

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И
БИОТЕХНОЛОГИИ "ВЕКТОР"**

На правах рукописи

Сергеев Артемий Александрович

**Модельные биосистемы для оценки защитной эффективности препаратов от
оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) у человека
03.02.02 – вирусология**

Диссертация
на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научный консультант:
доктор биологических наук
Шишкина Л.Н.

Новосибирск – 2016

Оглавление

	ВВЕДЕНИЕ.....	6
	ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	17
1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: ИЗВЕСТНЫЕ МОДЕЛЬНЫЕ БИОСИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ОТ ИНФЕКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА, ВЫЗВАННЫХ ВИРУСАМИ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН И ГРИППА ПТИЦ А/Н5N1.....	17
1.1	История выделения патогенных для человека вирусов оспы обезьян и гриппа птиц.....	17
1.2	Чувствительность человека, подопытных животных и их первичных кле- точных культур к вирусу оспы обезьян и высокопатогенному вирусу грип- па птиц А/Н5N1.....	19
1.2.1	Чувствительность человека и животных и их первичных клеточных куль- тур к вирусу оспы обезьян.....	19
1.2.2	Чувствительность человека и мышей и их первичных клеточных культур к вирусу гриппа птиц.....	31
1.3	Распространение вируса оспы обезьян и высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5N1 в организме человека и подопытных животных.....	37
1.3.1	Накопление вируса оспы обезьян в органах и тканях человека и животных.....	37
1.3.2	Накопление вируса гриппа птиц в органах и тканях человека и мышей.....	47
1.4	Патоморфологические изменения у человека и подопытных животных, инфицированных вирусом оспы обезьян и высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н5N1.....	51
1.4.1	Данные световой и электронной микроскопии органов и тканей человека и животных, инфицированных возбудителем оспы обезьян.....	51
1.4.2	Данные световой и электронной микроскопии органов и тканей человека и мышей, инфицированных вирусом гриппа птиц.....	53
1.5	Использование модельных видов животных для оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) при изучении эффективности противовирусных	

	препаратов.....	57
1.6	Подходы к созданию модельных биосистем для изучения защитной эффективности противооспенных и противогриппозных препаратов у человека.....	66
1.7	Заключение	71
2	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	73
2.1	Лабораторные животные.....	73
2.2	Перевиваемая клеточная культура и куриные эмбрионы.....	74
2.3	Первичные культуры клеток крови и легких человека.....	74
2.4	Первичные культуры клеток подопытных видов животных.....	77
2.5	Вирусы	79
2.6	Методы инфицирования животных.....	80
2.7	Методы изучения инфекционного процесса в первичных клеточных культурах.....	85
2.8	Подготовка биоматериалов от инфицированных животных.....	88
2.9	Вирусологический и молекулярно-генетический анализ проб.....	91
2.10	Оценка остаточной инфекционности кусочков органов сурков, зараженных вирусом оспы обезьян	92
2.11	Оценка титров противооспенных антител.....	92
2.12	Патоморфологические исследования.....	93
2.13	Исследуемые противовирусные препараты.....	94
2.14	Определение цитотоксичности и антиортопоксвирусной активности химических препаратов.....	94
2.15	Схемы применения препаратов у инфицированных вирусами сурков и мышей.....	95
2.16	Экстраполяция на человека и животных 50 %-х инфицирующих доз вируса, полученных с использованием первичных культур клеток.....	98
2.17	Статистическая обработка результатов.....	98
	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	100
3	СТРАТЕГИЯ ПОИСКА МОДЕЛЬНЫХ БИОСИСТЕМ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ОТ ИНФЕКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА, ВЫЗВАННЫХ ВИРУСАМИ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН И ГРИППА	

	ПТИЦ А/Н5N1.....	100
4	ПОИСК МОДЕЛЬНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН ПО ИЗУЧЕНИЮ ЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА.....	106
4.1	Экспериментальная и прогнозная оценка чувствительности людей и подопытных животных к патогенным ортопоксвирусам.....	106
4.1.1	Оценка чувствительности первичных клеток-мишеней животных и человека к патогенным ортопоксвирусам.....	106
4.1.1.1	Данные по чувствительности первичных клеток-мишеней животных к возбудителю оспы обезьян.....	106
4.1.1.2	Данные по чувствительности первичных клеток-мишеней человека и животных к возбудителю натуральной оспы.....	110
4.1.2	Оценка 50 %-х инфицирующих доз вируса оспы обезьян для подопытных животных при интраназальном заражении.....	124
4.1.3	Прогнозная оценка чувствительности к патогенным ортопоксвирусам человека и подопытных животных.....	135
4.1.3.1	Прогнозная оценка 50 %-х инфицирующих доз патогенных ортопоксвирусов для человека и подопытных животных по данным заражения первичных их клеток-мишеней и самих животных.....	135
4.1.3.2	Прогнозная оценка 50 %-й инфицирующей дозы возбудителя оспы обезьян для человека.....	144
4.2	Распространение возбудителя оспы обезьян в организме степных сурков и аутбредных мышей ICR.....	149
4.2.1	Диссеминация вируса в организме сурков.....	149
4.2.2	Диссеминация вируса в организме мышей.....	157
4.3	Патоморфологические изменения у степных сурков и аутбредных мышей ICR, зараженных возбудителем оспы обезьян.....	164
4.3.1	Световая и электронная микроскопия органов и тканей сурков, зараженных вирусом.....	163
4.3.2	Световая и электронная микроскопия органов и тканей мышей, зараженных вирусом.....	171
4.4	Оценка возможность использования степных сурков и аутбредных мышей	

	ICR для изучения эффективности препаратов от оспы обезьян у человека.....	179
4.5	Испытание и пределы практического применения модельных биосистем для оспы обезьян на основе степного сурка и аутбредной мыши ICR.....	192
5	ПОИСК МОДЕЛЬНОЙ БИОСИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ОТ ГРИППА ПТИЦ (А/Н5N1) У ЧЕЛОВЕКА.....	205
5.1	Чувствительность человека и подопытных животных к высокопатогенному вирусу гриппа птиц А/Н5N1.....	205
5.1.1	Прогнозная оценка 50 %-й инфицирующей дозы вируса для человека по данным заражения его первичных клеток-мишеней.....	205
5.1.2	Оценка 50 %-х инфицирующих доз вируса для подопытных животных при респираторном заражении.....	214
5.2	Диссеминация высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5N1 в организме кур генетической линии Род-Айланд, гусей генетической линии A. anser и аутбредных мышей ICR.....	223
5.2.1	Распространение вируса в организме кур и гусей.....	223
5.2.2	Распространение вируса в организме мышей.....	233
5.3	Патоморфологические изменения у аутбредных мышей ICR, инфицированных высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н5N1.....	243
5.4	Оценка возможности применения модельной биосистемы «аутбредная мышь ICR –штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005 высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5N1» для изучения защитной эффективности препаратов у человека.....	252
5.5	Испытание и пределы практического применения модельной биосистемы для гриппа птиц А/Н5N1 на основе аутбредной мыши ICR.....	261
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	268
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	278
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	280
	СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	323

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Болезни инфекционной природы составляют одну пятую часть среди причин смерти людей в мире, по данным Всемирной организации здравоохранения за последние 15 лет [228, 427]. При этом из числа вирусных инфекций наибольшую значимость с эпидемиологической точки зрения представляют заболевания, входными воротами для которых являются органы респираторного тракта. Возбудители этих заболеваний имеют преимущественно аэрозольный механизм передачи и короткий инкубационный период [125, 418, 464]. К числу таких инфекций (из ряда особо опасных) и относятся оспа обезьян и грипп птиц (А/Н5N1). Несмотря на то, что возбудители этих зооантропонозных заболеваний, принадлежащих к семействам *Poxviridae* (род *Orthopoxvirus*) и *Orthomyxoviridae*, были открыты достаточно давно, внимание ученых к данным патогенам не ослабевает и по настоящее время, что связано, по крайней мере, с шестью основными причинами:

- с высокой опасностью высокопатогенного вируса гриппа птиц (в/пат ВГП) А/Н5N1 и вируса оспы обезьян (ВОО) для человека (летальность достигала 60 и 17 % соответственно) [178, 227, 273];
- с низким иммунитетом или его отсутствием у людей к гриппу птиц (А/Н5N1) и оспе обезьян: вакцинация от первого заболевания не проводится, а от натуральной оспы, которая защищает и от оспы обезьян, была прекращена с 1980 г. [114, 259, 261];
- с продолжающимися эпидемическими вспышками гриппа птиц (А/Н5N1) и оспы обезьян [45, 186, 273];
- с отсутствием исчерпывающей информации о резервуарах ВОО и высокопатогенного (в/пат) ВГП А/Н5N1 в природе [134, 314];
- с существующей возможностью распространения ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1 по всему миру и выраженной генетической изменчивостью особенно последнего, которая в любой момент может существенно увеличить контагиозность вызываемого им заболевания среди людей, приведя к пандемии [45, 89, 208];
- с отсутствием или ограниченностью спектра разрешенных к применению эффективных лечебно-профилактических химиопрепаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1), а также вакцин против последнего [8, 143, 175].

Для достижения успеха при проведении противоэпидемических мероприятий, направленных на борьбу с оспой обезьян и гриппом птиц (А/Н5N1), необходимы высоко-

эффективные средства медицинской защиты. При этом испытания протективных свойств данных средств на начальных этапах (научно-исследовательская работа и доклинические исследования) должны проводиться в экспериментах *in vivo* на модельных биосистемах, включающих в себя актуальные вирулентные для людей штаммы ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1, а также доступные виды животных, воспроизводящие соответствующий инфекционный процесс у человека. Регулярное появление новых штаммов этих вирусов во время вспышек заболеваний у людей и животных делает актуальной проблему совершенствования таких модельных биосистем.

Степень разработанности. К началу данного исследования известны модельные биосистемы для оспы обезьян, созданные на основе шести видов животных: иммунодефицитных мышей [90, 92, 163], сусликов (*Spermophilus tridecemlineatus*) [156, 193, 211], луговых собачек (*Cynomys ludovicianus*) [101, 182, 213], сонь Келлена (*Graphiurus kelleni*) [209] и низших приматов (*Macaca cynomolgus* и *mulatta*) [93, 339, 424]. Тем не менее, все эти модельные виды животных имеют те или иные недостатки, касающиеся возможности их воспроизводства в неволе, дороговизны, удобства и адекватности их применения при моделировании оспы обезьян у людей:

- иммунодефицитная мышь, соня Келлена и суслик при инфицировании ВОО не воспроизводят основную симптоматику оспоподобного заболевания; первая может лишь частично моделировать инфекционный процесс у людей с подавленной иммунной системой, доля которых во время эпидемических вспышек оспы обезьян, вероятно, не очень значительна, и вряд ли может быть использована для оценки активности противовирусных средств, в основе действия которых заложен механизм их влияния на систему иммунитета; кроме того, инбредные мыши дорогие и имеют слабовыраженное генетическое разнообразие, в то время как человеческая популяция по существу представляется аутбредной (межрасовое скрещивание, межнациональное и межсемейное); соня Келлена и суслик относительно дорогие, не являются лабораторными животными и требуют специальных условий при проведении экспериментов;

- низшие приматы и луговая собачка, хотя и воспроизводят при инфицировании ВОО симптоматику оспоподобного заболевания, однако первые виды используются с высокими дозами ВОО ($\geq 7 \lg$ БОЕ – бляшкообразующая единица) для оценки защитной эффективности химиопрепаратов [98, 331, 393], являются дорогими животными, применение которых в экспериментах сопряжено с большими трудозатратами, а второй вид

плохо приживается в неволе и поэтому для экспериментов доставляется, как правило, из естественной среды обитания (Северная Америка [31]), что порождает необходимость проведения у него оценки состояния здоровья, а также наличия/отсутствия антител к ортопоксвирусам.

Из мелких лабораторных животных, удобных для оценки эффективности разрабатываемых для человека препаратов против гриппа птиц (А/Н5N1), чаще всего использовали инбредных мышей (BALB/с), а также вирусные штаммы, которые не являются актуальными для России, так как они были выделены на территории зарубежных стран [191, 351, 455].

Цели и задачи. Целью настоящих исследований явилась разработка модельных биосистем на основе актуальных высоковирулентных для человека штаммов вирусов, а также доступных и адекватных при воспроизведении болезни у людей видов животных для оценки защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1). Для достижения этой цели необходимо было решить следующие задачи:

- разработать стратегию поиска модельных биосистем для изучения защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1);
- провести экспериментальную и прогнозную оценку чувствительности человека и подопытных животных в отношении патогенных ортопоксвирусов и в/пат ВГП А/Н5N1 и выбрать для кандидатных модельных биосистем применительно к оспе обезьян и гриппу птиц (А/Н5N1) соответствующие штаммы и виды модельных животных для дальнейшего изучения;
- изучить динамику диссеминации ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1 в организме кандидатных модельных видов животных;
- исследовать патоморфологические изменения, включая выявление клеток-мишеней, в организме кандидатных модельных видов животных, инфицированных ВОО или в/пат ВГП А/Н5N1;
- оценить возможность использования кандидатных модельных биосистем для изучения защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1);
- провести испытания и определить пределы практического применения модельных биосистем для оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1).

Научная новизна:

1) определена чувствительность при интраназальном (и/н) заражении аутбредных мышей ICR и степных сурков к ВОО (центральноафриканский - ц/афр штамм V79-1-005) по ID₅₀, оцененной по наличию соответственно инфекционного процесса в легких или внешней клинической картины оспоподобного заболевания; на основе данных по чувствительности первичных клеток-мишеней животных определены прогнозные значения ID₅₀ ВОО для сурков и мышей, а также ВНО (штамм Ind-3a) для аутбредных мышей ICR; в опытах *in vitro* с применением первичных моноцитов-макрофагов человеческой крови оценено прогнозное значение ID₅₀ ВНО в отношении людей;

2) изучен патогенез оспы обезьян у и/н инфицированных ВОО (штамм V79-1-005) степных сурков и аутбредных мышей ICR с учетом динамики накопления патогена у животных этих видов (выявленные первичные и вторичные органы-мишени), патологических изменений и идентифицированных видов клеток-мишеней;

3) определена чувствительность по ЛД₅₀ при и/н и аэрозольном заражении аутбредных мышей ICR и кур генетической линии Род-Айланд к ВГП А/Н5N1 (штаммы A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Chicken/Crimea/04/2005, A/Chicken/Omsk/2006, A/Chicken/Krasnodar/02/2006, A/Chicken/Dagestan/2006, A/Duck/Kurgan/08/2005, A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005); по данным опытов *in vitro* с применением первичных клеток легких человека оценены прогнозные величины ID₅₀ в/пат ВГП А/Н5N1 (штаммы A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 и A/Chicken/Kurgan/05/2005) для людей; приведены результаты сравнительного изучения чувствительности кур по ЛД₅₀ к ВГП А/Н5N1 (штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) при различных способах инфицирования: внутривенный, аэрозольный, и/н, оральный и интрагастральный;

4) представлен патогенез гриппа птиц (А/Н5N1) у и/н зараженных в/пат ВГП А/Н5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) аутбредных мышей ICR с учетом динамики накопления патогена у животных этого вида (выявленные первичные и вторичные органы-мишени), патологических изменений и идентифицированного типа клеток-мишеней; приведены результаты диссеминации в/пат ВГП А/Н5N1 (штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 и/или A /Chicken/Kurgan/05/2005) в организме и/н инфицированных кур генетической линии Род-Айланд и гусей генетической линии *A. anser*;

5) с использованием разработанных модельных биосистем («степной сурок – штамм V79-1-005 ВОО», «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 ВОО» и «аутбредная мышь ICR - штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1»), запатентованных нами [60, 61, 75], представлены данные по оценке противооспенной и противогриппозной активности некоторых известных и разрабатываемых препаратов.

Теоретическая и практическая значимость работы:

- созданная нами методология поиска модельных видов животных для вирусных инфекций, основанная на изучении показателей взаимодействия подопытных животных с возбудителем заболевания по сравнению с таковыми у людей (известных видов модельных животных) использована при разработке трех модельных биосистем по оценке защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1);

- разработанная нами методология поиска модельных видов животных для вирусных инфекций уже применялась для создания модельных биосистем («морская свинка – штамм GPA вируса вакцинии (ВВ)» и «аутбредная мышь ICR - штамм A/Salekhard/01/2009 ВГ А/Н1N1pdm») с целью изучения протективной активности различных препаратов и может быть использована при поиске видов модельных животных для других инфекций вирусной природы;

- разработанные нами модельные биосистемы «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 ВОО», «степной сурок - штамм V79-1-005 ВОО» и «аутбредная мышь ICR – штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1» были успешно применены на этапе доклинических испытаний российских противооспенного химического соединения НИОХ-14 и противогриппозного препарата Реаферон-ЕС-липинт®, что открывает перспективу их дальнейшего изучения в клинических исследованиях;

- разработанные нами модельные биосистемы «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 ВОО», «степной сурок - штамм V79-1-005 ВОО» и «аутбредная мышь ICR – штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1», а также методические рекомендации (МР) по их применению (МР 4.2.001-16, МР 4.2.002-16, МР 4.2.004-16 Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» - ГНЦ ВБ «Вектор») могут быть взяты для изучения защитной активности других препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1);

- ранее существующий подход прогнозной оценки величины ID₅₀ вируса, основанный на применении первичных клеточных культур животных и человека и продемонст-

рировавший при его использовании адекватность результатов таковым, полученным в прямых экспериментах на животных, может быть взят для исследования чувствительности разных млекопитающих к патогенным ортопоксвирусам и в/пат ВГП А/Н5N1;

- прогнозные величины ID₅₀ ВНО (штамм Ind-3a) для аутбредных мышей ICR, определенные на основе экспериментов (*in vitro*), уже использованы при создании модельной биосистемы для оценки защитного действия препаратов от натуральной оспы;

- прогнозные величины ID₅₀ ВНО, ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1 для людей, определенные на основе экспериментов (*in vitro*), могут быть полезными при поиске модельных биосистем не только для изучения защитной эффективности препаратов от соответствующих инфекций, но и для оценки показателей их патогенеза и контагиозности;

- при работе с мышами, сурками, первичными культурами клеток человека и животных с применением ВОО и ВНО по сей день в ГНЦ ВБ «Вектор» руководствуются методами, представленными в созданной нами инструкции № 1/02;

- в организациях, проводящих работы с возбудителями особо опасных инфекций, руководствуются разработанной нами методологией подготовки фрагментов органов и тканей от животных, инфицированных этими патогенами, для проведения патоморфологического изучения (методические указания - МУ 1.3.3103-13 Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека – Роспотребнадзор), которая обеспечивала гарантированную инактивацию жизнеспособного ВОО в этих биоматериалах при исследовании на остаточную инфекционность;

- в организациях, проводящих работы с в/пат ВГ типа А, руководствуются разработанной нами методологией забора и приготовления биологических образцов от людей, инфицированных этим патогеном, для вирусологических исследований (временные МУ Роспотребнадзора от 01.05.2009 г. №01/5963-9-23 и МУ Роспотребнадзора от 24.05.2009 г. №01/7161-9-34).

Методология и методы исследования. При поиске модельных видов животных для гриппа птиц (А/Н5N1) и оспы обезьян в работе применяли методологию, основанную на оценке показателей взаимодействия подопытных животных с возбудителями этих заболеваний при заражении через дыхательный тракт для сравнения с таковыми у людей (известных модельных видов животных).

Для оценки чувствительности первичных клеток-мишеней подопытных животных и людей в отношении патогенных ортопоксвирусов и в/пат ВГП А/Н5N1 применяли ра-

нее созданный нами подход по приготовлению этих клеток и проведению экспериментов *in vitro*. В ряде случаев была взята методология прогнозного определения значений ID_{50} ВОО, ВНО и в/пат ВГП А/Н5N1 для животных и людей, базирующаяся на использовании их первичных клеток-мишеней для этих патогенов. В работе также были применены следующие методы исследований: вирусологические, культуральные, гистологические, электронно-микроскопические, серологические, молекулярно-генетические, аэрозольные и статистические.

Положения, выносимые на защиту. В рамках данной работы выносятся на защиту следующие положения:

1) при и/н и п/к заражении ВОО (штамм V79-1-005) степные сурки воспроизводят внешнюю клиническую симптоматику оспоподобного заболевания, включая наличие гибели;

2) аутбредные мыши ICR чувствительны к штамму V79-1-005 ВОО: величина ID_{50} вируса по его наличию в легких животных через 7 суток после заражения и/н способом составляет 2,4 (2,0...2,8) lg БОЕ;

3) органами первичной репродукции ВОО (штамм V79-1-005) при и/н заражении степных сурков в дозе 3,7 lg БОЕ являются легкие и трахея, а основной механизм диссеминации патогена в организме этого вида животных - лимфогенный с размножением его в лимфатических органах;

4) аутбредные мыши ICR после и/н введения 25 ID_{50} ВОО (штамм V79-1-005) демонстрировали генерализованную инаппарантную форму инфекции с основным гематогенным механизмом диссеминации патогена, связанным с его репликацией в клетках кровеносной системы и крови;

5) у степных сурков после и/н заражения ВОО (штамм V79-1-005) воспалительно-некротические изменения происходят как в органах дыхательной системы, так и в других, а у аутбредных мышей ICR данный вид поражения в основном сосредоточен в респираторных органах;

6) у степных сурков и аутбредных мышей ICR в результате и/н инфицирования ВОО (штамм V79-1-005) размножение вируса происходит в первичных клетках-мишенях (макрофагах и эпителиоцитах дыхательных органов), а также в других видах клеток (гладкомышечных и ретикулярных, плазмócитах, эндотелиоцитах, фибробластах);

7) изученные восемь штаммов в/пат ВГП А/Н5N1, выделенные от птиц на территории России, достоверно не различаются между собой по вирулентности (летальной активности) для кур генетической линии Род-Айланд при аэрозольном и и/н заражении;

8) наиболее высокая чувствительность кур генетической линии Род-Айланд к в/пат ВГП А/Н5N1 (на примере штамма A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005), судя по летальному эффекту, наблюдается при аэрозольном заражении, которая выше примерно в 30 раз, чем при и/н, в 500 раз, чем при оральном, и в 10000 раз, чем при интрагастральном;

9) исследованные штаммы в/пат ВГП А/Н5N1 для аутбредных мышей ICR при и/н заражении обладают разной степенью летальной активности и подразделяются на три группы: высоковирулентная ($LD_{50} < 3,0 \lg ЭИД_{50}$) - A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Chicken/Crimea/04/2005, A/Chicken/Omsk/2006, A/Chicken/Krasnodar/02/2006, A/Chicken/Dagestan/2006; средней степени вирулентности ($LD_{50} = 3,0-4,5 \lg ЭИД_{50}$) - A/Duck/Kurgan/08/2005; авирулентная ($LD_{50} > 4,5 \lg ЭИД_{50}$) - A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005;

10) у аутбредных мышей ICR при и/н инфицировании в/пат ВГП А/Н5N1 (штаммы A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Duck/Kurgan/08/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) первичные органы-мишени респираторного тракта находятся в нижнем его отделе, а у кур генетической линии Род-Айланд – в верхнем, при этом генерализация инфекционного процесса у этих видов животных, сопровождающаяся внешней клинической симптоматикой, происходит в основном путем гематогенного распространения патогена;

11) и/н инфицирование аутбредных мышей ICR в/пат ВГП А/Н5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) вызывает воспалительно-некротические изменения в трахее и слизистой носа, а также аналогичный вид поражения, кровоизлияния и тромбоз кровеносных капилляров - в легких, головной мозге, почках и селезенке; в легких размножение вируса происходит в эпителиоцитах;

12) модельные биосистемы «степной сурок – штамм V79-1-005 ВОО», «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 ВОО» и «аутбредная мышь ICR - штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1» могут быть использованы при оценке защитной активности разрабатываемых препаратов от инфекций человека, вызванных ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1;

13) прогнозные величины ID_{50} штамма Ind-3a ВНО, а также штаммов A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 и A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 для людей, оцененные в опытах *in vitro* с использованием человеческих первичных клеток-мишеней для этих вирусов, составляют 1,0 (0,6...1,4) lg БОЕ, а также -2,4 (-2,8...-2,0) и -2,5 (-2,9...-2,1) lg ЭИД50 соответственно;

14) прогнозные значения ID_{50} ВОО (штамм V79-1-005) для степных сурков и аутбредных мышей ICR, а также ID_{50} ВНО (штамм Ind-3a) для аутбредных мышей ICR, оцененные в опытах *in vitro* с применением их первичных клеток-мишеней для этих вирусов, согласуются с таковыми, полученными при и/н заражении этих животных.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты исследований обработаны с использованием стандартных статистических методов [12] и пакета компьютерных программ «Statistica 6.0» (StatSoft Inc. 1984-2001) [70] с определением достоверности отличий на 5 %-м уровне значимости.

Результаты работы были доложены на 19 российских и международных научных конференциях, конгрессах и митингах: Biological Medical Defense Conference, Munchen, Germany, 17–18 October, 2007; 3-я всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов», Новосибирск, 7–9 ноября 2007 г.; XV заседание рабочей группы «Аэрозоли Сибири», Томск, 8–9 сентября 2008 г.; 5-я международная конференция «Наука и образование для целей биобезопасности», Пушкино, Московская обл., 6–9 октября 2008 г.; Международная научно-практическая конференция «Проблемы совершенствования межгосударственного взаимодействия в подготовке к пандемии гриппа», Новосибирск, 9–10 октября 2008 г.; 27th Annual Conference of American Association for Aerosol Research, Orlando, Florida, USA, 20–24 October, 2008; 14th International Congress on Infectious Diseases (ICID), Miami, Florida, USA, March 9–12, 2010; WHO Advisory Committee on Variola Virus Research Report of the Thirteenth Meeting, Geneva, Switzerland, 31 October–1 November, 2011; 3-я научно-практической школы-конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора «Современные технологии обеспечения биологической безопасности», Оболенск, Московская обл., 31 мая - 2 июня 2011 г.; WHO Advisory Committee on Variola Virus Research Report of the Fourteenth Meeting. - Geneva, Switzerland, 16–17 October, 2012; Конференция «Гигиенические аспекты в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благо-

получия человека», Новосибирск, 8 сентября 2012 г.; Научно-практическая конференция «Диагностика и профилактика инфекционных болезней», Новосибирск, 26–28 сентября 2013 г.; Medical Biodefense Conference, Munich, Germany, 22–25 October, 2013; 1-я международная конференция молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов, вирусологов OpenBio, Новосибирск, 4–5 октября 2014 г.; 12-я межгосударственная научно-практическая конференция «Вклад государств-участников содружества независимых государств в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения в современных условиях», Новосибирск, 25–26 ноября 2014 г.; 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Spain, 10–13 May, 2014; 7-я Всероссийская научно-практическая конференция «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов», Новосибирск, 21–22 апреля 2015 г.; 2-я международная конференция молодых ученых, Новосибирск, 1–2 октября 2015 г.; 2-я Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания», Сочи, 2–5 ноября 2015 г.

В общей сложности в рамках тематики данной диссертации было получено 7 патентов Российской Федерации (РФ), опубликовано 20 статей в отечественных изданиях, 8 статей в зарубежных журналах, а также 2 монографии.

Личный вклад соискателя: в разработке стратегии подбора модельных биосистем для изучения защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) у человека; в прогнозной и экспериментальной (*in vitro*) оценке чувствительности человека к ВОО, ВНО и в/пат ВГП А/Н5N1 (при участии Сергеева Ал.А. – научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов»); в экспериментальной (*in vitro*) оценке чувствительности сурков и мышей к ВОО; в экспериментальной (*in vitro*) оценке чувствительности сурков и мышей к ВНО (при участии Овчинниковой А.С. – младший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов»); в экспериментальной (*in vivo*) оценке чувствительности сурков, мышей, мини-свиней и кроликов к ВОО (при участии Сергеева Ал.А. – научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов»); в экспериментальной (*in vivo*) оценке чувствительности кур, гусей и мышей к в/пат ВГП А/Н5N1; в изучении динамики распространения ВОО у инфицированных сурков и мышей; в изучении динамики распространения в/пат ВГП А/Н5N1 в организме инфицированных кур, гусей и мышей; в изучении патологических изменений в органах и тканях, инфицированных ВОО или в/пат ВГП А/Н5N1 кандидатных модельных животных (при

участии Таранова О.С. - заведующий отделом микроскопических исследований); в проведении сравнительной оценки исследованных показателей взаимодействия кандидатных видов модельных животных с ВОО или в/пат ВГП А/Н5N1 при заражении через дыхательный тракт с таковыми у человека (известных видов модельных животных); в использовании разрабатываемых модельных биосистем «степной сурок – штамм V79-1-005 ВОО», «аутбредная мышь ICR - российский в/пат штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 ВГП А/Н5N1» и «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 ВОО» с целью оценки возможности применения для изучения защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) (при участии Сергеева Ал.А. и Овчинниковой А.С. - сотрудники отдела «Коллекция микроорганизмов», а также Кабанова А.С. – научного сотрудника отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций).

Благодарности. Автор признателен своему научному консультанту Шишкиной Л.Н. (доктор биологических наук), а также своему наставнику Сергееву А.Н. (доктор медицинских наук, профессор) за ту помощь, что они оказали при разработке плана исследований по теме данной диссертационной работы, в обсуждении полученных данных и при проверке подготовленной диссертации. Автор также благодарит сотрудников двух отделов «Коллекция микроорганизмов» и профилактики и лечения особо опасных инфекций Булычева Л.Е. (кандидат биологических наук), Пьянкова О.В. (кандидат биологических наук), Боднева С.А. (кандидат медицинских наук), Сергеева Ал.А. (кандидат медицинских наук), Овчинникову А.С., Титову К.А., Юрганову И.А., Кабанова А.С., Галахову Д.О., которые участвовали с автором при проведении экспериментов с применением живых ВОО, в/пат ВГП А/Н5N1 и ВНО и/или в обсуждении полученных результатов, Таранова О.С. (сотрудника отдела микроскопических исследований) за помощь в осуществлении световой и электронной микроскопии органов и тканей животных и людей, инфицированных ВОО, ВНО и в/пат ВГП А/Н5N1.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 332 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение (3 раздела), заключение с выводами, список сокращений и условных обозначений, список литературы и список иллюстративного материала. Работа иллюстрирована 39 таблицами и 46 рисунками. Список литературы содержит 464 источника, в том числе 385 зарубежных статей.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: ИЗВЕСТНЫЕ МОДЕЛЬНЫЕ БИОСИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ОТ ИНФЕКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА, ВЫЗВАННЫХ ВИРУСАМИ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН И ГРИППА ПТИЦ А/Н5N1

1.1 История выделения патогенных для человека вирусов оспы обезьян и гриппа птиц

ВОО является зооантропонозом и принадлежит к роду *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae*. ВОО был впервые изолирован в Государственном институте сывороток в г. Копенгаген (Дания) в 1958 году во время изучения болезни у яванских макаков, схожей с натуральной оспой. Один из выделенных штаммов получил название Copenhagen и впоследствии был использован, как референс-штамм этого вируса [100]. В последующем аналогичные вспышки заболевания среди обезьян, содержащихся в неволе, продолжали регистрироваться в ряде стран: Соединенные Штаты Америки (США) [316, 352], Нидерланды [347] и Франция [307].

В 1971 г. было представлено первое сообщение [5] о том, что ВОО может вызывать заболевание у людей, клинически напоминающее натуральную оспу. Спустя некоторое время была исследована географическая зона, на которой регистрировалась оспа обезьян у людей. Данная территория охватывала экваториальную часть западной и центральной Африки. Стало известно, что не все штаммы ВОО имеют одинаковую вирулентность для человека: те, которые были выделены от больных людей в центральной Африке были более вирулентными, чем в западной [108].

Вирус гриппа (ВГ), так же как и ВОО, относится к зооантропонозам и принадлежит к семейству *Orthomyxoviridae*. За последние 100 лет было зарегистрировано четыре пандемии гриппа: в 1918 г., вызванная ВГ А/Н1N1, в 1957 г., – А/Н2N2, в 1968 г., – А/Н3N2 и в 2009 г., – А/Н1N1pdm. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно в эпидемии сезонного гриппа обычно вовлекается около 1 миллиарда людей Земного шара, из которых 3–5 млн. человек имеет тяжелые формы заболевания, а 300–500 тыс. из них погибает [289]. Практически не отличалась от них и пандемия гриппа 2009 г., вызванная ВГ А/Н1N1pdm09, по широте охвата населения Земного шара (11–21 %) и показателю летальности (284,5 тыс. человек) [201, 378]. ВГ А/Н1N1pdm09, явив-

шийся причиной пандемии в 2009 г., в дальнейшем заменил человеческий сезонный ВГ А/Н1N1 и вместе с другими сезонными ВГ А/Н3N2 и В вызывает с 2009 года эпидемии [329].

Впервые человеческий штамм в/пат ВГП А/Н5N1 был выделен в 1997 г. в Гонконге от 3-летнего мальчика, умершего от гриппозной пневмонии, осложненной синдромом Рейе [137, 148, 154]. В дальнейшем и по настоящее время регистрируются спорадические случаи заболевания среди людей, вызванного этим субтипом вируса. При этом отмечаются одиночные случаи передачи возбудителя заболевания от человека к человеку лишь при тесном контакте. Однако ряд ученых в экспериментальных целях провел работы с использованием методов точечного мутагенеза (4 мутации в гене НА и 1 – в гене РВ2) и реассортации (замена 7 генов ВГП А/Н5N1 на таковые ВГ А/Н1N1pdm09) по созданию вариантов ВГП А/Н5N1, обладающих способностью связываться не только с рецепторами сиаловой кислоты (СА) с α -2,3 связью к галактозе, но и с рецепторами СА с α -2,6 связью к галактозе и передаваться воздушно-капельным путем между хорьками. Эти результаты показали принципиальную возможность возникновения в природе новых генетически измененных вариантов этого вируса с пандемическим потенциалом [89, 208].

Из 144 известных субтипов ВГП (Н1–16 и N1–9), которые делят на высоко- и низкопатогенные с учетом величины внутривенного индекса патогенности для кур (IVPI) [167], 103 циркулирует в настоящее время среди дикой и домашней птицы [294] у более 100 видов птиц [134], вызывая летальный эффект у более 40 видов, включая 3 домашних (куры, индюки и страусы). Причем известно, что 9 субтипов этого вируса вызывали заболевание у людей:

- в/пат ВГП А/Н5N1 в Гонконге, Азербайджане, Бангладеш, Китае, Джибути, Египте, Индонезии, Ираке, Камбодже, Лаосе, Мьянмаре, Нидерландах, Пакистане, Таиланде, Турции и Вьетнаме (более 700 случаев с летальностью около 60 %) [138, 273];

- низкопатогенный ВГП А/Н7N2 (4 случая без гибели) в США в 2004 г. и Великобритании в 2007 г. [115, 136];

- высоко- и низкопатогенный ВГП А/Н7N3 (12 случаев без гибели) в Италии в 1999–2003 г., Канаде в 2004 г., Великобритании в 2006 г. и Мексике в 2012 г. [135, 136, 332];

- высоко- и низкопатогенный ВГП А/Н7N7 (93 случая, включая один летальный) в Великобритании в 1959, 1977 и 1996 г. и Нидерландах в 2003 г. [131, 288, 410, 431];
- низкопатогенный ВГП А/Н7N9 (251 случай, включая 56 летальных в период с февраля по май 2013 г., 199 случаев в период с октября 2013 по май 2014 г.) в Китае в 2013 г. [435];
- низкопатогенный ВГП А/Н9N2 (15 случаев без гибели) в Китае, Гонконге в 1998–1999, 2003, 2007, 2009, 2013 и 2014 г., а также в Бангладеш в 2011 г. [112, 253, 270, 356, 359, 460];
- низкопатогенный ВГП А/Н6N1 (1 случай без гибели) в Китае в 2013 г. [333];
- низкопатогенный ВГП А/Н10N7 (4 случая без гибели) в Египте в 2004 г., Австралии в 2010 г. [116, 275];
- низкопатогенный ВГП А/Н10N8 (2 случая, включая 1 летальный) в Китае в 2013 и 2014 г. [357, 358].

1.2 Чувствительность человека, подопытных животных и их первичных клеточных культур к вирусу оспы обезьян и высокопатогенному вирусу гриппа птиц А/Н5N1

1.2.1 Чувствительность человека и животных и их первичных клеточных культур к вирусу оспы обезьян

В доступной для нас научной литературе нет данных, относящихся к количественной оценке степени чувствительности людей к ВОО. Тем не менее, проведенный информационный анализ в отношении вызывающих эпидемии заболеваний (натуральной оспы, гриппа, аденовирусной и риновирусной инфекций и др.), для которых ведущие механизмы передачи инфекции сходны с таковыми при оспе обезьян (аэрозольный и контактный) и реализуются преимущественно через дыхательный тракт, указывает на то, что чувствительность специфически неиммунизированных людей к этим вирусам высокая и, как правило, не превышает 100 вирионов [43, 142, 189, 255]. Сам факт же периодического появления вспышек оспы обезьян среди людей на Земном шаре (в Африке и Северной Америке) может говорить также об их высокой восприимчивости к возбудителю этой инфекции.

В научной литературе приведена экспериментальная информация о клинической картине заболевания и чувствительности некоторых видов животных для ВОО при разных способах заражения. При этом исследованиям подвергали как лабораторные виды животных (мышь, крыса, хомяк, морская свинка, кролик и низшие приматы), так и дикие и необычные виды домашних животных (хлопковая, многососковая и гамбийская сумчатая крысы, суслик, белка, луговая собачка и африканская соня).

Данные по аутбредным и линейным мышам. Оценка чувствительности аутбредных белых мышей к западноафриканскому (з/афр) штамму Copenhagen ВОО была проведена рядом исследователей [100], которые наблюдали некоторые внешние клинические симптомы заболевания с 100 %-м летальным исходом у взрослых животных при интрацеребральном инфицировании (энцефалитические проявления) и у 2-дневных при и/н заражении (снижение подвижности и массы тела). При этом авторы не привели информации, касающейся величин использованных доз вируса. Эксперименты, проведенные другими учеными на беспородных белых мышах разного возраста с применением того же штамма ВОО, показали следующее: при и/н, внутрибрюшинном и пероральном инфицировании 8-дневных мышей дозой $1,2 \times 10^6$ ООЕ (оспинообразующая единица) наблюдались соответственно 100, 100 и 40 %-й летальный эффект, которому предшествовали снижение подвижности и массы тела; при интраплантарном инфицировании 8- и 12-дневных мышей дозой 6×10^2 ООЕ – соответственно 100 и 60 %-й летальный эффект, которому предшествовали отек стопы и генерализованные проявления; при пероральном и и/н инфицировании соответственно 12- и 15-дневных мышей дозой $1,2 \times 10^6$ ООЕ – 60 и 24 %-й летальный эффект, которому предшествовали снижение подвижности и массы тела [301]. 4-недельные инбредные мыши (BALB/c) при внутрибрюшинном заражении как ц/афр штаммом ВОО (Congo-2003-358), так и з/афр (USA-2003-044) в одной и той же дозе (10^5 БОЕ) демонстрировали одинаковую клиническую картину заболевания (взъерошенность шерсти и анорексия) без летального исхода [162]. Другие исследователи [163] при заражении мышей BALB/c и C57BL/6 (6–7-недельных) и/н способом, показали отсутствие признаков болезни при использовании з/афр штамма ВОО и их наличие (взъерошенность шерсти, снижение массы тела) без летального эффекта при использовании ц/афр штамма. Более выраженная симптоматика (отек стопы, хромота, взъерошенность шерсти, снижение массы тела) без гибели наблюдали у мышей BALB/c при инфицировании интраплантарно ц/афр штаммом, чем з/афр (отек стопы и хромота). При

этом оба штамма ВОО вызывали у мышей C57BL/6 сходные клинические признаки заболевания (отек стопы и хромота). Исследования, проведенные другими авторами на 4-недельных мышках SCID при заражении штаммом USA-2003-044 или ц/афр Congo-2003-358 в дозе 10^5 БОЕ, показали наличие 100 %-го летального эффекта у этих животных с предшествующей ему симптоматикой (взъерошенность шерсти и анорексия) [162]. В экспериментах с использованием мышей BALB/c (7-недельных), которых заражали и/н другим ц/афр штаммом Z79-I-005 ВОО дозами 10^2 – 10^7 БОЕ, при отсутствии их гибели наблюдали выгибание спины, взъерошенность шерсти, а также снижение массы тела [90]. При и/н заражении ц/афр штаммом ZAI-79 ВОО 4–8-недельные мыши C57BL/6 stat1-/- (в 100 % случаев при дозе 4700 БОЕ), 129 stat1-/- (в 40 % случаев при дозе 4700 БОЕ) и SCID (в 100 % случаев при дозе 275 БОЕ) демонстрировали снижение массы тела и гибель [92]. При этом были оценены величины LD_{50} вируса для самцов и самок мышей C57BL/6 stat1-/- (47 и 213 БОЕ соответственно). При и/н заражении тем же штаммом вируса в дозе 2×10^4 БОЕ 5–11-недельных мышей PERA/EiJ и MOLF/EiJ некоторые исследователи наблюдали у 40 и 75 % животных соответственно снижение массы тела и летальный эффект [90]. При тех же условиях 5–6-недельные иммунодефицитные мыши CAST/EiJ проявляли более богатую симптоматику заболевания (выгибание спины, взъерошенность шерсти, снижение подвижности и массы тела), а также гибель в 100 % случаев [185]. При этом была оценена величина LD_{50} штамма Z79-I-005 ВОО, которая составила 680 БОЕ. При той же клинической картине болезни 9 - 11-недельные мыши этой линии оказались более чувствительными к вирусу при внутрибрюшинном его введении ($LD_{50} = 14$ БОЕ). В то же время значение LD_{50} з/афр штамма ВОО (USA-2003-044) при и/н заражении мышей CAST/EiJ (5–9-недельных) было существенно выше: 7600 БОЕ [90]. Результаты эпизоотического исследования, проведенные в Африке, также показали существование возможности инфицирования ВОО другой разновидности мышей (крошечная жирная мышь - *Steatomys parvus*) [335].

Данные по разным видам крыс. И/н, скарификационное и внутривенное инфицирование взрослых лабораторных белых крыс з/афр штаммом ВОО (Copenhagen), доза не указана, не приводило к появлению каких-либо признаков болезни [301]. При этом у 1–3-дневных крыс после и/н заражения наблюдались адинамия и 100 %-й летальный эффект. Взрослые хлопковые крысы (*Sigmodon hispidus*), инфицированные и/н или внутривенно тем же штаммом вируса в дозе 10^5 ООЕ демонстрировали гибелью в 50 или 100

% случаев соответственно с предшествующей клинической симптоматикой (цианоза, ринита, конъюнктивита и прогрессивного истощения) [303]. 66 % гамбийских сумчатых крыс (*Cricetomys gambianus*) массой 950–1150 г, зараженных внутрикожно в дозе 10^6 БОЕ ц/афр штаммом ВОО (ROC 2003–358), в геном которого встроен ген люцеферазы, проявляло некоторые клинические признаки оспоподобного заболевания: повреждения на коже, везикулярная сыпь на языке и локальные некротические изменения на деснах, поражение глаз, адинамия, анорексия, потеря веса [224]. И/н же введение данного вирусного материала животным этого вида не приводило к какой-либо внешне выраженной симптоматике. В литературе имеется также информация без указания каких-либо подробностей о возможности внутрибрюшинного и и/н инфицирования штаммом Copenhagen ВОО многососковых крысах (*Mastomys natalensis*), которых многие считают мышами [303].

Данные по морским свинкам. Заражение з/афр штаммом ВОО (Copenhagen), доза не указана, 1-месячных морских свинок и/н, внутрисердечным, пероральным или интраплантарным способами не сопровождалось сколько-нибудь значимыми признаками заболевания [301]. Тем не менее, некоторые ученые при интраплантарном инфицировании животных этого вида (возраст не указан) тем же штаммом вируса (доза не указана) отмечали небольшой отек соответствующей конечности морских свинок [398].

Данные по хомякам. И/н, пероральное, внутрисердечное и скарификационное введение з/афр штамма ВОО (Copenhagen) в дозах 1×10^6 – $5,9 \times 10^7$ ООЕ 3-недельным хомякам не вызывало каких-либо клинических проявлений заболевания [6, 301].

Данные по кроликам. Все исследования на кроликах были выполнены учеными с использованием з/афр штамма Copenhagen ВОО. При этом 2-недельных животных инфицировали вирусом (доза не указана) внутрикожно, скарификационно или интрацеребрально, наблюдая лишь в последнем случае некоторую менингоэнцефалитную симптоматику [100, 226]. В то же время внутривенное введение вируса в дозе 10^7 ООЕ взрослым кроликам приводило к появлению сыпи и 8 %-й гибели [301]. Скарификационное или внутрикожное заражение животных дозой 10^6 ООЕ сопровождалось при отсутствии у них гибели в первом случае образованием пустулы на месте введения и сыпью, а во втором – появлением инфильтрата в месте инокуляции. Не было отмечено внешних признаков заболевания у взрослых кроликов, инфицированных перорально вирусом в дозе $1,4 \times 10^9$ ООЕ. При и/н или пероральном введении патогена в дозе 10^6 ООЕ 10-дневным

животным наблюдали снижение подвижности, массы тела и гибель в 83 % случаев или сыпозные проявления и гибель в 85 % случаев соответственно.

Данные по низшим и человекообразным приматам. Из числа обезьян в экспериментальных работах с ВОО использовали только два их вида: *Macaca cynomolgus* и *mulatta*, относящихся к низшим приматам. Первые исследования, проведенные на 1–3-годовалых *Macaca cynomolgus* при аэрозольном инфицировании вирусом (штамм не указан) в дозе 6×10^5 – 9×10^5 ООЕ продемонстрировали появление сыпи и анорексии у этих животных, а также 50 %-й летальный эффект [241]. Заражая тем же методом взрослых приматов этого вида дозами $1,0 \times 10^4$ – $1,4 \times 10^5$ БОЕ ц/афр штамма ВОО (V79-I-005), некоторым ученым удалось зарегистрировать более богатую клиническую симптоматику заболевания (лихорадка, сыпь, выделения из носа, кашель и анорексия) [424]. При тех же условиях проведения экспериментов другие исследователи обнаружили у обезьян сыпь, лимфаденопатию, гипертермию тела, адинамию, анорексию, снижение массы тела и летальный эффект в 66, 66, 82 или 66 % случаев при заражении дозами 4×10^4 , 1×10^5 , 4×10^5 или 1×10^6 БОЕ соответственно [210]. Используя 2,5–10,1-килограммовых *Macaca cynomolgus* (6 особей), ряду авторов удалось определить значение LD_{50} для штамма V79-I-005 ВОО, которая соответствовала $7,8 \times 10^4$ БОЕ [280]. Сравнивая ц/афр штамм Zaire-79 ВОО и з/афр СОР-58 по вирулентности для взрослых *Macaca cynomolgus* при аэрозольном инфицировании близкими дозами, немного превышающими 10^4 БОЕ, ряд исследователей обнаружил 100 %-ю гибель в первом случае и ее отсутствие во втором [454]. В то же время первый штамм в дозе 90 или 50000 БОЕ вызвал соответственно у 2 из 3 экзантему, энантему, кашель и депрессивное состояние или у 3 из 3 животных еще и гибель, а второй в дозе 110 или 20000 БОЕ только в последнем случае вызывал у 3 из 3 животных позднюю энантему. Моделируя аэрозольный механизм заражения людей, ряд исследователей инфицировал интратрахеально взрослых приматов этого вида ц/афр штаммом Zaire ВОО в дозах $3,42 \times 10^6$; $8,37 \times 10^6$ или $3,53 \times 10^7$ БОЕ. При этом во всех случаях у животных наблюдали сыпь, лимфаденопатию и лихорадку, но лишь последние 2 дозы вызывали летальный эффект в 66 % случаев [96]. При интрабронхиальном заражении *Macaca cynomolgus* регистрировали сыпь, лихорадку, кашель и затрудненное дыхание, а также гибель 0, 17 или 66 % животных при дозе 5×10^4 , 5×10^5 или 5×10^6 БОЕ штамма Zaire-79 соответственно [155]. При этом внутривенное введение этого штамма вызывало сыпь и лихорадку и эффект гибели у 0, 17 или 83 % животных при дозе 5×10^4 –

5×10^5 , 5×10^5 и 5×10^5 БОЕ соответственно. Ц/афр штамм Zr-599 при и/н и п/к способах введения взрослым *Macaca cynomolgus* в одной дозе (10^6 БОЕ) в первом случае давал только некоторые внешние признаки заболевания (сыпь и анорексия), а во втором – дополнительно диарею и летальный эффект в 75 % случаев [454]. И/н и п/к заражение *Macaca cynomolgus* з/афр штаммом Liberia BOO в дозе 10^6 БОЕ в первом случае не приводило к их гибели, а во втором вызывало смертельный исход у 33 % приматов. Клиническая картина заболевания в обоих случаях была сходной: сыпь, анорексия и диарея [453].

В экспериментах с использованием 5–9-годовалых *Macaca mulatta* и мутантного варианта ц/афр штамма BOO (V79-I-005), который вводили интрабронхиально, ряд ученых наблюдал у этих животных сыпь, гипертермию тела, кашель, затруднение дыхания, снижение массы тела, а также летальный эффект в 13, 100 или 100 % случаев при дозе вируса 2×10^5 , 10^6 или 10^7 БОЕ соответственно [172]. Внутривенное инфицирование ц/афр штаммом Zaire-79 BOO 3,8–8,4-килограммовых приматов этого вида приводило к появлению у них: обычной сыпи (5–100 оспин) в 100 % случаев и гипертермии тела в 50 % случаев без гибели при использовании дозы 5×10^6 БОЕ; дополнительно геморрагической сыпи в 33 % случаев (более 100 оспин) и гипертермии тела со 100 %-й гибелью при использовании дозы 2×10^7 БОЕ; продромальной сыпи, нарушению свертываемости крови, гипертермии тела в 50 % случаев с 100 %-й гибелью при использовании дозы 5×10^8 БОЕ [388]. При тех же условиях проведения экспериментов, но используя дозу заражения вирусом $1,5 \times 10^7$ и $8,5 \times 10^7$ БОЕ, другие исследователи обнаружили соответственно 80 и 66 %-ю гибель животных [349].

В доступной нам научной литературе отсутствуют информация по экспериментальному изучению чувствительности к BOO других видов низших и человекообразных приматов. Тем не менее, некоторое представление по этому вопросу можно получить при анализе нескольких подтвержденных эпизоотических вспышек оспы обезьян у приматов, произошедших за последние полвека. В зоопарке г. Роттердам (Нидерланды) заболели десять орангутангов (*Pongo pygmaeus*), шесть из которых погибло, при этом у пяти наблюдались сыпозные проявления [347]. В этот период времени наблюдали следующее:

- два случая генерализованной сыпи у горилл (*Gorilla gorilla*) без их гибели, хотя одно животное имело тяжелое заболевание;

- сыпозные элементы на лице и губах у шимпанзе (*Pan troglodytes*) без других признаков заболевания;
- гибель одного гиббона (*Hylobates lar*) после тяжелой болезни;
- отек глаз и носа у обезьян (*Callithrix sp.*), одна из которых умерла,
- гибель трех обыкновенных беличьих обезьян (*Saimiri sciureus*), имеющих сыпозные проявления;
- высыпания на губах у совиновидной мартышки (*Cercopithecus hamlyni*).

Во время данной вспышки оспы обезьян не было каких-либо признаков заболевания у других видов приматов: *Oedipoides oedipus*, *Ateles paniscus*, *Ateles geoffreyi*, *Ateles fusiceps*, *Symphalangus syndactylus*, *Cebus capucinus*, *Cercopithecus mona* и *Cercopithecus lhoesti*. Тогда как филиппинские макаки (*Macaca philippinensis*) индийские и малазийские лангуры (*Presbytis*) и свинохвостые макаки (*Macaca nemestrina*) демонстрировали клиническую картину заболевания во время эпизоотии оспы обезьян среди них в США [103, 223]. У зеленых мартышек (*Cercopithecus aethiops*), заболевание протекало в инapparантной форме [223]. Недавно в Кот-д'Ивуар был обнаружен умерший от оспы обезьян дымчатый мангабей (*Cercocebus atys*), на теле которого наблюдали темно-красные корочки 5–7 мм в диаметре, частично слившиеся на конечностях и разрозненные на животе при отсутствии таких повреждений на коже спины [221].

Данные по луговым собачкам. В первых экспериментах с использованием взрослых луговых собачек (*Cynomys ludovicianus*) было проведено и/н или внутрибрюшинное их заражение з/афр штаммом BOO (USA-2003-044) в дозе $10^{5,1}$ БОЕ [213]. При этом наблюдали более богатую симптоматику заболевания (сыпь, анорексия, адинамия, выделения из носа и гибель у 60 % животных) после инфицирования первым способом, чем вторым (анорексия, адинамия и гибель у 100 % луговых собачек). В сравнительных исследованиях по и/н введению животным того же штамма BOO или ц/афр Congo-2003-358 в одной дозе $10^{4,5}$ БОЕ были зарегистрированы соответственно сыпь и выделения из носа с кровью без летального исхода или сыпь, выделения из носа, лихорадка, снижение массы тела и с последующей гибелью 25 % животных [101]. Скарификационное введение животным вируса в той же дозе приводило к появлению сыпи и кровавистых выделений из носа у луговых собачек без летального исхода при инфицировании BOO (штамм USA-2003-044), а также к появлению сыпи, лихорадки и диареи с 50 %-м летальным исходом при инфицировании штаммом Congo-2003-358. Используя эти два

штамма, ряд исследователей провел оценку величин их LD_{50} для взрослых луговых собачек, которые составили $1,29 \times 10^5$ БОЕ для з/афр штамма и $5,9 \times 10^3$ БОЕ для ц/афр, а также дополнительно обнаружил у заболевших животных лимфаденопатию [182].

Данные по белкам. При и/н, пероральном или скарификационном заражении взрослых белок (*Sciurus vulgaris*) ц/афр штаммом Z-249 ВОО в дозе 10^6 ООЕ наблюдали лихорадку, ринорею и кашель у этих животных и последующую 100 %-ю гибель [302]. При исследовании чувствительности к этому же штамму белок шести видов (*Funisciurus congicus*, *anerythrus*, *lemniscatus*, *pyrrhopus*; *Protoxerus stangeri*; *Heliosciurus gambianus*), которых заражали и/н, регистрировали адинамию, нерегулярный конъюнктивит, анорексию и кашель, а также только у *Funisciurus congicus* нерегулярную сыпь [71]. Процент летальности у этих животных составлял 30, 50, 70, 25 и 100 после инфицирования вирусом в дозе 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 и 10^5 ООЕ соответственно. При пероральном введении вирусного материала белкам этих видов наблюдали аналогичную клиническую картину заболевания, но с летальностью 50, 50 или 0 % для дозы 10^3 , 10^4 или 10^5 ООЕ соответственно. У белок на месте скарификационного инфицирования ВОО дозой 10^5 ООЕ были выявлены красные папулы, при этом заболевание сопровождалось 50 %-м летальным эффектом.

Данные по сусликам. И/н инфицирование взрослых сусликов (*Spermophilus tridecemlineatus*) з/афр штаммом ВОО (USA-2003-044) в дозе $10^{5,1}$ БОЕ вызывало у них анорексию, адинамию и гибель в 100 % случаев [211]. В экспериментах при п/к заражении тем же штаммом ВОО или ц/афр Zair-79 в одной дозе 100 БОЕ ряд ученых наблюдал сходную симптоматику заболевания у сусликов (анорексия, адинамия и носовое кровотечение) и всегда их гибель [156]. Этим же исследователям удалось определить при п/к инфицировании сусликов величины LD_{50} как ц/афр, так и з/афр штаммов ВОО, которые составили соответственно 0,35 и 0,46 БОЕ.

Данные по африканским соням. Единственная группа ученых провела исследования с использованием африканских сонь (*Graphiurus kelleni*), которых заражали интраплантарно или и/н ц/афр штаммом ВОО (ZAI-79) в дозе $1,4 \times 10^4$ или 0,2–2000 БОЕ соответственно [209]. При этом в первом случае наблюдали гибель 92 % взрослых животных, а во втором была определена LD_{50} вируса, которая составила для сонь 12 БОЕ. Перед смертью у животных регистрировали взъерошенность шерсти и конъюнктивит.

Данные по другим видам животных. В дополнение к проведенным экспериментальным исследованиям с использованием вышеперечисленных животных ранее и в последнее время ряд ученых обнаружил признаки оспы обезьян или некоторые ее серологические маркеры у антилопы, гигантского муравьеда (*Myrmecophaga tridactyla*), лесного сурка (*Marmota monax*), южного опоссума (*Didelphis marsupialis*), тушканчика (*Jaculus spp.*) и карликового ежика (*Atelerix spp.*), что может указывать на возможность их инфицирования ВОО [71, 226, 319].

Проведенный анализ сведений из научных источников по вопросу чувствительности некоторых видов подопытных животных в отношении ВОО при разных способах заражения, свидетельствует о том, что большинство ученых пыталось провести исследования в данном направлении, ориентируясь в основном на воспроизведение животными в максимально возможном диапазоне внешней клинической симптоматики оспы обезьян у человека, включая гибель. Особого внимания заслуживают работы, связанные с изучением заболевания у животных, при инфицировании которых применяли методы, сориентированные на введение ВОО в дыхательный тракт, что реально напоминает основные механизмы заражения человека при эпидемических вспышках оспы обезьян (аэрозольный и контактный). В этом плане виды испытанных животных можно сгруппировать следующим образом:

- (1-я группа) животные, воспроизводящие при заражении через респираторный тракт основные внешние проявления оспы обезьян у людей (сыпь и лимфаденит), к которым относятся низшие приматы (*Macaca cynomolgus* и *mulatta*), луговые собачки и белки (*Funisciurus congicus*);

- (2-я группа) животные, воспроизводящие при заражении через респираторный тракт некоторые не основные проявления оспы обезьян у людей (конъюнктивит, выделение из носа, адинамия, снижение массы тела и гибель), к которым относятся аутбредные мыши, 6–7-недельные мыши BALB/c и C57BL/6, иммунодефицитные мыши C57BL/6 *stat1*^{-/-}, 129 *stat1*^{-/-} и SCID (4–8-недельные), CAST/EiJ (5–9-недельные) и MOLF/EiJ (5–11-недельные), взрослые крысы, кролики (10-дневные), суслики и африканские сони;

- (3-я группа) животные, не воспроизводящие при заражении через респираторный тракт каких-либо проявлений оспы обезьян у людей, к которым относятся морские свинки, хомяки и гамбийские сумчатые крысы.

Если рассматривать первую группу животных, которая максимально моделирует оспоподобное заболевание, то сравнить их по чувствительности к ц/афр штамму ВОО сложно. С одной стороны, проведено определение величин LD_{50} для *Macaca cynomolgus* [280] и луговых собачек [182] при респираторном заражении этим вирусом ($7,8 \times 10^4$ и $5,9 \times 10^3$ БОЕ соответственно). С другой стороны, сопоставить эти значения трудно, так как при проведении таких исследований были взяты различные штаммы ВОО (Congo-2003-358 и V79-I-005) и способы инфицирования (и/н и аэрозольный). При этом также наблюдали слабо выраженную зависимость величины летальности от дозы заражения луговых собачек [182, 187, 200] и приматов с учетом данных, полученных другими исследователями [96, 210, 453]. Кроме того, значение данного показателя для приматов была определена в экспериментах, в которых исследованию подвергали незначительное число животных (всего 6 особей). Тем не менее, чувствительность к исследуемому патогену у луговых собачек по показателю летальности выше в 10 раз, чем у приматов. Причем ц/афр штамм проявлял существенно более высокую вирулентность для луговых собачек после и/н заражения (в ~ 30 раз), чем з/афр ($LD_{50} = 1,29 \times 10^5$ БОЕ). Говоря о белках, то величина данного показателя для них не была определена вообще.

В научной литературе есть значительный объем информации, относящийся к изучению активности создаваемых лечебно-профилактических и профилактических лекарственных средств от оспы обезьян в экспериментах на *Macaca cynomolgus* и *mulatta* (п. 1.5). При этом приводятся результаты воздействия вируса при интратрахеальном, аэрозольном, и/н и внутривенном инфицировании данных животных. В одной из этих статей был указан показатель чувствительности *Macaca cynomolgus* при внутривенном заражении ц/афр штаммом ВОО: $LD_{50} = 5 \times 10^6$ БОЕ [363].

Важно отметить также отсутствие данных о величине ID_{50} ВОО при респираторном введении в отношении животных 1-й группы, но по имеющимся экспериментальным данным [182] можно оценить величину такого показателя в отношении луговых собачек при и/н инфицировании для ц/афр и з/афр штаммов ВОО (соответственно 10^3 и $10^{2,9}$ БОЕ). Некоторые исследователи [401] приводят величину этого показателя для *Macaca cynomolgus* при внутримышечном (в/м) заражении з/афр штаммом ($1,5 \lg$ БОЕ), которая в 10 раз ниже, рассчитанной нами для луговых собачек после и/н инфицирования. Причем существенно большей чувствительностью к этому патогену обладал данный вид обезьян по сравнению с *Macaca mulatta* [315].

