

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК 615.281.8.03:578.821.5].076.9.036.8

Титова К.А.¹, Сергеев Ал.А.¹, Кабанов А.С.¹, Булычев Л.Е.¹, Сергеев Ар.А.¹, Галахова Д.О.¹, Шишкина Л.Н.¹, Замедянская А.С.¹, Нестеров А.Е.¹, Глотов А.Г.², Таранов О. С.¹, Омигов В.В.¹, Агафонов А.П.¹, Сергеев А.Н.¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДЕЛИ МЫШЬ ICR – ВИРУС НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"», 630559, пос. Кольцово, Новосибирская область; ²ГНУ «Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока» Российской академии сельскохозяйственных наук, 630501, пос. Краснообск, Новосибирская область

Мышей аутбредной популяции ICR интраназально (и/н) заражали вирусом натуральной оспы (ВНО, штамм Ind-3a). Клинические признаки заболевания не появлялись даже при использовании максимально возможной дозы вируса 5,2 lg бляшкообразующих единиц (БОЕ). При этом 50% инфицирующая доза (ИД₅₀) ВНО, оцениваемая по наличию или отсутствию вируса в легких через 3 сут после заражения (п. з.), была равна 2,7±0,4 lg БОЕ, что с учетом его 10% аппликации в легких при и/н введении соответствовало 1,7 lg БОЕ. Это свидетельствует о высокой инфекционности ВНО для мышей, сравнимой с его инфекционностью для человека. После и/н заражения мышей ВНО в дозе 30 ИД₅₀ наиболее высокие концентрации вируса обнаружены в легких (4,9 lg БОЕ/мл гомогената) и тканях носовой полости (4,8 lg БОЕ/мл). Патоморфологические изменения в респираторных органах инфицированных ВНО мышей появлялись через 3–5 сут п. з., а размножение ВНО отмечено в эпителиоцитах и макрофагах. При пероральном введении препаратов ST-246 и НИОХ-14 в дозе 60 мкг на 1 г массы мыши за 1 сут до заражения, через 2 ч, 1 и 2 сут п. з. продукция ВНО в легких через 3 сут п. з. снижалась в 10 раз. Таким образом, аутбредных мышей ICR, инфицированных ВНО, можно использовать в качестве лабораторной модели натуральной оспы при оценке лечебно-профилактической эффективности противооспенных препаратов.

Ключевые слова: вирус натуральной оспы; мышь; интраназальное заражение; размножение вируса; патоморфологические изменения; модельное животное.

Для цитирования: Титова К.А., Сергеев Ал.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев Ар.А., Галахова Д.О., Шишкина Л.Н., Замедянская А.С., Нестеров А.Е., Глотов А.Г., Таранов О. С., Омигов В.В., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Использование модели мышь ICR – вирус натуральной оспы для оценки эффективности противовирусных препаратов. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (2):79-84.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-79-84

Titova K.A.¹, Sergeev Al.A.¹, Kabanov A.S.¹, Bulychev L.E.¹, Sergeev Ar.A.¹, Galakhova D.O.¹, Shishkina L.N.¹, Zamedyanskaya A.S.¹, Nesterov A.E.¹, Glotov A.G.², Taranov O.S.¹, Omigov V.V.¹, Agafonov A.P.¹, Sergeev A.N.¹

THE USE OF THE MODEL MOUSE ICR – VARIOLA VIRUS FOR EVALUATION OF ANTIVIRAL DRUG EFFICACY

¹State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russian Federation; ²Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation

Mice of the ICR outbred population were infected intranasally (i/n) with the variola virus (VARV, strain Ind-3a). Clinical signs of the disease did not appear even at the maximum possible dose of the virus 5.2 lg PFU/head (plaque-forming units per head). In this case, 50% infective dose (ID₅₀) of VARV estimated by the presence or absence of the virus in the lungs three days after infection (p.i.) was equal to 2.7 ± 0.4 lg PFU/head. Taking into account the 10% application of the virus in the lungs during the intranasal infection of the mice, it was adequate to 1.7 lg PFU/lungs. This indicates a high infectivity of the VARV for mice comparable to its infectivity for humans. After the i/n infection of mice with the VARV at a dose 30 ID₅₀/head the highest concentration of the virus detected in the lungs (4.9 ± 0.0 lg PFU/ml of homogenate) and in nasal cavity tissues (4.8 ± 0.0 lg PFU/ml) were observed. The pathomorphological changes in the respiratory organs of the mice infected with the VARV appeared at 3-5 days p.i., and the VARV reproduction noted in the epithelial cells and macrophages were noticed. When the preparations ST-246 and NIOCH-14 were administered orally at a dose of 60 µg/g of mouse weight up to one day before infection, after 2 hours, 1 and 2 days p.i., the VARV reproduction in the lungs after 3 days p.i. decreased by an order of magnitude. Thus, outbred ICR mice infected with the VARV can be used as a laboratory model of the smallpox when evaluating the therapeutic and prophylactic efficacy of the antimallpox drugs.

