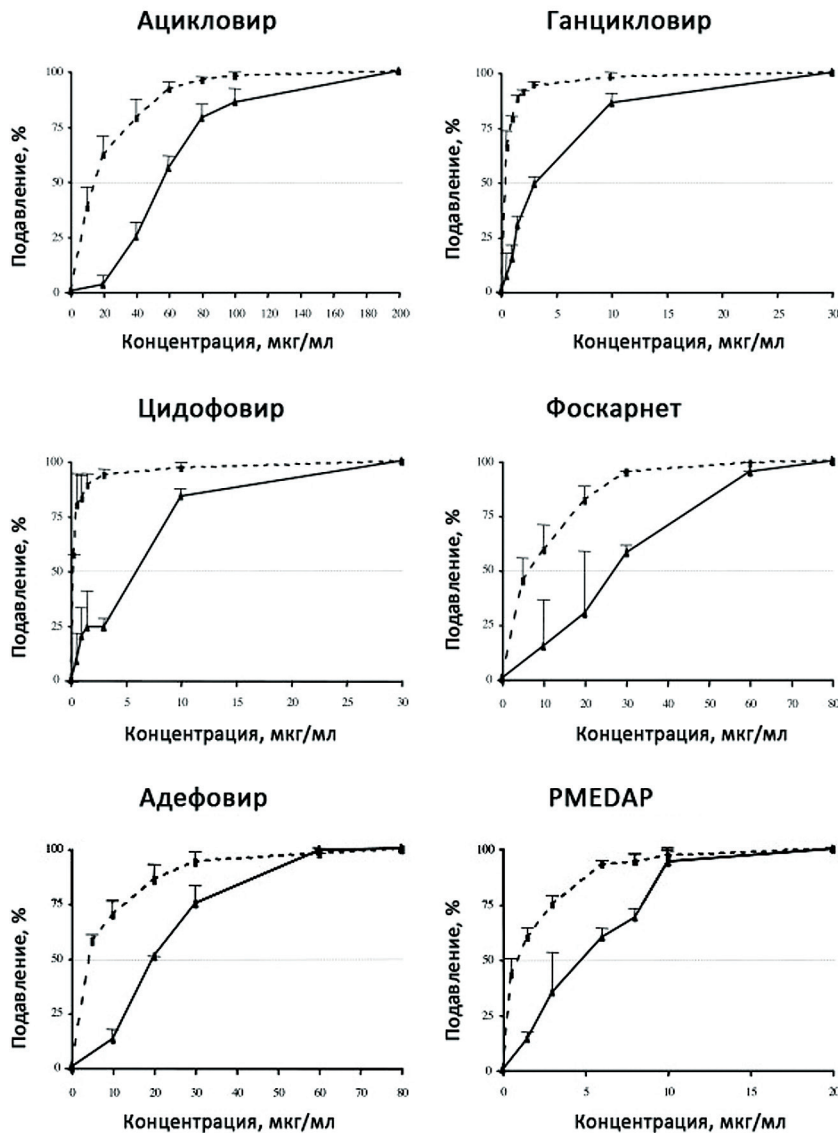


Рис. 1. Активность шести противовирусных препаратов по отношению к герпесвирусу кошек I типа. Непрерывная линия отражает зависимость снижения числа бляшек от концентрации вещества. Пунктирная линия – зависимость уменьшения размеров бляшек от концентрации вещества. Данные представляют собой средние значения трех независимых экспериментов с учетом стандартного отклонения.

эффекта цидофовира на клетки CRFK вплоть до концентрации 160 мкг/мл, Sandmeyer и кол. [23] сообщили о цитотоксическом эффекте цидофовира в концентрации 50 мкг/мл в первичной культуре эпителиальных клеток кошачьей роговицы. Адефовир также не проявил цитотоксичности *in vitro*, однако при его применении для лечения вируса инфекционного перитонита у кошек [24] и вируса лейкемии кошек [25] наблюдались тяжелые гематологические побочные эффекты. Таким образом, необходимы дальней-

шие широкие исследования безопасности этих препаратов для кошки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование показало, что измерение снижения количества бляшек и уменьшения их размера служит двумя ценными и адекватными средствами оценки эффективности противовирусных препаратов. Используя эти критерии для оценки шести выбранных противовирусных препаратов, мы обнаружили, что ганцикловир, PMEDAP и цидофовир наибо-

лее активно подавляют репликацию FHV-1 в клетках CRFK. Следовательно, эти препараты могут быть ценными кандидатами для лечения герпесвирусных инфекций у кошек.

