

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016  
УДК 578.828:578.3].083.2

Савченкова И.П., Алексеенкова С.В., Юров К.П.

## ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МЫШИ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЛОШАДЕЙ *IN VITRO* И *IN VIVO*

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», 109428, г. Москва

Сложность патогенеза и недостаточная изученность медленных ретровирусных инфекций, к которым относится инфекционная анемия лошадей (ИНАН), обуславливает необходимость поиска адекватной лабораторной модели для изучения инфекционного процесса, иммуногенеза с целью создания средств профилактики и терапии заболеваний. Приводятся данные о штаммах и клеточном тропизме вируса ИНАН. Показано, что эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мыши обладают уникальными свойствами и признаками. В отличие от фибробластов и других клеточных типов они могут являться новой клеточной системой для изучения вируса ИНАН как *in vitro*, так и *in vivo*. При условиях, которые индуцируют дифференцировку, они способны *in vitro* воспроизвести эмбриогенез с образованием клеток трех зародышевых листков. Дифференцировка ЭСК мыши в направлении гематопоэза могла бы способствовать более глубокому изучению и пониманию тропизма вируса ИНАН *in vitro*. ЭСК можно вернуть обратно в ранний предимплантационный эмбрион. Попав в окружение клеток зародыша, они участвуют в формировании всех тканей и органов развивающегося плода. Таким образом, адаптация мышинных ЭСК к вирусу ИНАН лошадей посредством генетической трансформации позволит приблизиться к созданию лабораторной модели *in vivo* для изучения иммунного ответа при лентивирусной инфекции.

**Ключевые слова:** инфекционная анемия лошадей; лентивирус; штаммы; тропизм; рецептор; эмбриональные стволовые клетки; цитодифференцировка *in vitro*; мышинная модель *in vivo*.

**Для цитирования:** Савченкова И.П., Алексеенкова С.В., Юров К.П. Эмбриональные стволовые клетки мыши – перспективный материал для изучения вируса инфекционной анемии лошадей *in vitro* и *in vivo*. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(3): 107-111.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-107-111

*Savchenkova I.P., Alekseyenkova S.V., Yurov K.P.*

### MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS – A NEW CELLULAR SYSTEM FOR STUDYING THE EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS IN VITRO AND IN VIVO

Ya.R. Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary, Moscow, 109428, Russian Federation

The complexity of the pathogenesis and insufficient knowledge about the slow retroviral infections, which include equine infectious anemia, necessitates finding an adequate laboratory model for the study of the infection process and immunogenesis to create means of prevention and treatment of diseases. Data about strains and cellular tropism of the virus are discussed. It was shown that mouse embryonic stem cells (ESCs) exhibited unique properties and characteristics. In contrast to fibroblasts and other cell types, these cells can be considered as a new cell system for studying EIAV *in vitro* and *in vivo*. Under differentiation-inducing conditions they are able to reproduce *in vitro* embryogenesis cells and form cells of three germ layers. Differentiation of mouse ESCs in the direction of hematopoiesis could contribute new knowledge and understanding of viral tropism EIAV *in vitro*. ESC can be returned back to the early pre-implantation embryo. Once in the germ cell environment, they participate in the formation of tissues and organs of the developing fetus. Thus, the adaptation of the mouse ESC to the equine EIAV through genetic transformation makes it possible to get closer to the creation of a laboratory model for the study of the *in vivo* immune response in the lentiviral infection.

**Keywords:** equine infectious anemia; lentivirus; strains; tropism; receptor; mouse embryonic stem cells; differentiation *in vitro*; mouse model *in vivo*.

**For citation:** Savchenkova I.P., Alekseyenkova S.V., Yurov K.P. Mouse embryonic stem cells – a new cellular system for studying the equine infectious anemia virus *in vitro* and *in vivo*. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(3): 107-111. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-107-111

**For correspondence:** Irina P. Savchenkova, Doctor of Biology, Professor, Chief of the Laboratory of stem cells, Ya.R. Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary, Moscow, 109428, Russian Federation, E-mail: s-ip@mail.ru

#### **Information about authors:**

Savchenkova I.P., <http://orcid.org/0000-0003-3560-5045>  
Alexeyenkova S.V., <http://orcid.org/0000-0001-9580-6047>