Key words: variola virus; mouse; intranasal infection; virus reproduction; pathomorphological damages; model animal.

For citation: Titova K.A., Sergeev Al.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev Ar.A., Galakhova D.O., Shishkina L.N., Zamedyanskaya A.S., Nesterov A.E., Glotov A.G., Taranov O.S., Omigov V.V., Agafonov A.P., Sergeev A.N. The use of the model mouse ICR – variola virus for evaluation of antiviral drug efficacy. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(2): 79-84. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-79-84

For correspondence: Kseniya A. Titova, Junior research scientist, State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russian Federation, E-mail: titova_ka@vector.nsc.ru

Для корреспонденции: Титова Ксения Александровна, младший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»@», 630559, пос. Кольцово, Новосибирская область, E-mail: titova_ka@vector.nsc.ru

Information about authors:

Titova K.A., <http://orcid.org/0000-0001-8764-9408>
Sergeev A.I.A., <http://orcid.org/0000-0001-8355-5551>
Kabanov A.S., <http://orcid.org/0000-0002-6287-0912>
Bulychev L.Ye., <http://orcid.org/0000-0001-9598-7327>
Sergeev Ar.A., <http://orcid.org/0000-0002-3591-1571>
Galahova D.O., <http://orcid.org/0000-0002-7801-4141>
Shishkina L.N., <http://orcid.org/0000-0002-8264-0217>
Zamedyanskaya A.S., <http://orcid.org/0000-0002-1177-2693>
Nesterov A.E., <http://orcid.org/0000-0001-7943-3287>
Glotov A.G., <http://orcid.org/0000-0002-2006-0196>
Taranov O.S., <http://orcid.org/0000-0002-6746-8092>
Omigov V.V., <http://orcid.org/0000-0002-2028-6099>
Agafonov A.P., <http://orcid.org/0000-0003-2577-0434>
Sergeev A.N., <http://orcid.org/0000-0001-5984-8776>

Funding. This scientific work was carried out with the financial support of the State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector" and the Ministry of Education and Science (State contract № 14.518.11.7035).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 17 February 2015

Accepted 19 March 2015

Для оценки эффективности действия разрабатываемых противовирусных препаратов на этапах научно-исследовательской работы и доклинических исследований по требованиям национальных органов контроля крайне важно иметь не менее двух видов животных, моделирующих соответствующее инфекционное заболевание у человека. Что касается вируса натуральной оспы (ВНО), до настоящего времени подобран лишь 1 вид такого животного – макака циномогус (*Macaca fascicularis*, синоним – *M. irus*) [1–3]. Однако использование данного модельного животного в вирусологических экспериментах является крайне дорогостоящим и трудоемким.

Ранее нами было обнаружено, что первичные суспензионные культуры клеток легких, полученные от аутбредных мышей ICR, чувствительны к ВНО и способны продуцировать его *in vitro* [4]. Кроме того, уже установлено, что 10–14-суточных аутбредных мышей ICR, инфицированных вирусом оспы обезьян (ВОО), по своей структуре и свойствам наиболее близким к ВНО, можно использовать в качестве лабораторной модели при оценке лечебно-профилактической эффективности препаратов против оспы обезьян [5, 6]. Однако в отношении мышей, инфицированных ВНО, подобные исследования не проводились.

В связи с этим целью настоящих исследований явилось изучение возможности использования мышей аутбредной популяции ICR в качестве животных – моделей натуральной оспы для оценки эффективности противовирусных препаратов.

Материал и методы

Все эксперименты были проведены в лаборатории с максимальным уровнем биологической защиты (BSL-4) с использованием изолирующих пневмокостюмов на базе ГНЦ ВБ «Вектор» (Россия).

Животные. В экспериментах использовали мышей аутбредной популяции ICR: 10–14-суточных (массой 8–10 г) и 30–35-суточных (массой 18–20 г), полученных из питомника ГНЦ ВБ «Вектор». При выполнении исследований соблюдали «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» и требования по гуманному содержанию и использованию лабораторных животных [7]. Эвтаназию мышей осуществляли методом цервикальной дислокации и после этого извлекали органы и ткани (носовая перегородка,

головной мозг, трахея, лимфоузлы, легкие, пищевод, печень, селезенка, поджелудочная железа, двенадцатиперстная кишка, почки, надпочечники, кожа) для вирусологических и микроскопических исследований.