Обобщая результаты исследований с использованием ВОО на животных 1-й группы, необходимо указать следующее: если появление болезни у луговых собачек при инъекционном введении патогена сопровождалось летальным эффектом, который зависел от величины вводимой дозы вируса, то у приматов гибель была в основном спорадической и слабо зависела от дозы заражения; при респираторном инфицировании процент гибели приматов и луговых собачек слабо коррелировал с величиной вводимой дозы вируса.

Среди животных, отнесенных ко 2-й группе, самыми чувствительными (по летальному эффекту) к ц/афр штамму ВОО при респираторном введении оказались африканские сони ($LD_{50} = 12$ БОЕ) [209], затем иммунодефицитные мыши C57BL/6 stat1^{-/-} ($LD_{50} = 213$ БОЕ для самок и 47 БОЕ для самцов), а также CAST/EiJ ($LD_{50} = 680$ БОЕ) [92, 185]. В то же время у п/к инфицированных сусликов величина данного показателя составила 0,35 БОЕ, а у внутрибрюшинно зараженных мышей CAST/EiJ - 14 БОЕ [92, 156]. Оценку же значений ID_{50} ВОО для животных этой группы не делали.

В научной литературе нет сведений, касающихся оценки чувствительности разных видов животных и человека в отношении ВОО и ВНО на основе данных, полученных при заражении их первичных клеток. В то же время имеется противоречивая информация о взаимодействии с такими клетками некоторых представителей ортопоксвирусов. В экспериментах с использованием дермальных фибробластов человека [282] была продемонстрирована способность ВОО к размножению. Применяя перитонеальные макрофаги вакцинированных и интактных мышей и кроликов, а также ВВ, ряд исследователей [81, 118, 230, 287, 296] наблюдал существенное снижение или отсутствие размножения вируса этими клетками, полученными от вакцинированных животных (на поздней стадии блокирование инфекционного процесса), по сравнению с его размножением в аналогичных клетках интактных животных. Другие ученые [326] получили результат, указывающий на отсутствие полного цикла репродукции вируса в мышинных перитонеальных макрофагах (на ранней стадии abortивное течение инфекции) с апоптозом этих клеток.

При проведении опытов с ВВ на культуре клеток моноцитов-макрофагов мышей (линия клеток J774.G8) также было обнаружено abortивное течение инфекционного процесса, причем блокирование его также наступало на ранней стадии [441]. В то же время в других работах [169, 287] был зарегистрирован факт размножения ВВ и вируса

эктомелии в аналогичных мышинных клетках, в том числе моноцитах-макрофагах RAW 264.7 (TIB-71). В процессе выполнения таких же работ с ВВ на макрофаг-подобных клетках человека (зрелые и незрелые дендритные клетки и моноциты-макрофаги), приготовленных из крови, не было обнаружено его размножение, при этом инфекционный процесс имел абортный характер и блокировался на ранней стадии [176, 216, 266, 350, 443, 445]. Тем не менее, этот вирус репродуцировался в моноцитах-макрофагах, приготовленных путем культивирования человеческих моноцитов крови в присутствии рекомбинантных гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и макрофагального колониестимулирующего фактора (М-КСФ) [353].

С целью оценки эффективности создаваемых противооспенных химиопрепаратов ряд ученых [83, 84, 85, 97] наблюдал размножение некоторых ортопоксвирусов (ВВ, вирусы оспы коров и оспы верблюдов) и в других типах первичных клеток человека (кератиноцитах, приготовленных из крайней плоти плода в монослое и в органотипической культуре на плоте). Продукцию ВВ так же наблюдали не только в человеческих кератиноцитах, но и в дермальных фибробластах и эндотелиальных клетках кровеносных капилляров. В человеческих клетках Лангерганса, Т-клетках и дермальных дендритных регистрировали абортное течение инфекционного процесса на ранней стадии [442]. В опытах с использованием клеток легких мышей (LA-4), обладающих свойствами пневмоцитов 2-го порядка, отмечалось активное размножение ВВ [321], при этом такой процесс резко ингибировался в присутствии МН-S клеток, полученных трансформацией альвеолярных макрофагов мышей Balb/c вирусом SV40.

Таким образом, информация, взятая из научной литературы по вопросу чувствительности разных видов исследованных животных к ВОО, свидетельствовала о том, что большинство ученых ориентировалось в направлении поиска для оспы обезьян модельных видов животных лишь на воспроизведение внешней клинической картины этого заболевания в прямых экспериментах (*in vivo*). Имеется также (часто противоречивая) информация о размножении некоторых ортопоксвирусов *in vitro* в отдельных типах первичных клеток человека и животных. Дальнейшему подробному изучению и последующему применению в качестве моделей для оценки эффективности создаваемых противооспенных химиопрепаратов были подвергнуты только шесть видов животных: луговые собачки, нечеловекообразные приматы (*Macaca cynomolgus* и *mulatta*), иммунодефицитные мыши (C57BL/6 *stat1*^{-/-}, CAST/EiJ), африканские сони и суслики.

1.2.2 Чувствительность человека и мышей и их первичных клеточных культур к вирусу гриппа птиц

Если в отношении сезонного ВГ (к которому в настоящее время относят и ВГ А/Н1N1pdm09 [329]) для человека известна ID₅₀ (от -0,3 до 0,5 lg ТЦД₅₀ – 50 %-я тканевая цитопатогенная доза), оцененная по внешним клиническим признакам заболевания при экспериментальном инфицировании мелким аэрозолем [255] и, вероятно, в 100 раз большая ID₅₀ при инфицировании через верхние отделы дыхательного тракта [154, 204, 446], то в отношении в/пат ВГП А/Н5N1 (по результатам полученной величины IVPI при внутривенном тестировании на курах), обладающего высокой летальной активностью для более 40 видов птиц, включая домашнюю (куры, индюки и страусы), а также регулярно вызывающего заболевание у людей часто со смертельным исходом (~60 % случаев), подобной информации нет. Причем, если в настоящее время природные изоляты в/пат ВГП А/Н5N1 адаптированы к рецепторам СА с α -2,3 связью к галактозе, которые в основном отсутствуют в верхнем отделе дыхательного тракта человека и в трахее, а также присутствуют преимущественно на слизистых конъюнктив глаз, миндалин, бронхах, бронхиолах, пневмоцитах 2-го порядка и альвеолярных макрофагах, то сезонный ВГ, включая ВГ А/Н1N1pdm09, легко взаимодействует с рецепторами СА с α -2,6 связью к галактозе, которые находятся в нереснитчатых клетках как верхнего, так и нижнего отделов дыхательного тракта человека (нос, трахея, бронхи и альвеолярные макрофаги) [252, 279, 382, 434]. Тем не менее, некоторые ученые все-таки отмечали репликацию ВГП А/Н5N1 в трахее и органах верхнего отдела респираторного тракта человека [99, 222, 236].

Сезонный грипп сопровождался, как правило, клинической картиной поражения только респираторного тракта человека (часто - кашель, одышка, заложенность носа и боли в горле; реже – лихорадка, головные боли, слабость и анорексия [126]), грипп, вызванный ВГ А/Н1N1pdm09, кроме указанных проявлений, в 10 – 40 % случаев инициировал расстройства желудочно-кишечного тракта (тошнота, рвота, понос) и крайне редко – признаки острого респираторного дистресс-синдрома и синдрома полиорганной недостаточности, связанные с глубоким поражением легких, почек, печени, селезенки, сердца и головного мозга [194, 219, 395]. Грипп, вызванный в/пат ВГП А/Н5N1, в 70 – 100 % случаев сопровождался лихорадкой, одышкой и кашлем на фоне пневмонии, а

также в 10 – 50 % случаев – заложенностью носа, признаками конъюнктивита, болью в горле и мышцах, тошнотой, рвотой, поносом, головными болями, помутнением сознания, судорогами (дополнительно признаки острого респираторного дистресс-синдрома и синдрома полиорганной недостаточности) [145, 149, 437]. Тяжесть пневмоний, вызванных ВГ А/Н1N1pdm09 занимала промежуточное положение между сезонным гриппом и гриппом, вызванным в/пат ВГП А/Н5N1 [383]. В отличие от сезонного гриппа, при котором около 90 % тяжелых случаев заболевания, наблюдалось у пожилых людей, во время пандемии гриппа 2009 г. такие случаи в основном регистрировали среди детей и взрослых моложе 60 лет (около 69 – 90 % смертей), тогда как при обычном сезонном гриппе на их долю приходится около 17 % [229, 271]. Эта ситуация с гриппом 2009 г. в части, касающейся увеличения доли встречаемости тяжелых случаев заболевания среди детей из общего числа таких случаев для всех возрастных групп людей, была похожа на те, которые отмечались во время эпидемической вспышки 2003 г. и пандемии 1918 г., вызванными в/пат ВГП А/Н5N1 и ВГ А/Н1N1 соответственно [119, 386].

Многие ученые проводили оценку чувствительности к различным штаммам в/пат ВГП А/Н5N1 разных видов лабораторных, домашних и диких животных и птиц с целью выбора моделей для оценки эффективности создаваемых лечебно-профилактических противогриппозных препаратов для людей [240, 304, 423], беря во внимание то, что птицы, лошади, собаки, кошки, мыши и обезьяны имеют рецепторы СА с α -2,3 связью к галактозе в верхнем отделе респираторного тракта, тогда как свиньи, хорьки и морские свинки (как и человек) – преимущественно рецепторы СА с α -2,6 связью [278, 365, 434]. Тем не менее, для оценки эффективности противогриппозных препаратов для человека в основном были использованы мыши, хорьки, крысы, включая хлопковых, морские свинки, хомяки, свиньи, кошки, собаки и приматы (*Saimiri sciureus*, *Macaca rhesus* и *synomolgus*). Учитывая то, что из всех перечисленных видов подопытных животных наиболее дешевым, доступным и удобным для экспериментальных исследований является мышь, более подробно остановимся на имеющейся в научной литературе информации о чувствительности к в/пат ВГП А/Н5N1 именно этого вида модельного животного. Если для получения на мышах высокой летальной активности ВГ А/Н1N1pdm09 требуется проведение его адаптации (путем пассирования на легких животных или осуществления сайт-направленного мутагенеза [86, 323, 327, 447]), то подавляющее большинство штаммов в/пат ВГП А/Н5N1 изначально обладало этим свойством. В этой связи некото-

рые ученые при работе с ВГ А/Н1N1pdm09 вынуждены были применять другой метод регистрации инфекционного процесса у мышей (по выявлению вируса в легких), при этом была отмечена очень высокая чувствительность мышей Balb/c ($ID_{50} = 0,5-1,5 \lg$ БОЕ) к трем разным штаммам данного вируса [430].

Некоторые наиболее значимые результаты исследования вирулентных свойств (по летальной активности) и инфекционных (по наличию вируса в легких) различных штаммов ВГП А/Н5N1 при и/н введении мышам разных линий приведены в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Некоторые данные по вирулентности и инфекционности различных штаммов высокопатогенного вируса гриппа птиц (в/пат ВГП) А/Н5N1 и вируса гриппа (ВГ) А/Н1N1pdm09 при интраназальном введении мышам разных линий

Номер источника	Вид линий мышей (возраст)	Наименование штаммов и вирусов	LD_{50} (ID_{50})
312	BALB/c (6–8 недель)	A/Hong Kong/483/97 ² в/пат ВГП А/Н5N1	2,4 lg ЭИД ₅₀
		A/Hong Kong/514/97 ² в/пат ВГП А/Н5N1	< 1,5 lg ЭИД ₅₀
		A/Hong Kong/516/97 ² в/пат ВГП А/Н5N1	< 1,5 lg ЭИД ₅₀
		A/Hong Kong/156/97 ² в/пат ВГП А/Н5N1	5,9 lg ЭИД ₅₀
		A/Hong Kong/97/98 ² в/пат ВГП А/Н5N1	> 6,5 lg ЭИД ₅₀
		A/Hong Kong/485/97 ³ в/пат ВГП А/Н5N1	2,9 lg ЭИД ₅₀
		A/Hong Kong/542/97 ³ в/пат ВГП А/Н5N1	< 1,5 lg ЭИД ₅₀
		A/Hong Kong/481/97 ⁴ в/пат ВГП А/Н5N1	1,7 lg ЭИД ₅₀
		A/Hong Kong/491/97 ⁴ в/пат ВГП А/Н5N1	2,0 lg ЭИД ₅₀
		A/Hong Kong/503/97 ⁴ в/пат ВГП А/Н5N1	2,0 lg ЭИД ₅₀
		A/Hong Kong/532/97 ⁴ в/пат ВГП А/Н5N1	< 1,5 lg ЭИД ₅₀
		A/Hong Kong/486/97 ⁴ в/пат ВГП А/Н5N1	> 6,5 lg ЭИД ₅₀
		A/Hong Kong/488/97 ⁴ в/пат ВГП А/Н5N1	> 6,5 lg ЭИД ₅₀
		A/Hong Kong/507/97 ⁴ в/пат ВГП А/Н5N1	> 6,5 lg ЭИД ₅₀
		A/Hong Kong/538/97 ⁴ в/пат ВГП А/Н5N1	> 6,5 lg ЭИД ₅₀
123	BALB/c (6 недель)	A/Hong Kong/156/97 ¹ в/пат ВГП А/Н5N1	0,6 БОЕ
		A/Hong Kong/483/97 ² в/пат ВГП А/Н5N1	0,3 БОЕ
		A/Hong Kong/485/97 ³ в/пат ВГП А/Н5N1	1,1 БОЕ
		A/Hong Kong/491/97 ¹ в/пат ВГП А/Н5N1	11,0 БОЕ
		A/Hong Kong/514/97 ¹ в/пат ВГП А/Н5N1	1,0 БОЕ
		A/Hong Kong/516/97 ² в/пат ВГП А/Н5N1	5,6 БОЕ
		A/Hong Kong/481/97 ¹ в/пат ВГП А/Н5N1	$6,0 \times 10^3$ БОЕ
		A/Hong Kong/482/97 ¹ в/пат ВГП А/Н5N1	$9,3 \times 10^3$ БОЕ
		A/Hong Kong/486/97 ⁴ в/пат ВГП А/Н5N1	$> 6,0 \times 10^4$ БОЕ
		A/Hong Kong/488/97 ¹ в/пат ВГП А/Н5N1	$4,2 \times 10^5$ БОЕ

Продолжение таблицы 1.1

Номер источника	Вид линий мышей (возраст)	Наименование штаммов и вирусов	LD ₅₀ (ID ₅₀)
91	BALB/c (6–8 недель)	A/Hong Kong/483/97 ² в/пат ВГП А/Н5N1	2,4 lg ЭИД ₅₀ (2,2 lg ЭИД ₅₀) ⁵
		A/Hong Kong/485/97 ³ в/пат ВГП А/Н5N1	2,9 lg ЭИД ₅₀ (1,1 lg ЭИД ₅₀) ⁵
		A/Hong Kong/156/97 ² в/пат ВГП А/Н5N1	5,9 lg ЭИД ₅₀ (3,2 lg ЭИД ₅₀) ⁵
		A/Hong Kong/486/97 ⁴ в/пат ВГП А/Н5N1	> 7 lg ЭИД ₅₀ (1,2 lg ЭИД ₅₀) ⁵
140	BALB/c (6–8 недель)	A/chicken/Korea/ES/03 в/пат ВГП А/Н5N1	> 7 lg ЭИД ₅₀ (2,8 lg ЭИД ₅₀) ⁵
237	DBA/2J	A/Hong Kong/213/03 ¹ в/пат ВГП А/Н5N1	1,3 lg ЭИД ₅₀
	BTBR T+tf/J		2,2 lg ЭИД ₅₀
	DBA/1J		2,2 lg ЭИД ₅₀
	NZB/BIN		2,9 lg ЭИД ₅₀
	LP/J		3,0 lg ЭИД ₅₀
	129/SvImJ		3,3 lg ЭИД ₅₀
	A/J		3,3 lg ЭИД ₅₀
	B10.D2/Hc0		3,5 lg ЭИД ₅₀
	C3H/HeJ		4,0 lg ЭИД ₅₀
	A/HeJ		4,1 lg ЭИД ₅₀
	KK/HIJ		4,2 lg ЭИД ₅₀
	FVB/NJ		4,9 lg ЭИД ₅₀
	NZW/acJ		5,0 lg ЭИД ₅₀
	MRL/MpJ		5,2 lg ЭИД ₅₀
	SM/J		5,3 lg ЭИД ₅₀
	AKR		5,4 lg ЭИД ₅₀
	C57BL/6		5,5 lg ЭИД ₅₀
	NOD/ShiLtJ		5,7 lg ЭИД ₅₀
177	C57BL/6j (н.у.)	A/Solomon Islands/3/06-like ¹ ВГ А/Н1N1	>6 lg БОЕ
		A/Hamburg/05/09 ¹ ВГ А/Н1N1pdm09	5,2 lg БОЕ
		A/Hamburg/NY1580/09 ¹ ВГ А/Н1N1pdm09	3,5 lg БОЕ
		A/Thailand/KAN-1/04 ² в/пат ВГП А/Н5N1	1,8 lg БОЕ
	BALB/c (н.у.)	A/Solomon Islands/3/06-like ¹ ВГ А/Н1N1	> 6 lg БОЕ
		A/Hamburg/05/09 ¹ ВГ А/Н1N1pdm09	> 6 lg БОЕ
		A/Hamburg/NY1580/09 ¹ ВГ А/Н1N1pdm09	> 6 lg БОЕ
		A/Thailand/KAN-1/04 ² в/пат ВГП А/Н5N1	0,3 lg БОЕ

Продолжение таблицы 1.1

Номер источника	Вид линий мышей (возраст)	Наименование штаммов и вирусов	LD ₅₀ (ID ₅₀)
430	BALB/c (н.у.)	A/California/04/09 ¹ ВГ А/Н1N1pdm09	> 6 lg БОЕ (1,5 lg БОЕ) ⁵
		A/Texas/15/2009 ¹ ВГ А/Н1N1pdm09	> 6 lg БОЕ (0,5 lg БОЕ) ⁵
		A/Mexico/4108/2009 ¹ ВГ А/Н1N1pdm09	> 6 lg БОЕ (1,5 lg БОЕ) ⁵
88	BALB/c (4 недели)	A/Beijing/501/09 ¹ ВГ А/Н1N1pdm09	3,3 lg ТЦД ₅₀
	BALB/c (6 месяцев)	A/Beijing/501/09 ¹ ВГ А/Н1N1pdm09	4,2 lg ТЦД ₅₀
	BALB/c (12 месяцев)	A/Beijing/501/09 ¹ ВГ А/Н1N1pdm09	4,5 lg ТЦД ₅₀
Примечания ¹ Штамм выделен от человека ² Штамм выделен от погибшего человека ³ Штамм выделен от человека с тяжелым течением заболевания ⁴ Штамм выделен от человека с легким течением заболевания ⁵ Величина определена по результатам регистрации вируса в легких мышей			

Что касается оценки чувствительности мышей к в/пат ВГП А/Н5N1 (таблица 1.1), то подобного рода исследований было проведено множество [91, 123, 212, 232, 245, 342]. При определении величины данного показателя ученые в основном использовали мышей BALB/c, ориентируясь на выявление летального эффекта именно у этой линии животных, мыши C57BL/6j оказались менее чувствительными к в/пат ВГП А/Н5N1 [177], хотя обе эти линии (среди 21-й испытанной) были более резистентными к штамму А/Hong Kong/213/03 в/пат ВГП А/Н5N1, чем, например, мыши DBA/2J [237]. Важно также отметить, что штаммы в/пат ВГП А/Н5N1 (на примере 15 штаммов), выделенные от людей, существенно различались по своей летальности для мышей BALB/c (LD₅₀ < 1,5 – > 6,5 lg ЭИД₅₀), которая также не зависела от степени тяжести заболевания у человека (легкое течение, тяжелое течение, гибель) [91, 312]. Тогда как по результатам регистрации наличия инфекционного процесса в легких мышей наблюдали существенно меньшее различие между исследованными штаммами (ID₅₀ от 1,1 до 3,2 ЭИД₅₀). Величины этих показателей не коррелировали с летальной активностью штаммов в отношении мышей, а также со степенью тяжести заболевания, которое они вызвали у человека.

Эти и другие данные позволяют разделить известные штаммы в/пат ВГП А/Н5N1 на три группы [312]:

- 1) высоковирулентные для мышей ($LD_{50} \leq 3 \lg \text{ БОЕ}$ или ЭИД₅₀);
- 2) средневирulentные для мышей ($LD_{50} > 3 - \leq 6,5 \lg \text{ БОЕ}$ или ЭИД₅₀);
- 3) низковирulentные для мышей ($LD_{50} > 6,5 \lg \text{ БОЕ}$ или ЭИД₅₀).

Из данных таблицы 1.1 видно, что все исследователи в своих экспериментах в основном ориентировались на оценку летального эффекта у линейных мышей при и/н инфицировании различными штаммами ВГ А/Н1N1pdm09, причем наибольшей чувствительностью в этом плане обладали мыши DBA/2j ($LD_{50} = 1,3 \lg \text{ ЭИД}_{50}$). В то же время, применяя другой метод регистрации инфекционного процесса у животных (по наличию вируса в легких), были определены более низкие значения ID₅₀ трех разных штаммам этого вируса для мышей Balb/c (0,5–1,5 lg БОЕ) по сравнению с LD₅₀ (> 6,0 lg БОЕ).

В научной литературе нет сведений, касающихся оценки чувствительности разных видов животных и человека к ВГ на основе результатов инфицирования их первичных клеток. Однако многие первичные клетки и ткани (особенно респираторного тракта) человека (кусочки носовых раковин, носоглотки, гортани, трахеи, а также клетки миндалин, трахеи, бронхов, альвеол, эндотелиоциты) и птиц (клетки трахеи, фибробласты и мышечные клетки) изучались с точки зрения возможности рецепторного взаимодействия с ВГ, включая ВГ А/Н1N1pdm09 и в/пат ВГП А/Н5N1, и его размножения в них [141, 159, 233, 274, 367, 382], продемонстрировав соответствующие эффекты, наблюдаемые в экспериментах *in vivo* на животных.

Крайне противоречивые сведения имеются в научной литературе в отношении возможности размножения ВГ А/Н1N1pdm09 и в/пат ВГП А/Н5N1 в альвеолярных макрофагах, моноцитах-макрофагах и дендритных клетках человека и мышей, имеющих рецепторы СА с α -2,3 и α -2,6 связями к галактозе [170, 416, 451]: одни ученые подтверждают эту возможность [235, 246, 276, 451], другие отмечают abortивное течение инфекции [80, 168, 250, 364, 374, 376, 415].

Таким образом, по данным научной литературы, из результатов прямых экспериментов по заражению добровольцев известна чувствительность человека по внешней клинической картине заболевания к ВГ, вызывающему сезонные эпидемии, ID₅₀ = (-0,3–0,5) ТЦД₅₀. Проведена также оценка вирулентных свойств различных штаммов ВГП А/Н5N1 для разных линий мышей по летальной и инфицирующей активности. При этом

мыши в общем виде обладали существенно меньшей чувствительностью (с точки зрения получения летального эффекта) к штаммам ВГ А/Н1N1pdm09, нежели к штаммам в/пат ВГП А/Н5N1. В то же время при оценке наличия инфекционного процесса в легких этих животных выявлена крайне высокая их чувствительность к штаммам ВГ А/Н1N1pdm09, близкая к таковой для человека в отношении сезонного ВГ. В экспериментах с использованием первичных клеток и тканей человека (полученных в основном из органов респираторного тракта) и птиц продемонстрирована их способность апплицировать и размножать многие ВГ, включая субтипы А/Н1N1pdm09 и А/Н5N1.

1.3 Распространение вируса оспы обезьян и высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5N1 в организме человека и подопытных животных

1.3.1 Накопление вируса оспы обезьян в органах и тканях человека и животных

Вопросу, связанному с исследованием динамики накопления ВОО в организме экспериментально инфицированных видов животных (мыши, сони, суслика, луговой собачки, гамбийской сумчатой крысы и низших приматов), посвящено много научных публикаций, по которым обобщенные результаты исследований представлены ниже.

Данные по линейным мышам. При и/н заражении ц/афр штаммом ВОО (Z79-I-005) иммунодефицитных мышей CAST/EiJ дозой 10^2 БОЕ первоначально патоген был зарегистрирован в легких и селезенке через 4 суток после инфицирования (п.и.), затем через 8 суток п.и. он появился в печени и почках [185]. Наиболее высокие концентрации вируса отмечали в легких ($6,3 \lg$ БОЕ/мл) через 13 суток п.и. и селезенке ($5,0 \lg$ БОЕ/мл) через 8 суток п.и. Введение мышам более высоких доз вируса (10^4 и 10^6 БОЕ) приводило к более раннему его появлению (через 1–2 суток п.и.) в легких, селезенке, печени и иногда в головном мозге и почках. Самых высоких концентраций (в \lg БОЕ/мл) вирус достигал в легких ($8,5$ – $9,0$) и селезенке ($5,5$ – $8,3$) через 6 суток п.и., в печени ($5,5$ – $7,5$) и почках ($4,5$ – $5,3$) через 6–8 суток п.и., а также в головном мозге ($5,5$ – $6,0$) через 8 суток п.и. После гибели 5–11-недельных мышей CAST/EiJ через 7–10 суток п.и. дозой вируса 1×10^4 БОЕ в легких его концентрация достигала $9,0 \lg$ БОЕ/мл, в селезенке - $5,3 \lg$ БОЕ/мл и в печени - $6,0 \lg$ БОЕ/мл [90]. Внутривентрикулярное введение патогена (доза 2×10^4 БОЕ) приводило к гибели животных через 5–8 суток п.и. и его накоплению к этому моменту в легких в титре $8,0 \lg$ БОЕ/мл, в печени $8,5 \lg$ БОЕ/мл и в селезенке $9,0 \lg$

БОЕ/мл. При и/н заражении мышей этой же линии з/афр штаммом BOO (USA-2003-044) в дозах 10^4 , 10^5 или 10^6 БОЕ их гибель регистрировали через 7–10 суток п.и., при этом концентрация вируса в легких и яичках была 7,5–8,3 lg БОЕ/мл, в печени - 5,5–6,8 lg БОЕ/мл, а в селезенке - 6,2–8,3 lg БОЕ/мл. При и/н заражении мышей BALB/c ц/афр штаммом BOO (Z79-I-005) дозой 10^4 БОЕ патоген первоначально появлялся в легких через 1–2 суток п.и. и в печени через 5 суток п.и., достигая максимальных концентраций соответственно 5,6 и 2,0 lg БОЕ/мл через 6 суток п.и. [185]. При увеличении дозы введения вируса (10^6 БОЕ) через 1–2 суток его регистрировали в легких, селезенке и печени мышей, а через 4 суток в почках и головном мозге, максимальные титры патогена (в lg БОЕ/мл) наблюдали в легких (8,2), головном мозге (3,7), почках (3,2) и селезенке (3,0) через 6 суток п.и., а также в печени (3,5) через 8 суток п.и. У 3–4-недельных мышей SCID и BALB/c, погибших через 11 суток после внутрибрюшинного заражения з/афр штаммом BOO (MPXV-2003-358) в дозе 10^5 БОЕ, количество вируса в легких, оцененное в lg фотонов/с, было 1,8, в яичках - 4,5, в почках - 2,5 и в печени - 1,2 [162]. При заражении ц/афр штаммом MPXV-Congo в той же дозе гибель животных наблюдали через 9 суток п.и., при этом количество вируса, также оцененное в lg фотонов/с, в легких было 2,7, в яичках - 4,4, в печени - 2,8 и в почке - 2,5. У 4–8-недельных мышей C57BL/ stat1-/-, эвтаназированных через 8 суток после и/н заражения ц/афр штаммом ZAI-79 BOO в дозе $4,6 \times 10^3$ БОЕ, концентрация вируса в легких составляла 5,2 lg БОЕ/мл, в печени - 2,2 lg БОЕ/мл и в селезенке - 4,2 lg БОЕ/мл [92].

Данные по низшим приматам. Исследования, проведенные по аэрозольному заражению взрослых *Macaca cynomolgus* ц/афр штаммом BOO (V79-I-005) в дозах $3,0 \times 10^4$ – $1,0 \times 10^6$ БОЕ показали, что в крови появление патогена происходило через 4–6 суток п.и., а в оральных (глоточных) смывах - через 4–8 суток п.и. [210, 280]. Максимальных значений титры генетического материала вируса достигали в крови (6,5–6,8 lg геномов/мл) через 6–12 суток и в оральных (глоточных) смывах (4,5–8,0 lg геномов/мл) через 6–10 суток п.и., у выживших животных эти показатели были на 0,3 – 1,0 lg ниже, чем таковые у погибших. У животных, умерших через 6–11 суток п.и., концентрация вируса (в lg геномов/мл) в легких была 8,1–10,1, в паховых лимфоузлах - 7,1–9,1, в красном костном мозге и аксиллярных лимфоузлах - 6,0–7,5, в гонадах - 5,2–8,5, в селезенке - 7,3–8,1, в надпочечниках, почках, сердце, 12-перстной и тощей кишке, головном мозге - 4,5–7,5, в толстой кишке - 5,5–8,3 и в оспинах - 6,5–10,3 [210]. Погибшие или эв-

таназированные приматы соответственно через 8–9 или 21 сутки после аэрозольного инфицирования вирусом в дозах $3,0 \times 10^4$ и $1,0 \times 10^5$ БОЕ имели его концентрацию в легких 1,0–6,8 lg геномов/мл, в головном мозге <1,0–2,6 lg геномов/мл и в сердце <1,0–3,6 lg геномов/мл. Обезьяны, погибшие через 7 или 10 суток п.и. дозами вируса $3,0 \times 10^5$ и $9,0 \times 10^5$ БОЕ, имели его титры в легких 8,1–8,3 lg геномов/мл, в головном мозге 3,1–3,5 lg геномов/мл и в сердце 4,3–4,5 lg геномов/мл [280]. Взрослые *Macaca cynomolgus*, аэрозольно инфицированные штаммом V79-I-005 ВОО в дозах $1,0 \times 10^4$ – $1,4 \times 10^5$ БОЕ и погибшие или эвтаназированные перед гибелью, в легких содержали вирус в концентрации, выраженной в lg БОЕ/мл, 6,9–8,9, в селезенке - < 1,7–8,4, в печени - < 1,7–8,0, в почках - < 1,7–6,2 и в надпочечниках - < 1,7–6,7 [424]. В то же время другой ц/афр штамм Zaire 79 ВОО при аэрозольном инфицировании им 2–3-летних *Macaca cynomolgus* (доза $2,6 \times 10^5$ БОЕ) накапливался до пиковых значений в крови (2,2 lg БОЕ/мл) и глоточных смывах (5,0 lg БОЕ/мл) через 9–10 суток п.и., начиная регистрироваться в них через 1–3 суток п.и. [106]. У погибших животных через 7–11 суток п.и. концентрация генетического материала вируса, выраженная в lg геномов/мг, в селезенке была 2,5–6,0, в почках - 1,5–3,0, в надпочечниках - 1,2–3,2, в сердце - 2,2–3,5, в левое легком - 3,2–7,0, в правом легком - 6,2–7,0, в миндалинах - 4,0–7,2, в мезентериальных лимфоузлах - 0,5–4,0, в печени - 1,0–5,8, в паховых лимфоузлах - 1,5–4,2 и в головном мозге - 1,5–3,7. При интратрахеальном введении ц/афр штаммов MSF#6 или Zaire ВОО взрослым *Macaca cynomolgus* в дозах $1,0 \times 10^6$ – $3,53 \times 10^7$ БОЕ первичное появление патогена регистрировали через 1–4 суток п.и. в крови (ее плазме) и глоточных смывах [96, 309]. При этом максимального уровня титры вируса или его генетического материала достигали в плазме крови 5,5–6,7 lg БОЕ/мл или в крови 5,5–9,0 lg геномов/мг через 8–20 суток п.и. и в глоточных смывах 2,6–3,0 lg БОЕ/мл через 8–20 суток п.и. Ряд исследователей наблюдал в крови максимальные концентрации вирусного генетического материала 2,8 и 2,5 lg геномов/мл соответственно при п/к и и/н инфицировании взрослых *Macaca cynomolgus* дозой 10^6 БОЕ ц/афр штамма Zr-599 ВОО [453]. При п/к или и/н заражении животных в той же дозе, но з/афр штаммом Liberia ВОО, приводило к накоплению этого патогена в крови с максимальными значениями концентраций генетического материала 2,3 или 1,5 lg геномов/мл соответственно. Интрабронхиальное введение ц/афр штамма ВОО (Zaire-79) в дозах 5×10^5 или 5×10^6 БОЕ взрослым *Macaca. cynomolgus* инициировало появление патогена в крови через 1–2 суток п.и., в оральных смывах и в

носовых смывах через 5–10 суток п.и. [155]. Наиболее высоких титров в крови (6,7–7,0 lg геномов/мл) вирус достигал через 7–20 суток п.и., в оральных смывах (2,0–4,4 lg БОЕ/мл) - через 8–14 суток п.и. и в носовых смывах (3,3–5,9 lg БОЕ/мл) через 5–12 суток п.и. У обезьян, эвтаназированных перед смертью, патоген обнаруживали в следующих органах (в концентрациях, выраженных в lg БОЕ/мл): в легких (4,0–7,2), различных лимфоузлах (3,0–7,0), тимусе (5,5), селезенке (3,5), красном костном мозге (5,0–5,7), ноздрях (6,7), миндалинах (5,1), трахее (6,8), пищеводе и щитовидной железе (3,2–3,7). При внутривенном введении животным того же штамма ВОО в тех же дозах вызывало его появление в крови через 1–2 суток п.и., в оральных смывах через 2–7 суток п.и. и носовых смывах через 4–10 суток п.и. При этом наибольшие титры патогена в крови (7,5–8,5 lg геномов/мл) были отмечены через 5–13 суток п.и., в оральных смывах (3,0–5,7 lg БОЕ/мл) - через 5–14 суток п.и. и в носовых смывах (3,3–6,0 lg БОЕ/мл) - через 5–12 суток п.и. У обезьян, зараженных дозой 5×10^6 БОЕ и эвтаназированных перед смертью, обнаруживали патоген в левом легком (3,3–3,8 lg БОЕ/мл), подчелюстных лимфоузлах (1,8 lg БОЕ/мл), красном костном мозге (2,7 lg БОЕ/мл) и миндалинах (2,0 lg БОЕ/мл). У приматов, инфицированных дозой 5×10^7 БОЕ и эвтаназированных перед гибелью, патоген регистрировали в следующих органах (в концентрациях, выраженных в lg БОЕ/мл): в легких (5,5–6,5), различных лимфоузлах (3,5–7,0), тимусе и селезенке (4,5), красном костном мозге (6,5–7,0), ноздрях и миндалинах (7,1), трахее (4,0), пищеводе (6,1) и щитовидной железе (4,5). Другие исследователи, проводя эксперименты на 2–6-летних *Macaca cynomolgus* и заражая их внутривенно дозами $3,8 \times 10^7$ – 5×10^7 БОЕ тем же ц/афр штаммом Zaire 79 ВОО, обнаруживали появление патогена в крови, ее плазме, мононуклеарах, глоточных смывах через 1–4 суток п.и. [152, 153, 331]. При этом максимальные концентрации вируса в крови (8,5 lg геномов/мл) наблюдали через 5–8 суток п.и., в мононуклеарах крови (4,3–6,8 lg геномов/ 10^6 клеток или 5,6 lg БОЕ/мл) - через 6 или 7–16 суток п.и., в плазме крови (1,8–7,1 lg БОЕ/мл) и в глоточных смывах (3,7–4,8 lg БОЕ/мл) - через 6 суток п.и. Животные, погибшие через 9–13 суток п.и., в коже имели титр патогена 6,6–8,2 lg БОЕ/мл, в легких - 6,5–9,3 lg БОЕ/мл, и в лимфоузлах - 5,0–6,2 lg БОЕ/мл [153]. Эксперименты, проведенные по интрабронхиальному инфицированию одной дозой (2×10^5 БОЕ) мутантными вариантами ц/афр штамма V79-I-005 (D14L KO MPXV-Z или WT MPXV-Z) ВОО 5–9-годовых *Macaca mulatta* продемонстрировали появление патогена в крови и бронхоальвеолярных смывах через 1–7 су-

ток п.и. [172]. При этом первый вариант вируса обнаруживали в максимальных концентрациях в крови (3,1–4,0 lg БОЕ/мл) через 10–14 суток п.и. и в бронхоальвеолярных смывах (4,6–4,7 lg БОЕ/мл) через 17 суток п.и., а второй вариант - в крови (5,7–6,0 lg БОЕ/мл) через 7–21 сутки п.и. и в бронхоальвеолярных смывах (7,3–8,0 lg БОЕ/мл) через 7–10 суток п.и. Внутривенное введение ц/афр штамма ZAI-79 ВОО 3,8–8,4-килограммовым *Macaca mulatta* в дозе 2×10^7 БОЕ приводило к появлению возбудителя заболевания в крови через 2–10 суток п.и., а в глоточных смывах через 6 суток п.и. [388]. Пиковые значения титров вируса в крови (3,2–7,0 lg БОЕ/мл) обнаруживали через 6–12 суток п.и., а в глоточных смывах (6,0–7,7 lg БОЕ/мл) - через 8–14 суток п.и.

Данные по луговым собачкам. Внутривентральное или и/н инфицирование взрослых луговых собачек з/афр штаммом ВОО (USA-2003-044) приводило к появлению патогена соответственно через 5–6 суток п.и. в крови и глоточном смыве или через 3–6 суток п.и. в глоточном смыве и 8–9 суток п.и. в крови, а также пики его концентрации (в lg БОЕ/мл) наблюдали в крови (3,4–5,4) и глоточных смывах (2,5–5,1) через 7–10 суток п.и. или в крови (2,3–4,5) через 10–15 суток п.и. и глоточных смывах (3,0–5,2) через 10–18 суток п.и. [213]. При этом у павших животных через 8–11 суток после внутривентрального заражения вирусные титры (в lg БОЕ/мл) в печени составляли 7,2–7,9, в селезенке - 6,4–6,8, в легких - 5,9–6,7, в почках - 4,4–5,3, в сердце - 3,5–4,5 и в головном мозге - 1,7–4,0, а у животных, павших через 11–14 суток после и/н заражения, титры патогена (в lg БОЕ/мл) в печени составляли 1,0–3,0, в селезенке - <1,0–2,4, в легких - <1,0–8,0, в почках - <1,0–2,4, в сердце - <1,0–4,5 и в головном мозге - 1,0–4,7. При скарификационном или и/н введении взрослым луговым собачкам того же штамма ВОО в одной и той же дозы ($10^{4,5}$ БОЕ) ряд ученых наблюдал соответственно появление вируса в оральных и носовых смывах и крови через 6–9 суток п.и., в кале через 9–12 суток п.и. и в глазном смыве через 12–15 суток п.и. или в оральном смыве через 3–6 суток п.и., в носовом смыве и крови через 6–9 суток п.и., в кале через 9–12 суток п.и. и в глазном смыве через 12–15 суток п.и. [101]. При этом сходные максимальные значения титров вируса были получены у животных, инфицированных обоими методами: в крови (1,8–2,5 lg геномов/мл) через 12–15 суток п.и., в оральном смыве (4,4–5,3 lg БОЕ/мл) через 9–15 суток п.и., в носовом смыве (3,3–4,0 lg БОЕ/мл) через 15–21 сутки п.и., в кале (2,5–3,3 lg БОЕ/мл) через 9–12 суток п.и. и в глазном смыве (1,5–2,8 lg БОЕ/мл) через 12–15 суток п.и. При скарификационном или и/н введении взрослым луговым собачкам ц/афр штам-

ма Congo-2003-358 ВОО в той же дозе наблюдали соответственно появление вируса в смывах с места инокуляции, оральном и глазном, крови и кале через 6–9 суток п.и., в смыве с оспенного среза и носовом через 9–12 суток п.и. или оральном, носовом смывах и крови через 6–9 суток п.и., в глазном смыве и кале через 9–12 суток п.и., в смыве с оспенного среза через 12–15 суток п.и. При этом сходные максимальные значения титров вируса были получены у животных, инфицированных обоими методами: в крови ($2,5 \lg$ геномов/мл) через 9–12 суток п.и., в оральном смыве ($5,5 \lg$ БОЕ/мл) через 12–15 суток п.и., в носовом смыве ($3,2\text{--}5,5 \lg$ БОЕ/мл) через 12–15 суток п.и., в кале ($2,8\text{--}5,0 \lg$ БОЕ/мл) через 12–18 суток п.и., в глазном смыве ($3,0\text{--}4,2 \lg$ БОЕ/мл) через 12–15 суток п.и. и в смыве с оспенного среза ($3,3\text{--}4,6 \lg$ БОЕ/мл) через 12–15 суток п.и. Другие ученые отметили, что и/н инфицирование взрослых луговых собачек з/афр штаммом ВОО (USA-2003-044) дозами $6 \times 10^2\text{--}6 \times 10^5$ БОЕ или ц/афр штаммом Congo-2003-358 дозами $8 \times 10^2\text{--}8 \times 10^5$ БОЕ приводило к появлению вируса в оральных смывах соответственно через 3–13 суток п.и. или 3–6 суток п.и. с максимумом его концентрации ($4,0\text{--}8,7 \lg$ БОЕ) в обоих случаях [182]. При этом в первом случае гибель животных наступала через 13–17 п.и. и титры вируса (в \lg БОЕ) в носовом смыве были $5,3\text{--}7,3$, в оральном смыве - $5,7\text{--}8,0$, в коже - $<1,0\text{--}7,7$, в печени - $<1,0\text{--}6,7$ в легких - $2,8\text{--}7,0$, в крови - $<1,0\text{--}4,0$, в оспине - $6,7\text{--}7,7$, а во втором – через 11–17 суток п.и. и титры вируса (в \lg БОЕ) в носовом смыве были $4,0\text{--}7,5$, в оральном смыве - $3,8\text{--}9,1$, в коже - $<3,5\text{--}8,5$, в печени - $4,9\text{--}9,4$, в легких - $6,9\text{--}8,5$, в крови - $<1,0\text{--}7,8$, в оспине - $5,0\text{--}8,3$. В исследованиях с использованием з/афр штаммом ВОО (USA-2003-044), который и/н вводили молодым луговым собачкам в дозе 9×10^3 БОЕ ряд ученых [317] наблюдал аналогичную вышеописанной [182] динамику накопления вируса в оральных смывах, а также слабую его аккумуляцию в крови с 6 по 24-е сутки п.и. с максимальной концентрацией $0,7\text{--}2,5 \lg$ геномов/мл. В экспериментах по и/н заражению молодых луговых собачек з/афр штаммом ВОО (USA-2003-044) в дозе 6×10^3 БОЕ или ц/афр (ROC-2003-358) в дозе 8×10^3 БОЕ патоген регистрировали через 6–17 суток п.и. с пиковым значением титров ($3,8\text{--}3,9 \lg$ геномов/мл) через 12 суток п.и. [161]. З/афр штамм ВОО (USA-2003-044) наблюдали через 6–12 суток п.и. с максимальным уровнем концентрации (в БОЕ) $6,8 \times 10^5$ через 6 суток п.и. (6) в слюнных железах и подчелюстных лимфоузлах, $4,9 \times 10^8$ (12) в селезенке, $7,7 \times 10^7$ (12) в миндалинах, $2,7 \times 10^6$ (12) в трахее, $5,9 \times 10^7$ (12) в легких, $5,7 \times 10^8$ (12) в печени, $2,4 \times 10^7$ (9) в толстой кишке, $1,1 \times 10^7$ (12) в тощей кишке и $3,8 \times 10^6$ (12) в почках;

через 6–17 суток п.и. - $2,4 \times 10^7$ (9) в носу, $1,1 \times 10^7$ (12) в языке, $4,1 \times 10^6$ (12) в ротоглотке, $1,1 \times 10^7$ (12) в слизистой щеки, $9,7 \times 10^7$ (17) в веках, $1,2 \times 10^7$ (12) в глазах, $7,6 \times 10^7$ (12) гонадах, $3,3 \times 10^5$ (12) в коже; через 6–9 суток п.и. - $9,7 \times 10^7$ (9) в двенадцатиперстной кишке; через 12 суток п.и. - $1,4 \times 10^7$ (12) в мезентериальных лимфоузлах, $4,3 \times 10^5$ (12) в желудке, $1,4 \times 10^6$ (12) в сердце, $2,8 \times 10^6$ (12) в поджелудочной железе; через 12–17 п.и. - $7,1 \times 10^4$ (12) в головном мозге, $3,5 \times 10^6$ (12) в моче и мочевом пузыре, $3,8 \times 10^4$ (12) в желчном пузыре; через 12–24 суток п.и. - $6,5 \times 10^6$ (12) в дефекате и $7,8 \times 10^7$ (17) в оспинах. Эти же ученые зарегистрировали в общем виде аналогичную картину по накоплению ц/афр штамма ВОО (ROC-2003-358) в организме животных данного вида с той лишь разницей, что в некоторых органах (слюнные железы, подчелюстные лимфоузлы, печень, желудок, поджелудочная железа и желчный пузырь) концентрация этого штамма была несколько выше (на 0,5–1,5 lg) и в оспинах его обнаруживали раньше (на 4–5 суток).

Данные по сусликам. И/н заражение взрослых сусликов з/афр штаммом ВОО (USA-2003-044) в дозе $10^{5,1}$ БОЕ приводило к первичному появлению патогена в глоточных смывах через 2–4 суток п.и. и в крови через 4–6 суток п.и. Максимальных титров вирус достигал в крови через 7 суток п.и. (4,2–5,1 lg БОЕ/мл) и в глоточных смывах через 8 суток п.и. (4,9–6,2 lg БОЕ/мл). Гибель инфицированных животных наступала через 8–9 суток п.и., к этому времени концентрация патогена (в lg БОЕ/мл) в легких составляла 5,9–6,7, в селезенке - 6,4–6,8, в печени - 7,2–7,9, в почках - 4,4–5,3, в сердце - 3,5–4,5 и в головном мозге - 1,7–4,0 [211]. Введение вируса в той же дозе, но внутрибрюшинно, вызывало его первичное появление в крови через 3 суток п.и. и глоточных смывах через 4 суток п.и. При этом самые высокие титры вируса были зарегистрированы в крови (3,8–4,2 lg БОЕ/мл) и глоточных смывах (3,9–6,0 lg БОЕ/мл) через 5 суток п.и. Гибель инфицированных животных наступала через 6–7 суток п.и., к этому времени концентрация возбудителя заболевания (в lg БОЕ/мл) в легких составляла 5,5–6,1, в селезенке - 6,4–6,8, в печени - 7,0–7,8, в почках - 4,1–5,4, в сердце - 3,5–5,7 и в головном мозге - 1,0–3,6. При п/к заражении взрослых сусликов дозой 100 БОЕ тем же штаммом ВОО раньше всего вирус обнаруживали в селезенке (через 2 суток п.и.), а также в крови, печени и легких (через 4 суток п.и.), пиковых значений титры патогена (в lg БОЕ/мл) достигали в крови (5,3), печени (8,4), селезенке (7,5) и легких (7,3) через 10 суток п.и. [156]. При введении животным ц/афр ZAI-79 штамма ВОО тем же способом и в той же

дозе приводило к первичному появлению патогена в крови, легких и селезенке через 2 суток п.и., а в печени через 4 суток п.и., при этом максимальные концентраций возбудитель заболевания (в lg БОЕ/мл) наблюдали в крови (6,1), печени (6,1), селезенке (7,6) и легких (8,9) через 10 суток п.и. Заражение сусликов тем же способом и дозой, но другим ц/афр штаммом ZAI-1970 BOO, вызывало накопление вируса в наиболее высоких титрах (в lg БОЕ/мл) в крови (4,9), печени (7,2), селезенке (7,0) и легких (8,2) через 7 суток п.и. [193]. При и/н инфицировании луговых собачек ц/афр штаммом MPXVV-2003-38 BOO дозой 10^5 или 10^6 БОЕ патоген появился в оральных смывах соответственно через 3–6 суток п.и. или через 1–3 суток п.и., достигая в них максимальных концентраций (3,5 lg БОЕ/мл) через 1–3 суток п.и. или в крови (8,0 lg геномов/мл) через 1–3 суток п.и. и в оральных смывах (6,8 lg БОЕ/мл) через 7–14 суток п.и. [200].

Данные по африканским соням. При и/н заражении взрослых африканских сонь ц/афр штаммом ZAI-79 BOO в дозе 2×10^4 БОЕ раньше всего патоген регистрировали в носовых смывах (через 2 суток п.и.), затем в селезенке (через 3 суток п.и.), а также в легких, печени и крови (через 4 суток п.и.). Максимальные концентрации возбудителя заболевания (в lg БОЕ/мл) были отмечены через 8 суток п.и. в печени (8,0), легких (6,5), селезенке (6,5), носовых смывах (5,2) и крови (4,5) [209].

Данные по гамбийским сумчатым крысам. При внутрикожном инфицировании гамбийских сумчатых крыс дозой 10^6 БОЕ ц/афр штамма BOO (ROC 2003–358), в геном которого встроен ген люциферазы, с помощью биолуминисцентного метода наблюдали в динамике накопление вируса в различных участках тела трех животных по усилению их свечения с максимумом через 4–14 суток п.и., который превышал контрольную величину в 30–10000 раз [224]. При этом в оральных смывах патоген появлялся через 7–11 суток п.и., в назальных – через 3–14 п.и., в ректальных - 7–14 суток п.и. и в окулярных - через 7–18 суток п.и. Максимальные значения титров возбудителя заболевания (в lg БОЕ/мл) наблюдали в оральных смывах (3,0–6,0) через 11–18 суток п.и., в назальных (3,0–4,7) через 7–18 суток п.и., в ректальных (3,5–5,3) через 14–18 суток п.и. и в окулярных (3,5–6,0) через 11–18 суток п.и.. Эвтаназированное животное через 17 суток п.и. имело концентрацию патогена (в lg БОЕ/мл) в слюнной железе 7,9, в поднижнечелюстном лимфоузле 2,3, в легких 7,3, в селезенке 4,6, в тонком кишечнике 7,0, в почках 2,3, в яичках 4,7, в головном мозге 5,7, в коже 7,2, в миндалинах 6,2, в ингвинальном лимфоузле 7,3 при его отсутствии в сердце, печени и желудке. При и/н заражении животных

той же дозой вируса с помощью билюминисцентного метода наблюдали в динамике накопление возбудителя заболевания в различных участках тела 3 животных по усилению их свечения с максимумом через 7–16 суток п.и., который превышал у двух крыс контрольную величину в 5–50 раз. При этом в оральных смывах патоген появлялся через 3–8 суток п.и., в назальных – через 5–15 суток п.и., в ректальных и в окулярных (только у одного животного) – через 12 суток п.и. Максимальные значения титров возбудителя заболевания (в lg БОЕ/мл) наблюдали в оральных смывах (3,5–5,5) через 3–12 суток п.и., в назальных (3,5–4,3) через 12–15 суток п.и., в ректальных (4,0) через 15 суток п.и. и в окулярных (1,5) через 12 суток п.и. Все органы и ткани эвтаназированных животных через 26 и 27 суток п.и. не содержали патогена.

Анализ представленной информации по накоплению ВОО в организме всех исследованных подопытных животных свидетельствует о его органной политропности. При этом лишь у инфицированных луговых собачек и приматов наблюдали размножение вируса в коже: оспинах [101, 210]. В отличие от п/к, внутрибрюшинного и скарификационного способов введения ВОО мелким подопытным животным и/н сопровождался первичным размножением его в респираторных органах, судя по накоплению вируса в легких и смывах из носа в сравнении с таковым по другим биоматериалам.

Несмотря на наличие большого количества публикаций, связанных с изучением у приматов инфекционного процесса, вызванного ВОО при разных методах заражения, имеются лишь крайне скудные экспериментальные данные по вопросу динамики диссеминации патогена у этих животных, которая ограничена только информацией о его накоплении в крови, ее плазме и мононуклеарах, глоточных смывах, оральных, носовых и бронхоальвеолярных. Ряд исследователей отмечал более высокие титры вируса в кровяных клеточных элементах (мононуклеары), чем в плазме [152]. Существенно шире спектр материалов был взят для оценки концентрации вируса по результатам вирусологического, люминесцентного и молекулярно-генетического исследований при проведении некропсии приматов и других животных, погибших от инфекции, вызванной ВНО, или подвергнутых эвтаназии по жизненным показаниям. Как у мелких подопытных животных, так и у приматов к моменту их гибели ВОО обнаруживали почти во всех исследованных материалах. При этом типы органов и тканей, максимально накапливающих вирус, у большинства видов животных были сходными (не зависимо от способа заражения): легкие, слизистая носа, трахея, селезенка, лимфоузлы, красный костный мозг, пе-

чень, тимус, гонады и кожа (у приматов и луговых собачек). Существенно более низкие концентрации патогена были обнаружены в почках, сердце и головном мозге.

К сожалению, в доступной нам литературе нет данных по накоплению ВОО у человека для того, чтобы сопоставить их с таковыми экспериментальных исследований на животных. Имеется только информация о количестве геномных копий вируса (несколько миллионов) в оспинах кожи больных людей [195]. Причем сходное количество вирионов в этой ткани было выявлено у животных (луговые собачки и низшие приматы), которые воспроизводят у человека основную симптоматику оспы обезьян [153, 182, 210]. Кроме того, если исходить из общепризнанных представлений, что у людей клинические проявления и патогенез этого заболевания напоминает обычный клинический тип натуральной оспы [158], то у людей с таким типом болезни уловить вирусемию удавалось редко: в продромальном периоде, а также при ранней стадии высыпания [34]. Тогда как почти у всех исследованных видов животных, инфицированных ВОО различными способами (в том числе через респираторный тракт), патоген регулярно обнаруживали в крови в высоких концентрациях. Возможно, такое несоответствие результатов может быть связано с использованием большинством исследователей в своих экспериментах больших доз ВОО при заражении изучаемых животных. В поддержку этого объяснения говорит, к примеру, тот факт, что данный вирус редко регистрировали в крови у погибших луговых собачек от оспы обезьян при инфицировании низкими дозами патогена (6×10^3 и 8×10^2 БОЕ) [182]. Присутствие ВНО у людей в носоглотке и зеве обнаруживали не только от момента появления клинических признаков заболевания [37, 403, 457], но и в конце инкубационного периода [458], и в стадии реконвалесценции [369]. Аналогичные результаты были получены на различных видах животных (кроме мышей), зараженных ВОО через дыхательный тракт и другими методами.

Таким образом, данные исследований динамики накопления ВОО у животных различных видов (сони, луговые собачки, суслики, гамбийские сумчатые крысы, *Mascas cynomolgus* и *mulatta*) после заражения через дыхательный тракт и другими способами продемонстрировали в ряде случаев сходство с некоторыми показателями инфекционного процесса при оспе обезьян у человека: по факту накопления патогена в оспинах кожи (в том числе величину его титра), в крови при заболевании в ранней стадии и инкубационном периоде, а также в слизистых носоглотки (не только от момента появления клинической признаков болезни, но и в конце инкубационного периода, и в стадии ре-

конвалесценции). Отсутствие соответствующих данных экспериментов по мышам не позволяет судить о подобии инфекционного процесса у этого вида животных и людей при оспе обезьян.

1.3.2 Накопление вируса гриппа птиц в органах и тканях человека и мышей

Несмотря на регулярно возникающие по настоящее время эпидемические вспышки заболеваний, вызываемые в/пат ВГП А/Н5N1 и ВГ А/Н1N1pdm09, количественной научной информации о распространении этих патогенов в организме человека практически нет. Как и при сезонном гриппе, данные патогены размножаются в слизистой оболочке носа, носоглотки, ротоглотки, трахеи, бронхов, бронхиол и альвеол. Данное обстоятельство было убедительно доказано путем выделения этих вирусов в основном из верхнего отдела респираторного тракта больных в конце инкубационного периода и в разгар заболевания, а также экспериментально - с использованием кусочков органов и первичных клеток этого тракта [159, 233, 274, 382]. При этом ВГ А/Н1N1pdm09 в отличие от в/пат ВГП А/Н5N1 не реплицировался в эндотелиоцитах легких и менее активно размножался в альвеолоцитах, но лучше размножался в эпителии верхнего отдела дыхательного тракта, чем ВГП. Последний факт подтверждался и результатами исследований людей, инфицированных в/пат ВГП А/Н5N1 [114, 366]. Даже в тяжелых случаях заболевания, связанных с развитием расстройств функции кишечника, острого респираторного дистресс-синдрома и симптомов полиорганной недостаточности, приведших к гибели человека, не было обнаружено убедительных доказательств вирус-индуцированных поражений в органах других систем организма человека, помимо дыхательной [295, 396, 462]. Тем не менее, кроме успешного регулярного выделения вируса из носоглоточных смывов, в отличие от сезонных ВГ, включая ВГ А/Н1N1pdm, относительно часто встречались только случаи (в 70–100 %) изоляции в/пат ВГП А/Н5N1 из крови больных людей в разгар заболевания (до 3,5 lg копий РНК/мл - рибонуклеиновая кислота/мл) [114, 220], не считая редких случаев обнаружения и выделения этого вируса из цереброспинальной жидкости и из одного образца кала [220]. При этом факт обнаружения в/пат ВГП А/Н5N1 в кале также подтверждался данными выявления вирусной РНК в кишечнике [269].

Изучением диссеминации в/пат ВГП А/Н5N1 ВГ и А/Н1N1pdm09 занимались многие ученые, используя, в том числе различные виды модельных животных: мыши, хорьки, крысы, включая хлопковые, морские свинки, хомяки, свиньи, кошки, собаки и приматы [240, 309, 423]. Тем не менее, больше всего информации в этом направлении было получено на лабораторных мышах. Из огромного массива литературных данных были выбраны наиболее показательные результаты исследований динамики накопления ВГ А/Н1N1, А/Н1N1pdm18, А/Н1N1pdm09 и ВГП А/Н5N1 (высоко- и низкопатогенные) в органах и тканях инфицированных мышей, в основном сориентированные на сравнительное изучение, и отражены в таблице 1.2.

