

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И  
БИОТЕХНОЛОГИИ "ВЕКТОР"  
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ  
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ  
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

*На правах рукописи*

*Титова Ксения Александровна*

**Лабораторные модели на основе мышей для оценки защитной эффективности  
препаратов от натуральной оспы**

***1.5.10 – вирусология***

Диссертация  
на соискание кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук Сергеев А.А.

р.п. Кольцово, 2021 г.

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	11
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: СКРИНИНГ ЛАБОРАТОРНЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ОТ НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ У ЛЮДЕЙ.....	11
1.1 История выделения возбудителя натуральной оспы.....	11
1.2 Чувствительность людей и подопытных животных к возбудителю натуральной оспы.....	11
1.3 Диссеминация возбудителя натуральной оспы в организме людей и подопытных животных.....	23
1.4 Патоморфологическая картина натуральной оспы у людей и подопытных животных.....	33
1.5 Использование модельного вида животных к натуральной оспе при изучении протективного действия противовирусных препаратов.....	39
1.6 Заключение.....	40
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	44
2.1 Лабораторные животные.....	44
2.2 Перевиваемая культура клеток.....	45
2.3 Первичные макрофагальные клетки селезенки мыши и метод их приготовления.....	45
2.4 Вирусы.....	46
2.5 Противовирусные препараты.....	47
2.6 Метод вирусологического анализа биологических образцов.....	48
2.7 Методы и дозы инфицирования животных и их первичных макрофагальных клеток селезенки.....	48
2.8 Методы приготовления образцов органов и тканей от подопытных животных.....	49
2.9 Метод изучения динамики аккумуляции вируса в первичных макрофагальных клетках селезенки мыши.....	51
2.10 Методы исследования <i>in vitro</i> цитотоксичности и противовирусного действия химически синтезированных соединений.....	51
2.11 Схемы использования и оценочные критерии эффективности противови-	

	русных препаратов в исследованиях <i>in vivo</i> .....	51
2.12	Методы патоморфологических исследований.....	52
2.13	Статистические методы обработки экспериментальных данных.....	53
	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	55
3	ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ МОДЕЛЕЙ К НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЕ НА ОСНОВЕ МЫШЕЙ ДЛЯ СКРИНИНГА ЭФФЕКТИВНЫХ АНТИОСПЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	55
3.1	Экспериментальная оценка чувствительности мышей к возбудителю нату- ральной оспы.....	55
3.2	Распространение возбудителя натуральной оспы в организме мышей.....	62
3.2.1	Диссеминация вируса в организме мышей аутбредной популяции ICR.....	62
3.2.2	Диссеминация вируса в организме иммунодефицитных мышей линий SCID и Nude.....	73
3.3	Патоморфологические изменения у мышей аутбредной популяции ICR и иммунодефицитной линии SCID, инокулированных возбудителем нату- ральной оспы.....	79
3.4	Оценка возможности применения мышей аутбредной популяции ICR и иммунодефицитной линии SCID для скрининга эффективных антиоспен- ных препаратов.....	88
3.5	Испытание лабораторных моделей к натуральной оспе на основе мышей аутбредной популяции ICR и иммунодефицитной линии SCID.....	98
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	114
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	118
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120
	СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	134
	ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное). Первые листы методических рекоменда- ций МР 4.2.005-16.....	139
	ПРИЛОЖЕНИЕ Б (справочное). Первые листы методических рекоменда- ций МР 4.2.003-16.....	141

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Более 40 лет прошло с того времени, как в мире была победоносно завершена программа глобального уничтожения натуральной оспы (НО). В то же время угроза возникновения этого опасного заболевания существует и до сих пор из-за возможности умышленного или непреднамеренного распространения его возбудителя, потенциальными резервуарами которого могут явиться:

- существующие, возможно, нелегальные его хранилища [42, 106, 137];
- останки людей, умерших от НО, контакт с которыми может осуществляться в процессе археологических раскопок в регионах вечной мерзлоты, где возбудитель заболевания остается жизнеспособным длительное время [99, 130, 156];
- искусственно созданный возбудитель заболевания на основании данных его первичной генетической структуры [78].

При этом в мире сложилась угрожающая ситуация - более половины его населения не имеет противооспенного иммунитета. В последние десятилетия отмечается рост масштаба и частоты возникновения эпидемических очагов других ортопоксвирусных заболеваний: оспы коров и оспы обезьян [22, 23, 147]. В то же время по сей день существует только один официально разрешенный (с середины 2018 г.) к применению (и то только в США) химиопрепарат (Tecovirimat на основе ST-246) для борьбы с ортопоксвирусными инфекциями у людей [145]. Одной из причин задержки быстрого прогресса в создании защитных средств медицинского применения от НО является отсутствие лабораторных моделей для массового скрининга препаратов по противооспенной активности в экспериментах с использованием возбудителя натуральной оспы (*variola virus* - VARV) и животных [44, 83, 127], что делает перспективной проблему создания таких моделей.

**Степень разработанности.** Основываясь на подходе, связанном с поиском лабораторных моделей, воспроизводящих внешнюю клиническую картину НО, до настоящего времени для оценки эффективности исследуемых препаратов от этого заболевания подобрана лишь одна такая модельная система на основе штамма Harper VARV (с неизвестной величиной вирулентности для человека) и *Macaca (M.) fascicularis* (синонимы - *M. cynomolgus* и *M. irus*) [44, 83, 127]. Однако такие приматы явля-

ется дорогостоящим, а работа с ними в лабораторных условиях связана со значительной трудоемкостью, что значительно затрудняет его применение в масштабных для статистической обработки экспериментах, сориентированных на оценку эффективности разрабатываемых препаратов. Кроме того, несмотря на относительно близкую к человеку клиническую картину заболевания, вызываемого VARV у этих приматов, их чувствительность не менее чем в 10 000 раз ниже к данному патогену, беря во внимание инфицирование через респираторный тракт [83, 93, 94, 108, 127], чем людей, для которых 50 %-я инфицирующая доза (ИД<sub>50</sub>) при теоретическом расчете составляет 0-2 lg БОЕ (десятичный логарифм бляшкообразующих единиц) [21, 30, 58]. Причем этот вид животных используется только для оценки терапевтической (лечебной) эффективности противооспенных препаратов, при этом его инфицирование осуществляется внутривенным (в/в) методом, вводя 8 lg БОЕ VARV [75, 127], тогда как основные пути заражения человека этим патогеном реализуются через органы дыхательного тракта.

В то же время имеется еще один вариант скрининга восприимчивых лабораторных моделей для оценки противовирусной характеристики препаратов, связанной с имитацией не внешней симптоматики НО у людей, а процесса инфекции в органах-мишенях (первичных и вторичных) и в клетках-мишенях, наличие которого даст возможность рассчитать ИД<sub>50</sub> [30, 32, 150]. Ранее в работе с использованием первичных суспензионных клеткок легких мышей аутбредной популяции (а/б п.) ICR нами было отмечено то, что они были восприимчивы к VARV и способны нарабатывать данный патоген [19, 25, 30]. В связи с этим, основываясь на втором подходе, при разработке дешевых и удобных лабораторных моделей для массового скрининга препаратов по противооспенной активности в экспериментах *in vivo* мы сориентировались именно на этот вид животных и ранее изученный высоковирулентный для человека штамм India-3a VARV: ИД<sub>50</sub> = 1,0 (0,6-1,4) lg БОЕ [19, 30].

**Цели и задачи.** Целью настоящей работы являлось изучение возможности применения лабораторных моделей на основе иммунокомпетентных и иммунодефицитных мышей при интраназальном (и/н) заражении высоковирулентным для человека штаммом VARV для оценки эффективности препаратов от НО.

Чтобы достичь данной цели, требовалось решить следующие задачи:

1) изучить чувствительность иммунокомпетентных мышей а/б п. ICR, а также мышей иммунодефицитных линий (и/д л.) SCID и Nude к вирулентному в отношении человека штамму India-3a VARV при их и/н заражении по величинам 50 %-й летальной дозы ( $LD_{50}$ ) и  $ID_{50}$ , вычисленной по наличию признаков заболевания или по наличию вируса в легких;

2) изучить динамику распространения VARV в организме и/н зараженных мышей а/б п. ICR и и/д л. SCID и Nude;

3) исследовать патоморфологические изменения в организме выбранных популяций мышей, и/н инфицированных VARV;

4) оценить возможность использования выбранных популяций мышей, и/н инфицированных штаммом India-3a VARV, в качестве лабораторных моделей для изучения эффективности препаратов от НО;

5) исследовать эффективность противооспенных препаратов (НИОХ-14 и ST-246) на выбранных лабораторных моделях и оценить пределы их практического использования.

#### **Научная новизна:**

1) оценена восприимчивость при и/н заражении мышей а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные) и и/д л. SCID и Nude (18-21-суточные) к VARV (штамм India-3a) по величинам  $ID_{50}$ , определенным по присутствию инфекционного процесса в легких по прошествии 3 или 4 суток после инфицирования (п.и.);

2) представлена динамика накопления VARV (штамм India-3a) в организме и/н зараженных мышей а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные) и и/д л. SCID и Nude (18-21-суточные), а также у них выявлены первичные органы-мишени для этого вируса;

3) описаны у и/н зараженных VARV (штамм India-3a) мышей а/б п. ICR (10-14-суточные) и и/д л. SCID (18-21-суточные) гистологические и электронно-микроскопические изменения в органах и тканях, а также и типы клеток-мишеней для этого патогена;

4) исследованы и доказаны защитные действия химически синтезированных соединений (НИОХ-14 и ST-246) и вакцины оспенной живой сухой для накожного применения, произведенной в Акционерном обществе «Научно-производственное объ-

единение «Микроген» (АО «НПО «Микроген»), с использованием выбранных лабораторных моделей: «10-14-суточная мышь а/б п. ICR и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции» и «18-21-суточная мышь и/д л. SCID и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции» (в отношении НИОХ-14 и ST-246); «18-21-суточная мышь а/б п. ICR – и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции» (в отношении противооспенной вакцины);

5) разработанные способы определения эффективности лечебно-профилактических препаратов от НО с помощью первых двух вышеупомянутых лабораторных моделей были запатентованы в Российской Федерации (РФ) [33, 34].

#### **Теоретическая и практическая значимость работы:**

1) данные, полученные при изучении лабораторных моделей на основе мышей и высоковирулентного для человека штамма VARV, обеспечили успешное выполнение научных проектов в 2014-2016 годах:

- темы «Создание лабораторной модели для оценки эффективности лечебно-профилактических препаратов против натуральной оспы» (Шифр 03-5-14) Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) под эгидой Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории РФ;

- международных обязательств, касающихся данного направления, принятых Сотрудничающим центром Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по диагностике ортопоксвирусных инфекций и музея штаммов и ДНК вируса оспы, располагающимся на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора;

2) с применением выбранных нами лабораторных моделей «10-14-суточные мыши а/б п. ICR, инфицированные штаммом India-3a VARV» и «18-21-суточные мыши и/д л. SCID, инфицированные штаммом India-3a VARV», были разработаны соответствующие методические рекомендации по их использованию (МР 4.2.005-16 и 4.2.003-16 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, титульные листы которых представлены в приложениях А и Б соответственно), и успешно осуществлены доклинические исследования российского химически синтезированного соединения НИОХ-

14, включая его специфическую противоопухолевую активность, что делает возможным в дальнейшем его регистрацию в Министерстве здравоохранения РФ; результаты этих исследований были применены при выполнении Госконтрактов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора по федеральной целевой программе «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009-2014 годы)»;

3) основная информация, приведенная в методических рекомендациях (МР 4.2.005-16 и 4.2.003-16 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) по использованию лабораторных моделей «10-14-суточная мышь а/б п. ICR и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции» и «18-21-суточная мышь и/д л. SCID и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции», вошла в учебное издание [31], которое активно используется в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора с целью подготовки аспирантов очной формы обучения, научных сотрудников и лаборантов.

**Методология и методы исследования.** С целью проверки возможности применения выбранных видов лабораторных животных, как модельных для НО, в данной работе использовали методологию определения характеристик их заражения VARV через дыхательный тракт в сравнении с таковыми у людей (или известного модельного животного - *M.fascicularis*), базирующуюся на исследовании у них инфекционного процесса. В работе также были использованы различные традиционные методы вирусологического, культурального, серологического, гистологического, электронно-микроскопического и статистического исследования.

**Положения, выносимые на защиту:**

1) мыши а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные), а также и/д л. SCID и Nude (18-21-суточные) обладают сравнимой чувствительностью к штамму India-3a VARV, судя по ИД<sub>50</sub>, оценной по регистрации вируса в легких после и/н инфицирования;

2) у мышей а/б п. ICR (10-14-суточные) и и/д л. SCID (18-21-суточные) при и/н заражении штаммом India-3a VARV наблюдается бессимптомная инфекция, ограниченная в основном органами респираторного тракта и вызывающая в них воспалительно-некротические изменения;



3) у 10-14-суточных мышей а/б п. ICR, и/н инфицированных VARV (штамм India-3a), органами максимального накопления вируса являются легкие и нос, а у 18-21-суточных мышей и/д л. SCID, и/н инфицированных этим же вирусом, - легкие;

4) мыши а/б п. ICR (10-14-суточные), а также мыши и/д л. SCID (18-21-суточные), зараженные и/н штаммом India-3a VARV являются адекватными лабораторными моделями для оценки лечебно-профилактической эффективности химиопрепаратов от НО.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Для проведения статистической обработки данных, включая сравнение величин, пользовались стандартными методами [5] и пакетом компьютерных программ «Statistica 6.0» (StatSoft Inc. 1984-2001) [36]. Результаты, полученные в рамках данной работы, были представлены на 7 российских и международных научных форумах: WHO Advisory Committee on Variola Virus Research Report of the Sixteenth Meeting, Geneva, 20–21 October 2014; I международная конференция молодых ученых, Новосибирск, 7-8 октября 2014 г.; Седьмая Всероссийская научно-практическая конференция «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов», Новосибирск, 21-22 апреля 2015 г.; II Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания», Сочи, 2-5 ноября 2015 г.; Научно-практическая конференция «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе», Новосибирск, 26-27 сентября 2016 г.; III международная конференция молодых ученых, Новосибирск, 5-6 октября 2016 г.; WHO Advisory Committee on Variola Virus Research Report of the Seventeenth Meeting, Geneva, 12–13 January 2016. При этом все результаты, приведенные в рамках данной диссертационной работы, представлены в 8 публикациях, в том числе в 2 патентах РФ на изобретения [8, 18, 25, 33, 34, 129, 149, 154].

Личный вклад соискателя: в определении восприимчивости мышей а/б п. ICR и и/д л. SCID и Nude к VARV при проведении экспериментов по их и/н инфицированию; в исследовании динамики диссеминации VARV в организме зараженных мышей (с ведущим научным сотрудником лаборатории коллекции вируса натуральной оспы и ортопоксвирусов, кандидатом медицинских наук – к.м.н. Сергеевым Ал.А.); в исследовании гистологических изменений у зараженных мышей и их первичных культур

клеток (макрофагов селезенки), инфицированных VARV (с заведующим отделом микроскопических исследований Тарановым О.С.); в определении возможности применения мышей а/б п. ICR и и/д л. SCID как модельных животных к НО, базируясь на имеющихся экспериментальных результатах; в изучении эффективности препаратов от НО при использовании VARV на мышах а/б п. ICR и и/д л. SCID (с к.м.н. Сергеевым Ал.А.).

Благодарности. Автор очень признателен научному руководителю к.м.н. Сергееву Ал.А., а также заместителю директора Центра разработок и внедрения АО «НПО «Микроген» Сергееву А.Н. (доктор медицинских наук, профессор), заведующей отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций Шишкиной Л.Н. (доктор биологических наук) и генеральному директору общества с ограниченной ответственностью «МК Девелопмент» Сергееву Ар.А. (доктор медицинских наук) за помощь, которую они оказали при разработке плана проведения экспериментов по диссертационной работе, в обсуждении полученных экспериментальных данных и при ее рассмотрении. Автор также передает глубокую благодарность в адрес сотрудников отделов «Коллекция микроорганизмов» и профилактики и лечения особо опасных инфекций Булычеву Л.Е. (кандидат биологических наук – к.б.н.), Юргановой И.А., Овчинниковой А.С. (к.б.н.), Морозовой А.А., Галаховой Д.О., Мининой А.А., Кабанову А.С. (к.б.н.) и Нестерову А.Е., которые принимали участие с автором при подготовке или осуществлении экспериментов с применением живого VARV, сотруднику отдела микроскопических исследований Таранову О.С. за проведенные им патоморфологические и электронно-микроскопические исследования на органах, тканях и первичных культурах макрофагов селезенки инфицированных животных, подготовленных автором.

Структура и объем работы. Диссертация представлена в виде машинописного текста в объеме 142 страницы (машинописный текст) и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала. В состав диссертации входят 20 таблиц и 14 рисунков, а также список литературы, включающий в себя 163 источника, из которых 125 зарубежных.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: СКРИНИНГ ЛАБОРАТОРНЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ОТ НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ У ЛЮДЕЙ

#### 1.1 История выделения возбудителя натуральной оспы

НО относится к антропонозам и представляет собой высококонтагиозную особо опасную инфекцию. Возбудитель этого заболевания (ВНО) является членом семейства *Poxviridae* (род *Orthopoxvirus*), содержит дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), имеет размеры 200—350 нм и размножается в цитоплазме клеток человека с образованием включений. Впервые эти включения описал Guarnieri в 1892 году, обнаружив их в поврежденных клетках больного НО [87] и приняв их за простейшие. Однако перед этим Buist в 1886 году описал мельчайшие частицы в лимфе человека, умершего от этого заболевания [55]. Тем не менее, открытие VARV в основном связано с именами Negri и Pashen, которые в своих работах начиная с 1906 г. продемонстрировали то, что эти фильтрующиеся мельчайшие частицы обладали инфекционностью [122, 128]. Pashen также описал в материале из пустул больных оспой элементарные тельца, получившие название телец Пашена. Специфичность своих находок он видел не только в том, что регулярно обнаруживал эти тельца в материалах от больных, но и в их способности агглютинировать под влиянием специфической сыворотки.

Несмотря на давний интерес к VARV, его изучение до конца 30-х годов прошлого столетия (до введения в практику культивирование вирусов на куриных эмбрионах) было затруднено из-за отсутствия биологической системы его размножения и подходящей лабораторной модели к НО.

#### 1.2 Чувствительность людей и подопытных животных к возбудителю натуральной оспы

При поиске лабораторных моделей к инфекционным заболеваниям с целью использования их для оценки эффективности разрабатываемых противовирусных препаратов в научной литературе описано два основных подхода:

- первый сориентирован на поиск лабораторной модели, которая будет воспроизводить внешние клинические признаки моделируемого заболевания у человека, наличие которых, включая гибель, позволит оценить чувствительность животных к вирусу за счет определения величины ЛД<sub>50</sub> или ИД<sub>50</sub> [16, 51, 92];

- второй сориентирован на поиск лабораторной модели, которая будет воспроизводить, как у человека, инфекционный процесс в первичных и/или вторичных органах-мишенях и клетках-мишенях, наличие которого позволит оценить чувствительность животных к вирусу за счет определения величины ИД<sub>50</sub> [30, 32].

Если первый (старый подход) использовался очень широко, то второй (новый) был успешно применен в отношении мышей а/б п. ICR при и/н заражении вирусом оспы обезьян [9, 149, 150]. В любом случае для реализации этих подходов необходимо иметь информацию по чувствительности исследуемых видов животных к возбудителю моделируемого заболевания (его штамму, проявляющий высокую вирулентность для человека).

В доступной научной литературе в прошлом столетии имеется скудная информация в российских литературных источниках относительно количественной оценки прогнозной величины ИД<sub>50</sub>, основываясь на которой можно было бы судить о степени восприимчивости человека к VARV, находящейся в диапазоне от 1 до 10 вирусных частиц [20, 21]. При этом ученые не предоставляют ни каких доказательств для обоснования величины такого показателя. Вероятно, она была получена путем экстраполяции результатов исследований, проведенных с использованием других эпидемически значимых вирусов, обладающих теми же основными механизмами передачи вызываемых ими инфекций от человека к человеку (аэрозольный – а/з и контактный), что и при НО [41, 43, 132]. Так, экспериментально в опытах по инфицированию добровольцев через дыхательный тракт показано, что ИД<sub>50</sub> вирусов, вызывающих клиническую картину гриппа, аденовирусной и риновирусной инфекций, не превышает 10 жизнеспособных вирусных частиц [72, 101, 124]. При этом более высокое значение показателя контагиозности при НО, составляющего 58 % (диапазон - от 37 до 88 %) [77, 102, 119], по сравнению с таковым, например, при обычном гриппе (до 30 %) [57, 59, 143], может быть легко объяснено, как минимум, самой высокой (среди других респираторных вирусов) устойчивостью VARV к различным факторам внешней среды

[1, 95, 114], куда попадают возбудители заболеваний от больного человека перед инфицированием здорового.

Несколько иного мнения в отношении чувствительности человека к VARV придерживаются американские ученые, оценивая ИД<sub>50</sub> этого возбудителя для человека в диапазоне между 10 и 100 БОЕ [58], но не имея также при этом соответствующего экспериментального доказательства. Более убедительной в этом плане является информация, недавно полученная при прогнозной оценке этого показателя российскими исследователями: 1,0 (0,6-1,4) lg БОЕ [19, 30], которая основана на использовании экспериментальных результатов чувствительности к VARV первичных клеточных культур человека и мышей а/б п. ICR, а также этих мышей при и/н заражении таким патогеном.

Заражение людей VARV (особенно не вакцинированных от НО) в основном через респираторный тракт при эпидемии приводит часто к появлению выраженной симптоматики заболевания, которая описана достаточно подробно в ряде фундаментальных научных трудов [2, 132, 136]. В этой связи, чтобы обеспечить удобное представление сведений о восприимчивости к VARV подопытных животных, далее будет приведена краткая информация, касающаяся ключевых этапов клинических проявлений НО у не вакцинированных от нее людей, которые погибали, как правило, в 25–40 % случаев.

Инкубационный период при НО (от момента инфицирования до начала возникновения лихорадки) обычно находится в диапазоне от 10 до 14 суток. Затем наступает продромальная фаза болезни (до появления сыпозных элементов), которая имеет длительность от 2 до 4 суток, и характеризуется гипертермией (38,5-40,5 °C), сильной головной болью и болью в крестце. При этом регистрируются следующие симптомы: тахикардия, учащенное дыхание, тошнота, нередко рвота и бред. На 2-3-й день этой стадии у части больных обнаруживается продромальная сыпь в виде розеол или петехий, локализуемая в области бедренного треугольника и/или на груди, и которая исчезает по прошествии 2–3 суток с после появления. В последующем наступает фаза высыпания, перед которой наблюдается снижение температуры тела и появление (в течение нескольких часов или дней) энантемы на поверхности слизистых оболочек. На 2-4-е сутки лихорадки на коже возникает сыпь в виде маленьких красноватых

узелков (папул) первоначально на лице и верхних конечностях, потом на других участках тела. В течение 1-2 суток папулы увеличиваются в числе и размерах и превращаются в везикулы, имеющие прозрачное содержимое и umbilicalное западение в центре. К 7–8-м суткам с момента высыпания содержимое везикул нагнаивается (стадия пустул), что сопровождается подъемом температуры у больного (второй волной гипертермии). Оспенная сыпь имеет характерную черту: она распределяется центробежно, увеличиваясь по числу элементов на единицу поверхности в направлении к периферии (лицо и конечности). К 10–13-м суткам с момента высыпания пустулы достигают наибольших размеров, после этого они начинают уплощаться, подсыхать и превращаться в корки, при этом состояние больных улучшается и снижается температура тела до нормальных величин. Корки отпадают к 30–40-м суткам болезни, оставляя на их месте красноватые пятна и рубцы. По наличию той или иной плотности и вида сыпозных элементов на поверхности кожи людей различают пять основных клинических типа НО:

- обычный, который встречается в 88,8 % случаев в следующих формах: дискретная (42,1 %) с летальностью 9,3 %, полусливная (23,9 %) с летальностью 37,0 %, сливная (22,8 %) с летальностью 62,0 %;
- модифицированный - в 2,1 % случаев с летальностью около 10 %;
- без сыпи – крайне редко;
- плоский - в 6,7 % случаев с летальностью 96,5 %;
- геморрагический, который встречается в 2,4 % случаев в следующих формах: ранняя (0,7 %) с летальностью 100 % и поздняя (1,7 %) с летальностью 96,8 %.

Вопросы восприимчивости к VARV различных видов подопытных животных достаточно подробно приведены в монографиях [15, 112], из которых и была заимствована часть нижеприведенной информации. Обращает на себя внимание то, что основная масса фундаментально-прикладных исследований, связанных с поиском подопытных животных, проявляющих высокую чувствительность к VARV и воспроизводящих клиническую картину НО у человека, была проведена до 1980 года (год, с которого началась эпоха жизни людей без вакцинации против НО в связи с полным ее искоренением на Земном шаре). Первые исследования в этом направлении относятся еще к концу 19 – началу 20 века и касаются в основном приматов. Тогда было уста-

новлено, что введение обезьянам материала от оспенных больных сопровождается развитием у них местных поражений и в некоторых случаях генерализованного процесса, имеющего большое сходство по своим внешним проявлениям с таковым у человека при НО [61, 146].

Имитируя а/з механизм заражения, чаще всего наблюдаемый в период эпидемий НО, низшим и человекообразным приматам некоторые исследователи [53, 110, 111] интрабронхиально или другими способами (внутрилегочным, накожным, скарификацией слизистой полости рта, через роговицу) вводили пустулезный материал от больных людей, и при этом у животных наблюдали либо субклиническое, либо легкое оспоподобное заболевание. Кроме того, заболевание удалось вызывать у обезьян после в/в инокуляции крови оспенных больных [107].

Некоторые ученые [65, 151] в экспериментах на *M.fascicularis* при в/в и внутрисердечном заражении также успешно воспроизвели малую оспу (*variola minor*), возбудителем которой является разновидность VARV – вирус аластрим.

Накопленные данные при экспериментальных исследованиях с VARV на приматах свидетельствуют о некоторой восприимчивости различных видов низших приматов: *Cercopithecus* [163], *M. nemestrinus*, *M. rhesus*, *M.fascicularis* [93, 94, 146], *P. cynocephalus* [98], а также человекообразных обезьян: шимпанзе [82] и орангутангов [52]. При этом есть информация, свидетельствующая о возможности передачи НО от больных обезьян здоровым и от больных людей интактным обезьянам [52, 84, 126].

Более подробные исследования в данном направлении были проведены с использованием *M.fascicularis* [94], у которых при а/з заражении в дозе 4,5 lg ООЕ (оспинообразующая единица) VARV (штамм Yamada) удалось вызвать нелетальную инфекцию (в общем виде напоминающую НО у человека) со следующей клинической симптоматикой:

- гипертермия в течение 3 дней, начиная с 6-х суток п.и.; снижение активности и потеря аппетита в течение 1–2 дней лихорадки;
- появление сыпи в виде папул размером 1–3 мм по прошествии 9 суток п.и., которая в течение 24 часов превращались в везикулы и пустулы, затем по прошествии 11 суток п.и. формировались корки, которые отпадали по истечении 13 суток п.и., оставляя на этом месте рубцы;

- распределение сыпи по периферии (на морде в районе переносицы, губ и вокруг глаз, а также на внутренних поверхностях бедер и предплечья).

Увеличение же дозы такого заражения ( $5,0 \times 10^5$ – $2,0 \times 10^6$  ООЕ) для штамма Yamada также не привело к гибели данных животных, тогда как штамм Lee VARV вызвал гибель одной из двух а/з зараженных обезьян дозой  $1,8 \times 10^6$ – $3,4 \times 10^6$  ООЕ по прошествии 7 суток п.и. [93]. При этом авторы отметили существенные различия у обезьян и человека в течении заболевания: по длительности инкубационного периода (4-5 и 10-14 суток п.и. соответственно); по степени выраженности кожной сыпи (трудноразличимая и ярко выраженная соответственно); по локализации кожной сыпи (на морде, верхних конечностях и на всей поверхности тела соответственно); по скорости появления различных стадий развития сыпи (практически одновременно и последовательно соответственно); по длительности присутствия кожной сыпи (3-4 и 20–30 суток соответственно). Кроме того, эти ученые привели неопубликованную информацию о возможности интратрахеально заражения обезьян данного вида дозой 15 ООЕ этого вируса с воспроизведением у них оспоподобного заболевания.

Другие исследователи [80] в экспериментах по а/з инфицированию *M. mulatta* (синоним *M. rhesus*) штаммом Higgins VARV (неопубликованная величина дозы) продемонстрировали заболевание, напоминающее НО у человека, с незначительным летальным эффектом (у 2 из 109 обезьян), инкубационным периодом 5 суток и появлением у них сыпи на 7–8-е сутки п.и., носящей центробежный характер, которая исчезала после этого по прошествии 6-11 суток.

Новый виток исследований с использованием *M.fascicularis* и VARV начался только в начале 21-го столетия, когда ряд исследователей [75, 83, 108] оценил способность вызвать оспоподобное заболевание у этого вида животных штаммами Harper и India 7124 данного возбудителя заболевания при раздельном а/з и в/в заражении, а также сочетанном. Результаты этих исследований продемонстрировали наличие почти 100 %-го летального эффекта, который в большинстве случаев наступал по прошествии 3-6 суток п.и. у обезьян только при дозе 9 lg БОЕ каждого из испытанных штаммов VARV, вводимого в/в или сочетано с аэрозолем. При этом наблюдалась клиническая картина заболевания, которая появлялась по прошествии 2 суток п.и. и была характерна для геморрагического типа НО у человека. При в/в же введении дозы 8 lg БОЕ VARV исследователям удалось в определенной степени воспроизвести забо-



левание, имеющее сходство с обычным клиническим типом НО у человека, с 20-50 % -й гибелью обезьян. Что касается сыпозных элементов на коже обезьян, то их количество увеличивалось с увеличением дозы в/в введения вируса: с 1-50 элементов при дозе 6 lg БОЕ до 500 и более при дозах 8 и 9 lg БОЕ. Само по себе а/з инфицирование приматов этого вида в дозах, превышающих 8 lg БОЕ, не приводило их к гибели, но инициировало появление гипертермии тела и легких экзематозных поражений кожи. В обобщенном виде результаты исследований, проведенных в прошлом и в этом столетии на *Macaca* разного вида, приведены в таблице 1.1.

По данным таблицы 1.1 видно, что у приматов разного вида, зараженных VARV тем или иным методом через респираторный тракт (а/з, и/н, интратрахеальный и внутрилегочный) в широтой охвата доз (с 4,7 до 8 lg БОЕ или ООЕ и более), практически отсутствовала зависимость тяжести клинической картины заболевания от величины инфицирующей дозы [60]. При этом заболевание у них протекало лишь с клинической картиной, напоминающей обычный тип НО у человека, но в легкой форме и, как правило, без летального эффекта. В/в же введение *Macaca* вируса в интервале доз от 6 и до 9 lg БОЕ, начиная с 6 lg БОЕ, приводило у них к существенному утяжелению клинического течения заболевания: от обычного типа до геморрагического.

Большинство исследователей отмечало низкую восприимчивость взрослых белых мышей к VARV при различных путях введения [4, 123, 155]. В то же время в опытах с более молодыми животными этого вида (до 14-суточного возраста), включая мышей-сосунков, при внутрибрюшинном и интрацеребральном введении вируса ряд ученых наблюдал летальный эффект, который наступал по прошествии 2-8 суток п.и. [10, 14, 113]. При и/н заражении гибель наблюдалась только у 1-5-суточных мышей по прошествии 5-8 суток п.и. с предшествующим появлением на их коже в большинстве случаев оспенных элементов.

Повышение восприимчивости взрослых мышей к VARV могло быть получено после их облучения  $\text{Co}^{60}$  [37]. При этом клинические симптомы заболевания и вирусологические показатели у таких животных напоминали таковые у 10-12-суточных мышей.

Таблица 1.1 - Данные по клиническим типам натуральной оспы у *Macaca*, инокулированных разными способами с помощью различных штаммов возбудителя натуральной оспы

Номер ссылки	Вид <i>Macaca</i>	Кол-во жив-х	Наименование штамма вируса	Доза заражения	Способ за- ражения	Наблюдаемый клинический тип нату- ральной оспы
64	<i>Irus</i>	>10	Материал от больного	Не указана	С/к.к.	Обычный (в 25 % случаев) с легким те- чением или субклинический без гибели
53	<i>Irus, ne- mestrina</i>	65	№21, 52, 167, 199, 200, 252, 307, 325, 326, 327	Не указана	С/к.к.; с/к.с. носа, рта и роговицы глаза; в/л; и/т; к/б	Обычный с легким течением или суб- клинический без гибели
94	<i>Irus</i>	39	Yamada	$5,0 \times 10^4$ ООЕ	А/з	Обычный с легким течением без гибели
93	<i>Irus</i>	3	Yamada	$1,8 \times 10^6 - 3,4 \times 10^6$ ООЕ	А/з	Обычный с легким течением без гибели
		2	Lee	$5,0 \times 10^5 - 1,0 \times 10^6$ ООЕ	А/з	Обычный с гибелью одной особи
80	<i>Mulatta</i>	109	Higgins	Не указана	А/з	Обычный с 2 %-й гибелью
126	<i>Irus</i>	22	Harvey	$5,0 \times 10^6$ БОЕ	И/н	Обычный
125	<i>Irus</i>	8	Brazil Study 2	$10^6$ БОЕ	И/н	Обычный с легким течением
			Pakistan	Не указана	И/н	Обычный с легким течением

Продолжение таблицы 1.1

Номер ссылки	Вид <i>Macaca</i>	Кол-во жив-х	Наименование штамма вируса	Доза заражения	Способ за- ражения	Наблюдаемый клинический тип нату- ральной оспы
			Utrecht 65-32	$10^8$ БОЕ	И/н	Обычный с легким течением
			Brazil Study 5	$10^7$ БОЕ	В/м и в/бр	Обычный с легким до умеренного тече- ния
108	<i>Irus</i>	Не ука- зано	Не указано	Более $10^8$ БОЕ	А/з	Обычный с легким до умеренного тече- ния без гибели
83	<i>Irus</i>	36	Harper	$10^8$ и $10^9$ БОЕ	В/в	Обычный без гибели - при дозах $10^6$ и $10^7$ БОЕ и с 20 %-й гибелью - при дозе $10^8$ БОЕ; геморрагический с 95 %-й ги- белью - при дозе $10^9$ БОЕ
				$10^9$ БОЕ	В/в с а/з	
			India 7124	$10^6 - 10^9$ БОЕ	В/в	
				$10^9$ БОЕ	В/в с а/з	
127	<i>Irus</i>	2	Harper	$10^8$ БОЕ	В/в	Обычный
131	<i>Irus</i>	27	Harper	$10^8$ и $10^9$ БОЕ	В/в	Обычный - при дозе $10^8$ БОЕ; обычный или геморрагический - при дозе $10^9$ БОЕ
75	<i>Irus</i>	6	Harper	$10^8$ БОЕ	В/в	Обычный с 50 % гибелью

## Продолжение таблицы 1.1

## Примечания

А/з – аэрозольно

БОЕ – бляшкообразующая единица

В/бр – внутрибрюшинно

В/в – внутривенно

В/л – внутрилегочно

В/м – внутримышечно

И/н – интраназально

И/т – интратрахеально

К/б – прямой контактный с больным человеком

ООЕ – оспинообразующая единица

С/к.к. – скарификационно на коже

С/к.с. – скарификационно на слизистых

В экспериментах с использованием белых крыс, подвергнутых и/н заражению VARV, некоторые исследователи отмечали нечетко выраженную симптоматику заболевания по прошествии 2-3 суток п.и. [13] и явления интерстициальной пневмонии [120]. Введение различных штаммов вируса крысам на скарифицированную кожу не вызывало у них каких-либо изменений, за исключением, появления в редких случаях на этом месте папул, в то время как нанесение VARV на скарифицированную роговицу животных этого вида сопровождалось развитием кератита.