Вирус. В работе использовали штамм Ind-3a ВНО, полученный из Государственной коллекции вирусов и риккетсий ГНЦ ВБ «Вектор» (пос. Кольцово, Новосибирская область), наработанный в культуре клеток Vero. Концентрацию вируса в культуральной жидкости определяли методом подсчета количества бляшек при титровании в клетках Vero, рассчитывали и выражали в десятичных логарифмах бляшкообразующих единиц в 1 мл (lg БОЕ/мл) [8]. Концентрация вируса в использованных для работы образцах составляла $6,7 \pm 0,1$ lg БОЕ/мл.

Инфицирование мышей ВНО. После ингаляционного наркоза диэтиловым эфиром аутбредным мышам ICR (массой 8–10 г) интраназально (и/н) вводили вирусосодержащую жидкость в объеме 0,03 мл суммарно в обе ноздри, используя для заражения различные дозы ВНО (1,2, 2,2, 3,2, 4,2 и 5,2 lg БОЕ, по 6 животных на дозу). Используя данные о наличии и отсутствии ВНО в легких через 3 сут после заражения (п. з.), рассчитывали 50% инфицирующую дозу (ID_{50}) ВНО для мышей.

Введение химических соединений при инфицировании мышей ВНО. В работе использовали химические соединения с установленной антиортопоксвирусной активностью [9, 10]: НИОХ-14 (7-[N'-(4-трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновая кислота) и ST-246 (4-трифторметил-N-(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-октагидро-1,3-диоксо-4,6-этенциклопроп[*f*]изоиндол-2 (1H)-ил)-бензамид), синтезированные для исследования [9] по описанной методике [10]. Мышам перорально вводили по 0,2 мл суспензии этих соединений в дозе 60 мкг на 1 г массы мыши ежедневно однократно за 1 сут до заражения, через 2 ч, 1 и 2 сут п. з. ВНО. В качестве плацебо вводили 0,2 мл раствора, содержащего 0,75% метилцеллюлозы и 1% твина-80, использованного для приготовления суспензии препаратов НИОХ и ST-246.

Определение титров ВНО в органах и тканях инфицированных мышей. При исследовании диссеминации ВНО в организме мышей определяли его концентрацию (в lg БОЕ/мл) в сыворотке и клетках крови, а также в 10% гомогенатах органов через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 10 сут п. з. В экспериментах по оценке противовирусной эффективности препаратов определяли количество ВНО в

легких (в lg БОЕ/легкие) через 3 сут п. з. в контрольной группе мышей и при введении препаратов. Во всех случаях использовали метод подсчета количества блюшек при внесении последовательных разведений образцов на монослой культуры клеток Vero [8]. Минимальное количество вируса, которое могло быть выявлено при использованном методе титрования, составляло 0,4 lg БОЕ/мл и 1,1 lg БОЕ/легкие.

Получение и инфицирование ВНО первичных монослойных культур моноцитов-макрофагов (Мц-Мф) селезенки мышей. Для получения монослоя Мц-Мф использовали гомогенаты селезенки интактных мышей аутбредной популяции ICR массой 18–20 г. Суспензию спленоцитов инкубировали в течение 24 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 80 мкг/мл гентамицина, в 24-луночных плоскодонных планшетах. Затем после двукратного отмывания средой RPMI-1640 оставшиеся адгезированные Мц-Мф инфицировали ВНО при множественности заражения 0,017 БОЕ/кл. и культивировали в течение 3 сут в среде RPMI-1640 с 2% сыворотки при прочих описанных выше условиях. После этого монослой клеток отмывали, снимали резиновым полисменом и готовили образцы для электронно-микроскопического исследования.

Микроскопические исследования. Для световой микроскопии образцы органов и тканей мышей фиксировали в 4% растворе параформальдегида, готовили парафиновые срезы и окрашивали гематоксилином и эозином. Для электронно-микроскопического исследования образцов прибегали к дополнительной фиксации 1% раствором осмиевой кислоты, ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Микроскопические исследования и микрофото съемку проводили с использованием светооптического микроскопа Imager Z1 («Zeiss», Германия) и электронного микроскопа JEM 1400 («Jeol», Япония).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [11] с помощью пакета компьютерных программ Statistica 6.0 («StatSoft Inc.». 1984–2001) с оценкой достоверности различий ($p \leq 0,05$) для 95% доверительного уровня (I_{95}). ИД₅₀ рассчитывали по формуле Спирмена–Кербера. Сравнение доли инфицированных животных в группах проводили по критерию χ^2 , для сравнения титров ВНО в легких использовали U -критерий Манна–Уитни и t -критерий Стьюдента [11].

