

УДК 619:615.28

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ КАЛИЦИВИРОЗА КОШЕК

Глотова Т.И., Семенова О.В., Глотов А.Г., Ядренкина Т.Г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока», г. Новосибирск, Россия

Введение. Вирус калицивируса кошек *Feline calicivirus* (FCV) является важным и весьма распространенным возбудителем. Он принадлежит к семейству Caliciviridae, включающему другие патогены, имеющие значение для человека и животных (М.М. Рахманина, 1994; J.E. Sykes, 1998; A.D. Radford, 2007). Впервые вирус выделен из желудочно-кишечного тракта кошки в 1957 г. L. Fastier.

В настоящее время заболевание, вызываемое FCV, встречается у кошек во всем мире

(S. Dawson, 1994, C.R. Helps, 2005). Вирус обладает высокой пластичностью генома, что позволяет ему быстро реагировать на различные экологические изменения. Мутационная изменчивость, характерная для FCV, объясняет клиническое разнообразие форм болезни: от субклинической с бессимптомным течением, поражений слизистой ротовой полости и глаз, верхних отделов респираторных органов с разной степенью тяжести, до системной инфекции, заканчивающейся часто гибелью животного (A.D. Radford, 2007).

В последние годы в литературе встречаются сообщения о высоко вирулентных штаммах вируса, вызывающих дополнительно к описанным клиническим проявлениям: подкожные отеки, хромоту и гибель животного (B.S. Schulz, 2011). Генетические и антигенные мутации приводят к появлению и распространению среди животных новых штаммов вируса с различной вирулентностью, что значительно снижает профилактическую эффективность существующих вакцин. Калицивирусная инфекция может охватывать от 5 до 91% восприимчивых животных, вызывать развитие ринитов, язв в полости рта и редко – пневмонии. Чаще встречаются слабовирулентные штаммы FCV, вызывающие умеренные признаки заболевания и низкую смертность. Установлено, что FCV обладает способностью к длительной персистенции в организме переболевшего животного. Как правило, количество животных, персистентно инфицированных вирусом, может быть небольшое, но они играют важную роль в распространении и сохранении вируса в популяции кошек.

В последние годы участились случаи регистрации в ветеринарных клиниках г. Новосибирска клинических проявлений у кошек в виде поражений глаз, слизистых ротовой полости и языка, респираторных органов, обусловленные FCV. Распространению возбудителя инфекции среди популяции домашних кошек способствуют концентрация животных в питомниках по их разведению, перегруппировки, выставки, вязки и другие мероприятия, сопровождающиеся стрессами, при которых происходит реактивация вируса из латентного состояния, сопровождающаяся его репликацией и экскрецией во внешнюю среду с носовыми, глазными выделениями, а также слюной животных.

В связи с широким распространением калицивируса среди кошек, снижением профилактической эффективности вакцин в настоящее время актуальной задачей является поиск препаратов, обладающих выраженной противовирусной активностью в отношении FCV.

Целью работы являлось изучение противовирусной активности нового препарата в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы исследований. Для определения противовирусной активности препарата в отношении вируса калицивируса кошек в условиях *in vitro* использовали вирус калицивируса кошек (штамм «Ларс-30ДЕП»). Инфекционную активность его определяли в чувствительной перевиваемой линии культур клеток почки котенка (FK-81). Культивирование и заражение FCV проводили в перевиваемой линии культуры клеток FK-81 во флаконах для клеточных культур (Nunc, Дания) до

появления 100% цитопатогенного действия. Клетки выращивали в среде Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов (производство ФГУП «Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН»), с добавлением 3-5% эмбриональной сыворотки крови теленка (HyClone, lot №ASA28574), 0,06% L-глутамина и 100 мкг/см³ канамицина, при 37°C и 5% CO₂. В качестве поддерживающей среды использовали ту же среду без сыворотки. Определение токсичности и противовирусной активности препарата проводили в соответствии с рекомендациями [9].