В проведенных исследованиях на хлопковых крысах, и/н или в/в зараженных большими дозами VARV (6–7 lg OOE), не было зарегистрировано у них клинических признаков заболевания [38]. Также у золотистых хомячков наблюдалось отсутствие какой-либо реакции на внутрисердечное введение этого патогена в большой дозе (6,3 lg OOE).

Морские свинки, как и взрослые белые мыши, не были восприимчивы к данному этиологическому агенту при различных способах инфицирования [155], но введение вируса в переднюю камеру глаза сопровождалось развитием кератита, менее выраженного, чем от той же дозы вируса осповакцины (BOB) [12].

В экспериментах на кроликах, связанных с накожным введением VARV, наблюдалось полное отсутствие какой-либо реакции [12, 63, 123]. Из пяти испытанных методов заражения кроликов (в/в, внутрибрюшинный, интрацеребральный, внутрикожный и интратестикулярный) только внутрикожный с использованием больших доз вируса вызывал образование небольшого уплотнения на месте введения, быстро подвергавшегося обратному развитию [12, 13, 157]. В то же время некоторые исследователи обнаруживали у этого вида животных даже некротические и геморрагические поражения на коже при внутрикожном инфицировании [69, 85]. Введение вируса в переднюю камеру глаза кроликов сопровождалась развитием кератита, а на скарифицированную роговицу – образованием мелких белых узелков [12]. Не было отмечено клинических признаков заболевания у новорожденных кроликов после внутрикожного и подкожного заражения вирусом [133].

В экспериментах с использованием петухов, которых инъецировали подкожно VARV, только на месте введения обнаруживали мелкие узелки. При внутримышечном

и интрацеребральном инфицировании у петухов и 5-суточных цыплят не было обнаружено каких-либо реакций [12, 115].

У домашних животных (коз, овец, свиней и крупного рогатого скота) не было отмечено никаких признаков восприимчивости к VARV, не брав во внимание появления одиночных оспин на скарифицированном участке кожи у телят и коровы [99, 100].

Таким образом, осуществленный анализ информации из научной литературы, посвященной чувствительности к VARV некоторых видов животных, которых инфицировали разными методами, доказывает то, что практически все исследователи двигались в направлении поиска видов животных, восприимчивых к VARV, обращая при этом внимание лишь на моделирование ими наибольшего спектра внешних клинических признаков НО у человека. В этом случае все виды подопытных животных можно разделить на две группы:

- животные, воспроизводящие оспоподобное заболевание при использовании лишь больших доз заражения патогеном, к которым можно отнести только приматов;
- животные, не воспроизводящие оспоподобное заболевание при использовании даже больших доз заражения патогеном, к которым можно отнести все виды исследованных животных, кроме приматов.

При этом обращает на себя внимание отсутствие в научной литературе информации, касающейся показателей чувствительности ( $ID_{50}$  или  $LD_{50}$ ) у исследуемых животных к VARV, что, вероятно, обусловлено, с одной стороны, просто отсутствием такой восприимчивости у большинства подопытных животных (кроме обезьян), а с другой стороны, и слабой восприимчивостью к патогену у обезьян, у которых степень выраженности клинической картины заболевания слабо зависела от дозы заражения. За неимением лучшего ряд исследователей вынужден был при поиске модельных видов животных к НО акцентировать свое внимание лишь на приматах (*M. fascicularis*), которые при в/в (или сочетанном: в/в и а/з) заражении дозами 6–8 и 9 lg БОЕ VARV были способны моделировать у людей основную симптоматику НО: соответственно обычный клинический тип и геморрагический. Причем при таком заражении приматов были использованы штаммы вируса (Harper и India 7124) с неизвестной величиной показателя вирулентности для человека.

### 1.3 Диссеминация возбудителя натуральной оспы в организме людей и подопытных животных

В связи с тем, что все исследованные виды животных (кроме приматов) оказались практически нечувствительными к VARV особенно при заражении через дыхательные органы, главное внимание в данном кратком обзоре будет обращено лишь на приматов (*M. fascicularis* и *M. mulatta*), которые способны были моделировать основные внешние признаки НО у человека при а/з и/или в/в инфицировании, но только большими дозами вируса (см. п. 1.2).

Первые и ключевые исследования в направлении изучения динамики накопления VARV в организме а/з инфицированных *M. fascicularis* и *M. mulatta* были проведены в 60-х годах прошлого столетия [80, 94]. При изучении экспериментальной инфекции у таких видов животных некоторые ученые [94] использовали штамм Yamada этого вируса и дозу аэрогенного заражения 4,5 lg ООЕ. Почти каждые сутки с момента заражения (не считая 12 и 13-х) вскрывали в основном по 3 животных вплоть до 15-х суток п.и., забирая органы и ткани у них для последующего вирусологического исследования. Результаты такого эксперимента отражены в таблице 1.2, которая была частично модифицирована для лучшего восприятия материала.

Из данных, приведенных в таблице 1.2, видно то, что по прошествии 1 суток после а/з заражения обезьян VARV обнаруживался первоначально в органах дыхательного тракта (в легких и трахее), а также в легочных и шейных лимфатических узлах, достигая максимальных значений по прошествии 3–6 суток п.и. Затем он регистрировался и в других органах в относительно невысоких концентрациях, в то же время в коже, ноздрях и буром жире величина этого показателя достигала 3–4 lg ООЕ/мл по прошествии 9–11 суток п.и. Факт бурного размножения патогена в данный период времени в коже и ноздрях авторы связывают с появлением в них экзантемных и энантемных сыпозных элементов соответственно. Появление вируса в крови наблюдалось крайне редко и в невысоких концентрациях: по прошествии 5, 8 и 9 суток п.и. Исследователи пришли к выводу, что диссеминация вируса от органов-мишеней первичного звена ко вторичному у обезьян осуществляется лимфогенным путем при размножении вируса в лимфоузлах, а также в результате кратковременной виремии.

Таблица 1.2 - Данные по аккумулярованию возбудителя натуральной оспы (штамм Yamada) в образцах\* от *Macaca fascicularis*, аэрозольно инфицированных дозой 4,5 lg ООЕ, по данным Nahon, Wilson (1960) [94]

Вид образцов от обезьян	Инфекционный титр вируса (lg ООЕ/мл) в образцах от приматов (n=3) в разные периоды заболевания и промежутки времени (сутки) после заражения:												
	инкубационный период							период клинических проявлений					
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14
Кровь	-	-	-	-	-	0,3	-	-	1,3	0,1	-	-	-
Ноздри	0,3	-	-	-	0,7	1,3	2,1	2,2	1,9	2,7	2,9	3,3	1,2
Носоглотка	-	-	-	-	1,0	2,9	2,0	1,5	1,0	0,6	1,1	0,8	1,6
Трахея	0,3	1,1	1,7	0,8	2,3	2,7	1,1	0,9	-	0,7	0,4	1,0	1,9
Легкие	0,6	2,9	3,8	5,1	5,3	5,5	4,4	2,3	2,9	0,8	0,5	0,5	-
Цервикальные лимфоузлы	-	0,6	0,7	0,3	1,0	-	2,0	-	-	-	-	0,3	-
Подчелюстные лимфоузлы	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	1,3	0,5	0,5	-
Легочные лимфоузлы	-	3,1	-	-	3,4	-	-	1,9	-	-	-	0,9	1,8
Мезентериальные лимфоузлы	-	-	0,6	-	0,6	-	0,8	-	-	-	1,4	0,4	-
Селезенка	-	-	-	-	1,2	1,2	-	0,8	-	-	-	-	-
Подмышечные лимфоузлы	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	0,7	0,6	-	-
Паховые лимфоузлы	-	-	-	-	-	-	1,0	0,5	-	2,0	0,6	-	-



Продолжение таблицы 1.2

Вид образцов от обезьян	Инфекционный титр вируса (lg ООЕ/мл) в образцах от приматов (n=3) в разные периоды заболевания и промежутки времени (сутки) после заражения:												
	инкубационный период							период клинических проявлений					
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14
Костный мозг из кости бедра	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	2,1
Костный мозг из кости грудины	-	-	-	-	-	-	-	1,1	0,5	-	-	-	-
Слизистая щек	0,5	-	0,6	-	-	-	-	-	-	0,4	1,0	0,8	-
Пищевод	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	0,4	1,1	0,6	-
Слюнная железа	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	0,7	0,7	1,8	-
Желудок	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	0,4	-
Печень	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	0,3	0,4	-
Поджелудочная железа	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Желчный пузырь	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Почка	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	0,6	0,7	-
Яичко	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Мочевой пузырь	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,8	-	-

Продолжение таблицы 1.2

Вид образцов от обезьян	Инфекционный титр вируса (lg ООЕ/мл) в образцах от приматов (n=3) в разные периоды заболевания и промежутки времени (сутки) после заражения:												
	инкубационный период							период клинических проявлений					
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14
Спинной мозг (поясничная часть)	-	-	0,9	-	-	-	0,7	0,7	-	1,6	1,2	0,4	-
Головной мозг	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	2,1	1,8
Надпочечники	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	0,8	0,5	-	0,9
Глаз	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Сердце	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Бурый жир	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,1	2,1	-	-
Поперечнополосатая мышце	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	-
Кожа и кожные повреждения	-	-	-	-	-	-	-	-	--	2,0	3,2	3,2	-
<p>Примечания</p> <p>ООЕ – оспинообразующая единица</p> <p>«-» - вирус не обнаружен при титровании на хорион-аллантаисной оболочке куриных эмбрионов</p> <p>n – число животных</p> <p>*Органы и ткани в составе гомогенатов, а также кровь</p>													

Аналогичным образом были проведены исследования на *M. mulatta* другими исследователями [80] с использованием штамма Higgins VARV, но, к сожалению, авторы не указали дозу вируса, которая была применена при а/з заражении животных. При этом на каждую временную точку они брали по 4 животных, забирая органы и ткани для последующего вирусологического исследования. Результаты исследований динамики накопления вируса в органах и тканях этих обезьян представлены в таблице 1.3, которая была частично модифицирована для лучшего восприятия материала.

Из данных, приведенных в таблице 1.3, видно то, что по прошествии 3 суток п.и. вирус накапливается в легких обезьян у всех 4 исследованных животных в огромных концентрациях (до 7,2 lg ООЕ/г), при этом он появляется и в внутригрудном лимфоузле и селезенке (только у 1 из 2 и 1 из 4 обезьян соответственно), но в низкой концентрации. В ряде случаев по прошествии 7-11 суток п.и. вирус был обнаружен в большинстве изученных органов и тканей, не считая легких, где его концентрация к концу этого периода достигла максимальных значений (9,2 lg ООЕ/г у одной исследованной обезьяны). Причем во всех немногочисленных исследованиях кожи был обнаружен вирус (4,0-5,4 lg ООЕ/г) по прошествии 7 и 10 суток п.и.

Обращает на себя внимание факт отсутствие возбудителя заболевания в крови у всех исследованных подопытных животных по прошествии 3, 7, 10, 11, 12, 20, 35 суток п.и. Кроме того, авторы приводили дополнительный забор крови животных для вирусологического изучения (по прошествии 1 суток п.и. у 12 особей; по прошествии 2 суток п.и. у 11; по прошествии 3 суток п.и. у 12; по прошествии 5 суток п.и. у 12; по прошествии 9 суток п.и. у 1) и при этом также ни в одном случае не обнаружили в ней патоген.

Основные подробные исследования динамики накопления VARV по органам и тканям приматов, инфицированных через дыхательный тракт, были связаны с вышепредставленными работами. Однако некоторые ученые [83] предоставили сведения по накоплению VARV в глоточных смывах у *M. fascicularis* после их заражения сочетанным способом (в/в и а/з) одним из штаммов Harper или India данного вируса в огромной дозе: 9 lg БОЕ. При этом отмечено, что вирус наиболее часто обнаруживается в этих смывах уже по прошествии 1-3 суток п.и. (до 2 lg БОЕ/мл), и концентрации его в

Таблица 1.3 - Данные по аккумулярованию возбудителя натуральной оспы (штамм Higgins) в образцах\* от аэрозольно инфицированных *Macaca mulatta*, по данным Westwood et al. (1966) [80]

Вид образцов от обезьян	Инфекционный титр вируса (lg ООЕ/мл) в образцах от приматов (n=4) в разные периоды заболевания и промежутки времени (сутки) после заражения:											
	0	3	7	8	9	10	11	12	15	20	25	35
Кровь	Н.д.	-	-	Н.д.	Н.д.	-	-	-	Н.д.	-	Н.д.	-
	Н.д.	Н.д.	-	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	-	Н.д.	Н.д.	Н.д.	-
	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	-	Н.д.
	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.
Легкие	-	7,0	4,9	4,6	-	7,2	9,4	-	-	-	-	-
	-	6,2	4,0	5,2	-	Н.д.	Н.д.	-	-	Н.д.	-	-
	Н.д.	6,6	4,5	5,6	7,7	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	-	Н.д.
	Н.д.	7,2	3,4	Н.д.	4,2	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.
Внутригрудной лимфоузел	Н.д.	Н.д.	-	-	-	-	Н.д.	-	-	Н.д.	-	Н.д.
	Н.д.	Н.д.	-	-	-	Н.д.	Н.д.	-	Н.д.	Н.д.	-	Н.д.
	Н.д.	2,5	-	-	4,8	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.
	Н.д.	-	-	Н.д.	-	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.
Селезенка	Н.д.	-	2,5	-	-	-	7,1	-	-	Н.д.	-	Н.д.
	Н.д.	2,2	1,6	-	-	Н.д.	Н.д.	-	Н.д.	Н.д.	-	Н.д.

### Продолжение таблицы 1.3

[illegible]

\*Органы и ткани в составе гомогенатов, а также кровь

ряде случаев достигали максимальных величин (до 4,5 lg БОЕ/мл) по прошествии 5–10 суток п.и. Затем происходило постепенное падение величины этого показателя до 0 lg БОЕ/мл к 20-м суткам п.и. У погибших животных огромные концентрации патогена (более 9 lg БОЕ/г) были зарегистрированы в надпочечниках, почках, селезенке и печени, тогда как в головном мозге она была существенно ниже: 5 lg БОЕ/г.

Ряд исследователей [131] провел также изучение по накоплению генетического материала VARV (штамм Harper) с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией - ОТ-ПЦР (геном/г ткани) в различных органах (печень, селезенка, костный мозг, лимфоузел, легкое сердце, почка, яичко, головной мозг и кровь) у *M. fascicularis* после в/в введения вируса в двух дозах (8 и 9 lg БОЕ). В этом случае было зафиксировано, что у животных, инфицированных вирусом в дозе 8 lg БОЕ, вирусная ДНК выявлялась в высоких концентрациях в крови в разгар клинических проявлений  $10^5$ /г, а в печени и селезенке уже по прошествии 1 суток п.и. величина ее концентрации превысила  $10^8$ /г и прогрессивно снижалась к 11-м суткам п.и. ( $<10^6$ /г). Максимальных значений ( $>10^9$ /г) этот показатель достиг в костном мозге приматов по прошествии 3 и 5 суток п.и. и семенниках по прошествии 5 суток п.и., тогда как концентрация вирусного генетического материала в лимфоузлах оставалась длительное время не на высоком уровне ( $10^6$ – $10^7$ /г). При этом в поздние сроки (по прошествии 9–11 суток п.и.) вирусная ДНК продолжала выявляться только в коже. При инфицировании же *M. fascicularis* VARV в максимальной дозе (9 lg БОЕ) регистрировали более высокие величины концентраций ДНК вируса в разных органах и тканях (особенно у павших), чем те, которые наблюдали у животных, инфицированных дозой 8 lg БОЕ. Самые высокие значения этого показателя были зарегистрированы в селезенке ( $>10^{13}$ /г). У этих животных, как и у *M. cynomolgus*, в/в инфицированных вирусом в дозе 8 lg БОЕ, первичными органами-мишенями были печень, костный мозг и селезенка.

К сожалению, в доступных для нас литературных источниках отсутствуют подробные сведения о кинетике размножения VARV по органам и тканям у людей, больных НО. Хотя такая информация была бы полезна для проведения сравнения с результатами экспериментов на низших приматах. Все же отдельные фрагментарные качественные и количественные сведения о процессе инфекции у людей имеется. Концентрация вируса в гомогенатах корочек от больных людей НО составляла 3,7–6,6

Ig ООЕ/мл или БОЕ/мл [3, 13, 117], что практически совпадало с таковой у *M. mulatta* по прошествии 10 суток после а/з заражения [80] и несколько превышало величину этого показателя при аналогичном инфицировании *M. fascicularis* (в три и более раз). У людей с обычным типом НО обнаружить вирусемию удавалось очень редко (лишь в продромальном периоде и в раннем периоде высыпаний), и в экспериментах на *M. fascicularis* также обнаруживали спорадическое появление вируса в крови в те же периоды в низких концентрациях, тогда как у *M. mulatta* такой патоген не был обнаружен в этой ткани при рассмотрении всех сроков наблюдения. Наличие VARV в носоглотке и зеве у больных людей (в глоточных смывах - 3-5 Ig ООЕ/мл) регистрировали не только при выявлении внешних признаков инфекции [17, 142, 160], но и в инкубационном периоде болезни (во 2-й его половине) [161], а также на стадии реконвалесценции [134]. В экспериментах с использованием *M. fascicularis* также было зарегистрировано наличие возбудителя болезни во все указанные периоды в нескольких биологических образцах (в носоглоточных смывах, носоглотке и полости носа) [75, 83, 94].

Таким образом, используя научную литературу, нами в следующих направлениях было установлено сходство кинетик репродукции VARV по органам и тканям *M. fascicularis* и *M. mulatta* после проведенного а/з или комбинированного (в/в и а/з) инфицирования с некоторыми имеющимися характеристиками процесса НО у людей:

- наличие события, связанного с накоплением вируса в корочках, взятых с поверхности кожи;
- значения инфекционных титров вируса в кожных корочках;
- факт наличия вируса в крови в инкубационном периоде и на ранней стадии болезни;
- факт накопления вируса на слизистой оболочке носоглотки, не только когда появлялись визуальные признаки болезни, но и в ее инкубационном периоде во 2-й его половине и на стадии выздоровления.

При этом исследователи акцентировали свое внимание на моделировании только последнего этап диссеминации VARV в организме людей при НО (репродукция вируса в органах-мишенях вторичного звена патогенеза инфекции при его попадании



в них из крови). Для этого они подвергали в/в заражению максимальными дозами вируса (8 и 9 lg БОЕ) *M. fascicularis*.

#### **1.4 Патоморфологическая картина натуральной оспы у людей и подопытных животных**

В доступных научных трудах имеются очень ограниченные сведения о патоморфологической картине НО у людей. Эти сведения представлены всего лишь в трех публикациях [52, 62, 109], в которых приведена информация по макроскопическим и гистологическим исследованиям, выполненным на органах и тканях 168 умерших от НО с обычным клиническим типом, 30 – с ранним геморрагическим клиническим типом и 13 – с поздним геморрагическим клиническим типом. Кроме того, некоторые отрывочные сведения в данном направлении приведены и в других публикациях.

Основная масса результатов патоморфологического изучения органов и тканей умерших от НО людей опубликована в научном обзоре Cann et al. (2013) [60]. В этой публикации отмечен широкий спектр человеческих органов и тканей, которые подверглись серьезным патологическим изменениям. При этом чаще всего регистрировались поражения, связанные с пролиферативными и воспалительно-некротическими процессами. При реализации второго процесса часто наблюдались кровоизлияния, которые появлялись на коже, в легких, селезенке, миндалинах, лимфатических узлах, костном мозге, печени, яичниках, яичках, почках, костях и сердце. Причем картина проявления этих изменений во многом была связана с вариантом клинического типа инфекции:

- при обычном - поражения чаще всего имели воспалительно-некротический и пролиферативный характер;
- при геморрагическом - поражения чаще всего имели воспалительно-некротического характер с геморрагиями.

Проведенное в Соединенных штатах Америки (США) гистологическое и ультраструктурное исследование хранившихся в «мокром» архиве более 50 лет образцов кожи человека, погибшего от НО, показало поражение клеток всех слоев эпидермиса и размножение вируса в кератиноцитах [66].

В очень ограниченном объеме была приведена и информация, касающаяся изучения некоторых характеристик крови у людей при НО. Обычный клинический тип заболевания часто сопровождался легкой анемией и лейкоцитозом [152], а геморрагический - лейкоцитозом с лимфоцитозом и нейтропенией при отсутствии анемии [97, 104], которая, вероятно, не успела развиться из-за быстрого наступления смерти. При обоих типах заболевания у людей многие исследователи наблюдали выраженную тромбоцитопению [89, 91, 118]. Причем при обычном клиническом типе болезни максимальный уровень снижения концентрации тромбоцитов регистрировали во время появления везикулярной сыпи, а к моменту ее перехода в стадию пустул этот показатель начинал приходить в норму [90, 104]. Отмечено небольшое снижение фактора VII свертывания крови и увеличение протромбинового времени при геморрагическом типе болезни, тогда как фактор V существенно снижался при обоих типах заболевания [91].

Учитывая то, что все испытанные виды животных (кроме приматов) оказались практически невосприимчивыми к VARV, основное внимание при проведении патоморфологических исследований было обращено на *M. cynomolgus*, которые демонстрировали сходные клинические признаки НО с таковым у человека при а/з и/или в/в инфицировании, но только большими дозами вируса. Данные макроскопических, гистологических и электронно-микроскопических наблюдений образцов, взятых от обезьян, инфицированных этим возбудителем заболевания, обобщены в таблице 1.4.

Из таблицы 1.4 видно, что достаточно полная информация о патоморфологических нарушениях в организме *M. fascicularis*, зараженных в/в VARV в огромных дозах, описана Jahrling et al. (2004) [83] и Wahl-Jensen et al. (2011) [131]. Результаты этих исследований свидетельствуют о существующем большом сходстве поражений в органах и тканях, включая кровь, этих приматов с таковыми у человека при НО. Причем при в/в введении вируса в дозе 8 lg БОЕ *M. fascicularis* воспроизводили патологические изменения, характерные для обычного типа НО у человека (в коже – очаги воспаления, гиперплазия клеток, вне- и внутриклеточные отеки; в селезенке, лимфоузлах, костном мозге - процессы гиперплазии; воспалительно-некротические изменения в яичках, семенных канальцах, коре надпочечников и печени). Тогда как

Таблица 1.4 – Данные по патоморфологии изменений у *Macaca* после инокуляции разнообразными штаммами возбудителя натуральной оспы

Номер ссыл- ки	Вид <i>Macaca</i>	Назва- ние штамма	Доза зараже- ния	Метод зара- жения	Виды основной патоморфологической картины по органам и тканям	Клетки-мишени для вируса (метод обнаружения)
53	<i>Cynomol- gus, ne- mestrina</i>	№21, 52, 167, 199, 200, 252, 307, 325, 326, 327	Не ука- зана	С/к.к.; с/к.с.; в/л; и/т; к/б	Воспалительно-некротические изменения в ко- же; пролиферативные процессы и геморрагии в лимфоузлах; отсутствие поражений печени, се- лезенки, костного мозга, почек, легких, яичек	Эпителиоциты кожи, респи- раторного тракта, пищевода, сальных и Боуменовых же- лез; эндотелиоциты (свето- вая микроскопия - по нали- чию включений)
94	<i>Irus</i>	Yamada	$5,0 \times 10^4$ ООЕ	А/з	В коже такие же, как и у людей при натуральной оспе; отсутствие изменений в носовой полости и трахее	Макрофаги и эпителиоциты (световая микроскопия - по наличию включений)
93	<i>Irus</i>	Yamada	$(1,8-3,4) \times 10^6$ ООЕ	А/з	В коже такие же, как и у людей при натуральной оспе; отсутствие изменений в легких, селезенке и других органах	Не указано
		Lee	$(5,0-10) \times 10^5$ ООЕ	А/з		

Продолжение таблицы 1.4

Номер ссыл- ки	Вид <i>Macaca</i>	Назва- ние штамма	Доза зараже- ния	Метод зара- жения	Виды основной патоморфологической картины по органам и тканям	Клетки-мишени для вируса (метод обнаружения)
81	<i>Mulatta</i>	Higgins	Не ука- зана	А/з	Некротические очаги в легких и внут- риальвеолярный отек (другие органы не изучались)	Не указано
108	<i>Cynomol- gus</i>	Не ука- зано	Более $10^8$ БОЕ	А/з	Бронхопневмония (данных по другим органам нет)	Не указано
83	<i>Cynomol- gus</i>	Harper и India 7124	$10^8$ и $10^9$ БОЕ	В/в	Дегенерация и некроз клеток кожа и меж- и внутриклеточный отек; гепато- цитарная дегенерация и дегенерация клеток почечных канальцев; системный лимфоцитарный апоптоз в лимфоидных органах; кровоизлияния на поверхности висцеральных органов; лейкоцитоз и тромбопения в крови	Макрофаги, моноциты, эндотелиоци- ты, клетки эпидермиса, Купферов- ские клетки, гепатоциты, клетки ка- нальцев почек, гистиоцитарные клетки селезенки (вирусологический, иммуногистохимический, иммуно- флуоресцентный, электронно- микроскопический)
			$10^9$ БОЕ	В/в с а/з		

Продолжение таблицы 1.4

Номер ссыл- ки	Вид <i>Masc</i>	Назва- ние штамма	Доза зараже- ния	Метод зара- жения	Виды основной патоморфологической картины по органам и тканям	Клетки-мишени для вируса (метод обнаружения)
131	<i>Cynomol- gus</i>	Harper	10 <sup>8</sup> БОЕ	В/в	По прошествии 3-5 суток после заражения: эпи- дермальная гиперплазия и отек кожи; лимфоидная гиперплазия и тромбозы в селезенке и лимфоузлах; диффузная миелоидная гиперплазия костного моз- га; интерстициальный орхит, воспаление семенных канальцев; дегенеративные изменения в коре надпочечников; некротический гепатит с бактери- ями; в крови лейкоцитоз, гипогемоглобинемия, легкая гипоальбуминемия	Эпителиоциты; гистиоциты; макрофаги, васкулярные пе- рициты, эндотелиоциты; ге- патоциты; пневмоциты; эпи- телией коры надпочечников и мочеполовых органов, мак- рофаги и клетки зародыше- вых центров селезенки; мак- рофаги и клетки подкапсу- лярной и мозговой пазух лимфоузлов; гранулоциты костного мозга; интерстици- альные клетки яичек и яич- ников и клетки дурального слоя фолликулов (иммуноги- стохимический)
			10 <sup>9</sup> БОЕ	В/в	По прошествии 3 суток после заражения: кровоиз- лияния, пролиферативные и некротические пора- жения эпидермиса; лимфоидный некроз с бактери- ями и кровоизлияния в селезенке; мультифокаль- ный лимфоидный некроз в лимфоузле; некроз и кровоизлияния в костном мозге; интерстициаль- ный орхит, воспаление семенных канальцев; деге- неративные изменения в коре надпочечников;	

Продолжение таблицы 1.4

Номер ссыл- ки	Вид <i>Масас</i> <i>a</i>	Назва- ние штамма	Доза зара- жения	Метод зара- жения	Виды основной патоморфологической картины по органам и тканям	Клетки-мишени для вируса (метод обна- ружения)
					некротический гепатит с бактериями; кровоизлияния в толстом и тонком кишечнике, мочевом пузыре, радужной оболочке глаза; интерстициальная пневмония с бактериями; в крови лейкоцитоз, гипогемоглобинемия, легкая гипоальбуминемия	
<p>Примечания</p> <p>А/з – аэрозольно</p> <p>БОЕ – бляшкообразующая единица</p> <p>В/в – внутривенно</p> <p>В/л – внутривенно</p> <p>И/н – интраназально</p> <p>И/т – интратрахеально</p> <p>К/б – прямой контактный с больным человеком</p> <p>ООЕ – оспинообразующая единица</p> <p>С/к.к. – скарификационно на коже</p> <p>С/с.с. – скарификационно на слизистых носа, рта и роговицы глаза</p>						

введение этим методом вируса в дозе 9 lg БОЕ часто приводило к более выраженным поражениям в коже, селезенке, лимфоузлах и костном мозге обезьян (фокусы некроза и кровоизлияния), а также к патологии легких (интерстициальная пневмония). Причем патоморфологические изменения в этом случае напоминали те, которые наблюдались у людей, погибших от геморрагического типа НО.

В процессе выполнения световой микроскопии и электронной органов и тканей зараженных *M. fascicularis* ученым удалось идентифицировать основные клеточные мишени для VARV (см. табл. 1.4), спектр которых очень разнообразен и, как правило, совпадает с таковым известных других ортопоксвирусных заболеваний.

Особого внимания заслуживает факт обнаружения размножения вируса в моноцитах крови обезьян [83]. Если бы это происходило у человека с обычным клиническим типом заболевания, то исследователи бы легко и регулярно выделяли возбудитель заболевания из крови, чего не было в реальности: в редком случае удавалось обнаружить вирус только в продромальном периоде заболевания и в ранней стадии высыпаний. Однако при геморрагическом типе заболевания у человека виремия была длительной и продолжалась до момента смерти, причем патоген легко выделялся из крови в значительных количествах [88, 158, 159]. Возможно, отмеченная исследователями ситуация [83], связанная с размножением вируса в моноцитах у приматов, указывает на то, что в условиях этого эксперимента *M. fascicularis* воспроизводили геморрагический тип НО у людей после в/в заражения огромной дозой VARV: 9 lg БОЕ [83, 131].

Таким образом, несмотря на низкую чувствительность приматов (*M. cynomolgus*) к VARV, при в/в и сочетанном (в/в и а/з) заражении большими дозами вируса (8 lg БОЕ) они моделировали патоморфологические изменения по многим органам и тканям (включая кровь), наблюдаемые у умерших людей после обычного типа НО, а в ряде случаев, когда инфицирование приматов осуществляли дозой 9 lg БОЕ, воспроизводился и геморрагический тип этого заболевания.

### **1.5 Использование модельного вида животных к натуральной оспе при изучении протективного действия противовирусных препаратов**

В отличие от большинства видов животных лишь приматы проявляли некоторую чувствительность к VARV при в/в или сочетанном в/в и а/з заражении и при этом воспроизводили основные внешние клинические признаки НО у человека, а также со-

ответствующие патоморфологические изменения. В этой связи в качестве единственного модельного вида животных для изучения эффективности создаваемых препаратов от данного заболевания использовали только *M. fascicularis*. Причем спектр таких исследований ограничился лишь 2 сериями экспериментов по изучению защитного действия одного химически синтезированного препарата ST-246 (блокатор формирования внеклеточного оболочечного ортопоксвируса за счет действия на вирусный протеин р37 обертывающего комплекса) [45, 67, 86] от НО при в/в введении VARV приматам такого вида в огромной дозе (8 lg БОЕ). Данные этих экспериментов в подытоженном виде представлены в таблице 1.5.

Как видно из таблицы, соединение ST-246 продемонстрировало на *M. fascicularis* терапевтическое действие даже при ежедневном пероральном приеме в течение 14 суток в малых дозах (по 10 мг/кг) начиная по истечении 2 или 4 суток п.и. вирусом [75]. Тем не менее, только в больших суточных дозах введения данного соединения (по 300 мг/кг) в течение 14-15 суток начиная сразу после инфицирования или по прошествии суток после этого исследователям удалось достичь эффекта полного отсутствия какой-либо видимой симптоматики оспоподобного заболевания [127].

Таким образом, для изучения противовирусной активности разрабатываемых химиопрепаратов от НО в настоящее время используется только одна лабораторная модель - на основе *M. fascicularis*, которую инфицируют в/в большой дозой штамма Harper KMVARV (8 lg БОЕ) с неизвестным уровнем вирулентности для человека. При этом в таком варианте экспериментов изучается только терапевтический (лечебный) эффект исследуемых средств медицинского применения.

## 1.6 Заключение

Анализ литературных данных свидетельствовал о том, что до сих пор при скрининге животных, моделирующих НО, с целью обнаружения препаратов с защитной активностью исследователи брали за основу подход на воспроизведение только внешне заметных симптомов этого заболевания у людей [16, 51, 92]. При этом в качестве модельной биологической системы, удовлетворяющей данному требованию, ученые выбрали только единственную: на основе *M. fascicularis* и штамма Harper VARV (с неизвестной величиной вирулентности для человека).



Таблица 1.5 – Данные по эффективности препарата ST-246 в экспериментах на *Macaca fascicularis* с использованием возбудителя натуральной оспы

Номер ссыл- ки	Воз- раст <i>Macaca</i>	Штамм ви- руса, спо- соб и доза заражения	Схема их введения ST-246	% животных в опыте/контроле, обладающих оцениваемой картиной забо- левания (изменение уровня ее проявления в опыте в сравнении с контро- лем)	% погиб- ших в опыте/ контроле
127	3 года	Harper, внутри- венно, $10^8$ БОЕ	П/о 300 мг/кг еже- суточн по проше- ствии 0–13 и 1–15 су- ток п.и.)	0/100 (отсутствие сыпозных проявлений, снижение уровня аккумуляции ДНК VARV в крови на 3-5 lg, выравнивание по прошествии 11 суток п.и. уровней лейкоцитов, альбумина, аспаратаминотрансферазы, алкалинфос- фатазы)	0/100 (контроль забит при агонии)
75	2,9- 6,5 года (разн овид ность Mau- ritius)	Harper, внутри- венно, $10^8$ БОЕ	П/о 10 мг/кг еже- суточно по прошествии 2–15 суток п.и.)	100/100 (снижение количества оспин по прошествии 8 суток п.и. и быстрое их исчезновение к 22 суткам п.и.; снижение уровня аккумуляции ДНК ви- руса в крови по прошествии 7-13 суток п.и., снижение концентрации виру- са в смывах из глотки по прошествии 7 суток п.и. и быстрое его исчезнове- ние к 10-м суткам п.и.; менее чем на 10 %, снижения массы тела; задержка на 1 сутки появления симптомов: лежащее положение, отсутствие реакции, одышка, кашель, выделения из носа, отек, кровотечение, увеличение лим- фатических узлов, обезвоживание и более раннее на 4 суток их исчезнове- ние; в крови более мягкое снижение уровня альбумина, отсутствие повы- шения уровня щелочной фосфатазы, азота мочевины и снижения общего белка)	0/50

Продолжение таблицы 1.5

Номер ссылк и	Возра ст <i>Масаса</i>	Штамм ви- руса, спо- соб и доза заражения	Схема их введения ST-246	% животных в опыте/контроле, обладающих оцениваемой картиной забо- левания (изменение уровня ее проявления в опыте в сравнении с контро- лем)	% погиб- ших в опыте/ контроле
			П/о 10 мг/кг еже- суточно по прошествии 4–17 суток п.и.)	100/100 (снижение количества оспин по прошествии 8 суток п.и. и быстрое их исчезновение к 22 суткам п.и.; снижение накопления ДНК вируса в кро- ви по прошествии 13 суток п.и., снижение концентрации вируса в глоточ- ных смывах по прошествии 7 суток п.и. и быстрое его исчезновение к 10-м суткам п.и.; менее чем на 10 % снижение массы тела; более раннее на 6 су- ток исчезновение симптомов заболевания; в крови более мягкое снижение уровня альбумина, отсутствие повышения уровня щелочной фосфатазы, азота мочевины и снижения общего белка)	0/50
Примечания БОЕ – бляшкообразующая единица ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота П.и. – после инфицирования П/о – перорально					

Однако данный вид животных является очень дорогостоящим и применение его в вирусологических исследованиях сопряжено с значительной трудоемкостью, что существенно затрудняет его использование в крупномасштабных статистически значимых экспериментах по оценке эффективности разрабатываемых препаратов. Кроме того, несмотря на относительно близкую к человеку клиническую картину заболевания, вызываемого VARV у *M. fascicularis*, они в 10000–100000000 раз менее чувствительны к данному патогену при заражении через респираторный тракт, чем человек: ИД<sub>50</sub> = 1,0 (0,6-1,4) lg БОЕ [19, 30]. Более того, этот вид животных применяется только для изучения терапевтической (лечебной) эффективности создаваемых противооспенных препаратов, при этом его инфицирование осуществляется в/в методом, вводя 8 lg БОЕ VARV, тогда как основные пути заражения человека этим патогеном реализуются через органы дыхательного тракта.