Результаты и обсуждение

Было установлено, что и/н введение ВНО даже в максимально возможной дозе, равной 5,2 lg БОЕ, 10–14-суточным аутбредным мышам ICR (массой 8–10 г) не вызвало у них появления каких-либо внешних клинических признаков заболевания.

В экспериментах, касающихся определения чувствительности мы-

шей к ВНО, сначала провели изучение динамики накопления вируса в легких при и/н заражении ВНО в дозе 4,2 lg БОЕ, используя по 3 животных на каждую временную точку. При этом через 5–10 мин п. з. в легких находилось 3,2±0,3 lg БОЕ/легкие, через 1 сут п.з. – 3,2±0,3 lg БОЕ/легкие, через 2 сут – 4,8±0,3 lg БОЕ/легкие, через 3 сут – 4,4±0,4 lg БОЕ/легкие, через 4 сут – 4,5±0,4 lg БОЕ/легкие, через 5 сут – 3,5±0,3 lg БОЕ/легкие и через 7 сут – 2,3±0,4 lg БОЕ/легкие. Из полученных данных видно, что наиболее высокие уровни накопления ВНО в легких мышей наблюдались через 2 и 3 сут п. з.

Следует особо отметить, что при использованном нами и/н способе заражения мышей только 10% вводимого вирусного материала попадало в легкие, поскольку и/н инфицирующая доза вируса была равна 4,2 lg БОЕ, а его количество в легких через 5–10 мин п. з. составило всего 3,2 lg БОЕ.

Учитывая предыдущие результаты, на следующем этапе работы оценивали ИД₅₀ ВНО по его наличию или отсутствию в легких мышей через 3 сут п. з. При этом определено, что значение этого показателя равно 2,7±0,4 lg БОЕ. Однако с учетом 10% аппликации вируса в легких при и/н заражении ИД₅₀ ВНО для мышей может быть на 1,0 lg ниже и составлять 1,7±0,4 lg БОЕ. Это свидетельствует о достаточно высокой чувствительности данного вида животных к ВНО только с учетом развития инфекционного процесса в организме без появления клинических признаков заболевания, приближающейся к таковой у человека, а именно до 1,0 lg жизнеспособных вирусных частиц, вызывающих развитие и инфекционного процесса, и клинических признаков заболевания [12].

В дальнейшем изучали динамику диссеминации ВНО в органах и тканях мышей через 1, 2, 3, 4, 5, 7 и 10 сут после и/н инфицирования в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД₅₀). Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Динамика накопления штамма Ind-3a ВНО в органах, тканях и сыворотке крови мышей, интраназально инфицированных дозой 4,2 lg БОЕ (30 ИД₅₀)

Органы и ткани* мышей (n = 4)	Концентрация ВНО, lg БОЕ/мл, M±I ₉₅ , в органах и тканях мышей в разные сроки после заражения, сут							
	1	2	3	4	5	6	7	10
Клетки крови	< 0,4	< 0,4	< 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	< 0,4	< 0,4
Головной мозг	< 0,4	< 0,4	1,3±0,6	< 0,4	2,2±0,3	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Носовая перегородка со слизистой оболочкой	< 0,4	4,8±0,3	3,9±0,3	3,9±0,2	3,0±0,4	2,9±0,2	4,2±0,3	< 0,4
Трахея	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Легкие	2,7±0,3	4,6±0,4	4,1±0,4	3,7±0,3	3,1±0,3	3,2±0,4	2,0±0,3	< 0,4
Пищевод	< 0,4	< 0,4	< 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	< 0,4	< 0,4
Селезенка	< 0,4	< 0,4	< 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	< 0,4	< 0,4
Двенадцатиперстная кишка	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4

Примечание. * – 4% гомогенаты органов, клетки и сыворотка крови; < 0,4 – величина ниже порога чувствительности (0,4 lg БОЕ/мл) использованного метода титрования ВНО. Здесь и в табл. 2: n – число мышей, взятых на временную точку; M – среднее.