Таблица 1.2 – Данные по накоплению вируса гриппа (ВГ) А/Н1N1, А/Н1N1pdm18, А/Н1N1pdm09 или высоко- и низкопатогенного вируса гриппа птиц (в/пат и н/пат ВГП) А/Н5N1 в органах и тканях интраназально инфицированных мышей

Номер источника	Вид линий мышей (возраст)	Название штаммов и вирусов (доза)	Вид органов (сутки после заражения/концентрация патогена в lg БОЕ)
177	C57BL/6j (н.у.)	A/Solomon Islands/3/06 ВГ Н1N1 (5 lg БОЕ)	Легкие (3/5,7; 6/4,0); головной мозг (3/<0,5; 6/<0,5); кишечник (3/1,0; 6/<0,5)
		A/Hamburg/05/09 ВГ Н1N1pdm09 (5 lg БОЕ)	Легкие (3/6,5; 6/5,3); головной мозг (3/<0,5; 6/<0,5); кишечник (3/<0,5; 6/<0,5)
		A/Hamburg/NY1580/09 ВГ Н1N1pdm09 (5 lg БОЕ)	Легкие (3/6,7; 6/6,8); головной мозг (3/<0,5; 6/<0,5); кишечник (3/<0,5; 6/<0,5)
		A/Thailand/KAN-1/04 в/пат ВГП Н5N1 от умершего человека (2 lg БОЕ)	Легкие (3/6,2; 6/7,0); головной мозг (3/<0,5; 6/3,3); кишечник (3/0,7; 6/1,0)
	BALB/c (н.у.)	A/Solomon Islands/3/06 ВГ Н1N1 (5 lg БОЕ)	Легкие (3/5,7; 6/5,4); головной мозг (3/<0,5; 6/<0,5); кишечник (3/<0,5; 6/<0,5)
		A/Hamburg/05/09 ВГ Н1N1pdm09 (5 lg БОЕ)	Легкие (3/6,3; 6/6,0); головной мозг (3/<0,5; 6/0,5); кишечник (3/<0,5; 6/<0,5)
		A/Hamburg/NY1580/09 ВГ Н1N1pdm09 (5 lg БОЕ)	Легкие (3/6,2; 6/5,8); головной мозг (3/<0,5; 6/1,3); кишечник (3/<0,5; 6/2,7)

Продолжение таблицы 1.2

Номер источника	Вид линий мышей (возраст)	Название штаммов и вирусов (доза)	Вид органов (сутки после заражения/ концентрация патогена в lg БОЕ)
177	BALB/c (н.у.)	A/Thailand/KAN-1/04 в/пат ВГП H5N1 от умершего человека (2 lg БОЕ)	Легкие (3/5,8; 6/6,7); головной мозг (3/<0,5; 6/1,3); кишечник (3/<0,5; 6/0,7)
247	BALB/c (12–14 недель)	A/Tokyo/2619/2009 ВГ H1N1pdm09 (6,3 lg БОЕ)	Легкие (1/8,0; 3/7,3; 7/5,4)
		A/whooper swan/Hokkaido/1/2008 в/пат ВГП H5N1 H5N1 от умершей птицы (4,0 lg БОЕ)	Легкие (1/4,8; 3/5,2; 6/6,8; 9/4,8)
235	BALB/c (8–10 недель)	A/Texas/36/91 ВГ H1N1 (2,0 lg БОЕ)	Легкие (1/1,0; 3/4,5; 4/4,0; 5/4,5; 6/4,6)
		A/South Carolina/1/18 ВГ H1N1pdm18 (2,0 lg БОЕ)	Легкие (1/4,8; 3/6,4; 4/6,3; 5/6,2; 6/5,8)
		A/Thailand/16/2004 в/пат ВГП H5N1 - (2,0 lg БОЕ)	Легкие (1/4,8; 3/5,8; 4/6,3; 5/6,6; 6/6,7)
		A/Thailand/SP/83/2004 н/пат ВГП H5N1 (2,0 lg БОЕ)	Легкие (1/1,0; 3/4,1; 4/5,0; 5/5,3; 6/5,5)
272	FVB/J (8–10 недель)	A/swine/Iowa/4/76 ВГ H1N1 на 31-м пассаже на легких мышей (10 LD ₅₀)	Легкие (2/5,5; 4/5,8; 6/6,0; 8/4,3)
		A/crested_eagle/Belgium/1/2004 н/пат ВГП H5N1 (5 пассажей на легких мышей) (10 LD ₅₀)	Легкие (2/6,2; 4/7,1)
91	BALB/c*	A/Hong Kong/483/97 в/пат ВГП H5N1 от легкого случая болезни человека (100 LD ₅₀)	Легкие (4/6,2; 6/6,5); печень (4/3,0; 6/1,5); кровь (4/1,8; 6/0,5); головной мозг (4/2,2; 6/3,3); почки (4/1,2; 6/1,0); селезенка (4/2,3; 6/0,5)
		A/Hong Kong/156/97 в/пат ВГП H5N1 от умершего человека (100 LD ₅₀)	Легкие (4/7,0; 6/6,5); печень (4/1,3; 6/0,3); кровь (4/0,3; 6/0,3); головной мозг (4/0,3; 6/1,7); почки (4/0,5; 6/0,3); селезенка (4/0,3; 6/0,3)

Продолжение таблицы 1.2

Номер источ- ника	Вид линий мышей (воз- раст)	Название штаммов и вирусов (доза)	Вид органов (сутки после заражения/ концентрация патогена в lg БОЕ)
91	BALB/c*	A/Hong Kong/486/97 в/пат ВГП H5N1 от умершего человека (100 LD ₅₀)	Легкие (4/6,0; 6/5,5); печень (4/0,3; 6/0,3); кровь (4/0,3; 6/0,3); головной мозг (4/0,3; 6/0,3); почки (4/0,5; 6/0,3); селезенка (4/0,3; 6/0,3)
452	C57BL/6 (6 недель)	A/Hong Kong/483/97** в/пат ВГП H5N1 от умер- шего человека (18 БОЕ)	Легкие (0,5/3,5; 1/5,6; 2/6,8; 3/7,0; 5/7,2; 7/6,8; 9/6,0)
	C57BL/6 (6 недель)	A/Hong Kong/486/97 *** в/пат ВГП H5N1 от легкого случая бо- лезни человека (18 БОЕ)	Легкие (0,5/1,3; 1/2,6; 2/3,7; 3/5,6; 5/6,6; 7/5,7; 9/1,0)
237	BALB/c _R *	A/Hong Kong/213/03 в/пат ВГП H5N1 (4,0 lg ЭИД ₅₀)	Легкие (2/5,6; 4/4,6; 7/2,2)
	DBA/2S*		Легкие (2/6,5; 4/5,7; 7/4,8)
	129/SvImS*		Легкие (2/5,9; 4/5,1; 7/4,6)
	A/JS*		Легкие (2/5,8; 4/5,0; 7/4,0)
	SMR*		Легкие (2/4,9; 4/4,6; 7/3,2)
	C57BL/6R*		Легкие (2/4,9; 4/5,0; 7/3,6)
Примечания * 6–8-недельные животные ** Высоковирулентный штамм для мышей *** Низковирулентный штамм для мышей Н.у. – показатель не указан			

Данные таблицы 1.2 и другой научной информации, опубликованной в большом объеме по вопросу изучения динамики накопления ВГ А/Н1N1, А/Н1N1pdm18, А/Н1N1pdm09 и А/ВГП H5N1 (высоко- и низкопатогенные) в органах и тканях мышей, свидетельствуют о том, что все исследованные субтипы ВГ хорошо размножаются в органах респираторного тракта этих животных (независимо от их линий). Причем штаммы ВГП А/Н5N1, выделенные от погибших людей, накапливались в легких мышей существенно быстрее, чем те, которые были получены от больных с легким течением гриппа птиц [91, 452]. Аналогичная картина наблюдалась и у мышей, и/н инфицированных раз-

личающимися для них по летальной активности штаммами: более вирулентный штамм размножался в легких существенно быстрее, чем менее вирулентный [232, 452].

В экстрареспирационных органах и тканях мышей (кровь, селезенка, головной мозг, печень, кишечник, почки) накопление вируса происходило крайне нерегулярно и в низких концентрациях. При этом в головном мозге могут ограниченно размножаться не только в/пат ВГП А/Н5N1, но и сезонные штаммы ВГ, включая ВГ А/Н1N1pdm18 [91, 133, 177]. Причем проникновение в/пат ВГП А/Н5N1 в головной мозг мышей может происходить через ольфакторный тракт [419]. Наблюдается также тенденция более частого выявления в экстрареспирационных органах мышей штаммов в/пат ВГП А/Н5N1, выделенных от погибших людей, по сравнению с теми, которые были изолированы от больных, течение заболевания которых протекало легко [91, 123].

Таким образом, основное размножение ВГП А/Н5N1 и ВГ А/Н1N1pdm09 как у больного человека, так и инфицированных и/н лабораторных линейных мышей происходит в органах респираторного тракта. Причем при тяжелых случаях течения инфекции у человека и мышей данные возбудители заболевания также могут выявляться в других органах и тканях (головном мозге, селезенке, печени, крови, кишечнике, почках и поджелудочной железе), но, как правило, редко и в низких концентрациях.

1.4 Патоморфологические изменения у человека и подопытных животных, инфицированных вирусом оспы обезьян и высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н5N1

1.4.1 Данные световой и электронной микроскопии органов и тканей человека и животных, инфицированных возбудителем оспы обезьян

В доступной нам научной литературе имеется мало информации о патоморфологических изменениях у людей, умерших от оспы обезьян, и она в основном ограничена данными гистологических, макроскопических и электронно-микроскопических исследований кожных повреждений (элементов сыпи) [121, 414, 417], а также клиническим описанием лимфаденитов [146, 257, 258]. При этом, по данным электронной и световой микроскопии с учетом признаков репродукции ВОО в кератиноцитах регистрировали сходство с теми, которые наблюдались при натуральной оспе у людей [173]. Большинство исследователей отмечало отсутствие существенных различий между клиническими

признаками оспы обезьян у человека и натуральной оспы с обычным клиническим типом, а также модифицированным [146, 158, 387], что делает возможным использование результатов исследования патогенеза этих инфекций, как взаимодополняющих друг друга. Причем несколько больше информации в научной литературе имеется в отношении патологических изменений, наблюдаемых при натуральной оспе у людей и описанных всего в трех публикаций [127, 166, 293], которые основывались на результатах описания 168 случаев смерти людей от натуральной оспы с обычным клиническим типом и 43 – с геморрагическим клиническим типом (ранний – 30, поздний – 13), а также на сведениях из разных информационных источников.

В обобщенном виде данные этих исследований представлены в обзорной статье [158]. У людей при натуральной оспе поражалось большинство исследованных органов и тканей, и патологические очаги пролиферативного и воспалительно-некротического типов часто с кровоизлияниями наблюдались в коже, легких, селезенке, миндалинах, красном костном мозге, лимфоузлах, печени, яичках, яичнике, почках, сердце и костях [127, 166, 293]. Причем их степень выраженности часто зависела от типа (клинического) заболевания:

- при обычном, который напоминал оспу обезьян, данные изменения были в основном воспалительного и пролиферативного типов;
- при геморрагическом – воспалительно-некротического типа с тромбозами сосудов и геморрагиями.

В крайне скудном объеме представлена и информация по изучению некоторых показателей крови при оспе обезьян у людей, которая ограничивалась результатами исследований, проведенных во время эпидемической вспышки этого заболевания в 2003 г. в США. Причем у 45 % заболевших был отмечен лейкоцитоз $(9,13-26,8) \times 10^9/\text{л}$, у 35% – снижение уровня тромбоцитов $(90-143) \times 10^9/\text{л}$ и у 50% – гипоальбуминемия 11–34 г/л [146]. Результаты этих исследований напоминали те, которые наблюдали у больных натуральной оспы с обычным клиническим типом [239, 265, 433]. При изучении спинномозговой жидкости в разгар заболевания у больного оспой обезьян зарегистрировали повышенную концентрацию лейкоцитов (21 кл./мм^3) за счет увеличения процента полиморфонуклеаров (60) [260]. Если для человека при оспе обезьян данных о патологических изменениях было очень мало, то для известных модельных видов животных такая информация была приведена в достаточно внушительном объеме, и касалась луговых

собачек [161, 213, 217, 318], *Macaca cynomolgus* [96, 98, 106, 152, 153, 155, 210, 241, 280, 291, 315, 331, 341, 402, 424, 453], *Macaca mulatta* [349, 388], сусликов [156, 193, 211], африканских сонь [209] и мышей SCID/BALB, а также C57BL/6 stat1^{-/-} и 129 stat1^{-/-} [92, 162]. При этом патологические изменения у этих модельных для оспы обезьян видов животных, инфицированных ВОО разными способами, напоминали таковые у людей с обычным клиническим типом натуральной оспы. При осуществлении световой и электронной микроскопии, в том числе иммуногистохимии и иммунофлуоресценции, органов и тканей зараженных ВОО животных исследователям удалось идентифицировать клетки-мишени для возбудителя заболевания, спектр которых был представлен достаточно широко и в основном совпадал с описанным для многих других ортопоксвирусных болезней: макрофаги, эпителиоциты, плазмочитах, эндотелиоциты, фибробласты, клетки ретикулярные и гладкомышечные, кератиноциты, перициты, клетки соединительной ткани, клетки Купфера, моноциты, гепатоциты, дендритные клетки.

Таким образом, все известные модельные для оспы обезьян виды животных (луговые собачки, *Macaca cynomolgus* и *mulatta*, суслики, иммунодефицитные мыши и африканские сони) после респираторного и других способов заражения в определенной степени воспроизводили картину патологических изменений в органах и тканях, отмеченную при оспе обезьян у людей и натуральной оспе с обычном клиническим типом: воспалительно-пролиферативные очаги и некротические иногда с геморрагиями.

1.4.2 Данные световой и электронной микроскопии органов и тканей человека и мышей, инфицированных вирусом гриппа птиц

В научной литературе имеется много информации, касающейся изучения патологических изменений у больных и умерших людей от инфекции, вызванной сезонным ВГ, включая ВГ А/Н1N1pdm09, и в/пат ВГП А/Н5N1, которая в обобщенном виде представлена в некоторых обзорах [157, 225, 423].

Сезонный грипп, протекающий обычно у людей без осложнений, вызывает легкое воспаление в органах верхних отделов дыхательного тракта (ринит, параназальный синусит, фарингит и ларингит) и нижнего (диффузный поверхностный некротизирующий трахеобронхит с десквамацией эпителиальных клеток, отеком, гиперемией и инфильтрацией лимфоцитами и гистиоцитами). При этом эпителиальная регенерация чаще всего

начиналась через 2 суток после появления первых симптомов заболевания [130]. В тоже время, при развитии осложнений наиболее часто при гриппе встречается вирусная пневмония с обширными уплотнениями разной степени выраженности и кровоизлияниями с диффузными альвеолярными повреждениями. [165, 409, 411]. Патологические изменения в легких, наблюдаемые при гриппе, вызванном ВГ А/Н1N1pdm09 и в/пат ВГП А/Н5N1, как правило, имели ту же картину поражения (диффузные альвеолярные повреждения). При исследовании погибших людей от сезонного и пандемического гриппов чаще, чем при гриппе птиц (А/Н5N1), регистрировали признаки воспаления в носу, трахее, бронхах и бронхиолах [234, 248, 423]. Инфекция, вызванная в/пат ВГП А/Н5N1, регулярно сопровождалась поражением и органов других систем организма человека: гистiocитарная гиперплазия лимфоидной ткани лимфоузлов; реактивный гемафагоцитарный синдром; атрофия белой пульпы селезенки, центральнодолевые некрозы печени, острый тубулярный некроз почек, некроз волокон скелетных мышц и некроз ткани головного мозга с формированием микроглиальных узлов [82, 344, 366]. Заражение же людей сезонным ВГ А/Н1N1, включая А/Н1N1pdm09, редко приводило к гемафагоцитозу, поражению нервно-мышечной и сердечной тканей и других экстрареспиаторных органов [379, 398].

С помощью иммуногистохимического и вирусологического методов в органах респираторного тракта людей, включая умерших от гриппа, были выявлены клетки-мишени для ВГ А/Н1N1pdm09 и в/пат ВГП А/Н5N1, которыми являются эпителиоциты [53, 111, 251, 274, 382]. Причем, если сезонный ВГ А/Н1N1, включая А/Н1N1pdm09, преимущественно размножался в реснитчатых клетках и альвеолоцитах 1 и 2-го порядка, то в/пат ВГП А/Н5N1 регистрировали в основном в пневмоцитах 2-го порядка, а также в эндотелиоцитах кровеносных капилляров легких людей. В отношении участия макрофагов в репродукции ВГ вопрос по настоящее время остается открытым (п. 1.3.2).

Грипп птиц (А/Н5N1) в отличие от сезонного гриппа более часто сопровождается у человека лейкопенией, лимфопенией, тромбоцитопенией, повышением уровней аминотрансфераз [113, 114, 199] и выбросом в кровь большого количества цитокинов (цитокиновый шторм): фактор некроза опухоли - α , интерликин-6 и 10, γ -гамма-интерферон и др. [222, 267, 355]. Причем появление острого респираторного дистресс-синдрома и синдрома полиорганной недостаточности при гриппе может быть связано именно с цитокиновым штормом, индуцированным, по всей видимости, гемафагоцитарным синдро-

мом [344, 366], степень выраженности которого, в свою очередь, прямо коррелировала с концентрацией вируса в респираторном тракте людей (в глотке) [222]. Например, инфекционный процесс, происходящий в эндотелиальных клетках капилляров легких, сопровождался мощным выбросом цитокинов и хемокинов [197]. В свою очередь цитокиновый шторм может привести в организме к активному тромбообразованию [104, 218], которое даже встречалось у людей (5,9 % случаев), госпитализированных во время пандемии гриппа, вызванной ВГ A/H1N1pdm [337].

Многие ученые занимались вопросом изучения патологических изменений у различных подопытных видов животных, в том числе модельных (мыши, хорьки, крысы, включая хлопковые, морские свинки, хомяки, свиньи, кошки, собаки и приматы), инфицированных в/пат ВГП A/H5N1 или ВП A/H1N1pdm09 [240, 304, 423]. Результаты этих исследований напоминали таковые у больных и умерших людей от сезонного гриппа, включая пандемический (A/H1N1pdm09), и гриппа птиц (A/H5N1). Больше всего информации в этом направлении было получено на лабораторных мышах. Некоторые данные в сравнительном плане, касающиеся изучения патологических изменений у этого вида животных, инфицированных ВГ A/H1N1, A/H1N1pdm09 и ВГП A/H5N1, приведены в таблице 1.3.

Таблица 1.3 – Данные патологических изменений у мышей, интраназально инфицированных вирусом гриппа (ВГ) A/H1N1, A/H1N1pdm09, высоко- или низкопатогенным вирусом гриппа птиц (в/пат и н/пат ВГП) A/H5N1

Номер источника	Вид линии мышей (возраст)	Название штаммов и вирусов (доза)	Вид патологических изменений (клетки-мишени для вируса - метод иммуногистохимия или гибридизационный анализ in situ)
281	BALB/c (6 недель)	A/California/04/09 ВГ H1N1pdm09 (2–5 lg БОЕ)	Бронхоальвеолиты, высокий уровень ИФ-γ и ИЛ-4 в легких (эпителиоциты)
		A/Kawasaki/UTK-4/09 ВГ H1N1 (5 lg БОЕ)	Бронхиты, перибронхиты, низкий уровень ИФ-γ и ИЛ-4 в легких (эпителиоциты бронхов)
88	BALB/c (4 недели)	A/Beijing/501/09 ВГ H1N1pdm09 (10 LD ₅₀)	Выраженный воспалительно-некротический бронхит и бронхиолит (часто эпителиоциты бронхиол, включая терминальные, и альвеолярные макрофаги)

Продолжение таблицы 1.3

Номер источника	Вид линии мышей (возраст)	Название штаммов и вирусов (доза)	Вид патологических изменений (клетки-мишени для вируса - метод иммуногистохимия или гибридизационный анализ in situ)
88	BALB/c (6 и 12 месяцев)	A/Beijing/501/09 ВГ Н1N1pdm09 (10 LD ₅₀)	Менее выраженный воспалительно-некротический бронхит и бронхиолит (редко эпителиоциты бронхиол, включая терминальные, и альвеолярные макрофаги)
272	FVB/J (8–10 недель)	A/swine/Iowa/4/76 ВГ Н1N1 на 31-м пассаже на легких мышей (10 LD ₅₀)	Выраженный воспалительно-некротический бронхит и бронхиолит
		A/crested_eagle/Belgium/1/2004 н/пат ВГП Н5N1 на 5-м пассаже на легких мышей (10 LD ₅₀)	Менее выраженный воспалительно-некротический бронхит и бронхиолит, но с геморрагиями, в том числе в почках, фокальный некроз в печени и иногда в селезенке
247	BALB/c (12–14 недель)	A/Tokyo/2619/2009 ВГ Н1N1pdm09 (6,3 lg БОЕ)	Воспалительно-некротические очаги в бронхах, слабое повышение уровня цитокинов (бронхиолярные эпителиоциты)
		A/whooper swan/Hokkaido/1/2008 в/пат ВГП Н5N1 (4,0 lg БОЕ)	Воспалительно-некротические очаги в легких с геморрагиями, выраженное повышение уровня ИФ-γ, ИЛ-6, ИЛ-1b, ФНО-α и М-КСФ (в легких: бронхиолярные эпителиоциты, пневмоциты 2-го порядка, эндотелиоциты, периваскулярные лимфоциты)
123	BALB/c (6–8 недель)	A/Hong Kong/483/97 в/пат ВГП Н5N1 (10–100 LD ₅₀)	Воспалительно-некротические изменения в легких, головном мозге и сердце (бронхиальные эпителиоциты, нейроны и глиальные клетки головного мозга и сердечные мышечные клетки)
179	BALB/c (12–14 недель)	A/НК/156/97 в/пат ВГП Н5N1 от умершего человека, A/ck/НК/220/97 в/пат ВГП Н5N1, A/ck/НК/728/97 в/пат ВГП Н5N1, (ЭИД ₅₀)	Более выраженные повреждения для штамма А/НК/156/97: дегенерация и некрозы эпителия носовой полости, трахеи, бронхов и бронхиол; альвеолиты с эритроцитами, нейтрофилами и макрофагами; пневмония; нет повреждений других органов, включая головной мозг

Из данных таблицы видно, что все штаммы сезонного ВГ, включая ВГ А/Н1N1pdm09, и ВГП А/Н5N1 вызывают в той или иной степени выраженности воспалительно-некротические процессы в респираторном тракте инфицированных мышей, при этом размножаясь в основном в различных эпителиоцитах. Грипп птиц (А/Н5N1) у

мышей может дополнительно сопровождаться еще и геморрагиям в легочной ткани и поражением других экстрареспиаторных органов (головной мозг, сердце, печень и селезенка). Кроме того, зарегистрирован факт репродукции в/пат ВГП А/Н5N1 в эндотелии кровеносных капилляров. С помощью мышей удалось успешно смоделировать цитокиновый шторм, который возникает у больных людей, инфицированных в/пат ВГП А/Н5N1, при этом отсутствие у трансгенных мышей B6;129S1-Il1r1^{tm1Roml}, B6.129Tnfrsf1^{atm1Mak}/J, B6;129S6-Tnf^{tm1Gkl}/J, B6;129STnfr^{sf1atm1Imx}, Tnfrsf1^{btm1Imx}/J, B6.129S2-Il6^{tm1Kopf}/J и B6.129S4-Ccl2^{tm1Rol}/J некоторых цитокинов (фактор некроза опухоли-α, интерлейкин-1R, 6 и СС хемокин лиганд 2) не меняло течения летальной инфекции [377, 380], а также независимо от линии используемых мышей наблюдали прямую корреляцию между уровнем накопления цитокинов в легких и концентрацией в них вируса [237].

Таким образом, в общем виде патоморфологическая картина заболевания у человека и линейных мышей, вызванная ВГ А/Н1N1 и А/Н1N1pdm09, а также в/пат ВГП А/Н5N1, достаточно сходная и связана в основном с поражением органов респираторного тракта: в той или иной степени выраженности воспалительно-некротические изменения (пневмонии иногда с геморрагиями, бронхиты, бронхиолиты, трахеиты, риниты); репродукция вируса в различных эпителиоцитах и иногда в эндотелиоцитах кровеносных капилляров. Особенно под воздействием в/пат ВГП А/Н5N1 встречались случаи поражения и экстрареспиаторных органов (головной мозг, сердце, печень и селезенка) и цитокиновый шторм.

1.5 Использование модельных видов животных для оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) при изучении эффективности противовирусных препаратов

К настоящему времени для лечения и экстренной профилактики ортопоксвирусных заболеваний на стадии клинических исследований в США находятся 2 биодоступных при пероральном введении эффективных противовирусных химиопрепарата: эфирно-липидный аналог цидофовира (СМХ001), подавляющий репликацию дезоксирибонуклеиновой кислоты - ДНК) [143, 287], и новый ингибитор выхода патогена из клетки (ST-246) [94, 175, 231]. Для того чтобы данные химические соединения дошли до этой стадии, требовалось первоначально выполнить научно-исследовательские работы и док-

линические испытания *in vitro* с использованием не только ВВ, вирусов экстремелии, оспы коров, оспы верблюдов, оспы кроликов, но ВОО и ВНО, а также *in vivo* на ВВ, вирусах экстремелии, оспы кроликов и оспы коров. При этом значительный массив данных по этим экспериментам, убедительно доказавший наличие у химиопрепаратов CMX001 и ST-246 выраженного противооспенного действия, явился основанием для осуществления учеными дальнейших исследований на модельных видах животных с целью оценки защитной их эффективности с применением возбудителей особо опасных инфекций (ВОО и ВНО), для борьбы собственно с которыми и разрабатывались данные химиопрепараты.

В экспериментах на 11–13-недельных мышах CAST/EiJ, и/н инфицированных ц/афр штаммом ZAI-79 ВОО (доза 10^4 БОЕ) и перорально обработанных цидофовиром (1,3 мг/мышь через 4 и 24 часа п.и.), наблюдали по сравнению с контролем полное отсутствие признаков заболевания (выгибание спины, снижение массы тела на 20 % через 7–12 суток п.и., взъерошенность шерсти и адинамия) и летального эффекта [90]. Пероральное введение CMX001 (10 мг/кг через 0 суток п.и., 2,5 мг/кг через 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 суток п.и.) или ST-246 (ежедневно 100 мг/кг с 1 по 10-е сутки п.и.) 4–8-недельным мышам C57BL/6 *stat1*^{-/-}, и/н зараженным тем же штаммом ВОО в дозе 5×10^3 БОЕ, приводило к отсутствию снижения массы тела у них более чем на 25 % и гибели [92].

Однократное внутривенное введение цидофовира в дозе 20 мг/кг взрослым *Macaca cynomolgus* через 24 часа после интратарахеального заражения ц/афр штаммом MSF#6 в дозе 10^7 БОЕ полностью защищало животных от гибели, но не от появления сыпозных элементов на коже, хотя количество их было существенно меньше, чем в контроле [98]. Внутривенное введение цидофовира (20 мг/кг) параллельно с скарификационной вакцинацией Dryvax ($2,5 \times 10^5$ БОЕ) 3–6-летним *Macaca cynomolgus* и последующее (через 55 суток) внутривенное инфицирование ц/афр штаммом Zaire 79 в дозе $2,5 \times 10^5$ БОЕ приводило к снижению процента гибели животных до 17 по сравнению с контролем (67) [153]. Причем 33 % опытных животных (в контроле 100 %) имело кашель, анорексию, нарушение дыхания, дегидратацию, депрессивное состояние и адинамию. Тем не менее, у всех опытных животных, как и у контрольных, наблюдались сыпозные проявления, снижение массы тела, наличие в моноцитах крови ДНК ВОО и через 28 суток п.и. повреждения в легких. Введение же вакцины Dryvax без цидофовира приводило к 100 %-му защитному эффекту, оцененному по всем исследуемым показате-

лям. Ежедневное пероральное введение ST-246 (300 мг/кг) через 1–14 и 3–16 суток после внутривенного заражения 6-летних *Macaca cynomolgus* тем же штаммом ВОО, но в дозе 5×10^7 БОЕ, вызывало 100 %-ю защиту животных от заболевания (отсутствие внешней клинической картины) и гибели [331]. При этом у опытной группы приматов по сравнению с контрольной наблюдали снижение накопления в крови ДНК ВОО на 4–5 lg через 5–8 суток п.и., через 9 суток п.и. выравнивание уровней лейкоцитов, альбумина, аспартатаминотрансферазы, азота мочевины, алкалинфосфатазы и креатинина в крови. При пероральном ежедневном однократном введении взрослым *Macaca cynomolgus* ST-246 по 3, 10, 30 и 300 мг/кг через 3–14 суток после внутривенного заражения другим ц/афр штаммом V79-I-005 ВОО в дозе 5×10^7 БОЕ регистрировали у животных полное отсутствие летального эффекта и более низкие по сравнению с контролем количества сыпозных элементов и уровни ДНК ВОО в крови [393]. 4–8-килограммовые *Macaca mulatta*, внутривенно инфицированные штаммом Zaire 79 ВОО (доза $8,5 \times 10^7$ БОЕ) с последующим (через 24 часа п.и.) однократным внутривенным введением цидофовира (20 мг/кг), были полностью защищены от заболевания (включая отсутствие ортопоксвирусных антигенов через 4 суток п.и. в моноцитах и гранулоцитах и в крови ДНК ВОО через 4 суток п.и.) и гибели [349].

В экспериментах на 3-годовалых луговых собачках, и/н зараженных з/афр штаммом ВОО (ROC-2003-358) в дозе $3,8 \times 10^5$ БОЕ и перорально обработанных ST-246 (30 мг/кг ежедневно однократно через 0–13 суток п.и. и через 3–16 суток п.и., или в день появления сыпи и в течение 13 суток), ученые регистрировали по сравнению с контрольными животными отсутствие сыпи, адинамии, выделений из носа, потери веса, анорексии и летального эффекта, а также редкое и в более низких концентрациях по сравнению с контролем выделение патогена из ротоглоточных смывов [187].

Ежедневное однократное пероральное введение ST-246 взрослым сусликам по 100 мг/кг через 0–14, 1–14, 2–14 и 3–14 суток после п/к инфицирования ц/афр штаммом ZAI-1970 ВОО в дозе 10^2 БОЕ приводило по сравнению с контролем к отсутствию анорексии, кровотечений из носа, некроза тканей, респираторного дистресса, накопления вируса в крови, печени, легких и селезенке, лейкоцитоза, коагулопатии, трансаминаита и гибели [193]. Использование же другой схемы введения животным ST-246 (100 мг/кг через 4–14 суток п.и.) в 66 % случаев вызывало появление вышеперечисленных признаков, а также 33 %-ю гибель.

В экспериментах с использованием взрослых африканских сонь, которых и/н заражали ц/афр штаммом ZAI-79 BOO в дозах $75, 4 \times 10^3$ и 5×10^3 БОЕ с последующим (через 4 часа п.и.) однократным введением внутрибрюшинно цидофовира в дозе 2 мг/мышь, наблюдали лишь небольшой летальный эффект (19 %) по сравнению с контролем (100 %) [209].

Анализируя представленные результаты исследований, необходимо отметить, что при проведении экспериментов с BOO и широким спектром модельных для оспы обезьян видов животных: луговые собачки, нечеловекообразные приматы (*Macaca cynomolgus u mulatta*), суслики, мыши (C57BL/6 stat1^{-/-} и CAST/EiJ) и африканские сони исследованию лечебно-профилактической активности подвергали три разрабатываемых противооспенных средства (цидофовир, его аналог CMX001 и ST-246), первые 2 из которых имели сходный механизм противовирусного действия. Несмотря на то, что заражение разных видов животных проводилось различными штаммами BOO (ZAI-79, Zair-79, ROC-2003-358 и V79-I-005), способов (и/н, интратрахеальный, внутривенный и п/к) и доз введения ($7,5 \times 10^1$ – $8,5 \times 10^7$ БОЕ), результаты этого изучения убедительно продемонстрировали, что все испытываемые химиопрепараты обладали выраженным защитным эффектом. При этом ученые изучали изменения широкого спектра показателей заболевания: процент заболевших и погибших животных; степень выраженности внешних клинических признаков болезни, гематологических, биохимических и патоморфологических изменений; уровни накопления вируса, вирусного антигена и ДНК в органах, тканях и клетках. Важно также отметить, что некоторым ученым удалось получить значительный защитный эффект при применении цидофовира, CMX001 и ST-246 не только на иммунокомпетентных животных, но и на иммунодефицитных мышах CAST/EiJ и C57BL/6 stat1^{-/-}, и/н инфицированных BOO [90, 92]. Интересно, что введение химического соединения цидофовир с противооспенным вакцинным препаратом Druvax ухудшало течение заболевания у внутривенно зараженных ц/афр штаммом BOO приматов по сравнению с тем, которое наблюдалось при одиночном применении вакцины [153]. Это свидетельствует о выраженном противовирусном действии цидофовира на вирус вакцины, входящий в состав данной вакцины, в результате которого формирование противооспенного иммунного ответа в организме приматов было существенно снижено.

Животных, воспроизводящих натуральную оспу или оспу обезьян у людей, активно использовали для оценки эффективности не только лечебно-профилактических

химиопрепаратов, что рассматривалось выше, но и профилактических (вакцин). При этом обычно такие эксперименты с вакцинами на начальном этапе проводились с применением ВВ, вирусов экстремелии, оспы кроликов и оспы коров [205, 249, 348], а на завершающем (перед получением разрешения на проведение клинических исследований профилактического препарата) - на целевых патогенных для человека ортопоксвирусах (включая ВОО, с использованием африканских сонь [209], мышей C57BL/6 stat1 -/- и CAST/EiJ [90, 92], луговых собачек [200], *Macaca mulatta* [180, 385, 388, 389, 390, 404] и *Macaca cynomolgus* [98, 102, 106, 110, 152, 153, 291, 309, 313, 363, 391]).

После проведения доклинических испытаний разных видов вакцин безопасность, безвредность и эффективность некоторых из них успешно была изучена на людях (ACAM2000; Imvanex[®], известная как IMVAMUNE[®]; LC16m8), что позволило начать их производство.

Что касается гриппа, вызванного в/пат ВГП А/Н5N1 и ВП А/Н1N1pdm09, то оценку эффективности разрабатываемых препаратов для лечения и профилактики этого заболевания у человека проводили на разных видах модельных животных: чаще всего на мышах, хорьках, морских свинках, свиньях и приматах, при этом используя штаммы этих вирусов, выделенные на территории зарубежных стран. В этом направлении множество экспериментов выполнено на инбредных мышах, наиболее показательные из них отражены в таблице 1.4.

Оценку эффективности лечебных и профилактических препаратов на мышах, и/н зараженных в/пат ВГП А/Н5N1 и ВП А/Н1N1pdm09, все исследователи осуществляли, изучая те или иные основные показатели инфекционного процесса: клинические (внешние признаки заболевания, масса тела, процент летальности, средняя продолжительность жизни), вирусологические (концентрация вируса в легких и других органах), патоморфологические (световая микроскопия органов и тканей) и иммунологические (титр антител в сыворотке крови, уровень клеточного иммунитета и концентрация цитокинов). Многие из испытанных противогриппозных препаратов на модельных животных, в том числе на линейных мышах, успешно прошли клинические испытания и внедрены в практику здравоохранения. Зачастую те лекарственные средства, которые проявляли высокую лечебно-профилактическую активность у людей при сезонном гриппе, были эффективными и при пандемическом и гриппе птиц (А/Н5N1) [147, 188, 392].

Таблица 1.4 – Данные по эффективности разных лечебно-профилактических препаратов в экспериментах на лабораторных мышах, интраназально (и/н) зараженных вирусом гриппа (ВГ) А/Н1N1pdm09 и высокопатогенным вирусом гриппа птиц (в/пат ВГП) А/Н5N1

Но- мер ист-ка	Вид ли- нии мы- шей (возраст)	Название штаммов и вирусов (доза)	Название препаратов (схема их введения)	Изменение степени выраженности оцениваемых признаков болезни в опыте по сравнению с контролем	Процент ги- бели в опыте / контроле
455	BALB/c (6 нед.)	VN1203/04 в/пат ВГП H5N1 (5 LD ₅₀)	Озельтамивир (ораль- но за 5 ч д.з. 2 раза в день по 0,1 или 1, или 10 мг/кг - 5 суток)	Снижение уровня накопления вируса в легких для доз 1 и 10 мг/кг и головном мозге для 10 мг/кг; низкий процент снижения массы тела - <6, увеличение СПЖ для всех доз	100, 100, 50 (0,1; 1; 10 мг/кг со- отв.)/100
			Озельтамивир (ораль- но за 5 ч д.з. 2 раза в день по 0,1 или 1, или 10 мг/кг - 8 суток)	Снижение уровня накопления вируса в легких и головном моз- ге для доз 1 и 10 мг/кг; низкий процент снижения массы тела - > 5, увеличение СПЖ для дозы 10 мг/кг	90, 40, 20 (0,1; 1; 10 мг/кг со- отв.)/100
171	BALB/c (6–8 нед.)	А/Vietnam/1 203/2004 в/пат ВГП H5N1 (3 LD ₅₀)	Флудаз (и/н 1 или 0,7 или 0,3 мг/кг дважды в день за 1 сутки д.з. и в течение 7 или 8 су- ток п.и.)	Низкий процент снижения массы тела через 5 суток п.и., низ- кий уровень сероконверсии на 77, 12 и 13 % для 1, 2 и 3-й доз соотв., увеличение СПЖ на > 14,3; 2,7 и 4 суток для 1, 2 и 3-й доз соотв., снижение концентрации вируса в легких на 5, 4 и 4,3 lg для 1, 2 и 3-й доз соотв., а в головном мозге на > 3 lg	0, 31, 60 (1; 0,7; 0,3 мг/кг соотв.)/100
		А/Vietnam/1 203/2004 в/пат ВГП H5N1 (1,5 LD ₅₀)	Флудаз (и/н 1 или 0,7 или 0,3 мг/кг дважды в день за 1 сутки д.з. и в течение 7 или 8 су- ток п.и.)	Низкий процент снижения массы тела через 5 суток п.и., низ- кий уровень сероконверсии (на 71, 19 и 29 % для 1, 2 и 3-й доз соотв.), увеличение СПЖ на > 13,7; 12,9 и 5 суток для 1, 2 и 3- й доз соотв., снижение концентрации вируса в легких на 6, 5 и 5,5 lg для 1, 2 и 3-й доз соотв., а в головном мозге на > 1,5 lg	0, 6, 53 (1; 0,7; 0,3 мг/кг соотв.)/100
		А/Vietnam/1 203/2004 в/пат ВГП H5N1 (3 LD ₅₀)	Флудаз (и/н 1 мг/кг дважды в день за 1 сутки д.з. или через 1, 2 или 3 суток п.и. и в течение 8 или 7 суток п.и.)	Низкий процент снижения массы тела через 5 суток п.и. (в 4; 1,3; 1,4 и 1,8 раза для 1, 2, 3 и 4-й схем соотв.), увеличение СПЖ на 13,9; 4,5; 3,3 и 2,6 суток для 1, 2, 3 и 4-й схем соотв., снижение концентрации вируса в легких на 7; 3; 1,8 и 1 lg для 1, 2, 3 и 4-й схем соотв. и в головном мозге на 3,5; 3; 0,7 и 2,5 lg	5, 30, 65, 85 (за 1 сутки д.з., через 1, 2, 3 суток п.и. со- отв.)/100

Продолжение таблицы 1.4

Но- мер ист- ка	Вид ли- нии мы- шей (возраст)	Название штаммов и вирусов (доза)	Название препаратов (схема их введения)	Изменение степени выраженности оцениваемых признаков болезни в опыте по сравнению с контролем	Процент ги- бели в опыте / контроле
361	BALB/c (6–8 нед.)	A/California /07/2009 BG H1N1pdm (5 LD ₅₀)	Вакцина ЛАН-НВс VLP с адъювантом (за 3 нед. д.з. и/н 25 мг/мышь 3-кратно с интервалом 2 нед.)	Низкий процент снижения массы тела (7,2)	0/100
		A/Vietnam/1 194/2004 в/пат ВГП H5N1 (5 LD ₅₀)		Высокий процент снижения массы тела (27,1)	40/100
351	BALB/c (6–8 нед.)	A/HongKong /156/97 в/пат ВГП H5N1 (25 LD ₅₀)	Моноклональное ан- титело CR6261 (в/в однократно 15 мг/кг за 1 сутки д.з.)	Отсутствие снижения массы тела через 10 суток п.и. и сим- птомов заболевания	0/100
			Озельтамивир (ораль- но однократно 10 мг/кг за 1 сутки д.з. и в течение 5 суток п.и.)	Низкий процент снижения массы тела через 15 и 20 суток п.и.; наличие лишь некоторых симптомов у заболевших: взъеро- шенность шерсти, затрудненное дыхание, слабая реакция на раздражитель	10/100
		A/WSN/33 BG H1N1 (25 LD ₅₀)	Моноклональное ан- титело CR6261 (в/в однократно 15 мг/кг за 1 сутки д.з.)	Отсутствие снижения массы тела через 15 и 20 суток п.и., от- сутствие симптомов заболевания	0/100

Продолжение таблицы 1.4

Но- мер ист- ка	Вид ли- нии мы- шей (возраст)	Название штаммов и вирусов (доза)	Название препаратов (схема их введения)	Изменение степени выраженности оцениваемых признаков болезни в опыте по сравнению с контролем	Процент ги- бели в опыте / контроле
351	BALB/c (6–8 нед.)	A/WSN/33 BG H1N1 (25 LD ₅₀)	Озельтамивир (ораль- но однократно 10 мг/кг за 1 сутки д.з. и в течение 5 суток п.и.)	Аналогичное снижение массы тела через 15 и 20 суток п.и.; наличие лишь некоторых симптомов у заболевших: взъеро- шенность шерсти, затрудненное дыхание, слабая реакция на раздражитель	100/100
		A/HongKon g/156/97 в/пат ВГП H5N1 (25 LD ₅₀)	Моноклональное ан- титело CR6261 (в/в однократно 15 мг/кг через 4 суток п.и.)	Аналогичное снижение массы тела через 10 суток п.и.; нали- чие лишь некоторых симптомов у заболевших: взъерошен- ность шерсти, затрудненное дыхание, слабая реакция на раз- дражитель	0/100
			Озельтамивир (ораль- но однократно 10 мг/кг через 4 суток п.и. и в течение 5 су- ток)	Аналогичное снижение массы тела через 10, 15 и 20 суток п.и.; наличие сходных симптомов у заболевших: взъерошенность шерсти, затрудненное дыхание, отсутствие реакции на раз- дражитель	78/100
		A/WSN/33 BG H1N1 (25 LD ₅₀)	Моноклональное ан- титело CR6261 (в/в однократно 15 мг/кг через 4 суток п.и.)	Аналогичное снижение массы тела через 10, 15 и 20 суток п.и.; наличие сходных симптомов у заболевших: взъерошенность шерсти, затрудненное дыхание, отсутствие реакции на раз- дражитель	63/100

Продолжение таблицы 1.4

Но- мер ис- точ.	Вид ли- нии мы- шей (возраст)	Название штаммов и вирусов (доза)	Название препаратов (схема их введения)	Изменение степени выраженности оцениваемых признаков болезни в опыте по сравнению с контролем	Процент ги- бели в опыте / контроле
351	BALB/c (6–8 нед.)	A/WSN/33 BГ H1N1 (25 LD ₅₀)	Озельтамивир (ораль- но однократно 10 мг/кг через 4 суток п.и. и в течение 5 су- ток)	Аналогичное снижение массы тела через 10, 15 и 20 суток п.и.; наличие сходных симптомов у всех животных: взъерошен- ность шерсти, затрудненное дыхание, отсутствие реакции на раздражитель	0/100
191	BALB/c (6 нед.), иммуно- супрес- сирован- ные	A/Osaka/129 /2009 BГ H1N1pdm, (1000 ТЦД ₅₀ , т.е. 10 LD ₉₀) за 0, 1, 2 и 3 суток до лечения	Перамивир (в/в 1 раз в день по 40 мг/кг 1, 5, 10 или 20 суток	Снижение уровня накопления вируса в легких через 2, 6, 10 и 14 суток при лечении 5, 10 и 20 суток; низкий процент сниже- ния массы тела (7–11) при лечении 10 и 20 суток; отсутствие повреждения в легких при лечении во все сроки; снижение уровня накопления в легких ИЛ-6 при лечении 1, 10 и 20 су- ток, М-КСФ – 5, 10, 20 суток и ФНО-α – 1, 10 и 20 суток	100, 80, 20, 10 (1, 5, 10 20 суток ле- чения со- отв.)/100
			Озельтамивир (ораль- но 2 раза в день по 5 мг/кг 20 суток	Легкое снижение уровня накопления вируса в легких через 14 суток; немного ниже процент снижения массы тела (17); те же повреждения в легких; снижение уровня накопления в легких ИЛ-6, М-КСФ и отсутствие снижения уровня ФНО-α	100/100
Примечания СПЖ – средняя продолжительность жизни ИЛ-6 – интерлейкин-6 М-КСФ – макрофагальный колониестимулирующий фактор ФНО-α – фактор некроза опухоли-α В/в - внутривенно П.и. – после инфицирования Д.з. - до заражения					

Таким образом, при создании лечебно-профилактических и профилактических противооспенных лекарственных средств на этапе научных исследований и доклинических испытаний ученые проводили последовательную оценку их активности: на культурах клеток и/или модельных видах животных с использованием сначала ВВ, вирусов экстремелии, оспы коров, оспы верблюдов и оспы кроликов, а затем и возбудителей особо опасных ортопоксвирусных инфекций. В экспериментах на разных видах модельных животных для оспы обезьян и ВОО продемонстрирована высокая защитная эффективность создаваемых в настоящее время в мире 2 химических соединений (СМХ001 и ST-246), а также, как минимум, 3 вакцин (LC16m8, IMVAMUNE® и ACAM2000). При проведении испытаний противогриппозных препаратов большинство ученых использовало инбредных мышей и штаммы в/пат ВГП А/Н5N1 и ВП А/Н1N1pdm09, выделенные на территории зарубежных стран. При этом был показан выраженный антигриппозный эффект некоторых лечебно-профилактических препаратов (озельтамивир, занамивир, перамивир и др.).

1.6 Подходы к созданию модельных биосистем для изучения защитной эффективности противооспенных и противогриппозных препаратов у человека

Уровень защитной эффективности разрабатываемых лекарственных препаратов является основной характеристикой, влияющей на успех их внедрения в практику здравоохранения. Результаты его исследования на больных людях являются самыми надежными и позволяют отбирать наиболее активные лекарственные средства. Таким образом были внедрены в практику здравоохранения препараты для лечения гипертонии, диабета, некоторых онкозаболеваний и др. [124, 325, 412]. В то же время проведение исследований эффективности препаратов на людях не всегда допустимо, например, в отношении особо опасных вирусных инфекций, за исключением случаев, когда существует редкая возможность испытаний во время соответствующих эпидемических вспышек [190]. В этом плане основным способом оценки защитного потенциала препаратов от таких особо опасных вирусных инфекций, как оспа обезьян и грипп птиц (А/Н5N1), остаются исследования с использованием инфицированных вирусом животных, моделирующих эти заболевания у человека [264]. Однако абсолютного сходства в течении вирусного заболевания у животных и человека достигнуть не возможно, что связано преж-

де всего с их анатомо-физиологическими различиями. Многие ученые при поиске модельных для оспы обезьян и гриппа птиц (A/H5N1) видов животных ориентируются в основном на максимально возможное воспроизведение ими клинической картины заболевания человека [126, 240, 264]. Предпочтение исследователей сохраняется за видами животных, у которых после инфицирования вирусом, во-первых, развиваются основные клинические признаки заболевания, сходные с таковыми у человека, а во-вторых, наблюдается гибель. Общеизвестно, что лучшим критерием оценки эффективности препаратов в отношении смертельно опасных вирусных заболеваний является его способность защищать животных от летальной инфекции [69, 438].

Известно, что развитие клинических признаков, а также летальный исход в результате вирусного заболевания, являются следствием инфекционного процесса в организме хозяина и связаны с разрушением его клеток в органах и тканях, вызванным размножением вируса. Вирус-индуцированный генерализованный инфекционный процесс в своем развитии проходит 7 основных стадий: 1) проникновение вируса в первичную клетку-мишень; 2) размножение вируса в первичных клетках-мишенях; 3) распространение вируса с помощью лимфатической, кровеносной и нервной системы к вторичным клеткам-мишеням; 4) размножение вируса и повреждение (разрушение) клеток-мишеней с возможным развитием клинической картины заболевания; 5) активация иммунных механизмов защиты организма; 6) элиминация вируса из организма или его дальнейшая персистенция; 7) выделение вируса из организма [132]. При этом существующие показатели оценки эффективности препаратов с использованием модельных животных, описанные в литературе для оспы обезьян или гриппа птиц (A/H5N1), в основном ориентированы на последние стадии инфекционного процесса у животных (с 4 по 7): выживаемость (%), LD₅₀, средняя продолжительность жизни), заболеваемость (%), ID₅₀, количественные и качественные данные внешней клинической картины инфекции, а также количественные и качественные данные инструментальных методов анализа инфекции: патоморфологические изменения по органам и тканям, наличие вируса в них на поздних стадиях заболевания, гематологические и биохимические изменения, уровни цитокинов), клеточный и гуморальный иммунный ответ, выделение вируса в окружающую среду, возможность его передачи интактным животным [95, 155, 160, 192, 193, 206, 393, 408, 448]. Такой подход позволяет оценивать как лечебную, так и профилактическую эффективность противовирусных препаратов. В то же время степень выраженности вы-

шеописанных показателей, характеризующая тяжесть заболевания у животного, зависит от его чувствительности к вирусу, которая, в свою очередь, влияет на результаты оценки эффективности исследуемых препаратов [35, 93, 304].

Существует много показателей, характеризующих чувствительность организма хозяина к вирусу (LD_{50} , ID_{50} , средняя продолжительность жизни и др.). Тем не менее, наиболее распространена и более универсальна оценка чувствительности организма хозяина к вирусу, основанная на зависимости вероятности проявления показателей инфекционного заболевания от дозы вируса [449]. Использование модельных животных, обладающих более низкой чувствительностью к вирусу в сравнении с человеком по контролируемому показателю, при оценке эффективности препарата приводит к неоправданному ее завышению. Так, по наблюдению ряда ученых, показано, что выявляемая эффективность противовирусных препаратов значительно выше в испытаниях с авирулентными штаммами вирусов, чем с вирулентными [35, 284, 360]. В связи с этим для получения адекватной прогнозной информации о защитной активности препаратов для человека из экспериментов на модельных биосистемах важно иметь данные о чувствительности человека к данному вирусу (например, LD_{50} или ID_{50}). Однако подобные сведения для в/пат вирусов не могут быть получены путем прямых исследований по этическим соображениям. В этом плане не являются исключением ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1. Учитывая отсутствие таких экспериментальных данных в отношении человека, использование модельных биосистем на основе животных, высокочувствительных к этим патогенам, позволяет избежать нежелательного завышения результатов оценки эффективности препаратов. В то же время, если чувствительность модельных животных к вирусу окажется существенно более высокой, чем человека, то такие биосистемы могут не выявлять наличие защитного эффекта у некоторых препаратов, реально обладающих таковым. В результате использование данных биосистем сильно сузит эффективность поиска новых медицинских средств защиты от вирусных инфекций человека. Очевидно, что золотой серединой для создания адекватной модели заболевания человека является использование животных, чувствительность которых к выбранному штамму вируса будет близка таковой человека [35, 264].

Известно, что чувствительность животных к вирусу во многом зависит от способа его введения. При подборе и использовании модельной биосистемы для оценки протективной активности препаратов от инфекционного заболевания необходимо учитывать

существующие основные механизмы передачи соответствующего патогена среди людей. Очевидно, что для воспроизведения в организме модельного животного вирусной инфекции человека, необходимо вирус доставлять к тем же первичным органам-мишеням. Подобный подход может позволить в той или иной степени воспроизвести у животного все стадии инфекционного процесса, протекающие обычно в организме людей в случае заражения в естественных условиях, включая задействование схожих типов клеток-мишеней [126, 264, 438]. В то же время использование иных способов заражения животных вирусом инициирует получение других значений показателей их чувствительности и последовательность течения инфекционного процесса. Так, внутривенное введение приматам высоких доз ВНО или ВОО, которое приводит к быстрому одномоментному попаданию патогенов в большинство органов и тканей животных, вызывает у них развитие тяжелой скоротечной генерализованной формы инфекции [155, 215]. Такое заболевание у приматов имеет мало общего с классически описанным у людей. Эффективность препаратов, оцененная с использованием таких биосистем, скорее указывает на их способность влиять на поздние стадии развития инфекции в организме животных, исключая возможность изучения их профилактического действия, направленного на борьбу с патогеном в первичных респираторных органах-мишенях.

Для создания модельных биосистем на основе вида животных, обладающего высокой чувствительностью к вирусу, часто используется процедура адаптации патогена путем его пассирования в организме таких животных, когда он приобретает новые инфекционные свойства. Так, например, были получены вирулентные для мышей штаммы PR8 и Aichi ВГ [343, 400], а также штамм WR ВВ [444], которые используют при моделировании гриппозной и оспенной инфекции. Для изучения показателей инфекционного процесса также берут генетически модифицированные штаммы патогенов [172, 224]. Тем не менее, применение таких штаммов, в модельных биосистемах может приводить к ошибочной оценке эффективности тестируемых препаратов [35, 284, 360]. Адаптация или модификация штамма вируса являются процессами, приводящими к изменению его генетической и антигенной структуры, что влечет за собой изменение его инфекционных, вирулентных и иммуногенных свойств. Такие штаммы приобретают новые свойства, но теряют прежние. Штамм MVA ВВ был получен путем 500 пассажей штамма Ankara ВВ в фибробластах куриных эмбрионов, что привело к значимому изменению его инфекционных свойств. Штамм MVA ВВ не только изменил свой фенотип, но и потерял

части генома (9 %) [303]. Другим примером является приобретение новых фенотипических и генотипических свойств у ряда штаммов ВВ в результате делеций генов в левом и правом концах генома при пассировании в культуре клеток эритролейкемии Френда (FEL) [109]. После адаптации штамма A/Fujian/411/2002 ВГ A/H3N2 путем пассирования в куриных эмбрионах происходили похожие процессы изменения генома, которые в основном носили характер замен в генах гемагглютинирина и нейраминидазы, приведшие к изменению тропности вируса к рецепторам СА с α -2,3 связью к галактозе [311]. В то же время важно сохранить исходную генетическую и антигенную структуру вирулентного для человека вируса в модельной биосистеме, чтобы корректно определять защитную эффективность препаратов при соответствующем инфекционном заболевании. Для этого необходимо использовать вирусные штаммы, имеющие короткую пассажную историю культивирования на других нечеловеческих клеточных субстратах.

Таким образом, известные модельные биосистемы для оценки протективной эффективности противооспенных и противогриппозных препаратов в основном сориентированы на изучение последних стадий инфекционного процесса у модельных видов животных, используя при этом в ряде случаев: штаммы вирусов, генетически отличные от выделенных во время эпидемических вспышек заболеваний, не охарактеризованные по вирулентной (инфекционной) активности для человека и по пассажной истории, с низкой вирулентностью (инфекционностью) для подопытных видов животного; модельные виды животных с недоказанным сходством в отношении человека по чувствительности к штаммам; не оптимальные способы инфицирования подопытных животных штаммами с точки зрения моделирования способа инфицирования, наблюдаемого во время соответствующего эпидпроцесса. В связи с этим при разработке модельных биосистем для оценки защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (A/H5N1) необходимо учитывать возможность изучения соответствующего инфекционного процесса, в том числе начальных его стадий, включая аспекты, касающиеся выбора штамма вируса, вида животного и способа его заражения. В состав разрабатываемой модельной биосистемы должен входить штамм возбудителя вирусного заболевания, которой является актуальным с точки зрения циркуляции во время последних эпидемических и эпизоотических вспышек заболеваний особенно на территории России и иметь после его выделения минимальную пассажную историю культивирования в нечеловеческих клеточных субстратах. При выборе данного штамма необходимо сделать акцент на тот, ко-

торый обладает высокой вирулентностью (инфекционностью) для человека. Важно также обратить особое внимание на подбор модельного вида животных, который по чувствительности к этому штамму вируса будет близок человеку. При этом необходимо использовать способы заражения таких животных вирусом, максимально приближенные к тем, которые чаще всего встречаются во время эпидемических вспышек соответствующих заболеваний.

1.7 Заключение

Анализ литературных данных показал, что на настоящий момент известны модельные биосистемы для оспы обезьян на основе шести видов животных: иммунодефицитные мыши, суслики, чернохвостые луговые собачки, сони Келлена и низшие приматы (*Macaca cynomolgus* и *mulatta*). Однако эти модельные виды животных имеют некоторые существенные недостатки в части, касающейся возможности их воспроизводства в неволе, дороговизны, удобства и адекватности применения при моделировании оспы обезьян у людей:

- иммунодефицитная мышь, соня Келлена и суслик при инфицировании ВОО не воспроизводят основную симптоматику оспоподобного заболевания; первая может лишь частично моделировать инфекционный процесс у людей с подавленной иммунной системой, доля которых во время эпидемических вспышек оспы обезьян, вероятно, не очень значительна, и вряд ли может быть использована для оценки активности противовирусных средств, в основе действия которых заложен механизм их влияния на систему иммунитета; кроме того, инбредные мыши достаточно дорогие и имеют слабовыраженное генетическое разнообразие, в то время как человеческая популяция по существу представляется аутбредной (межрасовое скрещивание, межнациональное и межсемейное); соня Келлена и суслик относительно дорогие, не являются лабораторными животными и требуют специальных условий при проведении экспериментов;

- низшие приматы и луговые собачки, хоть и воспроизводят при инфицировании ВОО симптоматику оспоподобного заболевания, однако первые используются с высокими дозами ВОО (≥ 7 lg БОЕ – бляшкообразующая единица) для оценки защитной эффективности химиопрепаратов, являются дорогими животными, применение которых в экспериментах сопряжено с большими трудозатратами, а вторые плохо приживаются в

неволе и поэтому для экспериментов должны, как правило, доставляться из естественной среды обитания (Северная Америка), что сопряжено с необходимостью проведения у них оценки состояния здоровья, а также наличия/отсутствия антител к ортопоксвирусам.

Из лабораторных животных, удобных для оценки эффективности разрабатываемых для человека препаратов против гриппа птиц (А/Н5N1), чаще всего использовали относительно дорогих инбредных мышей разных линий, а также вирусные штаммы, которые не являются актуальными для России, так как они были выделены на территории зарубежных стран.

Если для сезонного ВГ, к которому в настоящее время относят и субтип H1N1pdm09, имеются экспериментальные данные по чувствительности к нему человека, то в отношении в/пат ВГП А/Н5N1, ВНО и ВОО такая информация полностью отсутствует. В то же время эти данные необходимы с точки зрения разработки адекватных модельных биосистем для оценки эффективности создаваемых препаратов против гриппа птиц (А/Н5N1), натуральной оспы и оспы обезьян, а также для лучшего понимания происходящих эпидемических процессов при этих заболеваниях и разработки тактики их лечения.

В связи с этим целью настоящих исследований явилась разработка модельных биосистем на основе актуальных высоковирулентных для человека штаммов вирусов, а также доступных и адекватных при воспроизведении болезни у людей видов животных для оценки защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1). Кроме того, наше исследование дополнительно было нацелено на осуществление прогнозной оценки чувствительности человека к ВНО, ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1 на основе опытов *in vitro* на человеческих первичных клетках-мишенях для этих патогенов.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты с живыми ВОО и ВНО были проведены на базе ГНЦ ВБ «Вектор» (Россия) в лаборатории с максимальным уровнем биологической защиты (BSL-4) с использованием изолирующих пневмокостюмов, а с живым в/пат ВГП А/Н5N1 - в лаборатории с высоким уровнем биологической защиты (BSL-3).

2.1 Лабораторные животные

В работе использовали разные виды лабораторных животных, полученные из питомника ГНЦ ВБ «Вектор»: ~250 аутбредных мышей популяции ICR 10–16-суточных обоего пола (для экспериментов с ВОО и ВНО); ~1300 аутбредных мышей популяции ICR 18–22-суточных обоего пола (для экспериментов с в/пат ВГП А/Н5N1); 16 кроликов породы Шиншилла 1,5-месячных обоего пола массой 1,5 (1,4–1,6) кг (для экспериментов с ВОО). Кроме того, в исследовании участвовали и другие виды подопытных животных: 16 лабораторных свиней породы Сибирская мини-свинья 2-месячных массой 6 (4–8) кг обоего пола (для экспериментов с ВОО), приобретенных в питомнике Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук – СО РАН (г. Новосибирск); 16 степных сурков (*Marmota bobak*) породы Байбак 1,5-месячных массой 883–1577 г обоего пола и 29 сурков той же породы 12–24-месячных массой 3,5 (3,0–4,0) кг обоего пола (для экспериментов с ВОО и ВНО), полученных из Федерального государственного унитарного предприятия «Русский соболев» питомника г. Пушкино Московской области; ~200 кур генетической линии Род-Айленд и кросса Хайсекс Вайт массой 300 (250–350) г и 550 (500–600) г (для экспериментов с в/пат ВГП А/Н5N1), не вакцинированных против в/пат ВГП А/Н5N1 и полученных из филиала Закрытого акционерного общества «Ново-Барышевская птицефабрика» (п. Кольцово Новосибирской области), а также 5 разнополых цыплят той же линии и кросса 5–7-суточных (для экспериментов с ВНО), полученных с той же птицефабрики, и 20 разнополых домашних 4-недельных гусей генетической линии A. anser породы Красноозерская (для экспериментов с в/пат ВГП А/Н5N1), полученных из гусиной фермы в селе Красноозерка Новосибирской области.

Животных содержали на стандартном рационе со свободным доступом к воде при естественном освещении. Все работы с животными проводили с соблюдением ветеринарного законодательства согласно действующим документам «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» [51] и «Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных» [54]. Исследования с подопытными животными выполняли в соответствии с одобренными биоэтической комиссией ГНЦ ВБ «Вектор» протоколами-заявками №ИМБТ/2-09.08 от 15 ноября 2008 г. и №1-01.2014 от 28 января 2014 г.

2.2 Перевиваемая клеточная культура и куриные эмбрионы

В работе с ВОО использовали полученную из коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор» перевиваемую клеточную культуру Vero (клетки почки зеленой мартышки) - коллекционный шифр 275. Монослой этих клеток выращивали в питательной среде DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) в присутствии (10 % по объему) эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота - КРС («HyClone», США) с добавлением стрептомицина (100 мкг/мл) и пенициллина (100 МЕ/мл). При культивировании вируса в качестве поддерживающей среды брали ту же среду, но с добавлением (2 % по объему) сыворотки.

В работе с в/пат ВГП А/Н5N1 использовали 9-суточные куриные эмбрионы генетической линии Род-Айланд и кросса Хайсекс Вайт, полученные из филиала Закрытого акционерного общества «Ново-Барышевская птицефабрика» (п. Кольцово Новосибирской области).

2.3 Первичные культуры клеток крови и легких человека

Процедуру взятия крови у добровольцев из вены для определения титров антител к ВВ и ВНО, а также приготовления культур клеток из этой ткани осуществляли в стационаре Федерального бюджетного учреждения здравоохранения «Медико-санитарная часть 163» Федерального медико-биологического агентства России. Кусочки легкого от людей для приготовления культур клеток забирали в Федеральном бюджетном учреждении здравоохранения «Новосибирский областной онкологический диспансер» Мини-

стерства здравоохранения РФ. Все эти мероприятия проводили согласно протоколу №3 от 02.12.13, утвержденному этической комиссией ГНЦ ВБ «Вектор».