Определение инфекционной активности вируса калицивироза кошек проводили микрометодом в 96-луночных культуральных планшетах (Costar) с культурой клеток FK-81 с использованием не менее 4 параллельных рядов. Инфекционный титр вируса выражали в ТЦД_{50/0,1см³} (50%-я тканевая цитопатическая доза). При определении противовирусной активности препарата *in vitro* монослой используемой культуры клеток заражали вирусом калицивироза кошек в дозе не менее 1 ТЦД/кп, через 1,5 часа после этого его отмывали питательной средой без сыворотки и вносили препарат в 50%-ной ингибирующей дозе (опыт) или разводящую среду (контроль). Через 72 часа культивирования вируса в такой биосистеме культуральную жидкость титровали. Противовирусный эффект препарата рассчитывали по соотношениям инфекционных активностей вируса в опытных и контрольных образцах.

В каждом опыте проводили дополнительный контроль на токсичность испытуемой дозы препарата.

Для расчета вирусной редукции использовали формулу: $R = (\log_{10}A_0) - (\log_{10}A_n)$, где A_0 – титр вируса/см³ в исходном образце; A_n – титр вируса/см³ в образце после обработки.

В работе использовали коммерческий препарат рибавирин-Липинт (ЗАО «ВЕКТОР-МЕДИКА», серия 02э). Этот препарат прошел клинические испытания в медицине, обладает меньшей токсичностью и более высокой терапевтической эффективностью, чем существующие препараты рибавирин. Он использует механизм адресной доставки действующего вещества. Уникальная нанотехнология позволила заключить рибавирин в мельчайшие, искусственно созданные биоконтейнеры – липосомы. Это сферические микрочастицы, заполненные жидкостью. Их оболочка (мембрана) состоит из молекул тех же природных фосфолипидов, что входят в состав клеточных мембран. Доказано, что липосомы не обладают токсичностью и полностью биodeградируемы. Рибавирин, находящийся в липосоме, защищен от разрушения при воздействии внутренней среды организма. С другой стороны - оболочка не позволяет токсичному препарату превысить допустимую концентрацию в крови. Липосомы выполняют роль контейнера, из которого препарат высвобождается постепенно, в нужных дозах, и самое главное - в определенных органах-мишенях. Адресная доставка в липосомах позволяет достичь максимальной концентрации рибавирин в печени и минимальной - в крови. Это снижает токсичность препарата и позволяет в некоторых случаях даже увеличивать дозировку.

Данных о противовирусной активности этого препарата в отношении возбудителя калицивирусной инфекции кошек нет. Все опыты проводили в трехкратной повторности, для статистической обработки применяли общепринятые методы [8].

Результаты исследований. Оценка цитотоксичности – необходимый компонент комплексного подхода к изучению свойств новых химических и биологически активных соединений. Ее изучение необходимо для того, чтобы правильно выбирать вирусинактивирующую дозу испытуемого препарата.

Оценку цитотоксичности препарата проводили по четырехкестровой системе, анализируя морфологию клеток и целостность монослоя культуры клеток почки котенка. При выборе 50% ингибирующей концентрации препарата в культуре клеток FK-81 было отмечено, что она составила 5 мг/см³. Контроли показали полное отсутствие токсичности препаратов для культур клеток.

Исследование противовирусной активности препарата проводили, используя три нетоксичные для культуры клеток дозы рибавирин липосомального (0,05; 0,5 и 5,0 мг/см³). Культуру клеток FK-81 инфицировали 6,5 lg ТЦД_{50/0,1см³} вируса калицивироза

кошек штамм Ларс-30ДЕП.