В то же время существует 2-е направление поиска лабораторных моделей для выявления защитного антиоспенного действия препаратов, связанное с имитированием не внешних проявлений заболевания у людей, а процесса инфекции в органах и клетках-мишенях первичного и/или вторично звена патогенеза [30, 32]. Ранее нами в опытах *in vitro* на первичных суспензионных клетках легких мышей а/б п. ICR был зафиксирован факт их восприимчивости к VARV и способности его продуцировать [19, 25, 30]. В связи с этим, базируясь на 2-м направлении, при подборе дешевых и удобных модельных биологических систем для массового скрининга разрабатываемых препаратов по противооспенному действию в экспериментах *in vivo* нами было уделено основное внимание именно на этот вид животных и на ранее нами изученный высоковирулентный в отношении человека штамм India-3a VARV: ИД<sub>50</sub> = 1,0 (0,6-1,4) lg БОЕ [19, 30].

Таким образом, целью нашего исследования явилось изучение возможности использования лабораторных моделей на основе иммунокомпетентных и иммунодефицитных мышей и высоковирулентного в отношении человека штамма VARV для скрининга перспективных антиоспенных препаратов.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты с живым VARV были выполнены в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора в лаборатории, имеющей максимальный уровень биологической защиты (BSL-4) с применением изолирующих пневмокостюмов.

### 2.1 Лабораторные животные

Для исследований были взяты следующие лабораторные животные из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора:

- мыши а/б п. ICR разнополые массой 8-10 г (10-14-суточные) в количестве около 190 особей, массой 16-19 г (18-21-суточные) в количестве около 40 особей и массой 20-24 г (42-49-суточные) в количестве около 110 особей;

- мыши и/д л. Nude разнополые массой 12-14 г (18-21-суточные) в количестве около 90 особей с генетической мутацией, проявляющейся в недоразвитии или отсутствии тимуса, что приводит к подавлению иммунных функций и низкому количеству Т-лимфоцитов.

Кроме того, для исследований брали также мышей и/д л. SCID с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (дефицит Т- и В-лимфоцитов и иммуноглобулинов) разнополых массой 12-14 г (18-21-суточные) в количестве около 160 особей, которые были предоставлены Российским национальным центром генетических ресурсов лабораторных животных, находящимся в SPF-виварии Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (СО РАН).

Уход за лабораторными животными осуществляли, используя стандартный рацион при свободном доступе к воде в условиях естественного освещения. Все процедуры с животными, включая анестезию и эвтаназию, выполняли, руководствуясь действующими документами «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» [26] и «Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных» [29], а также согласно протоколу № 1-01.2014, утвержденному биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Роспотребнадзора 28 января 2014 года.

## **2.2 Перевиваемая культура клеток**

Для работы брали перевиваемую культуру клеток Vero (клетки почки зеленой мартышки), полученную из коллекции клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Культивирование монослоя клеток осуществляли в ростовой питательной среде: питательная среда DMEM (ООО «БиолоТ», Россия), содержащая 10 % (по объему) сыворотки крови плодов крупного рогатого скота («HyClone», США), стрептомицин (100 мкг/мл) и пенициллин (100 МЕ/мл). Поддерживающая питательная среда, необходимая для наработки вируса, была сделана аналогично ростовой, с той лишь разницей, что сыворотку крови плодов крупного рогатого скота добавляли в питательную среду DMEM в объеме 2 %.

## **2.3 Первичные макрофагальные клетки селезенки мыши и метод их приготовления**

Для создания монослоя первичных клеток селезеночных макрофагов у трех мышей а/б п. ICR (10-14-суточных) после проведения эвтаназии путем дислокации шейных позвонков брали селезенку, которую подвергали гомогенизации в пробирке стеклянным пестиком и отмывали питательной средой RPMI-1640 (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия). Затем на основе ростовой питательной среды (сделанной так, как описано в п. 2.2, с той лишь разницей, что в качестве исходной питательной среды использовали RPMI-1640) готовили суспензию макрофагальных клеток, вносили по 1 мл в лунки 24-луночного культурального планшета и инкубировали их в воздушной среде с 5 % углекислого газа (CO)<sub>2</sub> при температуре 37 °С в течение 1 суток. От неприлипших ко дну пластиковых лунок клеток избавлялись, а прилипшие клетки отмывали поддерживающей питательной средой, произведенной по аналогии с тем, как отражено в п. 2.2, с той лишь разницей, что в качестве питательной среды брали RPMI-1640, а не DMEM. В этой же питательной среде держали подготовленный для исследований сформированный монослой макрофагов. Для оценки количества

клеток в лунке планшета их снимали шпателем из 4 контрольных лунок и вели подсчет, используя камеру Горяева. При этом в каждой содержалось в среднем  $9,0 (7,5-10,5) \times 10^5$  клеток. По данным световой микроскопии приготовленные макрофаги селезенки мыши в монослое сохраняли длительно жизнеспособность (7 суток) в течение инкубирования при  $34,5^\circ\text{C}$ : по прошествии 3 суток процент жизнеспособных клеток был  $\sim 98$ , а по прошествии 7 суток -  $\sim 87$ .

Кроме того, в работе использовали макрофагальный клеточный дебрис (отрицательный контроль), который готовили путем трехкратного замораживания-оттаивания монослоев селезеночных макрофагов в поддерживающей питательной среде, контролируя на отсутствие неповрежденных (живых) клеток на световом микроскопе и посевом на культуральный планшет. Введение такого отрицательного контроля обусловлено необходимостью получения информации о влиянии на инфекционный титр вируса присутствие нежизнеспособных клеток в сравнении с жизнеспособными (опыт).

## 2.4 Вирусы

В работе были использованы штаммы India-3a, 6-58, Congo-9 и Butler VARV, а также штамм Л-ИВП вируса осповакцины (*vaccinia virus* – VACV), взятые из Государственной коллекции вирусов и риккетсий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Штаммы India-3a, 6-58, Congo-9 и Butler VARV поступили в данную коллекцию в 1994 году из Научно-исследовательского института вирусных препаратов (ныне Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова») и сразу были депонированы с присвоением им регистрационных номеров: соответственно V-667, V-4, V-73 и V-27. При проведении полногеномного секвенирования этих 4 штаммов была подтверждена их подлинность. Штаммы VARV нарабатывали на клеточной культуре Vero с использованием поддерживающей питательной среды на основе DMEM в процессе культивирования в атмосфере с 5 %  $\text{CO}_2$  при температуре  $34,5^\circ\text{C}$ , а VACV – при температуре  $37^\circ\text{C}$ . На основе этих вирусных штаммов были приготовлены препараты VARV и VACV, представляющие собой вирусные суспензии в среде культивирования клеток Vero. Инфекционный титр вирусных материалов определяли

путем учета (при титровании) количества бляшек в монослое клеточной культуры Vero, рассчитывали и выражали в lg БОЕ/мл. При этом инфекционные титры штаммов VARV в приготовленных для исследований препаратах находились в диапазоне от 5,6 до 6,7 lg БОЕ/мл, а VACV - 7,0 (6,9-7,1) lg БОЕ/мл.

## 2.5 Противовирусные препараты

В опытах *in vitro* и *in vivo* с VARV была взята новая серия № 4П химического соединения, синтезированного в Новосибирском институте органической химии (НИОХ) им. Н.Н. Ворожцова СО РАН [27], ранее продемонстрировавшая противовирусное действие в экспериментах *in vitro* на VACV, вирусах оспы коров, экстремелии и оспы обезьян, а также *in vivo* на вирусах оспы коров, экстремелии и оспы обезьян: 7-[N'-(4-Трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0<sup>2,6</sup>,4]нон-8-ен-6-карбоновая кислота (НИОХ-14) [24, 30, 150]. Дополнительно в опытах *in vitro* с этим вирусом изучению подвергали химическое соединение серии № 1С, приготовленное той же организацией и ранее продемонстрировавшее низкий противовирусный эффект при использовании VACV, вирусов оспы коров, экстремелии и оспы обезьян: Гидрат N-{3,5-диоксо-4-азатетрацикло[5.3.2.0<sup>2,6</sup>.0<sup>8,10</sup>]додец-11-ен-4-ил}-2-гидроксибензамида – (НИОХ-32) [30].

Для положительного контроля брали серию №1 химического соединения с зарегистрированной антиоспенной активностью – ST-246 (4-трифторметил-N-(3,3а,4,4а,5,5а,6,6а-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етеноциклопроп[ф]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид), ранее произведенное в НИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН по представленной в патенте методике [121] с целью проведения научных исследований.

Все приготовленные лабораторные образцы химических соединений были охарактеризованы и паспортизованы. Подлинность этих препаратов была подтверждена с помощью инфракрасной спектроскопии, данными элементного анализа, включая спектры ядерно-магнитного резонанса.

Исследованию также подвергали вакцину оспенную живую сухую для накожного применения на основе штамма ЛИВП VACV, произведенную АО «НПО «Мик-

роген» (г. Томск) и ранее продемонстрировавшую высокую профилактическую активность во время последней эпидемии НО [112].

## **2.6 Метод вирусологического анализа биологических образцов**

Инфекционные титры вирусов (VARV и VACV) в биологических пробах определяли обычным стандартным в отношении поксвирусов методом, основанным на получении негативных колоний на клеточной культуре Vero (не используя агаровое покрытие) [141]. Культуру клеток выращивали до получения полного монослоя, используя 24-луночные планшеты (с посадочной концентрацией - 100 тыс. кл./мл, вводя по 1 мл в лунку) и ростовую питательную среду на основе RPMI-1640, в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С. Десятикратные разведения вирусосодержащих проб готовили на поддерживающей среде, содержащей RPMI-1640. На планшет вносили каждое разведение проб в объеме по 0,1 мл в 4 лунки. Инфицированные клетки инкубировали 6 суток в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора при 34,5 °С (при работе с VARV) и 4 суток при 37 °С (при работе с VACV). После завершения культивирования монослои клеток Vero обрабатывали раствором генцианового фиолетового и проводили подсчет неокрашенных колоний в лунках. При этом учитывали такие разведения, в которых число негативных колоний находилось в диапазоне от 10 до 100. Инфекционные титры вируса в образцах, полученных от животных и культур клеток, выражали в lg БОЕ/мл или в lg БОЕ/легкое. При этом минимальный инфекционный титр вируса, который мог быть определен в исследуемых образцах, составлял 0,4 lg БОЕ/мл и 1,1 lg БОЕ/легкое. В работах по оценке активности противоопухолевых химических соединений, в случаях, когда биологическая концентрация вируса в образцах была ниже порога чувствительности использованного метода титрования, при расчете среднего значения (М) брали 1,1 lg БОЕ/легкое: само значение порога чувствительности.

## **2.7 Методы и дозы инфицирования животных и их первичных макрофагальных клеток селезенки**

В большинстве исследований на мышах а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные) и и/д л. SCID и Nude (18-21-суточные) содержащий VARV материал вводи-



ли (после осуществления ингаляционного рауш-наркоза, проведенного с использованием диэтилового эфира) и/н в суммарном объеме 0,03 мл на обе ноздри, беря для этого соответствующие разведения этого материала. При этом мышей инокулировали данным вирусом для определения внешней симптоматики заболевания и наличия инфекционного процесса в легких. В первом случае использовали дозу VARV 5,2 lg БОЕ, а во втором – 4,2 lg БОЕ для мышей а/б п. ICR (10-14-суточные) или 5,2 lg БОЕ для мышей а/б п. ICR (42-49-суточные) и и/д л. SCID и Nude.

В экспериментах по оценке восприимчивости мышей к вирусу животным вводили его 10-кратные разведения в интервале доз от 1,2 до 5,2 lg БОЕ.

В процессе изучения кинетики аккумуляирования VARV у мышей а/б п. ICR (10-14-суточные), патоморфологической картины болезни и оценке действия противовирусных химических препаратов брали следующие дозы введения VARV: 4,2 lg БОЕ (в первом и втором случаях) и 3,7 lg БОЕ (в третьем случае). 42-49-суточных мышей той же популяции при изучении динамики инфекционного процесса в их организме заражали дозой вируса 5,2 или 4,2 lg БОЕ, а при оценке активности вакцины оспенной живой сухой для накожного применения - дозой 3,7 lg БОЕ. При изучении кинетики аккумуляирования VARV у мышей и/д л. SCID и Nude, патоморфологических изменений в органах и тканях и активности противовирусных химических препаратов использовали одну дозу инокуляции VARV: 5,2 lg БОЕ.

В единственно проведенном эксперименте на мышах а/б п. ICR (10-14-суточные), касающемся изучения возможности образования у них оспин на поверхности кожи хвоста, было сделано их заражение с помощью VARV в дозе 4,7 lg БОЕ, инокулируя материал по 0,01 мл внутривожно в область хвоста.

Заражение монослоя первичных макрофагальных клеток селезенки мышей а/б п. ICR (10-14-суточные) осуществляли с помощью VARV в дозе 0,003 или 0,017 БОЕ/кл., инокулируя материал по 0,1 мл в каждую лунку 24-луночного культурального планшета.

## **2.8 Методы приготовления образцов органов и тканей от опытных животных**

Забор образцов органов и тканей (крови крови) у инфицированных VARV мышей выполняли, предварительно осуществив процедуру эвтаназии методом церви-

кальной дислокации. При этом для вирусологических исследований готовили 10 %-е гомогенаты этих органов и тканей методом механической дезинтеграции в ступке пестиком в присутствии речного песка. В процессе изучения кинетики накопления VARV в легких животных использовали по 4 мыши на каждую точку времени, выборочно взятую в интервале от 5-10 мин до 10 суток п.и. При этом у животных брали легкие в полном объеме для приготовления гомогенатов с целью последующего вирусологического изучения каждого из них.

При проведении работ по определению восприимчивости к VARV 10-14-суточных и 42-49-суточных мышей а/б п. ICR, а также мышей и/д л. SCID и Nude и оценке активности испытываемых препаратов проводили забор легких у зараженных животных по прошествии 3 или 4 суток п.и. с целью приготовления гомогенатов и дальнейшего вирусологического изучения каждого из них. При этом для изучения чувствительности мышей к VARV брали по 4-6 животных на разведение вируса. При определении противооспенной активности химических препаратов использовали по 7 мышей а/б п. ICR (10-14-суточные) и по 8-10 мышей и/д л. SCID на исследуемый препарат и плацебо, а также 13 и 8 мышей а/б п. ICR (42-49-суточные) на вакцину оспенную живую сухую для накожного применения и плацебо соответственно.

При изучении распространения VARV по органам, тканям и крови у и/н зараженных мышей а/б п. ICR, а также и/д л. SCID и Nude было взято по 4 животных на каждую точку времени, выборочно определенную в интервале от 1 до 10 суток п.и. В отдельных случаях у мышей под действием эфирного рауш-наркоза брали кровь, используя для этого ретроорбитальный венозный синус. Путем ее центрифугирования получали сыворотку, а также сгусток форменных элементов. Причем из второго готовили гомогенат. От инфицированных мышей в ряде случаев отбирали биологический материал (носовая перегородка со слизистой, трахея, головной мозг, почки, селезенка, легкие, бифуркационные лимфоузлы, печень, поджелудочная железа и двенадцатиперстная кишка) и готовили гомогенаты. Каждый из этих образцов исследовали с помощью вирусологических методов.

При светооптическом и электронно-микроскопическом исследованиях органов и тканей и/н инокулированных VARV мышей а/б п. ICR (10-14-суточные) и и/д л. SCID забор образцов (клеток крови, головного мозга, носовой перегородки со слизистой, бифуркационных лимфоузлов, трахеи, легких, печени, поджелудочной железы, селезенки, брыжеечных лимфоузлов, двенадцатиперстной кишки, почек, надпочечни-

ков и кусочков кожи) осуществляли по прошествии 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 10 суток п.и., беря по 4 животных на каждую точку времени, в том числе контроль. В этом случае клетки крови получали вышеприведенным способом.

## **2.9 Метод изучения динамики аккумуляции вируса в первичных макрофагальных клетках селезенки мыши**

24-луночные культуральные планшеты с инокулированными VARV монослоями первичных макрофагальных клеток, полученных из селезенки мышей а/б п. ICR, закладывали в CO<sub>2</sub>-инкубатор при 34,5 °С. Для оценки инфекционного титра патогена из 4 лунок после 3-кратной заморозки-оттайки брали образцы по отдельности на каждой точке времени (по прошествии 1, 48, 72, 144 и 168 часов п.и.). С целью изучения ультратонких срезов с помощью электронного микроскопа инокулированные VARV монослои макрофагальных клеток селезенки мыши отмывали, затем снимали резиновым полисменом и приготавливали образцы.

## **2.10 Методы исследования *in vitro* цитотоксичности и противовирусного действия химически синтезированных соединений**

Для изучения цитотоксичности химических препаратов НИОХ-14 и ST-246 и их противовирусного действия в отношении VARV была применена нами приспособленная методика, требующая для использования 96-луночные пластиковые культуральные планшеты с монослоями клеточной культуры в лунках [48]. Для учета результатов были использована планшетный спектрофотометр Emax (Molecular Devices, США) и программа SoftMax 4.0 (Molecular Devices, США), которая могла автоматически рассчитывать 50 %-е токсические и ингибирующие концентрации химиопрепаратов (соответственно TC<sub>50</sub> и IC<sub>50</sub>). По соотношению TC<sub>50</sub> к IC<sub>50</sub> определяли индекс селективности (IS).

## **2.11 Схемы использования и оценочные критерии эффективности противовирусных препаратов в исследованиях *in vivo***

При работе с VARV химически синтезированными соединениями НИОХ-14 и ST-246 обрабатывали мышам а/б п. ICR (10-14-суточные) и и/д л. SCID в дозе соответственно 60 или 50 мкг/г массы однократно ежедневно за 1 сутки до заражения и в

течение 2 и 3 суток соответственно после заражения. Контрольным группам животных, инокулированных VARV, вводили раствор метилцеллюлозы с твином–80 для создания суспензий препаратов НИОХ и ST-246 по тем же схемам и способу введения, что и для химических препаратов.

При изучении привентивного действия вакцины оспенной живой сухой были взяты мыши а/б п. ICR (18-21-суточные). Данный препарат после растворения в физиологическом растворе инъецировали этим животным однократно подкожно по 0,5 мл в дозе 6,0 lg БОЕ. Контрольную группу мышей обрабатывали также, но с помощью физиологического раствора, инъецируя им в объеме по 0,5 мл. Опытную и контрольную группы мышей по прошествии 4 недель, когда возраст их достиг 42-49 дней, и/н инокулировали VARV.

Спустя 3 или 4 суток п.и. мышей, подвергнутых обработке исследуемыми химическими препаратами или вакциной, оценивали значения инфекционных титров VARV в легких, предарительно гомогенизированных, для установления коэффициента защиты от инфицирования (КЗИ). При этом данный коэффициент подсчитывали по формуле:  $\text{КЗИ} = \% \text{ мышей контрольной группы с наличием вируса в легких} - \% \text{ мышей опытной группы с наличием вируса в легких}$ . Кроме того, рассчитывали индекс подавления продукции вируса (ИППВ) в легких, который определяли по формуле:  $\text{ИППВ} = \lg \text{ инфекционного титра вируса в легких в контрольной группе мышей} - \lg \text{ инфекционного титра вируса в легких в опытной группе животных}$ .

## 2.12 Методы патоморфологических исследований

Для гистологических исследований кусочки органов и тканей фиксировали 4 %-м раствором параформальдегида. После чего обработку материала осуществляли по общепринятой методике с последовательным обезвоживанием в спиртах нарастающей концентрации, пропитыванием в смеси ксилол–парафин и заливкой в парафиновые блоки. Затем делали парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм с помощью автоматического ротационного микротомы НМ-360 (Germany). Срезы окрашивали путем обработки гематоксилином и эозином. Светооптическое исследование, а также микрофото съемку осуществляли, используя микроскоп Imager Z1 (Zeiss, Göttingen, Germany), имеющий камеру с высоким разрешением HRc. Снимки анализировали, применяя

программный пакет AxioVision Rel.4.8.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany).

Для исследований с помощью электронно-микроскопа кусочки органов и тканей дополнительно фиксировали с помощью 1 %-го раствора осмиевой кислоты, обезвоживали, используя стандартную методику в растворах этилового спирта нарастающей концентрации и ацетоне, а также заливали в смесь эпон-аралдит. На микротоме Райхерт-Янг (Австрия) выполняли ультратонкие срезы, которые контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. С применением электронного микроскопа JEM 1400 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) изучали срезы органов и тканей. При этом фотосъемку делали встроенной цифровой камерой Jeol и цифровой камерой бокового вывода Veleta (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany). Снимки анализировали, используя программный пакет iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany).

### **2.13 Статистические методы обработки экспериментальных данных**

Статистическую обработку и сравнение экспериментальных результатов осуществляли стандартными методами [5], применяя компьютерные программы в рамках пакета «Statistica 6.0» (StatSoft Inc. 1984-2001) [36]. Принятие гипотез о средних величинах ( $M$ ), о показателях рассеяния совокупностей значений, а также о законах их распределений проводили на уровне вероятности ошибки  $\leq 5\%$  ( $p \leq 0,05$ ). Тип распределения совокупностей значений оценивали, используя критерий согласия Колмогорова–Смирнова [5]. Доверительный интервал ( $I_{95}$ ) для  $M$  рассчитывали с вероятностью 95 %. Определение дисперсий для величин в выборках на однородность осуществляли, используя односторонний F-критерий для дисперсий [5].

Сравнение  $M$  инфекционных титров вируса в органах делали при нормальном распределении совокупностей значений, применяя двусторонний  $t$  критерий Стьюдента и учитывая характер дисперсий и объемы выборок. Кроме того, параллельно с целью повышения надежности результатов, осуществляли сравнение  $M$  для значений в выборках, используя непараметрический односторонний или двусторонний  $U$ -критерий Манна-Уитни [5]. Когда не было возможности провести определение нор-

мальности распределения в выборках, сравнение  $M$  совокупностей осуществляли только, применяя непараметрический двусторонний  $U$ -критерий Манна-Уитни.

Сравнение долей зараженных мышей в группах осуществляли 2 разными способами: используя двусторонний критерий  $\chi^2$  и точный тест Фишера [5, 36]. Для каждой категории мышей рассчитывали значения  $ID_{50}$ , которые выражали десятичными логарифмами бляшкообразующих единиц ( $lg$  БОЕ), представляли в виде  $M \pm I_{95}$  (где  $M$  – среднее,  $I_{95}$  – 95%-й доверительный интервал), определяли доверительные границы ( $M - I_{95}$  и  $M + I_{95}$ ) и сравнивали по методу Спирмена-Кербера [5].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3 ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ МОДЕЛЕЙ К НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЕ НА ОСНОВЕ МЫШЕЙ ДЛЯ СКРИНИНГА ЭФФЕКТИВНЫХ АНТИОСПЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

#### 3.1 Экспериментальная оценка чувствительности мышей к возбудителю натуральной оспы

Проведенный многими исследователями скрининг различных видов животных с целью выявления тех, которые имеют высокую чувствительность к VARV по результатам выявления внешней симптоматики заболевания, сходной с таковой у человека, оказался слабо эффективным. Поэтому в своей работе мы сконцентрировали свои усилия не на визуальных признаках болезни, а на исследовании процесса инфекции в легких (основной орган-мишень для VARV на начальном этапе инфекции) приемлемых для нас видов животных при и/н заражении VARV с целью выбора из них наиболее перспективных для последующего использования при скринировании антиоспенных препаратов. Ранее нами отмечалось, что первичные суспензионные клеточные культуры легких, приготовленные с использованием мышей а/б п. ICR, восприимчивы к VARV и обладают способностью размножать данный патоген в опытах *in vitro* [19, 25, 30]. Основываясь на этом, в данной работе был задействован именно этот вид животных: с нормальной и подавленной иммунными системами (мыши а/б п. ICR 10-14-суточные и 42-49-суточные, а также и/д л. SCID и Nude 18-21-суточные). Для заражения мышей использовали штамм India-3a VARV, изолированный от больного человека в Азии (Индия) в период последней эпидемии НО (в 60–70-х годах прошлого столетия) и обладающий высокой вирулентностью для людей по прогнозным данным:  $ID_{50} = 1,0 (0,6-1,4) \lg \text{ БОЕ}$  [19, 30], полученным с учетом чувствительности к VARV первичных культур клеток людей и мышей а/б п. ICR, а также этих мышей при и/н заражении таким патогеном. При этом инокуляцию животных вирусом выполняли и/н способом, что в основном имитировало ведущие механизмы передачи НО от человека к человеку (а/з и контактный), которые реализуются обычно через дыхательный тракт во время эпидемий [2, 132, 136].

Перед началом экспериментов на мышах а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные), а также и/д л. SCID и Nude были обследованы некоторые образцы сыво-

ротки крови этих животных на наличие антиоспенных антител. Для этого использовали ранее описанную реакцию нейтрализации VACV в монослое клеточной культуры Vero. Ни у одной из мышей исследованных категорий в рамках проведенных опытов не было обнаружено искомых специфических антител в сыворотках их крови. Это указывало на то, что планируемые для экспериментов животные в период их жизни никогда не встречались с ортопоксирусными инфекциями. В связи с этим все исследованные категории мышей были задействованы в дальнейшей работе с VARV.

Первоначально нами была выполнена работа, связанная с оценкой чувствительности 4 категорий мышей по 6 в каждой (а/б п. ICR 10-14-суточные и 42-49-суточные, а также и/д л. SCID и Nude 18-21-суточные) к VARV (штамм India-3a), с целью выявления у них каких-либо внешних признаков заболевания, включая гибель. Для этого животных и/н инокулировали вирусом, используя только одну дозу: 5,2 lg БОЕ.

По результатам проведенных экспериментов не было выявлено визуальной симптоматики ни у одного животного из 4 групп и тем более эффекта гибели от использованной дозы и/н введения VARV. То есть в этой ситуации нам не удастся определить для мышей ни ИД<sub>50</sub> вируса по наличию видимых признаков заболевания, ни тем более ЛД<sub>50</sub>. В связи с этим была сделана серия экспериментов по оценке у этих животных ИД<sub>50</sub> VARV с учетом регистрации его наличия в легких, базирующаяся на принципах, описанных ранее [28]. Для оценки величины этого показателя сначала необходимо было провести изучение динамики накопления вируса в легких мышей с целью подбора временной точки, когда инфекционный титр вируса в этом органе приобретет максимальное значение. При этом каждую группу животных (мыши а/б п. ICR 10-14-суточных и 42-49-суточных, а также и/д л. SCID и Nude 18-21-суточные) и/н обрабатывали максимально возможными дозами VARV (4,2 или 5,2 lg БОЕ) и через разные промежутки времени (от 5-10 мин до 10 суток п.и.) у них брали легкие и оценивали накопление в них вируса. В таблице 3.1 нами приведены результаты таких исследований.

По данным таблицы видно, что в легких 10-14-суточных мышей а/б п. ICR, и/н инфицированных VARV в дозе 4,2 lg БОЕ, по прошествии 2-3 суток п.и. патоген достиг максимальных значений (4,8 lg БОЕ). Причем факт размножения VARV у животных в этом органе подтверждался тем, что по прошествии 1 суток п.и. количество



Таблица 3.1 – Данные по аккумулярованию возбудителя натуральной оспы (штамм India-3a) в легких мышей аутбредной популяции (а/б п.) ICR и иммунодефицитных линий (и/д л.) SCID и Nude, интраназально инокулированных дозой вируса 4,2 или 5,2 lg БОЕ

Категория мышей	Возраст мышей	Доза за- ражения, в lg БОЕ	Инфекционный титр вируса в легких мышей, lg БОЕ/легкие, М (I <sub>95</sub> ) для n=3, по про- шествии разного время после заражения:						
			5-10 мин	1 сутки	2 суток	3 суток	4 суток	5 суток	7 суток
А/б п. ICR	10-14 суток	4,2	3,2 (2,9-3,5)	3,2 (2,9-3,5)	4,8 (4,5-5,1)*	4,8 (4,4-5,2)*	4,5 (4,1-4,9)*	3,5 (3,2-3,8)	1,3 (0,9-1,7)
А/б п. ICR	42-49 суток	5,2	3,9 (3,5-4,3)	3,4 (3,1-3,8)	2,7 (2,2-3,2)	5,0 (4,5-5,5)*	4,2 (3,1-4,5)*	Н.д.	4,2 (3,8-4,6)*
И/д л. SCID	18-21 сутки	5,2	Н.д.	3,9 (3,6-4,2)	4,8 (4,5-5,1)*	4,6 (4,2-5,0)*	4,5 (4,2-4,8)*	4,4 (4,1-4,7)	3,5 (3,1-3,9)
И/д л. Nude	18-21 сутки	5,2	Н.д.	3,5 (3,1-3,9)	Н.д.	4,6 (4,3-4,9)*	Н.д.	4,3 (3,9-4,7)*	Н.д.
<p>Примечания</p> <p>БОЕ – бляшкообразующая единица</p> <p>М – среднее значение</p> <p>I<sub>95</sub> – доверительный интервал для М с вероятностью 95 %</p> <p>n – число животных</p> <p>Н.д. – не делали</p> <p>*Величина отличается от той, которая получена по прошествии 1 суток после заражения для соответствующей категории мышей, p≤0,05 (в соответствии с двусторонним t-критерием Стьюдента и U-критерием Манна-Уитни)</p>									

вируса в легких мышей (3,2 lg БОЕ) было существенно ниже таковых по прошествии 2, 3 и 4 суток п.з ( $p \leq 0,05$ ). Интересно отметить, что при применении нами стандартного метода и/н заражения мышей 10 % инокулированного вирусного материала проникает в легкие этих животных, так как доза заражения в этом эксперименте была 4,2 lg БОЕ, а количество выявленного вируса в этом органе по прошествии 5-10 мин п.и. составило 3,2 lg БОЕ.

В легких 42-49-суточных мышей а/б п. ICR, и/н инфицированных VARV в дозе 5,2 lg БОЕ, патоген достиг максимального значения (5,0 lg БОЕ) по прошествии 3 суток п.и. (таблица 3.1). Факт размножения VARV у животных в этом органе подтверждался тем, что по прошествии 1 и 2 суток п.и. количество вируса в легких (3,3 и 2,7 lg БОЕ) было существенно ниже таковых по прошествии 3, 4 и 7 суток п.и. ( $p \leq 0,05$ ). Причем в отличие от 10-14-суточных мышей у 42-49-суточных не наблюдалось резкого снижения количества вируса в этом органе по прошествии 7 суток п.и. Кроме того, при использовании нами стандартного метода и/н инфицирования мышей 20 % инокулированного вирусного материала проникала в легкие этих животных, так как доза заражения в этом эксперименте была 5,2 lg БОЕ, а количество выявленного вируса в этом органе по прошествии 5-10 мин п.и. составило 3,9 lg БОЕ.

В легких мышей и/д л. SCID и Nude, и/н инфицированных VARV в дозе 5,2 lg БОЕ, патоген достиг максимальных значений (4,5-4,8 lg БОЕ) по прошествии 2-4 суток п.и. (таблица 3.1). Факт размножения VARV у животных в этом органе подтверждался тем, что по прошествии 1 суток п.и. количество вируса в легких было существенно ниже таковых по истечении 2-4 суток п.и. для мышей и/д л. SCID ( $p \leq 0,05$ ), а также по истечении 3 и 5 суток п.и. для мышей и/д л. Nude ( $p \leq 0,05$ ).

Основываясь на результатах изучения динамики накопления VARV в легких животных разных групп (таблица 3.1), с целью определения для них величин ИД<sub>50</sub> вируса были выбраны (для наблюдения за наличием инфекционного процесса в легких) 3-е сутки п.и. для мышей а/б п. ICR (10-14-суточных и 42-49-суточных) и 4-е сутки п.и. для мышей и/д л. SCID и Nude. При этом животных инокулировали 10-кратными разведениями вируса, используя по 4-6 особей на дозу. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Данные по 50 %-м инфицирующим дозам (ИД<sub>50</sub>) возбудителя натуральной оспы (штамм India-3a), подсчитанным по наличию вируса в легких, в отношении мышей аутбредной популяции (а/б п.) ICR и иммунодефицитных линий (и/д л.) SCID и Nude при интраназальном заражении

Категория мышей	Возраст мышей	ИД <sub>50</sub> * (М), lg БОЕ	I <sub>95</sub> *	ИД <sub>50</sub> ** (М), lg БОЕ	I <sub>95</sub> **
А/б п. ICR, n=6	10-14 суток	2,7	2,3-3,1	1,7	1,3-2,1
А/б п. ICR, n=6	42-49 суток	2,8	2,4-3,2	1,8	1,4-2,2
И/д л. SCID, n=6	18-21 сутки	3,5	3,1-3,9	2,5	2,1-2,9
И/д л. Nude, n=4	18-21 сутки	3,3	2,8-3,8	2,3	1,8-2,8
<p>Примечания</p> <p>БОЕ – бляшкообразующая единица</p> <p>М – среднее значение</p> <p>I<sub>95</sub> – доверительный интервал для М с вероятностью 95 %, рассчитанный по формуле Спирмена-Кербера</p> <p>n – число животных</p> <p>*Величины подсчитаны по фактам наличия патогена в легких мышей а/б п. ICR по прошествии 3 суток после заражения и мышей и/д л. SCID и Nude по прошествии 4 суток после заражения</p> <p>**Величины рассчитаны с учетом количества апплицированного в легких мышей вируссодержащего материала (10 %), введенного мышам и/н методом</p>					

Было установлено, что процент инфицированности подопытных мышей всех категорий, отмеченный по наличию VARV в легких по прошествии 3 или 4 суток после и/н инфицирования, имел выраженную зависимость «доза-эффект», что и дало нам возможность оценить ИД<sub>50</sub> этого вируса для подопытных животных. Однако с учетом только количества апплицированного в легких мышей вирусосодержащего материала (10 %), введенного и/н методом, ИД<sub>50</sub> VARV для них должны быть существенно ниже, как минимум, на 1 lg (коэффициент), беря во внимание результаты предыдущего эксперимента (таблица 3.1). В то же время применение такого коэффициента при оценке показателей чувствительности и/н зараженных мышей ортопоксвирусом далеко не всегда возможно. Следует обратить внимание, что используемый нами способ заражения животных существенно отличался от другого, взятого некоторыми исследователями [46, 68] и основанного на введении микроколичеств вирусного материала (возбудитель оспы обезьян) на слизистую носа. Данный метод был сопряжен с эффективной первичной задержкой этого материала только в носовой полости.