Приготовление первичных культур клеток крови. Для получения первичных клеточных культур клеток была использована кровь от четырех добровольцев, 1–7 лет тому назад вакцинированных от натуральной оспы: мужчина 28 лет, имеющий группу крови B(III)Rh⁺ и средний геометрический титр противооспенных антител 216 PRNT₅₀/мл (обратный титр антител, вызывающий 50%-е снижение количества бляшек на инфицированном вирусом монослое культуры клеток, на мл); мужчина 53 лет, AB(IV)Rh⁺ и 128 PRNT₅₀/мл; женщина 25 лет, 0(I)Rh⁺ и 76 PRNT₅₀/мл; женщина 25 лет, B(III)Rh⁺ и 100 PRNT₅₀/мл. При этом титры антител к ВВ и ВНО определяли в реакции нейтрализации (п. 2.11). Кроме того, для приготовления первичных клеточных культур была также использована кровь от трех интактных добровольцев: мужчина 28 лет, имеющий группу крови 0(I)Rh⁺; мужчина 33 лет, B(III)Rh⁺; женщина 29 лет, A(II)Rh⁻.

Полученную кровь в растворе ЭДТА наносили на двойной градиент плотности фиколл-верографина 1,077 и 1,119 г/мл в соотношении их объемов 1:2. Через 40 мин центрифугирования с ускорением 200 g (1500–1800 об./мин) в бакет-роторе при температуре 20 °С над границей градиента плотности 1,077 г/мл забирали слой клеток с целью получения суспензии первичной культуры мононуклеаров крови (СПКМК). При получении суспензии первичной культуры гранулоцитов крови (СПКГК) слой клеток забирали между верхней и нижней границами градиентов плотности 1,077 и 1,119 г/мл. Взятые клетки дважды отмывали в питательной среде RPMI-1640 (Gibco, США) центрифугированием в течение 10 мин при 20–24 °С при 3000 об./мин. После второго центрифугирования к клеткам вносили поддерживающую питательную среду: среда RPMI-1640 с добавлением гентамицина (80 мкг/мл) и эмбриональной сыворотки КРС (2 % по объему), затем подсчитывали концентрацию клеток. До начала экспериментов СПКМК и СПКГК вносили в лунки культуральных 24-луночных планшетов по $7,5 (7,0–8,0) \times 10^5$ кл.

При получении монослоя первичной культуры моноцитов-макрофагов крови (МПКМ-МК) СПКМК по 1 мл заливали в лунки культурального 24-луночного планшета после смены питательной среды на ростовую: среда RPMI-1640 с добавлением гентамицина (80 мкг/мл) и эмбриональной сыворотки КРС (10 % по объему), затем инкубировали в течение 24 часов в атмосфере, имеющей 5 % CO₂, при температуре 37 °С. Клетки,

не адгезированные в лунках, удаляли, промывая питательной средой RPMI-1640. Перед заражением меняли среду на поддерживающую в лунках с монослоем макрофаг-подобных клеток, при этом клетки из 4 лунок снимали со дна и подсчитывали в камере Горяева, в среднем концентрация их составляла $9,0 (7,5-10,5) \times 10^5$ кл./лунку.

По результатам световой микроскопии, моноциты-макрофаги сохраняли в монослое свою жизнеспособность 7 суток при инкубировании при 34,5 и 37 °C: через 3 суток процент жизнеспособных клеток составлял ~95, а через 7 суток - ~85. Процент жизнеспособных клеток в составе суспензий кровяных гранулоцитов и мононуклеаров, при тех же условиях культивирования менялся так: через 3 суток – ~60, а через 7 суток – ~20.

Приготовление первичных культур клеток легких. Получение суспензий первичной культуры клеток легких (СПККЛ) человека осуществляли в соответствии с ранее разработанной методикой [55]. Кусочки здоровой легочной ткани брали из фрагментов резекционного материала, полученного после проведения хирургической операции по удалению части легкого, пораженного онкологическим процессом. Отсутствие онкологических изменений в тканях легких из отобранных кусочков проверяли гистологически.

Кусочки здоровой легочной ткани были получены от трех мужчин: первый 40 лет, имеющий группу крови B(III)Rh+; второй 57 лет, B(III)Rh+; третий 59 лет 0(I)Rh+. Кусочки легочной ткани измельчали на мелкие фрагменты размером 1 мм³, затем помещали в раствор трипсина с ДНК-зой для последующей инкубации в течение 35 мин при температуре 36 °C с встряхиванием через каждые 5 мин. После чего трипсин инактивировали эмбриональной сывороткой КРС («HyClone», США), введенной в концентрации 2 % (по объему), суспензию легочной ткани в растворе трипсина фильтровали последовательно через нейлоновые фильтры сначала с диаметром пор 100 мкм, затем – 40 мкм. Клеточную суспензию, прошедшую через фильтры, центрифугировали при температуре 20 °C в течение 40 мин в бакет-роторе с ускорением 200 g (1500–1800 об./мин) на градиенте плотности фиколл-верографина 1,077 г/мл. При этом клетки легкого собирали сверху над границей градиента, отмывали питательной средой RPMI-1640 2-кратным центрифугированием в том же режиме и оставляли до заражения при 4 °C в поддерживающей питательной среде в пробирках Эппендорф (по 0,9 мл). При этом в каждой такой пробирке с СПККЛ человека находилось $3,0 (2,5-3,5) \times 10^5$ клеток. По результатам

световой микроскопии, данная клеточная суспензия содержала различные типы живых человеческих клеток легких: эпителиоциты: альвеолоциты 1-го порядка 8,6 (7,5–9,7) %, альвеолоциты 2-го порядка 1,0 (0,1–1,9) %; реснитчатые клетки 2,1 (0,5–3,7) %; макрофаги 12,4 (9,0–15,8) %. Около 70 % оставшихся клеток в суспензиях были представлены лимфоцитами (60–65 %) и нейтрофилами (5–10 %). При этом жизнеспособность таких клеток в суспензии в процессе инкубирования при 37,0 °C через 1 сутки составила ~80 %, а через 2 суток - ~50 %. Приготовленные таким образом СПККЛ человека были использованы при работе с четырьмя штаммами ВГ.

Приготовление контролей на основе первичных культур клеток человека. Учитывая, что при культивировании вирусов в клеточных культурах могут наблюдаться два процесса: как их накопления, так и убыли, обусловленной термоинактивацией и возможным нейтрализующим действием клеточных мембран (непродуктивная адсорбция вируса), в качестве отрицательного контроля использовали клеточный дебрис. Его готовили путем 3-кратного замораживания-оттаивания СПККЛ или МПКМ-МК, или смеси, сделанной в равных соотношениях по количеству клеток СПКГК, СПКМК и МПКМ-МК, с последующей проверкой на отсутствие жизнеспособных клеток методом световой микроскопии и путем посева на культуральный планшет.

2.4 Первичные культуры клеток подопытных видов животных

У 10–16-суточных мышей, 12–24-месячных сурков и цыплят, не имеющих антител к ВВ в реакции нейтрализации (п. 2.11), брали отдельные органы и ткани с целью приготовления первичных клеточных культур.

Приготовление первичной культуры макрофагов селезенки мышей. Для получения монослоя первичной культуры макрофагов селезенки (МПКМС) у аутбредных мышей ICR после эвтаназии методом цервикальной дислокации брали селезенку, гомогенизировали ее в пробирке стеклянным пестиком и отмывали средой RPMI-1640. Клеточную суспензию, полученную на ростовой питательной среде, вносили в лунки 24-луночного культурального планшета по 1 мл и инкубировали в течение 24 часов в атмосфере с 5 % CO₂ при температуре 37 °C. Не адгезированные клетки на дне лунок удаляли путем промывки поддерживающей питательной средой. До эксперимента монослой макрофагов содержали в той же среде. Перед опытом клетки из 4 контрольных лунок

планшета снимали шпателем со дна и подсчитывали в камере Горяева. При этом количество клеток в лунке было в среднем $(7,5-10,5) \times 10^5$. Приготовленные таким образом МПКМС мышей и их дебрис (контроль) были использованы при работе с ВНО, при этом такие клетки, по данным световой микроскопии, длительное время (7 суток) сохраняли свою жизнеспособность в процессе инкубирования при $34,5^\circ\text{C}$: через 3 суток процент жизнеспособных клеток был ~ 95 , а через 7 суток - ~ 83 .

Приготовление первичной культуры перитонеальных макрофагов мышей.

При приготовлении монослоя первичной культуры перитонеальных макрофагов (МПКПМ) аутбредным мышам ICR вводили внутривентально по 1 мл эмульсии, включающей в себя 10 % (по объему) неполного адьюванта Фрейнда. После этого через сутки животных умерщвляли путем цервикальной дислокации, затем отбирали из брюшной полости асцитную жидкость, имеющую в своем составе и перитонеальные макрофаги. Клетки данной жидкости отмывали от адьюванта путем центрифугирования, ресуспендировали в поддерживающей питательной среде и вносили в лунки планшета по 1 мл для формирования монослоя. Перед опытом клетки из 4 контрольных планшетных лунок аккуратно снимали шпателем со дна и подсчитывали в камере Горяева. Количество клеток в лунке было $(7,5-10,5) \times 10^5$. Приготовленные таким образом МПКПМ мышей и их дебрис (контроль) были использованы при работе с ВНО, при этом такие клетки, по данным световой микроскопии, длительное время (7 суток) сохраняли свою жизнеспособность при $34,5^\circ\text{C}$ в процессе инкубирования: через 3 суток процент жизнеспособных клеток был ~ 98 , а через 7 суток - ~ 85 .

Приготовление первичных культур клеток легких мышей, сурков и цыплят.

СПККЛ получали из легочной ткани аутбредных мышей ICR, сурков и цыплят. После эвтаназии мышей и цыплят с помощью метода цервикальной дислокации, а сурков путем в/м инокуляции летальной дозы (60 мкг/кг) ветеринарного раствора для анестезии, представляющего собой смесь действующих веществ в соотношении 1:1 золазепама гидрохлорида и тилетамина гидрохлорида, проводили забор у них кусочков легких, которые от крови отмывали питательной средой RPMI-1640. Далее проводили процедуру приготовления СПККЛ, аналогичную той, которая описана в п. 2.4. Причем в каждой пробирке было $(4,0-6,0) \times 10^5$ клеток. По результатам световой микроскопии, данная клеточная суспензия содержала различные типы и количества клеток легких животных, аналогичные тем, которые описаны для СПККЛ людей (п. 2.3). Жизнеспособность этих

клеток в суспензии при инкубирования при 34,5 и 37,0 °С через 1 сутки составила ~80 %, через 2 суток – ~50 % и через 3 суток – ~30 %. Полученные таким образом СПККЛ животных были использованы при работе с ВНО и ВОО.

Приготовление контролей на основе первичных культур клеток животных.

Учитывая, что при культивировании вирусов в клеточных культурах могут наблюдаться два процесса: как их накопления, так и убыли, обусловленной термоинактивацией и возможным нейтрализующим действием клеточных мембран (непродуктивная адсорбция вируса), в качестве отрицательного контроля использовали клеточный дебрис. Его готовили путем 3-кратного замораживания-оттаивания смеси, сделанной в равных соотношениях (по количеству клеток) из МПКМС и МПКПМ мыши или из СПККЛ мыши и сурка, или из СПККЛ мыши, сурка и цыпленка, с последующей проверкой на отсутствие жизнеспособных клеток световой микроскопией и путем посева на культуральный планшет.

2.5 Вирусы

В работе использовали ц/афр штамм ВОО (V79-1-005 - Congo Basin MPXV), штамм Ind-3a ВНО, штамм Гришак вируса оспы коров, штамм ЛИВП ВВ и штамм К-1 вируса экстремелии, взятые из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ГНЦ ВБ «Вектор». При этом штамм V79-1-005 ВОО был доставлен в коллекцию в 1999 г. из Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC, США). В GenBank представлен полногеномный сиквенс данного штамма: HQ857562.1. Штамм же Ind-3a ВНО поступил в коллекцию в 1994 г. из Научно-исследовательского института (НИИ) вирусных препаратов (ныне НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова) и был депонирован под регистрационным номером V-667, его подлинность подтверждена секвенированием генома. Нарботку вирусов проводили в культуре клеток Vero в среде DMEM (ООО «БиолоТ», Россия). Применяя данные штаммы, готовили вирусодержащие суспензии в среде культивирования клеток двух препаратов ВОО и по одному ВНО, ВВ, вирусов оспы коров и экстремелии. Концентрацию вирусов оценивали методом негативных колоний при титровании в клеточной культуре Vero, рассчитывая и выражая в lg БОЕ/мл [12, 298]. Титр ВОО в первом препарате составлял 6,7 (6,6...6,8) lg БОЕ/мл, а во втором - 7,1 (7,0...7,2) lg

БОЕ/мл. Концентрации же ВНО и других ортопоксвирусов в препаратах были от 5,6 до 6,7 lg БОЕ/мл. Первый препарат ВОО применяли для заражения первичных клеток животных, кроликов и мини-свиней, а второй – сурков и мышей. Препараты с ВНО и другими ортопоксвирусами использовали только для заражения перевиваемых и первичных клеточных культур. Вирусосодержащий материал, расфасованный по 1 мл в пробирки, хранили при температуре минус 70 °С.

Исследования также проводили с использованием полученных из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ГНЦ ВБ «Вектор» восьми в/пат штаммов ВГП А/Н5N1 (внутривенный индекс патогенности, IVIP - от 2,7 до 3,0), выделенных от домашних птиц в России (A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005; A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005; A/Chicken/Kurgan/05/2005; A/Duck/Kurgan/08/2005; A/Chicken/Crimea/04/2005; A/Chicken/Omsk/2006; A/Chicken/Krasnodar/02/2006; A/Chicken/Dagestan/2006). В работе также был использован непандемический штамм A/Novosibirsk/1/2009 ВГ А/Н1N1, выделенный от больного человека во время эпидемии в Новосибирске в начале 2009 года. Все эти штаммы на 2 или 3-м пассажах (от источника выделения) были наработаны на 9-суточных куриных эмбрионах. Кроме того, исследованию подвергали также наработанный адаптированный к мышам штамм A/Aichi/2/68 ВГ А/Н3N2, полученный в 1985 г. из Научно-исследовательского института вирусологии им Д.И. Ивановского РАМН. Концентрацию вируса в аллантоисной жидкости определяли путем титрования на 9-суточных куриных эмбрионах с последующей регистрацией гемагглютинации эритроцитов петуха в образцах аллантоисной жидкости [36], рассчитывая и выражая в lg ЭИД₅₀/мл [12, 298]. Приготовленные препараты разных вирусных штаммов имели концентрацию 7,5–8,7 lg ЭИД₅₀/мл и хранились до использования в экспериментах при температуре минус 70 °С.

2.6 Методы инфицирования животных

Интраназальное инфицирование кроликов. Заражение ВОО кроликов осуществляли и/н методом после их обработки ветеринарным препаратом для наркоза «Золетил», давая в/м 20 мкг/кг массы животного. Кроликам вводили вирусосодержащую жидкость в объеме 0,5 мл в каждую ноздрю (суммарно 1 мл) в дозах ВОО 0,0; 2,0 и 4,0 lg БОЕ, беря на дозу по 4 животных. Эти эксперименты были проведены с целью определения ID₅₀ ВОО для кроликов по наличию внешних клинических признаков заболевания и/или LD₅₀. Наблюдение за этими животными осуществляли в течение 21 суток с после-

дующей эвтаназией с помощью внутривенного введения летальной дозы (100 мкг/кг) препарата «Золетил».

Интраназальное инфицирование мини-свиней. С целью наркотизации мини-свиней перед и/н заражением ВОО применяли в/м введение 20 мкг/кг массы этого животного ветеринарного препарата «Золетил». При и/н инфицировании мини-свиньям вводили вирусодержащий материал в объеме 0,5 мл в каждую ноздрю (суммарно 1 мл) в дозах ВОО -1,0; 1,0; 3,0 и 5,0 lg БОЕ, беря на дозу по 4 животных. И/н заражение мини-свиней было сделано с целью определения ID₅₀ ВОО по наличию внешних клинических признаков заболевания и LD₅₀. Наблюдение за этими животными осуществляли в течение 21 суток с последующей эвтаназией с помощью внутривенного введения летальной дозы (100 мкг/кг) препарата «Золетил».

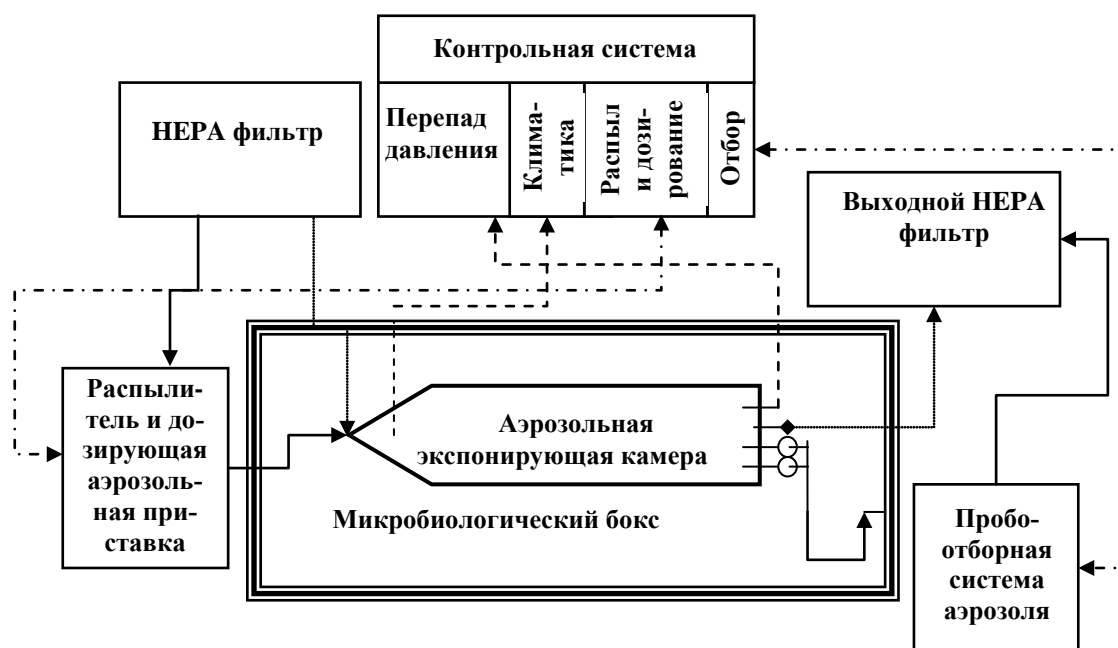
Интраназальное и подкожное инфицирование сурков. До начала исследований на сурках было установлено в традиционно поставленной реакции нейтрализации [394], что в сыворотке их крови отсутствовали антитела к ВВ. В экспериментах с использованием этих животных, инфицированных ВОО, делали измерение им ректальной температуры тела электронным термометром Thermoval (HARTMAN, Германия). Значение этого показателя у сурков до заражения их вирусом составляло 36,1–36,9 °С. П/к суркам вводили по 1 мл вирусодержащего материала в холку, а и/н - по 0,5 мл в каждую ноздрю (суммарно 1 мл), причем в последнем случае животных наркотизировали путем в/м введения 25 мкг/кг массы препарата «Золетил». В экспериментах по п/к заражению сурков ВОО, брали по 4 животных 1,5-месячных на каждую дозу: 2,6; 4,1; 5,6; 7,1 lg БОЕ, определяли чувствительность этих животных к патогену, уровень его накопления в органах и тканях некоторых из них, а также патологическую картину заболевания. Также делали и/н заражение 12–24-месячных сурков ВОО дозами -1,8; 0,2; 2,2; 4,2 и 5,0 lg БОЕ (по 4 особи на каждую дозу), а также 6,6 lg БОЕ (2 особи) и 7,8 lg БОЕ (1 особь). При этом определение ID₅₀ ВОО у сурков проводили по внешним клиническим признакам заболевания. Кроме того, была проведена попытка определения LD₅₀ ВОО для этого вида животных. За инфицированными сурками следили в течение 21 суток п.и., регистрируя количество животных с внешними клиническими симптомами болезни (ослоподобная сыпь на слизистых и коже, лимфаденит, гнойные выделения из носа, нарушение координации движения, тремор конечностей, лихорадка, взъерошенность шерсти, повышенная агрессивность) и количество погибших. При и/н инфицировании сурков ВОО

дозой 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀) изучали динамику его накопления в организме этих животных, патологические изменения в тканях и органах, а также проводили оценку эффективности противооспенных химиопрепаратов. Факт гибели животных вследствие инфекции, вызванной этим патогеном, подтверждали при определении наличия жизнеспособного ВОО и копий его генома в гомогенатах органов и тканей.

После окончания эксперимента выживших сурков эвтаназировали, вводя внутривенно летальную дозу (100 мкг/кг) препарата «Золетил».

Интраназальное и аэрозольное инфицирование мышей. После проведения ингаляционного наркоза с помощью диэтилового эфира мышам вводили и/н вирусосодержащий материал в объеме 0,03 мл суммарно в обе ноздри, используя для заражения различные его разведения. При этом мышей инфицировали в/пат ВГП А/Н5N1 или ВОО с целью определения LD₅₀ и ID₅₀ (по наличию внешних клинических признаков заболевания и/или инфекционного процесса в легких), а также для изучения динамики инфекционного процесса в организме этих животных, патоморфологической картины заболевания и оценки активности противовирусных препаратов. Эксперименты по аэрозольному инфицированию мышей с использованием только в/пат ВГП А/Н5N1 проводили аналогично методике, описанной ранее [18, 52]. Блок-схема аэрозольного стенда на основе малой динамической камеры приведена на рисунке 2.1.

Аэрозольное заражение мышей проводили в малой динамической камере при относительной влажности воздуха 50–70 % и температуре 20–24 °С. Камера позволяла одновременно инфицировать 20 мышей. Линейная скорость потока аэрозоля в канале экспонирования составляла 10 см/с, при этом время прохождения аэрозольным потоком всей камеры составляло 5–7 с. При проведении аэрозольных экспериментов в вирусосодержащую суспензию добавляли глицерин (10 % по объему). Распыление этого материала осуществляли с помощью биологического генератора аэрозоля БГ-2 с фракционирующей насадкой, создавая полидисперсный аэрозоль с медианно-массовым аэродинамическим диаметром частиц 1,1 мкм ($\delta=1,2$). Дисперсный состав аэрозоля был определен 4-каскадным импактором БП-35/25-4 после проведения предварительной его калибровки монодисперсными аэрозольными частицами. При этом для улавливания частиц с аэродинамическим диаметром менее 0,8 мкм выход импактора был соединен с фильтром АФА-БА. Разведение аэрозоля проводили с помощью дозирующей аэрозольной



— (сплошная линия) - поток воздуха и аэрозоля, включая отбор аэрозольных проб

... (точечная линия) - поток воздуха при продувке

----- (прерывистая линия) - воздушные и электрические линии измерения

— · — (пунктирная линия) - измерение параметров работы стенда и управление

Рисунок 2.1 - Блок-схема аэрозольного стенда с малой динамической камерой

приставки, изменяя диаметр диафрагмы выходного отверстия от 0,5 до 6,0 мм. Пробы аэрозоля отбирали в микроциклоны МЦ-2, в которые предварительно заливали по 10 мл сорбирующей жидкости, состоящей из раствора Хенкса (ГНЦ ВБ «Вектор», Россия), содержащего 2 % (по объему) инактивированной сыворотки крови крупного рогатого скота (ГНЦ ВБ «Вектор», Россия), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Объемная скорость отбора проб аэрозоля составляла 10,0 (9,5...10,5) л/мин.

Перед выполнением этих исследований на мышах было проведено высокоточное экспериментальное определение минутных объемов дыхания этих животных в зависимости от массы тела (после адаптации к условиям динамической камеры). При этом используемые нами 18-граммовые мыши имели минутный объем дыхания $\sim 18 \text{ см}^3/\text{мин}$. Концентрацию вируса в аэрозоле определяли путем титрования сорбирующей жидкости из пробоотборников на 9-суточных куриных эмбрионах и выражали в ЭИД₅₀/мл. Доза вируса, которую аспирировали мыши при экспонировании в аэрозоле, рассчитывали по

формуле: Доза = $C \times T \times W$, где C – концентрация вирусного аэрозоля, выраженная как ЭИД₅₀/см³; T – время экспозиции, мин; W – минутный объем дыхания животных, см³/мин. С учетом результатов наблюдения за гибелью животных получали зависимость доза-эффект и определяли LD₅₀ для различных штаммов в/пат ВГП А/Н5N1. Кроме того, в ряде случаев при аэрозольном инфицировании мышей проводили оценку ID₅₀ некоторых штаммов этого вируса по результатам его регистрации в легких через 5 суток п.и.

В ряде случаев эксперименты по определению величин ID₅₀ ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1, а также LD₅₀ в/пат ВГП А/Н5N1 для мышей при и/н и аэрозольном заражении проводили с 3-кратным повтором, используя по 4–8 особей на дозу. Факт гибели животных вследствие гриппозной инфекции подтверждали при определении наличия жизнеспособного в/пат ВГП А/Н5N1 и копий его генома в гомогенатах легких. Наблюдение за инфицированными мышами при оценке LD₅₀ вируса осуществляли в течение 16–21 суток. Эвтаназию мышей осуществляли путем цервикальной дислокации.

Внутривенное, интраназальное, оральное, интрагастральное и аэрозольное инфицирование кур. Все эксперименты на курах, полученных из птицефабрики, в которой не проводилась вакцинация этих животных против гриппа птиц (А/Н5N1), были выполнены в ряде случаев 3-кратно с использованием только в/пат ВГП А/Н5N1, заражая каждым его разведением в основном по 4–8 особей. Внутривенное введение вирусосодержащего материала в объеме 0,2 мл осуществляли через подкрыльцевую вену. И/н и оральное заражение кур проводили традиционными методами, вводя в каждую ноздрю по 0,02 мл и в ротовую полость по 0,1 мл вирусосодержащего материала соответственно. Интрагастральное инфицирование кур осуществляли следующим способом: на первом этапе в пищевод животных вводили металлическую трубку диаметром 0,7 мм с оливой на конце; затем внутри нее в желудок пропускали пластиковый катетер (внутренний диаметр – 0,4 мм), через который и вводили шприцом вирусосодержащую суспензию в объеме 0,1 мл; после этого вынимали пластиковый катетер, а затем – и металлическую трубку. Данная манипуляция позволяла практически исключить травматическое воздействие на верхние отделы пищеварительного тракта кур при интрагастральном заражении и минимизировать вероятность попадания вирусосодержащего материала в ротовую полость и пищевод животных. При оральном и интрагастральном заражении кур определяли LD₅₀ в/пат ВГП А/Н5N1, а при и/н, кроме данного показателя, исследовали динамику накопления вируса по тканям и органам этой птицы.

Эксперименты по аэрозольному инфицированию кур проводили аналогично тому, как это описано в отношении мышей. При этом минутный объем дыхания используемых кур составлял 0,13 л/мин [290]. С учетом результатов наблюдения за гибелью этой птицы получали зависимость доза-эффект (по гибели кур) и определяли, по данным аэрозольного эксперимента, LD₅₀ для различных штаммов в/пат ВГП А/Н5N1.

Факт гибели кур вследствие гриппозной инфекции подтверждали при определении наличия жизнеспособного в/пат ВГП А/Н5N1 и копий его генома в гомогенатах легких. Наблюдение за курами осуществляли в течение 16 суток с последующей эвтаназией методом цервикальной дислокации после предварительной наркотизации диэтиловым эфиром.

Интраназальное инфицирование гусей. Эксперименты на домашних гусях, полученных из фермы, в которой не проводилась вакцинация этих животных против гриппа птиц (А/Н5N1), были выполнены с использованием только одного штамма в/пат ВГП А/Н5N1 (А/Chicken/Kurgan/05/2005). С целью оценки наличия внешних клинических признаков заболевания и динамики накопления вируса в организме гусей проводили их и/н заражение, вводя животным в каждую ноздрю по 0,02 мл вирусосодержащего материала в дозе 5,5 lg ЭИД₅₀. Наблюдение за гусями осуществляли в течение 30 суток, завершив его эвтаназией методом цервикальной дислокации после предварительной наркотизации диэтиловым эфиром.

2.7 Методы изучения инфекционного процесса в первичных клеточных культурах

Изучение динамики накопления вирусов в первичных клеточных культурах. СПКГК, СПКМК и МПКМ-МК, приготовленные от человека, заражали ВНО дозами 0,001; 0,002; 0,003; 0,008; 0,017; 0,021 БОЕ/кл., а МПКМ-МК инфицировали ВВ в дозами 0,002 и 0,017 БОЕ/кл., внося по 0,1 мл вирусосодержащей суспензии в лунки культуральных планшетов. В каждой временной точке (1, 24, 48, 72, 144 часов п.и. для ВНО и 1, 24, 48, 72, 96 часов п.и. для ВВ) после проведенной инкубации материала при температуре 34,5 и 37 °С соответственно в атмосфере с 5 % CO₂ брали пробы из 4 лунок по отдельности после 3-кратной заморозки-оттайки с целью определения биологической концентрации вируса. Заражение МПКМС и МПКПМ, полученные от мышей, проводили ВНО в дозах 0,003; 0,017; 0,028 БОЕ/кл., внося вирусосодержащую суспензию по 0,1 мл в лунки

культуральных планшетов. В каждой временной точке (1, 24, 48, 72, 144, 168 часов п.и.) после проведенной инкубации материала при 34,5 °С в атмосфере, имеющей 5 % CO₂, брали пробы из 4 лунок по отдельности после 3-кратной заморозки-оттайки с целью определения биологической концентрации вируса. Аналогичным образом в экспериментах с ВНО и ВВ поступали с контрольными образцами (клеточный дебрис). Для электронно-микроскопического исследования инфицированные ВНО МПКМ-МК и МПКМС отмывали, аккуратно снимали полисменом из резины и готовили образцы. С этой же целью использовали СПКМК, зараженные ВНО, сняв предварительно полисменом клетки, фиксированные в пластиковом планшете ко дну лунок.

Заражение СПККЛ, полученных от животного (сурок, мышь и цыпленок), осуществляли одной дозой ВОО или ВНО (0,00001 БОЕ/кл.), вводя вирусодержащую суспензию в пробирки по 0,1 мл. В каждой точке по времени (1, 48, 72 часа п.и.) после проведенной инкубации материала при 34,5 °С для ВНО и 37 °С для ВОО брали пробы из 4 пробирок по отдельности после 3-кратной заморозки-оттайки с целью определения биологической концентрации вируса. Аналогичным образом поступали с контрольными образцами (клеточный дебрис).

Заражение СПККЛ человека осуществляли одной дозой (0,5; 0,05 или 0,005 ЭИД₅₀/кл.) того или иного штамма ВГ, внося вирусодержащую суспензию в пробирки в объеме по 0,1 мл. В каждой точке по времени (5 мин, 18, 24, 30, 36 и 42 часа п.и.) после проведенной инкубации материала при 37 °С брали пробы из 4 пробирок по отдельности после 3-кратной заморозки-оттайки с целью определения биологической концентрации вируса. В контрольные образцы (с клеточным дебрисом) вирусный материал вводили в одной дозе (3,5; 4,2 или 4,8 lg ЭИД₅₀/пробирку) с последующим инкубированием в течение 5 мин, 3, 6, 18 и 24 часов с последующим проведением процедуры отбора проб, аналогичной той, которая использовалась для инфицированных СПККЛ.

Определение 50 %-й инфицирующей дозы вируса и его урожайности в первичных клеточных культурах. При оценке чувствительности к ВГ, ВНО и ВОО первичных культур клеток животных и человека (измеряемой величиной CID₅₀ – 50 %-я инфицирующая для культуры клеток доза вируса) клетки заражали соответствующим возбудителем заболевания дозами от 0,02 до 2000 БОЕ/10⁶ кл. для ВНО и ВОО и от 0,00005 до 5 ЭИД₅₀/кл. для ВГ с 10-кратным шагом, используя по 6 лунок или пробирок для каждой дозы. После проведенной инкубации в термостате, условия которой уже

описаны для соответствующих первичных клеток, а также последующей 3-кратной заморозки-оттайки содержимое каждой емкости подвергали титрованию. Величины CID_{50} рассчитывали по методу Спирмена-Кербера, используя данные по наличию вируса в лунках планшетов или пробирках. CID_{50} нормировали на 1 млн. клеток, то есть определяли дозу, вызывающую инфицирование 50% образцов с монослоем или суспензией, каждая из которых содержит 1 млн. клеток, по формуле:

$$CID_{50} = CID_{50c} \times CI/10^6,$$

где CI - средняя концентрация клеток в монослое или суспензии, для которой определяли CID_{50c} . Значения CID_{50c} определяли в 3 независимых повторях для каждого вируса. Для каждой CID_{50} вычисляли по методу Спирмена-Кербера [12] дисперсию (S^2) и затем среднюю дисперсию по трем измерениям. Данные представляли в виде средней величины CID_{50} и доверительного интервала (I_{95}) с заданной вероятностью 95%.

Для определения параметра урожайности ВГ (N) в пересчете на 1 млн. клеток учитывали среднюю концентрацию клеток по 4 пробиркам и среднюю концентрацию вируса по 6 пробиркам (после 3-кратной заморозки-оттайки), соответствующим минимальной дозе вируса, вызывающей их накопление во всех 6 пробирках.

Урожайность вируса в одной клетке N вычисляли с учетом количества вируса, инактивированного во время стационарной фазы продукции, по формуле:

$$N = n_{18} + n_{18} \times k_i \times T,$$

где k_i — константа скорости инактивации вируса была рассчитана, как описано ранее [55], и составила 0,49 (0,38...0,60) час⁻¹; T равняется длительности стационарной фазы продукции вируса; n_{18} — количество вируса в среде культивирования (18 часов), соответствующее одной инфицированной клетке, вычисленное по формуле:

$$n_{18} = V_{18}/(V_0 \times \ln 2/CID_{50}),$$

где V_{18} - концентрация вируса в среде культивирования через 18 часов инкубации, V_0 – концентрация вируса в среде при инфицировании клеток (0 ч). Время взятия пробы 18 часов (из фазы стационарной продукции вируса) определено в экспериментах по изучению динамики репродукции вируса в суспензионной первичной культуре клеток. Величины N оценивали в независимых трех повторях для каждого штамма ВГ.

2.8 Подготовка биоматериалов от инфицированных животных

Приготовление органов, тканей и сыворотки крови от сурков, инфицированных вирусом оспы обезьян. В процессе изучения накопления ВОО у 5 из 16 сурков, павших после п/к заражения вирусом дозами 5,6 и 7,1 lg БОЕ, отбирали образцы следующих тканей и органов: носовая перегородка со слизистой; легкие; трахея; сердце; печень; почки; поджелудочная железа; селезенка; головной мозг; подмышечные, поднижнечелюстные, паховые и брыжеечные лимфоузлы; кусочки кожи с оспенными элементами; яички и яичники. Для микроскопических исследований у этих и двух интактных животных осуществляли забор образцов тех же тканей и органов. При изучении распространения ВОО и патологических изменений в тканях и органах и/н инфицированных сурков давали дозу заражения вирусом 3,7 lg БОЕ/гол. (30 ID₅₀, оцененную по внешней клинической картине заболевания этих животных). При этом осуществляли забор биоматериала (клетки крови, сыворотка крови, носовая перегородка со слизистой, головной мозг, трахея, бифуркационные лимфоузлы, легкие, печень, селезенка, поджелудочная железа, мезентериальные лимфоузлы, двенадцатиперстная кишка, почки, надпочечники и кожа), полученного от инфицированных сурков, используя по 1 животному на каждую точку по времени (2, 3, 5, 7, 9 и 12 суток п.и.). Для патологических исследований у этих и двух интактных животных брали те же образцы тканей и органов, а также дополнительно тимус. Забор крови у сурков осуществляли из вены на поверхности голени без анестезии. Из крови при центрифугировании получали сыворотку, а также сгусток форменных элементов. Перед забором органов и тканей сурков подвергали эвтаназии, вводя внутривенно летальную дозу (100 мкг/кг) препарата «Золетил».

Для вирусологического исследования готовили гомогенаты органов и тканей (10 %-е), инфицированных ВОО сурков, методом механической деструкции пестиком в ступке в присутствии речного песка.

Приготовление органов, тканей и сыворотки крови от мышей, инфицированных вирусом оспы обезьян. Забор проб органов и тканей (за исключением крови) у мышей осуществляли, предварительно проводя процедуру эвтаназии с помощью цервикальной дислокации. Для вирусологического исследования готовили гомогенаты органов и тканей (10 %-е), инфицированных ВОО мышей. В процессе изучения динамики накопления ВОО в легких мышей было использовано по 5 животных на каждую точку

по времени (3, 5, 7 и 10 суток п.и. дозой вируса 5,0 lg БОЕ - 400 ID₅₀, оцененной по регистрации наличия инфекционного процесса в легких), у которых брали целиком легкие для приготовления гомогенатов этих органов, объединяя соответствующие гомогенаты для каждой временной точки. При проведении исследований по определению чувствительности мышей к ВОО и оценке эффективности действия испытываемых препаратов осуществляли забор легких у инфицированных мышей через 7 суток п.и. для приготовления гомогенатов и последующего вирусологического исследования каждого из них. При этом оценку активности противооспенных препаратов проводили на мышах, зараженных вирусом в дозе 2,4 или 3,4 lg БОЕ (1 или 10 ID₅₀ соответственно). При изучении диссеминации ВОО по органам, тканям и сыворотке крови мышей, и/н зараженных вирусом дозой 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀), было взято по 4 животных на каждую точку по времени (2, 5, 7, 9 и 14 суток п.и.). У данных мышей делали забор крови из ретроорбитального венозного синуса под эфирным наркозом, из которой центрифугированием получали сгусток форменных элементов и сыворотку. При этом из первого готовили гомогенат. Кроме того, от инфицированных животных брали биоматериал (носовую перегородку со слизистой, трахею, головной мозг, бифуркационные лимфоузлы, печень, легкие, селезенку, поджелудочную железу, двенадцатиперстную кишку и почки) и готовили гомогенаты. Каждый из приготовленных биоматериалов подвергали вирусологическому исследованию.

Для светооптического и электронно-микроскопического исследования органов и тканей мышей, и/н инфицированных ВОО дозой 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀) забор биоматериала (клетки крови, головной мозг, носовая перегородка со слизистой, бифуркационные лимфоузлы, трахея, легкие, печень, поджелудочная железа, селезенка, брыжеечные лимфоузлы, двенадцатиперстная кишка, почки, надпочечники, кусочки кожи) осуществляли через 2, 5, 7, 9 и 14 суток п.и., используя по 4 животных на каждую точку по времени и контроль. При этом клетки крови получали ранее описанным способом. У мышей, и/н инфицированных ВОО дозой 5,0 lg БОЕ (400 ID₅₀), и интактных забор биоматериала (легкие, трахея, носовая перегородка со слизистой) осуществляли через 3, 5, 7 и 10 суток п.и., используя также по 4 животных на каждую точку по времени и контроль.

Приготовление органов, тканей и сыворотки крови от кур, инфицированных вирусом гриппа птиц ВГП А/Н5N1. При изучении динамики накопления штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 в организме и/н инфицированных кур до-

зой 3,2 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀) соответственно (после проведения эвтаназии путем цервикальной дислокации) готовили 10 %-е (по объему) гомогенаты биоматериалов (носовая перегородка со слизистой, трахея, легкие, пищевод, желудок, тонкий и толстый кишечник, печень, поджелудочная железа, почка, клоака, селезенка, головной мозг, поперечнополосатая мышечная ткань), а также сыворотку, полученную путем центрифугирования из сгустка крови, взятого из сердца. Данную процедуру осуществляли через 1, 18, 30, 42, 54 часа п.и., используя по 3 животных на временную точку и объединяя соответствующие гомогенаты для каждой временной точки. При изучении динамики накопления штамма A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 ВГП A/H5N1 в организме и/н инфицированных кур дозой 3,2 lg ЭИД₅₀ (3 LD₅₀) вируса работу проводили аналогично тому, как описано для кур, инфицированных штаммом A/Chicken/Kurgan/05/2005, с той лишь разницей, что набор отбираемых органов и тканей для приготовления гомогенатов был несколько сокращен (стенки носовой полости со слизистой трахея, легкие, пищевод, желудок, толстый и тонкий кишечник), и процедуру этого отбора осуществляли через 14, 24, 36 и 60 часов п.и.

Приготовление органов, тканей и сыворотки крови от гусей, инфицированных вирусом гриппа птиц ВГП A/H5N1. При изучении динамики накопления штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП A/H5N1 у домашних гусей, и/н инфицированных 5,5 lg ЭИД₅₀, (после проведения эвтаназии путем цервикальной дислокации) были приготовлены 10 %-е гомогенаты следующих органов и тканей: легкие, носовая перегородка со слизистой, трахея, головной мозг, селезенка, почки, поджелудочная железа, кишечник, лимфоузел, клоака, испражнения, а также сыворотка, полученная путем центрифугирования сгустка крови, взятой из сердца. При этом отбор данного биоматериала осуществляли спустя 3, 5, 7, 10 и 15 суток п.и., используя по 3 птицы на временную точку и объединяя соответствующие гомогенаты для каждой временной точки.

Приготовление органов и тканей от мышей, инфицированных вирусом гриппа птиц A/H5N1. При изучении динамики накопления 3 штаммов A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Duck/Kurgan/08/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в/пат ВГП A/H5N1 у мышей, и/н инфицированных 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀); 5,2 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀) и 5,8 lg ЭИД₅₀ (10 ID₅₀, рассчитанная с учетом регистрации наличия вируса в легких животных через 5 суток после и/н заражения) соответственно, были приготовлены 10 %-е гомогенаты следующих органов и тканей: легкие, носовая перегородка со

слизистой, трахея, головной мозг, селезенка, мочевой пузырь, почки, поперечнополосатая мышечная ткань и печень, а также гепаринизированная кровь. При этом отбор данного биоматериала осуществляли в течение 6–18 суток с интервалом в 1–8 суток, используя по 3 мыши на временную точку и объединяя соответствующие гомогенаты для каждой временной точки. Для патоморфологических исследований у мышей, и/н зараженных 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀) штаммом A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1, проводили забор различных тканей и органов (носовая перегородка со слизистой, трахея, легкие, пищевод, желудок, толстый и тонкий кишечник, почки, головной мозг), как правило, каждые сутки в течение 8 суток п.и., используя по 3 животных на временную точку. В качестве отрицательного контроля брали те же органы и ткани от 3 мышей, не инфицированных вирусом.

2.9 Вирусологический и молекулярно-генетический анализ проб

Концентрацию жизнеспособного ВНО, ВОО, ВВ, вирусов оспы коров и экстремелии в использованных в работе образцах определяли стандартным для ортопоксвирусов методом негативных колоний на культуре клеток Vero [394]. Титр вируса выражали в lg БОЕ/легкие или lg БОЕ/мл, а минимальная его величина, которая могла быть выявлена в исследуемых образцах при использованном нами способе титрования, составляла 1,1 lg БОЕ/легкие и 0,4 lg БОЕ/мл.

Концентрацию жизнеспособного ВГ в образцах оценивали стандартным методом [36] путем их титрования на 9-суточных куриных эмбрионах с последующей регистрацией вируса в реакции гемагглютинации. Титр вируса выражали в lg ЭИД₅₀/мл, а минимальная его величина, которая могла быть выявлена в гомогенатах тканей и органов и в сыворотке крови при взятом нами методе титрования, составляла 0,2 lg ЭИД₅₀/мл. Кроме того, оценку концентрации копий РНК в/пат ВГП А/Н5N1 в биоматериалах, полученных от и/н инфицированных кур, проводили с помощью традиционного молекулярно-генетического метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени [292]. РНК из проб выделяли методом нуклеосорбции на силикагеле с использованием набора «РИБО-сорб» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). Реакции обратной транскрипции и ПЦР-амплификации проводили с наборами реагентов «Реверта-L» и «АмплиСенс® Influenza virus A H5N1-FL» в соответствии с ин-

струкциями производителя (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). ОТ-ПЦР и детекцию продуктов амплификации в режиме реального времени производили в аппарате Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Стандартные образцы были получены из вирус-салантоисной жидкости с концентрацией в/пат ВГП А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) $8,7 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, из которой были приготовлены 10-кратные разведения.

2.10 Оценка остаточной инфекционности кусочков органов сурков, зараженных вирусом оспы обезьян

Ткани и органы (фрагменты) от ВОО инфицированных сурков объемом, не превышающем 1 см^3 при толщине не более 0,5 см вносили в стерильную полипропиленовую пробирку емкостью 50 мл, содержащую фиксирующий раствор (90 мл 4 %-го раствора параформальдегида, полученного из 8 %-го раствора путем разведения в 2 раза питательной средой DMEM). Фрагменты инкубировали 9–10 суток при $4-6^{\circ}\text{C}$ с полной заменой через каждые 3 суток фиксирующего раствора на свежий. Для определения остаточной инфекционности были взяты органы, в которых присутствовало максимальное количество вируса и которые отличались между собой тканевой архитектурой: головной мозг, легкие, почки, трахея и кусочек кожной пустулы. Половину обеззараженного фрагмента каждого органа отмывали трижды, используя 10 мл питательной среды DMEM, с целью удаления раствора параформальдегида, а затем готовили гомогенаты (10 %-е) для вирусологического исследования.

2.11 Оценка титров противооспенных антител

Оценку титров противооспенных антител в сыворотках крови людей и животных проводили в реакции нейтрализации с применением ВВ, ВОО или ВНО ранее описанным методом [394] с той разницей, что инкубирование ВНО в клетке Vero осуществляли при $34,5^{\circ}\text{C}$. Разведения исследуемой сыворотки смешивали с рабочим разведением ВОО, ВНО, ВВ, содержащим 400 – 600 БОЕ/мл. Инкубирование этих смесей проводили в течение 60 мин при 37°C для ВВ и ВОО, а также при $34,5^{\circ}\text{C}$ для ВНО, после чего их добавляли к монослою культуры клеток Vero в лунки 24-луночных планшетов. Титр сы-

воротки, подавляющий образование 50% БОЕ по сравнению с количеством БОЕ в контрольных лунках, рассчитывали по методу Спирмена-Кербера [12]. Для групп образцов сывороток рассчитывали средний геометрический титр, который представляли в виде его обратного значения на мл ($\text{PRNT}_{50}/\text{мл}$). В качестве положительного контроля использовали человеческую сыворотку с известным титром антител (206 $\text{PRNT}_{50}/\text{мл}$). В качестве отрицательного контроля брали сыворотку крови человека, не вакцинированного против натуральной оспы с титром антител менее 10 $\text{PRNT}_{50}/\text{мл}$.

2.12 Патоморфологические исследования

Для светооптического изучения образцы тканей и органов фиксировали в 4 %-м растворе параформальдегида. Дальнейшую обработку материала проводили по общепринятым способом: последовательное обезвоживание с помощью спиртов возрастающей концентрации с пропитыванием смесью ксилол – парафин и последующей заливкой в парафиновые блоки. Парафиновые срезы толщиной в 4–5 мкм готовили, используя автоматический ротационный микротом НМ-360 (Германия) и окрашивая их гематоксилином и эозином. Светооптическое исследование и микрофотосъемка проводили с помощью микроскопа Imager Z1 (Zeiss, Göttingen, Германия), оснащенного камерой HRc высокого разрешения. При анализе снимков использовали пакет программ AxioVision Rel.4.8.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Германия).

Для электронно-микроскопического изучения образцы дофиксировали с помощью 1 %-го раствора осмиевой кислоты, дегидратировали по стандартной методике, используя растворы этилового спирта с возрастающей концентрацией и ацетон, и заливали в эпон-аралдитную смесь. Ультратонкие срезы делали с помощью микротомы Райхерт-Янг (Австрия), затем контрастировали, применяя уранилацетат и цитрат свинца. Срезы исследовали с помощью электронного микроскопа JEM 1400 (Jeol Ltd., Tokyo, Япония), проводя фотосъемку встроенной цифровой камерой Jeol и цифровой камерой бокового вывода Veleta (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Германия). Снимки обрабатывали и анализировали с помощью пакета программ iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Германия).

2.13 Исследуемые противовирусные препараты

В работе с ВОО, ВВ, вирусами оспы коров и экстремелии была использована новая серия № 4П химического соединения, синтезированного в Новосибирском институте органической химии (НИОХ) им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, ранее продемонстрировавшего в опытах *in vitro* противовирусную активность на ортопоксвирусах: 7-[N'-(4-Трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновая кислота (НИОХ-14) [30], а также соединение, синтезированное той же организацией, ранее показавшее слабой противовирусный эффект в опытах *in vitro* в отношении ортопоксвирусов: Гидрат N-{3,5-диоксо-4-азатетрацикло[5.3.2.0^{2,6}.0^{8,10}]додец-11-ен-4-ил}-2-гидроксибензамида - серия № 1С (НИОХ-32). В качестве положительного контроля брали серию № 1 химического соединения с установленным противооспенным действием: 4-трифторметил-N-(3,3а,4,4а,5,5а,6,6а-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етеноциклопроп[f] изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид (ST-246), приготовленное для исследовательских работ в НИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН по методике, описанной в патенте [324]. Все лабораторные образцы химически синтезированных соединений были охарактеризованы, а также паспортизованы, их подлинность подтверждалась ИК спектроскопией, данными спектров ЯМР и элементного анализа.

В работе с в/пат ВГП H5N1 исследованиям подвергали коммерческие препараты с ранее доказанной лечебно-профилактической активностью против сезонного гриппа и птичьего гриппа (А/H5N1) - Тамифлю® (Озельтамивир) производства фирмы Хоффманн-Ля Рош Лтд. (Швейцария), а также против сезонного гриппа - Реаферон ЕС-липид® производства ЗАО «Вектор-Медика» (Россия).

2.14 Определение цитотоксичности и антиортопоксвирусной активности химических препаратов

Для определения противовирусной активности химиопрепаратов НИОХ-14, ST-246 и НИОХ-32 и их цитотоксичности в отношении ВОО, ВВ, вирусов оспы коров и экстремелии была адаптирована нами методика с применением 96-луночных пластиковых культуральных планшетов [120]. Для учета результатов использовали планшетный спектрофотометр Emax (Molecular Devices, США), а также программу SoftMax 4.0 (Molecular

Devices, США), которая автоматически рассчитывала 50 %-е токсические (TC_{50}) и ингибирующие (IC_{50}) концентрации препаратов. По соотношению TC_{50} и IC_{50} определяли индекс селективности (IS).

2.15 Схемы применения препаратов у инфицированных вирусами сурков и мышей

При расчете эквивалентных для мышей и сурков доз исследуемых препаратов были использованы ранее опубликованные сведения [286, 381], где научно обосновано применение повышенных величин таких доз в пересчете на единицу массы мелких лабораторных животных.

Эксперименты с использованием вируса оспы обезьян. Оценки эффективности антиортопоксвирусных химиопрепаратов осуществляли на мышах, которых заражали ВОО в дозах 2,4 и 3,4 lg БОЕ (соответственно 1 и 10 ID_{50} , оцененные по регистрации наличия инфекционного процесса в легких). Суспензию химических соединений НИОХ-14, ST-246 и НИОХ-32, приготовленных на основе раствора метилцеллюлозы с твином-80 вводили в дозах 30 или 60 мг/кг массы мыши перорально 1 раз в сутки (за 1 сутки до заражения ВОО, а затем в течение 6 суток п.и.). При изучении эффективности антиортопоксвирусных химиопрепаратов использовали также сурков, которых заражали и/н ВОО дозой 3,7 lg БОЕ/гол (30 ID_{50} , оцененная по клинической картине заболевания). Обработку животных химически синтезированными соединениями ST-246 и НИОХ-14 проводили перорально в виде суспензии дозой 40 мг/кг массы ежедневно 1 раз в сутки (за 1 сутки до заражения ВОО, а затем в течение 10 суток п.и.). Для этого животным после ручной фиксации без анестезии вводили в полость рта через угол его отверстия за большими коренными зубами, используя автоматическую пипетку, 5 мл суспензии исследуемого химиопрепарата, приготовленного на растворе метилцеллюлозы с твином-80.

Контрольной группе сурков и мышей по этой же схеме и этим же способом давали водный раствор метилцеллюлозы (0,75 %) и твина-80 (1 %), который использовали для приготовления суспензий химиопрепаратов НИОХ-14, ST-246 и НИОХ-32. В течение 21 суток п.и. ВОО в группах сурков оценивали количество погибших животных и животных, имеющих внешние клинические признаки заболевания. По полученным данным рассчитывали два показателя:

- коэффициент защиты от заболевания (КЗЗ) сурков = (% заболевших в контроле - % заболевших в опыте) / % заболевших в контроле;

- коэффициент защиты от гибели (КЗГ) сурков = $100\% \times (\% \text{ погибших в контроле} - \% \text{ погибших в опыте}) / \% \text{ погибших в контроле}$.

В то же время при экспериментах на мышах рассчитывали титр ВОО в легких через 7 суток п.и. после приготовления гомогенатов, чтобы оценить два показателя:

- коэффициент защиты от инфицирования (КЗИ) = $100\% \times (\% \text{ животных в контроле, имеющих вирус в легких} - \% \text{ животных в опыте, имеющих вирус в легких}) / \% \text{ животных в контроле, имеющих вирус в легких}$;

- индекс подавления продукции вируса (ИППВ) в легких = $\lg \text{ количества вируса в легких контрольной группы животных} - \lg \text{ количества вируса в легких опытной группы животных}$.

Через 28 суток п.и. у всех выживших сурков из контрольной и опытных групп в эксперименте по исследованию эффективности лекарственных химиопрепаратов проводили определение титров антител к ВОО в сыворотках крови по методике описанной ранее [394].

Эксперименты с использованием вируса гриппа птиц А/Н5N1. В работе со штаммом A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 изучали лечебно-профилактическое действие препаратов Тамифлю® и Реаферон-ЕС-липид®, которые вводили мышам, используя следующие различные схемы применения (таблица 2.1).

В группах мышей, обработанных препаратами и и/н инфицированных 1,6 или 2,1 \lg ЭИД₅₀ (3 или 10 LD₅₀ соответственно) вирусом, в течение 16 суток п.и. оценивали количество погибших животных для определения КЗГ, как описано выше, и СПЖ. При определении последнего показателя в каждой экспериментальной группе учитывали число животных, проживших определенное количество дней п.и. до гибели и число выживших животных. За максимальное значение продолжительности жизни для выживших животных принимали 16 суток, т.е. гарантированное время прекращения специфической гибели инфицированных мышей, что было установлено эмпирически при многократном повторении аналогичных экспериментов [70].

Таблица 2.1 – Используемые схемы введения аутбредным мышам ICR препаратов Реаферон-ЕС-липинт® и Тамифлю®, а также плацебо в экспериментах с высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н5N1

Наименование препарата	Доза в день и метод введения	Проверяемый вид защитного действия	Схема введения
Реаферон-ЕС-липинт®	1000 ед. (перорально)	Профилактический	2 раза в сутки за 4–1 сутки и за 1 час д.з.
		Лечебно-профилактический	2 раза в сутки в день заражения, далее в течение 6 суток п.и.
		Лечебный	2 раза в сутки через 3–9 суток п.и.
Тамифлю®	0,2 мг (перорально)	Лечебно-профилактический	За 1 час д.з., через 4 часа п.и., далее 2 раза в сутки в течение 6 суток
		Лечебный	Через 4 часа п.и., далее 2 раза в сутки в течение 4 суток
Дистил. вода (плацебо)	0,2 мл (перорально)	Лечебно-профилактический	2 раза в сутки за 4–0 суток д.з. и 1–10 суток п.з
Примечания Д.з. – до заражения П.и. – после заражения			

2.16 Экстраполяция на человека и животных 50 %-х инфицирующих доз вируса, полученных с использованием первичных культур клеток

Применяли созданный ранее частный алгоритм прогнозной оценки ID₅₀ для хозяина, используя эксперименты на первичных культурах клеток органа-мишени, взятых от лабораторного модельного вида животных и хозяина, адекватность которого ранее была показана для вирусов гриппа и Марбург [13, 55, 421]. Была выбрана упрощенная

модель прогнозирования, предназначенная для экспресс-оценки потенциальной чувствительности хозяина, благодаря тому, что в модели учитывается только один показатель восприимчивости клеток, характеризуемый CID_{50} , при условии, что анализируемые клетки не только чувствительны к патогену, но и обладают продуцирующей вирус способностью ($N > 0$). Прогноз дозы вируса (CID_{50}) для целевого объекта (человека или животного, отличающегося от модельного) и/или патогена (отличного от модельного) делали по уравнению:

$$lgID_{50} = lgID_{50m} - lgCID_{50m} + lgCID_{50},$$

где индекс «m» относит параметр к модельному виду животных и/или вирусу, а без индекса параметр соответствует целевому объекту и/или патогену. Дисперсию S^2_{prog} прогнозной величины $lg ID_{50}$ считали равной величине дисперсии дозы $lg ID_{50m}$ модельного животного и/или вируса.

2.17 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов и их сравнение проводили стандартными методами [12] с помощью компьютерного программного пакета «Statistica 6.0» (StatSoft Inc. 1984–2001) [70] с оценкой достоверности отличий. Принятие гипотез о средних величинах, характеристиках рассеяния совокупностей значений, а также законов их распределений проводили на уровне значимости $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$). Вид распределения совокупностей данных оценивали, используя критерий согласия Колмогорова – Смирнова [12]. Доверительный интервал для средних величин вычисляли с заданной вероятностью 95%. Для данных в выборках оценку дисперсий на однородность проводили с использованием одностороннего F-критерия для дисперсий [12].

Концентрации вирусов в органах и тканях (гомогенатах), а также сыворотке крови представлены, как средние значения (M) с 95 %-м доверительным интервалом (I_{95}). В случаях, когда концентрация вируса в гомогенатах органов была ниже порога чувствительности способа титрования, при расчете средней использовали саму величину этого порога: 1,1 lg БОЕ/легкие или 0,4 lg БОЕ/мл.

Сравнение средних величин концентраций вируса в тканях и органах (гомогенатах), культурах клеток, а также показателей продуктивности/урожайности (N) вируса в клетке проводили при нормальном распределении их совокупностей значений, исполь-

зуя двусторонний t-критерий Стьюдента с учетом объемов выборки и характера дисперсий. Также для повышения надежности, полученных результатов, осуществляли сравнение средних значений для данных по выборкам, применяя непараметрический двусторонний U-критерий Манна-Уитни [12]. В случаях, когда возможным не представлялось оценить в выборках нормальность распределения, а также для титров противооспенных антител сравнение средних величин совокупностей проводили только, используя непараметрический двусторонний U-критерий Манна-Уитни.

Значимость отличий средних величин ID_{50} (CID_{50} , ID_{50} , LD_{50}) проверяли (в том числе при оценке отличий прогнозных значений ID_{50} с полученными экспериментальным путем) по двустороннему z-критерию [12].

$$z = \frac{|lgID_{50\ pred} - lgID_{50\ exp}|}{\sqrt{S_{pred}^2 + S_{exp}^2}},$$

где индекс «pred/exp» относит параметр к прогнозному/экспериментальному значению.

При этом в качестве дисперсии средней величины ID_{50} использовали среднюю величину (S^2) дисперсий всех измеренных ID_{50} .

Сравнение долей зараженных мышей в группах проводили 2 разными методами: по двустороннему χ^2 -критерию (при малых выборках использовали поправку Йетса), а также двустороннему точному тесту Фишера [12, 70]. Парный корреляционный анализ данных проводили путем определения коэффициента (R) ранговой корреляции Спирмена, поскольку по характеру данные не относятся к нормально распределенным. При этом значения R от 0,7 до 1,0 свидетельствовали о сильной корреляционной зависимости [12]. СПЖ в группах сравнивали с помощью U-критерия Манна-Уитни для кривых Каплана-Маера [70].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3 СТРАТЕГИЯ ПОИСКА МОДЕЛЬНЫХ БИОСИСТЕМ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ОТ ИНФЕКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА, ВЫЗВАННЫХ ВИРУСАМИ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН И ГРИППА ПТИЦ А/Н5N1

Проведенный анализ литературы (п. 1.6) по вопросу, связанному с разработкой подходов по созданию модельных биосистем для оценки эффективности средств медицинской защиты от вирусных инфекций, свидетельствует о том, что исследования в этом направлении сориентированы в основном на воспроизведение с помощью животных последних стадий инфекционного процесса человека, включая внешнюю клиническую симптоматику заболевания [92, 193, 209]. При этом зачастую применяют методы заражения патогеном, которые не моделируют формирования начальной стадии инфекционного процесса у человека. Например, воспроизведение оспы обезьян или натуральной оспы у людей с помощью приматов осуществляется путем внутривенного введения ВНО или ВОО [98, 331, 349], что приводит к реализации сразу 2 и 3-го этапов распространения патогена (доставка вируса с помощью кровеносной системы к вторичным органам-мишеням и его размножение в них соответственно), минуя первый (репродукция вируса в респираторных органах), который наблюдается у человека (известных модельных видов животных для ортопоксвирусных инфекций при заражении через дыхательный тракт) [303, 362, 374]. В рамках данного раздела представлена созданная нами более широкая стратегия дифференцированного поиска модельных биосистем, направленная главным образом на воспроизведение инфекционного процесса, наблюдаемого у человека, в том числе начальных его стадий.

В рамках данного раздела представлена созданная нами более широкая стратегия дифференцированного поиска модельных биосистем, направленная главным образом на воспроизведение инфекционного процесса, наблюдаемого у человека, в том числе начальных его стадий.