На рисунке представлены результаты снижения инфекционного титра вируса при обработке различными дозами рибавирина липосомального. Наибольшая редукция отмечена при концентрации 5 мг/см^3 , титр вируса снизился до $2,42 \text{ IgTCDD}_{50/0,1 \text{ см}^3}$ в сравнении с контролем - $6,75 \text{ IgTCDD}_{50/0,1 \text{ см}^3}$. Доза препарата $0,5 \text{ мг/см}^3$ снижала инфекционный титр вируса до $4,5 \text{ IgTCDD}_{50/0,1 \text{ см}^3}$. Следовательно, разница титров вируса в опытных и контрольных образцах была более чем в $2,0 \text{ IgTCDD}_{50/0,1 \text{ см}^3}$, что свидетельствует о выраженной противовирусной активности препарата в отношении вируса калицивироза кошек. Снижение дозы препарата до $0,05 \text{ мг/см}^3$ приводило к уменьшению редукции вируса до 1,5.

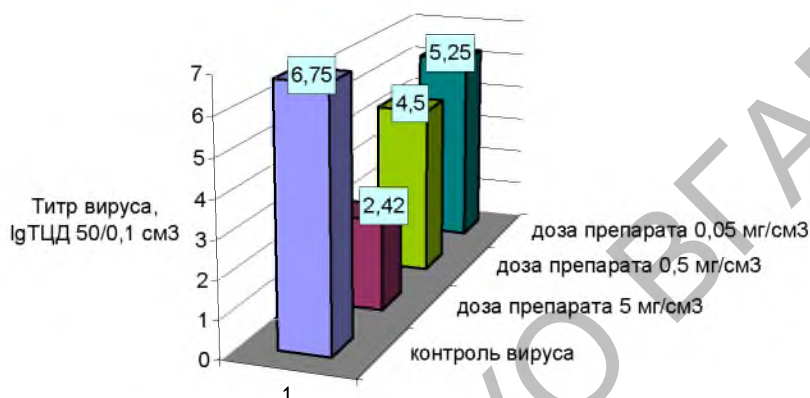


Рисунок 1 – Определение противовирусной активности препарата рибавирин-Липинт в отношении вируса калицивироза кошек

В настоящее время наиболее актуальным является поиск противовирусных препаратов, оказывающих как лечебное, так и профилактическое действие, эффективно подавляющих или снижающих репликацию вируса. Поэтому целью следующего этапа нашей работы было изучение способности рибавирина липосомального защищать инфицированные клетки путем предотвращения развития цитопатогенного действия FCV. Для этого выбрали наиболее эффективную в противовирусном отношении концентрацию испытуемого препарата – $5,0 \text{ мг/см}^3$, которую вносили в лунки с двухсуточным монослоем культуры клеток, а затем через 2, 4, 8, 12 и 24 часа вносили вирус калицивироза кошек в дозе $6,5 \text{ IgTCDD}_{50/0,1 \text{ см}^3}$. На каждый временной интервал использовали 4 лунки. В контрольные 4 лунки вносили вирус. Результаты учитывали по мере наступления цитопатического эффекта в контрольных лунках. После этого питательную среду, содержащую вирус в смеси с исследуемыми препаратами, подвергали титрованию в чувствительной культуре клеток в трехкратной повторности. Титр вируса высчитывали по методу Рида и Менча и выражали в $\text{IgTCDD}_{50/0,1 \text{ см}^3}$. Противовирусный эффект препаратов рассчитывали по разнице инфекционной активности (титров) вируса без препаратов и после контакта с ними. Результаты приведены в таблице.

Таблица 1 - Определение профилактического действия рибавирина липосомального в культуре клеток

Титр вируса до контакта с препаратом ($\text{IgTCDD}_{50/0,1 \text{ см}^3}$)	Титр вируса ($\text{IgTCDD}_{50/0,1 \text{ см}^3}$) при внесении в культуру клеток после контакта с препаратами в течение (час)				
	2	4	8	12	24
6,5	$5,25 \pm 0,5$	$5,25 \pm 0,5$	$4,75 \pm 0,25$	$4,75 \pm 0,25$	$4,25 \pm 0,25$

При определении профилактического действия рибавирина липосомального в культуре клеток FK-81 установили, что препарат в эффективной концентрации не

оказывал выраженного профилактического действия в отношении вируса калицивироза кошек.