Противовирусная активность препаратов в отношении штамма Ind-3a ВНО через 3 сут после и/н заражения аутбредных мышей ICR дозой 4,2 Ig БОЕ (30 ИД₅₀)

Показатель	Показатели инфекционности ВНО у мышей при введении препаратов в суточной дозе 60 мкг/г и в контроле		
	НИОХ-14	ST-246	контроль*
Количество вируса в легких у каждой мыши через 3 сут после и/н заражения, Ig БОЕ/легкие	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
Среднее количество вируса в легких мышей через 3 сут п. з., Ig БОЕ/легкие, $M \pm I_{95}$	2,3±0,5** (n = 3)	2,4±0,3** (n = 3)	3,6±0,8 (n = 7)
ИПП вируса в легких инфицированных мышей, Ig	1,3	1,2	–
Количество и доля (в %) инфицированных мышей через 3 сут п. з.	3 (43)#	3 (43)#	7 (100)
КЗ от инфицирования, %	57	57	–

Примечание. * – в контроле вводили раствор метилцеллюлозы с твином-80; < 1,1 – величина ниже порога чувствительности (1,1 Ig БОЕ/легкие) использованного метода титрования ВНО; ** – достоверное отличие от контроля по *t*-критерию Стьюдента и *U*-критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$); # – достоверное отличие от контроля по критерию χ^2 ($p = 0,018$ с поправкой Йетса $p = 0,076$); ИПП – индекс подавления продукции = среднее количество вируса в легких контрольной группы – среднее количество вируса в легких опытной группы; КЗ – коэффициент защиты = % инфицированных животных в контроле – % инфицированных животных в опыте.

Из табл. 1 видно, что в легких ВНО зарегистрирован через 1 сут п. з. Затем через 2 сут п. з. он был обнаружен в высоких концентрациях в легких и носовой перегородке со слизистой оболочкой, но к 10-м суткам п. з. вирус не удалось выявить в этих биоматериалах с помощью использованного метода титрования. Через 3 и 5 сут п. з. ВНО присутствовал в относительно низких концентрациях в головном мозге мышей. При этом во все сроки исследования от 1 до 10 сут п. з. вирус вообще не выявлялся в клетках и сыворотке крови, трахее, пищеводе, печени, селезенке, почках и двенадцатиперстной кишке (см. табл. 1). Самая высокая концентрация ВНО зарегистрирована в легких и носовой перегородке со слизистой оболочкой через 2 сут п. з. (см. табл. 1). Несмотря на то что концентрация ВНО в крови мышей на протяжении всего исследования была ниже предела обнаружения вируса при использованном нами методе титрования, его присутствие в системе кровообращения в низких концентрациях вполне возможно. Поэтому спорадическое появление ВНО в головном мозге (см. табл. 1) может быть вызвано его проникновением через гематоэнцефалический барьер. Также не исключена возможность его поступления в этот орган через обонятельный тракт. Снижение концентрации ВНО до неопределяемых величин в легких и носовой перегородке через 10 сут п. з., вероятно, обусловлено действием факторов иммунного ответа мышей.

Далее было обнаружено, что через 3–5 сут п. з. появлялись патоморфологические изменения в тканях и клетках легких, носовой полости и головного мозга мышей, инфицированных ВНО в дозе 30 ИД₅₀ (см. рисунок, а–г). При этом у мышей, как и у некоторых других животных, моделирующих ортопоксвирусные инфекции у человека, наблюдались в общем виде сходные патоморфологические изменения в органах [13–15]. Более того, размножение вируса отмечено не только в эпителиоцитах и макрофагах органов респираторного тракта мышей, инфицированных ВНО *in vivo*, но и в первичной культуре селезеночных мышечных Мц-Мф при их непосредственном заражении ВНО *in vitro* (см. рисунок, д, е). При этом морфологические характеристики репродукции ВНО в чувствительных клетках

аутбредных мышей ICR соответствовали таковым ортопоксвирусов, описанным в научной литературе [13–15].