Учитывая то, что в состав разрабатываемой модельной биосистемы, кроме соответствующего вида животных, должен входить возбудитель вирусного заболевания, крайне важно подобрать такой его штамм, который является актуальным с точки зрения циркуляции во время последних эпидемических и эпизоотических вспышек заболеваний

особенно на территории России. При выборе данного штамма необходимо также сделать акцент на тот, который обладает более высокой вирулентностью для человека.

При этом для оценки вирулентности в отношении людей того или иного штамма вируса существует экспериментальный подход, основанный на экстраполяции величины его инфекционности с модельного вида животного на человека, используя при этом их первичные культуры клеток, которые являются мишенью для соответствующего патогена и располагаются в органах входных ворот инфекции [11, 13, 55]. Причем данный подход может быть реализован в основном в отношении тех возбудителей особо опасных вирусных инфекций, у которых инфекционный процесс, как правило, сопряжен с внешними клиническими проявлениями (возможным летальным исходом), что практически ставит знак равенства между показателями их инфекционности и вирулентности.

Что касается другой составляющей модельной биосистемы, то для изучения эффективности лечебно-профилактической активности разрабатываемых противовирусных препаратов на стадиях научных исследований и доклинических испытаний важно иметь не менее 2 видов животных, воспроизводящих соответствующее заболевание у человека. Это нужно для того, чтобы обосновать перед национальными органами контроля (например, перед Научным центром экспертизы средств медицинского применения - НЦ ЭСМП, Россия; Управлением по лекарственным препаратам и продовольственным продуктам - FDA, США; Европейским агентством по контролю лекарственных средств – ЕМА, Великобритания) необходимость проведения в дальнейшем клинических испытаний препаратов.

Для экстраполяции лабораторных данных на человека, как биологический вид, одним из определяющих элементов является адекватность используемых моделей целям испытаний [10]. В этом плане для прогностически значимой оценки пригодности противовирусных препаратов для защиты от особо опасных инфекций может быть положена гипотеза о тождественности влияния препарата (с учетом фармакодинамики и фармакокинетики) на инфекционный процесс, в случае его сходного развития у модельного вида животного и человека [35].

Учитывая то, что существующие и создаваемые противовирусные препараты, как правило, сориентированы на непосредственное или опосредованное действие на патоген, направленное на снижение концентрации его в организме зараженных людей, основной путь поиска вида модельных животных должен основываться на правдоподоб-

ном воспроизведении соответствующего инфекционного процесса у человека с момента заражения до завершения заболевания (летальный исход или выздоровление). Однако найти модельное животное, доподлинно удовлетворяющее данному глобальному требованию, невозможно.

С целью систематизации требований, предъявляемых к модельному виду животных, который предполагается использовать для оценки эффективности разрабатываемых препаратов против инфекционных заболеваний, важно сконцентрировать внимание на патогене (на борьбу с которым направлено основное действие исследуемого лекарственного средства), а точнее на диссеминации его в чувствительном макроорганизме. В этом случае необходимо ориентироваться на введение в организм подопытных животных таких доз патогена, которые обычно используют при проведении доклинических исследований: от 10 ID₅₀ (LD₅₀) [69].

Говоря об оспе обезьян и гриппе птиц (A/H5N1), имеющих генерализованные проявления у человека, необходимо отметить три основных этапа распространения патогена в чувствительном макроорганизме:

- 1-й, связанный с репродукцией возбудителя заболевания в первичных органах-мишенях входных ворот инфекции (дыхательный тракт);
- 2-й, связанный с доставкой возбудителя заболевания той или иной системой (кровеносная и/или лимфатическая) от первичных к вторичным органам-мишеням, при этом вирус может перемещаться пассивно или активно, размножаясь, например, в клеточных элементах лимфы или крови, в эндотелии сосудов или клетках лимфоузлов;
- 3-й, связанный с репродукцией возбудителя заболевания во вторичных органах-мишенях.

Испытание противовирусных средств на модельных видах животных в общем виде направленно на оценку их лечебной и профилактической активности, ориентируясь на те или иные этапы распространения патогена у человека, которые воспроизводит данная модель. Несомненно, основной задачей исследователей является поиск такого вида животного, которое бы моделировало все эти этапы у человека. С целью систематизации требований к этим моделям были отобраны следующие основные критерии, по которым важно получить сходные между человеком и исследуемым видом животных значения показателей взаимодействия с патогеном:

- 1) по возможности заражения модельного вида животных (необходим для создания условий по инициации инфекционного процесса предпочтительно во входных воротах инфекции);
- 2) по величине ID_{50} (необходим для формирования оптимальных схем количественного использования лекарственных препаратов, направленных на инактивацию известной дозы возбудителя заболевания, с целью предотвращения взаимодействия его во входных воротах инфекции с чувствительными клетками первичного органа-мишени);
- 3) по типу основных первичных органов-мишеней (сориентирован на возможность наиболее эффективной доставки лекарственных препаратов в конкретный орган-мишень);
- 4) по видам основных клеток-мишеней в первичных органах-мишенях (сориентирован на возможность наиболее эффективной доставки лекарственных препаратов в соответствующие клетки-мишени);
- 5) по наличию п.и. патогеном ($10-100 ID_{50}$) максимального уровня его репродукции в первичном органе-мишени, превышающего $3 \lg ЭИД_{50}/мл$ ($БОЕ/мл$) гомогената (при максимальной пороговой величине чувствительности способа титрования $1 \lg$ у.е./мл, при обычно встречающемся стандартном отклонении 0,5, а также при дельте не менее 4σ между величинами порога чувствительности способа титрования и показателя репродукции возбудителя заболевания в исследуемом органе в контроле; интервал 4σ включает в себя при нормальном распределении 99,99 % всех величин титров патогена [12]) (связан с возможностью использования метода количественной оценки эффективности лекарственных препаратов по результатам выявления вируса в первичном органе-мишени);
- 6) по типу основной системы (кровеносная или лимфатическая) доставки возбудителя заболевания к вторичным органам-мишеням (сориентирован на возможность наиболее эффективной доставки лекарственных препаратов в конкретную основную систему доставки вируса к вторичным органам-мишеням);
- 7) по механизму (пассивный - без размножения возбудителя заболевания в системе доставки, активный – с размножением) диссеминации патогена в направлении вторичных органов-мишеней (направлен, особенно при активном распространении вируса к вторичным органам-мишеням, на возможность наиболее эффективной доставки лекар-

ственных препаратов в конкретные клетки-мишени соответствующей системы доставки патогена);

8) по наличию п.и. патогеном ($10-100 ID_{50}$) максимального уровня его репродукции в основной системе доставки его к вторичным органам-мишеням, превышающего $3 \lg ЭИД_{50}/мл$ (БОЕ/мл) гомогената (связан с возможностью использования метода количественной оценки лечебной эффективности лекарственных препаратов по результатам выявления возбудителя заболевания в основной системе его доставки к вторичным органам-мишеням);

9) по типу основных вторичных органов-мишеней (сориентирован на возможность наиболее эффективной доставки лекарственных препаратов в соответствующие вторичные органы-мишени);

10) по видам основных клеток-мишеней в основных вторичных органах-мишенях (сориентирован на возможность наиболее эффективной доставки лекарственных препаратов в конкретные клетки-мишени в основных вторичных органах-мишенях);

11) по наличию п.и. патогеном ($10-100 ID_{50}$) максимального уровня его репродукции в основных вторичных органах-мишенях, превышающего $3 \lg ЭИД_{50}/мл$ (БОЕ/мл) гомогената (связан с возможностью использования метода количественной оценки защитной эффективности лекарственных средств по выявлению вируса в соответствующих вторичных органах-мишенях);

12) по основным внешним клиническим проявлениям болезни, включая, возможно, гибель (связан с возможностью использования способа оценки защитной эффективности лекарственных средств по наличию/отсутствию основной симптоматики заболевания, включая гибель).

Говоря об универсальном виде модельных животных, который мог бы использоваться для всестороннего изучения эффективности лекарственных препаратов, оптимальнее всего было бы подобрать такой его вид, который имел бы близкие человеку значения показателей взаимодействия с патогеном, определенные по всем вышеперечисленным критериям. Кроме того, исходя из реальной возможности применения в вирусологических экспериментах модельных видов животных, важно, чтобы были максимально низкими их стоимость и трудоемкость осуществления с ними исследований.

Таким образом, представлена общая стратегия поиска модельных биосистем для изучения защитной эффективности препаратов от вирусных заболеваний, направленная

главным образом на воспроизведение в организме человека, тех или иных стадий инфекционного процесса, в том числе начальных. При этом выбор штамма вируса, как составляющей части этой биосистемы, предполагается проводить из числа актуальных (с точки зрения циркуляции во время последних эпидемических и эпизоотических вспышек заболеваний, особенно на территории России), акцентируя внимание на тот, который обладает высокой вирулентностью для человека. С целью систематизации требований к видам модельных животных (другая составляющая часть биосистемы) был разработан подход их выбора на основе отобранных только самых важных критериев, по которым должны быть получены сходные между человеком и исследуемым видом животных величины показателей взаимодействия с возбудителем заболевания. Базируясь на этой стратегии, было выбрано дальнейшее направление исследований, сориентированное на разработку модельных биосистем для оценки протективной активности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (A/H5N1). В этой связи в разделах 4 и 5 данной диссертации будут приведены экспериментальные данные, нацеленные на подбор соответствующих штаммов возбудителей этих заболеваний и приемлемых для нас видов модельных животных, воспроизводящих у человека в основном начальные стадии инфекционного процесса или все стадии, включая клиническую картину болезни, для изучения эффективности создаваемых противовирусных препаратов.

4 ПОИСК МОДЕЛЬНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН ПО ИЗУЧЕНИЮ ЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА

4.1 Экспериментальная и прогнозная оценка чувствительности людей и подопытных животных к патогенным ортопоксвирусам

4.1.1 Оценка чувствительности первичных клеток-мишеней животных и человека к патогенным ортопоксвирусам

4.1.1.1 Данные по чувствительности первичных клеток-мишеней животных к возбудителю оспы обезьян

С целью выбора штамма ВОО и чувствительного для него вида животных первоначально были проведены эксперименты *in vitro* по изучению инфекционной активности (CID₅₀) ц/афр штамма ВОО (V79-1-005) в первичных клетках-мишенях мышей и сурков. Для принятия решения о возможности использования в кандидатной модельной биосистеме данного штамма и выбранного вида животных в дальнейшем была выполнена прогнозная и прямая экспериментальная оценка величин ID₅₀ вируса для этих видов животных (п. 4.1.2 и 4.1.3), в том числе используя результаты, полученные в опытах *in vitro*. Учитывая то обстоятельство, что в России не было случаев оспы обезьян среди животных и людей, а также низкий показатель изменчивости возбудителя этого заболевания, в роли инфекционного агента применяли во всех экспериментах известный его штамм ВОО V79-1-005, относящийся к кладе ц/афр штаммов, обладающих более выраженной вирулентностью для людей с летальностью до 17 % [178, 227, 256]), чем з/афр (летальные случаи не описаны [454]).

Несмотря на то, что большинство ученых проводило поиск видов животных из числа высоко чувствительных к ВОО по данным регистрации внешних клинических проявлений заболевания, близких к таковой у людей, тем не менее, при исследованиях, по данным экспериментов *in vitro*, мы сконцентрировались в направлении изучения инфекционного процесса в клетках легких (в одном из первичных основных органов-мишеней для ВОО) приемлемых для нас видов животных. Для этого, кроме 10–14-суточных аутбредных мышей ICR, исследованию подвергли и два 1–2-летних степных сурка массой 3,5 и 4,0 кг.

Использование мышей раннего возраста с целью изучения чувствительности к ВОО обосновывалось тем, что в научных публикациях имеется информация об их спо-

способности проявлять некоторые клинические признаки заболевания вплоть до летального исхода при инфицировании вирусом и/н или другими методами [73, 100, 301]. При этом, беря неполовозрелых животных такого вида мы попытались воспроизвести инфекционный процесс у людей детского возраста, заболевание (оспа обезьян) у которых встречается чаще и течет тяжелее, чем у взрослых [195, 263, 299]. Более того, аутбредные животные обладают в большей степени генетическим разнообразием, чем инбредные, как и человеческая популяция (межрасовое, межнациональное и межсемейное скрещивание). Основанием по включению в экспериментальные исследования степного сурка было то, что среди животных из семейства беличьих в России, основные представители которого проявляли высокую чувствительность к ВОО [156, 213, 426], наиболее для нас доступным был именно данный вид животных, имеющий широкий ареал обитания, и который (в отличие от луговых собачек и сусликов) воспроизводят в специализированных питомниках нашей страны и при этом подвергают ветеринарному контролю, в том числе тестированию на отсутствие патогенных микрофлоры и гельминтов. Сурок - это один из самых крупных видов животных в данном семействе (его масса может достигать - 10 кг, а длина тела 70 см) и имеет физиологические параметры (температура тела, частота пульса и дыхательных сокращений), близкие таковым у человека.

Первоначально нами была сделана попытка экспериментальной оценки степени чувствительности к ВОО первичных клеточных культур легких мышей и сурков, произведенных ранее разработанным нами методом [3, 13, 63] с максимальным сохранением жизнеспособности всех типов клеток этого органа при культивировании в течение 3 суток. Перед приготовлением таких культур используемые сурки были исследованы на отсутствие специфических антител к ВВ в реакции нейтрализации с помощью ранее описанного метода [393]. Применение данной культуры клеток в исследованиях с ВОО было основано на том, что главные первичные клетки-мишени, ориентируясь на данные, полученные с этим вирусом на разных модельных видах животных [96, 318, 424], располагаются в дыхательном тракте (клетки системы мононуклеарных фагоцитов - макрофаги и эпителиоциты), с которых и начинается соответствующий инфекционный процесс.

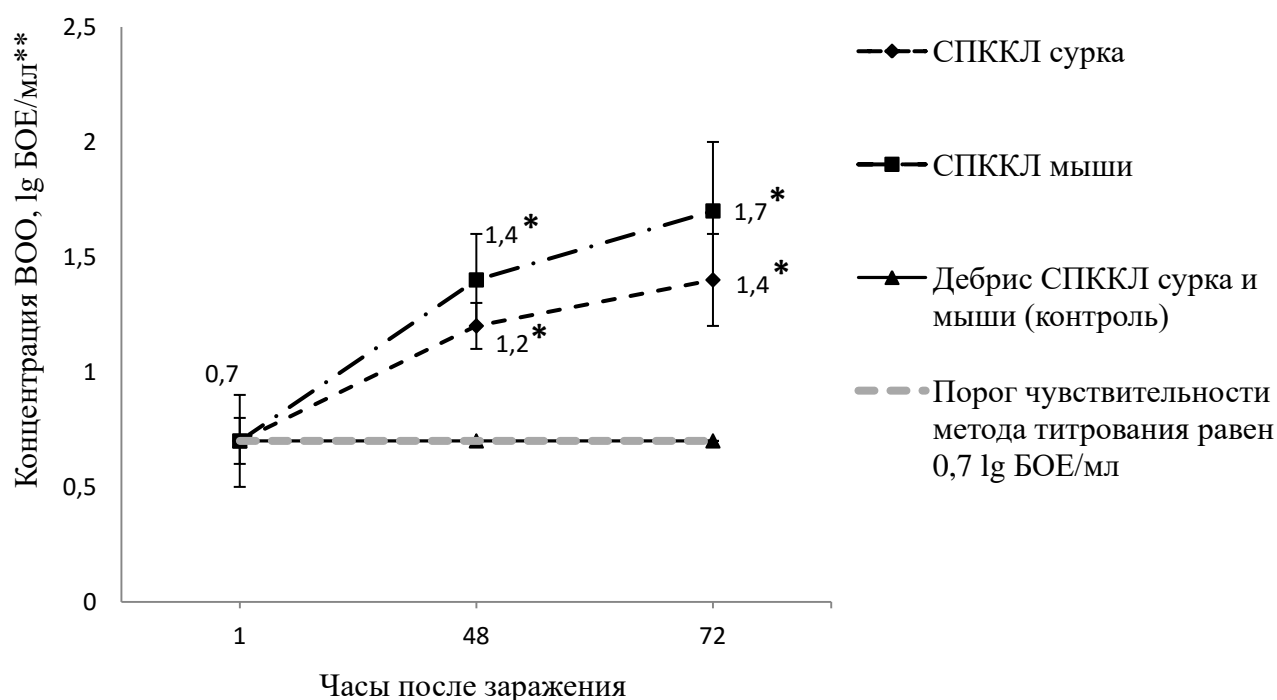
Данные по определению чувствительности к ВОО первичных клеточных культур легких подопытных животных будут использованы в дальнейшем (п. 4.1.3) для прогнозного изучения ID_{50} ВНО и ВОО для некоторых животных и человека.

Для данных исследований были приготовлены СПККЛ мышей и сурков, в том числе контроль (дебрис их клеток). Использование такого контроля в экспериментах и последующем было сориентировано на то, что при культивировании возбудителя заболевания в культурах клеток может происходить 2 процесса: его убыль и репродукция. Причем убыль патогена может быть связана как с термоинактивацией, так и с возможным нейтрализующим действием клеточных мембран (непродуктивная адсорбция патогена). В этом смысле использование в качестве отрицательного контроля клеточного дебриса позволяет сделать интегральную оценку убыли жизнеспособного вируса при культивировании в первичных культурах клеток.

Прежде всего, важно было оценить возможность репродукции ВОО в клетках легких сурков и мышей, используя дозу инфицирования 0,00001 БОЕ/кл. (при которой в предварительных экспериментах наблюдалось накопление вируса в этих клетках) и беря пробы для вирусологического изучения через 1, 48, 72 часа п.и. Результаты таких исследований представлены на рисунке 4.1.

Данные рисунка убедительно свидетельствуют о размножении ВОО в СПККЛ мыши и сурка: наблюдался достоверный прирост биологической концентрации патогена спустя 2 и 3 суток п.и. Более высокого уровня накопления в СПККЛ этих животных вирус достигал через 3 суток п.и., чем через 2. В связи с этим позднее были проведены опыты по изучению чувствительности СПККЛ исследуемых видов животных к ВОО, рассчитанные по регистрации данных спустя 72 часа п.и. о наличии в них вируса или величины его концентрации. При этом были рассчитаны следующие показатели инфекционности этого патогена для клеток некоторых животных: для сурков $CID_{50} = 0,5$ (0,2...0,8) lg БОЕ, а для мышей $CID_{50} = 1,7$ (1,4...2,0) lg БОЕ. Очевидно, что чувствительность первичных клеток сурка к этому вирусу была достоверно выше (на 1,2 lg) таковой у мыши.

Учитывая то обстоятельство, что главными первичными клетками-мишенями для ВОО у людей, судя по результатам, полученным с использованием модельных животных для оспы обезьян [96, 318, 424], являются макрофаги и эпителиоциты респираторных органов, мы попытались получить СПККЛ двух видов животных. При этом данная клеточная культура содержала в своем составе клетки, из которых создан этот орган, в том числе макрофаги и эпителиоциты легких. В связи с этим представленные данные исследований на клеточной суспензии легких сурка и мыши могут быть взяты в дальнейшем с целью прогнозной оценки чувствительности именно этих видов животных.



* Величина выше, чем через 1 час после заражения культуры клеток соответствующего вида животных, $p < 0,05$ (при сравнении по двустороннему t-критерию Стьюдента)

** Представлены средние значения титров вируса (М) с доверительным интервалом (I_{95}) с заданной вероятностью 95% по 4 пробам (n), взятым на временную точку

Контроль – дебрис клеток, приготовленный путем деструкции смеси СПККЛ мыши и сурка в равных количествах; доза заражения ВОО контроля рассчитана на количество клеток до их деструкции

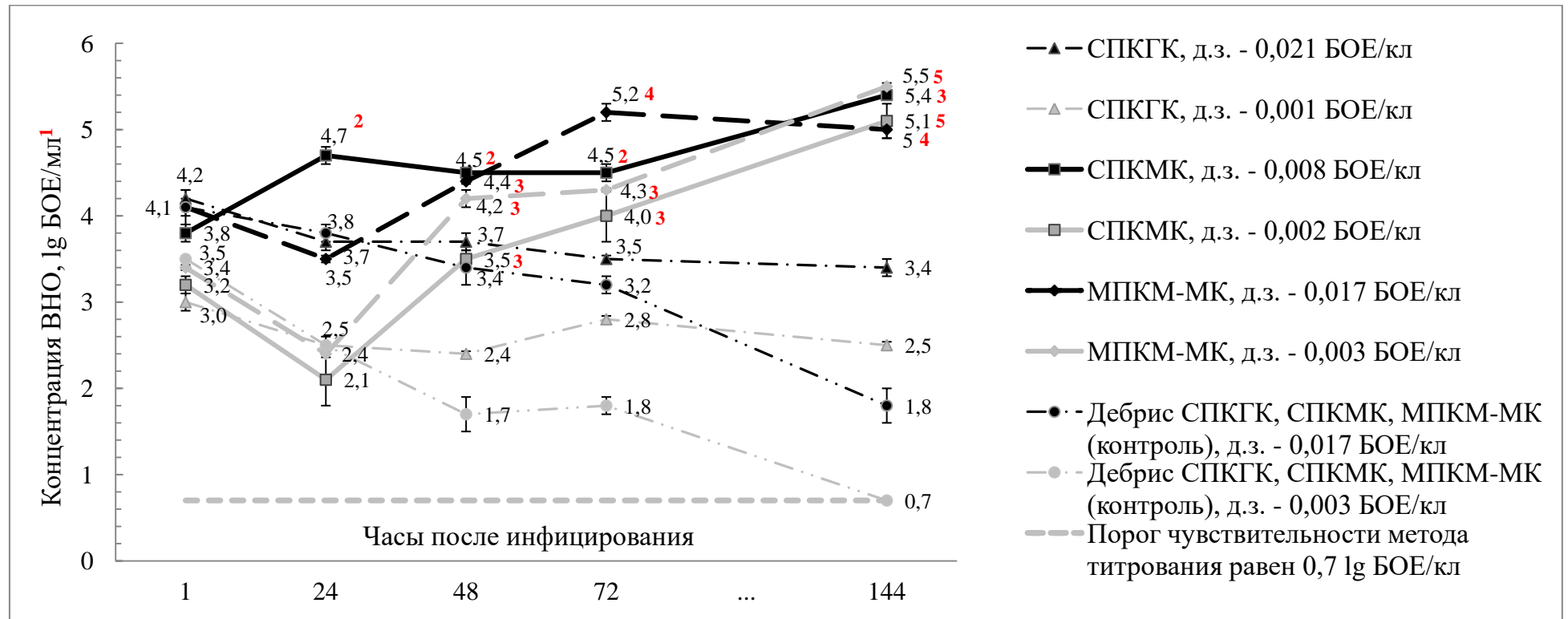
Рисунок 4.1 - Данные по накоплению вируса оспы обезьян - ВОО (штамм V79-1-005) в суспензии первичной культуры клеток легких (СПККЛ), по $5,0 (4,0 \dots 6,0) \times 10^5$ кл. в пробирке, аутбредной мыши ICR и степного сурка, инфицирующая доза - 0,00001 БОЕ/кл.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* продемонстрирована возможность размножения ВОО в мышинных и сурковых первичных клетках легких, инфицированных дозой 0,00001 БОЕ/кл. Определены CID_{50} ВОО для СПККЛ аутбредных мышей ICR 1,7 (1,4...2,0) lg БОЕ и степных сурков 0,5 (0,2...0,8) lg БОЕ.

4.1.1.2 Данные по чувствительности первичных клеток-мишеней животных и человека к возбудителю натуральной оспы

В экспериментах *in vitro* по изучению инфекционной активности ($CI_{D_{50}}$) штамма Ind-3a ВНО в первичных клетках-мишенях людей и некоторых видов животных первоначально нами был осуществлен выбор штамма ВНО и чувствительного для него вида животных. С целью определения возможности использования в кандидатной модельной биосистеме данного штамма и выбранного вида животных в дальнейшем была выполнена прогнозная оценка величин ID_{50} вируса для человека и животных (п. 4.1.2 и 4.1.3), используя результаты, ранее полученные в опытах *in vitro*. Выбор данного штамма для таких исследований был связан с тем, что он был выделен от больного человека в Азии (Индия) во время последней эпидемии натуральной оспы (60–70-е годы прошлого столетия). На первом этапе в исследовании использовали первичные человеческие клетки крови, моноциты-макрофаги, которые инфицировали штаммом Ind-3a ВНО. Применение такой культуры клеток для данных исследований было основано на том, что одной из главных первичных клеток-мишеней у человека для ВНО, судя по результатам полученным с этим патогеном на модельных видах животных (*Macaca cynomolgus* и аутбредная мышь ICR [215, 354, 440]), являются макрофаги. Кроме того, взятие крови от человека с целью приготовления первичных клеточных культур, является достаточно доступной процедурой.

Сначала необходимо было изучить возможность репродукции ВНО в первичных клеточных культурах, полученных из человеческой крови. Для этого были приготовлены на основе крови волонтера, невакцинированного от натуральной оспы, СПКГК, СПКМК и МПКМ-МК, включая контроль (дебрис их клеток). При проведении исследований применяли различные инфицирующие дозы ВНО (0,001; 0,002; 0,003; 0,017 и 0,021 БОЕ/кл.), отбирая пробы для вирусологических исследований через 1, 24, 48, 72, 144 часа п.и. С целью сравнения получаемых результатов параллельно проводили аналогичного вида эксперимент на МПКМ-МК человека, но с использованием ВВ при инфицирующих дозах 0,002 и 0,017 БОЕ/кл., беря пробы для вирусологических исследований через 1, 24, 48, 72, 96 часов п.и. Экспериментальные данные этих исследований представлены на рисунках 4.2 и 4.3 соответственно.



¹ Средние значения титров вируса (М) с доверительным интервалом (I_{95}) с заданной вероятностью 95% по 4 пробам (n), взятым на временную точку

СПКГК – суспензия первичной культуры гранулоцитов крови с $7,5 (7,0...8,0) \times 10^5$ кл./лунку

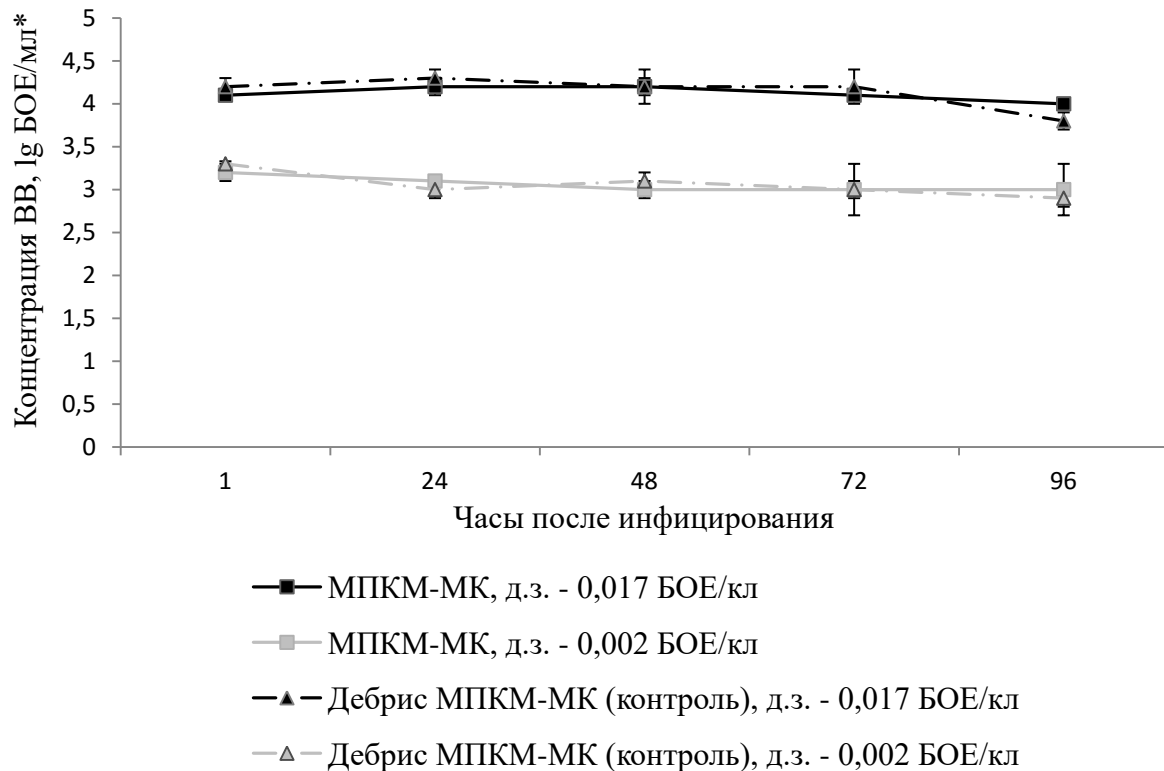
СПКМК – суспензия первичной культуры мононуклеаров крови с $7,5 (7,0...8,0) \times 10^5$ кл./лунку

МПКМ-МК – монослой первичной культуры моноцитов-макрофагов крови с $9,0 (7,5...10,5) \times 10^5$ кл./лунку

Контроль – дебрис клеток, приготовленный путем деструкции смеси СПКГК, СПКМК и МПКМ-МК человека в равных количествах. Д.з. – доза заражения ВНО клеток в опыте, а также в контроле, рассчитанная на количество клеток до их деструкции

^{2, 3, 4, 5} Значение достоверно выше такового соответственно через 1, 24, 48, 72 час после заражения, $p \leq 0,05$ (при сравнении по двустороннему t-критерию Стьюдента и двустороннему U-критерию Манна-Уитни)

Рисунок 4.2 - Данные по накоплению вируса натуральной оспы – ВНО (штамм Ind-3a) в первичных клеточных культурах крови, не вакцинированного от натуральной оспы человека



* Средние значения титров вируса (М) с доверительным интервалом (I_{95}) с заданной вероятностью 95% по 4 пробам (n), взятым на временную точку, и отсутствие достоверного отличия М от соответствующего контроля (при сравнении с помощью двусторонних t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни для $p \leq 0,05$)

Контроль – дебрис клеток, приготовленный путем деструкции МПКМ-МК человека

Д.з. - доза заражения ВНО клеток в опыте, а также в контроле, рассчитанная на количество клеток до их деструкции

Рисунок 4.3 - Данные по культивированию вируса вакцинии – ВВ (штамм Л-ИВП) в монослое первичной культуры моноцитов-макрофагов крови (МПКМ-МК), по $9,0 (7,5 \dots 10,5) \times 10^5$ кл. в лунке, не вакцинированного от натуральной оспы человека

Данные, приведенные на рисунке 4.2, свидетельствовали о репродукции ВНО в СПКМК и МПКМ-МК, при этом в зависимости от используемой в экспериментах заражающей дозы патогена наблюдали значимый прирост его биологической концентрации уже спустя 1 и 2 суток п.и. Максимального уровня накопления возбудитель заболевания достигал в основном через 6 суток п.и. При осуществлении электронной микроскопии были обнаружены признаки размножения этого патогена в моноцитах-макрофагах

МПКМ-МК и СПКМК человека (рисунки 4.4 и 4.5). В то же время сколько-нибудь значимого прироста биологического титра ВНО в СПКГК при заражении разными дозами патогена не было отмечено за весь срок наблюдения. В противоположность этим результатам, представленным на ВНО и МПКМ-МК, были получены данные, демонстрирующие отсутствие размножения в такой клеточной культуре в течение 4 суток наблюдения другого представителя из рода ортопоксвирусов: ВВ (рисунок 4.3).

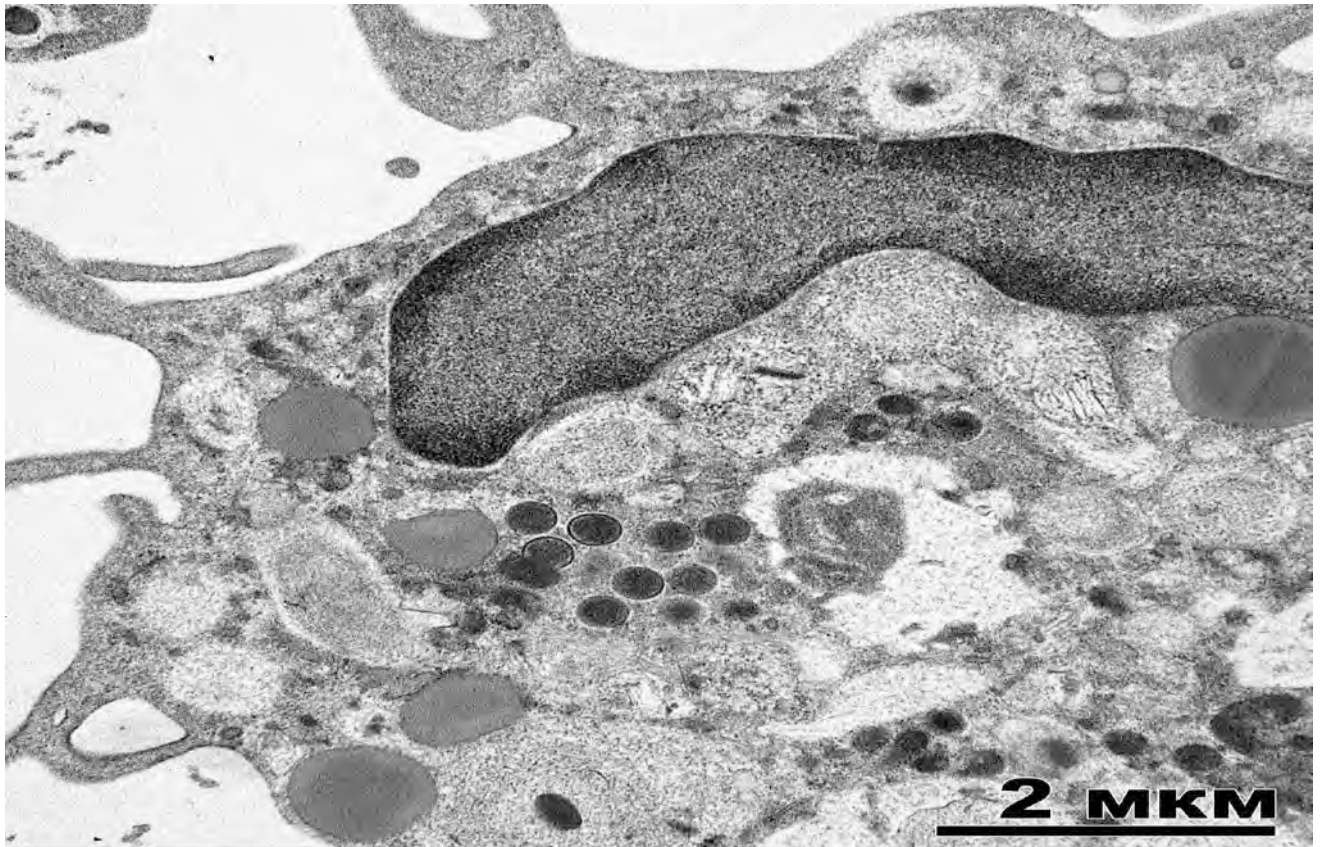


Рисунок 4.4 - Моноцит-макрофаг (трансмиссивная электронная микроскопия) из моно-слоя моноцитов-макрофагов человеческой крови через 3 суток после заражения вирусом натуральной оспы (штамм Ind-3a) в дозе 0,017 БОЕ/кл.: апоптотное состояние, в цитоплазме (слева вверху) несколько незрелых вирионов

Перед проведением опытов по оценке чувствительности моноцитов-макрофагов человеческой крови к ВНО, в том числе полученной у вакцинированных от натуральной оспы, было сделано изучение значений титров антител у людей, иммунизированных противооспенными вакцинными препаратами, в реакции нейтрализации с применением не только ВВ, но и ВНО.

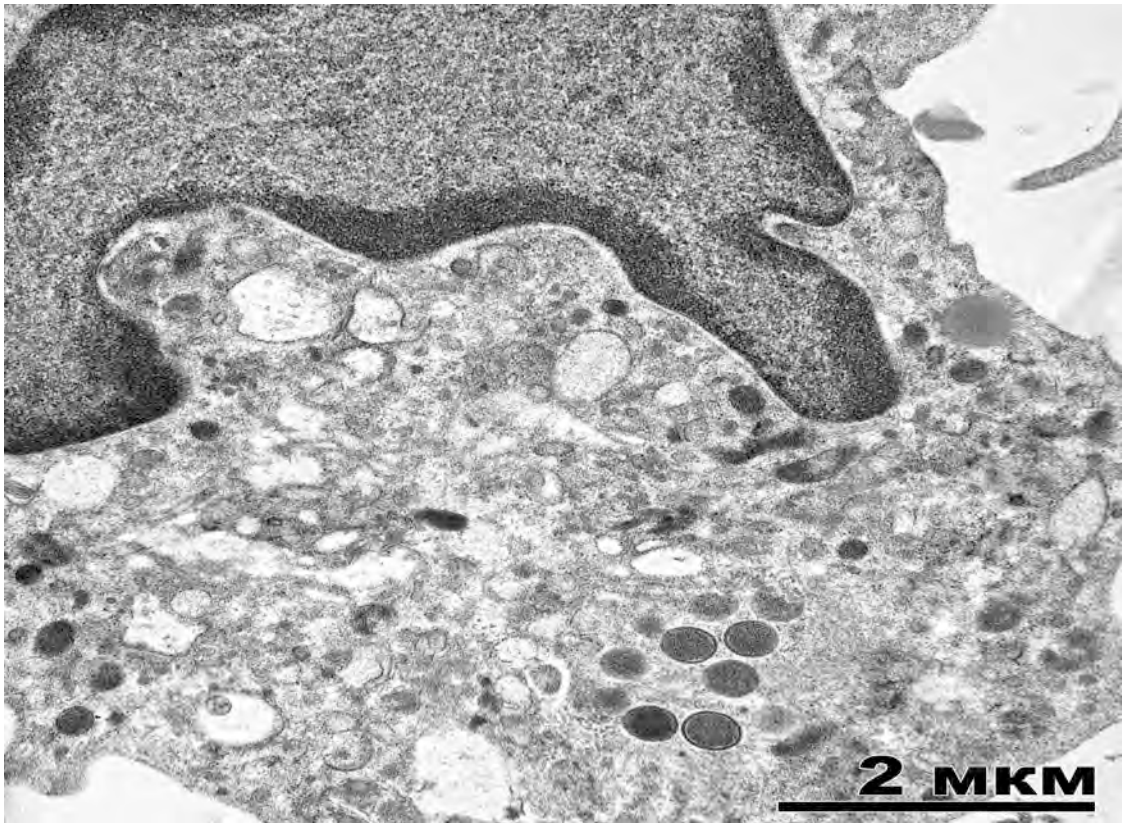


Рисунок 4.5 – Моноцит-макрофаг (трансмиссивная электронная микроскопия) из суспензии мононуклеаров человеческой крови через 6 суток после заражения вирусом натуральной оспы (штамм Ind-3a) в дозе 0,008 БОЕ/кл.: цитоподии в цитоплазме, признаки вакуолизации органелл и незрелые частицы вирусов

Такое исследование осуществили с целью сравнительной оценки данных по вакцинации и для получения истинных сведений о нейтрализующей активности сывороток к ВНО непосредственно для последующего выбора доноров крови к предстоящему опыту. Результаты этих исследований отражены в таблице 4.1.

Данные этой таблицы продемонстрировали, что величины титров антител, измеренных в реакции нейтрализации с ВНО и ВВ, достоверно между собой не отличались. При этом первичная вакцинация добровольцев приводила к формированию относительно невысоких титров антител, тогда как ревакцинация существенно стимулировала гуморальный иммунитет. В связи с этим в последующих исследованиях по изучению чувствительности к ВНО моноцитов-макрофагов была взята кровь от четырех добровольцев, 1 – 7 лет тому назад привитых против натуральной оспы и имеющих титры антител: 76, 100, 128, 216 PRNT₅₀/мл и трех непривитых добровольцев.

Таблица 4.1 - Данные оценки титров антител к вирусам натуральной оспы (ВНО) и вакцинации (ВВ) в сыворотках крови людей, привитых против натуральной оспы

Наименование показателей	Величина показателей для разных способов вакцинации:		
	первичная:		повторная живой накожной вакциной
	двукратная оральная вакциной Ревакс ВТ	двухэтапная инактивированной вакциной и живой накожной	
Количество вакцинированных людей (n)	19	5	6
Титр антител к ВВ в PRNT ₅₀ /мл, М (I ₉₅)	25 (19...49)	25 (0..51)	125 (80...155)*
Титр антител к ВНО, в PRNT ₅₀ /мл, М (I ₉₅)	58 (410...80)	46 (0...78)	143 (84...189)*
<p>Примечания</p> <p>М – средняя геометрическая величина</p> <p>I₉₅ - доверительный интервал М для 5%-го уровня значимости</p> <p>PRNT₅₀ – обратный титр антител, вызывающий 50%-е снижение количества бляшек на инфицированном вирусом монослое культуры клеток, вычисленный по методу Спирмена-Кербера [12]</p> <p>* Значение достоверно выше, чем у людей, первично вакцинированных, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двустороннего U-критерия Манна-Уитни)</p>			

Используя результаты ранее представленных исследований (рисунок 4.2), были рассчитаны значения показателя чувствительности культур клеток по регистрации данных по наличию в них вируса спустя 144 часа п.и. моноцитов-макрофагов крови. При этом была определена следующая средняя величина инфекционности этого патогена для клеток четырех вакцинированных волонтеров: $CID_{50} = 0,01 (-0,15...0,17)$ lg БОЕ. Схожие исследования, выполненные с использованием моноцитов-макрофагов, приготовленных от трех невакцинированных добровольцев, показали следующие средние данные: $CID_{50} = 0,09 (-0,37...0,55)$ lg БОЕ. Монослои моноцитов-макрофагов крови от 4 иммунизированных добровольцев от натуральной оспы и 3 не иммунизированных проявляли сходную

высокую чувствительность к ВНО, что позволило нам провести оценку среднего значения показателя инфекционности: $CID_{50} = 0,04 (-0,08...0,16) \lg \text{ БОЕ}$.

Учитывая то, что сделанный многими учеными поиск видов животных, обладающих высокой к ВНО чувствительностью по результатам регистрации внешней клинической картины болезни, близкой к таковой у людей, оказался слабо эффективным, при дальнейших исследованиях в опытах *in vitro* мы сконцентрировали внимание на изучение инфекционного процесса в легких (одном из первичных органов-мишеней для ВНО) приемлемых для нас животных после респираторного заражения. Причем, кроме традиционного лабораторного вида животных (аутбредные 10–14-суточные мыши ICR), исследованию подвергали 1–2-летних степных сурков, а также 5–7-суточных цыплят генетической линии Род-Айленд.

Использование иммунокомпетентных аутбредных мышей раннего возраста при оценке чувствительности к ВНО было обусловлено тем, что этот вид животных проявлял некоторые признаки болезни при и/н заражении [28, 33, 322]. При этом мы попытались воспроизвести инфекционный процесс у людей детского возраста, у которых натуральная оспа может встречается чаще и протекать тяжелее, чем у взрослых (учитывая последнее масштабное прививание, проведенное в мире до 1980 г. от этого заболевания) [370, 371, 387].

Использование сурков для таких же исследований было основано на том, что этот вид животных имеет некоторые физиологические показатели (частота дыхательных сокращений и пульса, температура тела), сходные с таковыми у человека, кроме того, они проявили, как люди, сходную чувствительность в экспериментах *in vitro* и *in vivo* при и/н заражении к ВОО (п. 4.1.1.1, 4.1.2 и 4.1.3), родственному ВНО, и могут быть приобретены в специализированных питомниках России, в которых они выращиваются с проведением ветеринарного контроля и тестированием на отсутствие патогенных микроорганизмов, включая гельминты.

Несмотря на отсутствие симптомов заболевания у 5-суточных цыплят при интрацеребральном заражении ВНО [32, 305], основанием для взятия в экспериментальные исследования такого вида животных были следующие обстоятельства: наличие высокой чувствительности к ВНО у 9–11-суточных эмбрионов курицы, которых регулярно используют при титровании и наработке вирусодержащих материалов [184, 242, 300].

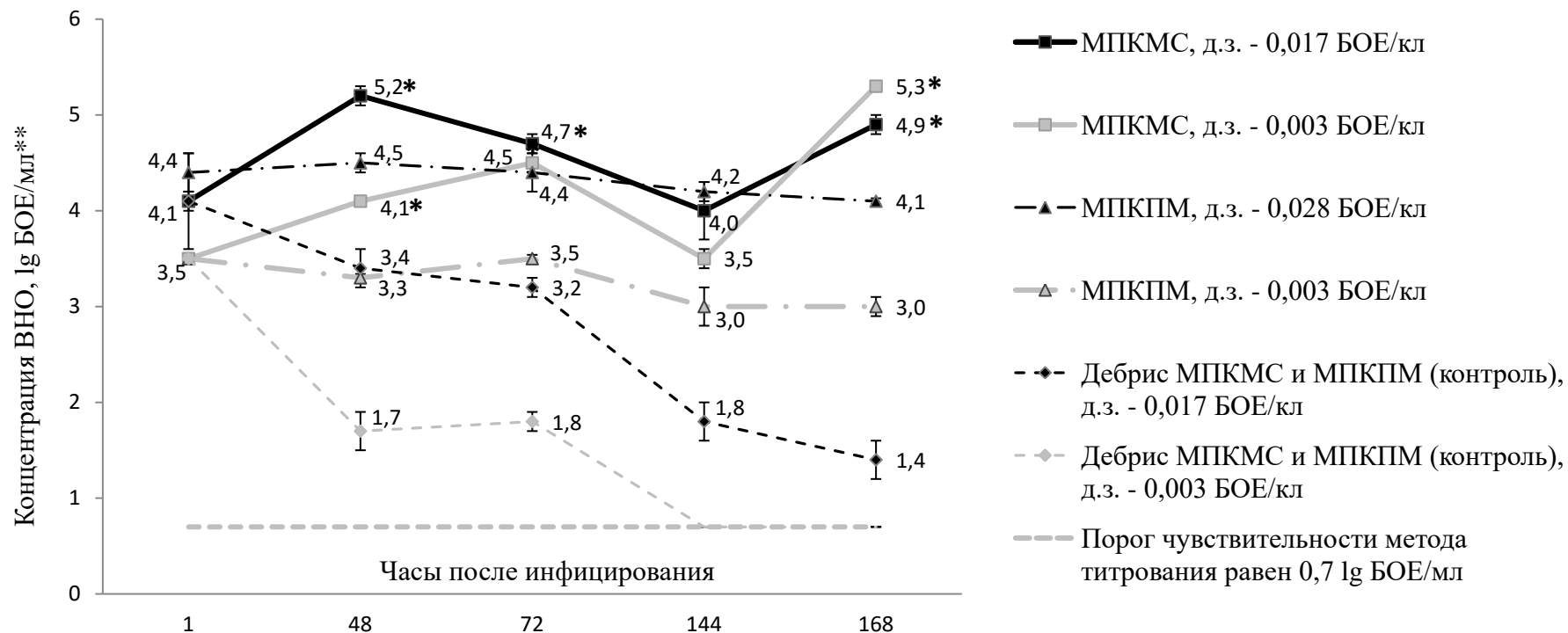
На начальном этапе нами была сделана попытка экспериментальной определения степени чувствительности к ВНО суспензий первичных клеток легких сурков, мышей и цыплят, приготовленных разработанным нами ранее способом при максимальном сохранении жизнеспособности (необходимое время для опытов) всех видов клеток данного органа [3, 13, 63], а также монослоев первичных культур клеток селезенки мышей и макрофагов из брюшной полости этих животных [14, 19, 47]. Перед осуществлением процедуры приготовления данных культур клеток сурки были обследованы ранее разработанным методом [393] на отсутствие антител к ВВ. Применение таких культур клеток для исследований было обосновано тем, что главные первичные клетки-мишени у человека к ВНО, судя по результатам, полученным с использованием этого вируса при инфицировании известных видов модельных животных *Musca cynomolgus* и аутбредная мышь ICR [215, 440], располагаются в респираторных органах и являются макрофагами и эпителиоцитами, с которых и берет начало соответствующий инфекционный процесс.

Данные определения чувствительности к патогену первичных клеточных культур подопытных животных были применены в дальнейшем (п. 4.1.3) для прогнозной определения ID_{50} ВОО и ВНО в отношении подопытных животных и человека.

Сначала необходимо было изучить возможность размножения ВНО в МПКМС и МПКПМ. Для этого клеточные монослои каждой лунки инфицировали этим возбудителем заболевания дозами 3,5, 4,1 и 4,4 lg БОЕ/лунку, беря пробы для вирусологического изучения через 1, 48, 72, 144, 168 часов п.и. Экспериментальные данные этих исследований представлены на рисунке 4.6.

Данные, приведенные на рисунке 4.6, свидетельствовали о размножении ВНО в МПКМС мышей, при этом наблюдался существенный прирост биологической концентрации этого вируса уже спустя 48, 72 и 168 часов п.и. Максимального уровня накопления в культурах клеток вирус достигал спустя 48 часов п.и. в дозе 0,017 БОЕ/кл. и спустя 168 часов п.и. в дозе 0,003 БОЕ/кл. В процессе проведения электронной микроскопии были выявлены признаки размножения вируса в мышинных макрофагах селезенки (рисунки 4.7 и 4.8). В то же время не было отмечено положительной динамики накопления ВНО в МПКПМ этого вида животных.

Используя результаты выше представленных исследований, в последующем были выполнены опыты по изучению чувствительности МПКМС мышей к ВНО с учетом регистрации результатов через 168 часов п.и. по наличию в них вируса.



* Значение выше такового через 1 час после инфицирования соответствующей дозой, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двусторонних t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни)

** Средние значения титров вируса (М) с доверительным интервалом (I_{95}) с заданной вероятностью 95% по 4 пробам (n), взятым на временную точку

Контроль – дебрис клеток, приготовленный путем деструкции смеси МПКМС и МПКПМ мыши в равных объемах

Д.з. - доза заражения ВНО клеток в опыте, а также в контроле, рассчитанная на количество клеток до их деструкции

Рисунок 4.6 - Данные по накоплению вируса натуральной оспы - ВНО (штамм Ind-3a) в монослоях первичных культур макрофагов селезенки (МПКМС) и перитонеальных макрофагах (МПКПМ), по $9,0 (7,5 \dots 10,5) \times 10^5$ кл. в лунке, аутбредной мыши ICR

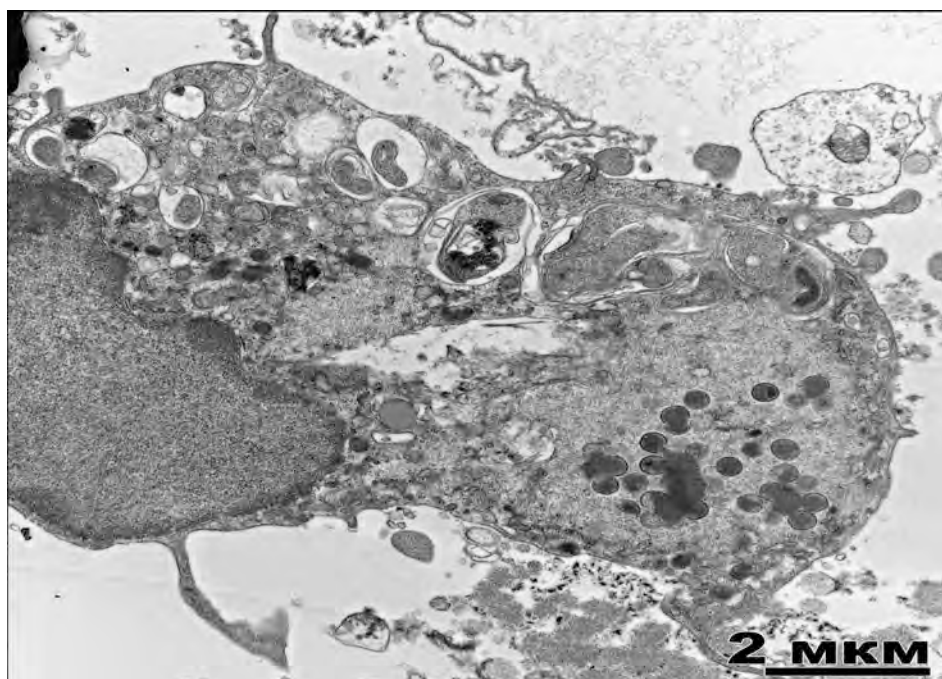


Рисунок 4.7 – Макрофаг (трансмиссивная электронная микроскопия) из монослоя макрофагов селезенки аутбредной мыши ICR спустя 72 часа после заражения вирусом натуральной оспы (штаммом Ind-3a) в дозе 0,017 БОЕ/кл.: крупная вирусная фабрика в цитоплазме, содержащая незрелые вирионы

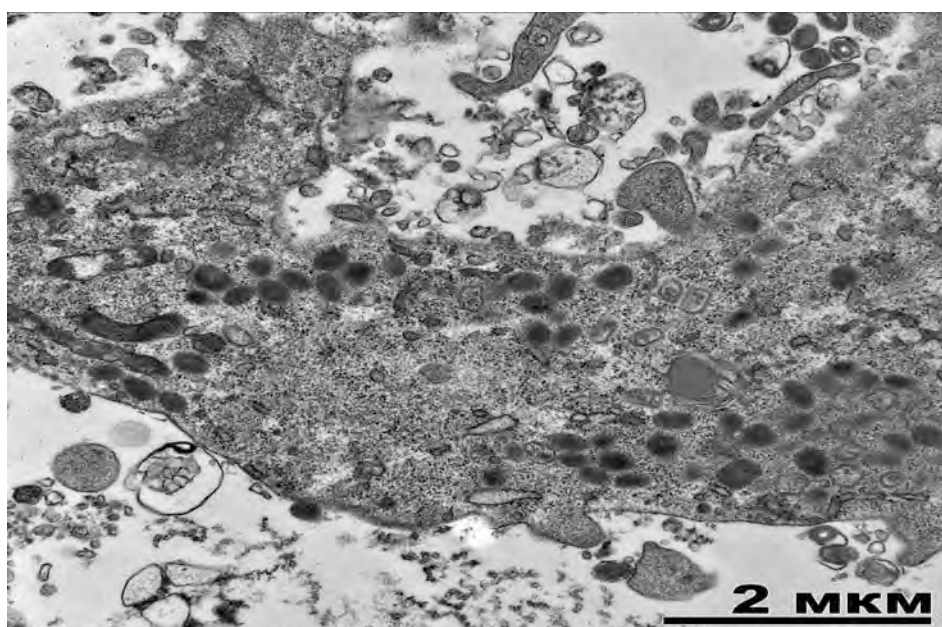


Рисунок 4.8 – Макрофаг (трансмиссивная электронная микроскопия) из монослоя макрофагов селезенки аутбредной мыши ICR спустя 144 часа после заражения вирусом натуральной оспы (штамм Ind-3a) в дозе 0,003 БОЕ/кл.: зрелые вирусные частицы в цитоплазме, признаки репродукции вируса

В результате проведенных опытов была определена чувствительность к ВНО макрофагов селезенки мыши: $CID_{50} = 1,0 (0,7 \dots 1,3) \lg \text{БОЕ}$.

В дальнейшем необходимо было определить возможность размножения ВНО в СПККЛ, полученных от сурков, мышей и цыплят, используя дозу инфицирования $0,00001 \text{ БОЕ/кл.}$ и беря пробы для вирусологического изучения через 1, 48, 72 часа п.и. Данные этих исследований представлены на рисунке 4.9.



* Значение выше, чем через 1 час после инфицирования клеточной культуры соответствующего животного, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента)

** Представлены средние значения титров вируса (М) с доверительным интервалом (I_{95}) с заданной вероятностью 95% по 4 пробам (n), взятым на временную точку

Контроль – дебрис клеток, приготовленный путем деструкции смеси СПККЛ мыши, сурка и цыпленка в равных объемах; доза заражения ВНО контроля рассчитана на количество клеток до их деструкции

Рисунок 4.9 - Данные по накоплению вируса натуральной оспы - ВНО (штамм Ind-3a) в суспензии первичной культуры клеток легких (СПККЛ), по $5,0 (4,0 \dots 6,0) \times 10^5 \text{ кл.}$ в пробирке, аутбредной мыши ICR, степного сурка и цыпленка линии Род-Айленд, инфицирующая доза - $0,00001 \text{ БОЕ/кл.}$

По данным этого рисунка, была отмечена репродукция ВНО в культуре клеток легких подопытных животных, при этом регистрировали значимый прирост его концентрации у мыши и сурка уже спустя 48 и 72 часа п.и. Наибольшего уровня накопления патоген достигал спустя 72 часа п.и. При этом у цыпленка прирост концентрации ВНО был ниже (спустя 48 часов п.и. значимого прироста вируса не отмечено) по сравнению с сурками и мышами, поэтому в дальнейших исследованиях по определению величин показателей инфекционности этого вируса для клеток легких цыплят не использовали. Были проведены опыты по изучению чувствительности легочных клеток только мышей и сурков к ВНО с учетом регистрации данных спустя 72 часа п.и. В этом случае были определены следующие параметры инфекционности патогена для клеток животных: для сурка $CI_{D_{50}} = 2,3 (1,8...2,8) \lg \text{ БОЕ}$; для мыши $CI_{D_{50}} = 1,3 (0,8...1,8) \lg \text{ БОЕ}$. Очевидно, что чувствительность клеток легких мыши к ВНО была выше по сравнению с таковой у сурка.

В наших опытах накопление ВНО наблюдалось не только в МПКМ-МК, но и в СПКМК. Несмотря на то обстоятельство, что мы не создавали специально условий для трансформации моноцитов крови в макрофаг-подобные клетки, находящихся в мононуклеарной клеточной фракции (СПКМК), тем не менее, данное событие произошло, возможно, в процессе экспозиции в плоских лунках планшета до момента инфицирования вирусом, и к присутствующим изначально в данной фракции макрофагам присоединились и моноциты-макрофаги. При инфицировании ВНО его размножение в моноцитах-макрофагах СПКМК было отмечено при помощи электронной микроскопии.

Отсутствие значимых различий по чувствительности к ВНО моноцитов-макрофагов 4 вакцинированных и 3 невакцинированных добровольцев, вероятно, объясняется следующим. Забор крови у привитых добровольцев осуществляли через достаточно большой промежуток времени от проведенной вакцинации (1–7 лет), то есть, когда у них уже не было активированных клеток системы мононуклеарных фагоцитов, как известно, которые появляются и находятся в макроорганизме в ранние сроки после введения антигена [81].

При проведении подобных исследований [230, 287] по заражению ВВ перитонеальных макрофагах, полученных спустя 1–2 недели от проведенной вакцинации ВВ кроликов и мышей, отмечалось слабое или полное отсутствие репродукции вируса этими клетками. Тогда как в аналогичных клетках, взятых от интактных животных, проис-

ходило явное размножение этого вируса. В то же время abortивная репликация ВВ была выявлена в активированных перитонеальных макрофагах, полученных от кроликов также спустя 1–2 недели после вакцинации [81].

При выполнении исследований с использованием моноцитов-макрофагов человека и ВВ другие авторы не обнаруживали его репродукции, причем инфекционный процесс имел abortивный характер и блокировался уже на ранней этапе инфекции [176, 216, 445]. В то же время ВВ размножался в моноцитах-макрофагах, приготовленных путем культивирования моноцитов человеческой крови в присутствии рекомбинантных гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и макрофагального колониестимулирующего фактора (М-КСФ) [353].

В отличие от данных, полученных на монослое макрофагов селезенки и суспензии культуры клеток легких мышей, мы не обнаружили появления жизнеспособного ВНО в монослое макрофагов, выделенных из перитонеальной жидкости этих животных. Отсутствие размножения вируса в таких клетках может быть связано с их перегрузкой (перенасыщением) неполным адьювантом Фрейнда, так как мы использовали его для привлечения максимальных количеств макрофагов в перитонеальную полость мышей.

Близкий результат, но с применением другого представителя ортопоксвирусов (ВВ), доказывающий отсутствие всего цикла репродукции этого вируса в привлеченных тиогликолятом натрия перитонеальных мышинных макрофагах (блокирование инфекционного процесса на ранней стадии) с явлениями апоптоза данных клеток, был отмечен некоторыми исследователями [326]. В противоположность этому другими авторам [287] был зарегистрирован факт размножения ВВ в аналогичных мышинных клетках, привлеченных тиогликолятом натрия.