Для определения эффективной дозы препарата рибавирин-Липинт в очаге калицивироза сформировали 3 опытные группы кошек по принципу аналогов по 6 животных в каждой. У них отмечали: повышение температуры тела от 39,5 до 41,5°C, чихание, кашель, серозно-катаральные истечения из глаз и носа, отказ от еды, наличие эрозий на слизистой носа, ротовой полости и языка. У всех животных клинически и по результатам вирусологических исследований установлена острая респираторная форма калицивироза, обусловленная наличием вируса.

Препарат рибавирин-Липинт выпаивали животным перед кормлением в соответствующих дозах: 1 группа – 20-25 мг/кг, 2-я – 30-35 и 3-я – 40-45 мг/кг массы тела животного, один раз в день в течение 10 дней.

За животными вели клинические наблюдения, биохимические исследования крови, ежедневный отбор проб биоматериала для проведения вирусологических исследований.

Критерием эффективности терапии являлась длительность проявления клинических признаков и сроки выявления вируса в носовых, конъюнктивальных секретах и выделениях со слизистой ротовой полости. Одним из основных показателей клинического выздоровления являлось снижение температуры тела, восстановление аппетита, отсутствие истечений из носа и глаз, кашля и чихания, эрозий в ротовой полости.

Оптимальные результаты лечения калицивироза кошек получали при использовании рибавирина – Липинт в дозе 20-25 мг/кг (1-ая опытная группа). Увеличение дозы препарата до 30-35 мг/кг и 40-45 мг/кг не привело к значительным сокращениям длительности проявления клинических признаков у животных и сроков выявления вируса в пробах биоматериала у животных опытных групп 2 и 3 в сравнении с животными 1-ой опытной группы.

Важную информацию о функциональном состоянии печени дает определение в сыворотке крови активности ферментов печеночного происхождения – трансаминаз и щелочной фосфатазы. Анализ полученных нами данных свидетельствует о том, что увеличение дозы препарата до 30-35 мг/кг и 40-45 мг/кг сопровождалось ростом показателей Алт, АсТ и ЩФ в сыворотке крови животных опытных групп.

Для подтверждения оптимальных сроков лечения калицивироза кошек препаратом рибавирин-Липинт и лечебной эффективности выбранной нами дозы препарата провели производственный опыт на 32 кошках.

Результаты исследований показали, что уже на 5 день у 87,5% животных отсутствовали клинические признаки заболевания, а у 84,4% вирус не выявляли в истечениях из носа и слизистой ротовой полости. Эффективность лечения к 7 дню составила 90,6%, что является подтверждением высокой терапевтической эффективности разработанного нами способа применения препарата рибавирин-Липинт для лечения калицивирусной инфекции кошек.

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что рибавирин липосомальный не оказывает цитотоксического действия на культуру клеток FK-81 в максимальной дозе 5,0 мг/см³, обладает выраженной противовирусной активностью в отношении вируса калицивироза кошек, в дозах 0,5 и 5,0 мг/см³ угнетает репродукцию возбудителя на 2,25 и 4,33 lgTCID₅₀/см³ соответственно.

Разработан способ лечения калицивироза кошек, включающий применение противовирусного препарата рибавирин-Липинт в дозе 20-25 мг/кг массы тела 1 раз в день, перед приемом корма, в течение 10 дней, который обладает высокой терапевтической эффективностью и может быть использован для терапии калицивирусной инфекции кошек.