Полученные нами результаты свидетельствуют об относительно высокой чувствительности взятых групп животных к VARV, оцениваемой по наличию инфекционного процесса в их легких. ИД<sub>50</sub> вируса, полученные для разных видов мышей, не отличались между собой при их сравнении методом Спирмена-Кербера. Причем величины этого показателя у них приближались к таковой у человека: 1,0 (0,6-1,4) lg БОЕ, полученной прогнозным путем [19, 30].

Большинство исследователей при оценке параметров чувствительности к VARV мышей раннего возраста при и/н и внутрибрюшинном способах инфицирования базировались в основном на обнаружении у них внешней клинической симптоматики заболевания, в том числе эффект гибели, наблюдая при этом низкую их восприимчивость к вирусу [10, 113, 120]. Тогда как наши эксперименты на мышах были сориентированы на выявление не только видимых признаков болезни, но и инфекционного процесса по результатам регистрации присутствия вируса в первичных органах-мишенях. Данный подход значительно уменьшил порог чувствительности метода определения показателя восприимчивости животных за счет возникшей возможности выявлять и бессимптомно протекающее заболевание. Это позволило нам получить ве-

личины показателя чувствительности мышей 4 исследуемых групп, оцененные по развитию у них инфекционного процесса и приближающиеся по своим значениям к таковому у человека, определенному прогнозным путем [19, 30]. Причем эти величины были почти в миллион раз ниже, чем те, которые были использованы для выявления терапевтической (лечебной) эффективности противооспенных химических соединений на модельном виде животных (*M. fascicularis*) в отношении НО [75, 127]. При этом наши ожидания, основанные на информации о повышении восприимчивости к VARV мышей с подавленным иммунитетом, искусственно созданным путем лучевой обработки  $\text{Co}^{60}$  [37], себя не оправдали в эксперименте на мышах и/д л. SCID и Nude, у которых не было отмечено ни появления признаков болезни, ни повышенных (в сравнении с мышами а/б п. ICR) количеств вируса в легких. Более того, величины ИД<sub>50</sub> у мышей и/д л. SCID и Nude оказались более высокими, хотя не достоверно, нежели у мышей а/б п. ICR. Такое несоответствие полученных результатов может быть связано с различием по уровням иммунодефицитного состояния у мышей и/д л. SCID и Nude в сравнении с мышами, облученными  $\text{Co}^{60}$ . Тем не менее, лишь единственным аргументом, подтверждающим информацию автора по облученным мышам, явился факт регистрации вируса в легких мышей и/д л. SCID и Nude в более высоких инфекционных титрах спустя 5 суток п.и., чем те, которые наблюдались у мышей а/б п. ICR (10-14-суточных).

Таким образом, показано, что инфекционный процесс у мышей а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные) и и/д л. SCID при и/н введении большой дозы штамма India-3a VARV (5,2 lg БОЕ) не вызывал у них зримых признаков болезни и, конечно, гибели. В легких мышей этих категорий по прошествии 2–4 суток п.и. происходила аккумуляция патогена в значительных концентрациях. В экспериментах при использовании штамма India-3a VARV и мышей зарегистрирована близкая по показателю ИД<sub>50</sub> и достаточно высокая их восприимчивость к этому возбудителю заболевания при и/н введении: ИД<sub>50</sub> = 2,7 (2,3-3,1) lg БОЕ для мышей а/б п. ICR (10-14-суточных), 2,8 (2,4-3,2) lg БОЕ для мышей а/б п. ICR (42-49-суточных), 3,5 (3,1-3,9) lg БОЕ для мышей и/д л. SCID (18-21-суточных) и 3,2 (2,7-3,7) lg БОЕ для мышей и/д л. Nude (18-21-суточных). Оценка указанных величин была проведена с учетом экспериментальных данных о выявлении в их легких патогена. Причем указанные значения ИД<sub>50</sub>, подсчитанные с учетом 10 %-й аппликации патогена в легких животных для примененного

нами метода и/н заражения, были близкими к таковому у человека, полученному прогнозируемым путем.

### **3.2 Распространение возбудителя натуральной оспы в организме мышей**

#### **3.2.1 Диссеминация вируса в организме мышей аутбредной популяции ICR**

Беря во внимание то, что 10-14-суточные и 42-49-суточные мыши а/б п. ICR по результатам выявления VARV в легких демонстрировали высокую восприимчивость к этому возбудителю болезни при и/н заражении (п. 3.1), близкую к таковой у людей, в дальнейшей работе нами была изучена диссеминацию данного патогена по органам и тканям мышей этих категорий после и/н инфицирования для сравнения с таковой у людей и признанного вида модельного животного (*M. fascicularis*).

На 1-м этапе была исследована кинетика аккумуляции VARV в органах, тканях и сыворотке крови 10-14-суточных мышей а/б п. ICR по прошествии 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 суток после их и/н инокуляции вирусом в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>). В таблице 3.3 даны результаты такого изучения.

При этом на размножение VARV в организме мышей этой категории указывают следующие факты:

- появление вируса в носу (носовая перегородка со слизистой), наблюдаемого по прошествии 2 суток п.и., при его отсутствии (с учетом предела чувствительности примененного метода титрования) по истечении 1 суток п.и.;
- выявление достоверно более высоких (на 1-2 lg) инфекционных титров патогена в легких, наблюдаемых по прошествии 2-4 суток п.и., по сравнению с таковым по истечении 1 суток п.и.;
- наличие вируса в головном мозге по истечении 3 суток п.и. при его отсутствии по прошествии 1 суток п.и., учитывая чувствительность примененного метода титрования).

Уже по прошествии 1 суток п.и. возбудитель заболевания был выявлен только в легких мышей. Спустя 2 суток п.и. патоген регистрировали в высоких инфекционных титрах в тканях легких и носовой перегородки со слизистой. К десятым суткам п.и. вирус не удавалось обнаружить в этих биологических материалах, используя взятый метод титрования. Тогда как в предшествующий этому срок наблюдения (7 суток п.и.) в носовой перегородке со слизистой не было отмечено падения концентрации вируса, а в легких было.

Таблица 3.3 – Данные по аккумулярованию возбудителя натуральной оспы (штамм India-3a) в организме 10-14-суточных мышей аутбредной популяции ICR, интраназально инокулированных дозой 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>)

[illegible]

## Продолжение таблицы 3.3

Вид образцов* от мышей	Инфекционный титр вируса, lg БОЕ/мл, М (I <sub>95</sub> ) для n=4, в образцах от мышей по истечении разных промежутков времени (сутки) после заражения:							
	1	2	3	4	5	6	7	10
Двенадцатиперстная кишка	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4

Примечания

БОЕ – бляшкообразующая единица

ИД<sub>50</sub> – 50 %-я инфицирующая доза, подсчитанная по фактам наличия патогена в легких животных по прошествии 3 суток после заражения

М – среднее значение

I<sub>95</sub> – доверительный интервал для М с вероятностью 95 %

n – количество мышей на одну временную точку

<0,4 - величина ниже порога чувствительности (0,4 lg БОЕ/мл) для метода титрования

\*Основные образцы в виде 10 %-х гомогенатов и сыворотка крови

\*\*Величина отличается от таковой, определенной для соответствующего органа (ткани) по прошествии 1 суток после заражения, при p≤0,05 (в соответствии с двусторонним t-критерием Стьюдента и U-критерием Манна-Уитни)



По прошествии 3 и 5 суток п.и. патоген был выявлен в относительно низких инфекционных титрах в головном мозге мышей. Причем во все сроки наблюдения начиная от 1 и до 10-х суток п.и. вирус вообще не появился в других исследованных биологических пробах: в клетках крови, сыворотке крови, трахее, пищеводе, печени, селезенке, почках, двенадцатиперстной кишке. Самые большие значения инфекционных титров VARV, превышающие 3,5 lg БОЕ/мл, были выявлены в легких по прошествии 2, 3 и 4 суток п.и. и в носовой перегородке со слизистой по истечении 2, 3, 4 и 7 суток п.и.

Учитывая то, что достаточно подробная информация о диссеминации VARV в органах и тканях именно у мышей а/б п. ICR нами уже представлена выше, на 2-м этапе был выполнен усеченный вариант такого эксперимента по числу временных точек отбора биологических проб от животных (по прошествии 1, 3, 5 суток п.и.) и видов органов, но на 42-49-суточных мышах этой же популяции. Этих мышей заражали и/н способом, вводя дозу вируса 4,2 lg БОЕ (25 ИД<sub>50</sub>). В таблице 3.4 отражены результаты таких экспериментов.

При этом выявлены объективные факты размножения VARV в организме таких мышей:

- появление вируса в носу (носовой перегородке со слизистой), наблюдаемом по прошествии 3 суток п.и., при его отсутствии (учитывая чувствительность взятого метода титрования) по истечении 1 суток п.и.;
- наличие достоверно более высокого (на 1,3 lg) инфекционного титра вируса в легких, наблюдаемого по прошествии 3 суток п.и., по сравнению с тем, который регистрировали по истечении 1 суток п.и.

По прошествии 1 суток п.и. возбудитель заболевания обнаружили только в легких мышей. По истечении 3 суток п.и. патоген регистрировали в высоких инфекционных титрах в легочной ткани и носовой перегородке со слизистой, а уже к 7-м суткам п.и. обнаруживалась тенденция падения значения этого показателя, но только в легких. Причем во все сроки наблюдения начиная от 1 и до 7-х суток п.и. вирус вообще не появлялся в других исследованных биологических пробах: в клетках крови, сыворотке крови, трахее, головной мозге, селезенке.

Таблица 3.4 – Данные по аккумулярованию возбудителя натуральной оспы (штамм India-3a) в организме 42-49-суточных мышей аутбредной популяции ICR, интраназально инокулированных дозой 4,2 lg БОЕ (25 ИД<sub>50</sub>)

Вид образцов* от мышей	Инфекционный титр вируса, lg БОЕ/мл, М (I <sub>95</sub> ) для n=4, в образцах от мышей по истечении разного времени (сутки) после заражения:			
	1	3	5	7
Клетки крови	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Сыворотка крови	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Носовая перегородка со слизистой	<0,4	4,3 (3,9-4,7)**	3,9 (3,6-4,2)**	4,1 (3,8-4,4)**
Трахея	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Легкие	3,0 (2,6-3,4)	4,3 (3,9-4,7)**	3,7 (3,4-4,0)**	3,4 (3,0-3,8)
Головной мозг	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Селезенка	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
<p>Примечания</p> <p>БОЕ – бляшкообразующая единица</p> <p>ИД<sub>50</sub> – 50 %-я инфицирующая доза, подсчитанная по фактам наличия патогена в легких животных по прошествии 3 суток после заражения</p> <p>&lt;0,4 - величина ниже порога чувствительности (0,4 lg БОЕ/мл) для метода титрования</p> <p>М – среднее значение</p> <p>I<sub>95</sub> – доверительный интервал для М с вероятностью 95 %</p> <p>n – количество мышей для одной временной точки</p> <p>*Основные образцы в виде 10 %-х гомогенатов и сыворотка крови</p> <p>**Величина отличается от таковой, определенной для соответствующего органа (ткани) по прошествии 1 суток после заражения, при <math>p \leq 0,05</math> (в соответствии с двусторонним t-критерием Стьюдента и U-критерием Манна-Уитни)</p>				

Самые большие значения концентрации VARV, превышающие 3,5 lg БОЕ/мл, были определены в легких по прошествии 3 и 5 суток п.и. и в носовой перегородке со слизистой по прошествии 3, 5 и 7 суток п.и.

Учитывая то, что нам не удалось обнаружить диссеминации VARV во вторичные потенциальные органы и ткани-мишени мышей а/б п. ICR и наличия этого вируса в традиционной системе доставки патогенов (кровеносная и лимфатическая), приводящие к генерализации инфекции, для выяснения вопроса относительно чувствительности некоторых мышечных клеток, локализованных вне дыхательного тракта, нами было выполнено 2 эксперимента.

В 1-м эксперименте четырех мышей а/б п. ICR (10-14-суточные) внутрикожно в корень хвоста инокулировали VARV относительно большой дозой: 4,7 lg БОЕ. В этом случае, кроме гиперемии кожи и припухлости на месте инъекции (рисунок 3.1), начавшихся по прошествии 6 суток п.и. и исчезнувших по истечении 10 суток п.и., не было выявлено за срок длительного наблюдения элементов сыпи, свойственных для НО. Это свидетельствует о низкой чувствительности клеток кожи к VARV, часто вызывающему у людей и модельного вида животных (*M. fascicularis*) некротические изменения в этой ткани за счет его размножения и гибели чувствительных клеток, включая кератиноциты [66, 83].

Во 2-м эксперименте необходимо было исследовать возможность репродукции VARV в первичной культуре селезеночных макрофагов мышей а/б п. ICR (10-14-суточные). С этой целью клеточные монослои каждой лунки инокулировали этим патогеном в дозе 0,003 или 0,017 БОЕ/кл., забирая образцы для вирусологического исследования по истечении 1, 48, 72, 144 и 148 часов п.и. Результаты такого опыта представлены в таблице 3.5.

Данные этой таблицы, демонстрировали размножение VARV в монослое первичной культуры селезеночных макрофагов мыши. Причем наблюдался значимый прирост инфекционного титра этого вируса по прошествии 48, 72 и 168 часов п.и. Максимального уровня аккумуляции в этой клеточной культуре патоген достигал по истечении 48 часов п.и. дозой 0,017 БОЕ/кл. и по истечении 168 часов п.и. дозой 0,003 БОЕ/кл., а в процессе проведения электронной микроскопии был подтвержден факт размножения этого вируса (рисунок 3.2).

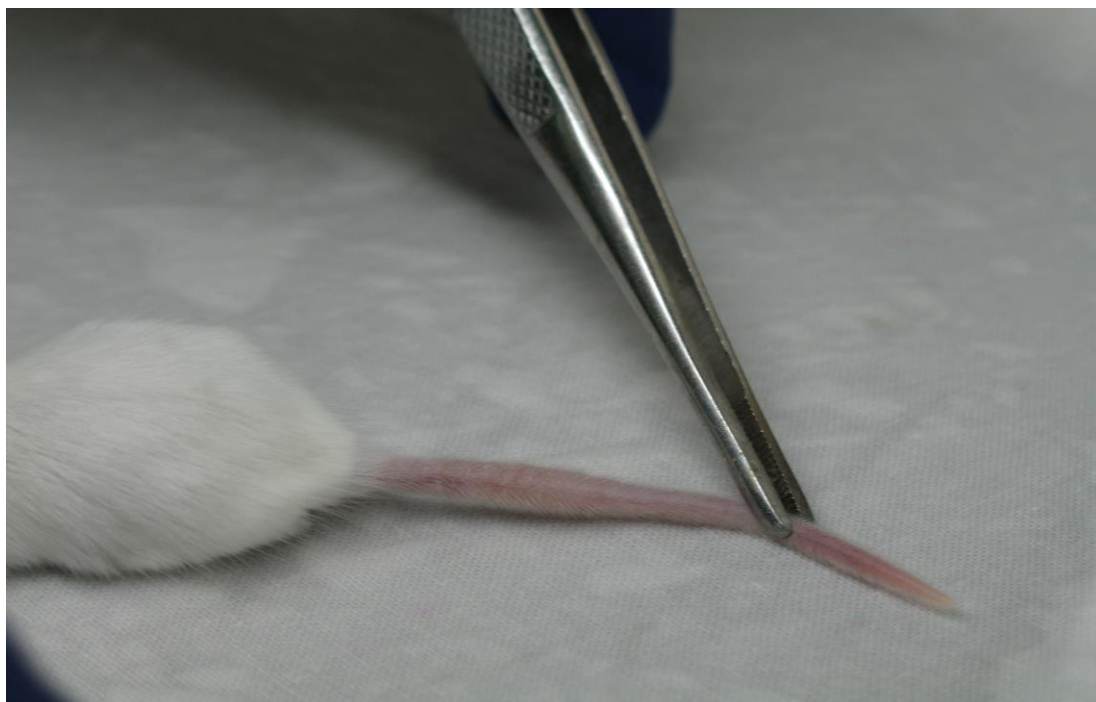


Рисунок 3.1 - Хвост 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR по прошествии 8 суток после внутрикожного инокулирования (в проксимальной части хвоста) возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 4,7 lg БОЕ: гиперемия кожи и отек на месте инъекции

Таблица 3.5 – Данные по аккумулярованию возбудителя натуральной оспы (штамм India-3a) в монослое первичной культуры макрофагов селезенки (ПКМС), по  $9,0 (7,5-10,5) \times 10^5$  кл./лунку, 10-14-суточных мышей аутбредной популяции ICR

Вид клеточной культуры	Доза заражения, БОЕ/кл.	Инфекционный титр вируса, lg БОЕ/мл, М ( $I_{95}$ ) для n=4, в ПКМС мыши по истечении разного времени после заражения:				
		1 час	48 часов	72 часа	144 часа	168 часов
ПКМС	0,017	4,1 (3,6-4,6)	5,2 (5,1-5,3)*	4,7 (4,6-4,8)*	4,0 (3,7-4,3)	4,9 (4,8-5,0)*
	0,003	3,5 (3,5-3,5)	4,1 (4,1-4,1)*	4,5 (4,5-4,5)*	3,5 (3,4-3,6)	5,3 (5,3-5,3)*
Дебрис ПКМС (контроль)	0,017**	4,1 (4,0-4,2)	3,4 (3,2-3,6)	3,2 (3,1-3,3)	1,8 (1,6-2,0)	1,4 (1,2-1,6)

Продолжение таблицы 3.5

Вид клеточной культуры	Доза заражения, БОЕ/кл.	Инфекционный титр вируса, lg БОЕ/мл, М (I95) для n=4, в ПКМС мыши по истечении разного времени после заражения:				
		1	48	72	144	168
	0,003**	3,5 (3,5-3,5)	1,7 (1,5-1,9)	1,8 (1,7-1,9)	<0,7	<0,7
<p>Примечания</p> <p>&lt;0,7 – значение ниже порога чувствительности (0,7 lg БОЕ/мл) для метода титрования</p> <p>М – среднее значение</p> <p>I<sub>95</sub> - доверительный интервал для М с вероятностью 95%</p> <p>n – количество образцов для одной временной точки</p> <p>*Величина выше, чем таковая по прошествии 1 час после заражения той же дозой, при <math>p &lt; 0,05</math> (в соответствии с двусторонним t-критерием Стьюдента и U-критерием Манна-Уитни)</p> <p>**Величина определена в расчете на первоначальное количество клеток в смеси до их разрушения</p>						

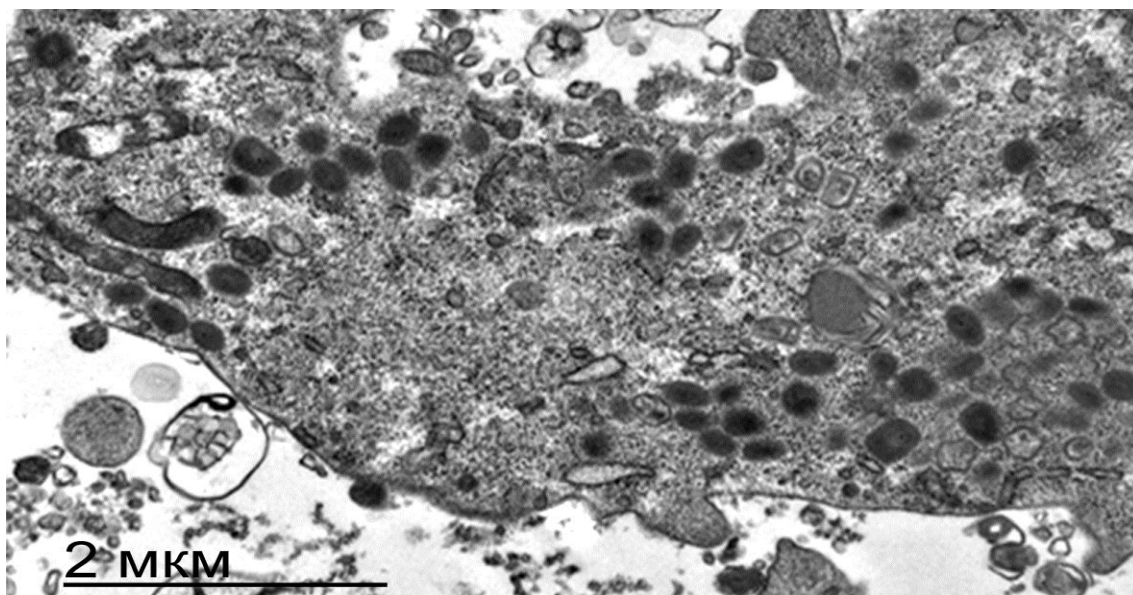


Рисунок 3.2 – Электронограмма макрофага из монослоя первичной культуры макрофагов селезенки 10-14-суточных мыши аутбредной популяции ICR по прошествии 144 часов после инокулирования возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 0,003 БОЕ/кл.: признаки размножения вируса, зрелые вирионы в цитоплазме клетки

Эти эксперименты, выполненные на внутрикожно зараженных мышах и на их инфицированной первичной культуре макрофагов селезенки, свидетельствовали о том, что, с одной стороны, кератиноциты этих животных не чувствительны к VARV, и, с другой стороны, макрофаги селезенки являются чувствительными клетками и способными продуцировать данный патоген.

Сравнивая в общем виде результаты исследований динамики накопления VARV в биоматериалах от мышей а/б п. ICR 42-49-суточных и мышей ICR 10-14-суточных той же популяции (таблицы 3.3 и 3.4), необходимо отметить их большое сходство, не беря во внимание 2 единичных факта присутствия патогена в низких концентрациях в головном мозге только у 10-14-суточных животных. Хотя и логично было бы ожидать повышенные инфекционные этого вируса в органах и тканях мышей раннего возраста, учитывая информацию некоторых ученых о более высокой чувствительности таких животных по сравнению с взрослыми [10, 14, 113].

Обращает на себя внимание то, что, кроме органов респираторного тракта, практически ни в одном биоматериале от мышей нам не удалось обнаружить VARV (не считая редких случаев его появления в головном мозге) в течение всего срока наблюдения (таблицы 3.3 и 3.4). Это говорит о том, что данный инфекционный процесс у этих животных не имеет генерализации и ограничен лишь первичными дыхательными органами-мишенями. Примерно аналогичная картина течения инфекции была отмечена у мышей той же популяции, и/н инфицированных штаммом A/Aichi/1/68 (H3N2) вируса гриппа, адаптированным к этим животным [6].

Отсутствие размножения VARV во вторичных органах-мишенях у и/н зараженных мышей может быть вызвано, как минимум, одной или двумя причинами:

- первая, отсутствием вируса в системе его доставки (лимфатическая и/или кровеносная) от первичных органов-мишеней к вторичным, традиционным для ортопоксвирусов [47, 56, 79];
- вторая, низкая чувствительность к вирусу или ее отсутствие у клеток вторичных экстра респираторных органов-мишеней (традиционных для ортопоксвирусов).

Если говорить о первой причине, то основания для ее существования есть: ни в одном случае нам не удалось обнаружить патоген в крови и лимфоузлах у и/н зараженных мышей (таблицы 3.3 и 3.4). Возможно, значительное снижение (или отсут-

ствие) роли лимфогенного пути в диссеминации данного патогена в организме мышей связано с несовершенством лимфатической системы у этого вида животных [96, 148, 162]. В то же время, учитывая относительно низкий уровень чувствительности использованного нами метода титрования и относительно редко проводимый забор биоматериалов у этих животных (по прошествии 24 часа и более), не исключена возможность постоянного или спорадического присутствия VARV в крови и лимфе в низких концентрациях. Если это так, то можно думать, что клетки вторичных традиционных для ортопоксвирусов экстрареспиаторных органов-мишеней являются низко чувствительными или не чувствительными к VARV (вторая причина). Для проверки этого предположения нами были проведены исследования на внутрикожно зараженных вирусом мышах и на их инфицированной первичной культуре макрофагов селезенки (таблица 3.5 и рисунки 3.1 и 3.2). Результаты исследований, выполненных на первичной культуре макрофагов селезенки мышей, свидетельствовали о том, что эти клетки являются чувствительными и способными продуцировать данный патоген. Такой факт подтверждает то, что причина отсутствия размножения VARV во вторичных органах-мишенях у и/н зараженных мышей, скорее всего, обусловлена отсутствием патогена в системе его доставки (лимфатическая и/или кровеносная) от первичных органов-мишеней к вторичным.

Тем не менее, VARV был дважды зарегистрирован в очень низких концентрациях в головном мозге и/н инфицированных мышей а/б п. ICR (таблица 3.3). Если учесть предыдущие рассуждения, то кратковременное размножение вируса в этом органе у и/н зараженных животных может быть вызвано, вероятно, его проникновением туда, как это отмечено для многих нейротропных вирусов, только через обонятельный тракт, войдя в обонятельные нейроны (за счет рецептор-опосредованного или неспецифического эндоцитоза и последующего размножения), тела которых располагаются в обонятельной луковице головного мозга, а аксоны выходят в обонятельную область в виде специфических булав [50, 116, 138]. Тем более, что ряд исследователей обратил внимание на наличие нейротропной активности у VARV, который проявлял способность к размножению в головном мозге мышей раннего возраста при интрацеребральном инфицировании, в том числе при проведении там его серийных пассажей [10, 14, 54].

Возвращаясь к таблице 3.3, необходимо отметить, что снижение инфекционного титра VARV до неопределяемых величин, отмеченное в легких и в носу (носовая перегородка со слизистой) мышей по прошествии 10 суток п.и., вероятно, связано с действием формирующегося у них специфического иммунного ответа.

Сам факт размножения вируса в органах дыхательной системы аутбредных мышей при заражении VARV через дыхательный тракт абсолютно согласуется с таковым, наблюдаемым у людей и признанного модельного вида животных (*M. fascicularis*) [15, 83, 94]. При этом некоторые исследователи регистрировали максимальные инфекционные титры этого возбудителя заболевания в глоточных смывах людей (3-5 lg ООЕ/мл) и приматов: *M. fascicularis* (2,0-4,5 lg БОЕ/мл) [83, 160, 161], а также в гомогенатах ноздрей и носоглотки *M. fascicularis* (2,0-4,8 lg ООЕ/мл) [94] аналогично нашим результатам с накоплением вируса в носу у мышей. Но длительность нахождения патогена в верхнем отделе респираторного тракта у приматов и людей [94, 112] была лишь немного больше ( $\geq 11$  суток), чем у и/н инфицированных мышей (6-8 суток). Титры вируса в легких *M. fascicularis* при заражении их через дыхательный тракт дозой VARV 4,7 lg ООЕ имели близкие значения (3,8-5,5 lg ООЕ/мл) [94] таковым, полученным нами на мышах, и/н зараженных сходной дозой VARV (4,2 lg БОЕ). При этом не было существенных различий по длительности инфекционного процесса в легких приматов и мышей (7-11 суток).

Таким образом, результаты экспериментов по изучению кинетики диссеминации VARV (штамм India-3a) в организме мышей а/б п. ICR при и/н инокуляции дозой 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>), ориентируясь в основном на более изученных нами 10-14-суточных животных, подтвердили их сходство с отдельными опубликованными характеристиками инфекционного процесса в первичных органах-мишенях у людей и общепризнанного модельного вида животных (*M. fascicularis*) при НО: по факту аккумуляции патогена в легких и в носу, а также по его инфекционным титрам в них и длительности нахождения. Инфекционный процесс у мышей не был генерализованным и был ограничен в основном только органами респираторного тракта. У 10-14-суточных и 42-49-суточных мышей а/б п. ICR, и/н зараженных дозой 4,2 lg БОЕ (30 и 25 ИД<sub>50</sub> соответственно), выявлены органы первичного размножения VARV: легкие и нос (носовая перегородка со слизистой), где в некоторые сроки его инфекционный



титр превышал 4 lg БОЕ/мл гомогената, а также отсутствие распространения этого патогена в организме мышей по другим органам и тканям, не беря во внимание спорадическое его появление в головном мозге мышей раннего возраста в низких концентрациях (до 2,3 lg БОЕ/мл), и его полное исчезновение через 10 суток п.и. во всех исследованных пробах (по данным, полученным на мышей раннего возраста). В первичной культуре макрофагов селезенки мышей раннего возраста, инфицированной VARV, отмечен факт его репродукции в традиционных для ортопоксвирусов первичных клетках-мишенях: в макрофагах.

### **3.2.2 Диссеминация вируса в организме иммунодефицитных мышей линий SCID и Nude**

Беря во внимание, что 18-21-суточные мыши и/д л. SCID и Nude по результатам регистрации VARV в легких показали высокую к нему чувствительность при и/н заражении (п. 3.1), сходную с таковой у людей, в дальнейшем мы изучили диссеминацию этого возбудителя заболевания в организме иммунодефицитных мышей при том же способе инокуляции патогена для сравнения с таковой у людей и признанного модельного вида животных (*M. fascicularis*).

На 1-м этапе была изучена кинетика накопления VARV в органах, тканях и сыворотке крови мышей и/д л. SCID по прошествии 1, 2, 3, 4, 5, 7 суток после и/н инокуляции вирусом в дозе 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>). Результаты таких экспериментов размещены в таблице 3.6.

Полученные данные указывают на репродукцию VARV в органах и тканях инфицированных мышей, что доказывается следующими фактами:

- появлением вируса в носу (носовая перегородка со слизистой), наблюдаемым по прошествии 3 суток п.и., при его отсутствии (учитывая чувствительность взятого метода титрования) по истечении 1 и 2 суток п.и.;
- наличием значимо более высоких (на 1-2 lg) инфекционных титров вируса в легких, наблюдаемых по прошествии 2 и 3 суток п.и., по сравнению с тем, который выявляли по прошествии 1-х суток п.и.;

Таблица 3.6 – Данные по аккумулярованию возбудителя натуральной оспы (штамм India-3a) в организме 18-21-суточных мышей иммунодефицитной линии SCID, интраназально инокулированных дозой 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>)

Вид образцов* от мышей	Инфекционный титр вируса, lg БОЕ/мл, М (I <sub>95</sub> ) для n=4, в образцах от мышей по прошествии разных промежутков времени (сутки) после заражения:					
	1	2	3	4	5	7
Клетки крови	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Сыворотка крови	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Носовая перегородка со слизистой	<0,4	<0,4	2,7 (2,3-3,1)**	2,2 (1,7-2,7)**	2,0 (1,7-2,3)**	<0,4
Трахея	<0,4	3,0 (2,6-3,4)**	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Легкие	3,3 (3,0-3,6)	4,2 (3,8-4,6)**	3,9 (3,6-4,2)**	3,8 (3,4-4,2)	3,7 (3,3-4,1)	2,9 (2,6-3,2)
Головной мозг	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Пищевод	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Печень	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Селезенка	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Почки	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4

## Продолжение таблицы 3.6

Вид образцов* от мышей	Инфекционный титр вируса, lg БОЕ/мл, М (I <sub>95</sub> ) для n=4, в образцах от мышей по прошествии разных промежутков времени (сутки) после заражения:					
	1	2	3	4	5	7
Двенадцатиперстная кишка	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4

Примечания

БОЕ – бляшкообразующая единица

ID<sub>50</sub> – 50 %-я инфицирующая доза, подсчитанная по фактам наличия патогена в легких животных по прошествии 4 суток после заражения

<0,4 - величина ниже порога чувствительности (0,4 lg БОЕ/мл) для метода титрования

М – среднее значение

I<sub>95</sub> – доверительный интервал для М с вероятностью 95 %

n – количество мышей для одной временной точки

\*Основные образцы в виде 10 %-х гомогенатов и сыворотка крови

\*\*Величина отличается от таковой, полученной для соответствующего органа (ткани) по прошествии 1 суток после заражения, при p≤0,05 (в соответствии с двусторонним t-критерием Стьюдента и U-критерием Манна-Уитни)

- появлением вируса в трахее, наблюдаемом по прошествии 2 суток п.и., при его отсутствии (с учетом чувствительности используемого нами метода титрования) по истечении 1 суток п.и.

Из табличных данных видно, что уже по прошествии 1 суток п.и. патоген был найден лишь в легких мышей, затем по истечении 2 суток п.и. его зарегистрировали в высоком инфекционном титре в этом органе, а также в низком - в носовой перегородке со слизистой и трахее. К седьмым суткам п.и. вирус не проявлялся в носовой перегородке со слизистой, а его концентрация в легких в это время существенно снизилась по сравнению с той, которую наблюдали по прошествии 2, 3 и 4 суток п.и. В трахее мышей возбудитель болезни был обнаружен только 1-кратно (по прошествии 2 суток п.и.) и в относительно низком титре. Причем в весь период наблюдения (1-7 суток п.и.) вирус вообще не выявляли в других исследованных образцах: в клетках крови, сыворотке крови, головном мозге, пищеводе, печени, селезенке, почках, двенадцатиперстной кишке). Самые большие значения инфекционного титра VARV, превышающие 3,5 lg БОЕ/мл, были определены в легких по прошествии 2, 3 и 4 суток п.и., а превышающие или равные 2,0 lg БОЕ/мл, - в носовой перегородке со слизистой по истечении 3, 4 и 5 суток п.и.

Учитывая то, что достаточно подробная информация о диссеминации VARV в организме мышей и/д л. SCID была представлена выше, на 2-м этапе был выполнен урезанный вариант такого исследования по числу точек по времени забора образцов от животных (по прошествии 3, 6, 10 суток) и видов органов, но на другой линии иммунодефицитных мышей (Nude). Животных этой линии заражали и/н способом, вводя вирус в дозе 5,2 lg БОЕ (80 ИД<sub>50</sub>). Результаты таких экспериментов размещены в таблице 3.7.

В связи с отсутствием информации по аккумулярованию VARV в изучаемых органах и тканях у мышей по прошествии 1 суток п.и. невозможно утвердительно говорить о том, что легкие, носовая перегородка со слизистой и трахея продуцировали данный вирус к этому времени (таблица 3.7). Но ранее (п. 3.1) в подобном же эксперименте на мышах этой линии, но при изучении динамики накопления VARV в легких, где была взята и временная точка 1 сутки п.и., был зафиксирован факт его репродукции. И, скорее всего, прирост урожая этого патогена происходил по истечении 3 суток п.и. и в носовой перегородке, и в трахее, если экстраполировать данные об его отсутствии по прошествии 1 суток п.и. в этих биоматериалах у мышей другой и/д л.: SCID (таблица 3.6).