Основываясь на том, что основным видом первичных клеток-мишеней для ВНО у человека, судя по результатам, полученным на модельных для натуральной оспы животных (*Macaca cynomolgus* и аутбредная мышь ICR) [58, 215, 354], являются клетки системы мононуклеарных фагоцитов, с которой и начинается инфекционный процесс при этом заболевании, нами была определена для людей нижняя граница ID_{50} этого вируса - 0,05 (-0,7...0,17) lg БОЕ при условии беспрепятственного взаимодействия его в организме людей с клетками такого вида. Важно обратить внимание на то, что результат изучения чувствительности человека к ВНО на основе наших экспериментальных данных, снятых при использовании первичных культур клеток человека (моноциты-

макрофаги), близок к таковому для людей (до 1 lg БОЕ), определенному экспертным путем [40, 43]. Кроме того, с использованием МПКМС мыши была также оценена и нижняя граница ID₅₀ этого вируса для данного вида животных: 1,0 (0,7...1,3) lg БОЕ в случае беспрепятственного взаимодействия его с клетками такого типа в организме мыши. Данное значение оказалось действительно достоверно более низким, чем то, которое было определено в экспериментах *in vivo* другими исследователями: 1,7 (1,3...2,1) lg БОЕ [439]. В обоих случаях во время оценки чувствительности к ВНО мышей и людей были использованы только клетки системы моноклеарных фагоцитов (макрофаги), к которым была добавлена вирусодержащая жидкость. При заражении же человека и мышей через дыхательный тракт вероятность взаимодействия патогена с чувствительными клетками может быть существенно ниже за счет факторов неспецифического иммунитета или более разрозненного и широкого пространственного распределения таких клеток в легких по сравнению с их компактным размещением в монослое.

Кроме размножения ВНО у известных модельных видов животных (аутбредная мышь ICR и *Macaca cynomolgus*) в макрофагах [58, 215, 354], ряд ученых [215] также отмечал репродукцию этого патогена и в их клетках-предшественниках (моноцитах крови *Macaca cynomolgus*), но только при заражении этих животных внутривенно огромной дозой ВОО (9 lg БОЕ). Возможно, такое размножение этого патогена в моноцитах человека может тоже происходить, но только при геморрагическом клиническом типе натуральной оспы. Об этом свидетельствует факт регулярного обнаружения у людей в этом случае вируса в этой ткани в существенных концентрациях [239, 450, 456]. В противоположность этому, при обычном типе заболевания данный патоген в крови практически не обнаруживается [303, 362, 387]. В этой связи, скорее всего, у людей и двух известных видах модельных для натуральной оспы животных чувствительность макрофагов к ВНО выше, чем таковая их предшественника (моноцита), на это указывает также и то, что при менее высоких дозах заражения мышей и приматов исследователи не отмечали репродукции вируса в моноцитах крови [58, 243, 354].

Таким образом, репродукция ВНО наблюдалась в моноцитах-макрофагах и моноклеарах крови человека, а также в мышинных селезеночных макрофагах, зараженных дозами вируса 0,002–0,017 БОЕ/кл. Данный процесс также регистрировался в клеточной культуре легких сурка, мыши и цыпленка, зараженной дозой ВНО 0,00001 БОЕ/кл. В то же время не было отмечено положительной динамики накопления данного патогена в

монослое привлеченных мышинных перитонеальных макрофагов, инфицированных дозами 0,003 и 0,028 БОЕ/кл. ВВ при испытанной дозе 0,002 или 0,017 БОЕ/кл. не демонстрировал способности к репродукции в моноцитах-макрофагах крови человека. Определены величины $CI_{D_{50}}$ ВНО в отношении моноцитов-макрофагов крови людей - 0,0 (-0,1...0,1) lg БОЕ, мышинных селезеночных макрофагов - 1,0 (0,7...1,3) lg БОЕ, а также в отношении клеточных культур легких сурков - 2,3 (1,8...2,8) lg БОЕ и мышей - 1,3 (0,8...1,8) lg БОЕ.

4.1.2 Оценка 50 %-х инфицирующих доз вируса оспы обезьян для подопытных животных при интраназальном заражении

В своих экспериментах *in vivo* с использованием ВОО мы акцентировали внимание не только на внешней клинической картине болезни, но и на исследовании инфекционного процесса в легких (первичный орган-мишень для этого патогена) некоторых подопытных видов животных после респираторного заражения. При этом кроме традиционных видов лабораторных животных (разнополые 10–14-суточные аутбредные мыши ICR; 1,5-месячных кролики породы шиншилла), исследованию были подвергнуты и мини-свиньи породы Сибирская мини-свинья массой (4–8) кг, а также 1,5-месячные и 12–24-месячные сурки породы Байбак.

Применение мышей и кроликов раннего возраста для изучения чувствительности к ВОО обосновывалось тем, что первичные культуры клеток легких первого вида животных демонстрировали размножение этого вируса (п. 4.1.1.1), и оба этих вида могли быть экспериментально инфицированы данным возбудителем заболевания и/н и другими способами с последующим проявлением у них некоторых внешних клинических признаков заболевания, включая летальный исход [73, 100, 301], а так же то, что описано ранее (п. 4.1.1.1) в отношении мышей.

Использование мини-свиней для данных исследований было обусловлено (по сравнению со многими другими лабораторными видами животных) выраженным их сходством с людьми по анатомии, строению кожи и физиологии пищеварительной и сердечнососудистой систем [68]. Основанием для включения в исследования сурков явился обнаруженный нами факт размножения ВОО в первичных культурах клеток (п. 4.1.1.1) и то, что описано ранее (п. 4.1.1.1) в отношении этого вида животных.

В этой связи были проведены исследования по определению чувствительности кроликов, мини-свиней, мышей и сурков к ВОО в прямых экспериментах по респираторному (и/н) их заражению, в том числе и с целью сравнения величин этого показателя с таковыми, полученным в экспериментах *in vitro*. Применение именно этого метода инфицирования животных было связано с необходимостью имитации основных механизмов передачи оспы обезьян среди людей (аэрозольный и контактный), реализуемых в основном через дыхательный тракт во время эпидемических вспышек этого заболевания [122, 150, 333]. Результаты данных экспериментов представлены в таблицах 4.2 и 4.3. Отмечено, что и/н введение ВОО в дозах -1,0; 1,0; 3,0; 5,0; 5,5 lg БОЕ не вызывало летальности у мышей. Тем не менее, с 7-х суток п.и. у них отмечали внешние клинические признаки болезни (взъерошенность шерсти, блефарит и гнойный конъюнктивит), которые исчезали спустя 11–13 суток п.и. В этой связи для мышей был оценен параметр чувствительности к ВОО (таблица 4.2), который был рассчитан по наличию внешних клинических признаков инфекции у этих животных ($ID_{50} = 4,8$ lg БОЕ при заражении и/н способом). У сурков, и/н инфицированных ВОО, наблюдали целый комплекс клинических проявлений: подчелюстной лимфаденит (одно- или двусторонний), гипертермия тела, оспоподобная дискретная сыпь на слизистых оболочках и видимой части кожи на всей поверхности тела, серозно-гнойные ринит, блефарит и конъюнктивит, нарушение координации движения, повышенная агрессивность, тремор конечностей и взъерошенность шерсти. Данную симптоматику регистрировали через 7–9 суток п.и., а спустя 13–22 суток п.и. лишь 5 из 12 заболевших сурков погибло. Причем у выживших животных клинические симптомы заболевания исчезали спустя 12–18 суток после появления, а на месте, где располагались оспоподобные сыпозные элементы были образованы рубцы. Важно отметить, что в проведенных нами экспериментах не удалось определить LD_{50} ВОО для заболевших животных, по той причине, что процент их гибели не зависел от значения заражающей дозы в интервале от 2,2 до 6,6 lg БОЕ (таблица 4.3). Тогда как процент инфицированности животных, регистрируемый по наличию симптоматики заболевания, имел выраженную зависимость «доза-эффект». Данное обстоятельство позволило нам оценить ID_{50} ВОО для этих животных по наличию внешних проявлений инфекции, которая составила 2,2 lg БОЕ (таблица 4.2).

Таблица 4.2 - Данные чувствительности аутбредных мышей ICR, степных сурков, кроликов породы Шиншилла и свиней породы Сибирская мини-свинья к вирусу оспы обезьян (штамм V79-1-005) при интраназальном заражении

Вид животных	Значение показателей у зараженных ВОО животных:	
	ID ₅₀ (в lg БОЕ), M±I ₉₅ для n=4	внешние клинические признаки заболевания
Мышь ICR	4,8 (4,2...5,4)	Блефарит, гнойный конъюнктивит, взъерошенность шерсти
Кролик	> 4,0	Нет
Мини-свинья	> 5,0	Нет
Сурок	2,2 (1,0...3,4)	Гипертермия, дискретная оспоподобная сыпь на слизистых оболочках и коже на всей поверхности тела, подчелюстной лимфаденит, серозно-гнойные ринит, блефарит и конъюнктивит, тремор конечностей, нарушение координации движения, взъерошенность шерсти и повышенная агрессивность
<p>Примечания</p> <p>M – средняя величина</p> <p>n – количество животных, взятое на разведение вируса</p> <p>I₉₅ - доверительный интервал M с заданной вероятностью 95%</p> <p>ID₅₀ – 50 %-я инфицирующая доза вируса, рассчитанная по внешним клиническим признакам заболевания у животных</p> <p>Н.д. - исследований не проводили</p>		

Первым внешним клиническим признаком заболевания, вызванного и/н заражением сурков ВОО, было появление значимо высоких значений температуры их тела (38,0–40,0 °C) при норме в 36,5 (36,1–36,9) °C. Такое лихорадочное состояние сохранялось в течение 2–6 суток, а за 2–6 суток до гибели животных температура их тела снижалась и за сутки до смерти достигала 32 °C. Почти одновременно с появлением гипертермии у сурков регистрировали одно- или двусторонние подчелюстные лимфадениты. При этом важно отметить, что величина ID₅₀ ВОО для сурков по наличию клинической

симптоматики заболевания, по сути, соответствует таковой по наличию инфекционного процесса, если учесть то, что у не заболевших животных при инокулировании разными дозами вируса (2,2; 0,2; -1,8 lg БОЕ) ни в одном случае не было обнаружено антител к ВОО.

Таблица 4.3 - Данные по чувствительности степных сурков к вирусу оспы обезьян (штамм V79-1-005) при интраназальном заражении различными дозами

№ п/п	Доза заражения (в lg БОЕ)	Кол-во взятых в опыт животных	Процент животных с клиническими симптомами	Процент павших животных
1	7,8	1	100	100
2	6,6	2	100	50
3	5,0	4	100	25
4	4,2	4	100	25
5	2,2	4	50	50
6	0,2	4	0	0
7	-1,8	4	0	0

Спустя 1–2 суток от начала гипертермии на теле у сурков появилась оспоподобная дискретная сыпь (рисунок 4.10), которая имела разную локализацию и дискретный вид с постепенно изменяющимися форменными элементами: макула с переходом в папулу, затем в везикулу и пустулу. Через 0–2 суток с момента появления на коже животных сыпозных элементов у них начинали регистрироваться и остальные признаки болезни: сыпь на слизистых полости рта и ануса, гнойно-серозный ринит (рисунок 4.11), блефарит и конъюнктивит, нарушение координации движения, повышенная агрессивность, тремор конечностей, и взъерошенность шерсти.

У остальных животных (кролики и мини-свиньи), взятых в эксперимент, не было отмечено внешних клинических признаков инфекции и тем более гибели даже при использовании максимальных доз и/н заражения ВОО (4 и 5 lg БОЕ соответственно). Учитывая то, что нам не удалось определить LD₅₀ ВОО при и/н заражении сурков, была проведена попытка оценки этого показателя по результатам экспериментов, связанных с

п/к заражением этих животных. В результате проведенных исследований все испытанные дозы вируса (не зависимо от значений) приводили у сурков к появлению через 6–8 суток п.и. выраженных клинических признаков заболевания, аналогичных вышеописанному в эксперименте с и/н заражением этих животных, но с той лишь разницей, что плотность сыпозных элементов на коже и слизистых была более высокой (рисунок 4.12). Причем летальный исход, наблюдаемый у п/к зараженных сурков, был зарегистрирован во всех случаях спустя 12–18 суток п.и. (таблица 4.4).



Рисунок 4.10 - Степной сурок через 9 суток после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) дозой 2,2 lg БОЕ (1 ID₅₀): сыпь на коже внутренней поверхности бедер, промежности и живота

При этом самое большое число погибших животных не зависимо от их дозы заражения было установлено через 12 суток п.и. Учитывая то, что даже испытанные нами низкие дозы ВОО привели к появлению внешних клинических признаков болезни и гибели сурков при п/к инфицировании, можно лишь сделать вывод, что значения ID₅₀ и LD₅₀ вируса для этого вида животных при п/к инфицировании существенно ниже 2,5 lg БОЕ. В соответствии с полученными результатами по чувствительности различных ви-

дов животных к ВОО и с целью дальнейшего проведения исследований по разработке модельной биосистемы для оценки эффективности лекарственных препаратов от оспы обезьян наше внимание было акцентировано на аутбредных мышах ICR и сурках.



Рисунок 4.11 - Степной сурок через 10 суток после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) дозой 4,2 lg БОЕ (100 ID₅₀): гнойные выделения из носовой полости

Таблица 4.4 - Данные по чувствительности степных сурков к вирусу оспы обезьян (штамм V79-1-005) при подкожном инфицировании различными дозами

№ п/п	Доза заражения (в lg БОЕ)	Кол-во взятых в опыт животных	Процент животных с клиническими симптомами	Процент павших животных
1	2,6	4	100	100
2	4,1	4	100	100
3	5,6	4	100	100
4	7,1	4	100	100



Рисунок 4.12 – Степной сурок через 12 суток после подкожного инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) дозой 2,6 lg БОЕ: сыпь на коже лапки

В связи с тем, что величина ID_{50} ВОО (по клинической картине заболевания) у мышей оказалась достаточно высокая, с целью выявления наиболее низкой величины показателя чувствительности данного вида животных к вирусу нами была проведена вторая серия экспериментов по оценке ID_{50} , но по регистрации наличия в легких мышей инфекционного процесса, основанная на принципах, описанных в ранее опубликованной статье [52]. Для определения величины данного показателя необходимо было сначала исследовать динамику накопления патогена в легких мышей с целью выбора временной точки, в которой концентрация возбудителя заболевания в таком органе достигнет максимальных значений. При этом животных и/н инфицировали большой дозой вируса (5,0 lg БОЕ). По результатам такого исследования было определено, что самый высокий уровень накопления патогена в легких животных (6,0 lg БОЕ/легкие) наблюдался через 7 суток п.и.

После чего была определена величина ID_{50} ВОО (в трех независимых повторях) по наличию патогена в легких мышей спустя 7 суток п.и. Для этого животных инфицировали дозами вирусом 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 lg БОЕ, используя по 6 мышей на дозу. В

результате проведенных исследований было отмечено, что процент инфицированности животных, регистрируемый по наличию патогена в легких спустя 7 суток после и/н заражения, зависел от дозы вируса, что и позволило определить значение ID_{50} ВОО (по наличию в легких инфекционного процесса) для этих животных, которое равнялось 2,4 (2,0...2,8 lg БОЕ и было ниже на 2,4 lg, чем величина ID_{50} , определенная путем регистрации внешней клинической картины заболевания (таблица 4.2).

В экспериментальных исследованиях, выполненных на 8–15-суточных мышках и 1,5-месячных кроликах, некоторыми учеными получена информация о 100 %-й летальности у этих животных после и/н инфицирования ВОО (штамм Копенгаген) дозой 6 lg БОЕ [301]. В наших же исследованиях (таблица 4.2) на мышках того же возраста, судя по наличию внешней клинической картины болезни после заражения дозой 4,8 lg БОЕ, отмечалась только инфицированность 50% животных, а у кроликов при инфицирующей дозе 4 lg БОЕ отсутствовала какая-либо визуальная клиническая симптоматика. Такое несоответствие полученных данных объясняется, вероятнее всего различием используемых в экспериментах штаммов вируса и доз заражения.

Важно отметить, что при применении обычного и/н способа заражения мышей ≥ 90 % материала, содержащего ВОО, попадает в желудок и кишечник, а лишь остальное ($\leq 10\%$) - в респираторный тракт [72]. Если взять в расчет только количество задержанного в дыхательном тракте вируссодержащего материала, то ID_{50} вируса для мышей в данном случае, рассчитанная по регистрации наличия в легких инфекционного процесса, должна быть значительно ниже (в 10 раз): 1,4 (1,0...1,8 lg БОЕ). Это свидетельствует о достаточно высокой чувствительности к ВОО данного вида животных, сходной с таковой у людей, определенной прогнозируемым путем по проявлениям внешней клинической картины заболевания (п. 4.1.3.2).

В научной литературе есть данные об крайне высокой чувствительности сусликов (относящихся, как и сурки, к семейству беличьих) при п/к инфицировании ц/афр штаммом ВОО ($ID_{50} = 0,35$ БОЕ) [93, 156, 211]. Но в отличие от сурков у и/н инфицированных ВОО дозой $10^{5,1}$ БОЕ сусликов, наблюдалась существенно раньше, более скудная картина болезни (анорексия и вялость спустя 4–5 суток п.и.) при отсутствии проявлений сыпи. При этом эффект гибели у этих животных был замечен в 100 % случаев. В то же время у заболевших животных после и/н введения ВОО данный эффект был установлен 25–50 % случаев (эксперименты с использованием 2 или 4 животных на дозу патогена) и

не имел зависимости от величин инфицирующих доз в испытанном диапазоне 2,2–6,6 lg БОЕ. Более того, гибель и/н зараженных сусликов наступала значительно раньше (спустя 8–9 суток п.и.), чем у сурков (спустя 13–22 суток п.и.).

Чувствительность к ВОО луговых собачек при и/н заражении была достаточно высокой [101,163, 429], близкой к той, которая у сурков, но существенно более низкой, чем таковая у сусликов. Основываясь на данных экспериментов ряда ученых [163], рассчитанная нами величина ID₅₀ ВОО (по регистрации клинической картины болезни) для луговых собачек соответствовала примерно 2,9 lg БОЕ. Но следует отметить, что используя (как в случае с сурками) обычный и/н метод заражения около 10 % материала, содержащего ВОО, должно попасть в респираторный тракт, беря во внимание результаты исследований, выполненных на другом представителе отряда грызунов (на мышах) [72]. Если взять в расчет только количество задержанного в дыхательном тракте вирус-содержащего материала при и/н заражении сурков, то ID₅₀ ВОО для них, оцененная путем выявления внешних клинических признаков оспоподобного заболевания, будет существенно ниже (на 1 lg): 1,2 (0,0...2,4) lg БОЕ. Это свидетельствует о относительно высокой чувствительности этого вида животных к данному патогену, подобной к таковой для людей, определенной прогнозируемым путем (п. 4.1.3.2). Наблюдаемая тенденция к более высокому значению ID₅₀ ВОО у луговых собачек (2,9 lg БОЕ) по сравнению с сурками (2,2 БОЕ), может быть объяснена, как минимум, двумя обстоятельствами: действительно более низкой чувствительностью луговых собачек, чем сурков, к этому патогену; более низкой чувствительностью у этих видов животных клеток слизистой носа по сравнению с клетками-мишенями нижнего отдела дыхательного тракта, так как взятый метод и/н введения вируса (аппликация на слизистую полости носа) луговых собачек [163] был менее успешным, чем примененный нами способ и/н инфицирования, с позиции количества попавшего в этот момент патогена в нижний отдел респираторного тракта. Причем в пользу последнего обстоятельства свидетельствует тот факт, что репродукция ВОО у сурков (рисунок 4.13) началась на много раньше в трахее и легких (через 5 суток п.и.), чем в носу (спустя 9 суток п.и.), несмотря на то, что инфекционный материал при осуществлении нами процедуры инфицирования попадал на слизистую носа в первую очередь.

Клинические признаки болезни у и/н зараженных ВОО сурков в основном напоминали таковые у людей и луговых собачек. Причем процент летальности у луговых со-

бачек, как и у сурков, практически не зависел от дозы патогена и находился в пределах 25–75 %. Явная зависимость «доза-эффект» у данных видов животных была отмечена при регистрации наличия внешних клинических проявлений заболевания. Несмотря на это исследователям [163] удалось, воспользовавшись формулой Reed–Muench, определить значение LD_{50} для луговых собачек, которое составило $5,9 \times 10^3$ БОЕ. В то же время другим ученым, воспользовавшимся этим видом модельных животных при проведении экспериментов по оценки противооспенной активности некоторых препаратов, не удалось получить 100 %-го летального эффекта в контрольной группе луговых собачек при и/н введении ВОО даже существенно в больших дозах (10^5 и 10^6 БОЕ) [187, 200]. При п/к же заражении патогеном у заболевших сурков наблюдался 100 %-й летальный эффект. Причем локализация лимфаденита (подчелюстного одно- или двустороннего) у больных животных была, вероятно, сопряжена с местом п/к нами введения вируса (в холку). Такое расхождение, наблюдаемое у сурков по величинам летального эффекта при и/н и п/к введении вируса, может быть, обусловлено различиями в течении инфекционного процесса при этих способах заражения. И/н заражение животных ВОО приводило к последовательному прохождению трех основных этапов инфекционного процесса: 1) размножение патогена в первичных органах-мишенях респираторного тракта; 2) доставка патогена к вторичным органам-мишеням от первичных с помощью той или иной системы (лимфатическая и кровеносная) с возможным размножением в ней; 3) размножение патогена во вторичных органах-мишенях. При п/к же заражении животных инфекционный процесс начинался, скорее всего, сразу со второго этапа. Некоторое увеличение его длительности при и/н заражении сурков, вероятно, создавало возможность для более эффективной ответной реакции иммунной системы по сравнению с таковой у животных, инфицированных п/к. Данное обстоятельство, связанное с затяжным течением инфекции у сурков при и/н введении ВОО, в некоторой степени подтверждается тенденцией к более позднему (на 1 сутки) появлению у них клинической картины заболевания и гибели, чем у п/к инфицированных животных.

Таким образом, и/н заражение аутбредных мышей ICR ВОО только высокими дозами вызывало у них возникновение некоторой внешней клинической картины заболевания (взъерошенность шерсти, а также гнойный конъюнктивит и блефарит), с использованием которой и была определена для этих животных величина ID_{50} вируса ($4,8 \lg$ БОЕ). Введение вируса мышам тем же способом, но в меньших дозах приводило к его

репродукции в легких на относительно высоком уровне (6 lg БОЕ/легкие) спустя 7 суток п.и. Значение ID_{50} для этого вида животных при и/н заражении вирусом, определенное на основании данных по регистрации инфекционного процесса в их легких, было 2,4 (2,0...2,8) lg БОЕ. После и/н инфицирования ВОО сурков зафиксировано появление выраженной и обширной симптоматики: лимфаденит (подчелюстной одно- или двусторонний); гипертермия тела; оспоподобная дискретная сыпь на слизистых оболочках и коже всей поверхности тела; гнойно-серозный ринит, блефарит и конъюнктивит, нарушение координации движения, взъерошенность шерсти, тремор конечностей и повышенная агрессивность - через 7–9 суток п.и., которая исчезала спустя 19–25 суток п.и. у выживших животных. При этом спустя 13–22 суток п.и. часть заболевших животных (25–50 %) независимо от величины заражающей дозы погибло, а доля инфицированности сурков, регистрируемая по наличию визуальной симптоматики заболевания, имела четкую зависимость от вводимой дозы вируса. Значение ID_{50} ВОО для сурков при и/н заражении, определенное на основании данных по регистрации у них внешней клинической картины болезни, составило 1,2 (0,0...2,4) lg БОЕ (с учетом 10% аппликации этого вируса в легких у этого вида животных). Отмечена сходная чувствительность мышей и сурков к этому вирусу при и/н заражении, причем величины этого показателя (ID_{50} , рассчитанная с учетом регистрации наличия вируса в легких мышей, и ID_{50} , рассчитанная с учетом регистрации клинических признаков заболевания у сурков, соответственно) для данных животных, пересчитанные с учетом 10 %-й аппликации вируса в их респираторном тракте при использованном методе и/н введения, составили 1,4 (1,0...1,8) и 1,2 (0,0...2,4) lg БОЕ соответственно, что подтверждает высокую чувствительность этих животных к ВОО, близкую к таковой у человека, определенной прогнозируемым путем по проявлениям внешней клинической картины заболевания (п. 4.1.3.2). У заболевших сурков при п/к инфицировании патогеном в диапазоне доз 2,6–7,1 lg БОЕ наблюдалась выраженная визуальная клиническая симптоматика, сходная с той, которая была определена при и/н заражении, а также 100 %-й эффект гибели через 12–18 суток п.и. У взятых в эксперименты мини-свиней и кроликов при и/н заражении вирусом в испытанных дозах, включая максимальные (соответственно 4,0 и 5,0 lg БОЕ), не было обнаружено каких-либо визуальных признаков болезни и тем более эффекта гибели.

4.1.3 Прогнозная оценка чувствительности к патогенным ортопоксвирусам человека и подопытных животных

4.1.3.1 Прогнозная оценка 50 %-х инфицирующих доз патогенных ортопоксвирусов для человека и подопытных животных по данным заражения первичных их клеток-мишеней и самих животных

Для принятия решения о возможности использования в кандидатных модельных биосистемах штаммов Ind-3a ВНО и V79-1-005 ВОО, также того или иного вида животного для оценки эффективности разрабатываемых средств медицинской защиты от оспы обезьян и натуральной оспы была проведена прогнозная оценка самих величин ID₅₀ ВНО для людей и животных, а также ID₅₀ ВОО для животных, учитывающая результаты экспериментов *in vitro* (п. 4.1.1) и *in vivo* (п. 4.1.2).

Большинство исследований инфекционных болезней у людей, вызванных теми или иными патогенами, проводится на чувствительных к ним животных с определением ID₅₀ и/или LD₅₀. Что касается человека, то проведение подобного типа экспериментальных исследований невозможно и представлено только в единичных работах, выполненных с применением возбудителей заболеваний людей, относящихся к 3–4-й группам патогенности [189, 225, 330]. Проведение же исследований с использованием возбудителей особо опасных инфекций практически не реально. Тем не менее, по данным научной литературы имеются противоречивые сведения о чувствительности людей к ВНО: ≤ 10 ООЕ [40, 43] и 10–100 БОЕ [142]. В то же время существует экспериментальный подход, дающий возможность оценить этот параметр путем экстраполяции с модельных видов животных, применяя первичные культуры клеток животных и человека, которые представляются мишенью для соответствующего патогена и локализуются в органах основных входных ворот инфекции [11, 13]. Данный метод учитывает особенности становления начального звена инфекционного процесса, характерные для многих макрофаготропных возбудителей особо опасных инфекций:

- инфицирование клеток-мишеней происходит в органах основных входных ворот инфекции при отсутствии специфического иммунного ответа, позволяющего на этой стадии блокировать инфекционный процесс, и, как правило, наверняка инициирует последующую генерализацию инфекции и формирование клинической картины болезни;

- степень чувствительности к патогену макрофагов (клетки системы мононуклеарных фагоцитов) в опытах *in vitro* коррелирует с таковой самого хозяина.

Данные положения основаны на многочисленных литературных сведениях о корреляции между восприимчивостью хозяина *in vivo* и *in vitro* к макрофаготропным вирусам [129, 310, 368].

Известно, что главными первичными клетками-мишенями для ВОО и ВНО у человека, учитывая данные, полученные с этими вирусами и известных модельных видах животных [318, 374, 387], являются эпителиоциты и макрофаги респираторных органов, куда эти патогены обычно попадают при эпидемических вспышках заболеваний в процессе реализации основных механизмов инфицирования людей (аэрозольного и контактного). Инфекционный процесс, стартующий в легких невакцинированного человека практически всегда инициирует генерализацию инфекции и проявления характерных симптомов болезней, вызванных ВОО и ВНО [387].

В данном разделе (пункт 4.1.1) уже были приведены экспериментальные данные, полученные *in vitro*, по чувствительности мышей и сурков к ВОО, а также людей, мышей и сурков к ВНО. В то же время в исследованиях *in vivo* по и/н инфицированию животных этими патогенными для человека вирусами были оценены значения ID_{50} , полученные с учетом существующей 10 %-й аппликации ВОО и ВНО в легких мышей, относящихся, как и сурки, к отряду грызунов, при использованном способе введения вирус-содержащего материала [72]: для мышей к ВНО 1,7 (1,3...2,1) lg БОЕ [440]; для мышей к ВОО 1,4 (1,0...1,8) lg БОЕ (п. 4.1.2); для сурков к ВОО 1,2 (0,0...2,4) lg БОЕ [439]. Все эти значения доз, полученные в опытах *in vitro* и *in vivo*, были использованы в нашем исследовании для осуществления экстраполяций и оценки их адекватности. При этом животное (вирус) одного вида брали как целевой объект, а другого вида, включая человека, - в качестве модельного. Во всех случаях использовали параметры вирус-клеточного взаимодействия, определенные для первичных культур клеток легкого сурков и мышей, макрофагов мышинной селезенки и моноцитов-макрофагов человеческой крови. При этом легочные клетки животных содержали эпителиоциты и макрофаги, являющиеся при и/н заражении животных первичными мишенями для ВНО и ВОО. В этой ситуации не важно, какой тип клеток является наиболее чувствительным к этим патогенам. Макрофаги мышинной селезенки моноциты-макрофаги человеческой крови рассматривались, как модель макрофагов легких. Использование информации, полученной

в опытах на макрофагах, возможно, если этот тип клеток наиболее восприимчивый (вариант 1) или равный по этому показателю эпителиоцитам (вариант 2). Причем требуется, чтобы проценты восприимчивых видов клеток в клеточных культурах модельного вида животных (с которого производится экстраполяция) и целевого объекта (на который осуществляется экстраполяция) были равными [11]. Поэтому значения CID_{50} для монослоев макрофагов селезенки мыши и моноцитов-макрофагов человеческой крови были нормированы на долю d_1 макрофагов (для варианта 1), а также на долю d_2 эпителиоцитов и макрофагов (для варианта 2) в клеточной суспензии легких, которые ранее были опубликованы в работе [11], равны соответственно 0,13 и 0,24, по формуле $CID_{50}(\text{для варианта 1 и 2}) = CID_{50} \cdot \frac{1}{d_{1,2}}$. Результаты прогнозного определения ID_{50} ВНО и ВОО для некоторых видов животных и человека представлены в таблице 4.5.

На первой стадии на 7 примерах была продемонстрирована возможность прогнозирования ID_{50} двух видов ортопоксвирусов для сурков и мышей, для которых при и/н заражении ранее были определены значения этого параметра в отношении ВНО и ВОО. Причем в первом случае была проведена с сурков на мышей экстраполяция ID_{50} ВОО, используя CID_{50} этого вируса, полученные на суспензиях легочных клеток животных этих видов. Во 2, 3 и 4-м случаях экстраполяцию ID_{50} ВОО проводили не с одного вида животных на другой, а с одного вида вирусов на другой для конкретного вида животных, то есть для мыши на ВОО с ВНО, используя CID_{50} ВОО и ВНО, полученные на суспензиях легочных клеток этих животных и на монослое макрофагов селезенки мыши. В 5, 6 и 7-м случаях осуществляли экстраполяцию ID_{50} ВОО с одного вида животных на другой (на сурка с мыши) и с одного вида вируса на другой (на ВОО с ВНО), используя CID_{50} ВНО и ВОО, полученные на суспензиях легочных клеток сурков и мышей, а также на монослое мышинных макрофагов селезенки.

Из данных таблицы 4.5 (номера 1–7) видно, что во всех 7 случаях прогнозные значения ID_{50} ВОО для сурков и мышей не отличались достоверно ($p > 0,05$) от экспериментально оцененных. Это свидетельствует о справедливости испытанных способов прогнозирования с модельного вида животного и вируса в прямой и обратной последовательностях. При этом данные прогнозной оценки чувствительности к ВНО мышей на базе ранее полученных результатов по значениям CID_{50} ВОО на легочных клетках сурков и мышей и по значениям CID_{50} ВНО на мышинных легочных клетках и макрофагах селезенки, тоже представлены в таблице (8–13-й номера). Использование для экстрапо-

ляции одних макрофагов и получение при этом соответствия экспериментальных и прогнозных значений ID_{50} ВНО свидетельствовало об основной роли макрофагов в становлении инфекционного процесса, инициированного патогенными для человека ортопоксвирусами в легких животных. Эти факты подтверждают возможность применения указанных первичных клеточных культур как легкого, так и селезеночных макрофагов для прогнозирования чувствительности к ВНО и ВОО млекопитающих, из органов которых были приготовлены эти культуры. Данное обстоятельство стало основанием для осуществления прогнозной оценки значений ID_{50} ВНО в отношении людей, используя CID_{50} ВНО и ВОО, полученные с использованием суспензий клеток легких сурков и мышей и монослоя мышинных макрофагов селезенки, а также с использованием монослоя моноцитов-макрофагов человеческой крови. Результаты этих исследований приведены в таблице 4.5 (номера 14–20).

В первом случае сделана экстраполяция ID_{50} ВНО в отношении людей с ВНО и мышей, используя CID_{50} ВНО, определенные на монослое мышинных макрофагов селезенки (номер 8). Так как эта клеточная культура и моноциты-макрофаги человеческой крови содержат одни макрофаги, то нормировку CID_{50} не проводили.

Во втором случае оценивали прогнозное значение ID_{50} ВНО в отношении людей, используя CID_{50} ВОО и ВНО, определенные на мышинных клетках легких (номера 9–12), проводя нормировку CID_{50} на долю d1 макрофагов и на долю d2 эпителиоцитов и макрофагов в суспензии мышинных клеток легких. В третьем случае оценивали прогнозное значение ID_{50} ВНО в отношении людей, используя CID_{50} ВОО, определенные на клетках легких от сурков (номера 13 и 14), делая соответствующую нормировку CID_{50} .

Из таблицы видно, что прогноз значения ID_{50} ВНО для людей варьируется в интервале 0,3–1,6 lg БОЕ. Также были оценены прогнозные величины данного показателя для ВНО и сурков (номер 21 таблицы 4.5), который составил 2,7 (2,3...3,1) lg БОЕ.

Обобщенные результаты прогнозного определения величин ID_{50} ВНО и ВОО для человека и подопытных животных, основанные на использовании значений их CID_{50} ВНО и ВОО для первичных клеток-мишеней, при сравнении с теми, которые получены в прямых экспериментах при и/н заражении этих животных и путем экспертной оценки в отношении человека, представлены в таблице 4.6.

Таблица 4.5 – Прогнозные значения 50 %-х инфицирующих доз (ID_{50}) возбудителей натуральной оспы (ВНО) и оспы обезьян (ВОО) для аутбредных мышей ICR, степных сурков и людей

№ п/п	Вид модель- ного/целевого вируса	Вид мо- дельного животного	Вид целе- вого объ- екта	Вид клеток		ID_{50m} , lg БОЕ	CID_{50m} , lg БОЕ	CID_{50} , lg БОЕ	Прогноз ID_{50} (I_{95}), lg БОЕ	Эксперимент ID_{50} (I_{95}), lg БОЕ	p
				модельного животного	целевого объекта						
1	ВОО / ВОО	Сурок	Мышь	СПККЛ	СПККЛ	1,2	0,5	1,7	2,4 (1,2...3,6)	1,4 (1,0...1,8)	0,14
2	ВНО / ВОО	Мышь	Мышь	СПККЛ	СПККЛ	1,7	1,3	1,7	2,1 (1,7...2,5)	1,4 (1,0...1,8)	0,052
3	ВНО / ВОО	Мышь	Мышь	МПКМС d1	СПККЛ	1,2	0,5	1,7	2,0 (0,8...3,2)	1,4 (1,0...1,8)	0,64
4	ВНО / ВОО	Мышь	Мышь	МПКМС d2	СПККЛ	1,7	1,9	1,7	1,5 (1,1...1,9)	1,4 (1,0...1,8)	0,75
5	ВНО / ВОО	Мышь	Сурок	СПККЛ	СПККЛ	1,7	1,3	0,5	0,9 (0,5...1,3)	1,2 (0,0...2,4)	0,64
6	ВНО / ВОО	Мышь	Сурок	МПКМС d1	СПККЛ	1,7	1,9	0,5	0,3 (-0,1...0,7)	1,2 (0,0...2,4)	0,16
7	ВНО / ВОО	Мышь	Сурок	МПКМС d2	СПККЛ	1,7	1,6	0,5	0,6 (0,2...1,0)	1,2 (0,0...2,4)	0,32

Продолжение таблицы 4.5

№ п/п	Вид модель- ного/целевого вируса	Вид мо- дельного животного	Вид целе- вого объ- екта	Вид клеток		ID _{50m} , lg БОЕ	CID _{50m} , lg БОЕ	CID ₅₀ , lg БОЕ	Прогноз ID ₅₀ (I ₉₅), lg БОЕ	Эксперимент ID ₅₀ (I ₉₅), lg БОЕ	p
				модельного животного	целевого объекта						
8	ВОО / ВНО	Мышь	Мышь	СПККЛ	СПККЛ	1,4	1,7	1,3	1,0 (0,4...1,6)	1,7 (1,3...2,1)	0,052
9	ВОО / ВНО	Сурок	Мышь	СПККЛ	СПККЛ	1,2	0,5	1,3	2 (0,8...3,2)	1,7 (1,3...2,1)	0,64
10	ВОО / ВНО	Мышь	Мышь	СПККЛ	МПКМС d1	1,4	1,7	1,9	1,6 (1,0...2,2)	1,7 (1,3...2,1)	0,75
11	ВОО / ВНО	Мышь	Мышь	СПККЛ	МПКМС d2	1,4	1,7	1,6	1,3 (0,7...1,9)	1,7 (1,3...2,1)	0,32
12	ВОО / ВНО	Сурок	Мышь	СПККЛ	МПКМС d1	1,2	0,5	1,9	2,6 (1,4...3,8)	1,7 (1,3...2,1)	0,16
13	ВОО / ВНО	Сурок	Мышь	СПККЛ	МПКМС d2	1,2	0,5	1,6	2,3 (1,1...3,5)	1,7 (1,3...2,1)	0,35
14	ВНО / ВНО	Мышь	Человек	МПКМС	МПКМ- МК	1,7	1,0	0,0	0,7 (0,3...1,1)	-	-

Продолжение таблицы 4.5

№ п/п	Вид модель- ного/целевого вируса	Вид мо- дельного животного	Вид целе- вого объ- екта	Вид клеток		ID _{50m} , lg БОЕ	CID _{50m} , lg БОЕ	CID ₅₀ , lg БОЕ	Прогноз ID ₅₀ (I ₉₅), lg БОЕ	Эксперимент ID ₅₀ (I ₉₅), lg БОЕ	p
				модельного животного	целевого объекта						
15	ВНО / ВНО	Мышь	Человек	СПККЛ	МПКМ- МК d1	1,7	1,3	0,9	1,3 (0,9...1,7)	-	-
16	ВНО / ВНО	Мышь	Человек	СПККЛ	МПКМ- МК d2	1,7	1,3	0,6	1,0 (0,6...1,4)	-	-
17	ВОО / ВНО	Мышь	Человек	СПККЛ	МПКМ- МК d1	1,4	1,7	0,9	0,6 (0,0...1,2)	-	-
18	ВОО / ВНО	Мышь	Человек	СПККЛ	МПКМ- МК d2	1,4	1,7	0,6	0,3 (-0,3...0,9)	-	-
19	ВОО / ВНО	Сурок	Человек	СПККЛ	МПКМ- МК d1	1,2	0,5	0,9	1,6 (0,4...2,8)	-	-
20	ВОО / ВНО	Сурок	Человек	СПККЛ	МПКМ- МК d2	1,2	0,5	0,6	1,3 (0,1...2,5)	-	-

Продолжение таблицы 4.5

№ п/п	Вид модель- ного/целевого вируса	Вид мо- дельного животного	Вид целе- вого объ- екта	Вид клеток		ID _{50m} , lg БОЕ	CID _{50m} , lg БОЕ	CID ₅₀ , lg БОЕ	Прогноз ID ₅₀ (I ₉₅), lg БОЕ	Эксперимент ID ₅₀ (I ₉₅), lg БОЕ	p
				модельного животного	целевого объекта						
21	ВНО / ВНО	Мышь	Сурок	СПККЛ	СПККЛ	1,7	1,3	2,3	2,7 (2,3...3,1)	-	-
<p>Примечания</p> <p>I₉₅ – доверительный интервал с вероятностью 95 %</p> <p>m – индекс, который связывает показатель с модельным животным, без индекса – с целевым объектом</p> <p>pred/exp – индекс, который связывает показатель с прогнозным/экспериментальным значением</p> <p>p – достигнутый уровень значимости двустороннего z-критерия $z = \frac{ lgID_{50\ pred} - lgID_{50\ exp} }{\sqrt{S_{pred}^2 + S_{exp}^2}}$</p> <p>Модельный/целевой вирус – вирус, с помощью которого инфицируется модельный вид животных (с которого делается экстраполяция) или целевой объект (на который делается экстраполяция)</p> <p>CID₅₀ – 50 %-я инфицирующая доза вируса для культуры клеток</p> <p>СПККЛ – суспензия первичной культуры клеток легких</p> <p>МПКМС – монослой первичной культуры макрофагов селезенки</p> <p>МПКМ-МК - монослой первичной культуры моноцитов-макрофагов крови</p> <p>d1 (d2) – значения CID₅₀ соответствующих клеточных культур нормированные на долю макрофагов (эпителиоцитов и макрофагов) в СПККЛ</p>											

Таблица 4.6 – Обобщенные данные по чувствительности к вирусам натуральной оспы (ВНО) и оспы обезьян (ВОО) аутбредных мышей ICR, степных сурков и людей, а также первичных клеток-мишеней от них

Наименование показателей	Вид вирусов	Величина показателей:		
		для мыши	для сурка	для человека
CID ₅₀ , lg БОЕ, М (I ₉₅) из экспериментов in vitro	ВОО	1,7 (1,4...2,0) ¹ n=3	0,5 (0,2...0,8) ¹ n=3	Н.д.
	ВНО	1,0 (0,7...1,3) ² n=3 1,3 (0,8...1,8) ¹ n=3	2,3 (1,8...2,8) ¹ n=3	0,0 (-0,1...0,1) ³ n=7
Прогнозная ID ₅₀ , lg БОЕ, М (I ₉₅) из экспериментов in vitro	ВОО	2,0 (1,4...2,6) n=4	0,6 (-0,1...1,3) n=3	Н.д.
	ВНО	1,8 (1,2...2,4) n=6	2,7 (2,3...3,1) n=1	1,0 (0,6...1,4) n=7
ID ₅₀ , lg БОЕ, М (I ₉₅) в экспериментах in vivo	ВОО	1,4 (1,0...1,8) n=3	1,2 (0,0...2,4) ⁴ n=1	≤ 1 ⁵
	ВНО	1,7 (1,3...2,1) ⁴ n=3	Н.д.	≤ 1 ⁵ и 1-2 ⁵
<p>Примечания</p> <p>М – средняя величина</p> <p>n – количество определений</p> <p>I₉₅ - доверительный интервал М с заданной вероятностью 95%</p> <p>¹ Величина получена при использовании монослоя макрофагов селезенки</p> <p>² Величина получена при использовании суспензии клеток легких</p> <p>³ Величина получена при использовании монослоя моноцитов-макрофагов крови</p> <p>⁴ Величина получена нами по ВОО для мышей и сурков и другими исследователями по ВНО для мышей [58] с учетом 10 %-й аппликации вируса в легких при интраназальном заражении мышей [72], относящихся, как и сурки, к отряду грызунов</p> <p>⁵ Величина определена путем экспертной или прогнозной оценки [40, 43, 56, 142]</p>				

Видно, что представленные прогнозные результаты в отношении ВНО и ВОО для сурков и мышей, базирующиеся на опытах in vitro, значимо не отличались от таковых полученных в экспериментах in vivo, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двустороннего

z-критерия). Кроме того, оцененное прогнозное значение ID_{50} ВНО для людей согласуется с таковым других исследователей, полученным путем экспертного определения. При этом важно отметить, что мыши по сравнению с сурками обладали близкой с людьми чувствительностью к ВНО.

Таким образом, опираясь на результаты по чувствительности первичных клеточных культур человека и некоторых видов животных и ранее созданный способ экстраполяции ID_{50} , сделаны прогнозные расчеты величин ID_{50} ВНО (штамм Ind-3a) для человека, аутбредной мыши ICR и степного сурка, а также ID_{50} ВОО (штамм V79-1-005) для аутбредной мыши ICR и степного сурка. При этом значения этого параметра для животных достоверно ($p \geq 0,05$) не отличались от таковых, оцененных по экспериментам *in vivo* в отношении ВОО для сурков и мышей и ВНО для мышей.

Данное обстоятельство свидетельствует о возможности использования в дальнейшем такого метода экстраполяции ID_{50} . Величина прогнозная ID_{50} Ind-3a ВНО для человека составила 1,0 (0,6...1,4) lg БОЕ. Это согласуется с результатами экспертной оценки такого показателя другими авторами и подтверждает возможность использования данного штамма при разработке модельной биосистемы для изучения эффективности противоспешенных химиопрепаратов.

Учитывая более высокую чувствительность мышей, чем сурков, к Ind-3a ВНО (по ID_{50}), близкую к таковой у людей, в состав такой кандидатной модельной биосистемы для дальнейшего изучения предлагается включить аутбредную мышь ICR. Беря во внимание результаты прогнозной и прямой экспериментальной оценки чувствительности степных сурков и аутбредных мышей ICR (по ID_{50}) к ВОО (штамм V79-1-005), близкой к таковой у людей (данные прогнозной оценки), оба вида этих животных могут быть использованы при разработке кандидатных модельных биосистем для изучения защитной эффективности препаратов от оспы обезьян.

4.1.3.2 Прогнозная оценка 50 %-й инфицирующей дозы возбудителя оспы обезьян для человека

В доступной литературе нет информации, относящейся к количественной оценке степени чувствительности людей к ВОО. Однако сделанный информационный анализ, связанный с вызывающими эпидемии вирусными заболеваниями (грипп, риновирусная

и аденовирусная инфекции, натуральная оспа и другие), для которых ведущие механизмы передачи инфекции сходны с таковыми оспы обезьян (аэрозольный и контактный) и реализуются, как правило, через дыхательный тракт, свидетельствует о достаточно высокой чувствительности невакцинированных людей к данным патогенам и не превышает 100 вирусных частиц [43, 142, 189, 255]. В то же время наличие или периодическое возникновение эпидемических очагов оспы обезьян (в Африке и Северной Америке) косвенно указывает на высокой восприимчивости людей к возбудителю этой болезни. Для прогнозного определения степени чувствительности людей к ВОО важно количественно и качественно изучить в сравнении с родственным ВНО, по которому есть экспертная информация о предполагаемой чувствительности человека – до 2 lg БОЕ [40, 43, 142] и наша прогнозная оценка – 1,0 (0,6...1,4) lg БОЕ (п. 4.1.3.1), 3 основных составляющих компонента эпидемического процесса, инициированного данными патогенами: источник инфекции, механизм ее передачи, восприимчивость населения.

Из данных литературы широко известно, что главными источниками оспы обезьян у людей являются зараженные ВОО отдельные виды животных (приматы, белки, гамбийские крысы и другие) и люди, причем выход вируса из макроорганизма в основном происходил из сыпозных элементов (корочки пустулы и везикулы, где количество возбудителя заболевания достигало 1 – 100 миллионов [72, 153, 195, 285]) кожи и слизистых, в том числе ротовой полости и респираторного тракта.

Если говорить о ВНО, то источником вызываемой им болезни является инфицированный человек, причем основное выделение этого вируса в окружающую среду происходило тоже из сыпозных элементов кожи и слизистых оболочек ротовой полости и респираторного тракта. Причем количественное содержание патогена в этих образованиях было близко тому, которое наблюдалось при оспе обезьян, если еще учесть длительность и условия хранения до момента титрования [7, 183, 308, 461]. В то же время подавляющее большинство ученых отмечает более мягкое течение этого заболевания у людей в сравнении с натуральной оспой: менее выраженная респираторная симптоматика, отсутствие плоского и геморрагического клинических типов болезни, редко наблюдающаяся сливная форма сыпи и другие [23, 432, 436]. При этом, как при натуральной оспе, так и при оспе обезьян очень редко встречались инаппарантные (бессимптомные) формы течения болезни у не вакцинированных от натуральной оспы людей [387]. Клиническая симптоматика оспы обезьян представлена подробно во многих научных пуб-

ликациях, посвященных ВОО [34, 285, 387]. В этой связи и с целью удобства представления сведений по чувствительности экспериментальных животных к этому вирусу приведем лишь краткую информацию по основным стадиям клинического течения этой болезни у не вакцинированных от оспы людей, летальность при которой достигает 17 %.

Инкубационный период оспы обезьян (от момента инфицирования до начала лихорадки) составляет обычно 7–21 суток [262]. После чего возникает продромальная стадия болезни (до появления базовой оспенной сыпи), которая длится обычно 2–4 суток, при этом происходит повышение температуры тела, появление головных болей, иногда кашля и боли в горле, а также слабость. Особенностью клинического течения этого заболевания, отличающей его от натуральной оспы, являются наличие лимфаденитов, которые наблюдали у 86,4 % больных и появлялись одновременно с лихорадкой (до высыпания за 1–2 суток). Место их локализации варьируется (шейные, подчелюстные, паховые лимфадениты), причем иногда они бывают односторонними, а иногда - двусторонними, но чаще всего развивается генерализованная лимфаденопатия (63,9 % случаев). Через 2–4 суток заболевания появляется сыпь, которая располагается по всему телу с преимущественным поражением конечностей и лица. По густоте сыпозных элементов на коже больных людей различают три основные клинические формы заболевания: дискретная (около 60 %), полусливная (около 30 %), а также сливная (около 10 %) [34, 387]. Элементы сыпи, как правило, мономорфны и проходят те же стадии превращения, что и при натуральной оспе (розеола, переходящая в папулу; затем везикула, переходящая в пустулу и затем в корки). Оспа обезьян у людей (с момента выявления клинических признаков) длилась обычно 2–4 недели.

Возвращаясь к проблеме восприимчивости людей к ВОО, признанным является то обстоятельство, что передача инфекции, инициированной этим вирусом, от животных человеку и между людьми происходит в основном при помощи контактного механизма (непрямого и прямого) и аэрозольного (воздушно-капельного и воздушно-пылевого). Причем контактный механизм передачи данной инфекции чаще всего реализовывался путем прикосания руками, контаминированными выделениями от больного человека или животных [122, 150, 333], к глазам и носу, то есть, по сути, входными воротами инфекции при этой ситуации был также дыхательный тракт (верхний отдел его), как и в случае осуществления аэрозольного механизма передачи этой инфекции.

Необходимо отметить также, что распространение инфекции при натуральной оспе у людей происходило теми же методами, как и при оспе обезьян. Но основной акцент исследователи все же делали на аэрозольный механизм распространения натуральной оспы, частота встречаемости которого была значительно выше при эпидемии этого заболевания, чем во время эпидемических вспышек оспы обезьян [34, 387], вероятно, за счет существенно более выраженных респираторной симптоматики, а также картины сыпозных проявлений, если предположить, что оба этих вируса, являясь близкородственными, имеют сходную устойчивость в окружающей среде.

Величина контагиозности инфекции для человека, вызванной ВОО, невысокая (не выше 10 %), ориентируясь на информацию, полученную в отношении людей, ранее невакцинированных от натуральной оспы [128, 256, 263], по сравнению с той, которая имеется для натуральной оспы – 58 %: 37–88 % [196, 257, 320].

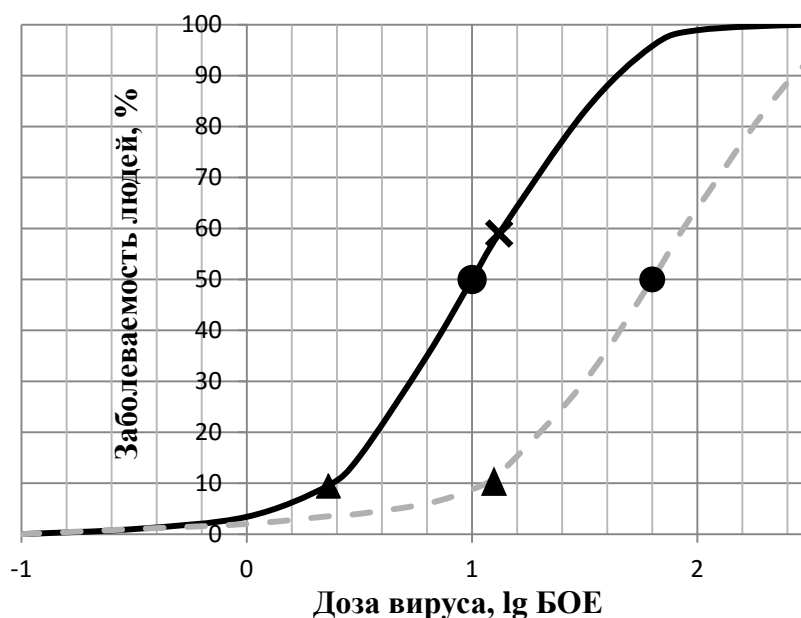
Обобщая вышеприведенную информацию из научной литературы, касающуюся основных количественных и качественных составляющих компонентов эпидемических процессов при натуральной оспе и оспе обезьян, не беря во внимание контагиозность, можно принять следующие утверждения об:

- 1) подобии механизмов передачи инфекции при эпидемических вспышках натуральной оспы и оспы обезьян, связанных с инфицированием людей через респираторный тракт;
- 2) близкой устойчивости во внешней среде ВНО и ВОО, относящихся к роду *Orthopoxviridae*;
- 3) более тяжелом течении у людей натуральной оспы по сравнению с оспой обезьян;
- 4) низкой частоте встречаемости инapparантных форм заболевания как при натуральной оспе, так и оспе обезьян;
- 5) подобии концентраций вируса в оспинах и генетического материала в них (основной источник распространения ВНО и ВОО у людей) при натуральной оспе и оспе обезьян.

Наличие большого сходства по вышепредставленным показателям эпидемических процессов при натуральной оспе и оспе обезьян позволяет провести определение степени чувствительности людей к ВОО. Если не принимать во внимание факт имеющихся различий по уровням тяжести течения болезней у человека, вызываемых данными пато-

генами, то ВНО и ВОО различаются только по значениям контагиозности для людей (соответственно около 10 и 58 %). При этом более слабая контагиозность ВОО у людей, в этом случае может быть обусловлена меньшей их чувствительностью к этому патогену по сравнению с той, которая отмечена для ВНО.

Зная прогнозное значение ID_{50} ВНО для людей, равное 1,0 (0,6...1,4) lg БОЕ и рассчитанное на основе экспериментальных данных по чувствительности моноцитов-макрофагов крови людей к этому патогену (п. 4.1.3.1), и исходя из требований построения стандартной кривой доза-эффект (рисунок 4.13), можно было бы считать, что ID_{50} ВОО для человека должна быть в несколько раз выше, чем ВНО (пунктирная кривая на рисунке 4.13).



- кривая доза-эффект для ВНО и ВОО с учетом различий по частоте встречаемости оспин на поверхности тела у людей при натуральной оспе и оспе обезьян
- - кривая доза-эффект для ВОО без учета различий по степени тяжести течения у человека натуральной оспы и оспы обезьян
- × точка проекции на кривой 58 %-й заболеваемости, характерной для натуральной оспы, по данным литературы [196, 257, 320], на наиболее вероятную ее вызывающую дозу ВНО
- ▲ точка проекции на кривой 10 %-й заболеваемости, характерной для оспы обезьян, по данным литературы [128, 256, 263], на наиболее вероятную ее вызывающую дозу ВОО
- точка проекции на кривой дозы ВНО и ВОО, вызывающей 50 %-ю заболеваемость среди людей (ID_{50})

Рисунок 4.13 – Кривые экспоненциальной зависимости процента заболеваемости среди людей оспой обезьян и натуральной оспой от дозы вирусов натуральной оспы (ВНО) и оспы обезьян (ВОО)

В то же время известно, что степень тяжести заболевания при оспе обезьян (частота встречаемости оспин на поверхности тела у людей) ниже, чем при натуральной оспе. Если это учесть, то можно объяснить более низкую контагиозность оспы обезьян по сравнению с натуральной оспой, не более низкой вирулентностью ВОО для людей, а попаданием в организм реципиентов меньшего количества жизнеспособного ВОО, чем ВНО. В этом случае ID_{50} ВОО для людей должна быть подобна таковой ВНО: 1,0 (0,6...1,4) lg БОЕ (сплошная линия на рисунке 4.13).

Полученные прогнозным путем сведения о величине ID_{50} для людей при инфицировании ВОО подтверждается в определенной степени результатами экспериментов на модельных видах низших приматов (*Macaca cynomolgus*), адекватно воспроизводящих симптоматику заболевания у людей:

- при аэрозольном инфицировании дозами 90 и 50000 БОЕ ВОО (ц/афр штамм ZAI-V79) соответственно 2 из 3 и 3 из 3 обезьян заболело [454];

- при в/м заражении ВОО (з/афр штамм) ID_{50} для этого же вида животных была 1,5 lg БОЕ [401].

Таким образом, проведя сравнительный количественный и качественный анализ эпидемического процесса по основным этапам при натуральной оспе, оспе обезьян, других респираторных инфекционных заболеваниях, прогнозным путем определена вероятная степень чувствительности людей к ВОО, значение которой составило 1,0 (0,6...1,4) lg БОЕ.

4.2 Распространение возбудителя оспы обезьян в организме степных сурков и аутбредных мышей ICR

4.2.1 Диссеминация вируса по органам и тканям сурков

Учитывая то, что сурки по данным регистрации внешней клинической картины заболевания демонстрировали высокую чувствительность к ВОО при и/н инфицировании (п. 4.1), сравнимую с таковой у человека, в дальнейшей работе мы использовали именно этот вид животных для изучения динамики накопления данного возбудителя заболевания в его организме при и/н инфицирования для сравнения с таковой человека и существующих модельных видов животных.

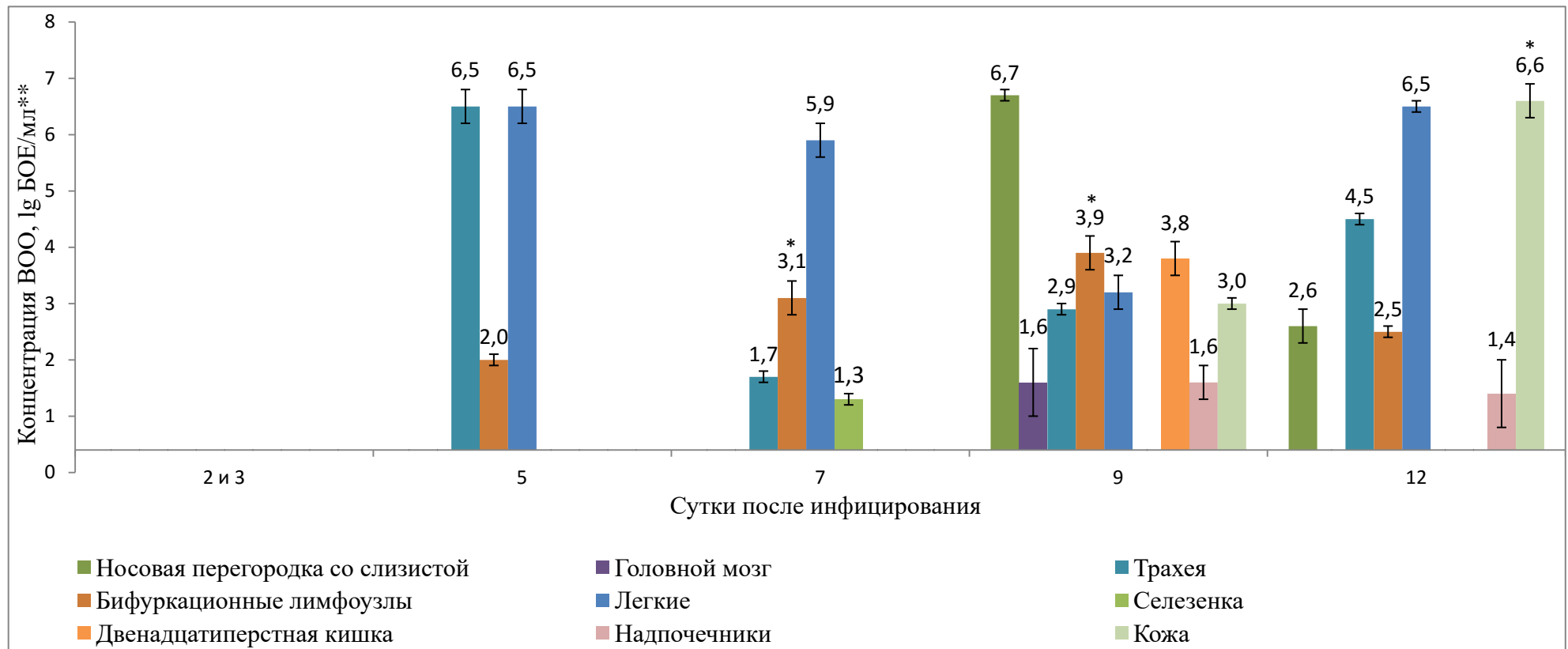
Была изучена диссеминация ВОО по органам, тканям и сыворотке крови сурков спустя 2, 3, 5, 7, 9, 12 суток после и/н заражения вирусом в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀ для этого вида животных), результаты таких экспериментов представлены на рисунке 4.14.