Yurov K.P., <http://orcid.org/0000-0002-2933-8801>

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

Received 08 April 2015  
Accepted 28 May 2015

**Для корреспонденции:** Савченкова Ирина Петровна, д-р биол. наук, профессор, зав. лаб. стволовой клетки ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», 109428, г. Москва, E-mail: s-ip@mail.ru

Инфекционная анемия лошадей (ИНАН) – вирусная болезнь непарнокопытных (лошади, мулы, ослы), которая характеризуется рецидивирующей лихорадкой, анемией, тромбоцитопенией и разнообразным течением: от остро до бессимптомного латентного [1, 2]. Возбудителем ИНАН лошадей является РНК-содержащий вирус (в англоязычной литературе – EIAV), который принадлежит к семейству ретровирусов (Retroviridae), подсемейству лентивирусов (Lentiviridae) с длинным инкубационным периодом [3]. Он тесно связан с другими лентивирусами, опасными как для животных, так и для человека. К ним относятся 2 близкородственных вируса овец висна/мэди; вирусы иммунодефицита кошек, крупного рогатого скота, обезьян, человека; лентивирус пум, вирус артрита и энцефалита коз [4, 5].

Геном лентивирусов хорошо изучен и клонирован. Структура вириона ИНАН и провирусный геном описаны подробно в работе [6]. Характерной особенностью лентивирусов является появление большого числа мутаций вируса в процессе репликации, которые вызваны ошибками лентивирусной обратной транскриптазы. Такие мутации, не оказывающие отрицательного воздействия на вирус, сохраняются, и лентивирусная инфекция представляет собой гетерогенную популяцию родственных вариантов вируса. В связи с этим при ИНАН лошадей образуется нестерильный иммунитет. Иммуноная реакция организма возникает в ответ на иммунодоминантные белки вируса, ответственные за продукцию антител (АТ). При этом в крови появляются АТ к различным антигенам детерминантам возбудителя инфекции. Несмотря на выраженную иммунную реакцию, инфекционный вирус сохраняется в организме лошади пожизненно. Степень репликации вируса при скрытом носительстве достаточна для его передачи и может быть смертельной для вновь зараженных лошадей [7]. Вирус ИНАН является широко распространенным и опасным патогеном (регистрируется в 28 странах мира), который передается насекомыми-гематофагами.

Лентивирусы способны доставлять значительное количество генетического материала в клетку хозяина и обладают уникальной среди ретровирусов способностью реплицироваться в неделящихся клетках, что делает их удобным вектором для доставки генетического материала в молекулярной биологии [8]. Вирус ИНАН является перспективной моделью для изучения антигенного дрейфа лентивирусов, так как различные антигенные штаммы этого вируса преобладают во время каждого нового приступа болезни. К преимуществам использования его для этих целей можно отнести следующие хорошо документированные факты: вирус ИНАН не реплицируется в клетках человека, инфицирует моноциты и макрофаги лошади, но не заражает лимфоциты *in vivo*; у инфицированных животных не вызывает иммунодефицит [6, 9]. В связи с этим создание лабораторной (мышинной) модели для изучения патогенеза вируса ИНАН и иммунного ответа организма на инфекцию является актуальным.

Цель нашей статьи – показать преимущества эмбриональных стволовых клеток мышцы (ЭСК) перед существующими культурами клеток для разработки новых подходов в изучении вируса ИНАН *in vitro* и *in vivo*.

**Штаммы вируса ИНАН.** В настоящее время существует несколько штаммов вируса ИНАН, которые хорошо изучены. Они различаются по вирулентности и способности размножения в культуре клеток. Большинство штаммов вируса ИНАН, которые используются в лабораториях,

получены от вирулентных штаммов V26 [10] и Wyoming [11]. Эти два штамма реплицируются только в культурах первичных макрофагов лошади и не могут реплицироваться в других тканевых культурах клеток без предварительной обширной адаптации, которая, как правило, приводит к снижению их вирулентности [11, 12]. В результате адаптации штамма Wyoming посредством культивирования в культуре клеток, представленной дермальными фибробластами лошади, был получен и охарактеризован новый штамм, получивший название Malmquist или WSU5 вируса ИНАН [13]. Он оказался способным инфицировать клетки, выделенные из тимуса плодов собаки, линия Cf2Th [14]. В России для изготовления антигена используют новый штамм вируса ИНАН 3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ. Штамм выращивают в культуре клеток кожи и/или мышц, и/или почек эмбриона лошади до накопления вируса в титре  $10^5$  ИД<sub>50</sub>/мл [15].