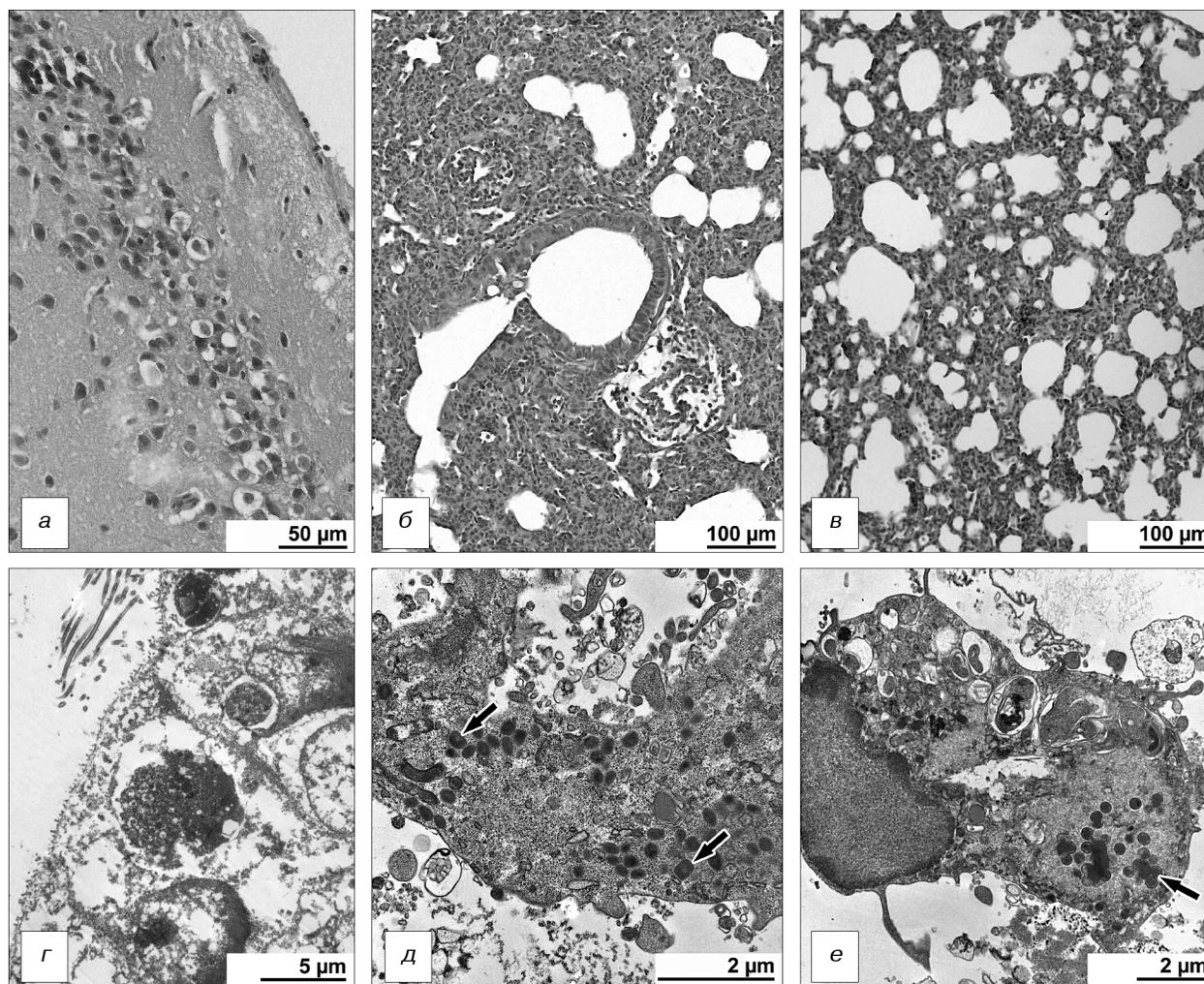
В следующей серии экспериментов оценивали лечебно-профилактическую эффективность препаратов ST-246 и НИОХ-14 у мышей, и/н инфицированных ВНО в дозе 30 ИД₅₀. Результаты этих исследований представлены в табл. 2. Отмечено, что количество инфицированных мышей, обработанных препаратами ST-246 и НИОХ-14 и зараженных ВНО, через 3 сут п. з. достоверно ($p \leq 0,05$) меньше, чем в контроле. Кроме того, используемые препараты уменьшали продукцию ВНО в легких мышей через 3 сут п. з. по сравнению с контролем.

Эксперименты по оценке эффективности противооспенного действия ST-246 и НИОХ-14 ранее проводились и другими исследователями с использованием культур клеток и разных видов животных [16–18]. Результаты данных исследований совпадают с нашими данными об эффективности этих препаратов в отношении ортопоксвирусов, в том числе ВНО.

Анализ полученных нами и описанных в научной литературе показателей активности противовирусных средств, действие которых, как правило, направлено на уменьшение взаимодействия вируса с клетками органов-мишеней и/или развития инфекционного процесса, позволяет рекомендовать использование мышей аутбредной популяции ICR в качестве животных – моделей натуральной оспы с целью оценки эффективности противооспенных препаратов.