Методы

Клетки и вирус

Клетки CRFK (CCL-94, ATCC, Манассас, Вирджиния, США) выращивали и поддерживали в полной среде на основе среды MEM (Invitrogen, Мерельбеке, Бельгия) с добавлением 5%-ной фетальной сыворотки КСР, пенициллина (100 Е/мл), стрептомицина (0,1 мг/мл), канамицина (0,1 мг/мл), глутамина (0,3 мг/мл) и гидролизата лактальбумина (1 мг/мл). Клетки трипсинизировались один раз в неделю.

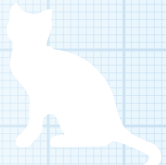
Для заражения использовался бельгийский штамм 94K49. Этот штамм был выделен у кошки с респираторными нарушениями и идентифицирован как FHV-1 с помощью моноклональных антител 22C12, 22F4 и 41G4 против гликопротеинов FHV-1 gC, gB и gD соответственно [26]. Для заражения использовали вирус на 3-м пассаже в клетках CRFK.

Противовирусные препараты

Ацикловир, ганцикловир, адефовир и PMEDAP были растворены в среде RPMI-1640 (Invitrogen, Мерельбеке, Бельгия) в концентрации 1 мг/мл. Цидофовир и фоскарнет были растворены в среде RPMI-1640 в концентрации 2 мг/мл. Впоследствии все препараты были профильтрованы через фильтр 0,45 мкм для получения стерильного раствора и сохранены при 4°C. Ацикловир перед использованием был доведен до комнатной температуры, чтобы растворить возможные преципитаты.

Ход эксперимента

Клетки CRFK выращивали до получения полного монослоя на 24-луночных культуральных плашках (Nunc A/S, Роскильде, Дания) в полной среде при 37°C и 5% CO₂. После этого среду удаляли, и клетки в каждой лунке заразили 40 БОЕ FHV-1 в 200 мкл полной среды. После 1 часа инкубации при 37°C и 5% CO₂ клет-



ки дважды промывали средой MEM. В дальнейшем их заливали средой, содержащей 0,94% карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) и противовирусные препараты в различных концентрациях. Поначалу использовался широкий разброс концентраций, чтобы предварительно оценить противовирусную активность. Затем были выбраны окончательные концентрации, которые указаны на рис. 1. В качестве контроля зараженные FHV-1 клетки инкубировались в полной среде с КМЦ без добавления противовирусных препаратов. Дополнительно для оценки влияния RPMI на формирование бляшек проводилась инкубация зараженных клеток в полной среде с добавлением различных концентраций RPMI, от 0,25% до 20%.

Через 72 часа после заражения покровная среда была удалена, клетки были промыты натрий-фосфатным буфером и последовательно зафиксированы 4%-ным параформальдегидом и 1%-ным раствором H_2O_2 в метаноле. Далее был использован иммунопероксидазный монослойный метод по der Meulen и пр. [27]. Описывая кратко, в течение 1 часа при 37°C клетки инкубировались со смесью моноклональных антител 22C12, 22F4 и 41G4 против гликопротеинов FHV-1 gC, gB и gD соответственно [26]. После трех промываний на 1 час при 37°C был добавлен меченый пероксидазой козий антитышинный IgG (Molecular Probes). После трех дополнительных промываний был добавлен раствор субстрата 3-амино-9-этилкарбазола в 0,05 молях ацетатного буфера с 0,05%-ной перекисью водорода. Клетки инкубировались в течение 10 минут при 37°C, затем раствор субстрата был заменен ацетатным буфером, чтобы заблокировать ферментативное окрашивание.