Исследования, посвященные генетическому картированию с использованием химерных провирусов, у которых родительские вирусы характеризовались высокой вирулентностью или были невирулентными, позволили определить важные области, которые влияют на острую вирулентность вируса. Химерные провирусы обеспечивают понимание генов или областей генома, которые определяют патогенез вирусных инфекций. С помощью этого подхода были установлены области U3 в вирусном длинном концевом повторе (LTR), поверхностный белок оболочки (SU) и дополнительный ген S2, которые в значительной мере определяют острое течение этой болезни. Новый штамм vMA-1c, быстро и специфично убивающий клетки, выделенные из дермы кожи лошади, был создан посредством внесения изменений в нуклеотидные последовательности 3'-области вируса ИНАН [16]. Недавно была определена область V6 вирусного белка оболочки (env), которая может взаимодействовать с рецептором ELR-1 вируса ИНАН [17]. Дальнейший анализ этих областей позволит сосредоточиться на определенных механизмах взаимоотношения вирус – клетка, вирус – животное, которые обуславливают особенности течения болезни.

**Клеточный тропизм вируса ИНАН.** При экспериментальном инфицировании лошадей вирусом ИНАН была обнаружена его активная репликация и вирусная антигенная продукция во многих тканях, обогащенных макрофагами: печени, легких, селезенки, почек, надпочечников, костного мозга [18, 19]. D. Sellon и соавт. [20] продемонстрировали локализацию вируса в мононуклеарных фагоцитах. Поэтому долгое время считалось, что тканевые макрофаги могут быть единственным клеточным типом у лошади, который поддерживает активную репликацию данного вируса [12, 19, 20]. Действительно, большинство вирулентных штаммов вируса ИНАН лошади реплицируются только в культурах первичных макрофагов лошади и не могут размножаться в других тканевых культурах клеток без предварительной адаптации [10, 12]. В культуре первичных макрофагов вирус сохраняет инфекционность, сопоставимую с его вирулентностью в естественных условиях *in vivo*. Однако в дальнейшем оказалось, что в мононуклеарных клетках периферической крови обнаруживалась только его провирусная ДНК. Транскрипция вирусной мРНК или белкового синтеза в течение острой инфекции ИНАН не было выявлено. Эти исследования показали, что моноциты периферической крови компетентны к вхождению вируса в клетку, где происходит обратная транскрипция вирусной РНК, но не

способны поддерживать его активную репликацию. Чтобы понять патогенез вируса ИНАН, необходимы более детальные экспериментальные данные о регуляции вируса в клетке-хозяине. В работе W. Maugy [21] была предпринята попытка изучить влияние степени клеточной дифференцировки моноцита/макрофаги на репликацию вируса ИНАН в культуре. Результаты экспериментов показали, что ограничение экспрессии вирусных генов наблюдалось в моноцитах, но не в макрофагах лошади. Эта рестрикция происходила на уровне транскрипции генов. В результате были охарактеризованы ДНК-мотивы в пределах LTR, которые контролировали экспрессию вирусных генов в моноцитах и макрофагах. В дальнейших исследованиях был обнаружен специфичный для макрофагов транскрипционный фактор, который взаимодействует с этими мотивами [22].

Известно, что первичные культуры макрофагов лошади трудно поддерживать в течение длительного времени. В связи с этим интенсивно велись исследования по оценке чувствительности к вирусу ИНАН первичных культур клеток, выделенных из других тканей и органов. Было показано, что различные штаммы вируса ИНАН могут реплицироваться в первичных культурах клеток лошади: дермальных фибробластах [16, 23–25], клетках почки [24, 26–28] и эндотелиальных клетках [29]. Эти клетки были использованы для наращивания вируса *in vitro* наряду с макрофагами. Результаты этих работ продемонстрировали способность вируса ИНАН реплицироваться в клетках, имеющих немакрофаговое происхождение. Следует отметить, что клеточный тропизм менее вирулентных штаммов этого вируса *in vitro* не был до сих пор исследован. Известно, что первичные культуры имеют ряд недостатков, в том числе краткосрочность культивирования (до 50 цитогенераций). Поэтому были предприняты попытки адаптировать иммортализованные (бессмертные) клеточные линии к вирусу. В результате показано, что перевиваемые клеточные линии эмбриональных фибробластов мыши (FEA) [30], клеток тимуса собаки (Cf2Th) [31], остеосаркомы собак (D17) [32], макрофагов собаки (DH82) [33] и макрофагов лошади (EML3C) [34] способны поддерживать репликацию вируса ИНАН *in vitro*. Однако бессмертные клеточные линии наряду с преимуществами имеют много недостатков. Они, как правило, при длительном культивировании теряют тканевую и даже видовую принадлежность. Возможно, в результате этого происходит ослабление вирулентности вируса ИНАН. Детерминанты вирулентности могут быть потеряны или изменены, когда вирусы размножаются длительное время в других клетках, отличающихся от их клеток-мишеней в естественных условиях.