Из данных рисунка видно, что в некоторых органах и тканях сурков наблюдалось явное размножение ВОО, что подтверждается следующим:

- полным отсутствием патогена во всех исследованных тканях и органах, даже в респираторном тракте, на начальной стадии (через 2 и 3 суток п.и.) после и/н инфицирования сурков ВОО дозой 3,7 lg БОЕ и его появлением в низких или высоких титрах в последующем (спустя 5, 7, 9, 12 суток п.и.) в некоторых органах и тканях этих животных; - нарастанием титров вируса в отдельных органах сурков (спустя 5, 7 и 9 суток п.и. в бифуркационных лимфоузлах и спустя 9 и 12 суток п.и. в коже);

- значительным превышением (на 1–4 lg) титров вируса в отдельных органах сурков (легкие, трахея, нос, двенадцатиперстная кишка, бифуркационные л/у, кожа) через определенные промежутки времени с момента их инфицирования (5, 7, 9, 12 суток) такового, вводимого суркам при использованном заражении, если сделать пересчет зарегистрированной концентрации патогена в 5 %-х гомогенатах тканей и органов животных на соответствующие их ткани и органы.

Через 2 и 3 суток п.и. возбудитель болезни не был выявлен ни в одном из взятых биоматериалов от сурков. Только спустя 5 суток п.и. вирус впервые был зарегистрирован сразу в 2 первичных органах-мишенях (в трахее и легких), а также в бифуркационных лимфоузлах. В данных органах вирус выявляли в нашем эксперименте долгое время: 5–12-е сутки п.и. В селезенке возбудитель заболевания был обнаружен лишь через 7 суток п.и. и то в невысоком титре (1,3 lg БОЕ/мл), в последующие сроки он не выявлялся в данном органе. Через 9 суток п.и. ВОО был детектирован не только в трахее и легких, но и в носу (носовая перегородка со слизистой), двенадцатиперстной кишке, головном мозге, коже и надпочечниках. Причем через 12 суток п.и. в двенадцатиперстной кишке и головном мозге вирус перестал выявляться вообще. В то же время наблюдали и существенное снижение концентрации патогена в носу (носовая перегородка со слизистой), тогда как значение этого показателя для кожи сурков, наоборот, достигло высокого уровня. Тканями и органами максимального накопления ВОО были легкие спустя 5 и 12 суток п.и., трахея спустя 5 суток п.и., нос спустя 9 суток п.и.) и кожа спустя 12 суток п.и.



* Величина выше таковой, полученной спустя 5, 7 или 9 суток после заражения для соответствующего органа, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двусторонних t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни)

** Средние значения титров вируса (М) с доверительным интервалом (I_{95}) с заданной вероятностью 95% при 4-кратном титровании (n) 10 %-го (по объему) гомогената каждого органа и сывороток крови, взятых от одного сурка на временную точку; вирус не обнаружен в клетках и сыворотке крови, печени, мезентериальных лимфоузлах, поджелудочной железе и почках; порог чувствительности использованного метода титрования - 0,4 lg БОЕ/мл

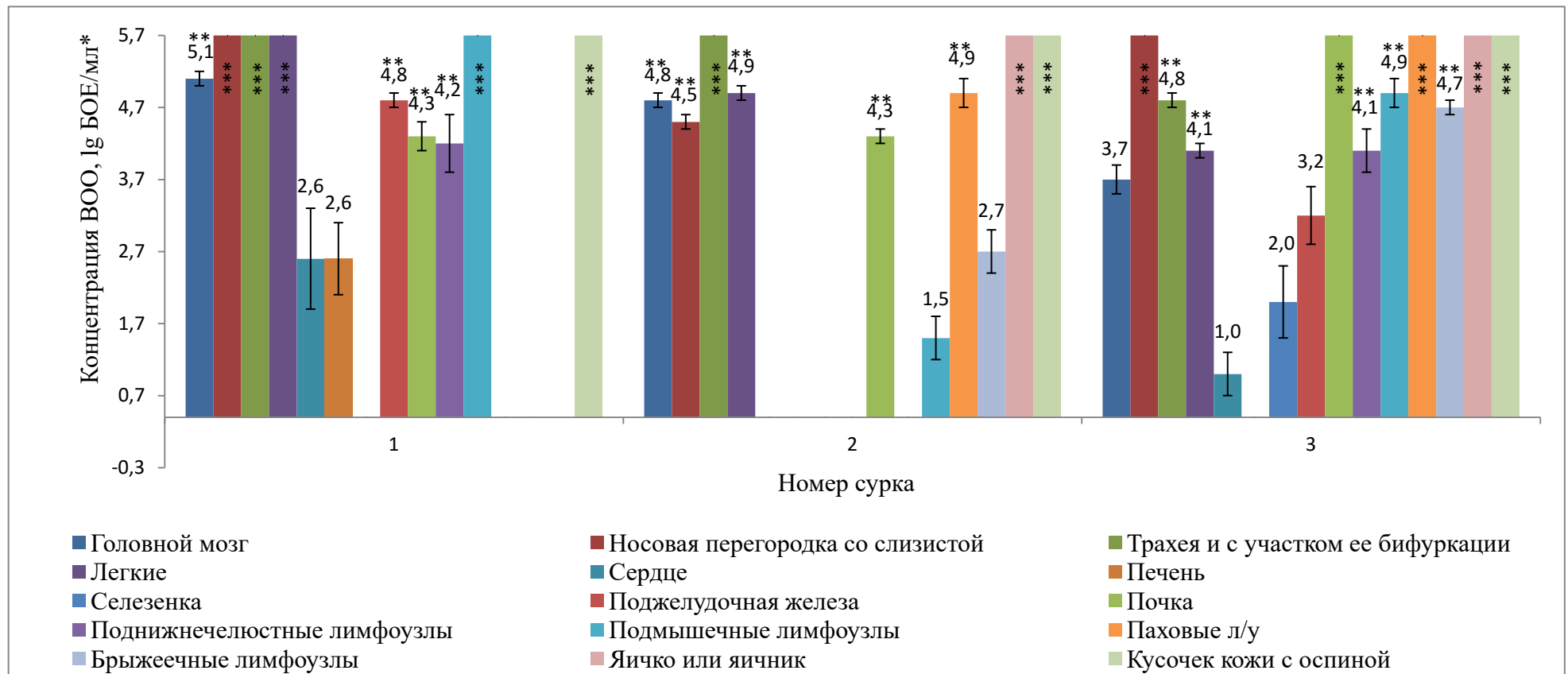
ID_{50} – 50 %-я инфицирующая доза вируса, рассчитанная по наличию внешних клинических признаков заболевания у сурков
 Рисунок 4.14 – Данные по накоплению вируса оспы обезьян – ВОО (штамма V79-1-005) в биоматериалах от степных сурков, интраназально зараженных дозой 3,7 lg БОЕ ($30 ID_{50}$)

В противоположность этим органам, во все сроки наблюдения в клетках и сыворотке крови, печени, поджелудочной железе, почках и мезентериальных лимфоузлах ВОО вообще обнаружить не удалось при титровании с помощью использованного нами метода.

Дополнительно провели изучение параметров накопления ВОО в тканях и органах некоторых сурков, погибших в эксперименте по п/к их заражению вирусом дозах 7,1 lg БОЕ (3 животных) и 5,6 lg БОЕ (2 животных). Результаты таких экспериментов представлены на рисунках 4.15 и 4.16.

Из данных, приведенных на рисунках, видно, что накопление патогена наблюдалось в разной степени почти во всех исследованных тканях и органах погибших сурков. Причем наиболее высокие концентрации этого вируса ($\geq 5,7$ lg БОЕ/мл) были обнаружены в носу (носовая перегородка со слизистой, легких, трахее, почках, подмышечных и паховых лимфоузлах, яичниках или яичках и в фрагментах кожи с оспинами). Средние величины этого показателя (4,0–5,7 lg БОЕ/мл) отмечали у сурков в ряде случаев в головном мозге, брыжеечных и поднижнечелюстных лимфоузлах и поджелудочной железе, а самые низкие значения концентраций вируса ($< 4,0$ lg БОЕ/мл) были зарегистрированы у данных животных в печени, селезенке и сердце.

В первом эксперименте на сурках мы применяли и/н метод инфицирования ВОО, который связан с попаданием инфекционного материала в респираторный тракт, как это наблюдалось при эпидемических вспышках оспы обезьян. В этом случае мы ожидали увидеть первичное размножение вируса во всех органах дыхательного тракта, но данный возбудитель заболевания был зарегистрирован лишь в легких и трахее, а в носу (носовая перегородка со слизистой) не выявлялся на первом этапе развития инфекции (рисунок 4.14). Примечательно, что через 5 суток п.и., то есть на тот же момент времени, что и в легких с трахеей, ВОО появился в бифуркационных лимфоузлах. По-видимому, распространение этого патогена у сурков сначала происходило по лимфогенному пути при вовлечении бифуркационных лимфоузлов, где происходило несколько циклов его репродукции, а затем после поступления лимфы в кровоток (венозный) – и гематогенным путем. При этом, используя метод электронной микроскопии, нам четко удалось зафиксировать признаки репродукции этого патогена в эндотелиальных клетках кровеносных капилляров (рисунок 4.22).

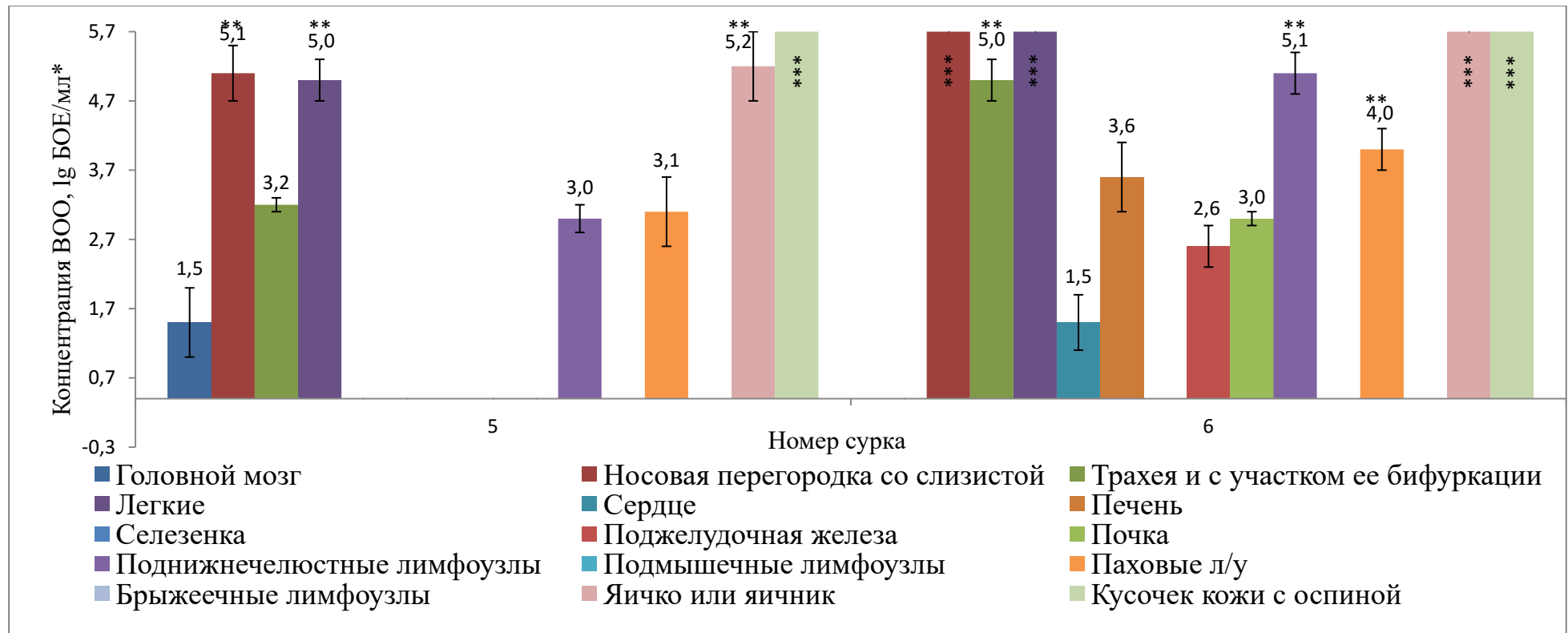


* Средние значения титров вируса (M) с доверительным интервалом (I_{95}) с заданной вероятностью 95% при 4-кратном титровании (n) 10 %-го (по объему) гомогената каждого органа, взятых от каждого сурка; порог чувствительности использованного метода титрования - 0,4 lg БОЕ/мл

** Величина выше таковой печени, сердца и селезенки, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двусторонних t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни)

*** В тех случаях, когда после титрования в максимально взятом разведении (1:1000) гомогената количество БОЕ в моно-слое клеток Vero превышало 50, использовали значение титра $> 5,7$ lg БОЕ/мл

Рисунок 4.15 - Данные по накоплению вируса оспы обезьян - ВОО (штамм V79-1-005) в биоматериалах от погибших степных сурков после подкожного инфицирования дозой 7,1 lg БОЕ



* Средние значения титров вируса (M) с доверительным интервалом (I_{95}) с заданной вероятностью 95% при 4-кратном титровании (n) 10 %-го (по объему) гомогената каждого органа, взятых от каждого сурка; порог чувствительности использованного метода титрования - 0,4 lg БОЕ/мл

** Величина выше таковой печени, сердца и селезенки, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двусторонних t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни)

*** В тех случаях, когда после титрования в максимально взятом разведении (1:1000) гомогената количество БОЕ в моно-слое клеток Vero превышало 50, использовали значение титра $> 5,7$ lg БОЕ/мл

Рисунок 4.16 - Данные по накоплению вируса оспы обезьян - BOO (штамма V79-1-005) в биоматериалах от погибших степных сурков после подкожного инфицирования дозой 5,6 lg БОЕ

В то же время ВОО не был обнаружен ни в форменных элементах крови, ни в ее сыворотке при титровании с помощью использованного нами способа (минимальный предел выявления ВОО - 0,7 lg БОЕ/мл). Данные обстоятельства свидетельствуют о возможном присутствии патогена в крови сурков в предельно низких количествах, но видимо, достаточных для заражения вторичных органов-мишеней. Факт наличия вируса в этой ткани в минимальных концентрациях подтверждался отсутствием одновременно инфицирования многих вторичных органов, содержащих чувствительные к этому патогену клетки. Так, у сурка, подвергнутого эвтаназии через 7 суток п.и., вирус обнаруживали только в селезенке; у сурка, эвтаназированного через 9 суток п.и., вирус обнаруживали в двенадцатиперстной кишке, головном мозге, в носу (носовая перегородка со слизистой), коже и надпочечниках; а у сурка, эвтаназированного через 12 суток п.и., вирус обнаруживали в носу (носовая перегородка со слизистой), коже и надпочечниках. Такая хаотичность при инфицировании вторичных органов-мишеней свидетельствовала о наличии элемента случайности при попадании в них патогена и может быть обусловлена присутствием патогена в крови в крайне низкой концентрации и/или его распространением из легких и трахеи с помощью глубокой и поверхностной разветвленной сети лимфатических сосудов в другие части макроорганизма, включая кожу и слизистую оболочку носа.

В пробах крови, взятых от луговых собачек, тоже, как и сурки, принадлежащих к семейству беличьих, спустя 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 суток после и/н заражения ВОО (ц/афр штамм МРХV-2003-358) дозой 4,5 lg БОЕ, выявляли вирусную ДНК в низких концентрациях [101]. При этом репродукция жизнеспособного вируса в тканях и органах была показана только у одной павшей луговой собачки спустя 13 суток после и/н заражения. В сыворотке крови данного животного был найден вирус в высоком титре (> 6 lg БОЕ/мл), однако в других экспериментах [182] у животного, погибшего через 11 суток после и/н заражения более низкой дозой этого же патогена (2,9 lg БОЕ - 1 ID₅₀, подсчитанная нами), зарегистрировать в крови вирус не удалось. Более того, при увеличении дозы инфицирования (3,9 lg БОЕ - 10 ID₅₀, подсчитанные нами) только у 50 % павших животных данного вида был выявлен патоген в крови. В экспериментах, выполненных нами, у заболевших после и/н заражения ВОО сурков дозой 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀) не был зарегистрирован вирус в форменных элементах крови и ее сыворотке во всех случаях при изучении инфекционного процесса. Некоторое несоответствие наших результатов,

полученных на сурках, таковым, выполненным на луговых собачках, скорее всего, связано с различиями взятых в экспериментах вирусных штаммов, доз заражения и видов животных. Более того, в отличие от исследований, приведенных в вышеупомянутых статьях [101, 182], в нашей работе анализ размножения ВОО в тканях и органах сурков осуществляли не у павших, а у умерщвленных животных в различные сроки после и/н их инфицирования. При это как у сурков, так и у луговых собачек, павших соответственно от п/к и внутрикожного заражения ВОО, значительные концентрации вируса выявлялись во многих исследованных тканях и органах (рисунки 4.15 и 4.16).

Факт размножения ВОО не только в респираторных органах сурков, но и в иных висцеральных органах при заражении через респираторный тракт согласуется с таковым у модельных животных и человека [34, 155, 156] и указывает на генерализованное течение болезни напоминающее, в общем виде, и иные особо опасные инфекции (Эбола, Марбург, венесуэльский энцефаломиелит лошадей и прочие), вызванные аэрозольным заражением экспериментальных животных [29, 67, 77].

К сожалению, в научной литературе, доступной для нас, не представлено информации по накоплению ВОО в тканях и органах больного человека, чтобы сравнить ее с данными наших экспериментальных исследований, выполненных на сурках. Имеются только сведения о количестве геномных копий вируса в кожных оспинах людей (несколько миллионов) [195]. При этом подобное количество жизнеспособных вирусных частиц было обнаружено и у сурков в этой ткани: 7,3 lg БОЕ (в 5 мл гомогената оспины 6,6 lg БОЕ/мл). Если исходить из признанных соображений, что у людей клиническая картина оспы обезьян и патогенез воспроизводят обычный клинический тип натуральной оспы [158], то у больных этим типом натуральной оспы почти никогда не удавалось уловить вирусемию: очень редко патоген выделяли из крови в ранней стадии высыпания и продромальном периоде [1, 34, 362]. В экспериментах на сурках мы также не обнаруживали ВОО в крови в исследованные сроки ее забора (2, 3, 5, 7, 9, 12 суток п.и.). Наличие ВНО в зеве и носоглотке у людей наблюдали не только со времени появления клинической симптоматики [37, 403, 457], но и в конце инкубационного периода болезни [458], и в стадии реконвалесценции [369]. Аналогичные результаты по выделению ВОО из носа (носовой перегородки со слизистой) были нами получены в экспериментах на сурках при и/н инфицировании в период появления симптоматики заболевания (рисунок 4.14).

Таким образом, данные изучения динамики накопления ВОО в органах и тканях сурков при инфицировании через дыхательный тракт (и/н) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀) подтвердили в ряде случаев их подобие некоторым известным показателям инфекционного процесса у людей при натуральной оспе и оспе обезьян: сам факт накопления этих вирусов в оспинах кожи (включая величину их концентрации), генерализация инфекций, низкая вероятность выявления этих вирусов в крови в процессе титрования и накопление их в органах верхнего отдела дыхательного тракта. При этом факты репродукции ВОО не только в респираторных органах сурков, но и в иных висцеральных органах соответствуют таковым у модельных животных для оспы обезьян и человека. Определены органы первичного размножения ВОО: легкие с трахеей, основной механизм распространения вируса в организме сурков, в том числе из первичных органов-мишеней: лимфогенный с его репродукцией в лимфоидных органах. Показано, что органами наибольшего накопления патогена у и/н инфицированных животных этого вида, являются легкие, трахея, нос (носовая перегородка со слизистой), также кожа, где концентрация вируса в ряде случаев была выше 6 lg БОЕ/мл, выраженная репродукция вируса отмечена у инфицированных животных в бифуркационных лимфоузлах и двенадцатиперстной кишке, достигающая титров 3–4 lg БОЕ/мл. У сурков, павших после п/к инфицирования дозами 5,6; 7,1 lg БОЕ, накопление вируса в наиболее высоких титрах ($\geq 5,7$ lg БОЕ/мл) наблюдалось в носу (носовая перегородка со слизистой), легких, трахее, почках, подмышечных и паховых лимфоузлах, яичниках или яичках и в фрагментах кожных оспин, средние величины этого показателя (4,0–5,7 lg БОЕ/мл) были отмечены в поджелудочной железе, головном мозге, брыжеечных и поднижнечелюстных лимфоузлах, а самые низкие ($< 4,0$ lg БОЕ/мл) - в селезенке, сердце и печени.

4.2.2 Диссеминация вируса в организме мышей

Учитывая то, что аутбредные мыши ICR по данным регистрации ВОО в легких демонстрировали высокую чувствительность к данному патогену при и/н инфицировании (п. 4.1), сравнимую с таковой у человека, в дальнейшей работе мы взяли конкретно этот вид животных с целью изучения диссеминации в его организме возбудителя заболевания после и/н заражения для сравнения с человеком и существующими модельными животными.

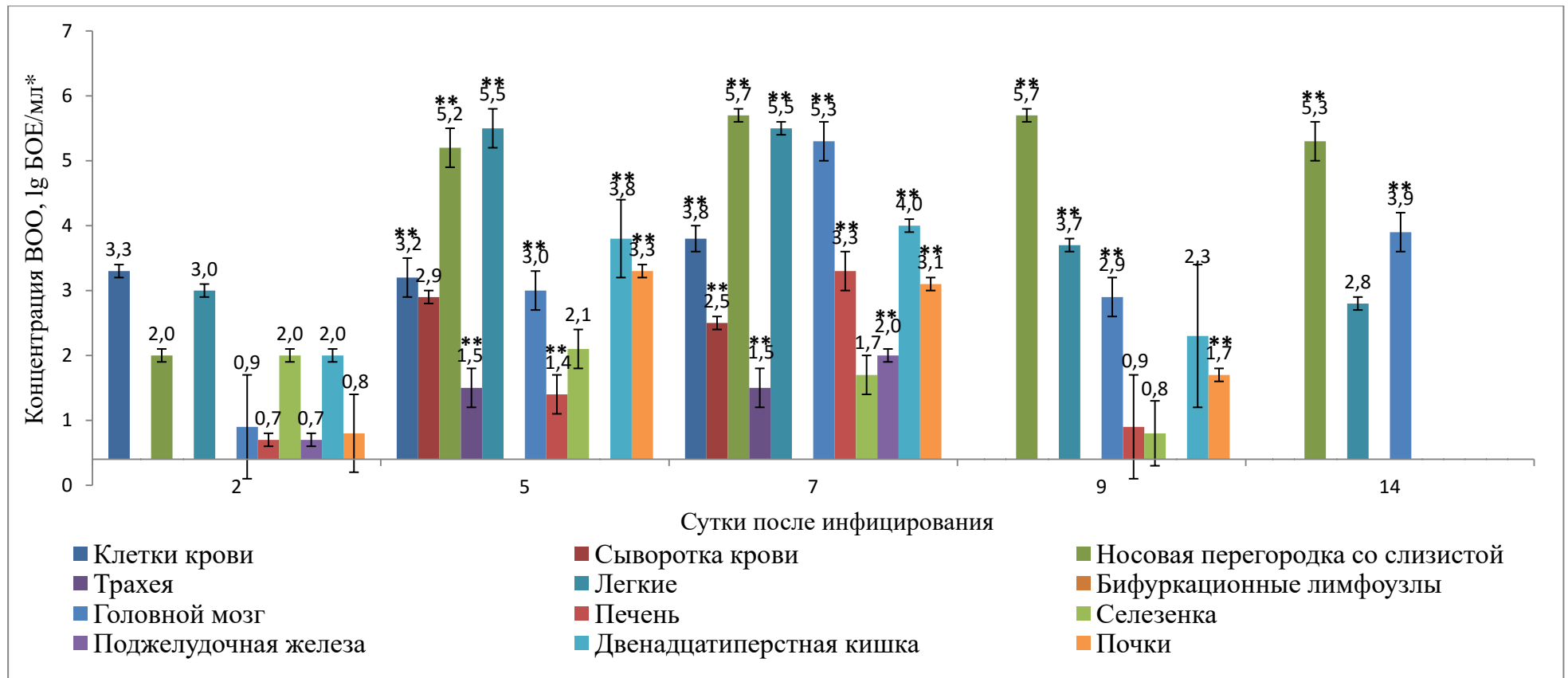
Была исследована динамика накопления вируса в сыворотке крови, органах и тканях мышей спустя 2, 5, 7, 9 и 14 суток после и/н инфицирования патогеном дозой 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀), данные этих экспериментов приведены на рисунке 4.17.

Представленные результаты свидетельствуют о размножении ВОО во многих тканях и органах и/н зараженных мышей, на что указывают следующие факты:

- присутствие более высоких (в 100–1000 раз) количеств вируса (в расчете на орган) в легких, носу (носовой перегородке со слизистой) и головном мозге, регистрируемых через 5–7 суток п.и., чем то, которое было взято при и/н заражении этих животных;
- наличием динамики по накоплению вируса спустя 2, 5, 7 суток п.и. в ряде тканей и органов: в носу (носовой перегородке со слизистой), легких, головном мозге, печени, двенадцатиперстной кишке и почках.

Из данных рисунка видно, что уже спустя 2 суток п.и. возбудитель заболевания обнаруживался в относительно высоких титрах сразу в нескольких тканях и органах: в клетках крови, носовой перегородке со слизистой, легких, селезенке и двенадцатиперстной кишке. Затем через 5 суток п.и. патоген был зарегистрирован в титрах 1,4–3,3 lg БОЕ/мл и во многих иных органах (трахее, головном мозге, почках и печени), а также в сыворотке крови. При этом величины концентрации патогена в носовой перегородке со слизистой и легких существенно превысили таковые других органов, тканей и сыворотки. Через 7 суток п.и. ситуация практически не изменилась в сравнении с 5-ми сутками, если не брать в расчет резкое повышение концентрации вируса в печени (3,3 lg БОЕ/мл) и головном мозге (5,3 lg БОЕ/мл), а также его появление в поджелудочной железе. Спустя 9 суток п.и. концентрация вируса практически во всех органах, кроме носа (носовая перегородка со слизистой), резко уменьшилась вплоть до нерегистрируемых величин, а спустя 14 суток п.и. величина данного показателя была < 0,4 lg БОЕ/мл у подавляющего большинства видов биоматериала, не считая головного мозга, носовой перегородки со слизистой и легких.

Самые большие значения титров ВОО были выявлены в носу (носовая перегородка со слизистой), головном мозге и легких, причем данная находка в ряде случаев была зарегистрирована спустя 5, 7, 9 суток п.и. Причем во все сроки наблюдения (2–14 суток п.и.) вирус вообще не выявлялся в бифуркационных лимфоузлах.



* Средние значения титров вируса (M) с доверительным интервалом (I_{95}) с заданной вероятностью 95% по органам (10 %-е по объему гомогенаты) и сывороткам, взятым от 4 мышей на временную точку (n); порог чувствительности использованного метода титрования - 0,4 lg БОЕ/мл

** Величина выше таковой, полученной спустя 2 суток после заражения для соответствующего органа, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двусторонних t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни)

ID₅₀ – 50 %-я инфицирующая доза вируса, рассчитанная по его наличию в легких мышей через 7 суток после заражения

Рисунок 4.17 – Данные по накоплению вируса оспы обезьян - BOO (штамм V79-1-005) в биоматериалах аутбредных мышей ICR, интраназально инфицированных с помощью дозы 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀)

Из-за того, что наши исследования (рисунок 4.16) по изучению динамики размножения ВОО у и/н зараженных мышей начались спустя 2 суток п.и., нам не удалось обнаружить, в каком органе осуществляется первичное размножение патогена. Однако, очевидно, что как верхние отделы респираторного тракта, так и нижние активно задействованы в процесс репликации возбудителя заболевания. При этом распространение вируса в организме данных животных в основном происходит гематогенным путем, беря во внимание наличие патогена в крови и его отсутствие в лимфатических узлах на всех временных точках наблюдения. К аналогичному выводу пришли и некоторые исследователи [28, 144, 214], проводившие эксперименты на кроликах и мышах, респираторно (и/н или аэрозольно) инфицированных одним из видов ортопоксвирусов (ВНО, вирусы оспы коров и экстремелии). Возможно, существенное снижение (или отсутствие) значения лимфогенного пути при распространении ВОО в организме мышей связано с несовершенством лимфатической системы животных этого вида [244, 420, 459]. При этом существенно более высокую концентрацию патогена наблюдали спустя 2, 5 и 7 суток п.и. в клеточных элементах крови в сравнении с таковой в сыворотке. Если учесть, что титры вируса были пересчитаны на миллилитр неразведенной сыворотки крови и на 10 %-й гомогенат ее форменных элементов, то разница между этими концентрациями должна быть еще существеннее (на 1 lg БОЕ) из-за увеличения величины данного показателя при пересчете на неразведенную массу клеток крови. Факт значительного превышения концентраций патогена в форменных элементах крови над таковыми ее сыворотки может быть объяснен одной или двумя причинами: наличием выраженной адсорбции вируса клетками крови и/или его репродукцией в них (по всей видимости, в ретикулярных клетках с учетом данных электронной микроскопии). При этом в первом случае большие количества адсорбирующегося патогена, вероятно, были произведены эндотелиальными клетками кровеносных капилляров (рисунок 4.32), чем другими клетками различных органов-мишеней. Об этом свидетельствует наличие достоверно более высокой концентрации вируса в клетках крови спустя 2 суток п.и., чем в иных органах инфицированных животных. Факт возможной адсорбции патогена клетками крови мышей (например, эритроцитами) подтверждается результатами электронной микроскопии (рисунок 4.29), с помощью которой возбудитель заболевания был обнаружен на эритроцитах.

Через 9 суток п.и. и позднее было обнаружено снижение концентрации ВОО (до неопределяемых значений) в крови многих и органах животных, что, вероятнее всего,

обусловлено воздействием у мышей формирующегося специфического иммунного ответа.

Было также отмечено, что тканями и органами максимального накопления вируса у мышей являются легкие, нос (носовая перегородка со слизистой) и головной мозг. Данное наблюдение зарегистрировано в ряде случаев спустя 5, 7, 9 суток п.и. Наличие относительно невысоких концентраций вируса в некоторых паренхиматозных органах (печень, головной мозг, селезенка, почки и двенадцатиперстная кишка) спустя 2, 5, 7, 9 суток п.и., сопоставимых с таковыми крови, трудно объяснить только присутствием вируса в них из крови и/или его репродукцией эндотелием (данные электронной микроскопии) кровеносных капилляров этих органов. Данный факт, скорее всего, связан с размножением вируса в собственной ткани таких органов, если принять во внимание, что количество крови в них не превышает 10 % их массы (неопубликованные наши данные), а также то, что спустя 9 суток п.и. при отсутствии патогена в крови он был зарегистрирован во всех данных органах. Периодическое же появление вируса в поджелудочной железе в низких титрах может быть обусловлено за счет его присутствия в крови, а также его репродукцией эндотелием кровеносных капилляров этого органа. К аналогичному предположению можно было бы прийти и в отношении трахеи, однако по данным электронной микроскопии были обнаружены продуцирующие вирус клетки слизистой дыхательного тракта: эпителиоциты (рисунок 4.31).

В отличие от опубликованных научных исследований [90, 162, 163] зарубежных авторов в нашей работе, связанной с изучением динамики накопления у мышей ВОО были использованы: иммунокомпетентные животные (10–14-суточные аутбредные мыши ICR); способ и/н инфицирования животных (соответствующий при эпидемических вспышках механизмам передачи данной инфекции); более низкая доза инфицирования животных ВОО - 25 ID₅₀ (3,8 lg БОЕ), вероятно, более близкая к таковой при эпидемических вспышках; умерщвленные (перед взятием биоматериала) в различные сроки п.и. животные для отслеживания у них динамики накопления патогена.

После и/н инфицирования мышей ВОО дозой 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀) сами факты размножения патогена не только в респираторных органах животных этого вида, но и в иных висцеральных тканях и органах согласуются с таковым при этой инфекции у людей и модельных видов животных [34, 155, 156] и свидетельствуют о генерализованном течении болезни, но без визуальных клинических признаков.

К сожалению, в научной литературе, доступной для нас, не представлено данных по накоплению ВОО в тканях и органах больных людей, чтобы сопоставить их с таковыми наших экспериментальных исследований, выполненных на мышах. Имеются лишь сведения о количестве геномных копий вируса (несколько миллионов) в оспинах на коже больных людей [195]. Но в наших экспериментах с использованием мышей, и/н зараженных ВОО дозах до 4,5 lg БОЕ, отсутствовала клиническая картина болезни, тем более оспоподобная сыпь.

Если оспа обезьян у людей напоминает патогенез натуральной оспы с обычным клиническим типом [158], при котором вирус в крови людей практически не регистрировали [1, 34, 362], то в экспериментах с применением мышей мы регулярно наблюдали ВОО в этой ткани спустя 2, 5, 7 суток п.и. в относительно высоких титрах ($\leq 3,8$ lg БОЕ/мл). Эта ситуация, наблюдаемая у животных данного вида, была сходна с таковой у человека, но при геморрагическом клиническом типе натуральной оспы, при котором вирус часто изолировали из такой ткани в существенных титрах (≤ 4 lg ООЕ/мл) [238, 450, 456].

Факт размножения ВОО в респираторных органах мышей после и/н заражения в определенной степени соответствует таковому у человека при натуральной оспе [243, 303, 457, 458]. Исследователи обнаруживали максимальные концентрации ВНО (3–6 lg ООЕ/мл) в смывах из глотки людей [457] аналогично нашим данным по накоплению вируса у мышей в носу (носовой перегородке со слизистой). Наличие патогена в зеве и носоглотке людей обнаруживали не только от момента появления внешних клинических признаков заболевания [37, 403, 457], но и в конце инкубационного периода болезни [458], и стадии реконвалесценции [369]. Аналогичные результаты по длительному выделению ВОО из слизистой носовой полости были получены и нами на и/н инфицированных мышах.

Таким образом, результаты экспериментов по изучению динамики репродукции ВОО по тканям и органам аутбредных мышей ICR при заражении через дыхательный тракт (и/н) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀) подтвердили сходство в некоторых случаях с известными параметрами инфекционного процесса у людей при натуральной оспе и оспе обезьян: наличие генерализованной инфекции, а также накопление патогена в слизистой полости носа. Причем факты размножения ВОО не только в респираторных органах животных, но и в иных висцеральных органах согласуются с таковыми у модельных видов

животных для оспы обезьян. Выявлен основной механизм диссеминации вируса от первичных органов-мишеней в организме мышей: гематогенный с размножением его в крови и/или в кровеносной системе. Отмечено, что органами максимальной репродукции ВОО у и/н инфицированных мышей являются нос, легкие и головной мозг, в которых в ряде случаев титры вируса превышали $5 \lg$ БОЕ/мл. Выраженное накопление вируса ($3-4 \lg$ БОЕ/мл) у таких животных показано в печени, почках и двенадцатиперстной кишке.

4.3 Патоморфологические изменения у степных сурков и аутбредных мышей

ICR, зараженных возбудителем оспы обезьян

4.3.1 Световая и электронная микроскопия органов и тканей сурков, зараженных вирусом

Учитывая то обстоятельство, что сурки при и/н инфицировании ВОО (штаммом V79-1-005), как и люди, поддерживали генерализованный инфекционный процесс, стартовый от респираторного тракта с дальнейшим подключением других внутренних органов (п. 4.2), и воспроизводили оспоподобное заболевание (п. 4.1), в последующей работе мы осуществили изучение патоморфологических изменений в организме этого вида животных после и/н заражения данным патогеном с целью выявления их степени сходства с таковыми, наблюдаемыми у существующих модельных животных и человека.

Для выполнения патоморфологического изучения тканей и органов инфицированных ВОО сурков требовалось провести процедуру доставки их фрагментов из «заразной» рабочей зоны ЛСК-4 корпуса № 6 в «чистую» зону. Для этого нами была отработана методология приготовления таких фрагментов, представленная в подразделе 2.8 и в созданных нами руководящем документе Роспотребнадзора (МУ 1.3.3103-13) [42] и инструкции «по порядку подготовки, дезинфекции и выноса из заразной зоны ЛСК-4 (корпус № 6) фрагментов органов и мазков органов, полученных от инфицированных вирусом оспы обезьян модельных животных, а также культур клеток». Данная методология обеспечивала гарантированную инактивацию жизнеспособного ВОО в этих биоматериалах по результатам исследования их на остаточную инфекционность.

Используя перенесенные в чистую зону от зараженных ВОО сурков фрагменты тканей и органов, было выполнено световое и электронно-микроскопическое изучение. Причем у животных этого вида было продемонстрировано развитие патоморфологиче-

ских изменений во многих тканях и органах с 7-х суток после и/н инфицирования, а также у павших сурков после и/н и п/к заражения. Эти изменения зависели от тяжести клинических проявлений и, так же как последние, не коррелировали с дозами п/к (2,6; 4,1; 5,6; 7,1 lg БОЕ) и и/н инфицирования (3,7; 7,8 lg БОЕ).

В отделах дыхательной системы наиболее заметными были деструктивные изменения эпителиальной выстилки, связанные с активной репродукцией патогена в клетках и формированием воспалительного процесса. Повреждения усиливались миграцией в эти зоны иммунокомпетентных клеток. Внимание обращали на себя полиморфные изменения эндотелия кровеносных сосудов, включавшие некротические и апоптозные явления. Эндотелиальные клетки, находящиеся в состоянии апоптоза, имели резкое уплотнение и распад ядер (кариорексис и кариопикноз), а также редукцию цитоплазматических структур. В сохраненных участках цитоплазмы эндотелия митохондрии часто были увеличены, однако сохраняли параллельное расположение крист и форму. Чаще всего вирусные частицы регистрировали в цитоплазме макрофагов, эпителиоцитов, плазмоцитов и эндотелиоцитов. Примечательно, что вирионы, находящиеся в цитоплазме одной клетки, различались по степени морфологической зрелости, что подтверждало репродукцию этого патогена в каждом из перечисленных типов клеток (рисунки 4.18, 4.19, 4.20, 4.21). В цитоплазме эндотелиальных клеток, пребывающих в состоянии некроза, наблюдали большое количество частиц вируса на разной стадии зрелости (рисунок 4.22). Более того, в альвеолярном просвете часто регистрировали плеоморфные частицы вируса (рисунок 4.23).

Кроме выше перечисленных клеток-мишеней для этого вируса, в организме зараженных сурков размножение патогена было выявлено и в других видах клеток (например, гладкомышечных и ретикулярных клетках, фибробластах).

В слизистой оболочке полости носа и трахеи зараженных сурков отмечали выраженные некротические очаги (рисунки 4.24 А, Б, В). Важным элементом в формировании патологического процесса после заражения сурков ВОО были нарушения микроциркуляции с развитием сладжа эритроцитов и стаза в капиллярах, образования тромбов, а также внутрисосудистого гемолиза эритроцитов.

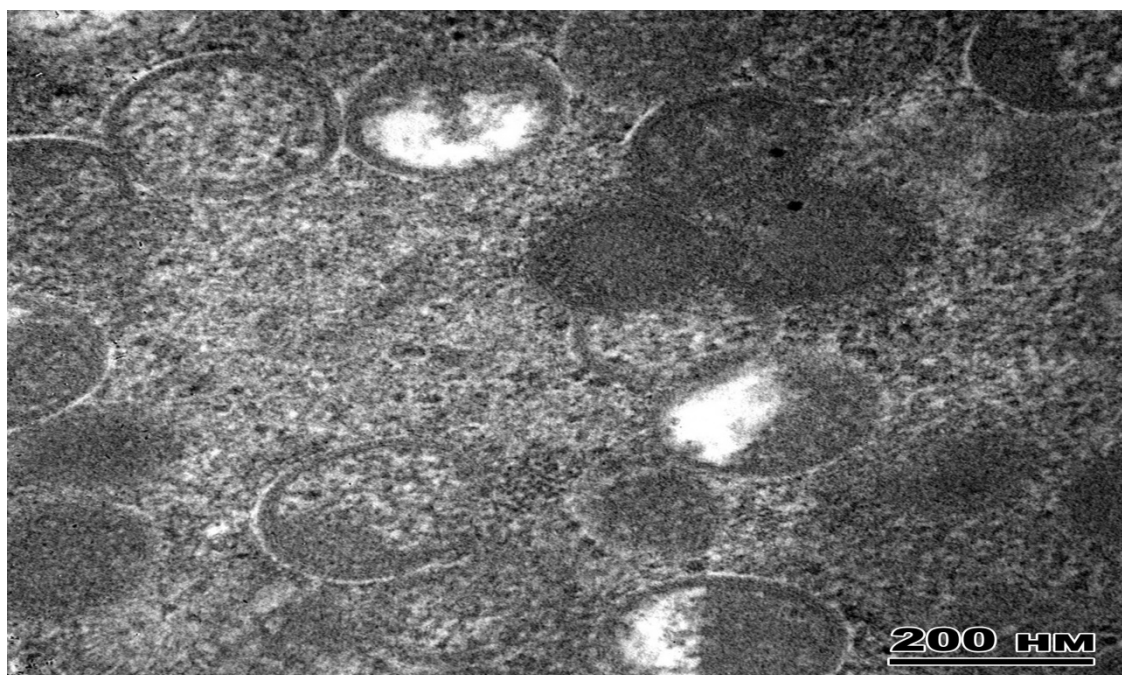


Рисунок 4.18 – Реснитчатый эпителиоцит трахеи (трансмиссивная электронная микроскопия) степного сурка спустя 7 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀): в цитоплазме вироплазма (частицы вируса разной степени зрелости)

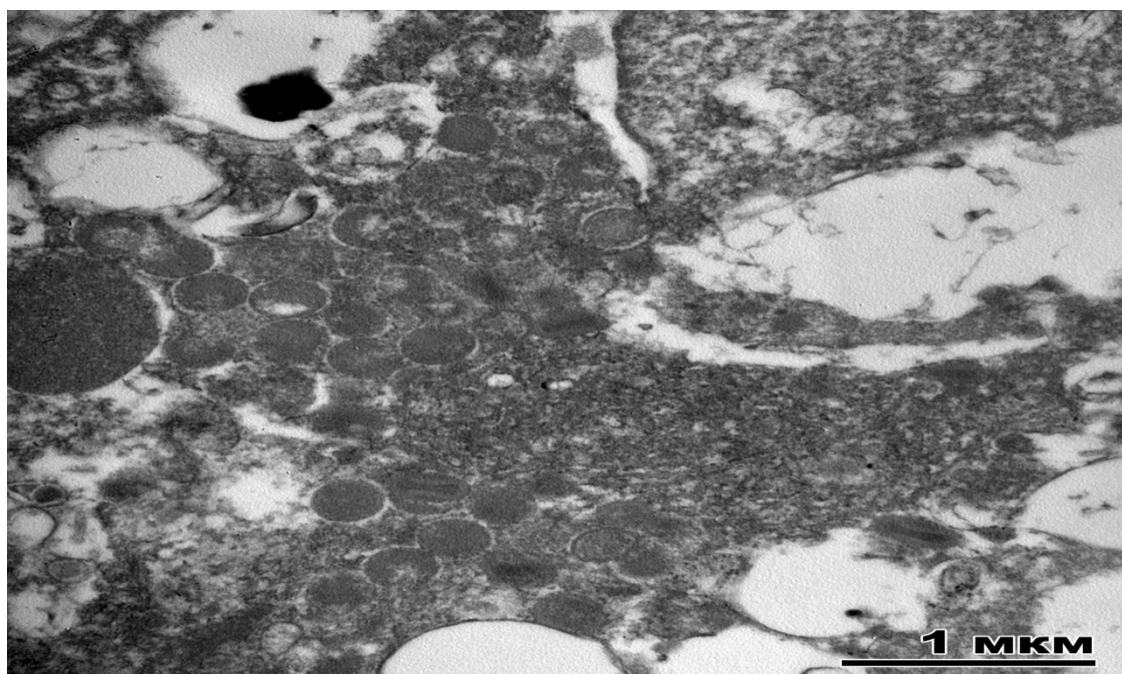


Рисунок 4.19 – Альвеолярный макрофаг (трансмиссивная электронная микроскопия) степного сурка спустя 7 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀): вирусные частицы в цитоплазме

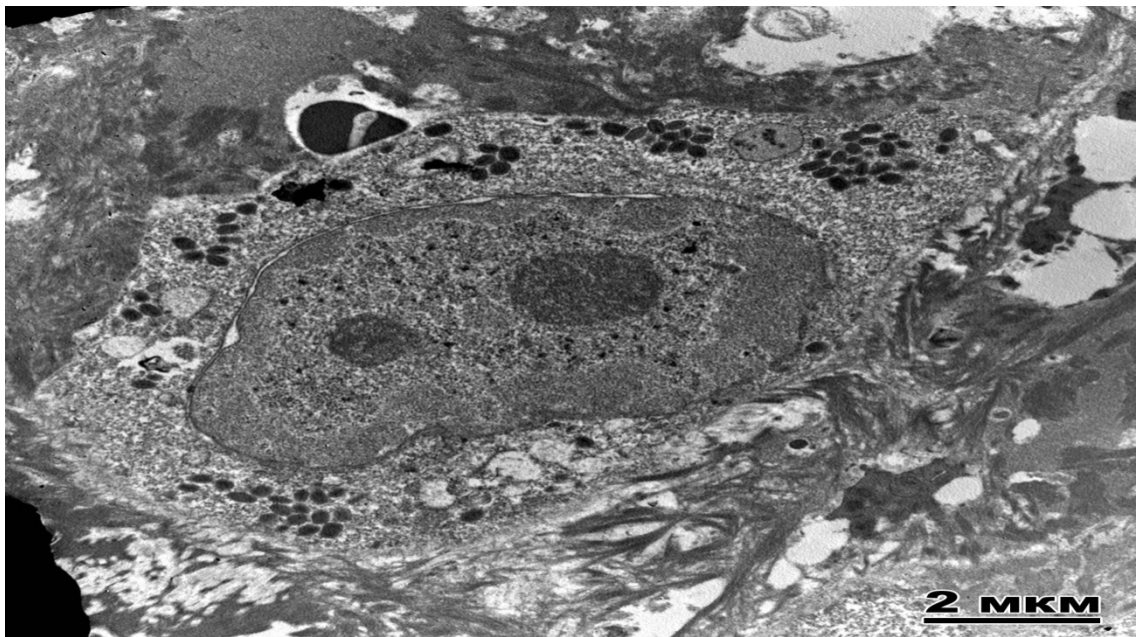


Рисунок 4.20 – Бронхиальный эпителиоцит (трансмиссивная электронная микроскопия) степного сурка спустя 9 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀): в цитоплазме групповые скопления частиц вируса, а также перицеллюлярное скопление фибрина

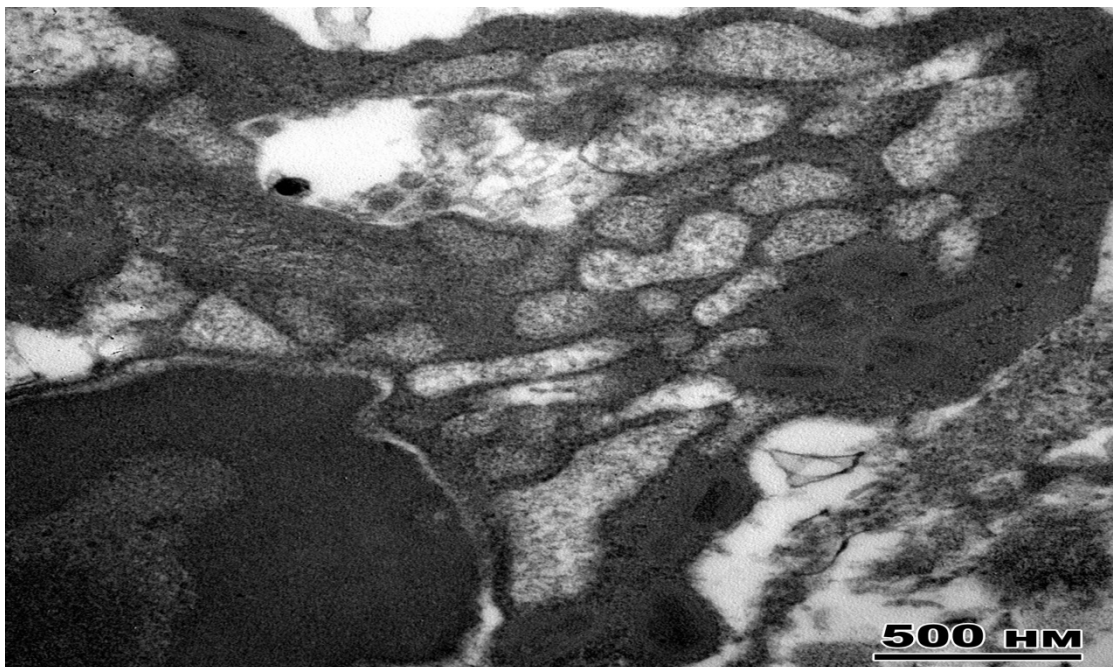


Рисунок 4.21 – Плазмоцит в лимфоузле (трансмиссивная электронная микроскопия) степного сурка спустя 12 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀): формирующиеся вирионы в цитоплазме

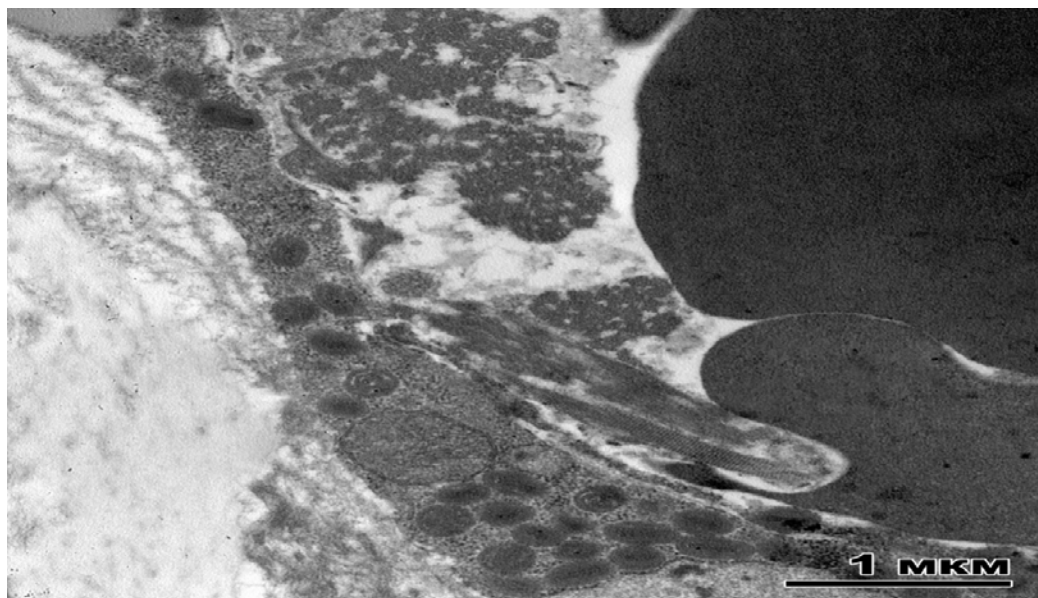


Рисунок 4.22 – Участок стенки капилляра в собственной пластинке слизистой оболочки трахеи (трансмиссивная электронная микроскопия) степного сурка спустя 9 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀): эритроцит и фибриновые волокна в просвете капилляра, полиморфные вирусные частицы в цитоплазме эндотелиоцита

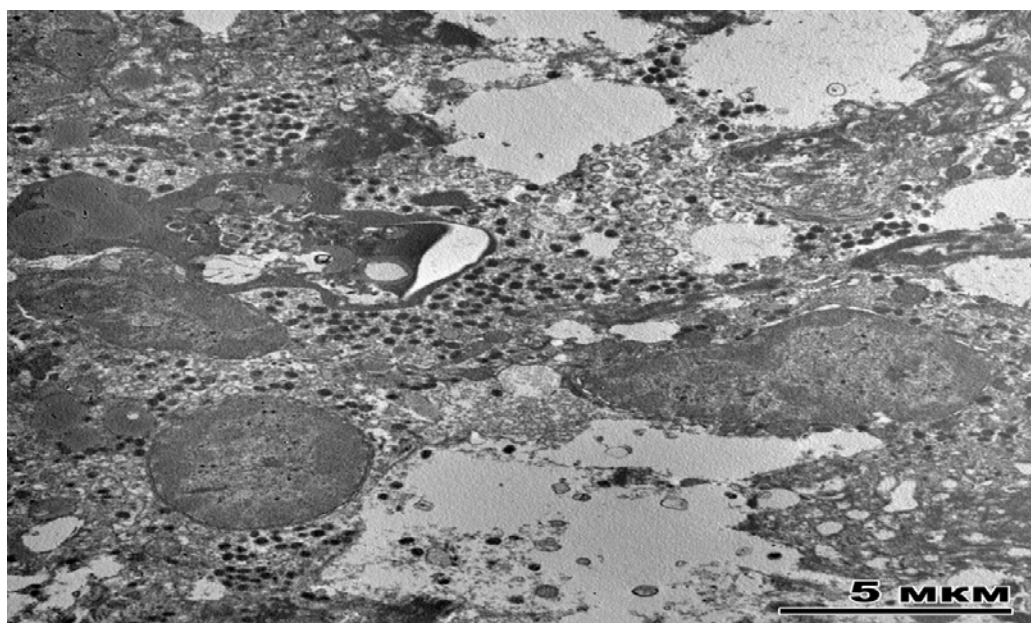
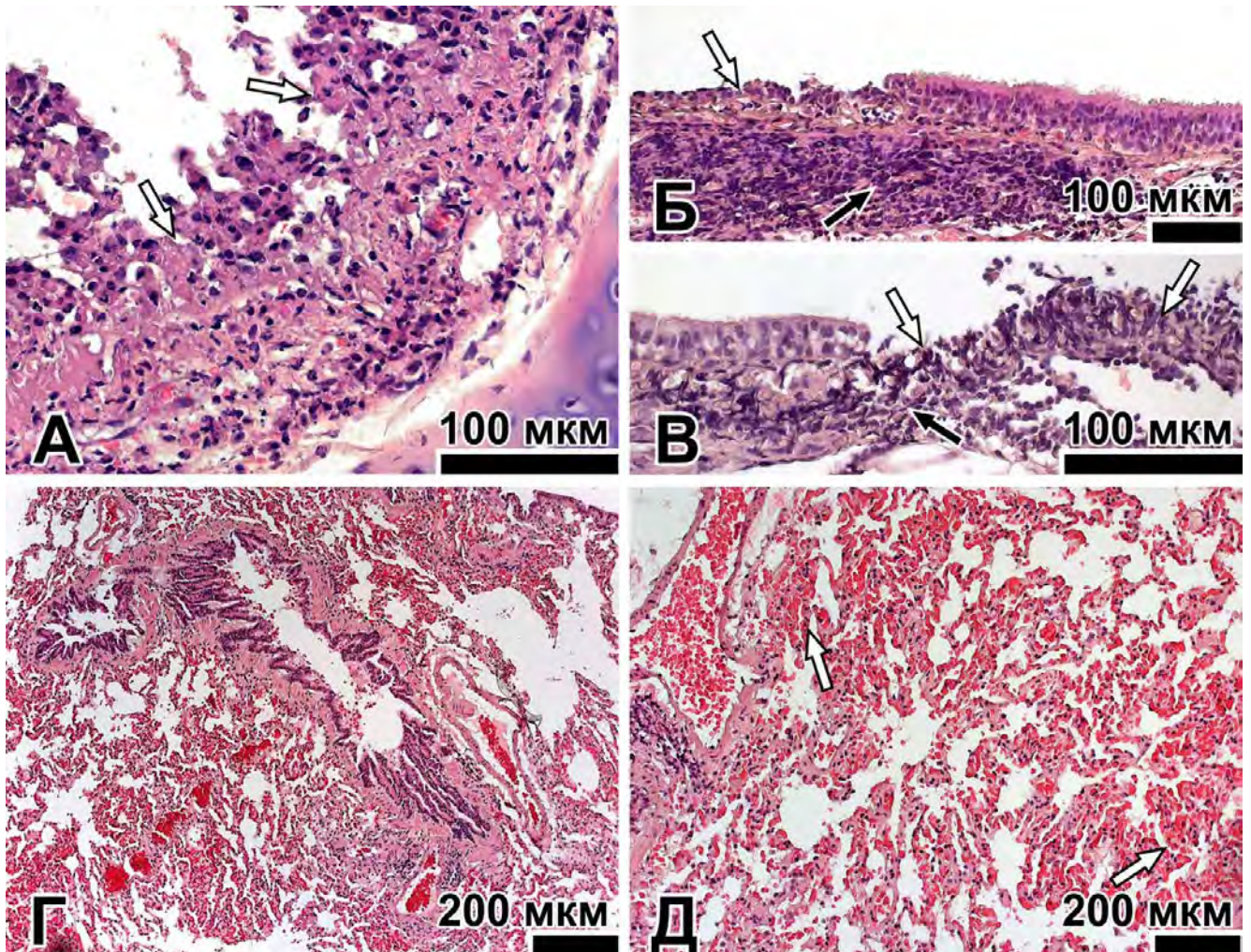


Рисунок 4.23 – Альвеолы (трансмиссивная электронная микроскопия) степного сурка спустя 9 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀): в просвете альвеол плеоморфные вирусные частицы

Все это давало основание предположить, что при развитии летального заболевания важную роль играет тромбогеморрагический синдром (рисунки 4.24 Г, Д).



А – ткань слизистой носа с крупными некротическими очагами слизистой оболочки, отмеченными белыми стрелками

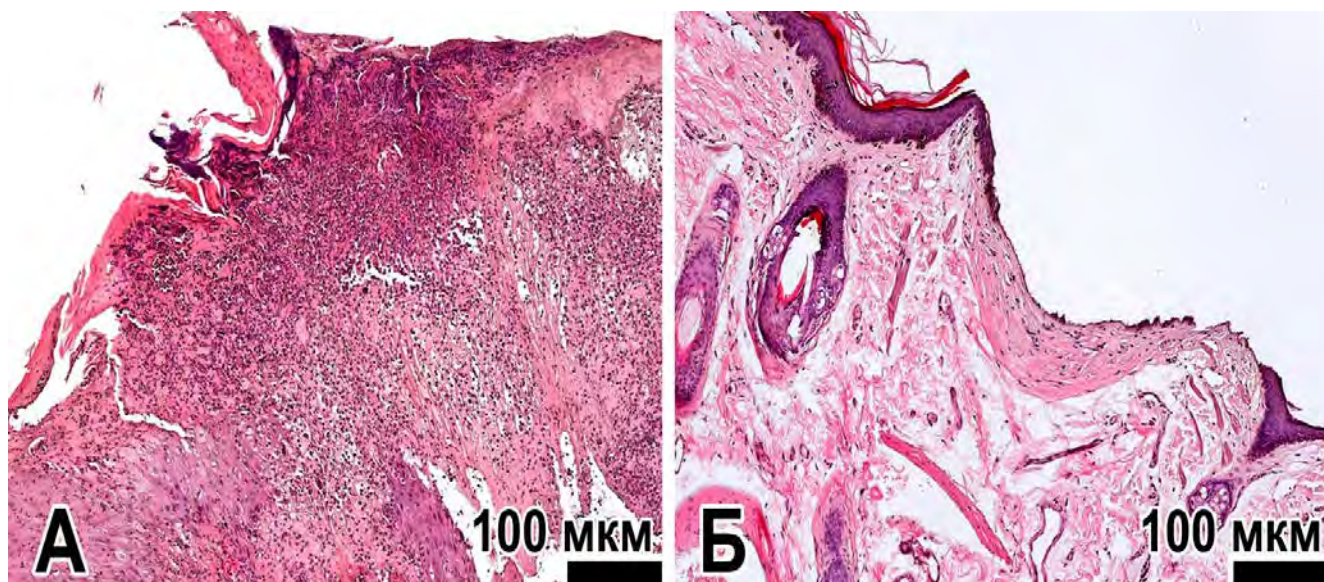
Б и В – ткань трахеи, в слизистой оболочке у которой крупные некротические очаги, обозначенные белыми стрелками, и обильная инфильтрация гетерофилами в подслизистом слое, отмеченная черными стрелками

Г – ткань легкого с интенсивной гиперемией, сосудистым тромбозом в сочетании с обширными зонами пониженной воздушности дыхательной ткани: дистелектазами

Д – ткань легкого с множественными очагами инфильтрации лимфоцитами, дилатации сосудов (стрелки)

Рисунок 4.24 - Ткани органов дыхательного тракта (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) степного сурков с изменениями спустя 9 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀).

Одним из главных органов-мишеней при заражении ВОО являлась кожа, в которой наблюдалась выраженная воспалительная реакция. Обильный полиморфноклеточный инфильтрат нередко захватывал почти всю глубину этого органа, и патологический процесс имел явную тенденцию к некротическим изменениям (рисунки 4.25 А, Б).