Литература. 1. Рахманина, М.М. Калицивироз кошек / М.М. Рахманина, Е.И. Элизбарашвили, В.И. Уласов // Ветеринария. – 1994. – №9. – С. 51-53. 2. Sykes, J.E. Detection and strain differentiation of feline calicivirus conjunctival swabs by RT-PCR of the hyper variable region of the capsid protein gene / J.E. Sykes, J.L. Allen, V.P. Studdert // *Arch. Virol.* – 1998. – Vol. 143. – P. 1321-1334. 3. Radford, A. D. Feline calicivirus / A.D. Radford, K.P. Coyne, S. Dawson // *Vet. Res.* – 2007. – Vol. 38. – P. 319-335. 4. Fastier, L. New feline virus isolated in tissue culture / L.

Fastier // *Am. J. Vet. Res.* – 1957. – Vol. 18 (67). – P. 382-383. 5. Dawson, S. Acute arthritis of cats associated with feline calicivirus infection / S. Dawson, D. Bennett, S.D. Carter // *Res. Vet. Sci.* – 1994. – Vol. 56. –P. 133-143. 6. Helps, C.R. Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, *Chlamydomphila felis* and *Bordetella bronchiseptica* in cats: experience from 218 European catteries / C.R. Helps, P. Lait, A. Damhuis // *Vet Rec.* – 2005. – Vol. 156. – P. 669-673. 7. Schulz, B.S. Two outbreaks of virulent systemic feline calicivirus infection in cats in Germany / B.S. Schulz, K. Hartmann, S. Unterer // *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochen schrift.* – 2011. – Vol. 124. – P. 10-17. 8. Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирования экспериментов. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1974. 9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р.У. Хабриева. — М.: Изд-во Медицина, 2005.

УДК 619:615.37.012

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ВЕТЕРИНАРИИ

Дяченко С.А., Преображенская А.С.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щёлково, Россия

Введение. Стволовые клетки человека используются в современной медицине при лечении многих заболеваний, в частности онкологических, кардиологических и ряда других. Стволовые клетки могут быть получены из костного мозга, из жировой ткани, а также из пуповинной и периферической крови и из эмбриональных тканей. Стволовые клетки подразделяются на мезенхимальные (они способны дифференцироваться в клетки тканей мезодермального происхождения), гематопоэтические (предшественники клеток крови), нейрональные (предшественники клеток нервной системы) и другие. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) часто используют в роли трансплантата, они активизируют собственные резервы организма, способствуют образованию цитокинов и факторов роста; МСК являются предшественниками остеобластов и способствуют формированию ремоделирующих единиц.

В практике клеточной терапии широко распространены средства активации стволовых клеток, основанные на принесении в организм новых стволовых клеток. При проникновении с током крови в различные органы и ткани, особенно в повреждённые, эти клетки обеспечивают развитие или замещают повреждённую ткань, что и является их регенерационным эффектом. Полагают, что регенерация органов, содержащих клетки и ткани мезенхимного происхождения, должна иметь единый общий биологический механизм. МСК доступны, просты в культивировании, при определенных условиях способны дифференцироваться в различные типы и виды тканей и органов и самое главное не вызывают реакцию иммунного отторжения. Эти данные послужили толчком к развитию ветеринарно-биологических исследований, направленных на изучение возможности использования МСК для клеточной терапии многих известных приобретенных и наследственных заболеваний. Болезни суставов животных занимают значительный удельный вес среди хирургических заболеваний. Известные консервативные и оперативные способы лечения патологии суставов не всегда позволяют добиться положительных клинических и анатомо-функциональных результатов лечения.

При заболеваниях, сопровождающихся скоплением жидкости в суставной полости, осуществляют пункцию сустава, частичное или полное выведение его содержимого с последующим введением в полость лекарственных препаратов. Однако при однократном введении фармпрепарата не всегда достигается полное купирование патологического процесса. Целью настоящего исследования явилась разработка метода лечения больных суставов у собак с помощью лекарственного средства, в качестве которого выступали аутологичные мезенхимальные стволовые клетки.

Материалы и методы. Клетки выделяли из жировой ткани больных собак по