В последние 10 лет появились 2 работы, в которых предпринимались попытки адаптировать мышинные эмбриональные фибробласты линии NIH 3T3 к вирусу ИНАН *in vitro* [35, 36]. Вначале для этого был найден и клонирован ген функционального рецептора для вируса ИНАН, названный «лошадиный лентивирусный рецептор 1» (ELR1), который, как оказалось, родственен семейству белков фактора некроза опухоли (ФНО) [35]. Было показано, что этот рецептор присутствует на поверхности моноцитов и макрофагов лошадей *in vitro*. Интересным является тот факт, что в не чувствительных к вирусу ИНАН клетках человека, обезьяны и мыши *in vitro* рецептор ELR1 не был выявлен. Однако при введении в эти клетки гена рецептора *ELR1* с помощью

рекомбинантного вектора, созданного на основе мышинного ретровируса, они приобретали чувствительность к вирусу ИНАН. Результаты этой работы демонстрируют, что инфицирование клеток человека, обезьяны и мыши вирусом ИНАН может быть опосредовано присутствием одного рецептора ELR1 на клетках.

Является ли этот рецептор единственным или вирус для входа в клетку использует другие рецепторы, пока неясно. Известно, что существуют культуры клеток других видов животных (собак), адаптированные к вирусу ИНАН. W. Maugy и соавт. [16, 37] сообщили, что вирус ИНАН, по-видимому, использует различные рецепторы для заражения фибробластов собак и лошадей *in vitro*. Сохраняется вероятность того, что другие штаммы ИНАН в высокоадаптированных клетках используют альтернативные рецепторы. Результаты многочисленных исследований показали, что ИНАН заражает только моноциты и макрофаги в естественных условиях и имеется одно сообщество, которое свидетельствует о том, что вирус может также инфицировать клетки эндотелия [29] *in vivo*. В литературе отсутствуют данные об инфекции вирусом ИНАН лимфоцитов или других типов клеток у инфицированных лошадей, что указывает на высокую степень тропизма ИНАН в естественных условиях. Однако в культуре репликация вируса ИНАН наблюдается и в других типах клеток лошади: дермальных фибробластах и клетках почки. В связи с этим можно предположить, что чувствительность клеток к вирусу ИНАН определяют другие биологические факторы, которые, возможно, отличаются от рецепторной специфичности. Отсутствуют данные о роли клеточной пролиферации и степени дифференцировки клеток в тропизме этого вируса.

Дальнейшие исследования в данном направлении позволили коллективу авторов [36] создать новую мышиную клеточную систему, которая была репликационно компетентна к вирусу ИНАН – NIH 3T3 (ELR1/cyc) (генетически трансформированные фибробласты мыши, в которых экспрессировались гены рецептора *ELR1* и циклина *cyc*). Таким образом, показано, что мышинные клетки можно адаптировать к лентивирусной инфекции посредством генетической трансформации. Однако использование адаптированных для вируса ИНАН мышинных фибробластов не решает основную проблему – создание адекватной модели *in vivo* вследствие недостаточных для этого свойств, которыми обладают эти клетки.

**Преимущества ЭСК мыши.** Особую перспективность в данном направлении представляют ЭСК мыши, о которых мы подробно сообщали ранее [38–40]. Впервые эти клетки были выделены из ранних предимплантационных эмбрионов мышей одновременно в двух независимых лабораториях в 1981 г. [41, 42]. ЭСК получили из клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцист мышей. Эти клетки происходят из эмбрионласта ранних предимплантационных зародышей и в культуре сохраняют сходство с ранними эмбрионами, в том числе содержат огромную библиотеку предсинтезированных мРНК генов раннего эмбриогенеза и органогенеза. Считается, что ЭСК наиболее близко напоминают примитивную эктодерму ранних постимплантационных эмбрионов. Они обладают высокой пролиферативной активностью, способны самообновляться и поддерживаться в недифференцированной форме в течение длительного времени *in vitro*.