Количество герпесвирусных бляшек подсчитывалось для каждой концентрации противовирусного препарата, для каждой концентрации RPMI и в контрольных образцах с помощью световой микроскопии (Olympus IX50). Оценка подавляющего эффекта противовирусного препарата на число бляшек производилась по следующей формуле:

$$I_n = \left(1 - \frac{\text{число бляшек (препарат)}}{\text{число бляшек (контроль)}}\right) \times 100,$$

где I_n – процент ингибирования (число).

Минимальная концентрация каждого препарата, необходимая для снижения количества бляшек на 50% (IC_{50} (число)), была рассчитана вручную с использованием графиков доза/ответ, построенных по полученным данным.

Размеры герпесвирусных бляшек для каждой концентрации противовирусного препарата, для каждой концентрации RPMI и в контрольных образцах были установлены следующим образом. Бляшки были сфотографированы с помощью светового микроскопа (Olympus IX50) и цифрового фотоаппарата (Sony Progressive 3CCD), подключенного к компьютеру Macintosh. В каждом образце случайным образом отбиралось некоторое количество бляшек, от 3 до 17 (среднее число на образец составило $10,4 \pm 2,5$). Затем с помощью программы Scion 1.63 (National Institutes of Health) был установлен размер каждой бляшки в пикселях и, наконец, средний размер бляшки для каждого образца. Подавляющий эффект противовирусных препаратов на размер бляшек был рассчитан по следующей формуле:

$$I_s = \left(1 - \frac{\text{размер бляшек (препарат)}}{\text{размер бляшек (контроль)}}\right) \times 100,$$

где I_s – процент ингибирования (размер). Минимальная концентрация каждого препарата, необходимая для уменьшения размера бляшек на 50% (IC_{50} (размер)), была рассчитана вручную с использованием графиков доза/ответ, построенных по полученным данным.

Каждый эксперимент был независимо повторен трижды.

Исследование цитотоксичности

Для выявления токсического эффекта противовирусных препаратов на клетки CRFK использовался метод нейтрального красного. Этот метод основан на внедрении сверхстабильного красителя нейтрального красного в живые клетки. Описывая кратко, клетки CRFK выращивали до получе-

ния полного монослоя на 96-луночной культуральной плашке (Nunc A/S, Роскильде, Дания) в полной среде при 37°C и 5% CO_2 . Затем среду удаляли, а клетки инкубировали в среде с разными концентрациями противовирусных препаратов от 5 до 500 мкг/мл в течение 72 часов при 37°C и 5% CO_2 . В качестве жизнеспособного контроля использовались клетки, инкубированные в течение 72 часов в полной среде без противовирусных препаратов. В качестве нежизнеспособного контроля использовались клетки, инкубированные в полной среде в течение 70 часов, а затем в дистиллированной воде в течение 2 часов. Дополнительно в исследование были включены клетки, инкубированные в полной среде в течение 72 часов с разными концентрациями RPMI, от 0,25% до 50%, чтобы выявить, влияет ли RPMI на жизнеспособность клеток CRFK.

После инкубации в каждую лунку было добавлено по 50 мкл раствора нейтрального красного (0,1% раствор в дистиллированной воде), затем плашки инкубировались в течение 1 часа при 37°C и 5% CO_2 . После этого клетки были промыты солевым раствором с фосфатным буфером и высушены при комнатной температуре в течение 1 часа. В конце в лунки были добавлены 50 мкл лаурилсульфата натрия (10%-ный раствор в дистиллированной воде) и 100 мкл HCl (0,2 моля), и плашки трясли в течение 15 секунд.

На аппарате Multiskan RC (Thermo Labsystems) с помощью фильтра 492 нм была измерена оптическая плотность образцов. Жизнеспособность клеток рассчитывалась по следующей формуле:

$$D_c = \frac{ODt - ODd}{ODc - ODd} \times 100,$$

где D_c – процент жизнеспособных клеток;

ODt – оптическая плотность раствора клеток, инкубированных с противовирусными препаратами или RPMI; ODd – оптическая плотность раствора нежизнеспособных контрольных клеток; ODc – оптическая плотность жизнеспособных контрольных клеток.