Таблица 3.7 – Данные по аккумулярованию возбудителя натуральной оспы (штамм India-3a) в организме 18-21-суточных мышей иммунодефицитной линии Nude, интраназально инокулированных дозой 5,2 lg БОЕ (80 ИД<sub>50</sub>)

Вид образцов* от мышей	Инфекционный титр вируса, lg БОЕ/мл, М (I <sub>95</sub> ) для n=4, в образцах от мышей по прошествии разных промежутков времени (сутки) после заражения:		
	3	6	10
Носовая перегородка со слизистой	3,5 (3,1-3,9)	3,3 (2,9-3,7)	<0,4
Трахея	2,8 (2,5-3,1)	<0,4	<0,4
Легкие	4,3 (3,9-4,7)**	4,0 (3,6-4,4)	<0,4
Головной мозг	<0,4	<0,4	<0,4
<p>Примечания</p> <p>БОЕ – бляшкообразующая</p> <p>ИД<sub>50</sub> – 50 %-я инфицирующая доза, подсчитанная по фактам наличия патогена в легких животных по прошествии 4 суток после заражения</p> <p>&lt;0,4 - величина ниже порога чувствительности (0,4 lg БОЕ/мл) для метода титрования</p> <p>М – среднее значение</p> <p>I<sub>95</sub> – доверительный интервал для М с вероятностью 95 %</p> <p>n – количество мышей для одной временной точки</p> <p>* Основные образцы в виде 10 %-х гомогенатов и сыворотка крови</p> <p>**Величина отличается от таковой, полученной для носовой перегородки со слизистой по прошествии 3 и 6 сутки после заражения, при <math>p \leq 0,05</math> (в соответствии с двусторонним t-критерием Стьюдента и U-критерием Манна-Уитни)</p>			

Сравнивая в общем виде результаты исследований динамики накопления VARV в биоматериалах от мышей и/д л. SCID и Nude (таблицы 3.6 и 3.7) и мышей а/б

п. ICR (таблицы 3.3 и 3.4), необходимо отметить их большое сходство, не беря во внимание единичные факты присутствия патогена в низких концентрациях в головном мозге у последних. Хотя и логично было бы ожидать повышенные титры вируса в органах и тканях иммунодефицитных мышей, учитывая информацию некоторых ученых о более высокой чувствительности таких животных по сравнению с иммунокомпетентными [37].

Многие выводы и предположения, сделанные в предыдущем разделе (п. 3.2.1) в процессе обсуждения результатов, полученных на мышах а/б п. ICR, могут быть перенесены и мышей и/д л. SCID и Nude. Это относится к выводам и предположениям, касающимся объяснений следующих вопросов в отношении и/н инфицированных мышей VARV:

- распространенности у них инфекционного процесса;
- возможности распространения вируса с помощью систем его доставки (лимфатическая и/или кровеносная) от первичных органов-мишеней к вторичным, традиционным для ортопоксвирусов [47, 56, 79];
- чувствительности к вирусу клеток вторичных экстрареспиаторных органов-мишеней, традиционных для ортопоксвирусов;
- снижения концентрации вируса или его исчезновения (с учетом чувствительности используемого нами метода титрования) в органах респираторного тракта на поздних сроках инфекции.

Сам факт размножения вируса в органах дыхательной системы иммунодефицитных мышей, ориентируясь в основном на более изученную нами линию SCID п.и. VARV и/н способом, соответствует таковым у людей и *M. fascicularis* [15, 83, 94]. При этом другие ученые обнаруживали максимальные инфекционные титры вируса в глоточных смывах у людей (3-5 lg ООЕ/мл) и обезьян (2,0-4,5 lg БОЕ/мл) [83, 160, 161], а также в гомогенатах ноздрей и носоглотки у последних (2,0–4,8 lg ООЕ/мл) [94] аналогично данным наших экспериментов с накоплением вируса в носу мышей. Однако длительность присутствия вируса в верхнем отделе респираторного тракта у приматов и человека [94, 112] была существенно больше ( $\geq 11$  суток), чем у и/н инфицированных мышей SCID (3 суток). Титры вируса в легких у *M. fascicularis* при заражении через дыхательный тракт дозой VARV 4,7 lg ООЕ имели близкие значения: 3,8–5,5 lg

ООЕ/мл [94] таковым, полученным нами на мышах, и/н зараженных сходной дозой VARV (5,2 lg БОЕ). Не было существенных различий по длительности инфекционного процесса в легких приматов и мышей (7-11 суток).

Таким образом, результаты исследований по изучению динамики диссеминации VARV (штамм India-3a) в организме 18-21-суточных иммунодефицитных мышей, ориентируясь в основном на более изученную нами линию SCID, при и/н инфицировании подтвердили сходство с некоторыми опубликованными показателями инфекционного процесса при НО в первичных органах-мишенях у людей и общепризнанного модельного вида животных (*M. fascicularis*): по факту накопления патогена в легких и в носу, а также по его концентрациям и частично по длительности его присутствия в них. Инфекционный процесс у этих животных не был генерализованным и ограничивался только органами респираторного тракта. У мышей и/д л. SCID и Nude, и/н зараженных дозой 5,2 lg БОЕ (50 и 80 ИД<sub>50</sub>), выявлены органы первичного размножения VARV: легкие и нос (носовая перегородка со слизистой), в которых ряде случаев его инфекционный титр в первом органе превышал 3,5 lg БОЕ/мл гомогената, а во втором - 2 lg БОЕ/мл. Отмечено также отсутствие распространения патогена в организме этих животных по другим органам и тканям, не считая одноразового его появления в трахее.

### **3.3 Патоморфологические изменения у мышей аутбредной популяции ICR и иммунодефицитной линии SCID, инокулированных возбудителем натуральной оспы**

Учитывая то обстоятельство, что подробно изученные нами в предыдущем разделе зараженные VARV (штамм India-3a) через респираторный тракт мыши а/б п. ICR (10-14-суточные) и и/д л. SCID, также как и люди или известный модельный вид животных (*M. fascicularis*), поддерживают сходный инфекционный процесс в органах дыхательного тракта (п. 3.2), в дальнейшей работе мы провели исследование патоморфологических видоизменений у этих мышей п.и. и/н способом с помощью данного возбудителя болезни для выявления уровня их сходства с таковыми у людей или *M. fascicularis*.

Светооптические и электронно-микроскопические исследования проводили, используя различные органы и ткани, взятые по прошествии 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 10 суток после и/н инфицирования мышей а/б п. ICR и и/д л. SCID дозами VARV 4,2 (30 ИД<sub>50</sub>) и 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>) соответственно. При этом у таких мышей наблюдали сходные патоморфологические изменения, которые были в основном локализованы в органах респираторного тракта и начинали проявляться достаточно рано: уже по прошествии 3 суток п.и. Данные изменения с максимальной степенью выраженности определяли по прошествии 5 и 7 суток п.и. и носили в основном воспалительно-деструктивный характер, а по прошествии 10 суток п.и. они практически не обнаруживались.

В начале и в разгар инфекционного процесса в слизистой носа у мышей регистрировали очаги вакуольной дистрофии покровного эпителия (рисунки 3.3 и 3.4). Количество клеточных слоев заметно возрастало, межклеточные промежутки выглядели расширенными. Местами прослеживался умеренный диапедез гранулоцитов и лимфоцитов. Заметных структурных изменений со стороны желез, мышечных элементов, хрящей, костных компонентов не выявлено.

При исследовании парафиновых и ультратонких срезов трахеи мышей в этот период отмечались отчетливые признаки вакуольной дистрофии эпителия (рисунки 3.5 и 3.6), сходные в целом с таковыми слизистой носа, наблюдавшимися на полутонких срезах. Кроме того, изменения эпителиальной ткани этого органа сопровождались резко выраженным отеком слизистой оболочки.

В легких все изученные образцы по прошествии 5 и 7 суток п.и. мышей а/б п. ICR и и/д л. SCID показали резко выраженные воспалительные изменения паренхимы с преобладанием интенсивного переваскулярного отека, дистрофическими изменениями бронхиального эпителия. Патологический процесс в равной мере затрагивал как стенки бронхов, так и альвеолы.



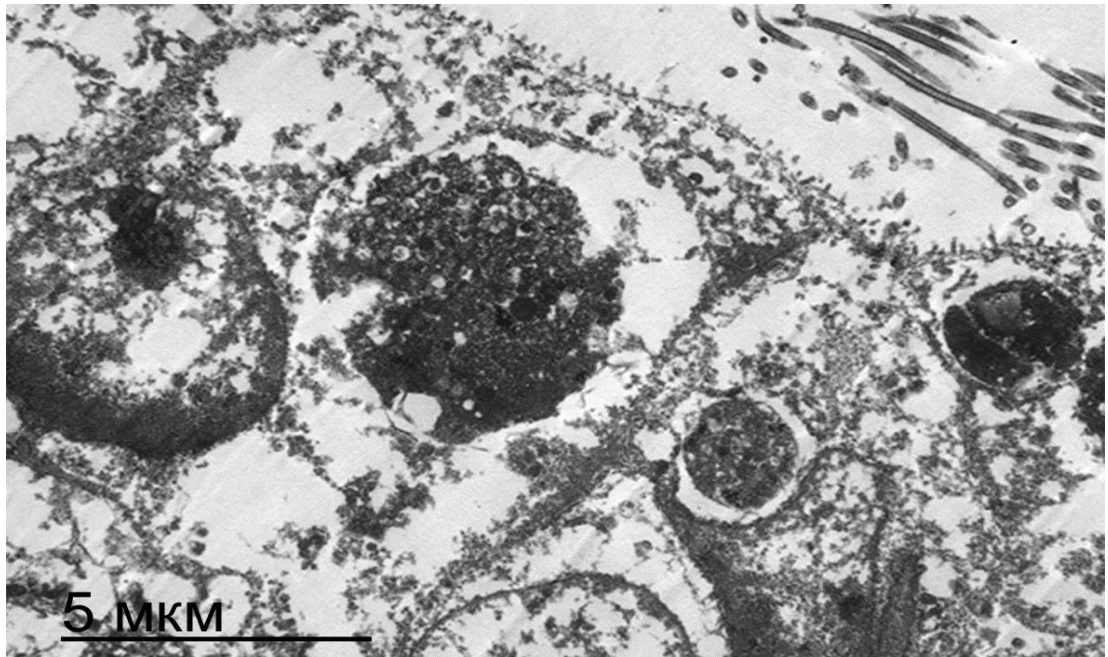


Рисунок 3.3 – Электронограмма слизистой носа 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR по прошествии 3 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>): дистрофические изменения эпителия - утрата ресничек, вакуолизация цитоплазмы эпителиоцитов

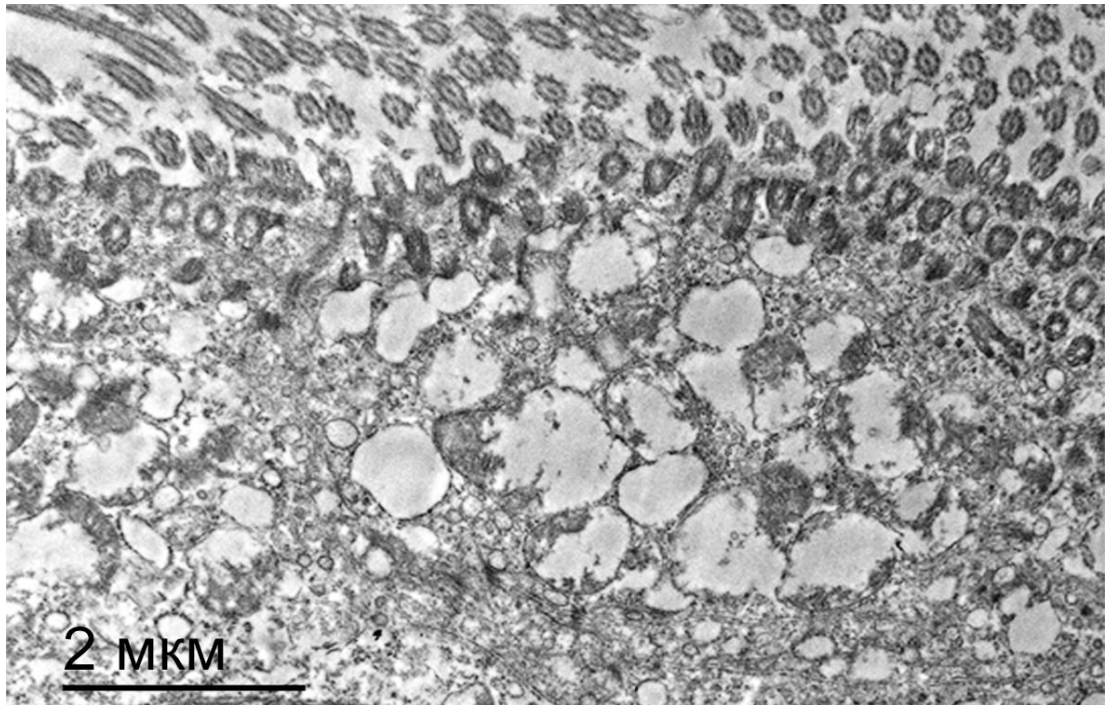


Рисунок 3.4 - Электронограмма слизистой носа 18-21-суточной мыши иммунодефицитной линии SCID по прошествии 5 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>): дистрофические изменения эпителия - утрата ресничек, вакуолизация цитоплазмы эпителиоцитов



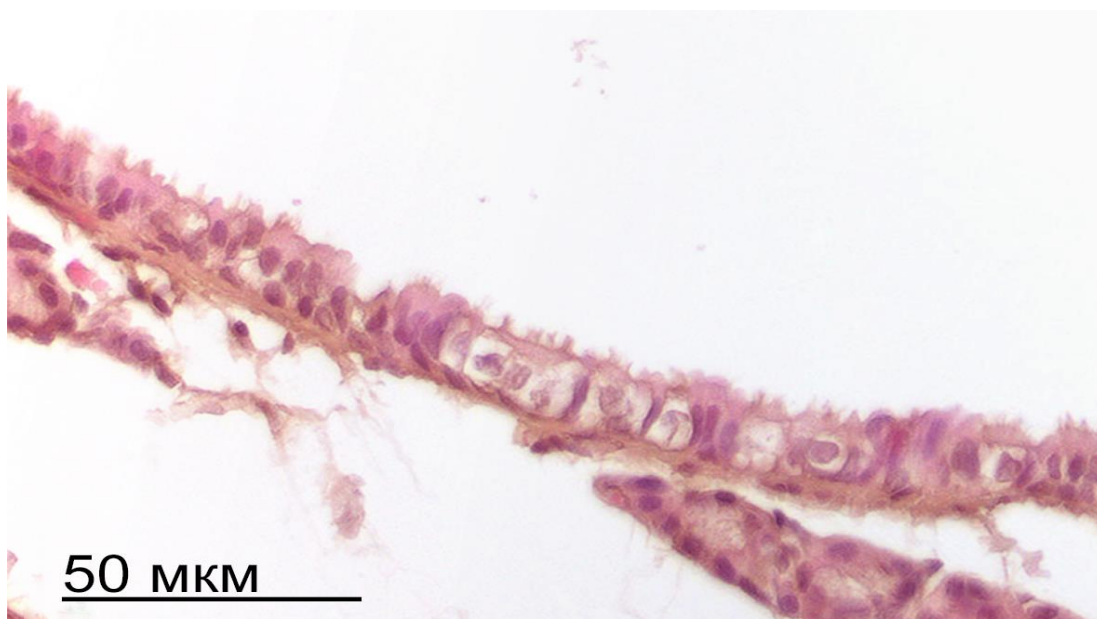


Рисунок 3.5 - Гистологический препарат (покраска гематоксилином и эозином) трахеи 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR по прошествии 3 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>): эпителиальный слой с вакуольной дистрофией эпителиоцитов

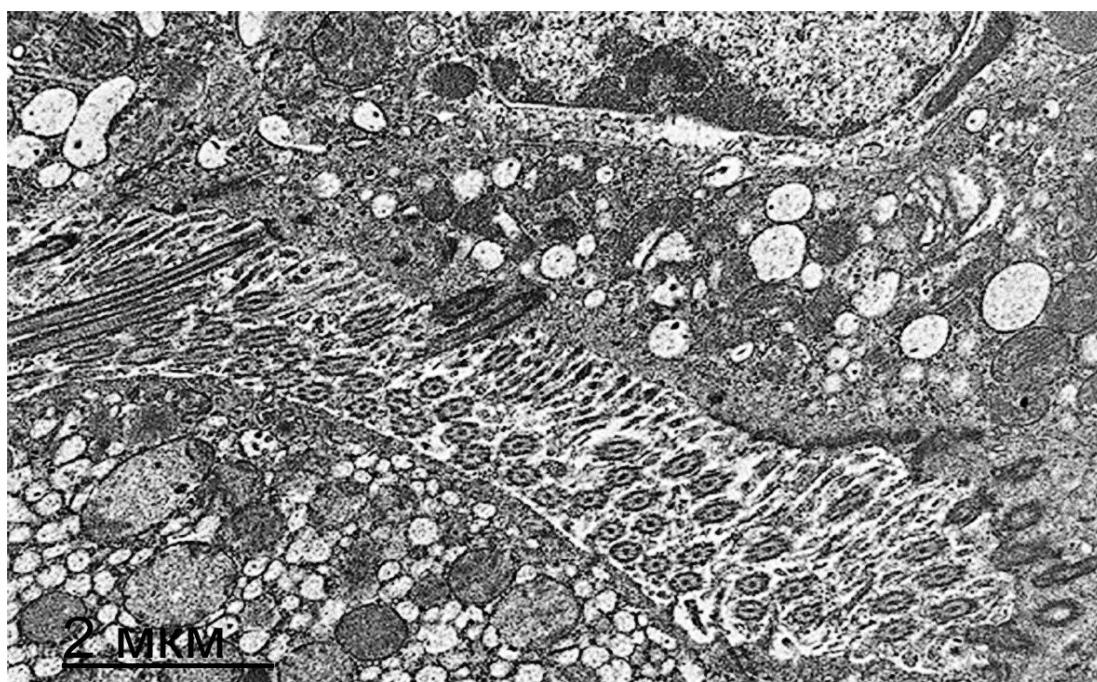


Рисунок 3.6 - Электронограмма трахеи 18-21-суточной мыши иммунодефицитной линии SCID по прошествии 3 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>): эпителиальный слой с вакуольной дистрофией эпителиоцитов

Наблюдалось заметное снижение воздушности легкого, вплоть до ателектазов (рисунки 3.7–3.10). Местами выраженная клеточная инфильтрация сопровождалась деструкцией легочной ткани. В качестве случайных образцов на препаратах были выявлены лимфатические узлы. Видимых нарушений морфологии с их стороны не найдено.

В отличие от мышей и/д л. SCID в коре мозга только у большинства мышей а/б п. ICR обнаружены локальные дистрофические изменения нейронов пирамидного слоя (рисунки 3.11 и 3.12). Клетки находились в состоянии баллонной дистрофии, межклеточные промежутки были в разной степени увеличены. Воспалительная инфильтрация отсутствовала. В клетках крови, бифуркационных лимфоузлах, печени, селезенки, поджелудочной железы, двенадцатиперстной кишки, брыжеечных лимфоузлах, почках, надпочечниках и кусочках кожи, взятых у мышей а/б п. ICR и и/д л. SCID в разные сроки, патоморфологических изменений зафиксировано не было.

Сделанный сравнительный анализ информации из научной литературы относительно патоморфологических изменений у человека и известного модельного вида животных (*M. fascicularis*) п.и. VARV через респираторный тракт [60, 62, 108] и результатов наших исследований на и/н инфицированных мышах а/б п. ICR и и/д л. SCID свидетельствовал об их большом сходстве в части картин поражения органов дыхания, носящих воспалительно-некротический характер.

При проведении электронной микроскопии органов и тканей и/н инфицированных мышей нами была предпринята попытка выявить первичные клетки-мишени к VARV. При этом основной акцент был сделан на исследование органов респираторного тракта этих животных, учитывая то, что основным и практически единственным первичным местом размножения вируса у них являются именно эти органы (п. 3.2). Однако такие исследования не увенчались успехом, что, скорее всего, объяснялось недостаточно высокой концентрацией вируса в изучаемых биоматериалах, которая во всех случаях не превышала 5 lg БОЕ/мл гомогената. Тем не менее, ранее в экспериментах *in vitro* с использованием селезеночных макрофагов 10-14-суточных мышей а/б п.



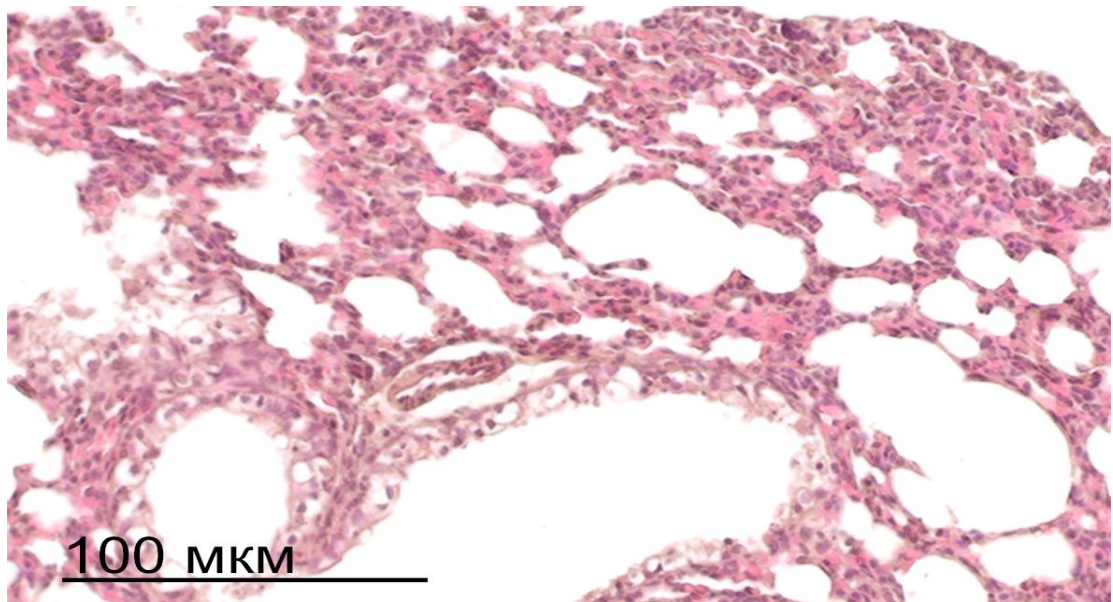


Рисунок 3.7 - Гистологический препарат (покраска гематоксилином и эозином) легкого 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR по прошествии 5 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) оспы в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>): резко выраженная воспалительная инфильтрация паренхимы с преобладанием ателектазов и интенсивный периваскулярный отек

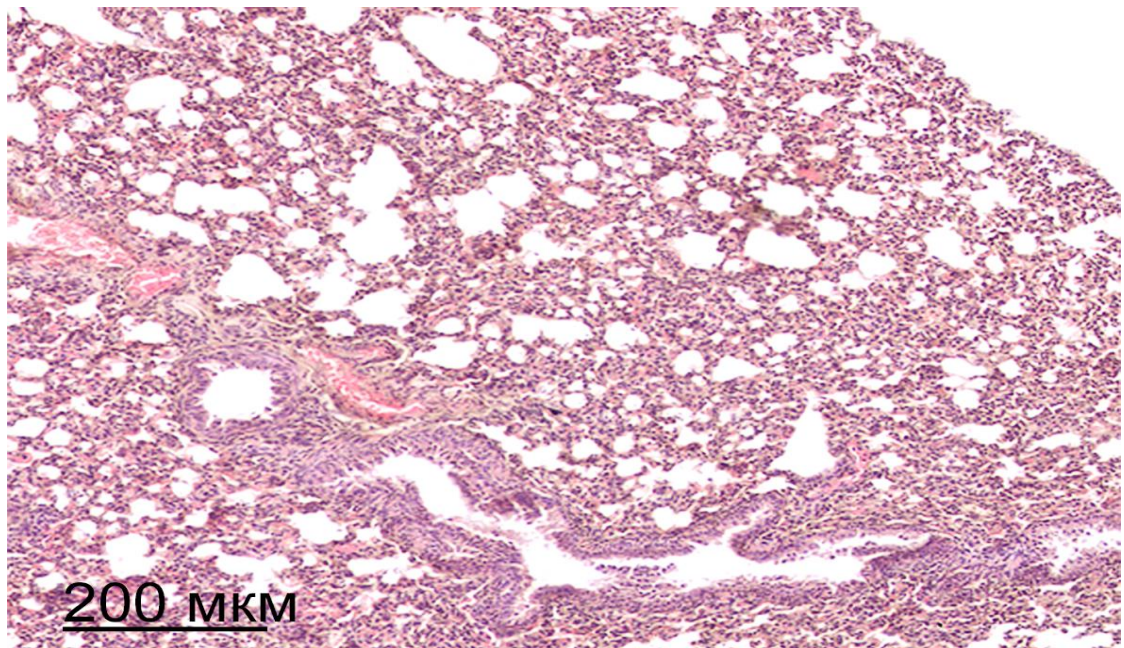


Рисунок 3.8 - Гистологический препарат (покраска гематоксилином и эозином) легкого 18-21-суточной мыши иммунодефицитной линии SCID по прошествии 5 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>): диффузный отек, полнокровие сосудов и ателектазы в зоне крупного бронха



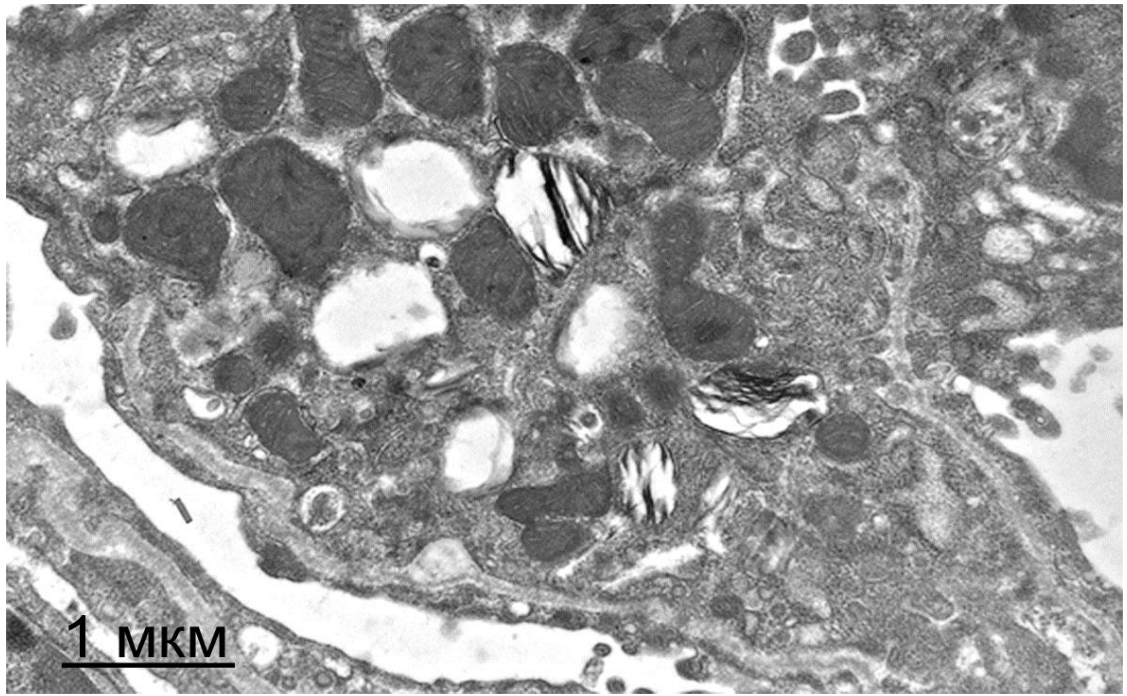


Рисунок 3.9 - Электронограмма легкого 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR по прошествии 5 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>): ателектаз ткани, пространства между альвеолами резко сужены

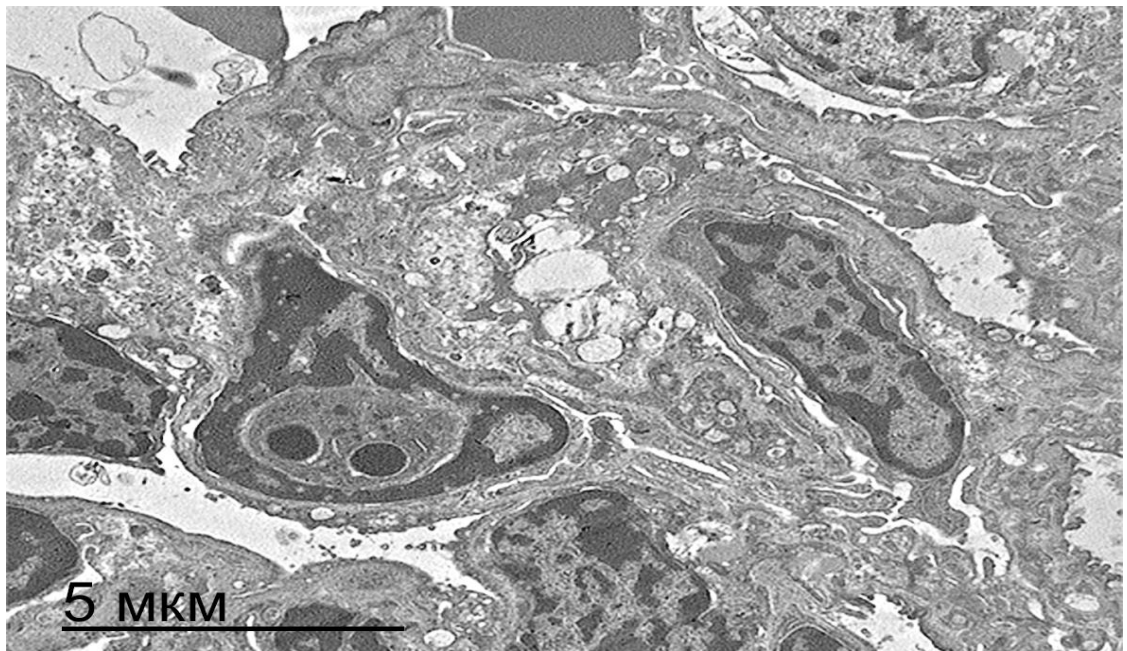


Рисунок 3.10 - Электронограмма легкого 18-21-суточной мыши иммунодефицитной линии SCID по прошествии 5 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>): ателектаз ткани, пространства между альвеолами резко сужены



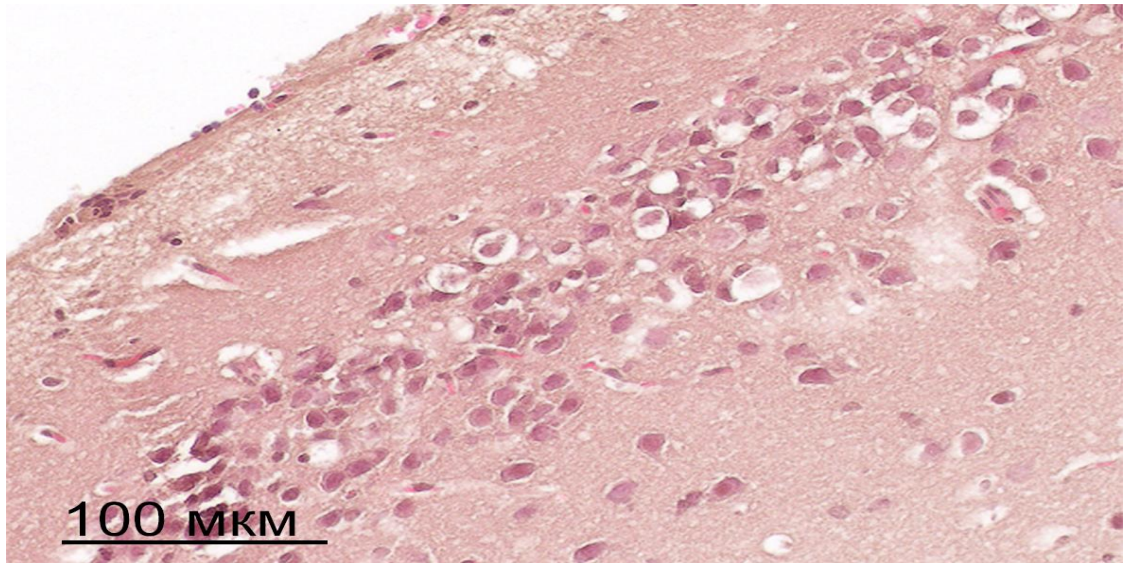


Рисунок 3.11 - Гистологический препарат (покраска гематоксилином и эозином) головного мозга 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR по прошествии 5 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>): местные дистрофические поражения нейронов пирамидного слоя; баллонная дистрофия клеток, пространства между клетками расширены

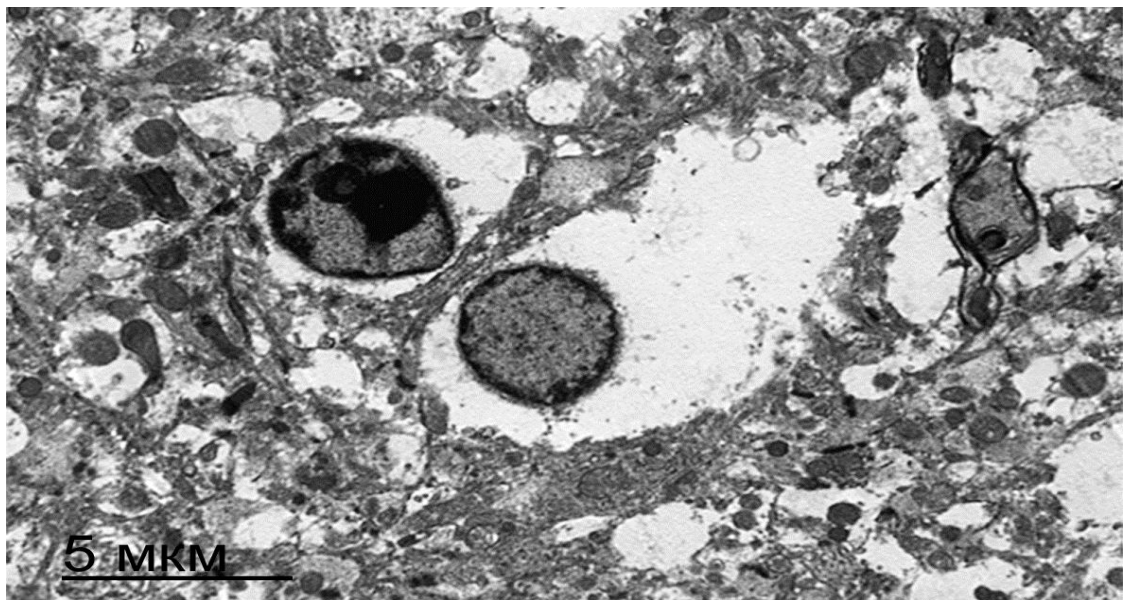


Рисунок 3.12 - Электронограмма головного мозга 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR по прошествии 5 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>): дистрофические изменения нейронов в пирамидном слое; баллонная дистрофия клеток, пространства между клетками расширены

ICR, были выявлены вирусологическим и электронно-микроскопическим методами признаки размножения VARV в таких клетках (п. 3.2.1, таблица 3.5 и рисунок 3.2). Результаты этих экспериментов вполне можно спроецировать на мышей этой популяции 42-49-суточных и на и/д л. SCID и Nude, так как все они поддерживают репродукцию вируса в одних и тех же органах респираторного тракта, а иммунодефицит, созданный у мышей последних групп, затронул лишь В и/или Т-клеточное звено иммунной системы и не вызвал каких-либо изменений у других клеток [49], в том числе в макрофагах и эпителиоцитах. С применением вирусологического метода (титрование гомогенатов носовой перегородки со слизистой и трахеи) у и/н зараженных мышей а/б п. ICR и и/д л. SCID первоначально (по прошествии 2 и 3 суток п.и.) было обнаружено аккумулялирование VARV (таблицы 3.3, 3.4, 3.6 и 3.7), что в совокупности с информацией о воспалительно-деструктивных поражениях именно слизистой дыхательного тракта этих животных указывает на вовлечение в инфекционный процесс самих эпителиоцитов. В научных публикациях, также отмечен факт наработки этого патогена в макрофагах и эпителиоцитах органов дыхания у модельного к НО вида животных (*M. fascicularis*) при а/з и/или в/в заражении (таблица 1.4) [83, 94, 131].