В настоящий момент имеются убедительные данные, которые свидетельствуют об огромном потенциале ЭСК

мышь относительно направленной дифференцировки в клетки всех трех зародышевых листков *in vitro* [43], в том числе половые клетки [44]. При условиях, которые индуцируют дифференцировку, они способны воспроизвести эмбриогенез в культуре, что позволяет использовать их вместо ранних эмбрионов. Адаптация ЭСК мыши, которые в отличие от других клеточек можно направлять в культуре по определенному пути развития, в том числе в направлении гематопоэза, могла бы способствовать более глубокому изучению и пониманию тропизма лентивирусов и патогенеза в инфицированных клетках как *in vitro*, так и *in vivo*. Для индукции дифференцировки ЭСК мыши в направлении гематопоэза отработаны условия культивирования, индукторы и даже имеются готовые индукционные коммерческие среды (ES-Cut<sup>TM</sup>, ES-Cult M3120 и другие фирмы «STEMCELL Technologies Inc»). Кроме того, дифференцировка ЭСК мыши в гематоэтические клетки вышла на уровень крупномасштабного культивирования с использованием различных биореакторов [45–48], что свидетельствует об изученности данного направления и достоверности, высокой воспроизводимости результатов. Способность ЭСК при определенных условиях дифференцироваться в заданном направлении делает их самым перспективным материалом для разработки новых технологий. Работы в данном направлении ведутся с привлечением ЭСК человека, которые многие коллективы пытаются адаптировать к другому представителю лентивирусов – вирусу иммунодефицита человека 1 [49, 50].

ЭСК имеют уникальные свойства, которые позволяют рассматривать их как перспективный материал для создания лабораторной мышинной модели *in vivo* с целью изучения лентивирусной инфекции. ЭСК могут быть возвращены обратно в ранний предимплантационный эмбрион. Для этого 10–15 клеток микроинъектируют в бластополюсть бластоцисты или агрегируют с одним (простой сэндвич) или двумя (сложный сэндвич) ранними эмбрионами (морулы), у которых предварительно удалена прозрачная оболочка. Далее такие комплексы краткосрочно культивируют и подсаживают в матку сурrogатным самкам. Попав в окружение клеток зародыша, ЭСК формируют все ткани развивающегося плода, давая начало химерным животным. Ранее нами посредством агрегации ЭСК с морулами методом простого и сложного сэндвича были получены химерные мыши с эффективностью 50% [51]. У химерных мышей, получаемых после инъекции ЭСК в полость бластоцисты, доля ЭСК достигает 80% и, как правило, химеризм распространяется на все ткани и органы [52, 53]. Перед возвратом этих клеток в эмбрион ЭСК могут быть подвергнуты генетическим манипуляциям различными методами [54]. Ранее мы показали компетентность ЭСК мыши линий D3 и RK23 к введению чужеродной ДНК [38, 55].

Генетическая трансформация мышинных ЭСК посредством введения рекомбинантной экзогенной ДНК, содержащей ген *ELR1* рецептора вируса ИНАН, поставленный под контроль промотора гена, который экспрессируется только в полипотентных клетках, например *Oct 3/4*, позволяет легко отбирать клоны ЭСК с необходимым фенотипом и использовать их для создания трансгенных эмбрионов, плодов и в конечном счете мышей. Эти данные демонстрируют огромное преимущество ЭСК перед другими культурами клеток, используемыми в вирусологии. Поскольку эксперименты с ЭСК человека требуют особого разрешения, а ЭСК лошади до сих пор не созданы, ЭСК мыши представ-

ляют собой единственный перспективный материал для создания адекватной репликационно-компетентной клеточной системы для вируса ИНАН. Адаптация мышинных ЭСК к вирусу ИНАН лошадей посредством генетической трансформации позволит приблизиться к созданию лабораторной модели *in vivo* для изучения иммунного ответа при лентивирусной инфекции.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3–6, 8–14, 16–37, 41–43, 45–50, 52, 53 см. REFERENCES)