Заключение

При и/н заражении ВНО аутбредных мышей ICR даже в максимально возможной дозе, равной 5,2 Ig БОЕ, не было обнаружено клинических признаков заболевания. ИД₅₀ ВНО для мышей, оцениваемая по наличию или отсутствию вируса в легких через 3 сут п. з., с учетом 10% аппликации в легких вводимого и/н вируса равна 1,7 Ig БОЕ/легкие и сравнима с таковой у человека, полученной теоретическим путем по данным регистрации клинической картины заболевания. У мышей, и/н зараженных ВНО в дозе 30 ИД₅₀, обнаружено размножение вируса в легких и носовой полости с максимальными значениями



Внутренние органы мышей аутбредной популяции ICR с патологическими изменениями через 3 и 5 сут после и/н заражения штаммом Ind-3a ВНО в дозе 30 ИД₅₀, а также первичная культура моноцитов-макрофагов селезенки мышей этой же популяции с репликацией ВНО через 3 сут п. з. в дозе 0,017 БОЕ/кл.

a–в – гистологические препараты головного мозга и легких (окраска гематоксилином и эозином): *a* – нейроны пирамидного слоя головного мозга с локальными дистрофическими изменениями: клетки в состоянии баллонной дистрофии, межклеточные промежутки в разной степени расширены (5 сут п. з.); *б* – паренхима легких с резко выраженной воспалительной инфильтрацией, преобладанием ателектазов и интенсивным периваскулярным отеком (3 сут п. з.); *в* – в легких интенсивный диффузный отек, ателектазы и дистелектазы, формирующие картину неравномерного воздухонаполнения альвеол, большая часть легких в спавшемся состоянии (5 сут п. з.); *г–е* – электронограммы слизистой оболочки носа и селезеночных моноцитов-макрофагов (контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца): *г* – эпителий слизистой оболочки носовой полости с дистрофическими изменениями (5 сут п. з.): утрата ресничек и вакуолизация цитоплазмы эпителиоцитов; *д* – клетки первичной культуры моноцитов-макрофагов селезенки с признаками репродукции вируса: зрелые внутриклеточные оболочечные вирионы (стрелки) в цитоплазме макрофага; *е* – макрофаг, в цитоплазме которого присутствует крупная вирусная фабрика (стрелка), содержащая незрелые вирусные частицы.

его концентрации 4,8–4,9 Ig БОЕ/мл. При этом у мышей, как и у человека, выявлены сходные патоморфологические изменения в легких и первичные клетки-мишени для ВНО (макрофаги и эпителиоциты). Показано, что аутбредных мышей ICR, инфицированных ВНО, можно использовать в качестве лабораторной модели натуральной оспы при оценке лечебно-профилактической эффективности противооспепных препаратов.

Финансовая поддержка. Данная научная работа проведена при финансовой поддержке ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и Министерства образования и науки РФ (Государственный контракт №14.518.11.7035).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–3, 8, 10, 13–15, 17–18 см. REFERENCES)

- Сергеев А.А., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Боднев С.А. и др. Поиск модельного животного для изучения эффективности противооспепных препаратов. В кн.: *Гигиенические аспекты в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия человека*. Новосибирск; 2012: 356–64.
- Сергеев А.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев Ар.А., Таранов О.С. и др. Использование мыши в качестве модельного животного для оценки эффективности лечебно-профилактического действия препаратов против оспы обезьян. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 2: 60–5.
- Сергеев А.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев А.А., Таранов О.С., Боднев С.А. и др. Способ оценки противооспепной активности лечебно-профилактических препаратов. Патент РФ № 2496149; 2013.