Таким образом, у мышей а/б п. ICR (10-14-суточные) и и/д л. SCID (18-21-суточные), и/н инфицированных VARV (штамм India-3a) в дозах 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>) и 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>) соответственно, отмечено появление патоморфологических изменений по прошествии 3 суток п.и. с последующим их нарастанием к 5 и 7-м суткам п.и. и исчезновением по прошествии 10 суток п.и., которые были ограничены в основном органами дыхательного тракта (воспалительные и некротические очаги в тканях легких, трахеи, слизистой полости носа). Данные изменения в органах респираторного тракта, наблюдаемые у мышей, напоминали таковые у человека при НО и признанного модельного *M. fascicularis* для этой инфекции. С учетом результатов патоморфологических изменений в органах дыхательного тракта мышей, вирусологических исследований, проведенных при изучении динамик накопления VARV в носовой перегородке со слизистой и трахее мышей а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные) и и/д л. SCID и Nude (18-21-суточные), и электронно-микроскопических, выполненных на первичной культуре макрофагов селезенки мыши а/б п. ICR, под-

тверждается факт существования у мышей общепризнанных для этого вируса первичных клеток-мишеней: макрофагов и эпителиоцитов респираторного тракта.

### **3.4 Оценка возможности применения мышей аутбредной популяции ICR и иммунодефицитной линии SCID для скрининга эффективных антиоспенных препаратов**

В рамках сделанного анализа научной литературы в направлении поиска модельных видов животных к НО (п. 1), исследователями был выбран лишь один, который входит в отряд приматов: *M. fascicularis* и который в основном воспроизводит клинические и патоморфологические проявления НО у человека при в/в введении патогена в огромных дозах (8 и 9 lg БОЕ) [60, 75, 83, 131]. При этом авторы успешно воспроизвели лишь последний (3-й) этап распространения VARV в человеческом организме при НО: репродукцию вируса во вторичных органах-мишенях после его проникновения туда из крови. Благодаря этому с недавнего времени начали проводиться работы с VARV по изучению противооспенной активности разрабатываемых препаратов. Причем они были сориентированы только на изучение их терапевтической (лечебной) эффективности, исходя из существующей возможности у *M. fascicularis* воспроизводить лишь последний этап распространения вируса в организме человека при НО, включая клинические и патоморфологические проявления [75, 127].

Ранее проведенный учеными поиск модельных видов животных к НО оказался слабо эффективным. Так как они при этом направили свои усилия только на выявление у подопытных животных клинических признаков болезни, близких к таковым у человека. В связи с этим в своей работе мы уделили особое внимание другому направлению: исследованию процесса и/н инфекции у наиболее приемлемого вида животных (мышь) с целью выбора из его категорий, наиболее перспективных для последующей скрининговой оценки протективной активности создаваемых противооспенных препаратов. По данной стратегии выбора модельных животных российские исследователи [30, 32, 150] разработали критерии и показатели взаимоотношения изучаемого организма с патогеном при оценке вида исследуемого животного и человека для принятия решения о степени сходства между ними. Реализуя такую страте-



гию на основе VARV, нами были сделаны необходимые для этого эксперименты на мышах 4 групп: а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные) и и/д л. SCID и Nude (18-21-суточные). Эксперименты по определению чувствительности этих животных к штамму India-3a VARV (с ранее доказанной высокой вирулентностью для человека [19, 30]) при и/н заражении показали, что ИД<sub>50</sub> патогена для мышей всех взятых групп имела относительно низкие значения, которые были близки к таковому, оцененному прогнозным путём для человека. Затем после и/н инокуляции этих животных вирусом была изучена кинетика его наработки в их организме и определены у них для этого патогена первичные органы и клетки-мишени, а также патоморфологические поражения в них, сходные с таковыми у людей и *M. fascicularis*. Результаты данных исследований в общем виде, ориентируясь только на лучше изученные нами категории мышей: а/б п. ICR (10-14-суточные) и и/д л. SCID (18-21-суточные), приведены в соответствующих патогенетических схемах (рисунки 3.13 и 3.14).

Экспериментальные данные, использованные для построения данных схем, были во многом близки к таковым, ранее представленным в научной публикациях в отношении людей и/или общепризнанного вида модельного к НО животного. При этом отсутствие у и/н инфицированных мышей а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные) и и/д л. SCID и Nude (10-14-суточные) внешних проявлений болезни, а также накопления вируса и патоморфологических поражений в экстрареспиаторных органах и тканях делает невозможным их применение в качестве модельных для изучения широкого спектра протективных свойств противовирусных препаратов.

Данное мнение подтверждается еще одним существенным различием между человеком (модельным *M. fascicularis*) и мышью: если у 1-го действует механизм лимфогенной и кратковременной гематогенной диссеминации вируса от первичных органов-мишеней к вторичным, то у 2-го существование его сомнительно. За весь период наблюдения вирус не был обнаружен ни в крови, ни в лимфоузлах мышей, а также в экстрареспиаторных органах, включая селезенку, макрофаги которой были чувствительны к этому патогену (таблица 3.5 и рисунок 3.2).

Однако данный вывод полностью блокирует только возможность применения мышей а/б п. ICR и и/д л. SCID и Nude для испытания противооспенных препаратов по лечебным схемам введения, которые сориентированы на появление клинической

Время после инф-ния (п.и.)	Динамика аккумуляции вируса в организме мышей (значение инфекционного титра вируса, lg БОЕ/мл)	Вид нарабатывающих вирус клеток	Вид патоморфологических поражений в органах и тканях	Внешние признаки болезни
0 суток	Входные ворота инфекции – органы респираторного тракта (4,2*)	Н.п.	Н.п.	Н.п.
5-10 минут	Первичные органы-мишени с апплицированным вирусом: легкие (3,2**) и нос	Макрофаги и эпителиоциты респираторного тракта	Н.п.	Н.п.
1 сутки	Легкие (2,7)	Те же клетки	Н.п.	Н.п.
2 суток	Легкие (4,6), нос – носовая перегородка со слизистой (4,8)	Те же клетки	Н.п.	Н.п.
3 суток	Легкие (4,1), нос – носовая перегородка со слизистой (3,9), головной мозг (1,3)	Те же клетки	Начало воспалительно-деструктивных изменений в легких, слизистой носа, трахее и головном мозге	Н.п.
4 суток	Нос – носовая перегородка со слизистой (3,9), легкие (3,7)	Те же клетки	Те же изменения, что и по прошествии 3 суток п.и., но более выраженные	Н.п.

Продолжение рисунка 3.13

Время после инф-ния (п.и.)	Динамика аккумуляирования вируса в организме мышей (значение инфекционного титра вируса, lg БОЕ/мл)	Вид нарабатывающих вирус клеток	Вид патоморфологических поражений в органах и тканях	Внешние признаки болезни
5 суток	Легкие (3,1), нос – носовая перегородка со слизистой (3,0), головной мозг (2,3)	Те же клетки	Выраженные воспалительно-деструктивные изменения в легких, слизистой носа, трахее и головном мозге	Н.п.
6 и 7 суток	Легкие (3,2 и 1,0), нос – носовая перегородка со слизистой (2,9 и 4,2)	Те же клетки	Те же изменения, что и по прошествии 5 суток п.и.	Н.п.
10 суток	Вирус не обнаружен ни в одном из биоматериалов	Те же клетки	Те же изменения, что и по прошествии 6 и 7 суток п.и., но менее выраженные	Н.п.

БОЕ – бляшкообразующая единица

\* Величина соответствует вводимой интраназально дозе вируса: 4,2 lg БОЕ

\*\* Величина соответствует количеству апплицированного вируса в респираторном тракте мышей сразу после интраназального заражения (п. 3.1)

\*\*\* Величина 50 %-й инфицирующей дозы, рассчитанной по наличию вируса в легких животных по прошествии 3 суток п.и.

н.п. – показатель не проявился на данную временную точку

Рисунок 3.13 - Патогенетическая схема болезни у 10-14-суточных мышей аутбредных популяции ICR, интраназально инокулированных возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) дозой 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>\*\*\*)

Время после инф-ния (п.и.)	Динамика аккумуляирования вируса в орга- низме мышей (значение инфекционного тит- ра вируса, lg БОЕ/мл)	Вид нарабатывающих вирус клеток	Вид патоморфологических поражений в органах и тканях	Внешние признаки болезни
0 суток	Входные ворота инфекции - респиратор- ный тракт (5,2*)	Н.п.	Н.п.	Н.п.
5-10 минут	Первичные органы-мишени с апплициро- ванным вирусом: легкие (4,2**) и нос	Макрофаги и эпите- лиоциты респиратор- ного тракта	Н.п.	Н.п.
1 сутки	Легкие (3,3)	Те же клетки	Н.п.	Н.п.
2 суток	Легкие (4,2) с трахеей (3,0)	Те же клетки	Н.п.	Н.п.
3 суток	Легкие (3,9), нос – носовая перегородка со слизистой (2,7)	Те же клетки	Начало воспалительно- деструктивных изменений в легких, трахее и слизистой носа	Н.п.

Продолжение рисунка 3.14

Время после инф-ния (п.и.)	Динамика аккумуляирования вируса в организме мышей (значение инфекционного титра вируса, lg БОЕ/мл)	Вид нарабатывающих вирус клеток	Вид патоморфологических поражений в органах и тканях	Внешние признаки болезни
4 суток	Легкие (3,8), нос – носовая перегородка со слизистой (2,2)	Те же клетки	Те же изменения, что и по прошествии 3 суток п.и., но более выраженные.	Н.п.
5 суток	Легкие (3,7), нос – носовая перегородка со слизистой (2,0)	Те же клетки	Выраженные воспалительно-деструктивные изменения в легких, трахее и слизистой носа	Н.п.
7 суток	Легкие (2,9)	Те же клетки	Те же изменения, что и по прошествии 5 суток п.и.	Н.п.

БОЕ – бляшкообразующая единица

\* Величина соответствует вводимой интраназально дозе вируса: 5,2 lg БОЕ

\*\* Величина соответствует количеству апплицированного вируса в респираторном тракте мышей сразу после интраназального заражения (п. 3.1)

\*\*\* Величина 50 %-й инфицирующей дозы, рассчитанной по наличию вируса в легких животных по прошествии 4 суток п.и.

н.п. – показатель не проявился на данную временную точку

Рисунок 3.14 - Патогенетическая схема болезни у 18-21-суточных мышей иммунодефицитной линии SCID, интраназально инокулированных возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) дозой 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>\*\*\*)

картины заболевания, которые формируются за счет соответствующих патоморфологических поражений, вызванных репликацией вируса во вторичных органах-мишенях, и не имеет отношения к схемам профилактическим (лечебно-профилактическим), которые, по существу, нацелены на уничтожение патогена на уровне входных ворот инфекции и первичных органов-мишеней. В связи с этим все показатели взаимоотношения мышей а/б п. ICR и и/д л. SCID и Nude и VARV в рамках существующих критериев [30, 32, 150], связанных с поиском животных моделей по оценке только профилактической (лечебно-профилактической) активности препаратов от НО, соответствуют или очень близки к таковым у людей и модельным *M. fascicularis* (таблицы 3.8).

Как видно из данной таблицы, в указанном направлении чуть хуже, чем 10-14-суточные мыши а/б п. ICR, выглядят мыши а/б п. ICR (42-49-суточные) и и/д л. SCID и Nude, в части касающейся достоверно более низких величин одного или двух показателей:

- чувствительности к вирусу;
- концентрации вируса в носу.

Однако если учесть то, что в настоящее время практически нет видов животных, которые могли бы быть взяты в качестве модельных для НО, за исключением обезьян *M. fascicularis*, использующихся только для оценки лечебной (терапевтической) эффективности препаратов от НО и лишь при введении в очень высокой дозе VARV (8 lg БОЕ) [75, 127], то мыши и/д л. SCID и Nude, а тем более мыши а/б п. ICR выглядят в этом плане достаточно перспективно.

Такие животные, моделируя начальный этап течения процесса инфекции у человека только в органах респираторного тракта, закономерно могут быть взяты для определения другой (не лечебной или не терапевтической) эффективности противопепенных препаратов: только профилактической (лечебно-профилактической). В этой связи представленные результаты на мышах и/д л. SCID и Nude соответственно с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (дефицит Т- и В-лимфоцитов и иммуноглобулинов) и недоразвитием тимуса (дефицит Т-лимфоцитов), могут быть полезны с позиции прогноза для людей с несовершенной иммунной системой или подавленной. Так как с каждым годом количество таких людей только растет из-за постоянного ухудшения экологической обстановки, расширения эпидемий, инициированных вирусом иммунодефицита, нарастающего числа людей с онкологическими заболеваниями, требующих лечение иммуносупрессорами, и др.

Таблица 3.8 - Результаты сравнительного анализа показателей взаимоотношения с вирусом натуральной оспы при инфицировании через респираторный тракт мышей аутбредной популяций ICR 10-14-суточных (10-14-сут мыши ICR) и 42-49-суточных (42-49-сут мыши ICR), мышей иммунодефицитных линий SCID 18-21-суточных (18-21-сут мыши SCID) и Nude 8-21-суточных (18-21-сут мыши Nude), а также людей (модельных *M. fascicularis*)

№ п/п	Название критериев	Показатель по каждому критерию:		Наличие соответствия
		у человека	у мыши	
1	Возможность инфицирования через респираторный тракт (входные ворота инфекции)	Происходит при эпидемиях*	Реализуется при проведении экспериментов	Есть
2	Значение 50 %-й инфицирующей дозы	1,0 (0,6...1,4) lg БОЕ**	1,7 (1,3-2,1)*** lg БОЕ для 10-14-сут мышей ICR; 1,8 (1,4-2,2)*** lg БОЕ для 42-49-сут мышей ICR; 2,5 (2,1-2,9)*** lg БОЕ для 18-21-сут мышей SCID; 2,5 (2,1-2,9)*** lg БОЕ для 18-21-сут мышей Nude	Есть для 10-14-сут мышей ICR, а также близкое для 42-49-сут мышей ICR и 18-21-сут мышей SCID и Nude
3	Основные первичные органы-мишени	Легкие и нос*	Легкие и нос	Есть

Продолжение таблицы 3.8

№ п/п	Название критериев	Показатель по каждому критерию:		Наличие соответствия
		у человека	у мыши	
4	Основные клетки-мишени в первичных органах-мишенях	Макрофаги и эпителиоциты респираторного тракта*	Макрофаги и эпителиоциты респираторного тракта	Есть
5	Наличие после инокуляции вирусом (10–100 ИД <sub>50</sub> ) через респираторный тракт максимального уровня его накопления (>3 lg БОЕ/мл) в первичных органах-мишенях	Имеется в легких и в носу*	Имеется в легких и в носу у 10-14-сут и 42-49-сут мышей ICR и 18-21-сут мышей Nude, а также в легких у 18-21-сут мышей SCID	Есть для 10-14-сут и 42-49-сут мышей ICR и 18-21-сут мышей Nude, а также есть частично для 18-21-сут мышей SCID
<p>Примечания</p> <p>БОЕ – бляшкообразующая единица</p> <p>*Информация, взятая из литературных источников в отношении людей и/или <i>M. fascicularis</i> [83, 94, 136]</p> <p>**Величина получена путем прогнозной оценки [19, 30]</p> <p>***Величина рассчитана по факту наличия вируса в легких животных по прошествии 3 или 4 суток п.и. 10-14-сут и 42-49-сут мышей ICR или 18-21-сут мышей SCID и Nude соответственно</p>				



Таким образом, были разработаны патогенетические схемы болезни у более изученных нами и/н зараженных в дозах 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>) и 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>) VARV соответственно мышей а/б п. ICR (10-14-суточные) и и/д л. SCID (18-21-суточные). Эти схемы были созданы на основе данных по чувствительности этих животных к патогену при и/з инокуляции, по его диссеминации в организме мышей и по патоморфологической картины у них бессимптомного течения болезни. При этом отмечено сходство всех величин показателей, оцененных у инфицированных VARV мышей а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные), а также и/д л. SCID и Nude (18-21-суточные) и людей (модельных *M. fascicularis*) на начальном этапе инфекции (в органах дыхания). Данное обстоятельство вселяет надежду на успех при использовании мышей этих категорий, но только с целью оценки профилактической (лечебно-профилактической) эффективности создаваемых противооспенных препаратов.

### **3.5 Испытание лабораторных моделей к натуральной оспе на основе мышей аут-бредной популяции ICR и иммунодефицитной линии SCID**

В разделах 3.1–3.4 была приведены экспериментальные и теоретические результаты, демонстрирующие реальный потенциал для использования мышей а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные) и и/д л. SCID и Nude (18-21-суточные) с целью оценки протективной активности противооспенных препаратов. Поэтому для испытания таких кандидатных лабораторных моделей с точки зрения адекватности результатов, получаемых при их использовании, таковым, имеющимся на других моделях, были проведены исследования противовирусного действия разрабатываемого российского препарата НИОХ-14 в сравнении с американским ST-246 (положительный контроль), с ранее установленной защитной противооспенной активностью.

Несмотря на то, что многими учеными уже было доказано в исследованиях с ортопоксвирусами наличие защитного эффекта у химически синтезированных соединений НИОХ-14 и ST-246 [11, 71, 105], необходимо было прежде, чем делать эксперименты с VARV на мышах, удостовериться в условиях *in vitro* в существовании данного эффекта у новых серий (№ 4П) препарата НИОХ-14 и (№ 1) препарата ST-246, полученных из НИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, и которые планировалось взять для дальнейшего нашего исследования.

Таблица 3.9 – Данные по выявлению на культуре клеток Vero противооспенной активности химически синтезированных соединений по отношению к возбудителю натуральной оспы (штамм India-3a)

Наименование соединения	TC <sub>50</sub> (мкг/мл)	IC <sub>50</sub> в мкг/мл, М для n = 2	IS (TC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )
НИОХ-14	>100	0,001	>100000,0
ST-246	>100	0,002	>50000,0
НИОХ-32	>100	0,03	>3333,3
<p>Примечания</p> <p>IC<sub>50</sub> – 50 %-я ингибирующая (эффективная) концентрация образца</p> <p>IS (TI) – индекс селективности (терапевтический индекс) образца; если IS меньше 8, то препарат считается неэффективными [35]</p> <p>М – среднее значение</p> <p>n – количество лунок, взятых на одно разведение образца с 2-кратным определением значений показателей</p> <p>TC<sub>50</sub> – 50 %-я токсическая концентрация образца</p>			

Таблица 3.10 – Данные по выявлению на культуре клеток Vero противооспенной активности химически синтезированных соединений по отношению к возбудителю натуральной оспы (штамм 6-58)

Наименование соединения	TC <sub>50</sub> (мкг/мл)	IC <sub>50</sub> в мкг/мл, М для n = 2	IS (TC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )
НИОХ-14	>100	0,003	>33333,3
ST-246	>100	0,004	>25000,0
НИОХ-32	>100	0,06	>1666,7
<p>Примечания</p> <p>IC<sub>50</sub> – 50 %-я ингибирующая (эффективная) концентрация образца</p> <p>IS (TI) – индекс селективности (терапевтический индекс) образца; если IS меньше 8, то препарат считается неэффективными [35]</p>			

## Продолжение таблицы 3.10

М – среднее значение
n – количество лунок, взятых на одно разведение образца с 2-кратным определением значений показателей
ТС <sub>50</sub> – 50 %-я токсическая концентрация образца

Таблица 3.11 - Данные по выявлению на культуре клеток Vero противооспенной активности химически синтезированных соединений по отношению к возбудителю натуральной оспы (штамм Congo-9)

Наименование соединения	ТС <sub>50</sub> (мкг/мл)	IC <sub>50</sub> в мкг/мл, М для n = 2	IS (ТС <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )
НИОХ-14	>100	0,003	>33333,3
ST-246	>100	0,003	>33333,3
НИОХ-32	>100	0,07	>1428,5
Примечания IC <sub>50</sub> – 50 %-я ингибирующая (эффективная) концентрация образца IS (TI) – индекс селективности (терапевтический индекс) образца; если IS меньше 8, то препарат считается неэффективными [35] М – среднее значение n – количество лунок, взятых на одно разведение образца с 2-кратным определением значений показателей ТС <sub>50</sub> – 50 %-я токсическая концентрация образца			

Таблица 3.12 - Данные по выявлению на культуре клеток Vero противооспенной активности химически синтезированных соединений по отношению к возбудителю натуральной оспы (штамм Butler)

Наименование соединения	ТС <sub>50</sub> , мкг/мл	IC <sub>50</sub> в мкг/мл, М для n = 2	IS (ТС <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )
НИОХ-14	>100	0,002	>50000,0

Продолжение таблицы 3.12

Наименование соединения	ТС <sub>50</sub> , мкг/мл	IC <sub>50</sub> в мкг/мл, М для n = 2	IS (ТС <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )
ST-246	>100	0,001	>100000,0
НИОХ-32	>100	0,07	>1428,5
Примечания IC <sub>50</sub> – 50 %-я ингибирующая (эффективная) концентрация образца IS (TI) – индекс селективности (терапевтический индекс) образца; если IS меньше 8, то препарат считается неэффективными [35] М – среднее значение n – количество лунок, взятых на одно разведение образца с 2-кратным определением значений показателей ТС <sub>50</sub> – 50 %-я токсическая концентрация образца			

В этой связи на начальном этапе были выполнены опыты на культуре клеток Vero с различными штаммами VARV (India-3a, 6-58, Congo-9 и Butler) для сравнительной оценки антиортопоксвирусной активности двух вышеупомянутых препаратов ST-246 и НИОХ-14, а также химически синтезированного соединения НИОХ-32, показавшего ранее низкий противовирусный эффект [30]. Результаты данных опытов отражены в таблицах 3.9-3.12. Судя по данным таблиц, видно, что новые серии препаратов ST-246 и НИОХ-14 (как и ранее произведенные) в условиях *in vitro* демонстрировали сходную высокую активность по отношению к разным штаммам VARV, беря во внимание величины IS, которые значительно были выше, чем таковые у НИОХ-32.

Кроме этого, была отмечена высокая коррелятивная связь ( $r \geq 0,9$ ) у исследованных препаратов между величинами IC<sub>50</sub>, полученными в отношении всех взятых штаммов данного вируса.

Продemonстрированный выраженный противооспенный эффект у новых серий препаратов ST-246 и НИОХ-14 (соответственно № 1 и № 4П) в исследованиях *in vitro* в отношении 4 штаммов VARV (India-3a, 6-5, Congo-9 и Butler) дал основание для проведения изучения их лечебно-профилактической активности первоначально в экспериментах с использованием 10-14-суточных мышей а/б п. ICR, и/н инокулирован-

ных штамм India-3a VARV в дозе 3,7 lg БОЕ (10 ИД<sub>50</sub>). При этом случае регистрации подвергали изменения инфекционных титров вируса в легких мышей по прошествии 3 суток п.и. Результаты исследований показаны в таблице 3.13.

По данным таблицы видно, что М инфекционных титров VARV в легких мышей опытных групп, обработанных препаратами НИОХ-14 и ST-246, были сходными и существенно ниже таковой у животных контрольной групп, получившей плацебо, ( $p \leq 0,05$ ). Причем величины ИППВ в легких животных опытных групп составили 2,0 lg. При этом число животных, подвергшихся действию препарата НИОХ-14, с наличием VARV в легких по прошествии 3 суток п.и. было значимо ниже, чем таковое в группе контроля (при  $p \leq 0,05$ ).

В то же время этот препарат по этому показателю не имел отличия от соединения ST-246. При этом величины КЗИ мышей обеих опытных групп составили 57 %.

По результатам, представленным в таблице 3.13, можно сделать вывод о наличии протективного эффекта у химического соединения НИОХ-14, равного таковому у химического соединения ST-246, во взятой схеме, а также дозе перорального введения 10-14-суточным мышам а/б п. ICR, и/н инокулированным 10 ИД<sub>50</sub> VARV (штамм India-3a).

На следующем этапе было проведено изучение показателей профилактической активности вакцины оспенной живой сухой для накожного применения на основе штамма ЛИВП VACV (АО «НПО «Микроген», г. Томск) в условиях *in vivo* на 18-21-суточных мышях а/б п. ICR, и/н инокулированных дозой 3,7 lg БОЕ (8 ИД<sub>50</sub>) VARV (штамм India-3a) по прошествии 4 недель после проведенной иммунизации этой вакциной. В этом случае наблюдали за значениями инфекционных титров патогена в легких мышей по истечении 3 суток п.и. В таблице 3.14 отображены результаты таких исследований.

Из нее видно, что М инфекционных титров вируса в легких мышей, привитых вакцинным препаратом за 4 недели до этого (опытная группа), были существенно ниже, чем М титров, которое наблюдалось у животных, получавших плацебо (контрольная группа), при  $p \leq 0,05$ .

Таблица 3.13 – Данные по протективной активности двух химически синтезированных соединений при пероральном введении 10-14-суточным мышам аутбредной популяции ICR, интраназально инокулированным возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) дозой 3,7 lg БОЕ (10 ИД<sub>50</sub>)

Название показателей	Величины показателей для инфицированных мышей после обработки по схеме* образцами:		
	НИОХ-14	ST-246	плацебо
Суточная доза образцов на массу животного	60 мкг/г	60 мкг/г	0,2 мл/мышь
Количество мышей	7	7	7
Инфекционный титр вируса в lg БОЕ/легкие у каждой мыши по прошествии 3 суток после инфицирования (п.и.)	2,4	2,5	4,5
	2,5	2,3	4,5
	2,1	2,3	4,4
	<1,1	<1,1	3,5
	<1,1	<1,1	2,8
	<1,1	<1,1	2,7
	<1,1	<1,1	2,7
Средний инфекционный титр вируса в lg БОЕ/легкие, М (I <sub>95</sub> ) для n=7	1,6 (1,0-2,2)**	1,6 (1,0-2,2)**	3,6 (2,8-4,4)
ИППВ в lg в легких животных	2,0	2,0	Н.р.
Число (%) животных с вирусом в легких	3*** (43)	3*** (43)	7 (100)
КЗИ в %	57	57	Н.р.
<p>Примечания</p> <p>&lt;1,1 – величина ниже порога чувствительности (1,1 lg БОЕ/легкие) метода титрования (при расчете М в этом случае брали величины порога чувствительности)</p> <p>БОЕ – бляшкообразующая единица</p> <p>ИД<sub>50</sub> – 50 %-я инфицирующая доза, рассчитанная по наличию вируса в легких животных по прошествии 3 суток п.и.</p>			

## Продолжение таблицы 3.13

ИППВ - индекс подавления продукции вируса = $M$ инфекционного титра вируса в легких мышей, обработанных плацебо – $M$ инфекционного титра вируса в легких мышей, обработанных образцом
КЗИ - коэффициент защиты от инфекции = % обработанных плацебо мышей с вирусом в легких – % обработанных образцом мышей с вирусом в легких
Н.р. – величина не рассчитывается
Плацебо - раствор, состоящий из 0,75 % метилцеллюлозы и 1 % твина-80, который брали для смешения с каждым образцом
$M$ – среднее значение
$I_{95}$ - доверительный интервал для $M$ с вероятностью 95 %
$n$ – число подопытных мышей
*Образцы и плацебо вводили однократно ежедневно за одни сутки до инфицирования и в течение двух суток с момента инфицирования
**Отличие от контроля при $p \leq 0,05$ (в соответствии с двусторонним U-критерием Манна-Уитни)
***Отличие от контроля при $p \leq 0,05$ (в соответствии с односторонним точным тестом Фишера)

При этом величина ИППВ в легких этих животных опытной группы была 2,1 lg. Обработанных вакциной количество мышей с установленным инфекционным титром VARV в легких по прошествии 3 суток п.и. было значимо ниже, чем в группе контрольных животных ( $p \leq 0,05$ ). При этом величина КЗИ вакцинированных мышей составила 62 %.

Обобщая результаты, представленные в таблице 3.14, можно сделать вывод о наличии профилактической активности у вакцины оспенной живой сухой для накожного применения на базе штамма ЛИВП VACV на 18-21-суточных мышах а/б п. ICR, и/н инокулированных 8 ИД<sub>50</sub> VARV (штамм India-3a) по прошествии 4 недель от момента подкожной вакцинации дозой 6,0 lg БОЕ.

Таблица 3.14 – Данные по защитной активности вакцины оспенной живой сухой для накожного применения на основе штамма ЛИВП вируса осповакцины (АО «НПО «Микроген», г. Томск), вводимой 18-21-суточным мышам аутбредной популяции ICR, интраназально инокулированным по прошествии 4 недель после этого возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) дозой 3,7 lg БОЕ (8 ИД<sub>50</sub>)

Название показателей	Величины показателей для инфицированных мышей после обработки по схеме* образцами:	
	вакцина оспенная живая сухая накожного применения	плацебо
Доза вводимых препаратов на мышь	6,0 lg БОЕ	0,2 мл
Количество животных	13	8
Инфекционный титр вируса в lg БОЕ/легкие у каждой мыши по прошествии 3 суток после инфицирования (п.и.)	5,0	4,6
	3,7	4,5
	3,6	4,4
	3,0	4,3
	2,8	4,1
	<1,1	4,0
	<1,1	4,0
	<1,1	3,7
	<1,1	
	<1,1	
	<1,1	
	<1,1	
Средний инфекционный титр вируса в lg БОЕ/легкие, М (I <sub>95</sub> ) для n=13 или 8	2,1 (1,3-2,9)**	4,2 (3,9-4,5)
ИППВ в lg в легких животных	2,1	Н.р.
Число (%) животных с вирусом в легких	5*** (38)	8 (100)
КЗИ в %	62	Н.р.

Продолжение таблицы 3.14



## Примечания

$<1,1$  – величина ниже порога чувствительности ( $1,1 \lg$  БОЕ/легкие) метода титрования (при расчете  $M$  в этом случае брали величины порога чувствительности)

БОЕ – бляшкообразующая единица

ИД<sub>50</sub> – 50 %-я инфицирующая доза, рассчитанная по наличию вируса в легких 42-49-суточных животных по прошествии 3 суток п.и.

ИППВ - индекс подавления продукции вируса =  $M$  инфекционного титра вируса в легких мышей, обработанных плацебо –  $M$  инфекционного титра вируса в легких мышей, обработанных вакциной

КЗИ - коэффициент защиты от инфекции =  $\%$  обработанных плацебо мышей с вирусом в легких –  $\%$  обработанных вакциной мышей с вирусом в легких

Н.р. – величина не рассчитывается

Плацебо – физиологический раствор, который использовали для растворения вакцины

$M$  – среднее значение

$I_{95}$  - доверительный интервал для  $M$  с вероятностью 95 %

$n$  – число подопытных мышей

\*Вакцину и плацебо вводили 18-21-суточным мышам подкожно однократно за четыре недели до инфицирования

\*\*Отличие от контроля при  $p \leq 0,05$  (в соответствии с двусторонним  $U$ -критерием Манна-Уитни)

\*\*\*Отличие от контроля при  $p \leq 0,05$  (в соответствии с двусторонним критерием  $\chi^2$  и точным тестом Фишера)

В последующем была проведена оценка эффективности химических соединений НИОХ-14 и ST-246 при применении лечебно-профилактической схемы их введения в исследованиях на 18-21-суточных мышах и/д л. SCID, и/н инъецированных дозой  $5,2 \lg$  БОЕ ( $50 \text{ ИД}_{50}$ ) VARV (штамм India-3a). В этом эксперименте наблюдали за величинами инфекционных титров патогена в легких у мышей по прошествии 4 суток п.и. Полученные результаты такого изучения отражены в таблице 3.15.

Таблица 3.15 – Данные по протективной активности двух химически синтезированных соединений при пероральном введении 18-21-суточным мышам иммунодефицитной линии SCID, интраназально инокулированным возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) дозой 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>)

Название показателей	Величины показателей для инфицированных мышей после обработки по схеме* образцами:		
	НИОХ-14	ST-246	плацебо
Суточная доза образцов на массу животного	50 мкг/г	50 мкг/г	0,2 мл/мышь
Количество мышей	10	9	8
Инфекционный титр вируса в lg БОЕ/легкие у каждой мыши по прошествии 4 суток после инфицирования (п.и.)	2,1	2,4	3,2
	1,3	2,2	2,9
	2,3	2,4	3,6
	2,2	2,1	3,1
	2,7	2,1	3,6
	<1,1	2,3	3,0
	<1,1	2,3	3,3
	<1,1	<1,1	3,3
	<1,1	<1,1	
	<1,1		
Средний инфекционный титр вируса в lg БОЕ/легкие, М (I <sub>95</sub> ) для n=8-10	1,6 (1,1-2,1)** (n=10)	2,0 (1,6-2,4)** (n=9)	3,3 (3,1-3,5) (n=8)
ИППВ в lg в легких животных	1,7	1,3	Н.р.
Число (%) животных с вирусом в легких	5*** (50)	7 (78)	8 (100)
КЗИ в %	50	22	Н.р.
<p>Примечания</p> <p>&lt;1,1 – величина ниже порога чувствительности (1,1 lg БОЕ/легкие) метода титрования (при расчете М в этом случае брали величины порога чувствительности)</p> <p>БОЕ – бляшкообразующая единица</p> <p>ИД<sub>50</sub> – 50 %-я инфицирующая доза, рассчитанная по наличию вируса в легких животных по прошествии 4 суток п.и.</p>			

## Продолжение таблицы 3.15

ИППВ - индекс подавления продукции вируса =  $M$  инфекционного титра вируса в легких мышей, обработанных плацебо –  $M$  инфекционного титра вируса в легких мышей, обработанных образцом

КЗИ - коэффициент защиты от инфекции = % обработанных плацебо мышей с вирусом в легких – % обработанных образцом мышей с вирусом в легких

Н.р. – величина не рассчитывается

Плацебо - раствор, состоящий из 0,75 % метилцеллюлозы и 1 % твина-80, который брали для смешения с каждым образцом

$M$  – среднее значение

$I_{95}$  - доверительный интервал для  $M$  с вероятностью 95 %

$n$  – число подопытных животных

\*Образцы и плацебо вводили однократно ежедневно за одни сутки до инфицирования и в течение двух суток с момента инфицирования

\*\*Отличие от контроля при  $p \leq 0,05$  (в соответствии с двусторонним  $U$ -критерием Манна-Уитни)

\*\*\*Отличие от контроля при  $p \leq 0,05$  (в соответствии с односторонним точным тестом Фишера)

По данным таблицы видно, что у инфицированных мышей опытной группы при обработке препаратами НИОХ-14 и ST-246 средние величины инфекционных титров VARV в легких достоверно не отличались и были значимо ниже, чем средние величины инфекционных титров у мышей контрольной группы, получавшей плацебо, ( $p \leq 0,05$ ). В этой ситуации ИППВ в легких у мышей из опытных групп соответствовали следующие значения: 1,7 lg для химического соединения НИОХ-14 и 1,3 lg для химического соединения ST-246.