2. Юров К.П., Заблоцкий В.Т., Косминков Н.Е. *Инфекционные и паразитарные болезни лошадей*. М.: Мастер-Класс; 2010.
7. Юров К.П., Алексеенкова С.В., Юров Г.К. Инфекционная анемия лошадей и её современная диагностика. *Ветеринария*. 2013; (4): 3–8.
15. Юров К.П., Токарник Э.Ф., Галатюк А.Е., Самуйленко А.Я., Люлькова Л.С., Пестова Г.В. и др. *Способ изготовления культурального антигена из вируса инфекционной анемии лошадей и набор для индикации антител или антигена вируса инфекционной анемии лошадей*. Патент РФ № 2146150; 2000.
38. Савченкова И.П. *Эмбриональные стволовые клетки в биологии: настоящее и будущее*. Дубровицы: ВИЖ; 1999.
39. Савченкова И.П. Эмбриональные стволовые клетки в биологии и биотехнологии. В кн.: Дьяконов Л.П., ред. *Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии)*. М.: Компания Спутник +; 2000: 244–73.
40. Савченкова И.П. Эмбриональные стволовые клетки млекопитающих. В кн.: Дьяконов Л.П., ред. *Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии)*. М.: Компания Спутник +; 2009: 347–79.
44. Савченкова И.П. Эмбриональные стволовые клетки как потенциальный источник гамет *in vitro*. *Проблемы репродукции*. 2009; 15 (3): 54–9.
51. Савченкова И., Фляйшманн М., Булла Й., Брэм Г. Использование эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши для получения химерных животных. *Цитология*. 1996; 38(10): 1118–23.
54. Савченкова И.П., Зиновьева Н.А., Булла Й., Брэм Г. Эмбриональные стволовые клетки, их генетическое изменение путем гомологичной рекомбинации и использование в получении трансгенных животных. *Успехи современной биологии*. 1996; 116 (1): 78–92.
55. Савченкова И.П. Введение гена *lac-Z* E. coli в эмбриональные стволовые клетки мыши ДЗ электропорацией. *Доклады Российской Академии Сельскохозяйственных Наук*. 1996; (6): 36–7.

#### REFERENCES

1. Issel C.J., Coggins L. Equine infectious anemia: current knowledge. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1979; 174 (7): 727–33.
2. Yurov K.P., Zablotskiy V.T., Kosminkov N.E. *Equine Infectious and Parasitic Disease [Инфекционные и паразитарные болезни лошадей]*. Moscow: Master-Klass; 2010. (in Russian)
3. Montelaro R.C., Ball J.M., Rushlow K. Equine retroviruses. In: Levy J.A., ed. *The Retroviridae*. Plenum Press, New York; 1993; (2): 257–360.
4. Craig J.K., Montelaro R.C. EIAV envelope diversity: shaping viral persistence and encumbering vaccine efficacy. *Curr. HIV Res.* 2010; 8(1): 81–6.
5. Craig J.K., Montelaro R.C. Lessons in AIDS vaccine development learned from studies of equine infectious anemia virus infection and immunity. *Viruses*. 2013; 5(12): 2963–76.
6. Leroux C., Cadore J.L., Montelaro R.C. Equine infectious anemia virus (EIAV): what has HIV’s country cousin got to tell us? *Vet. Res.* 2004; 35(4): 485–512.
7. Yurov K.P., Alekseyenkova S.V., Yurov G.K. Infectious anemia of horse and its current diagnostics. *Veterinariya*. 2013; (4): 3–8. (in Russian)
8. Olsen J.C. EIAN, CAEV and other lentivirus vector systems. *Somat. Cell Mol. Genet.* 2001; 26(1–6): 131–45.
9. Farley D.C., Bannister R., Leroux-Carlacci M.A., Evans N.E., Miskin J.E., Mitrophanous K.A. Development of an equine-tropic replication-competent lentivirus assay for equine infectious anemia virus-based

- lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther. Methods*. 2012; 23(5): 309–23.
10. Kono Y., Kobayashi K. Changes in pathogenicity of equine infectious anemia virus during passages in horse leukocyte cultures. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Tokyo)*. 1970; 10(3): 106–12.
  11. Kemeny L.J., Mott L.O., Pearson J.E. Titration of equine infectious anemia virus. Effect of dosage on incubation time and clinical signs. *Cornell Vet*. 1971; 61(4): 687–95.
  12. Carpenter S., Chesebro B. Change in host cell tropism associated with in vitro replication of equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 1989; 63(6): 2492–6.
  13. Malmquist W.A., Barnett D., Becvar C.S. Production of equine infectious anemia antigen in a persistently infected cell line. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1973; 42(4): 361–70.
  14. Whetter L., Archambault D., Perry S., Gazit A., Coggins L., Yaniv A. et al. Equine infectious anemia virus derived from a molecular clone persistently infects horses. *J. Virol.* 1990; 64 (12): 5750–6.
  15. Yurov K.P., Tokarik E.F., Galatyuk A.E., Samuylenko A.Ya., Lyul'kova L.S., Pestova G.V. et. al. *A Method of Production of a Cultural Anti-gene from an Equine Infectious Anemia Virus and a Set for Identification of Antibodies or an Anti-gene of an Equine Infectious Anemia Virus*. Patent RF N 2146150; 2000. (in Russian)
  16. Maury W., Wright P.J., Bradley S. Characterization of a cytotytic strain of equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 2003; 77 (4): 2385–99.
  17. Payne S.L., Fuller F.J. Virulence determinants of equine infectious anemia virus. *Curr. HIV Res.* 2010; 8(1): 66–72.
  18. McGuire T.C., Crawford T.B., Henson J.B. Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus in tissue. *Am. J. Pathol.* 1971; 62(2): 283–94.
  19. Rice N.R., Lequarre A.S., Casey J.W., Lahn S., Stephens R.M., Edwards J. Viral DNA in horses infected with equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 1989; 63(12): 5194–200.
  20. Sellon D.C., Perry S.T., Coggins L., Fuller F.J. Wild-type equine infectious anemia virus replicates in vivo predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes. *J. Virol.* 1992; 66(10): 5906–13.21. Maury W. Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 1994; 68(10): 6270–9.
  22. Raabe M.R., Issel C.J., Montelaro R.C. Equine monocyte-derived macrophage cultures and their applications for infectivity and neutralization studies of equine infectious anemia virus. *J. Virol. Methods*. 1998; 71(1): 87–104.
  23. Klever-Anderson P., Cheevers W.P., Crawford T.B. Characterization of the infection of equine fibroblasts by equine infectious anemia virus. *Arch. Virol.* 1979; 60(3–4): 279–89.
  24. Payne S.L., La Celle K., Pei X.F., Qi X.M., Shao H., Steagall W.K. et al. Long terminal repeat sequences of equine infectious anemia virus are a major determinant of cell tropism. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(Pt. 3): 755–9.
  25. Brindley M.A., Zhang B., Montelaro R.C., Maury W. An equine infectious anemia virus variant superinfects cells through novel receptor interactions. *J. Virol.* 2008; 82(19): 9425–32.
  26. Kono Y., Yoshino T. Propagation of equine infectious anemia virus in horse kidney cell cultures. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Tokyo)*. 1974; 14(4): 155–62.
  27. Payne S.L., Fang F.D., Liu C.P., Dhruva B., Rwambo P., Issel C. et al. Antigenic variation and lentivirus persistence: variations in envelope gene sequences during EIAV infection resemble changes reported for sequential isolates of HIV. *Virology*. 1987; 161(2): 321–31.
  28. O'Rourke K.I., Perryman L.E., McGuire T.C. Antiviral, antiglycoprotein and neutralizing antibodies in foals with equine infectious anemia virus. *J. Gen. Virol.* 1988; 69(Pt.3): 667–74.
  29. Maury W., Oaks J.L., Bradley S. Equine endothelial cells support productive infection of equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 1998; 72 (11): 9291–7.
  30. Derse D., Dorn P.L., Levy L., Stephens R.M., Rice N.R., Casey J.W. Characterization of equine infectious anemia virus long terminal repeat. *J. Virol.* 1987; 61(3): 743–7.
  31. Bouillant A.M., Nielsen K., Ruckerbauer G.M., Samagh B.S., Hare W.C. The persistent infection of a canine thymus cell line by equine infectious anemia virus and preliminary data on the production of viral antigens. *J. Virol. Methods*. 1986; 13(4): 309–21.