Для каждой концентрации проти-



• ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

вовирусного препарата, каждой концентрации RPMI и для контрольных образцов использовалось по 8 лунок. Каждый эксперимент был независимо повторен трижды.

Статистическая обработка

Статистическая обработка результатов была проведена на основе дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием программы SPSS (SPSS Inc., Чикаго, Иллинойс, США).

Сокращения

ANOVA: анализ вариабельности
ANP: ациклический нуклеозид фосфат
СМС: карбоксиметилцеллюлоза
CRFK: почка кошки Кранделла-Риза
FHV-1: герпесвирус кошек 1-го типа
НРМРА: (S)-9-(3-гидрокси-2-фосфонилметоксипропил) аденин
IPMA: монослойный вариант иммунопероксидазного метода
MEM: Minimum Essential Medium (основная питательная среда)
PMEDAP: 9-(2-фосфонилметоксиэтил)-2,6-диаминопурин
RPMI: Roswell Park Memorial Institute

Вклад авторов

KVDM принял участие в оформлении исследования, а также в координации и проведении экспериментов, описанных в данной статье. VG принимал участие в проведении экспериментов. SC и HN приняли участие в оформлении исследования и редактировании статьи.

Благодарности

Мы благодарим Els Mattheeuws за отличную техническую поддержку. Мы также благодарим профессора Y. Tohya из Управления Центра ветеринарной микробиологии, Высшую школу сельскохозяйственных и естественных наук Университета Токио за предоставление специфических моноклональных антител к FHV-1.

Ацикловир был щедрым подарком компании GlaxoSmithKline (Женваль, Бельгия). Ганцикловир – дар компаний Roche Bioscience (Пало Альто, Калифорния, США) и AstraZeneca Седертелье, Швеция). Цидофовир, адефовир и PMEDAP были предоставлены профессором J. Neyts из Института Рега, Лёвен, Бельгия. +