Число зараженных мышей при обработке химическим препаратом НИОХ-14 с выявленным в легких содержанием VARV по прошествии 4 суток п.и. было достоверно ниже, чем в группе животных в контроле ( $p \leq 0,05$ ).

При этом оба соединения НИОХ-14 и ST-246 существенно не различались по этому показателю, а величины КЗИ мышей опытных групп составили 50 % для соединения НИОХ-14 и 22 % для соединения ST-246.

Суммируя результаты, представленные в таблице 3.15, можно сделать вывод о присутствии защитного эффекта у химически синтезированного соединения НИОХ-14, близкого с таковому у соединения ST-246, в примененной схеме и дозе пероральной введения мышам и/д л. SCID, и/н инокулированных 50 ИД<sub>50</sub> VARV (штамм India-3a).

Учитывая то, что мыши, использованные нами в последнем исследовании, имели тяжелый комбинированный иммунодефицит (дефицит Т- и В-лимфоцитов и иммуноглобулинов), то эксперименты с их применением для оценки эффективности вакцинных противооспенных препаратов не проводились.

С применением VARV (штамм Harper) для оценки противооспенного активности химического препарата ST-246 в условиях *in vivo* посвящено только 2 публикации зарубежных исследователей [75, 127], в которых представлены данные на обезьянах (*M. fascicularis*) о существовании этого эффекта у такого препарата. Групп авторов [127] после инфицирования *M. fascicularis* очень высокой дозой патогена (8 lg БОЕ), да еще и в/в, обнаружил у приматов, обработанных перорально по терапевтической схеме очень высокой дозой препарата ST-246 (300 мг/кг ежедневно однократно по прошествии 2–15 или 1–15 суток п.и.), отсутствие внешних клинических проявлений болезни и снижение аккумуляции ДНК VARV в крови на 3–5 lg по прошествии 5–8 суток п.и. В наших же экспериментах с использованием штамма India-3a VARV на мышях а/б п. ICR (10–14-суточные) и и/д л. SCID (таблицы 3.13 и 3.15), оценивая процент животных с инаппарантной формой заболевания (инфицированность), был отмечен меньший протективный эффект для соединения ST-246: соответственно у 57 и 22 % мышей (КЗИ), включая величины ИППВ в легких 2 и 1,3 lg по прошествии 3 и 4 суток п.и. Более выраженные значения показателей протективности этого препарата у зарубежных исследователей, скорее всего, можно объяснить тем, что они применяли его в дозе, почти в 5 раз превышающей нашу, и/или более длительной схемой его введения. В то же время в исследованиях, проведенных на приматах другими учеными [75], были использованы более низкая доза препарата ST-246: 10 мг/кг ежедневно однократно по прошествии 2–15 или 4–17 суток после в/в инъекции 8 lg БОЕ VARV.

При этом у всех опытных приматов были зарегистрированы в противоположность результатам предыдущей группы авторов [127] внешне слабо выраженные (по сравнению с контрольными обезьянами) признаки оспенной болезни и снижение концентрации ДНК VARV в крови (по сравнению с контрольными обезьянами) лишь на 2-3 lg по прошествии 8–14 суток п.и. Величина такого снижения концентрации генетического материала VARV была близка к тем, которые мы получили в рамках показателя ИППВ в легких 10-14-суточных мышей а/б п. ICR по прошествии 3 суток п.и. (таблица 3.13) и и/д л. SCID по прошествии 4 суток п.и. (таблица 3.15) после их обработки препаратом ST-246 в дозах соответственно 60 или 50 мкг/г.

С использованием 18-21-суточных мышей а/б п. ICR и VARV (штамм India-3a) на примере вакцины оспенной живой сухой для накожного применения на основе штамма ЛИВП VACV подтверждено наличие профилактического эффекта, ранее отмеченного на людях во время последней эпидемии НО [15].

В исследованиях, проведенных на мышах а/б п. ICR (10-14-суточные) и и/д л. SCID 18-21-суточных (таблицы 3.13 и 3.15), зараженных в 5 раз различающимися дозами одного и того же штамма VARV (India-3a): соответственно 10 и 50 ИД<sub>50</sub>, с использованием химически синтезированных соединений ST-246 и НИОХ-14 по одинаковым схемам применения, были зафиксированы для них обоих достоверно высокие величины КЗИ, а также ИППВ. При этом логично, что у мышей и/д л. SCID, получивших повышенную дозу вируса по сравнению с мышами а/б п. ICR, наблюдались значения ИППВ и КЗИ для соединений ST-246 и НИОХ-14 более низкие. Данные этих экспериментов указывают на наличие выраженного противооспенного эффекта у препаратов ST-246 и НИОХ-14, а также на воспроизводимость результатов, получаемых с использованием испытанных нами лабораторных моделей.

По мнению ряда исследователей [16, 30, 103], для разработки адекватной модели инфекции у людей требуется использовать животных, которые обладают чувствительностью к выбранному штамму вируса близкой к человеку. В этом смысле, учитывая сходство в значениях этого показателя между мышами (а/б п. ICR и и/д л. SCID) и людьми (таблица 3.8), можно предвидеть, что результаты оценки противооспенного действия препаратов на таких мышах будут сравнимы с таковыми у людей.

Многие ученые осуществляли исследования *in vitro* по оценке антиортопоксвирусной активности химически синтезированных соединений НИОХ-14 и ST-246, от-

метив при этом у них также положительный эффект. В таких опытах они использовали лабораторные модели на основе чувствительной клеточной культуры Vero и вирусов, вызывающих следующие инфекции у животных и человека: оспа мышей [7, 45, 73], оспа коров [7, 40, 73], вакцинация [7, 39, 40], оспа верблюдов [40, 45], оспа обезьян [7, 45, 105] и НО [7, 45, 105]. Кроме того, протективное действие этих препаратов ранее также было обнаружено в исследованиях *in vivo* с использованием общепризнанных модельных видах животных (мыши, кролики, приматы и др.) и вирусов, инициирующие следующие болезни: эктромелия [24, 70, 78], вакцинация [74, 135, 140], оспа коров [11, 73, 144] и оспа обезьян [76, 139, 153].

В научной литературе, также имеется информация о выраженном привентивном действии на людях вакцины оспенной живой сухой для накожного применения на основе штамма ЛИВП VACV [15]. Сведения об этом были получены во время последней эпидемии НО. Результаты нашей работы, выполненной с VARV на мышах а/б п. ICR (10-14-суточные и 18-21-суточные) и и/д л. SCID (18-21-суточные), подтвердили существующие защитные эффекты у химически синтезированных соединений НИОХ-14 и ST-246. Это обстоятельство показывает реальную возможность применения в этом направлении испытанных нами лабораторных моделей к НО на основе мышей а/б п. ICR (10-14-суточные и 18-21-суточные) и и/д л. SCID (18-21-суточные), а также штамма India-3a VARV.

С учетом экспериментов, проведенных с использованием лабораторной модели «10-14-суточная мышь а/б п. ICR и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции», были выявлены пределы ее практического использования для оценки противооспенного действия создаваемых образцов химиопрепаратов:

- не менее 6 мышей 10–14-суточных а/б п. ICR разного пола для испытания каждого опытного и контрольного образца;
- штамм India-3a VARV в виде вирусной суспензии, наработанный на клеточной культуре Vero, с инфекционным титром не менее 5,6 lg БОЕ/мл и известной инфекционностью ( $ID_{50} = 2,3-3,1$  lg БОЕ) для этих мышей при и/н инокуляции, определенной по наличию вируса в легких по истечении 3 суток п.и.;
- способ введения вируса мышам: и/н;
- объем введения вируса в обе ноздри мышам: 0,03 мл на особь;
- доза введения вируса мышам: 10–100  $ID_{50}$  на особь;

- профилактическая или лечебно-профилактическая схемы введения мышам опытного и контрольных образцов: рекомендуется испытывать опытные образцы, показавшие противовирусный эффект в исследованиях *in vitro* с ортопоксвирусами, не патогенными для людей, (минимум, на трех: экстремелии, осповакцины и оспы коров) и патогенных (минимум на двух: оспы обезьян и НО), а также исследованиях *in vivo* на ортопоксвирусах, не патогенных для человека (минимум на двух: экстремелии и оспы коров) и патогенном (на одном: оспы обезьян);

- исследуемый образец и контрольные в виде раствора, суспензии или эмульсии;

- способ введения образцов мышам: пероральный;

- объем введения образцов мышам: 0,2 мл на особь;

- срок приготовления гомогенатов легких мышей опытной и контрольных групп: по истечении 3 суток п.и.;

- данные титрования гомогенатов легких мышей опытной и контрольных групп с определением наличия/отсутствия вируса в них и/или его инфекционных титров;

- статистические данные сравнения опытной и контрольных групп мышей по уровням инфекционных титров вируса в легких и по количеству животных, содержащих патоген в этом органе.

Аналогичным образом были установлены пределы практического применения лабораторной модели «18–21-суточные мышь а/б п. ICR и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции» для оценки профилактического действия создаваемых образцов оспенных вакцин:

- профилактическая схемы введения мышам опытного и контрольных образцов: рекомендуется испытывать опытные образцы, показавшие противовирусный эффект в исследованиях *in vivo* на ортопоксвирусах, не патогенных для человека (минимум на двух: экстремелии и оспы коров) и патогенном (на одном: оспы обезьян);

- не менее 8 мышей 18–21-суточных а/б п. ICR разного пола для испытания каждого опытного и контрольного образца;

- исследуемый образец и контрольные в виде раствора, суспензии или эмульсии;

- способ введения образцов мышам: подкожный или пероральный;

- объем введения образцов мышам : 0,1-0,5 мл на особь;

- штамм India-3a VARV в виде вирусной суспензии, наработанный на клеточной культуре Vero, с инфекционным титром не менее 5,7 lg БОЕ/мл и известной инфекционностью ( $ID_{50} = 2,4-3,2$  lg БОЕ) для мышей этой же категории, но 42-49-суточных, при и/н инокуляции, определенной по наличию вируса в легких по истечении 3 суток п.и.;

- срок введения вируса мышам: через 3-4 недели после первой инокуляции образцов;

- способ введения вируса мышам: и/н;

- объем введения вируса в обе ноздри мышам: 0,03 мл на особь;

- доза введения вируса мышам: 10–100  $ID_{50}$  на особь;

- срок приготовления гомогенатов легких мышей опытной и контрольных групп: по истечении 3 суток п.и.;

- данные титрования гомогенатов легких мышей опытной и контрольных групп с определением наличия/отсутствия вируса в них и/или его инфекционных титров;

- статистические данные сравнения опытной и контрольных групп мышей по уровням инфекционных титров вируса в легких и по количеству животных, содержащих патоген в этом органе.

Пределы практического использования лабораторной модели «18-21-суточная мышь и/д л. SCID и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции» для изучения противоопухолевого действия разрабатываемых химиопрепаратов были определены такими же, как и для лабораторной модели «10-14-суточная мышь а/б п. ICR и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции» с той лишь разницей, что  $ID_{50}$  вируса по регистрации его наличия в легких по прошествии 4 суток п.и. составляла 3,1–3,9 lg БОЕ, инфекционный титр вирусной суспензии должен быть не ниже 6,4 lg БОЕ/мл, и срок приготовления гомогенатов легких мышей опытной и контрольных групп должен быть 4 суток от момента инокуляции вирусом.

Лабораторные модели для предлагаемых нами исследований рассчитаны на дозы VARV в диапазоне от 10 до 100  $ID_{50}$ /мышь. Однако в некоторых случаях для определения предела эффекта действия у тех или иных препаратов могут быть востребованы и более высокие дозы этого патогена, например, в интервале между 100 и 1000  $ID_{50}$ /мышь. Чтобы обеспечить такие дозы заражения мышей необходимо иметь инфекционный титр вируса в исходной вирусной суспензии, превышающий 7 lg БОЕ/мл, если учесть объем суспензии, вводимой мышам (по 0,03 мл на каждую) и



чувствительность этих животных к этому патогену. Этого и более высоких значений данного показателя практически сложно достичь при культивировании VARV на культуре клеток Vero в стационарном режиме. В этой связи решить эту проблему можно, как минимум, 2 способами:

- перейти на другие более эффективные варианты наработки вирус, например, на роллерный;
- очистить и сконцентрировать вирус, например, путем градиентного центрифугирования.

Причем роллерное культивирование в определенной степени напоминает ферментерное, так как за счет постоянного вращения осуществляется более эффективно:

- удаление от инфицированных клеток токсических продуктов, образовавшихся в процессе их жизнедеятельности;
- снабжение инфицированных клеток питательными компонентами среды культивирования;
- доставка воздуха к инфицированным клеткам.

Таким образом, в исследованиях с VARV (штамм India-3a) с использованием мышей а/б п. ICR (10-14-суточные) и и/д л. SCID (18-21-суточные) засвидетельствовано наличие противооспенного действия у двух химически синтезированных соединений (НИОХ-14 и ST-246), ранее показанных рядом исследователей с помощью других лабораторных моделей к ортопоквирусным инфекциям: на основе клеточных культур или животных. С использованием 18-21-суточных мышей а/б п. ICR и VARV (штамм India-3a) на примере вакцины оспенной живой сухой для кожного применения на основе штамма ЛИВП VACV (АО «НПО «Микроген», г. Томск) подтверждено наличие профилактического эффекта, ранее отмеченного на людях во время эпидемии НО. Это свидетельствует о возможности применения предлагаемых нами лабораторных моделей:

- «10-14-суточная мышь а/б п. ICR и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции» и «18-21-суточная мышь и/д л. SCID и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции» для изучения защитной эффективности химиопрепаратов от НО;
- «18-21-суточная мышь а/б п. ICR и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции» для изучения профилактической эффективности оспенных вакцин.

Определены пределы практического применения таких моделей.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

До сих пор при осуществлении поиска модельных видов животных в направлении регистрации защитного эффекта у кандидатных лекарственных препаратов большинство исследователей брало за основу подход, ориентированный на имитацию только внешних проявлений НО у людей [16, 51, 92]. При этом в качестве лабораторной модели, соответствующей этому требованию, они выбрали лишь одну единственную на основе *M. fascicularis* и штамма Harper VARV (с неизвестной величиной вирулентности для человека). Однако данный вид животных - крайне дорогостоящий и применение его в экспериментальных работах имеет высокую трудоемкость, что существенно затрудняет его использование в крупномасштабных статистически значимых экспериментах по оценке эффективности разрабатываемых препаратов. Кроме того, несмотря на относительно близкую к человеку клиническую картину заболевания, вызываемого VARV у *M. fascicularis*, они в 1000–100000000 раз менее чувствительны к данному патогену при инфицировании через респираторный тракт, чем человек:  $ID_{50} = 1,0 (0,6-1,4) \lg \text{ БОЕ}$ . В то же время этот вид животных используется только для оценки терапевтической (лечебной) эффективности препаратов от НО, при этом его инфицирование осуществляется в/в методом, вводя 8  $\lg \text{ БОЕ VARV}$ , тогда как основные пути заражения человека этим патогеном реализуются через органы дыхательного тракта.

В своей работе мы использовали другой существующий подход в направлении поиска лабораторной модели для НО, который сориентирован на имитацию не внешней симптоматики этой болезни у людей, а на процесс инфекции в органах и клетках-мишенях первичного и вторичного звена [30, 32, 150]. При реализации данного подхода с использованием высоковирулентного для человека штамма VARV (India-3a) [19, 30] были выбраны две лабораторные модели (на основе мышей а/б п. ICR 10-14-суточных и и/д л. SCID 18-21-суточных) и проведена оценка пределов их практического использования. Такой выбор базировался на том, что эти животные при инокуляции вирусом, путем введения его в респираторный тракт, проявляли близкую к человеку чувствительность к VARV, ранее определенную путем прогнозной оценки [19, 30]. Они воспроизводили, как и люди или модельный вид животных (*M. fascicularis*), но без клинической картины заболевания, первый этап распространения патогена

(инфекционный процесс в первичных органах-мишенях: органах дыхательного тракта, включая клетки-мишени), а также патоморфологические изменения в них. Учитывая то, что мыши а/б п. ICR и и/д л. SCID моделируют у человека или модельного вида животных (*M. fascicularis*) лишь начальную стадию вызванного VARV инфекционного процесса (проникновение вируса в первичные клетки-мишени органов респираторного тракта и его размножение там), использование лабораторных моделей «10-14-суточная мышь а/б п. ICR и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции», а также «18-21-суточная мышь и/д л. SCID и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции» было сориентировано на изучение не терапевтической (лечебной), а только профилактической (лечебно-профилактической) эффективности разрабатываемых средств медицинского применения с учетом получения информации для макроорганизмов с нормальной и подавленной иммунной системой. При оценке такой активности создаваемых противооспенных лекарственных препаратов (в качестве примера - 2 химически синтезированных соединения: ST-246 и НИОХ-14) с помощью этих лабораторных моделей было подтверждено существование ранее опубликованного многими исследователями соответствующего положительного эффекта, что подтвердило возможность их использования для этой цели.

Основные результаты исследований с VARV, касающиеся изучения лабораторных моделей «10-14-суточная мышь а/б п. ICR и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции», а также «18-21-суточная мышь и/д л. SCID и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции», были приведены в 8 российских и зарубежных научных трудах, в том числе в 2 патентах РФ на изобретения [8, 18, 25, 33, 34, 129, 149, 154]. С использованием этих модельных биосистем были с успехом завершено доклиническое исследование химически синтезированного соединения НИОХ-14, разработанного в России.

Данные лабораторные модели могут применяться в области медицины и ветеринарии для массового скрининга разрабатываемых препаратов по профилактическому (лечебно-профилактическому) действию от НО и являются менее затратными и более простыми в использовании по сравнению с таковой на основе приматов, сориентированной только на оценку терапевтического (лечебного) эффекта у исследуемых препаратов. В связи с чем были выпущены соответствующие методические рекоменда-

дации ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (МР 4.2.005-16 и 4.2.003-16, титульные листы которых представлены в приложениях А и Б соответственно) по применению лабораторных моделей, основная информация которых вошла в учебное издание [31], используемое в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора с целью подготовки аспирантов очной формы обучения, научных сотрудников и лаборантов.

В перспективе разработка направления данной работы должна быть связана с усовершенствованием заявленных лабораторных моделей за счет расширения пределов их практического использования в направлении оценки лечебной (терапевтической) эффективности химиопрепаратов, ориентируясь при этом на в/в метод инфицирования мышей а/б п. ICR и и/д л. SCID.

### **По результатам выполненных исследований были представлены выводы.**

1 В экспериментах при интраназальном заражении 10-14-суточных и 42-49-суточных мышей аутбредной популяции ICR и 18-21-суточных мышей иммунодефицитных линий SCID и Nude вирусом натуральной оспы (штамм India-3a) в максимальной дозе, равной 5,2 lg БОЕ, не было отмечено появления внешних клинических признаков заболевания.

2 Чувствительность 10-14-суточных и 42-49-суточных мышей аутбредной популяции ICR и 18-21-суточных мышей иммунодефицитных линий SCID и Nude к вирусу натуральной оспы (штамм India-3a) одинаковая, судя по отсутствию отличий между величинами ИД<sub>50</sub> при интраназальном заражении данным вирусом всех исследованных групп мышей.

3 При интраназальном заражении 10-14-суточных и 42-49-суточных мышей аутбредной популяции ICR и 18-21-суточных мышей иммунодефицитных линий SCID и Nude вирусом натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 25-80 ИД<sub>50</sub> инфекционный процесс ограничивается в основном органами респираторного тракта. Органами наибольшего накопления патогена у этих животных являются легкие и нос, где в ряде случаев его концентрация достигала 4,8 lg БОЕ/мл гомогената.

4 У 10-14-суточных мышей аутбредной популяции ICR и 18-21-суточных мышей иммунодефицитной линии SCID, интраназально зараженных вирусом натуральной оспы (штамм India-3a) в дозах 30 и 50 ИД<sub>50</sub> соответственно, наиболее выражен-

ные патоморфологические изменения воспалительно-некротического характера, сходные с таковыми у человека при натуральной оспе, были сосредоточены в основном в респираторных органах.

5 В первичной культуре макрофагов селезенки 10-14-суточных мышей аутбредной популяции ICR, инфицированной вирусом натуральной оспы (штамм India-3a), отмечено размножение данного вируса.

6 На примере перорального введения химических соединений НИОХ-14 и ST-246, которые обладают доказанным антиортопоксвирусным действием, 10-14-суточным мышам аутбредной популяции ICR и 18-21-суточным мышам иммунодефицитной линии SCID, интраназально зараженным вирусом натуральной оспы (штамм India-3a), показано, что эти лабораторные модели пригодны для оценки лечебно-профилактического действия химиопрепаратов от натуральной оспы.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

А/з	- аэрозольно
А/б п.	- аутбредная популяция
БОЕ	- бляшкообразующая единица
В/в	- внутривенно
ГНЦ ВБ «Вектор»	- Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ИД <sub>50</sub>	- 50 %-я инфицирующая доза
И/д л.	- иммунодефицитная линия
И/н	- интраназально
ИППВ	- индекс подавления продукции вируса = М титра вируса в гомогенатах легких мышей, обработанных плацебо – М титра вируса в гомогенатах легких мышей, обработанных препаратом
КЗИ	- коэффициент защиты от инфекции = % животных с вирусом в легких мышей, обработанных плацебо – % животных с вирусом в легких мышей, обработанных препаратом
ЛД <sub>50</sub>	- 50 %-я летальная доза
НО	- натуральная оспа
НIOX	- Новосибирский институт органической химии
ООЕ	- оспинообразующая единица
П.и.	- после инфицирования
Роспотребнадзор	- Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
РФ	- Российская Федерация
СО РАН	- Сибирское отделение Российской академии наук
США	- Соединенные Штаты Америки
ФБУН	- Федеральное бюджетное учреждение науки
АО «НПО «Микроген»	- Акционерное общество «Научно-производственное объединение «Микроген»

CO <sub>2</sub>	- двуокись углерода
IS (TI)	– индекс селективности (терапевтический индекс) соединения
lg	- десятичный логарифм
M	- среднее значение
<i>M.</i>	- <i>Masasa</i>
p	- вероятность ошибки, уровень значимости
RPMI-1640	- вирусологическая питательная среда
VACV	- vaccinia virus (вирус осповакцины)
VARV	- variola virus (вирус натуральной оспы)
Vero	- перевиваемая культура клеток почки зеленой мартышки

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Акатова-Шелухина, Э.М. Устойчивость вирусов натуральной оспы, аластрим и осповакцины к некоторым физическим и химическим факторам: дисс. ... канд. мед. наук: 03.02.02/ Акатова-Шелухина Эльвира Матвеевна - М. 1962. - 161 с.
- 2 Бургасов, П.Н. Натуральная оспа/ П.Н. Бургасов, Г.П. Николаевский. - М.: Медицина, 1972. - 208 с.
- 3 Выживаемость вируса натуральной оспы в корочках от больных/ Е.Ф. Беланов, А.А. Гуськов, Е.Б. Сокунова [и др.]// Докл. РАН. – 1997. - №354. – С. 832-834.
- 4 Гутман, Н.Р. Изучение свойств вируса натуральной оспы/ Н.Р. Гутман// Тр. Моск. НИИВС им. Мечникова. – 1957. - № 9. – С. 182-190.
- 5 Закс, Л. Статистическое оценивание/ Л. Закс. - М.: Статистика, 1976. – 598 с.
- 6 Изучение некоторых патогенетических характеристик гриппозной инфекции у белых мышей/ О.Г. Пьянкова, Л.Е. Булычев, А.Н. Сергеев [и др.]// Вопр. вирусол. – 1997. - № 5. – С. 216-218.
- 7 Изучение противовирусной активности химически синтезированных соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах *in vitro*/ А.С. Кабанов, А.А. Сергеев, Л.Е. Булычев [и др.]// Пробл. особо опасных инфекций. – 2013. - №2. – С. 54-59.
- 8 Использование модели мышь ICR – вирус натуральной оспы для оценки эффективности противовирусных препаратов/ К.А. Титова, А.А. Сергеев, А.С. Кабанов [и др.]// Вопр. вирусол. – 2016. - №2. - С. 79-84.
- 9 Использование мыши в качестве модельного животного для оценки эффективности лечебно-профилактического действия препаратов против оспы обезьян/ А.А. Сергеев, А.С.Кабанов, Л.Е. Булычев [и др.]// Пробл. особо опасных инфекций. – 2013. - №2. – С. 60-65.
- 10 Капцова, Т.И. Разработка экспериментальных моделей натуральной оспы: дис. ... канд. мед. наук: 03.00.06/ Капцова Татаьяна Ивановна. - М., 1967. – 147 с.
- 11 Лечебно-профилактическое средство против вируса натуральной оспы и способы его получения и применения: пат. 2543338 Рос. Федерация: МПК А61Р 31/12 А61К 31/16 / Л.Н. Шишкина, А.Н. Сергеев, А.П. Агафонов [и др.]; заявитель и патен-



тообладатель Гос. научн. центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - № 2013146046/15; заявл. 15.10.13; опубл. 27.02.2015; бюл. №6. – 15 с: ил.

12 Маренникова, С.С. Выделение и изучение свойств вируса натуральной оспы. Сообщ. 2. Восприимчивость лабораторных животных к вирусу натуральной оспы/ С.С. Маренникова// Вопр. вирусол. – 1961. - №1. – С. 73-78.

13 Маренникова, С.С. Материалы по изучению возбудителя, лабораторной диагностике и экстренной профилактике натуральной оспы: дисс. ... докт. мед. наук: 03.00.06/ Маренникова Светлана Сергеевна. – М., 1962. – 484 с.

14 Маренникова, С.С. О возрастной чувствительности белых мышей к вирусу натуральной оспы/ С.С. Маренникова, Т.И. Капцова// Acta Virol. – 1965. – Vol. 9. – P. 230-234.

15 Маренникова, С.С. Патогенные для человека ортопоксвирусы/ С.С. Маренникова, С.Н. Щелкунов. - М.: KMK Scientific Press Ltd., 1998. - 386 с.

16 Маркин, В.А. Разработка методологии прогностической значимой оценки защитной эффективности противовирусных препаратов/ В.А. Маркин// Вопр. вирусол. – 2012. - №57 (2). – С. 14-19.

17 Методы лабораторной диагностики оспы и их сравнительная оценка по материалам вспышки 1960 года. Натуральная оспа (под ред. С.С. Маренниковой)/ С.С. Маренникова, Э.М. Акатова, Э.Б. Гурвич [и др.]. - М: 1961. – P. 63-79.

18 Мышь линии SCID как модельное животное для оценки эффективности препаратов против натуральной оспы/ К.А. Титова, А.А. Сергеев, А.С. Кабанов [и др.]// Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. - №19(4). - С. 487-493, DOI 10.18699/VJ15.065.

19 Овчинникова, А.С. Мышь аутбредной популяции ICR – лабораторная модель для оценки эффективности препаратов против оспы обезьян: дисс. ... канд. биол. наук: 03.02.02/ Овчинникова Алена Сергеевна. – Кольцово Новосибирской обл., 2016. - 139 с.

20 Огарков, В.И. Аэрогенная инфекция/ В.И. Огарков, К.Г. Гапченко. - М.: Медицина, 1975. - 232 с.

21 Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях/ С.Г. Дроздов, Н.С. Гарин, Л.С. Джинджоян, В.М. Тарасенко. – М.: Медицина, 1987. - 256 с.

22 Оспа коров: особенности распространения после отмены обязательного оспопрививания/ С.В. Борисевич, С.С. Маренникова, А.А. Махлай [и др.]// ЖМЭИ. - 2012. - № 3. – С. 103-107.

23 Оспа обезьян: особенности распространения после отмены обязательного оспопрививания/ С.В. Борисевич, С.С. Маренникова, А.А. Махлай [и др.]// ЖМЭИ. - 2012. - № 2. – С. 69-73.

24 Оценка лечебно-профилактической эффективности химического соединения НИОХ-14 в отношении вируса экстремелии *in vivo*/ А.С. Кабанов, Л.Н. Шишкина, О.Ю. Мазурков [и др.]// Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2015. - №1. – С. 58-65.

25 Оценка чувствительности животных к особо опасным ортопоксвирусам с использованием первичных культур клеток легких/ А.С. Замедьянская, А.А. Сергеев, К.А. Титова [и др.]// Пробл. особо опасных инф. – 2016. - №1. – С. 75-78.

26 Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных: введ. в действие с 12.08.1977 г. приказом Министерства здравоохранения СССР № 755.

27 Производные трицикло[3.2.2.0<sup>2,4</sup>]нон<sub>8</sub>ен<sub>6,7</sub>-дикарбоновой кислоты высокоэффективно ингибируют репликацию различных видов ортопоксвирусов/ Б.А. Селиванов, Е.Ф. Беланов, Н.И. Бормотов [и др.]// Доклады Академии наук. – 2011. - №441(3). – С. 414-418.

28 Разработка простого метода прямой оценки наличия инфекционного процесса у мышей и крыс, аэрогенно инфицированных вирусом гриппа/ А.Н. Сергеев, В.А. Жуков, В.Д. Порываев [и др.]// Вопр. вирусол. – 2002. - №4. – С. 44-46.

29 Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. - Перевод с английского. - Washington, D.C.: National Academy Press, 1996. – 138 с.

30 Сергеев, А.А. Модельные биосистемы для оценки защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) у человека: дис. ... докт. мед.

наук: 03.02.02/ Сергеев Артемий Александрович. - Кольцово Новосибирской обл., 2016. - 332 с.

31 Сергеев, А.А. Практикум по изучению в экспериментах *in vivo* защитного действия препаратов от натуральной оспы, оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) / А.А. Сергеев, Л.Н. Шишкина - Новосибирск: ЗАО «Кант», 2016. - 61 с.

32 Сергеев А.А. Степной сурок - модельный вид животного для оспы обезьян: дисс. ... канд. мед. наук: 03.00.06/ Сергеев Александр Александрович. – Кольцово Новосибирской обл., ГНЦ ВБ «Вектор», 2015. - 132 с.

33 Способ оценки активности лечебно-профилактических препаратов против вируса натуральной оспы: пат. 2522483 Рос. Федерация: МПК А61К 35/76 А61Р 31/12/ С12N 7/00 / А.А. Сергеев, А.С. Кабанов, Л.Е. Булычев [и др.]; заявитель и патентообладатель Гос. научн. центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - № 2013141380/10; заявл. 09.09.13; опубл. 20.07.14, бюл. №20. – 15 с: ил.

34 Способ оценки активности лечебно-профилактических препаратов против вируса натуральной оспы: пат. 3565812 Рос. Федерация: МПК С12N 7/00 А61К 35/76 А61Р 31/12/ А.А. Сергеев, К.А. Титова, А.С. Кабанов [и др.]; заявитель и патентообладатель Гос. научн. центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - № 2014138337/10; заявл. 22.09.14; опубл. 20.10.15, бюл. №29. – 21 с: ил.

35 Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/ Р.У. Хабриев. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.

36 Халафян, А.А. Statistica 6. Статистический анализ данных/ Халафян, А.А. - 2-е изд. - М.: ООО «Бином-Пресс», 2010.

37 Шафрикова, Р.А. Свойства свежевыделенных штаммов вируса натуральной оспы и изучение изменчивости этого вируса в естественных и экспериментальных условиях: дисс. ... канд. мед. наук: 03.00.06/ Шафрикова Раиса Александровна – М. 1970. – 158 с.

38 Шелухина, Э.М. Биология и экология ортопоксвирусов, патогенных для человека: дис. ... докт. мед. наук: 03.00.06/ Шелухина Эльвира Матвеевна. - М; 1980. – 336 с.

39 Activities of certain 5-substituted 4-thiopyrimidine nucleosides against orthopoxvirus infections/ E.R. Kern, M.N. Prichard, D.C. Quenelle [et. al.]// Antimicrob. Agents Chemother. - 2009. - Vol. 53 (2). - P. 572–579.

40 Activity of the anti-orthopoxvirus compound ST-246 against vaccinia, cowpox and camelpox viruses in cell monolayers and organotypic raft cultures/ S. Duraffour, R. Snoeck, R. de Vos [et al.]// Antivir. Ther. - 2007. - Vol. 12. - P. 1205–1216.

41 An airborne outbreak of smallpox in German hospital and its significance with respect to other recent outbreaks in Europe/ P.F. Wehrle, J. Posch, K.H. Richter, D.A. Henderson// Bull WHO. – 1070. – Vol. 43. – P. 669-679.

42 Anderson, P.D. Bioterrorism: Pathogens as weapons/ P.D. Anderson, G. Bokor// J. Pharm. Pract. - 2012. - Vol. 25. - P. 521–529.

43 Anders, W. Die Pockenausbrüche 1961/1962 in Nordrhein-Westfalen/ W. Anders, J. Posch// Bundesgesundheitsblatt. – 1962. – Bd. 17. – S. 265-269.

44 Animal models of orthopoxvirus infection/ J.L. Chapman, D.K. Nichols, M.J. Martinez, J.W. Raymond// Vet. Path. – 2010. – Vol. 47 (5). – P. 852-870.

45 An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus challenge/ G. Yang, D.C. Pevear, M.H. Davies [et al.]// J. Virol. – 2005. – Vol. 79 (20). – P. 13139-13149.

46 A prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease using West African and Congo Basin strains of monkeypox virus/ C.L. Hutson, V.A. Olson, D.S. Carroll [et al.]// J. Gen. Virol. – 2009. – Vol. 90. – P. 323-333.

47 Assessment of the protective effect of Imvamune and Acam2000 vaccines against aerosolized monkeypox virus in *F. scirularis* macaques/ G.J. Hatch, V.A. Graham, K.R. Bewley [et al.]// J. Virol. – 2013. – Vol. 87 (14). – P. 7805–7815.

48 Baker, R.O. Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections/ R.O. Baker, M. Bray, J.W. Huggins// Antiviral Res. – 2003. – Vol. 57 (1-2). – P. 13-23.

49 Belizário, J.E. Immunodeficient mouse models: an overview/ J.E. Belizário// Open Immunol. J. - 2009. - Vol. 2. - P. 79-85.