7. *Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных*. Перевод с английского. Washington, D.C.: National Academy Press; 1996.
 9. Кабанов А.С., Сергеев А.А., Шишкина Л.Н., Булычев Л.Е., Скарнович М.О., Сергеев А.А. и др. Сравнительное изучение противовирусной активности химических соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах in vivo. *Вопросы вирусологии*. 2013, 4: 39–43.
 11. Закс Л. *Статистическое оценивание*. Перевод с немецкого. М.: Статистика; 1976.
 12. Дроздов С.Г., Гарин Н.С., Джиндоян Л.С., Тарасенко В.М. *Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях*. М.: Медицина; 1987.
 16. Булычев Л.Е., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Пьянков О.В., Сергеев А.А., Таранов О.С. и др. Изучение эффективности химических синтезированных соединений против ортопоксвирусов. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2012; 20: 102–5.
- REFERENCES**
1. Jahrling P.B., Hensley L.E., Martinez M.J., LeDuc J.W., Rubins K.H., Relman D.A. et al. Exploring the potential of variola virus infection of cynomolgus macaques as a model for human smallpox. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101 (42): 15 197–200.
 2. Huggins J., Goff A., Hensley L., Mucker E., Shamblin J., Wlazlowski C. et al. Nonhuman primates are protected from smallpox virus or monkeypox virus challenges by the antiviral drug ST-246. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53 (6): 2620–5.
 3. Chapman J.L., Nichols D.K., Martinez M.J., Raymond J.W. Animal models of Orthopoxvirus infection. *Vet. Pathol.* 2010; 47 (5): 852–70.
 4. Sergeev A.A., Bulychev L.E., P'yankov O.V., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bodnev S.A. et al. Search for an animal model to study the effectiveness of antismallpox drugs. In: *Hygienic Aspects in the Field of Sanitary and Epidemiological Welfare of Human [Gigienicheskie aspekty v oblasti obespecheniya sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya cheloveka]*. Novosibirsk; 2012: 356–64. (in Russian)
 5. Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., P'yankov O.V., Sergeev Ar.A., Taranov O.S. et al. Exploitation of mouse model for assessment of therapeutic and prophylactic efficacy of drugs against monkeypox. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2013; 2: 60–5. (in Russian)
 6. Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev A.A., Taranov O.S., Bodnev S.A. et al. Method for Evaluating the Antipox Activity of Therapeutic and Prophylactic Preparations. Patent RF № 2496149; 2013. (in Russian)
 7. *The Guide to the Care and Use of Laboratory Animals [Rukovodstvo po sodержaniyu i ispol'zovaniyu laboratornykh zhivotnykh]*. Transl. from Engl. Washington, D.C.: National Academy Press; 1996. (in Russian)
 8. Leparc-Goffart I., Poirier B., Garin D., Tissier M.H., Fuchs F., Crance J.M. Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation. *J. Clin. Virol.* 2005; 32 (1): 47–52.
 9. Kabanov A.S., Sergeev A.A., Shishkina L.N., Bulychev L.E., Skarnovich M.O., Sergeev A.A. et al. Comparative studying antiviral activity of chemical compounds concerning of orthopoxviruses in vivo experiments. *Voprosy virusologii*. 2013; 4: 39–43. (in Russian)
 10. Jordan R., Bailey T.R., Rippin S.R. Compounds, compositions and methods for treatment and prevention of orthopoxvirus infections and associated diseases. Patent WO 2004/112718 A3. International Patent Classification C07D 209/56; 2005.
 11. Zaks L. *Statistical Estimation [Statisticheskoe otsenivanie]*. Transl. from German. Moscow: Statistika; 1976. (in Russian)
 12. Drozdov S.G., Garin N.S., Dzhindoyan L.S., Tarasenko V.M. *Fundamentals of Safety in Microbiological and Virological Laboratories [Osnovy tekhniki bezopasnosti v mikrobiologicheskikh i virusologicheskikh laboratoriyakh]*. Moscow: Meditsina; 1987. (in Russian)
 13. Martinez M.J., Bray M.P., Huggins J.W. A mouse model of aerosol-transmitted orthopoxviral disease: morphology of experimental aerosol-transmitted orthopoxviral disease in a cowpox virus-BALB/c mouse system. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000; 124 (3): 362–77.
 14. Sbrana E., Xiao S.Y., Newman P.C., Tesh R.B. Comparative pathology of North American and central African strains of monkeypox virus in a ground squirrel model of the disease. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 76 (1): 155–64.
 15. Goff A.J., Chapman J., Foster C., Wlazlowski C., Shamblin J., Lin K. et al. A novel respiratory model of infection with monkeypox virus in cynomolgus macaques. *J. Virol.* 2011; 85 (10): 4898–909.
 16. Bulychev L.E., Sergeev A.A., Kabanov A.S., P'yankov O.V., Sergeev A.A., Taranov O.S. et al. Study of the efficacy of the chemical synthesized compounds against orthopoxviruses. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii*. 2012; 20: 102–5. (in Russian)
 17. Jordan R., Goff A., Frimm A., Corrado M.L., Hensley L.E., Byrd C.M. et al. ST-246 antiviral efficacy in a nonhuman primate monkeypox model: determination of the minimal effective dose and human dose justification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53 (5): 1817–22.
 18. Stabenow J., Buller R.M., Schriewer J., West C., Sagartz J.E., Parker S.A. A mouse model of lethal infection for evaluating prophylactics and therapeutics against monkeypox virus. *J. Virol.* 2010; 84 (8): 3909–20.

Поступила 17.02.15

Принята в печать 19.03.15