  32. Beisel C.E., Edwards J.F., Dunn L.L., Rice N.R. Analysis of multiple mRNAs from pathogenic equine infectious anemia virus (EIAV) in an acutely infected horse reveals a novel protein, Ttm, derived from the carboxy terminus of the EIAV transmembrane protein. *J. Virol.* 1993; 67(2): 832–42.
  33. Hines R., Maury W. DH82 cells: a macrophage cell line for the replication and study of equine infectious anemia virus. *J. Virol. Methods*. 2001; 95(1–2): 47–56.
  34. Fidalgo-Carvalho I., Craig J.K., Barnes S., Costa-Ramos C., Montelaro R.C. Characterization of an equine macrophage cell line: application to studies of EIAV infection. *Vet. Microbiol.* 2009; 136 (1–2): 8–19.
  35. Zhang B., Jin S., Jin J., Li F., Montelaro R.C. A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; 102(28): 9918–23.
  36. Zhang B., Montelaro R.C. Replication of equine infectious anemia virus in engineered mouse NIH 3T3 cells. *J. Virol.* 2009; 83(4): 2034–7.
  37. Maury W., Bradley S., Wright B., Hines R. Cell specificity of the transcription-factor repertoire used by a lentivirus: motifs important for expression of equine infectious anemia virus in nonmonocytic cells. *Virology*. 2000; 267(2): 267–78.
  38. Savchenkova I.P. *Embryonic Stem Cells in Biology: Present and Future [Embryonal'nye stvolovye kletki v biologii: nastoyashchee i budushchee]*. Dubrovitsy: VIZH; 1999. (in Russian)
  39. Savchenkova I.P. Embryonic stem cells in biology and biotechnology. In: D'yakonov L.P., ed. *An Animal Cells in Culture (Methods and application in biotechnology) [Zhivotnaya kletka v kul'ture (Metody i primeneniye v biotekhnologii)]*. Moscow: Kompaniya Sputnik +; 2000: 244–73. (in Russian)
  40. Savchenkova I.P. Embryonic stem cells of mammals. In: D'yakonov L.P., ed. *An Animal Cells in Culture (Methods and application in biotechnology) [Zhivotnaya kletka v kul'ture (Metody i primeneniye v biotekhnologii)]*. Moscow: Kompaniya Sputnik +; 2009: 347–79. (in Russian)
  41. Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292(5819): 154–6.
  42. Martin G.R. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981; 78(12): 7634–8.
  43. Wobus A.M., Boheler L.K. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol. Rev.* 2005; 85(2): 635–78.
  44. Savchenkova I.P. Embryonic stem cells as a potential source of gametes. *Problemy reproduktivnoi biologii*. 2009; 15(3): 54–9. (in Russian)
  45. Li Y., Kniss D.A., Lasky L.C., Yang S.T. Culturing and differentiation of murine embryonic stem cells in a three-dimensional fibrous. *Cytotechnology*. 2003; 41(1): 2–5.
  46. Cameron C.M., Hu W.S., Kaufman D.S. Improved development of human embryonic stem cell-derived embryoid bodies by stirred vessel cultivation. *Biotechnol. Bioeng.* 2006; 94(5): 938–48.
  47. Fridley K.M., Fernandez I., Li M.T., Kettlewell R.B., Roy K. Unique differentiation profile of mouse embryonic stem cells in rotary and stirred tank bioreactors. *Tissue Eng. Part A*. 2010; 16(11): 3285–98.
  48. Lu S.J., Kelley T., Feng Q., Chen A., Reuveny S., Lanza R. et al. 3D microcarrier system for efficient differentiation of human pluripotent stem cells into hematopoietic cells without feeders and serum. *Regen. Med.* 2013; 8(4): 413–24.
  49. Bandi S., Akkina R. Human embryonic stem cell (hES) derived dendritic cells are functionally normal and are susceptible to HIV-1 infection. *AIDS Res. Ther.* 2008; 5: 1–9.
  50. Kitchen S.G., Zack J.A. Stem cell-based approaches to treating HIV infection. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2011; 6(1): 68–73.
  51. Savchenkova I., Flyayshmann M., Bulla Y., Brem G. The use of pluripotent mouse embryo stem cells for the production of chimeric animals. *Tsitologiya*. 1996; 38(10): 1118–23. (in Russian)
  52. Doetschman T.C., Eistetter H., Katz M., Schmidt W., Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: Formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1985; 87: 27–45.
  53. Robertson E.J. Embryo-derived stem cell lines. In: Robertson E.J., ed. *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach*. Oxford: IRL Press; 1987: 71–112.
  54. Savchenkova I.P., Zinov'eva N.A., Bulla Y., Brem G. Embryonic stem cells, their genetic change by a homologous recombination and use in receiving transgene animals. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 1996; 116(1): 78–92. (in Russian)
  55. Savchenkova I.P. Introduction of lac-Z E. coli gene into mouse D3 embryonic stem cells by electroporation. *Doklady Rossiyskoy Akademii Sel'skokhozyaystvennykh Nauk*. 1996; (6): 36–7. (in Russian)