- 50 Bioluminescence imaging of vaccinia virus: effects of interferon on viral replication and spread/ K. Luker, M. Hutchens, T. Schultz [et al.]// *Virology*. – 2005. – Vol. 341 (2). – P. 284–300.
- 51 Bouvier, N.M. Animal models for influenza virus pathogenesis and transmission/ N.M. Bouvier, A.C. Lowen// *Viruses*. – 2010. – Vol. 2. – P. 1530–1563.
- 52 Bras, G. The morbid anatomy of smallpox/ G. Bras// *Docum. Med. Geogr. Trop.* – 1952. – Vol. 4. – P. 303–351.
- 53 Brinckerhoff, W.R. Studies upon experimental variola and vaccinia in *Quadrumanus*/ W.R. Brinckerhoff, E.E. Tyzzer// *J. Med. Res.* – 1906. – Vol. 14 (2). – P. 213–359.
- 54 Brown, A. Growth and passage of variola virus on mouse brain/ A. Brown, V. Elsner, J.E. Officer// *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1960. – Vol. 104 (4). – P. 605–608.
- 55 Buist, J.B. The life-history of the microorganisms associated with variola and vaccinia/ J.B. Buist// *Proc. R. Soc. Edinburgh*. – 1886. – Vol. 13. – P. 603.
- 56 Buller, R.M. Mousepox: a small animal model for biodefense research/ R.M. Buller// *Appl. Biosafety*. – 2004. – Vol. 9 (1). – P. 10–19.
- 57 Burden of interpandemic influenza in children younger than 5 years: a 25-year prospective study/ K.M. Neuzil, Y. Zhu, M.R. Griffin [et al.]// *J. Infect. Dis.* – 2002. – Vol. 185 (2). – P. 147–152.
- 58 Chimerix. CMX001 for treatment of smallpox. 2012. 48 p.
- 59 Clinical attack rate and presentation of pandemic H1N1 influenza versus seasonal influenza A and B in a pediatric cohort in Nicaragua/ A. Gordon, S. Saborio, E. Videira [et al.]// *Clin. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 50 (11). – P. 1462–1467.
- 60 Comparative pathology of smallpox and monkeypox in man and macaques/ J.A. Cann, P.B. Jahrling, L.E. Hensley, V. Wahl-Jensen// *J. Comp. Path.* – 2013. – Vol. 148. – P. 6–21.
- 61 Copeman, S.M. Variola and vaccinia, their manifestations and interrelations in the lower animals: a comparative study/ S.M. Copeman// *J. Path. Bact.* – 1894. – Vol. 2. – P. 407–427.
- 62 Councilman, W.T. The pathological anatomy and histology of variola/ W.T. Councilman, G.B. Magrath, W.R. Brinckerhoff// *J. Med. Res.* – 1904. – Vol. 11. – P. 12–135.

- 63 Darrasse, H. Note sur le diagnostic de la variola au laboratoire/ H. Darrasse, P. Bres, R. Camain// *Ann. Inst. Pasteur.* – 1958. – T. 94 (5). – P. 577-582.
- 64 De Haan, L.J.E. Vaccine et retrovaccine/ L.J.E. De Haan// *Ann. Inst. Pasteur.* – 1986. – T. 10 (3). – P. 169-175.
- 65 De Jong, M. The alastrim epidemic in the Hague, 1953-1954/ M. De Jong// *Docum. Med. Geogr. Trop.* – 1956. – Vol. 8 (3). – P. 207-236.
- 66 Detection and identification of Variola virus in fixed human tissue after prolonged archival storage. Laboratory investigation/ R.J. Schoepp, M.D. Morin, M.J. Martinez [et al.]// *J. Tech. Meth. Pathol.* – 2004. – Vol. 84 (1). – P. 41-48.
- 67 Development of ST-246 for treatment of poxvirus infections/ R. Jordan, J.M. Leeds, S. Tyavanagimatt, D.E. Hruby// *Viruses.* – 2010. – Vol. 2. – P. 2409-2435.
- 68 Dosage comparison of Congo Basin and West African strains of monkeypox virus using a prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease/ C.L. Hutson, D.S. Carroll, J. Self [et al.]// *Virology.* – 2010. – Vol. 402. – P. 72–82.
- 69 Dumbell, K.R. Laboratory investigation of two “whitepox” viruses and comparison with two variola strains from southern India/ K.R. Dumbell, J.G. Kapsenberg// *Bull. WHO.* – 1982. – Vol. 60. – P. 381-387.
- 70 Ectromelia virus infections of mice as a model to support the licensure of anti-orthopoxvirus therapeutic/ S. Parker, N.G. Chen, S. Foster [et al.]// *Viruses.* – 2010. – Vol. 2. – P. 1918-1932.
- 71 Effective antiviral treatment of systemic orthopoxvirus disease: ST-246 treatment of prairie dogs infected with monkeypox virus/ S.K. Smith, J. Self, S. Weiss [et. al.]// *J. Virol.* – 2011. – Vol. 85 (17). – P. 9176-9187.
- 72 Effect of route of inoculation on experimental respiratory viral disease in volunteers and evidence for airborne transmission/ R.B. Couch, T.R. Cate, R.G. Douglas [et al.]// *Bacteriological Reviews.* – 1966. – Vol. 30 (3). – P. 517-529.
- 73 Efficacy of delayed treatment with ST-246 given orally against systemic orthopoxvirus infections in mice/ D.C. Quenelle, R.M. Buller, S. Parker [et. al.]// *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2007. – Vol. 51. – P. 689–695.

74 Efficacy of ST-246 versus lethal poxvirus challenge in immunodeficient mice/ D.W. Grosenbach, A. Berhanu, D.S. King [et al.]// Proc. Natl. Acad. Sci. - 2010. - Vol. 107. - P. 838–843.

75 Efficacy of tecovirimat (ST-246) in nonhuman primates infected with variola virus (smallpox)/ E.M. Mucker, A.J. Goff, J.D. Shamblin [et al.]// Antimicrob. Agents Chemother. - 2013. - Vol. 57 (12). - P. 6246-6253.

76 Efficacy of the antipoxvirus compound ST-246 for treatment of severe orthopoxvirus infection/ E. Sbrana, R. Jordan, D.E. Hruby [et al.]// Am. J. Trop. Med. Hyg. - 2007. - Vol. 76 (4). - P. 768–773.

77 Endemic smallpox in rural East Pakistan. H. Intravillage transmission and infectiousness/ D.B. Thomas, I. Arita, W.M. McCormack [et al.]// Am. J. Epidemiol. - 1971. - Vol. 93. - P. 373-383.

78 Evaluation of disease and viral biomarkers as triggers for therapeutic intervention in respiratory mousepox - an animal model of smallpox/ S. Parker, N.G. Chen, S. Foster [et al.]// Antiviral Res. - 2012. - Vol. 94 (1). - P. 44-53.

79 Evaluation of inhaled cidofovir as postexposure prophylactic in an aerosol rabbit-pox model/ D. Verreault, S.K. Sivasubramani, J.D. Talton [et al.]// Antivir. Res. - 2012. - Vol. 93 (1). - P. 204–208.

80 Experimental respiratory infection with poxviruses: I. Clinical virological and epidemiological studies/ J.C. Westwood, E.A. Boulter, E.T. Bowen, H.B. Maber// Br. J. Exp. Pathol. - 1966. - Vol. 47. - P. 453–465.

81 Experimental respiratory infection with poxviruses. II Pathological studies/ M.C. Lancaster, E.A. Boulter, J.C.N. Westwood, J. Randles// Brit. J. Exp. Path. - 1966. - Vol. 47 (5). - P. 466-471.

82 Experimental smallpox in chimpanzees/ S.S. Kalter, A.R. Rodriguez, L.B. Cummins [et al.]// Bull. WHO. - 1979. - Vol. 57. - P. 637-641.

83 Exploring the potential of variola virus infection of *Fascicularis* macaques as a model for human smallpox/ P.B. Jahrling, L.E. Hensley, M.J. Martinez [et al.]// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2004. - Vol. 101 (42). - P. 15197-15200.

84 Gispen, R. De herbesmetting van Indonesie met pokken/ R. Gispen// Nederl. Tijdschr. Geneesk. - 1949. - Bd. 93. - S. 3686–3695.

- 85 Gispén, R. "White" poxvirus strains from monkeys/ R. Gispén, B. Brand-Saathof// Bull. WHO. – 1972. – Vol. 46. – P. 585-592.
- 86 Grosenbach, D.W. Development of the small-molecule antiviral ST-246® as a smallpox therapeutic/ D.W. Grosenbach, R. Jordan, D.E. Hruby// Future Virol. – 2011. – Vol. 6 (5). – P. 653–671.
- 87 Guarnieri, G. Ricerche sulla patogenesi ed etiologia dell'infezione vaccinica e variolosa/ G. Guarnieri// Arch. Sci. Med. - 1892. - Vol. 16. - P. 403.
- 88 Haemorrhagic smallpox/ A.W. Downie, D.S. Fedson, L. St. Vincent [et al.]// J. Hyg. – 1969. – Vol. 67. – P. 619-629.
- 89 Haemorrhagic smallpox. A study of 22 cases to determine the cause of bleeding/ B.C. Mehta, R.G. Doctor, N.M. Purandare, J.C. Patel// Indian J. Med. Sci. – 1967. – Vol. 21. – P. 518-523.
- 90 Haemorrhagic smallpox I. Preliminary haematological studies/ J.F. Roberts, G. Coffee, S.M. Creel [et al.]// Bull. WHO. – 1965. – Vol. 33. – P. 607-613.
- 91 Haemorrhagic smallpox 2. Specific bleeding and coagulation studies/ P.J. McKenzie, J.H. Githens, M.E. Harwood [et al.]// Bull. WHO. – 1965. – Vol. 33. – P. 773-782.
- 92 Haga, T. Animal models to study influenza virus pathogenesis and control/ T. Haga, T. Horimoto// Open Antimicrob. Agents J. – 2010. – Vol. 2. – P. 15-21.
- 93 Hahon, N. Air-borne infectivity of the variolavaccinia group of poxviruses for the *Fascicularis* monkey, *Macaca fascicularis*/ N. Hahon, M.H. McGavran// J. Infect. Dis. – 1961. – Vol. 109. – P. 294–298.
- 94 Hahon, N. Pathogenesis of variola in *Macaca fascicularis* monkeys/ N. Hahon, B.J. Wilson// Amer. J. Hyg. – 1960. – Vol. 71. – P. 69-80.
- 95 Hahon, N. Survival of variola virus on chorioallantoic membrane preparation/ N. Hahon// J. Bact. – 1959. – Vol. 66. – P. 2982-2989.
- 96 Harrell, M.I. Lymph node mapping in the mouse/ M.I. Harrell, B.M. Iritani, A.J. Ruddell// Immunol. Methods. – 2008. – Vol. 332 (1-2). – P. 170–174.
- 97 Haviland, J.W. Purpura variolosa; its manifestations in skin and blood/ J.W. Haviland// Yale J. Biol. Med. – 1952. – Vol. 24. – P. 518-524.
- 98 Heberling, R.L. Poxvirus infection of the baboon (*Papio cynocephalus*)/ R.L. Heberling, S.S. Kalter, A.R. Rodriguez// Bull. WHO. – 1976. – Vol. 54. – P. 285-294.



- 99 Herrlich, A. Die Pocken/ A. Herrlich. - Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1960. - 285 s.
- 100 Herrlich, A. Experimental studies on transformation of the variola virus into the vaccinia virus/ A. Herrlich, A. Mayr, H. Mahnel, E. Munz// Arch. ges. Virusforsch. – 1963. - Bd. 12. – S. 579-599.
- 101 Human influenza resulting from aerosol inhalation/ R.H. Alford, J.A. Kasel, P.J. Gerone, V. Knight// Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1966. – Vol. 122. – P. 800–804.
- 102 Human monkeypox: an emerging zoonotic disease/ S. Parker, A. Nuara, R.M. Buller, D.A. Schultz// Future Microbiol. – 2007. – Vol. 2. – P. 17-34.
- 103 Hutson, C.L. Monkeypox virus infections in small animal models for evaluation of anti-poxvirus agents/ C.L. Hutson, I.K. Damon// Viruses. - 2010. – Vol. 2. – P. 2763-2776.
- 104 Ikeda, K. The blood in purpuric smallpox. Clinical review of forty-eight cases// K. Ikeda// J. Am. Med. Assoc. – 1925. – Vol. 84. – P. 1807-1813.
- 105 *In vitro* efficacy of ST-246 against smallpox and monkeypox/ S.K. Smith, V.A. Olson, K.L. Karem [et. al.]// Antimicrob. Agents Chemother. - 2009. - Vol. 53. - P. 1007–1012.
- 106 Jahrling, P.B. Countermeasures to the bioterrorist threat of smallpox/ P.B. Jahrling, E.A. Fritz, L.E. Hensley// Curr. Mol. Med. - 2005. - Vol. 5. - P. 817–826.
- 107 Kyrle, I. Tierexperimentelle Studien uber Variola/ I. Kyrle, G. Morawetz// Wien. Kiln. Wchschr. – 1915. – Bd. 28 (26). – S. 697-701.
- 108 LeDuc, J.W. Strengthening national preparedness for smallpox: an update/ J.W. LeDuc, P.B. Jahrling// Emerg. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 7. – P. 155–157.
- 109 Lillie, R.D. Smallpox and vaccinia. The pathologic histology/ R.D. Lillie// Arch. Pathol. – 1930. – Vol. 10. – P. 241-291.
- 110 Magrath, G.B. On experimental variola in the monkey/ G.B. Magrath, W.R. Brinckerhoff// J. Med. Res. – 1904. – Vol. 11 (1). – P. 230-246.
- 111 Magrath, G.B. On the occurrence of cytocytes variolae (Guarnieri) in the skin of the monkey inoculated with variola virus/ G.B. Magrath, W.R. Brinckerhoff// J. Med. Res. – 1904. – Vol. 11 (1). – P. 173-180.

- 112 Marennikova, S.S. Orthopoxviruses pathogenic for humans/ S.S. Marennikova, S.N. Shchelkunov. – NY: Springer New York, 2005. – 424 p.
- 113 Mayr, A. Zuchting des Variolavirus in der infantilen Maus/ A. Mayr, A. Herrlich// Arch. Ges. Virusforsch. – 1960. – Bd. 10 (2). – S. 226-135.
- 114 McCallum, F.O. Survival of variola virus in raw cotton/ F.O. McCallum, J.K. McDonald// Bull. WHO. – 1957. – 16 (2). – P. 247-254.
- 115 McCarthy, K. An investigation of immunological relationships between the virus of variola, vaccinia, cowpox and ectromelia de neutralization test on choroallantois of chick embryos/ K. McCarthy, A.W. Downie// Brit. J. Exp. Path. – 1948. – Vol. 29 (6). – P. 501-510.
- 116 McMinn, P. A comparison spread of Murray Valley encephalitis viruses of high or low neuroinvasiveness in tissues of Swiss mice after peripheral inoculation/ P. McMinn, R. Weir, L. Dalgarno// Virology. – 1996. – Vol. 220. – P. 414-423.
- 117 Mitra, A.C. Virus content of smallpox scabs/ A.C. Mitra, J.K. Sarkar, M.K. Mukherjee// Bull. WHO. – 1974. - Vol. 51. – P. 106-107.
- 118 Mitra, M. Some observations on haemorrhagic smallpox (Type I)/ M. Mitra, D.K. Bhattacharya// J. Indian Med. Assoc. – 1976. – Vol. 67. – P. 237-240.
- 119 Mukherjee, M.K. Pattern of intrafamilial transmission of smallpox in Calcutta, India/ M.K. Mukherjee, J.K. Sarkar, A.C. Mitra// Bull. WHO. – 1974. – Vol. 51. – P. 219-225.
- 120 Murti, B.R. A study biological behavior of variola virus. II. Experimental inoculation of laboratory animals/ B.R. Murti, J.B. Shrivastav// Indian J. Med. Sci. – 1957. – Vol. 11 (8). – P. 580-587.
- 121 N-(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-Octahydro-1,3-dioxo-4,6-ethenocycloprop[f]isoindol-2-(1H)-yl)carboxamides: identification of novel orthopoxvirus egress inhibitors/ T.R. Bailey, S.R. Rippin, E. Opsitnick [et al.]// J. Med. Chem. – 2007. – Vol. 50 (7). – P. 1442-1444.
- 122 Negri, A. Ueber Filtration des Vaccine virus/ A. Negri// Z. Hyg. Infektionskr. – 1906. - Bd. 54. - S. 327.
- 123 Nelson, J.B. Behavior of pox viruses in respiratory tract. II. The response of mice to the nasal instillation of variola virus/ J.B. Nelson// J. Exp. Med. – 1939. – Vol. 70 (1). – P. 107-115.

124 New research on influenza: studies with normal volunteers. Combined clinical staff conference at the national institutes of health/ V. Knight, J.A. Kasel, R.H. Alford [et al.]// Ann. Intern. Med. – 1965. – Vol. 62. – P. 1307–1325.

125 Noble, J.Jr. A study of New and Old World monkeys to determine the likelihood of simian reservoir of smallpox/ J.Jr. Noble// Bull. WHO. – 1970. – Vol. 42. – P. 509-514.

126 Noble, J.Jr. Transmission of smallpox by contact and aerosol routes in *Macaca Fascicularis*/ J.Jr. Noble, J.A. Rich// Bull. WHO. – 1969. - Vol. 40. – P. 279-286.

127 Nonhuman primates are protected from smallpox virus or monkeypox virus challenges by the antiviral drug ST-246/ J. Huggins, A. Goff, L. Hensley [et al.]// Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53 (6). – P. 2620–2625.

128 Pashen, E. Was wissen wir unter den Vakzineereger?/ E. Pashen// Muench. med. Wochenschr. – 1906. - Bd. 53. - S. 2391.

129 Possibility of using a mouse SCID as a model animal to variola virus for evaluating anti-smallpox drug efficacy/ K.A. Titova, A.A. Sergeev, A.S. Kabanov [et al.]// Rus. J. Gen.: Appl. Res. – 2016. – Vol. 6 (4). - C. 477–484.

130 Poxvirus viability and signatures in historical relics/ A.M. McCollum, Y. Li, K. Wilkins [et al.]// Emerg. Infect. Dis. - 2014. - Vol. 20 (2). - P. 177-184.

131 Progression of pathogenic events in *Fascicularis* macaques infected with variola virus/ V. Wahl-Jensen, J.A. Cann, K.H. Rubins [et al.]// PLoS One. – 2011. – Vol. 6. - e24832.

132 Rao, A.R. Smallpox/ A.R. Rao. - Bombay: The Kothari Book Deport, 1972. - 220 p.

133 Rao, P.S. Immunizing potency against variola of strains of vaccinia virus seeds used in India for the preparations of vaccine lymph/ P.S. Rao// Indian J. med. Res. – 1952. – Vol. 40 (3). – P. 341-351.

134 Results of a virological study of smallpox convalescents and contacts/ E.M. Shelukhina, S.S. Marennikova, N.N. Maltseva [et al.]// J. Hyg. Epidemiol., Microbiol., Immunol. – 1973. – Vol. 17. – P. 266-271.

135 Roy, C.J. Use of the aerosol rabbitpox virus model for evaluation of anti-poxvirus agents/ C.J. Roy, T.G. Voss// Viruses. - 2010. - Vol. 2. - P. 2096-2107.

136 Smallpox and its eradication/ F. Fenner, D.A. Henderson, I. Arita [et al.] - Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1988. - 1460 p.

137 Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense/ D.A. Henderson, T.V. Inglesby, J.G. Bartlett [et al.]// J. Am. Med. Assoc. - 1999. - Vol. 281. - P. 2127–2137.

138 Spread of Venezuelan equine encephalitis virus in mice olfactory tract/ A. Ryzhikov, E. Ryabchikova, A. Sergeev, N. Tkacheva// Arch. Virol. – 1995. – Vol. 140 (12). – P. 2243-2254.

139 ST-246 antiviral efficacy in a nonhuman primate monkeypox model: determination of the minimal effective dose and human dose justification/ R. Jordan, A. Goff, A. Frimm [et al.]// Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53 (5). – P. 1817–1822.

140 ST-246 inhibits in vivo poxvirus dissemination, virus shedding, and systemic disease manifestation/ A. Berhanu, D.S. King, S. Mosier [et. al.]// Antimicrob. Agents Chemother. - 2009. - Vol. 53. - P. 4999–5009.

141 Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation/ I. Leparac-Goffart, B. Poirier, D. Garin [et al.]// J. Clin. Virol. – 2005. – Vol. 32. – P. 47-52.

142 Studies on the virus content of mouth washing in the acute phase of smallpox/ A.W. Downie, L.St. Vincent, G. Meicklejohn [et al.]// Bull. WHO. – 1961. – Vol. 25. – P. 49-53.

143 Sullivan, K.M. Estimates of the US health impact of influenza/ K.M. Sullivan, A.S. Monto, I.M.Jr. Longini// Am. J. Public Health. – 1993. – Vol. 83 (12). – P. 1712–1716.

144 Synergistic efficacy of the combination of ST-246 with CMX001 against orthopoxviruses/ D.C. Quenelle, M.N. Prichard, K.A. Keith [et. al.]// Antimicrob. Agents Chemother. - 2007. - Vol. 51. - P. 4118–4124.

145 Tecovirimat for the treatment of smallpox disease. Final advisory committee briefing materials: available for public release/ FDA advisory committee briefing document// Antimicrobial Division Advisory Committee Meeting May 1, 2018. – 83 p.

146 Teissier, P. Experiences de variolisation sur les singes (*M. rhesus* et *M. nemestinus*)/ P. Teissier, M. Divoir, H. Stevenin// C.R. Nebd. Soc. Biol. – 1911. – 70. – P. 654-656.

- 147 The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere/ K.D. Reed, J.W. Melski, M.B. Graham [et al.]// N. Engl. J. Med. – 2004. - Vol. 350. - P. 342–350.
- 148 The lymph system in mice/ Y. Kawashima, M. Sugimura, Y.-Ch. Hwang, N. Kudo// Jap. J. Vet. Res. – 1964. – Vol. 12 (4). – P. 69-80.
- 149 The new effective chemically synthesized anti-smallpox compound NIOCH-14/ O.Yu. Mazurkov, A.S. Kabanov, L.N. Shishkina [et al.]// J. Gen. Virol. - 2016; doi:10.1099/jgv.0.000422.
- 150 The possibility of using the ICR mouse as an animal model to assess anti-monkeypox drug efficacy/ A.A. Sergeev, A.S. Kabanov, L.E. Bulychev [et al.]// Transbound. Emerg. Dis. – 2015, doi: 10.1111/tbed.12323.
- 151 Tores, C.M. Further studies on the pathology of their significance in the variola-alastrim problem/ C.M. Tores// Proc. Roy. Soc. Med. - 1935-1936. – Vol. 29 (2). – P. 1525-1539.
- 152 Treatment of variola major with adenine arabinoside/ J.P. Koplan, K.A. Monsur, S.O. Foster [et al.]// J. Infect. Dis. – 1975. – Vol. 131. – P. 34-39.
- 153 Using the ground squirrel (*Marmota bobak*) as an animal model to assess monkeypox drug efficacy/ A.A. Sergeev, A.S. Kabanov, L.E. Bulychev [et al.]// Transbound. Emerg. Dis. - 2015. - doi: 10.1111/tbed.12364.
- 154 Using the ICR and SCID mice as animal models for smallpox to assess antiviral drug efficacy/ K.A. Titova, A.A. Sergeev, A.S. Zamedyanskaya [et al.]// J. Gen. Virol. - 2015. - doi: 10.1099/vir.0.000216.
- 155 Variola/ K.H. Anders, H. Lieske, H. Lippelt [et. al.]// Dtsch. med. Wchschr. – 1958. – Bd. 83 (1). – S. 12-17.
- 156 Variola virus in a 300-year-old siberian mummy/ P. Biagini, C. Thèves, P. Balar-esque [et. al.]// N. Engl. J. Med. - 2012. - Vol. 367. - P. 2057-2059.
- 157 Vieuchange, J. Reactivation au moyen du virus variolique actif du virus vaccinal inactive par la chaleur/ J. Vieuchange// Compt. Rend. Acad. Sci. – 1961. – T. 252 (21). – P. 3347-3349.
- 158 Viraemia in haemorrhagic and other forms of smallpox/ A.C. Mitra, S.N. Chatterjee, J.K. Sarkar [et. al.]// J. Indian Med. Assoc. – 1966. – Vol. 47. – P. 112-114.

159 Virus and virus antigen in the blood of smallpox patients. Their significance in early diagnosis and prognosis/ A.W. Downie, K. McCarthy, A. Macdonald [et al.]// Lancet. – 1953. – Vol. 2. – P. 164-166.

160 Virus excretion in smallpox. I. Excretion in the throat, urine and conjunctive of patients/ J.K. Sarkar, A.C. Mitra, M.K. Mukherjee [et. al.]// Bull. WHO. – 1973. – Vol. 48. – P. 517-522.

161 Virus excretion in smallpox. 2. Excretion in the throats of household contacts/ J.K. Sarkar, A.C. Mitra, M.K. Mukherjee, S.K. De// Bull. WHO. – 1973. – Vol. 48. – P. 523-527.

162 Visualization of intrapulmonary lymph vessels in healthy and inflamed murine lung using CD90/Thy-1 as a marker/ S. Kretschmer, I. Dethlefsen, S. Hagner-Benes [et al.]// PloS ONE. – 2013. – Vol. 8 (2). - e55201.

163 Zuelzer, W. Zur Aetiologie der Variola/ W. Zuelzer// Centr. med. Wissensch. – 1874. – Bd. 12 (6). – S. 82-83.

## СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

- |             |   |
|-------------|---|
| Таблица 1.1 | Данные по клиническим типам натуральной оспы у <i>Macaca</i> , инокулированных разными способами с помощью различных штаммов возбудителя натуральной оспы                               |
| Таблица 1.2 | Данные по аккумуляции возбудителя натуральной оспы (штамм Yamada) в образцах от <i>Macaca fascicularis</i> , аэрозольно инфицированных дозой 4,5 lg ООЕ, по данным Nahon, Wilson (1960) |
| Таблица 1.3 | Данные по аккумуляции возбудителя натуральной оспы (штамм Higgins) в образцах от аэрозольно инфицированных <i>Macaca mulatta</i> , по данным Westwood et al. (1966)                     |
| Таблица 1.4 | Данные по патоморфологии изменений у <i>Macaca</i> после инокуляции разнообразными штаммами возбудителя натуральной оспы  |
| Таблица 1.5 | Данные по эффективности препарата ST-246 в экспериментах на <i>Macaca cynomolgus</i> с использованием возбудителя натуральной оспы  |
| Таблица 3.1 | Данные по аккумуляции возбудителя натуральной оспы (штамм   |

India-3a) в легких мышей аутбредной популяции (а/б п.) ICR и иммунодефицитных линий (и/д л.) SCID и Nude, интраназально инокулированных дозой вируса 4,2 или 5,2 lg БОЕ

- Таблица 3.2 Данные по 50 %-м инфицирующим дозам (ИД<sub>50</sub>) возбудителя натуральной оспы (штамм India-3a), подсчитанным по наличию вируса в легких, в отношении мышей аутбредной популяции (а/б п.) ICR и иммунодефицитных линий (и/д л.) SCID и Nude при интраназальном заражении
- Таблица 3.3 Данные по аккумулярованию возбудителя натуральной оспы (штамм India-3a) в организме 10-14-суточных мышей аутбредной популяции ICR, интраназально инокулированных дозой 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>)
- Таблица 3.4 Данные по аккумулярованию возбудителя натуральной оспы (штамм India-3a) в организме 42-49-суточных мышей аутбредной популяции ICR, интраназально инокулированных дозой 4,2 lg БОЕ (25 ИД<sub>50</sub>)
- Таблица 3.5 Данные по аккумулярованию возбудителя натуральной оспы (штамм India-3a) в монослое первичной культуры макрофагов селезенки (ПКМС), по 9,0 (7,5-10,5)×10<sup>5</sup> кл./лунку, 10-14-суточных мышей аутбредной популяции ICR
- Таблица 3.6 Данные по аккумулярованию возбудителя натуральной оспы (штамм India-3a) в организме 18-21-суточных мышей иммунодефицитной линии SCID, интраназально инокулированных дозой 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>)
- Таблица 3.7 Данные по аккумулярованию возбудителя натуральной оспы (штамм India-3a) в организме 18-21-суточных мышей иммунодефицитной линии Nude, интраназально инокулированных дозой 5,2 lg БОЕ (80 ИД<sub>50</sub>)
- Таблица 3.8 Таблица 3.8 - Результаты сравнительного анализа показателей взаимоотношения с вирусом натуральной оспы при инфицировании через респираторный тракт мышей аутбредной популяций ICR 10-14-суточных (10-14-сут мыши ICR) и 42-49-суточных (42-49-сут мыши ICR), мышей иммунодефицитных линий SCID 18-21-суточных (18-21-сут мыши SCID) и Nude 8-21-суточных (18-21-сут мыши Nude), а также людей (модельных *M. fascicularis*)

- Таблица 3.9 Данные по выявлению на культуре клеток Vero противооспенной активности химически синтезированных соединений по отношению к возбудителю натуральной оспы (штамм India-3a)
- Таблица 3.10 Данные по выявлению на культуре клеток Vero противооспенной активности химически синтезированных соединений по отношению к возбудителю натуральной оспы (штамм 6-58)
- Таблица 3.11 Данные по выявлению на культуре клеток Vero противооспенной активности химически синтезированных соединений по отношению к возбудителю натуральной оспы (штамм Congo-9)
- Таблица 3.12 Данные по выявлению на культуре клеток Vero противооспенной активности химически синтезированных соединений по отношению к возбудителю натуральной оспы (штамм Butler)
- Таблица 3.13 Данные по протективной активности двух химически синтезированных соединений при пероральном введении 10-14-суточным мышам аутбредной популяции ICR, интраназально инокулированным возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) дозой 3,7 lg БОЕ (10 ИД<sub>50</sub>)
- Таблица 3.14 Данные по защитной активности вакцины оспенной живой сухой для кожного применения на основе штамма ЛИВП вируса осповакцины (АО «НПО «Микроген», г. Томск), вводимой 18-21-суточным мышам аутбредной популяции ICR, интраназально инокулированным по прошествии 4 недель после этого возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) дозой 3,7 lg БОЕ (8 ИД<sub>50</sub>)
- Таблица 3.15 Данные по протективной активности двух химически синтезированных соединений при пероральном введении 18-21-суточным мышам иммунодефицитной линии SCID, интраназально инокулированным возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) дозой 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>)
- Рисунок 3.1 Хвост 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR по прошествии 8 суток после внутрикожного инокулирования (в проксимальной части хвоста) возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 4,7 lg БОЕ
- Рисунок 3.2 Электронограмма макрофага из монослоя первичной культуры макрофагов селезенки 10-14-суточных мыши аутбредной популяции ICR по прошествии 144 часов после инокулирования возбудителем нату-



ральной оспы (штамм India-3a) в дозе 0,003 БОЕ/кл.

- Рисунок 3.3 Электронограмма слизистой носа 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR по прошествии 3 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>)
- Рисунок 3.4 Электронограмма слизистой носа 18-21-суточной мыши иммунодефицитной линии SCID по прошествии 5 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>)
- Рисунок 3.5 Гистологический препарат (покраска гематоксилином и эозином) трахеи 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR по прошествии 3 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>)
- Рисунок 3.6 Электронограмма трахеи 18-21-суточной мыши иммунодефицитной линии SCID по прошествии 3 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>)
- Рисунок 3.7 Гистологический препарат (покраска гематоксилином и эозином) легкого 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR по прошествии 5 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) оспы в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>)
- Рисунок 3.8 Гистологический препарат (покраска гематоксилином и эозином) легкого 18-21-суточной мыши иммунодефицитной линии SCID по прошествии 5 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>)
- Рисунок 3.9 Электронограмма легкого 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR по прошествии 5 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>)
- Рисунок 3.10 Электронограмма легкого 18-21-суточной мыши иммунодефицитной линии SCID по прошествии 5 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>)
- Рисунок 3.11 Гистологический препарат (покраска гематоксилином и эозином) головного мозга 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR по прошествии 5 суток после интраназальной инокуляции возбудителем

натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>)

- Рисунок 3.12 Электронограмма головного мозга 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR по прошествии 5 суток после интраназальной инокуляции возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>)
- Рисунок 3.13 Патогенетическая схема болезни у 10-14-суточных мышей аутбредных популяции ICR, интраназально инокулированных возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) дозой 4,2 lg БОЕ (30 ИД<sub>50</sub>)
- Рисунок 3.14 Патогенетическая схема болезни у 18-21-суточных мышей иммунодефицитной линии SCID, интраназально инокулированных возбудителем натуральной оспы (штамм India-3a) дозой 5,2 lg БОЕ (50 ИД<sub>50</sub>)

## ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное)

## Первые листы методических рекомендаций МР 4.2.005-16

УТВЕРЖДАЮ

И.о. генерального директора

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Роспотребнадзора

В.Н. Михеев

«04» / 07 2016 г.



### 3.1. Профилактика инфекционных болезней

## ОЦЕНКА ЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИМИОПРЕПАРАТОВ С ПОМОЩЬЮ БИОСИСТЕМЫ «МЫШЬ АУТБРЕДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ICR – ШТАММ IND-3А ВИРУСА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ»

(Методические рекомендации)

Рассмотрены и одобрены Ученым советом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора  
(протокол Ученого совета № 6 от «01» июля 2016 г.)

**МР «Оценка защитной эффективности химиопрепаратов с помощью биосистемы «мышь аутбредной популяции ICR – штамм Ind-3а вируса натуральной оспы»**

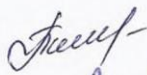
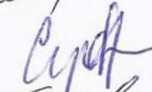
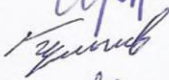

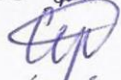


1 Разработаны: Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Титова Ксения Александровна, Сергеев Артемий Александрович, Булычев Леонид Егорович, Овчинникова Алена Сергеевна, Сергеев Александр Александрович, Кабанов Алексей Сергеевич, Шишкина Лариса Николаевна).

2 Рекомендованы Ученым советом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

3 Утверждены и введены в действие И. о. генерального директора ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» *«05» июля* 2016 г.

4 Введены впервые.

**Визы разработчиков МР**

- 1 Титова К.А. 
- 2 Сергеев Ар.А. 
- 3 Булычев Л.Е. 
- 4 Овчинникова А.С. 
- 5 Сергеев Ал.А. 
- 6 Кабанов А.С. 
- 7 Шишкина Л.Н. 

**ПРИЛОЖЕНИЕ Б (справочное)****Первые листы методических рекомендаций МР 4.2.003-16**

УТВЕРЖДАЮ

И.о. генерального директора

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Роспотребнадзора



В.Н. Михеев

« 04 » 07 2016 г.

**3.1. Профилактика инфекционных болезней****ОЦЕНКА ЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИМИОПРЕПАРАТОВ С  
ПОМОЩЬЮ БИОСИСТЕМЫ «МЫШЬ ИММУНОДЕФИЦИТНОЙ ЛИ-  
НИИ SCID – ШТАММ IND-3А ВИРУСА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ»**

(Методические рекомендации)

Рассмотрены и одобрены Ученым  
советом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
Роспотребнадзора  
(протокол Ученого совета № 6  
от «01» июля 2016 г.)

Кольцово 2016

**МР «Оценка защитной эффективности химиопрепаратов с помощью биосистемы «мышь иммунодефицитной линии SCID – штамм Ind-3a вируса натуральной оспы»**

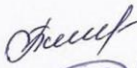
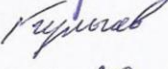

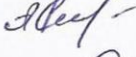
1 Разработаны: Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Титова Ксения Александровна, Сергеев Артемий Александрович, Булычев Леонид Егорович, Овчинникова Алена Сергеевна, Сергеев Александр Александрович, Кабанов Алексей Сергеевич, Шишкина Лариса Николаевна).

2 Рекомендованы Ученым советом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

3 Утверждены и введены в действие И. о. генерального директора ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» «5» июля 2016 г.

4 Введены впервые.

Визы разработчиков МР:

- 1 Титова К.А. 
- 2 Сергеев Ар.А. 
- 3 Булычев Л.Е. 
- 4 Овчинникова А.С. 
- 5 Сергеев Ал.А. 
- 6 Кабанов А.С. 
- 7 Шишкина Л.Н. 