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Povey RC, Johnson RH: A survey of feline viral rhinotracheitis and feline picornavirus infection in Britain. *J Small Anim Pract* 1971, 12:233-247.
2. Cai Y, Fukushi H, Koyasu S, Kuroda E, Yamaguchi T, Hirai K: An etiological investigation of domestic cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease in Japan. *J Vet Med Sci* 2002, 64:215-219.
3. Maggs DJ: Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of feline herpesvirus type 1. *Clin Tech Small Anim Pract* 2005, 20:94-101.
4. Nasisse MP: Feline herpesvirus ocular disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1990, 20:667-680.
5. Andrew SE: Ocular manifestations of feline herpesvirus. *J Feline Med Surg* 2001, 3:9-16.
6. Sussman MD, Maes RK, Kruger JM, Spatz SJ, Venta PJ: A feline herpesvirus-1 recombinant with a deletion in the genes for glycoproteins gI and gE is effective as a vaccine for feline rhinotracheitis. *Virology* 1995, 214:12-20.
7. Scott FW, Geissinger CM: Long-term immunity in cats vaccinated with an inactivated trivalent vaccine. *Am J Vet Res* 1999, 60:652-658. Erratum in: *Am J Vet Res* 1999, 60:763
8. Gaskell RM, Povey RC: Experimental induction of feline viral rhinotracheitis virus re-excretion in FVR-recovered cats. *Vet Rec* 1977, 100:128-33.
9. Williams DL, Fitzmaurice T, Lay L, Forster K, Hefford J, Budge C, Blackmore K, Robinson JC, Field HF: Efficacy of antiviral agents in feline herpetic keratitis: results of an in vitro study. *Curr Eye Res* 2004, 29:215-218.
10. Maggs DJ, Clarke HE: In vitro efficacy of ganciclovir, cidofovir, penciclovir, foscarnet, idoxuridine, and acyclovir against feline herpesvirus type-1. *Am J Vet Res* 2004, 65:399-403.
11. Nasisse MP, Guy JS, Davidson MG, Sussman W, De Clercq E: In vitro susceptibility of feline herpesvirus-1 to vidarabine, idoxuridine, trifluridine, acyclovir, or bromovinyldeoxyuridine. *Am J Vet Res* 1989, 50:158-160.
12. Mikloska Z, Cunningham AL: Alpha and gamma interferons inhibit herpes simplex virus type 1 infection and spread in epidermal cells after axonal transmission. *J Virol* 2001, 75:11821-11826.
13. Janssen H, Andersen JH, Mantzilas D, Gutteberg TJ: A wide range of medium-sized, highly cationic, alpha-helical peptides show antiviral activity against herpes simplex virus. *Antiviral Res* 2004, 64:119-126.
14. De Clercq E: Antiviral drugs: current state of the art. *J Clin Virol* 2001, 22:73-89.
15. Galle LE: Antiviral therapy for ocular viral disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004, 34:639-653.
16. Neirinckx E, Garre B, Nauwynck H, Croubels S, De Backer P, van der Meulen KM: Antivirale behandeling van rhinotracheitisvirus, immunodeficientievirus en leukemievirus infecties bij de kat. *Flemish Veterinary Journal* 2005, 74:420-431.
17. Weiss RC: Synergistic antiviral activities of acyclovir and recombinant human leukocyte (alpha) interferon on feline herpesvirus replication. *Am J Vet Res* 1989, 50:1672-1677.
18. Kramata P, Downey KM: 9-(2-phosphonylmethoxyethyl) derivatives of purine nucleotide analogs: A comparison of their metabolism and interaction with cellular DNA synthesis. *Mol Pharmacol* 1999, 56:1262-1267.
19. Sutton D, Boyd MR: Comparative activity of penciclovir and acyclovir in mice infected intraperitoneally with herpes simplex virus type 1 SC16. *Antimicrob Agents Chemother* 1993, 37:642-645.
20. Balzarini J, Degreve B, Andrei G, Neyts J, Sandvold M, Myhren F, de Clercq E: Superior cytostatic activity of the ganciclovir elaidic acid ester due to the prolonged intracellular retention of ganciclovir analogs in herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene-transfected tumor cells. *Gene Ther* 1998, 5:419-426.
21. Merta A, Votruba I, Jindrich J, Holy A, Cihlar T, Rosenberg I, Otmar M, Herve TY: Phosphorylation of 9-(2-phosphonomethoxyethyl)adenine and 9-(S)-(3-hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl)adenine by AMP(dAMP) kinase from L1210 cells. *iochem Pharmacol* 1992, 44:2067-2077.
22. Robbins BL, Greenhaw J, Connelly MC, Fridland A: Metabolic pathways for activation of the antiviral agent 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine in human lymphoid cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1995, 39:2304-2308.
23. Sandmeyer LS, Keller CB, Bienzle D: Effects of cidofovir on cell death and replication of feline herpes virus-1 in cultured feline corneal epithelial cells. *Am J Vet Res* 2005, 66:217-222.
24. Vahlenkamp TW, De Ronde A, Balzarini J, Naesens L, De Clercq E, van Eijk MJ, Horzinek MC, Egberink HF: (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)-2, 6-diaminopurine is a potent inhibitor of feline immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1995, 39:746-749.
25. Hartmann K, Donath A, Beer B, Egberink HF, Horzinek MC, Lutz H, Hoffmann-Fezer G, Thum I, Thefeld S: Use of two antivirals (AZT, PMEA) in the treatment of FIV and of FeLV seropositive cats with clinical symptoms. *Vet Immunol Immunopathol* 1992, 35:167-175.
26. Horimoto T, Limcumpao JA, Tohya Y, Takahashi E, Mikami T: Feline herpesvirus type 1 glycoproteins eliciting virus neutralizing and hemagglutination-inhibiting antibodies. *Arch Virol* 1990, 111:127-32.
27. van der Meulen KM, Caij AB, Nauwynck HJ, Pensaert MB: Absence of viral proteins in equine herpesvirus 1-infected blood mononuclear cells during cell-associated viremia. *Vet Microbiol* 2006, 113:265-73.

Из журнала BMC Veterinary Research 2006, 2:13doi:10.1186/1746-6148-2-13

© 2006 van der Meulen et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License