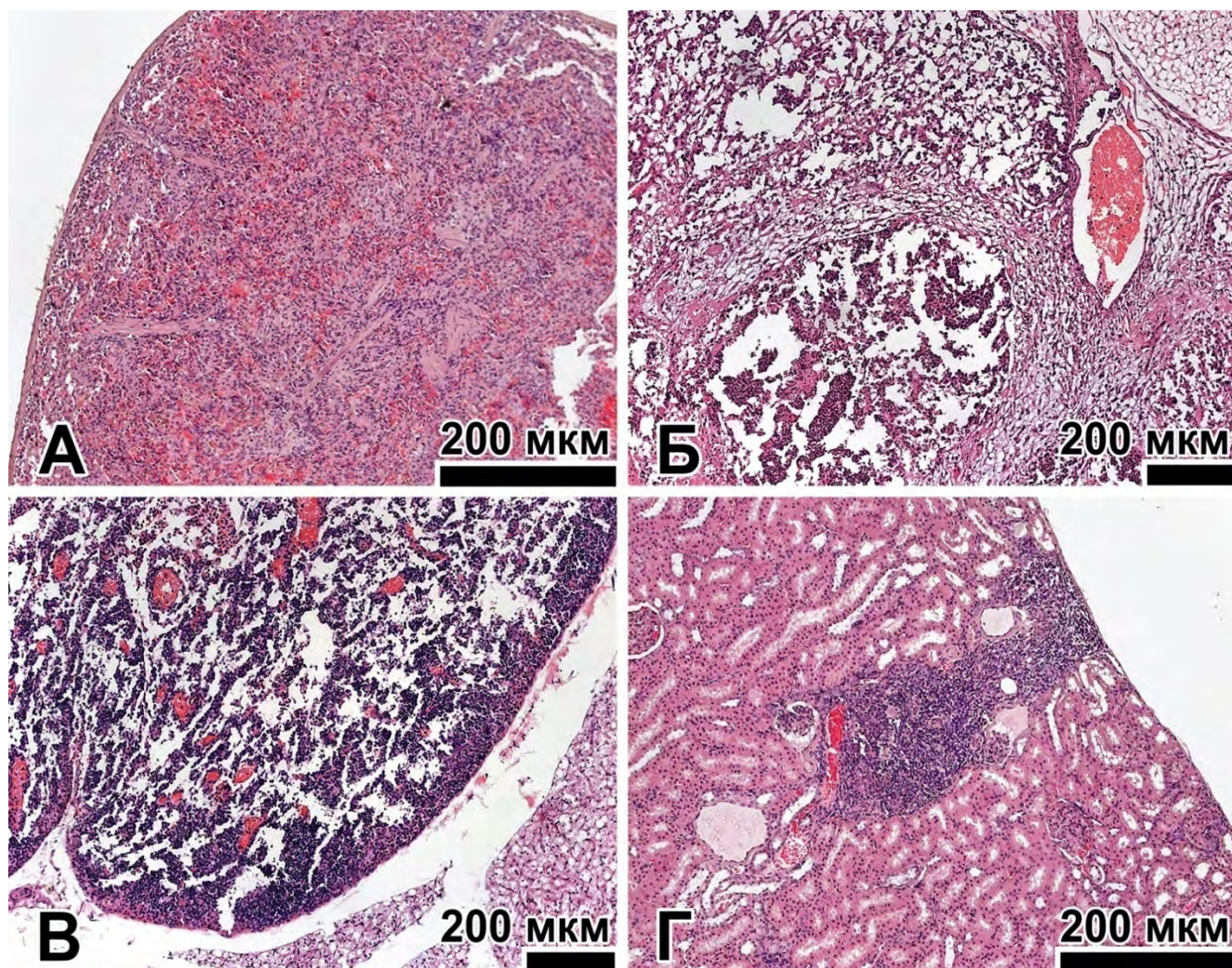
А – ткань кожи с участком некротического воспаления, распростертый на всю ее глубину

Б – дерма с утраченным поверхностным эпителиальным слоем и отеком

Рисунок 4.25 - Ткань кожи (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) степных сурков спустя 9 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀)

В селезенке наиболее частой находкой были гиперплазия фолликулов и локальные некрозы. При этом следует отметить, что, кроме гиперплазии фолликулов и очагов некрозов, у некоторых животных наблюдали обширные зоны, где полностью отсутствовали фолликулы (рисунок 4.26 А). У всех и/н зараженных сурков (с 7-х суток п.и.) и павших после и/н и п/к заражения наблюдали в разной степени выраженную некротизацию тимусной паренхимы (в одном случае полную) (рисунок 4.26 Б) и лимфатических узлов (рисунок 4.26 В). При тотальном некрозе тимусной ткани визуальная идентификация паренхимных структур была в значительной степени затруднительна и проводилась по остаточным профилям разных синусоидных сосудов и элементов, окружающих ретикулярную строму. В печени регулярно присутствовали очаги инфильтрации мононуклеарами. На фоне средней степени выраженности отека интерстиции почек наблюдали

крупные полиморфноклеточные инфильтраты, зачастую размещающиеся под капсулой (рисунок 4.26 Г).



А – ткань селезенки с гипоплазией фолликулов

Б – ткань тимуса с некрозом практически всей паренхимы

В – ткань лимфатического узла с выраженными гиперплазией и некрозом

Г – ткань почки с некрозом под капсулой и очагом полиморфноклеточной инфильтрации

Рисунок 4.26 - Ткани внутренних органов (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) степных сурков спустя 9 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀)

Патоморфологическое исследование других органов сурков продемонстрировало наличие слабо или умеренно выраженных изменений воспалительного типа.

Проведенный сравнительный анализ литературных данных относительно патоморфологических изменений, имеющих воспалительно-некротический характер, у различных видов модельных для оспы обезьян животных, респираторно зараженных ВОО [93, 210, 264], и результатов наших экспериментов на сурках свидетельствовал о большом сходстве таких изменений в основном в респираторных органах и других внутренних органах. С помощью электронной микроскопии у животного этого вида показан факт присутствия ВОО и размножения в традиционных для ортопоксвирусов первичных клетках-мишенях (клетки системы мононуклеарных фагоцитов – макрофаги и эпителиоциты респираторных органов), а также в других типах клеток (эндотелиоциты, фибробласты, плазмоциты, гладкомышечные и ретикулярные клетки) [96, 318, 424]. При этом морфологические признаки размножения вируса в чувствительных клетках сурков соответствовали таковым для этого возбудителя заболевания, представленным в научной литературе.

Таким образом, у п/к или и/н зараженных сурков разными дозами ВОО (2,6-7,8 lg БОЕ) наиболее выраженные патологические изменения были локализованы не только в респираторных органах, но и в иных (кожа, селезенка, тимус, лимфоузлы и другие), коррелируя со степенью тяжести клинических проявлений (независимо от дозы заражения). Как и у некоторых известных модельных видов животных для оспы обезьян, у сурков отмечены подобные гистологические изменения воспалительно-некротического характера в тканях и органах. У этих животных, инфицированных ВОО, показан факт присутствия вируса и размножения в традиционных для ортопоксвирусов первичных клетках-мишенях (макрофаги и эпителиоциты респираторных органов), а также в других типах клеток (эндотелиоциты, плазмоциты, фибробласты, ретикулярные и гладкомышечные клетки). Показано, что морфологические признаки репродукции вируса в чувствительных клетках животных этого вида соответствовали таковым для данного возбудителя заболевания, приведенным в научной литературе.

4.3.2 Световая и электронная микроскопия органов и тканей мышей, зараженных вирусом

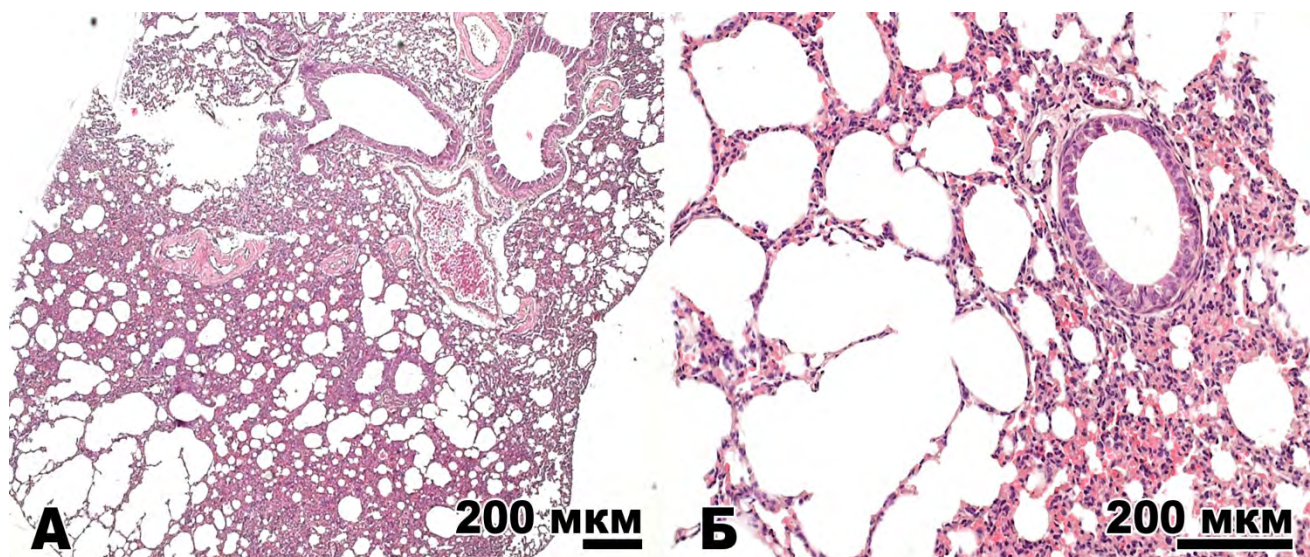
Учитывая то обстоятельство, что аутбредные мыши ICR при респираторном инфицировании ВОО (штамм V79-1-005), как и люди, поддерживали генерализованный инфекционный процесс, стартующий от респираторного тракта с дальнейшим подклю-

чением других внутренних органов (п. 4.2), в последующей работе мы осуществили изучение патологических изменений в организме животных этих видов после и/н заражения данным возбудителем болезни с целью определения степени их сходства таковым у человека и известных модельных видов животных.

При выполнении светооптических исследований тканей и органов мышей, подвергнутых и/н заражению ВОО дозами 5,0 lg БОЕ (400 ID₅₀) и 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀), наиболее существенные изменения наблюдали, как правило, в дыхательной части легких и бронхиальной спустя 5, 7, 9, 10 суток п.и.: диффузный или локальный равномерный отек перегородок альвеол, переполнение кровью капилляров, формирование дис- и ателектазов разной протяженности; уменьшение воздушности легочной ткани на одних участках, приведшее к развитию компенсаторной эмфиземы в других (рисунок 4.27) и воспалительно-некротические изменения в бронхах различного калибра (рисунок 4.28).

При исследовании с помощью электронной микроскопии бронхов и трахеи определялись признаки повреждения реснитчатых эпителиоцитов. У большинства клеток наблюдалась деформация ядер, контуры ядер становились фестончатыми, а в их структуре обнаруживались просветления, которые, вероятно, свидетельствовали о перераспределении хроматина. Бокаловидные клетки идентифицировались по скоплениям множества секреторных гранул. На апикальной поверхности мерцательных клеток менялось строение ресничек, поверхностная цитоплазматическая мембрана разрушалась, контуры клеток деформировались. Встречались слущенные реснички в виде крупных агрегатов. Часть клеток была заменена клеточным детритом, к которому были примешаны форменные элементы крови и нити фибрина.

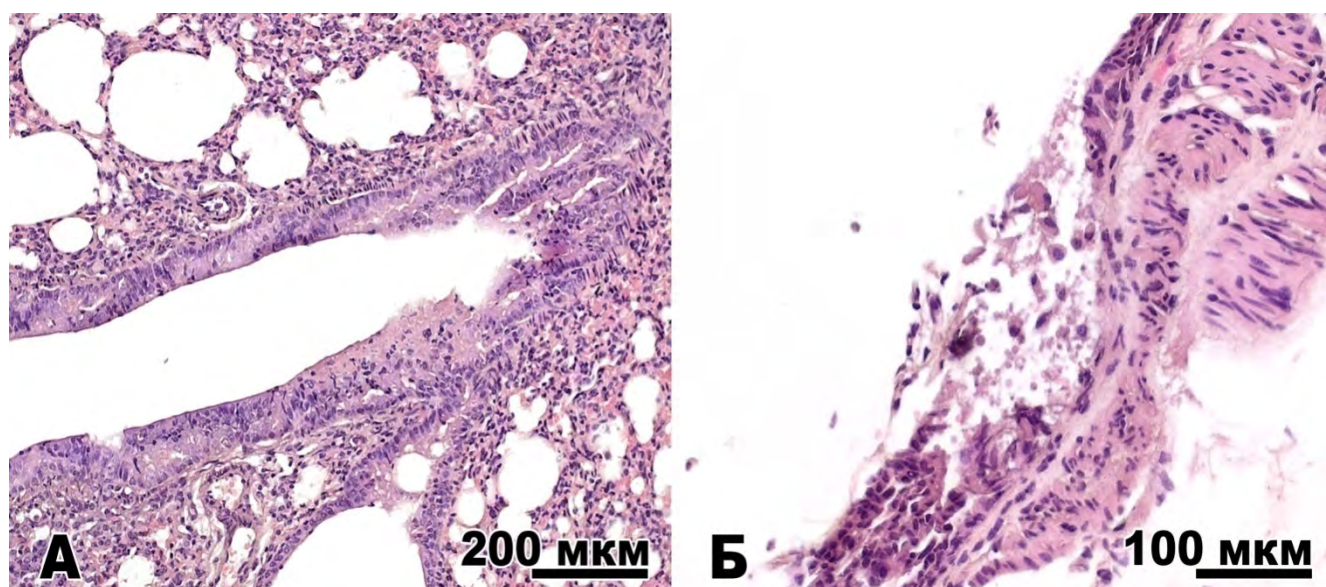
Частицы вируса визуализировались в эпителиоцитах выстилки бронхов и трахеи, соединительнотканых клетках собственной пластинки оболочки слизистой, а также в эндотелиоцитах сосудов подслизистой основы. Множество вирусных частиц находилось в разных фазах формирования: 1) полумесяцы, не содержащие генетический материал вируса; 2) незрелые вирусные частицы больших размеров; 3) зрелые вирионы кирпичеобразной формы с нуклеоидом, центрально расположенным и двояковогнутой формы. Изменения некротического характера слизистой оболочки бронхов и трахеи распространялись до собственной слизистой пластинки. Коллагеновые волокна набухали и фрагментировались. Обращало внимание на себя изменения кровеносных капилляров собственной пластинки, а также подслизистой оболочки.



А - зона обширных воспалительных изменений (пневмония)

Б - эмфизема компенсаторного типа (слева), примыкающая к зоне воспалительных изменений (справа)

Рисунок 4.27 - Ткань дыхательного отдела легкого (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) аутбредной мыши ICR через 7 суток после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀)



А - участок воспаления стенки бронха крупного калибра

Б – некротический очаг стенки бронха крупного калибра

Рисунок 4.28 - Ткань бронхиального участка легкого (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) аутбредной мыши ICR через 7 суток после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀)

У эндотелиальных клеток ядра были конденсированы, характеризовались повышенной осмиофильностью, неровным контуром, элементами фрагментации, что отражало наличие у этих клеток апоптозного процесса. В других ядрах отмечалось просветление за счет снижения количества хроматиновых гранул. Несмотря на то, что были увеличены размеры митохондрий, однако сохранялась их форма, параллельное расположение крист, а также внутренняя и наружная мембраны. Кроме того, у эндотелиальных клеток в цитоплазме выявлялось большое количество частиц вируса различной степени зрелости. В виде стаза кровеносных сосудов и сладжа эритроцитов в капиллярном просвете проявлялось нарушение гемодинамики. Кроме того, в некоторых капиллярах наблюдали гемолиз.

Патологические изменения в респираторной ткани были связаны во всеми видами клеток эпителиальной выстилки. Наблюдалась тенденция к десквамации пневмоцитов и появлению больших субэпителиальных полостей. В цитоплазматических отростках у альвеолоцитов I типа обнаруживали крупные вакуоли. Митохондрии этих клеток сохраняли размер, форму и параллельное расположение крист. Форма ядра изменялась, наблюдали маргинальное расположение хроматина и расширение перинуклеарных пространств.

В альвеолоцитах 2-го типа наблюдали структурные изменения ламеллярных телец и неравномерность их локализации, что, вероятно, приводило к расстройству их функции. Были выявлены также признаки интрацеллюлярного отека. Из-за разрушения структуры легочной ткани не представлялось возможным значимо дифференцировать клетки. Границы клеток на многих участках казались размытыми, обнаруживали только фрагменты базальных мембран и коллагеновых волокон. В просвете альвеол наблюдали скопление клеточного детрита, отечной жидкости, волокон фибрина, форменных элементов крови и вирионов.

В паренхиме просветов кровеносных сосудов легкого размещались сладжированные эритроциты, моноциты, а также миелиновые фигуры. Кроме того, наблюдалось разделение эритроцитов и мелкозернистой плазмы. Конгломераты гемолизированных эритроцитов заполняли просвет отдельных кровеносных сосудов. Наблюдались также нейтрофилы, содержащие значительное количество секреторных гранул, и лимфоциты, имеющие псевдоподии плазмолеммы. В просвете кровеносных сосудов нередко встречались клеточные элементы крови незрелой формы. Признаки некроза прослеживались

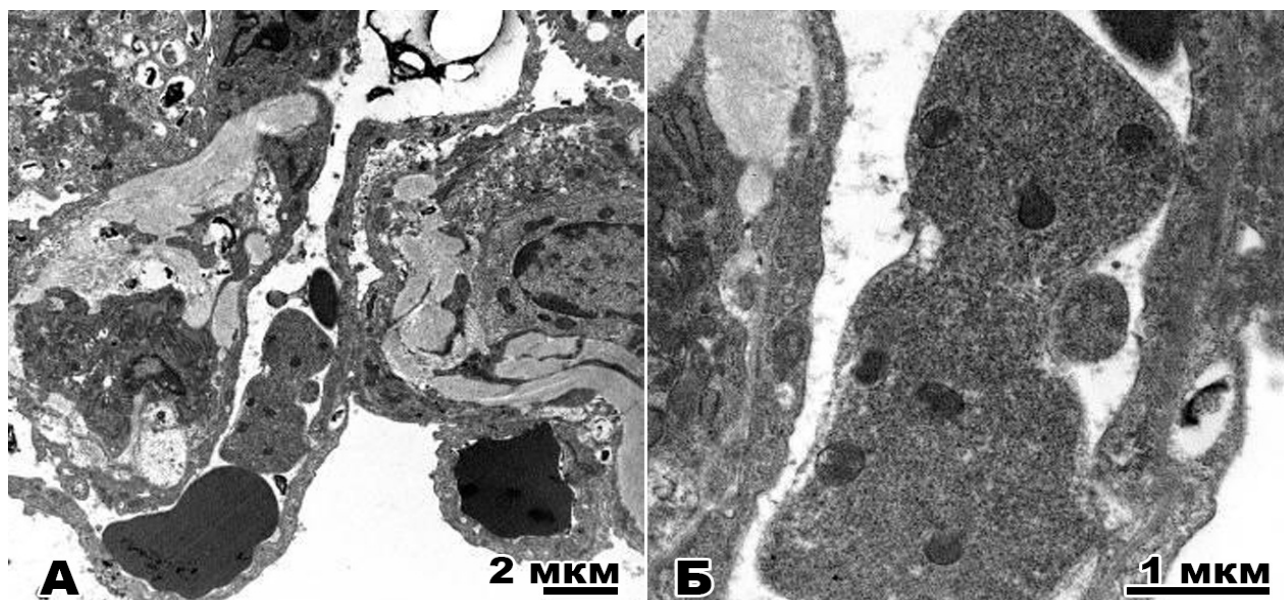
в эндотелиоцитах. Обращала внимание массивная инфильтрация воспалительно-клеточными элементами респираторной ткани. Здесь же наблюдалось присутствие активированных макрофагов, которые содержали в цитоплазме секреторные гранулы и многочисленные псевдоподии.

Важным элементом в органах дыхательного тракта при развитии патологического процесса у мышей, и/н инфицированных ВОО, было нарушение микроциркуляции в форме стаза и сладжа эритроцитов внутри кровеносных капиллярах, внутрисосудистого гемолиза, а также тромбоза. По результатам электронной микроскопии, были обнаружены эритроциты, содержащие вирионы (рисунок 4.29).

В эпителиальных клетках выстилки бронхов и трахеи, собственной пластинки оболочки слизистой, в эндотелии кровеносных сосудов подслизистой основы и макрофагах отмечались морфологические признаки репродукции вируса (рисунки 4.30, 4.31 и 4.32). Зоны некроза содержали большое количество «обломков» инфицированных клеток, не поддающихся идентификации. Зараженные клетки демонстрировали последовательные этапы морфогенеза патогена: полумесяцы, сферические незрелые вирусные частицы и зрелые вирионы кирпичеобразной формы с нуклеоидом двояковогнутой формы, расположенным по центру.

В процессе гистологических исследований у мышей спустя 7, 9, 10 суток после и/н инфицирования ВОО отмечали и в экстрареспираторных органах (чаще всего в печени, селезенке и почках) некоторые повреждения, которые были слабой или умеренной степени выраженности и имели воспалительно-некротический характер. Более того, при осуществлении электронно-микроскопических исследований таких тканей и органов животных, были отмечены морфологические признаки размножения вируса в клетках соединительной ткани и ретикулярных клетках (рисунок 4.33).

Основные патоморфологические изменения у и/н инфицированных ВОО мышей были связаны с респираторным трактом. У них, как и у некоторых других модельных видов животных [93, 210, 264], часто наблюдались в общем виде сходные гистологические изменения в респираторных органах. По данным электронно-микроскопических исследований, отмечен факт наличия и размножения вируса в традиционных для этого патогена первичных клетках-мишенях мышей (эпителиоциты и клетки системы мононуклеарных фагоцитов в респираторных органах), а также в других клетках (эндотелиоциты, ретикулярные и соединительнотканые клетки).



А - эритроцитарный сладж

Б - измененный эритроцит, содержащий вирусные частицы

Рисунок 4.29 – Ткань капилляра дыхательного отдела легкого (трансмиссивная электронная микроскопия) аутбредной мышей ICR через 9 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀)

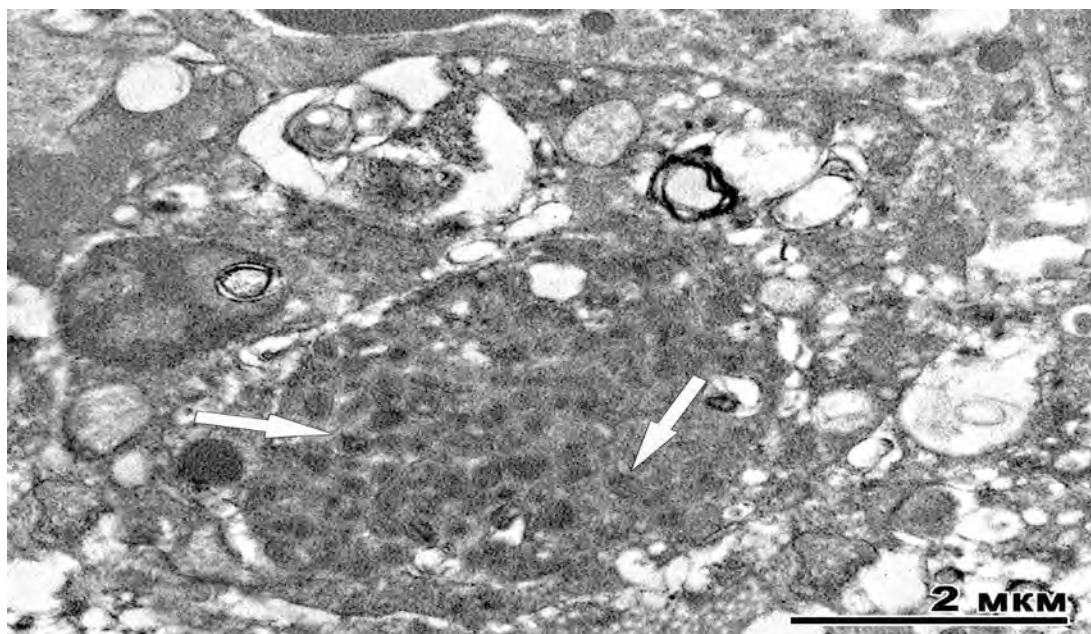
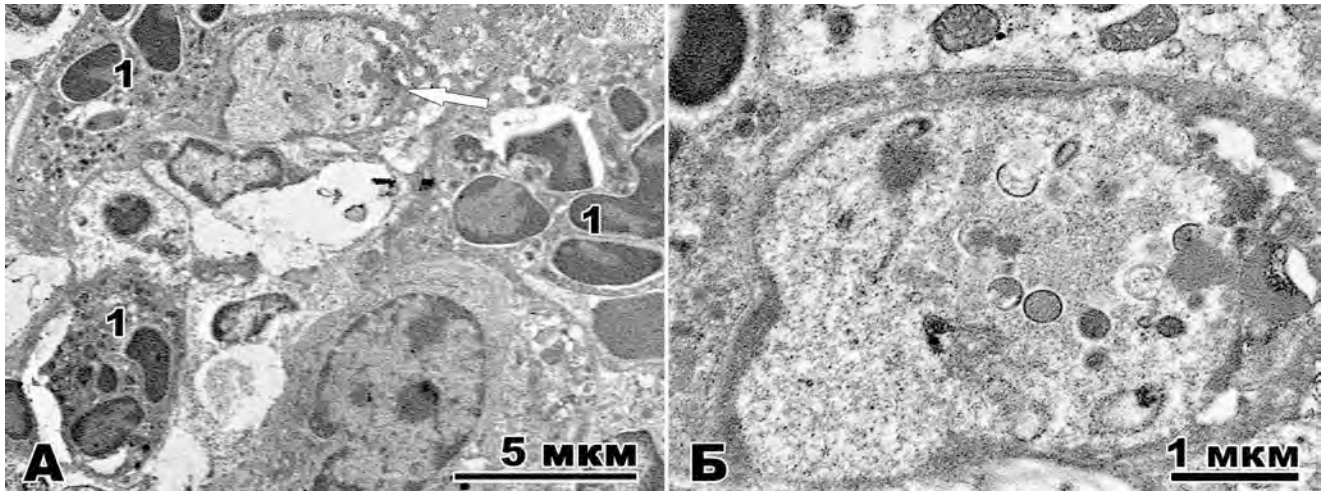


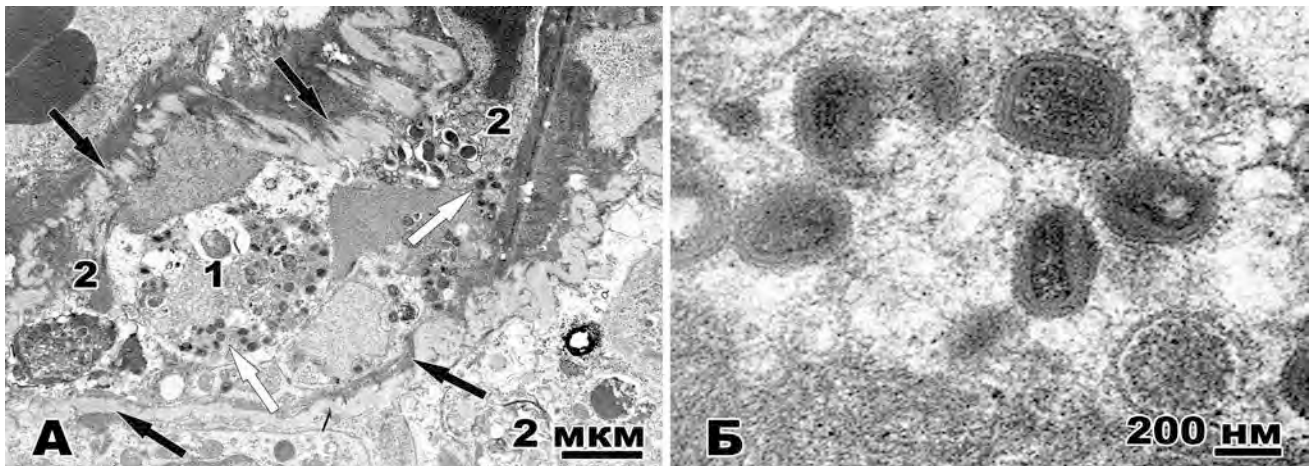
Рисунок 4.30 – Альвеолярный макрофаг (трансмиссивная электронная микроскопия) аутбредной мыши ICR через 7 суток после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀): в цитоплазме зрелые частицы вируса (указаны стрелками)



А – в воспалительном очаге в присутствии нейтрофилов (1) разрушенные клетки эпителия

Б – эпителиоцит, содержащий вирионы, имеющие различную степень зрелости (увеличенный фрагмент снимка А)

Рисунок 4.31 – Ткань легкого (трансмиссивная электронная микроскопия) аутбредной мышей ICR через 7 суток после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀): воспалительный очаг



А – кровеносный капилляр с базальной мембраной (указаны черными стрелками), макрофаг (1) в просвете капилляра с вирионами в цитоплазме (указаны белыми стрелками), а также некротизированные эндотелиальные клетки (2) с вирусными частицами

Б – эндотелиоцит, в цитоплазме которого вирусные частицы (увеличенный фрагмент снимка А)

Рисунок 4.32 – Ткань артериального кровеносного сосуда легкого (трансмиссивная электронная микроскопия) аутбредной мыши ICR через 7 суток после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀)

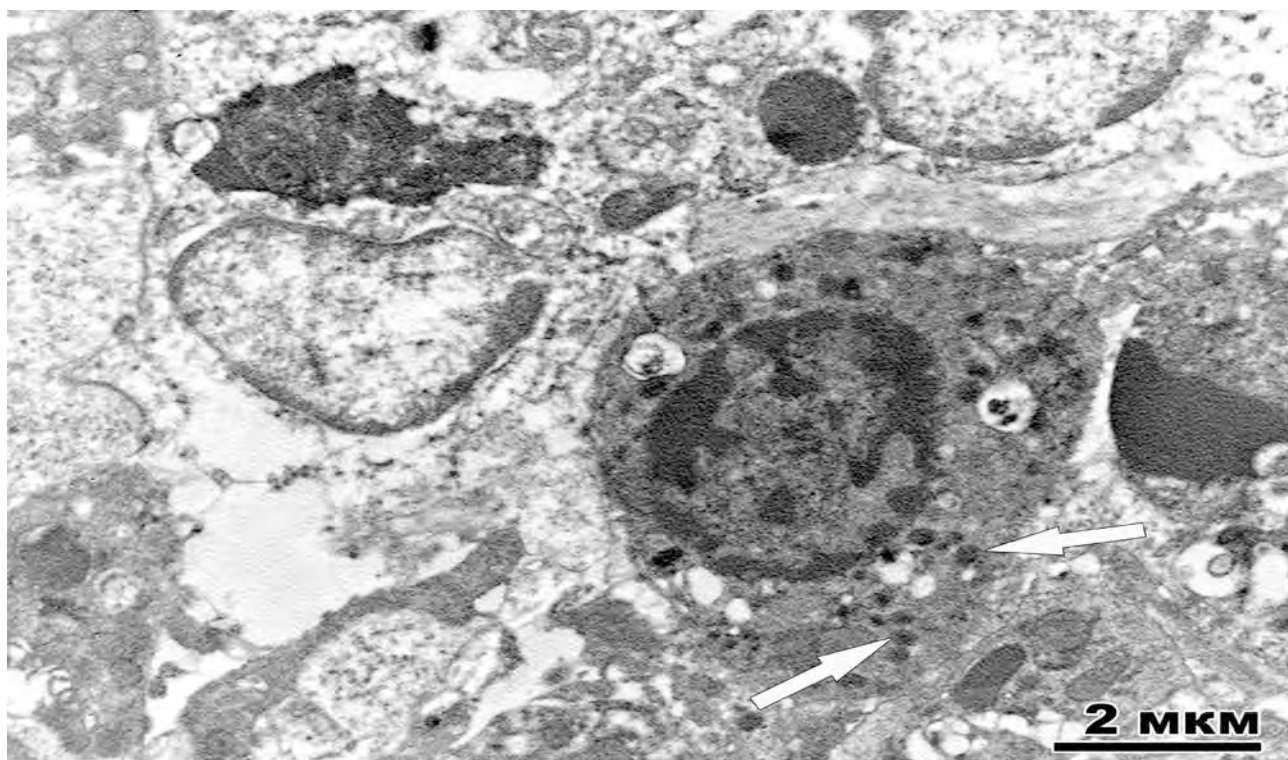


Рисунок 4.33 – Соединительнотканная клетка почки (трансмиссивная электронная микроскопия) аутбредной мыши ICR через 7 суток после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀): вирионы в цитоплазме (показаны стрелками)

При этом морфологические характеристики репродукции патогена в чувствительных клетках животных данного вида соответствовали таковым для этого вируса, описанным в научной литературе [96, 318, 424].

Таким образом, у мышей, и/н зараженных ВОО дозами 5,0 lg БОЕ (400 ID₅₀) и 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀), наиболее выраженные патологические изменения были сосредоточены в основном в респираторном тракте. Как и у других известных модельных для оспы обезьян видов животных, у мышей отмечены сходные гистологические поражения воспалительного и некротического типов в тканях и органах. У животных, инфицированных вирусом, обнаружен факт наличия и размножения патогена в традиционных для него первичных клетках-мишенях (эпителиоцитах и клетки системы мононуклеарных фагоцитов респираторных органов), а также в других типах клеток (эндотелиоциты, ретикулярные и соединительнотканые клетки). Показано, что морфологические характери-

стики размножения вируса в чувствительных клетках мышей соответствовали таковым, описанным в научной литературе для этого возбудителя заболевания.

4.4 Оценка возможности использования степных сурков и аутбредных мышей ICR для оценки эффективности препаратов от оспы обезьян у человека

Хотя многие ученые проводили поиск видов животных, имеющих высокую чувствительностью к ВОО с учетом регистрации внешней клинической картины болезни, близкой к таковой людей, тем не менее, наши эксперименты были сориентированы не только на симптоматику заболевания, но и на исследовании инфекционного процесса в легких (одном из первичных органах-мишенях для ВОО) приемлемых для нас видов животных после респираторного заражения.

В разделе 3 была представлена созданная нами общая стратегия разработки модельных биосистем для изучения защитной эффективности противовирусных препаратов. В рамках этой стратегии были представлены критерии, сориентированные на изучение взаимоотношения исследуемого макроорганизма с соответствующим возбудителем заболевания, по которым должны исследоваться человек и животное с позиции их сходства. С целью реализации этой стратегии в отношении ВОО, нами были сделаны соответствующие экспериментальные исследования с применением 4 видов подопытных животных: степной сурок, аутбредная мышь ICR, свинья породы Сибирская мини-свинья и кролик породы Шиншилла (п. 4.1). При этом после проведения экспериментов по определению чувствительности данных видов животных к вирулентному для человека ц/афр штамму ВОО (V79-1-005) были отобраны лишь два их вида (мышь и сурок), которые обладали относительно высокой восприимчивостью *in vivo* и *in vitro* к этому патогену, сходной с таковой у человека.

В связи с чем в дальнейших исследованиях, связанных с поиском модельных для оспы обезьян видов животных, мы использовали именно данные их виды. При этом была изучена динамика накопления вируса по тканям, органам и сывороткам крови мышей, и/н зараженных 25 ID₅₀ ВОО (по наличию инфекционного процесса в ткани легких), и сурков, инфицированных 30 ID₅₀ вируса (по данным регистрации клинических признаков заболевания), и определены первичные и вторичные органы-мишени и клетки-мишени.

Время с момента заражения (сутки)	Динамика накопления ВОО у мышей (ткани и органы с максимальной величиной концентрации ВОО, lg БОЕ/мл)	Вид клеток, размножающих ВОО	Вид патологических изменений в тканях и органах	Симптоматика болезни
-----------------------------------	---	------------------------------	---	----------------------

0	Входные ворота инфекции - дыхательный тракт (3,8*)	Н.п.	Н.п.	Н.п.
	Первичные органы-мишени с апплицированным ВОО: легкие и нос (2,8**)	Макрофаги и эпителиоциты респираторных органов	Н.п.	Н.п.
2	Кровь (3,3 – 3,8) и кровеносная система доставки ВОО к вторичным органам-мишеням	Эндотелиоциты и ретикулярные клетки	Н.п.	Н.п.
	Легкие (3,0), нос – носовая перегородка со слизистой (2,0), двенадцатиперстная кишка (2,0), селезенка (2,0)	Эпителиоциты и макрофаги респираторных органов, эндотелиоциты, ретикулярные и соединительнотканые клетки	Н.п.	Н.п.

Время с момента заражения (сутки)	Динамика накопления ВОО у мышей (ткани и органы с максимальной величиной концентрации ВОО, lg БОЕ/мл)	Вид клеток, размножающих ВОО	Вид патологических изменений в тканях и органах	Симптоматика болезни
-----------------------------------	---	------------------------------	---	----------------------

5	Легкие (5,5), нос – носовая перегородка со слизистой (5,2), двенадцатиперстная кишка (3,8), почки (3,3), головной мозг (3,0) и селезенка (2,1)	Те же виды клеток, что и через 2 суток после заражения	Начало воспалительных и некротических изменений в основном в дыхательных органах	Н.п.
7	Нос – носовая перегородка со слизистой (5,7), легкие (5,5), головной мозг (5,3), двенадцатиперстная кишка (4,0), печень (3,3), почки (3,1), поджелудочная железа (2,0), селезенка (1,7)	Те же виды клеток, что и через 2 суток после заражения	Те же изменения, как и спустя 5 суток после заражения, но более выраженные	Н.п.
9	Нос – носовая перегородка со слизистой (5,7), легкие (3,8), головной мозг (2,9), двенадцатиперстная кишка (2,3)	Те же виды клеток, что и через 2 суток после заражения	Те же изменения, как и спустя 7 суток после заражения	Н.п.

Время с момента заражения (сутки)	Динамика накопления ВОО у мышей (ткани и органы с максимальной величиной концентрации ВОО, lg БОЕ/мл)	Вид клеток, размножающих ВОО	Вид патологических изменений в тканях и органах	Симптоматика болезни
14	Нос – носовая перегородка со слизистой (5,3), головной мозг (3,9), легкие (2,8), двенадцатиперстная кишка (2,3)	Те же виды клеток, что и через 2 суток после заражения	Те же изменения, как и спустя 9 суток после заражения, но менее выраженные	Н.п.

* Значение соответствует и/н вводимой дозе вируса: 3,8 lg БОЕ

** Значение соответствует количеству апплицированного ВОО в легких мышей сразу после инфицирования и/н способом [72]

*** Значение определено для мышей по наличию ВОО в легких спустя 7 суток после заражения

Н.п. – признаки по показателю не проявились на данную точку времени

Рисунок 4.34 - Патогенетическая схема заболевания аутбредных мышей ICR, интраназально инфицированных вирусом оспы обезьян – ВОО (штамм V79-1-005) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀***)

Время с момента заражения (сутки)	Динамика накопления ВОО у сурков (ткани и органы с максимальной величиной концентрации ВОО, lg БОЕ/мл)	Вид клеток, продуцирующих ВОО	Вид патологических изменений в тканях и органах	Внешняя клиническая картина болезни
-----------------------------------	--	-------------------------------	---	-------------------------------------

0	Входные ворота инфекции - респираторный тракт (3,7*)	Н.п.	Н.п.	Н.п.
	Первичные органы-мишени с апплицированным ВОО: легкие и нос (2,7**)	Эпителиоциты и макрофаги респираторных органов	Н.п.	Н.п.
5	Первичные органы-мишени: легкие (6,5) с трахеей (6,5), а также бифуркационные лимфоузлы (2,0)	Эпителиоциты и макрофаги респираторных органов	Н.п.	Н.п.
	Лимфатическая система (бифуркационные лимфоузлы - 2,0–3,9), доставляющая вирус и через кровь к вторичным органам-мишеням	Плазмоциты, ретикулярные клетки и эндотелиоциты		

Время с момента заражения (сутки)	Динамика накопления ВОО у сурков (ткани и органы с максимальной величиной концентрации ВОО, lg БОЕ/мл)	Вид клеток, продуцирующих ВОО	Вид патологических изменений в тканях и органах	Внешняя клиническая картина болезни
-----------------------------------	--	-------------------------------	---	-------------------------------------

7	Легкие (5,9) с трахеей (1,7), бифуркационные лимфоузлы (3,1), селезенка (1,3)	Макрофаги, эпителиоциты, эндотелиоциты, плазмоциты, фибробласты, ретикулярные и гладкомышечные клетки	Начало воспалительно-некротических изменений в органах дыхания, коже, селезенке, тимусе, лимфоузлах и других	Подчелюстной лимфаденит и гипертермия тела (38,0 – 40,0 °С),
9	Нос – носовая перегородка со слизистой (6,7), бифуркационные лимфоузлы (3,9), двенадцатиперстная кишка (3,8), легкие (3,2) с трахеей (3,2), кожа (3,0), надпочечники (1,6), головной мозг (1,6)	Те же виды клеток, что и через 7 суток после заражения	Те же изменения, как и спустя 7 суток после заражения, но более выраженные	Подчелюстной лимфаденит, гипертермия тела, дискретная оспоподобная сыпь на слизистых и коже, серозно-гнойные ринит, блефарит и конъюнктивит, нарушение координации движения, тремор конечностей, взъерошенность шерсти, повышенная агрессив-

Время с момента заражения (сутки)	Динамика накопления ВОО у сурков (ткани и органы с максимальной величиной концентрации ВОО, lg БОЕ/мл)	Вид клеток, продуцирующих ВОО	Вид патологических изменений в тканях и органах	Внешняя клиническая картина болезни
-----------------------------------	--	-------------------------------	---	-------------------------------------

нось

12	Кожа (6,6), легкие (6,5) с трахеей (4,5), нос – носовая перегородка со слизистой (2,6), бифуркационные лимфоузлы (2,5), надпочечники (1,4)	Те же виды клеток, что и через 7 суток после заражения	Те же изменения, как и спустя 9 суток после заражения, но более выраженные для погибающих сурков	Та же клиническая картина, как и спустя 9 суток, но более выраженная для погибающих сурков и на смену гипертермии тела приходит гипотермия (до 32 °С)
----	--	--	--	---

* Значение соответствует вводимой и/н дозе ВОО: 3,8 lg БОЕ

** Значение получено путем экстраполяции данных с мышей на сурков, принадлежащих к одному и тому же отряду грызунов, в отношении доли апплицированного ВОО (до 10 %) в респираторном тракте сразу после и/н заражения [72]

*** Величина определена для сурков по наличию оспоподобных проявлений болезни

Н.п. – признаки по показателю не проявились на данную точку времени

Рисунок 4.35 - Патогенетическая схема заболевания степных сурков, интраназально инфицированных вирусом оспы обезьян – ВОО (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀***)

Результаты этих экспериментов в обобщенном виде отражены в разработанных нами патогенетических схемах заболевания у этих видов животных (рисунки 4.34 и 4.35). Обращает внимание тот факт, что данные экспериментов, на основе которых были составлены схемы, во многом схожи с таковыми, представленными в научной литературе в отношении существующих модельных для оспы обезьян видов животных и человека [156, 158, 161]. Причем у мышей и сурков при и/н заражении этиологическим агентом в дозах соответственно 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀ по наличию инфекционного процесса в ткани легких) и 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀ по наличию внешних клинических признаков болезни) наблюдалась генерализованная инфекция, стартующая от органов респираторного тракта с дальнейшим подключением других внутренних органов. При этом у мышей в отличие от сурков и людей этот инфекционный процесс протекал без внешних признаков заболевания и вызывал в основном патоморфологические изменения в органах респираторного тракта (первичные органы-мишени для данного патогена). С одной стороны, эти обстоятельства указывают на потенциальную возможность использования мышей в качестве животных модельного вида для оценки защитных свойств антиортопоксвирусных препаратов по профилактической и лечебно-профилактической схемам применения, с другой стороны, накладывают ограничения на их применение для оценки лечебных свойств препаратов. К тому же заключению можно прийти, если сделать сравнение основных механизмов диссеминации патогена от первичных к вторичным органам-мишеням в организме респираторно зараженных мышей и человека (существующих модельных видов животных), потому что они значительно отличаются: у мышей - гематогенный с размножением вируса в клетках кровеносной системы и/или крови, а у человека - в основном лимфогенный с размножением вируса в клетках лимфоузлов и лимфы и кратковременной виремией. Но данный вывод создает ограничение лишь на возможность применения мышей для изучения лечебных схем введения лекарственных препаратов и не относится к профилактическим (экстренной профилактическим) и лечебно-профилактическим схемам, которые по сути направлены на борьбу с патогеном во входных воротах инфекции, где располагаются первичные органы-мишени. В этом смысле все значения показателей взаимоотношения мышей с вирусом в рамках ранее представленных нами критериев, направленных на поиск модельных видов животных для использования при оценке только профилактической (экстренно-профилактической) и ле-

чебно-профилактической активности препаратов от оспы обезьян, соответствуют таковым у человека и известных модельных видов животных (таблица 4.7).

Таблица 4.7 - Результаты оценки показателей взаимоотношения аутбредных мышей ICR с вирусом оспы обезьян (ВОО) при респираторном инфицировании с таковыми у человека (известных модельных видов животных)

№ п/п	Наименование показателей по критериям	Значение показателей:		Наличие соответствия
		у человека	у мыши	
1	Возможность заражения через основные входные ворота инфекции: дыхательный тракт	Реализуется при эпидемических вспышках	Реализуется в эксперименте	Есть
2	ID ₅₀ , М (I ₉₅), в lg БОЕ	1,0 (0,6...1,4)*	1,4 (1,0...1,8)**	Есть
3	Тип основных первичных органов-мишеней	Легкие (возможно и нос)	Легкие (нос)	Есть
4	Вид основных клеток-мишеней в первичных органах-мишенях	Эпителиоциты и макрофаги респираторных органов***	Эпителиоциты и макрофаги респираторных органов	Есть
5	Присутствие после респираторного заражения патогеном (10–100 ID ₅₀) максимальной величины его концентрации в первичных органах-мишенях, превосходящей 3 lg БОЕ/мл	Имеется в легких, и носу***	Имеется в легких и носу	Есть

Примечания

* Значение получено прогнозным путем по наличию инфекционного процесса (п. 4.1.3.2)

** Величина определена по наличию инфекционного процесса и рассчитана на апплицированную долю ВОО (10 %) в респираторном тракте мышей сразу же после интраназальном инфицирования [72]

*** Обобщенные данные из литературных источников в отношении известных модельных видов животных для оспы обезьян и типов первичных органов и клеток-мишеней [156, 264, 424] и в отношении присутствия после заражения патогеном (10–100 ID₅₀) максимальной величины его титра в этих органах, превосходящего 3 lg БОЕ/мл [155, 182, 210], так как такие сведения, касающиеся людей, отсутствуют в доступной литературе

Тем не менее, у мышей мы все же наблюдали в $\geq 50\%$ случаев клиническую картину болезни (блефарит, гнойный конъюнктивит и взъерошенность шерсти), но при их и/н инфицировании только высокими дозами ВОО ($\geq 4,8 \lg \text{ БОЕ}$). Однако использование этого вида животных в сочетании с такими большими дозами вируса для оценки защитной (в том числе лечебной) эффективности лекарственных средств не будет корректным, так как человек существенно (почти в 1000 раз) более чувствителен к ВОО: $ID_{50} = 1,0 (0,6 \dots 1,4) \lg \text{ БОЕ}$ (по данным, полученным прогнозным путем, п. 4.1.3.2), чем мышь: $ID_{50} = 3,8 (3,2 \dots 4,4) \lg \text{ БОЕ}$ (по данным, полученным экспериментальным путем, п. 4.1.2, с учетом 10%-го осаждения вируса в легких при и/н введении инокулята). Использование модельных видов животных, обладающих более низкой чувствительностью к вирусу в сравнении с человеком, при оценке эффективности препаратов приводит к неоправданному ее завышению [35, 284, 360].

В указанном направлении несколько по-другому выглядит ситуация с сурками. Эти животные при и/н инфицировании ВОО даже в маленьких дозах проявляли широкий спектр клинических признаков заболевания, близкий к таковому у человека. Причем наблюдалось также выраженное сходство патологических изменений во многих тканях и органах инфицированных ВОО этих животных, людей и известных модельных видов животных. Более того, если сделать сравнение основных механизмов диссеминации патогена от первичных к вторичным органам-мишеням в организме респираторно зараженных мышей и людей (существующих животных модельных видов), то они сходны (лимфогенный с репродукцией вируса в макрофагах - форменные элементы лимфы и лимфоузлах и кратковременной вирусемией).

В этой смысле все значения показателей взаимоотношения сурков с вирусом в рамках взятых нами критериев, направленных на поиск видов модельных животных с целью применения для изучения профилактической (экстренно-профилактической), лечебно-профилактической и лечебной активности препаратов от оспы обезьян, соответствуют таковым у людей и известных видов модельных животных (таблица 4.8).

Таким образом, используя данные по изучению диссеминации ВОО у 2 видов животных, внешней клинической картины инфекции, а также патологических изменений в их тканях и органах разработаны патогенетические схемы заболевания у степных сурков и аутбредных мышей ICR.

Таблица 4.8 - Результаты оценки показателей взаимоотношения степных сурков с вирусом оспы обезьян (ВОО) при респираторном инфицировании с таковыми у человека (известными видами модельных животных)

№ п/п	Наименование показателей по критериям	Значение показателей:		Наличие соотв-я
		у человека	у сурка	
1	Возможность заражения через главные входные ворота ин- фекции: дыхательный тракт	Реализуется при эпидемических вспышках****	Реализуется в эксперименте	Есть
2	ID ₅₀ , М (I ₉₅), в lg БОЕ	1,0 (0,6...1,4)*	1,2 (0,0...2,4)**	Есть
3	Тип основных первичных ор- ганов-мишеней	Легкие (возможно и нос)***	Легкие	Есть
4	Вид основных клеток-мишеней в первичных органах-мишенях	Эпителиоциты и макрофаги респи- раторных органов ***	Эпителиоциты и макрофаги респи- раторных органов	Есть
5	Присутствие после респира- торного заражения патогеном (10–100 ID ₅₀) максимальной величины его концентрации в первичных органах-мишенях, превосходящей 3 lg БОЕ/мл	Имеется в лег- ких***	Имеется в легких	Есть
6	Тип основной системы достав- ки патогена во вторичные ор- ганы-мишени	Лимфатиче- ская***	Лимфатическая	Есть
7	Механизм доставки патогена во вторичные органы-мишени	Активный с ре- продукцией в макрофагах (фор- менные элементы лимфы) и лимфо- узлах***	Активный с ре- продукцией в макрофагах (фор- менные элементы лимфы) и лимфо- узлах	Есть

Продолжение таблицы 4.8

№ п/п	Наименование показателей по критериям	Значение показателей:		Наличие соотв-я
		у человека	у сурка	
8	Присутствие после заражения патогеном (10–100 ID ₅₀) максимальной величины его концентрации в основных системах доставки во вторичные органы-мишени, превосходящей 3 lg БОЕ/мл	Есть в лимфоузлах***	Есть в лимфоузлах	Есть
9	Тип основных вторичных органов-мишеней	Кожа, лимфоузлы, селезенка***	Кожа, лимфоузлы	Есть
10	Вид основных клеток-мишеней в основных вторичных органах-мишенях	Эпителиоциты, макрофаги, эндотелиоциты, ретикулярные и гладкомышечные клетки, фибробласты ***	Эпителиоциты, макрофаги, эндотелиоциты, плазмоциты, ретикулярные и гладкомышечные клетки, фибробласты	Есть
11	Присутствие после заражения патогеном (10–100 ID ₅₀) максимальной величины его концентрации в основных вторичных органах-мишенях, превосходящей 3 lg БОЕ/мл	Есть в коже и лимфоузлах***	Есть в коже и лимфоузлах	Есть
12	Основные внешние клинические проявления болезни, включая летальный эффект	Оспоподобная сыпь на слизистых и коже, лимфаденит, гипертермия тела и летальность - до 17 %****	Оспоподобная сыпь на слизистых и коже, лимфаденит, гипертермия тела и летальность – 25 – 50 %	Есть

Продолжение таблицы 4.8

Примечания

* Значение получено прогнозным путем по наличию инфекционного процесса (п. 4.1.3.2)

** Величина определена по наличию симптоматики заболевания, рассчитана с помощью экстраполяции данных с мышей на сурков, принадлежащих к одному и тому же отряду грызунов, в отношении доли апплицированного вируса (10 %) в респираторном тракте сразу же после и/н инфицирования [72] и соответствует таковой по наличию инфекционного процесса (п. 4.1.2)

*** Обобщенные данные из литературных источников в отношении известных модельных видов животных для оспы обезьян и типов первичных и вторичных клеток-мишеней и органов-мишеней [156, 264, 424] и в отношении присутствия после заражения патогеном (10–100 ID₅₀) максимальной величины его титра в этих органах, превосходящей 3 lg БОЕ/мл [155, 182, 210], так как подобные сведения, касающиеся людей, отсутствуют в доступной литературе

**** Обобщенные данные из источников литературы по заболеванию у людей [122, 150, 333]

Животные при этом были и/н инфицированы ВОО дозами 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀ по наличию в легких инфекционного процесса) и 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀ по данным регистрации оспоподобной клинической картины заболевания) соответственно.

Отмечено, что мыши при оспе обезьян воспроизводят без внешней клинической картины заболевания генерализованную инфекцию у людей или известных животных модельных видов в части, касающейся 1-го этапа диссеминации патогена и частично 2-го и 3-го, включая типы клеток-мишеней, а также патологические изменения, в основном происходящие в первичных органах-мишенях.

Это свидетельствует о потенциальной возможности применения мышей для изучения профилактического (экстренно-профилактического), а также лечебно-профилактического действия препаратов от оспы обезьян. Показано, что сурки при оспе обезьян максимально правдоподобно воспроизводят основную внешнюю клиническую картину заболевания, в том числе летальный эффект, и генерализованную инфекцию у людей или известных модельных видов животных, включающую в себя три этапа рас-

пространения патогена от органов и клеток-мишеней дыхательного тракта до экстрареспираторных, в том числе систему его доставки, патоморфологические изменения в органах и тканях. Это свидетельствует о потенциальной возможности применения сурков для изучения как профилактического (экстренно-профилактического), лечебно-профилактического, так и лечебного действия препаратов от оспы обезьян.

4.5 Испытание и пределы практического применения модельных биосистем для оспы обезьян на основе степного сурка и аутбредной мыши ICR

Ранее (п. 4.1–4.4) была представлена экспериментальная и теоретическая информация, показавшая потенциальную возможность использования аутбредных мышей ICR и степных сурков для исследования эффективности препаратов от оспы обезьян. В этой связи для проверки адекватности результатов использования таких моделей были проведены соответствующие эксперименты по изучению противовирусного действия разрабатываемого в России химического соединения НИОХ-14 при сравнении с американским химиопрепаратом ST-246 (положительный контроль), который ранее уже продемонстрировал соответствующий защитный эффект, и российским химическим соединением НИОХ-32, имеющим низкую антиортопоксвирусной активностью.

Хотя ранее рядом ученых [15, 16, 22] было экспериментально доказано противовирусное действие химиопрепаратов НИОХ-14 и ST-246, важно было перед проведением экспериментов на мышах и сурках убедиться в присутствии данного противовирусного эффекта у взятых в НИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН новых серий этих препаратов (№ 4П у НИОХ-14 и № 1 у ST-246), которые предполагалось применить в наших дальнейших исследованиях.

На начальном этапе *in vitro* с использованием ВВ, вирусов оспы коров и экстремелии были проведены исследования по сравнительной оценке противовирусной активности двух новых серий химических соединений ST-246 и НИОХ-14, а также химиопрепарата НИОХ-32, продемонстрировавшего ранее слабый противовирусный эффект. Результаты этих экспериментов представлены в таблицах 4.9, 4.10 и 4.11. При этом было показано, что новые серии химических соединений ST-246 и НИОХ-14 (как и предыдущие) проявляли сравнимую высокую активность в отношении этих ортопоксвирусов в

клеточной культуре Vero, ориентируясь на показатели ТІ (IS), которая значительно превышала таковую у химиопрепарата НИОХ-32.

Таблица 4.9 – Данные тестирования противовирусного действия химиопрепаратов на культуре клеток Vero в отношении вируса эктромелии (штамма К-1)

Наименование химиопрепаратов	TC ₅₀ (мкг/мл)	IC ₅₀ (мкг/мл)	IS (TC ₅₀ /IC ₅₀)
НИОХ-14	> 100	0,011	> 9091
ST-246	> 100	0,003	> 33333
НИОХ-32	> 100	0,054	> 1852
Примечания TC ₅₀ - токсическая концентрация химиопрепарата IC ₅₀ - ингибирующая концентрация химиопрепарата IS – индекс селективности химиопрепарата; химические соединения, у которых IS меньше 8, считаются неэффективными [69]			

Таблица 4.10 – Данные тестирования противовирусного действия химиопрепаратов на культуре клеток Vero в отношении вируса вакцинии (штамм ЛИВП)

Наименование химиопрепаратов	TC ₅₀ (мкг/мл)	IC ₅₀ (мкг/мл)	IS (TC ₅₀ /IC ₅₀)
НИОХ-14	> 100	0,001	> 100000
ST-246	> 100	0,001	> 100000
НИОХ-32	> 100	0,004	> 25000
Примечания TC ₅₀ - токсическая концентрация химиопрепарата IC ₅₀ - ингибирующая концентрация химиопрепарата IS – индекс селективности химиопрепарата; химические соединения, у которых IS меньше 8, считаются неэффективными [69]			

Таблица 4.11 - Данные тестирования противовирусного действия химиопрепаратов на культуре клеток Vero в отношении вируса оспы коров (штамм Гришак)

Наименование химиопрепаратов	TC ₅₀ (мкг/мл)	IC ₅₀ (мкг/мл)	IS (TC ₅₀ /IC ₅₀)
ННХ-14	> 100	0,051	> 1960
ST-246	> 100	0,002	> 50000
ННХ-32	> 100	0,015	> 6667
Примечания TC ₅₀ - токсическая концентрация химиопрепарата IC ₅₀ - ингибирующая концентрация химиопрепарата IS – индекс селективности химиопрепарата; химические соединения, у которых IS меньше 8, считаются неэффективными [69]			

Далее подобного рода исследования с этими же сериями химически синтезированных соединений были проведены *in vitro* с целевым ортопоксвирусом: ВОО. Результаты этих экспериментов представлены в таблице 4.12.

Таблица 4.12 - Данные тестирования противовирусного действия химиопрепаратов на культуре клеток Vero в отношении вируса оспы обезьян (штамм V79-1-005)

Наименование химиопрепаратов	TC ₅₀ , мкг/мл	IC ₅₀ , мкг/мл	IS (TC ₅₀ /IC ₅₀)
ННХ-14	> 100	0,013	> 7692
ST-246	> 100	0,001	> 100000
ННХ-32	> 100	0,153	> 653
Примечания TC ₅₀ - токсическая концентрация химиопрепарата IC ₅₀ - ингибирующая концентрация химиопрепарата IS – индекс селективности химиопрепарата; химические соединения, у которых IS меньше 8, считаются неэффективными [69]			

При этом было обнаружено, что исследованные химические соединения ST-246 и НИОХ-14 проявляли практически такую же эффективность для ВОО, как была ранее определена в опытах с ВВ, вирусами оспы коров и экстремелии (таблицы 4.9, 4.10 и 4.11), и близкую таковой, полученной в аналогичном исследовании с предыдущими сериями данных соединений. При этом по противовирусной активности такие химиопрепараты значительно превосходили НИОХ-32. Наличие выраженного противооспенного эффекта у новых серий химиопрепаратов ST-246 и НИОХ-14 (№ 1 и № 4П соответственно) в опытах *in vitro* с использованием ВВ, вирусов оспы коров, экстремелии и ВОО позволило провести изучение их показателей лечебно-профилактической активности в экспериментах на мышах, и/н инфицированных ВОО в дозах 3,4 и 2,4 lg БОЕ (10 и 1 ID₅₀ соответственно, рассчитанные по наличию вируса в легких). При этом наблюдали за изменениями концентраций вируса в легких спустя 7 суток п.и. мышей. Результаты таких исследований отражены в таблицах 4.13 и 4.14.

Из результатов, представленных в таблице 4.13, видно, что мыши в группах, получавших разные дозы (60 или 30 мкг/г массы) 2 исследуемых химических соединения (ST-246 и НИОХ-14) и и/н зараженных 1 ID₅₀ ВОО по наличию вируса в легких спустя 7 суток п.и., не отличались от контроля (сравнение величин по двусторонним критерию χ^2 и точному тесту Фишера, при $p \leq 0,05$). Тем не менее, наблюдалась некоторая тенденция по выявлению защитного действия у этих химиопрепаратов, особенно при применении их в высокой дозе: 60 мкг/г мыши.

По данным таблицы 4.14, видно, что количество обработанных химическими соединениями ST-246 и НИОХ-14 мышей с отмеченным содержанием патогена в легких спустя 7 суток п.и. существенно ниже по сравнению с контролем (при $p \leq 0,05$). Кроме того, было установлено, что химиопрепарат НИОХ-32 не отличался значимо по этому показателю от контроля. Причем использование в одинаковых дозах химических соединений ST-246 и НИОХ-14 не выявило достоверных различий между этими химиопрепаратами по эффективности защитного действия.

Из данных, приведенных в таблице 4.15, видно, что сурки из всей контрольной группы заболели, при этом у них отмечали внешние клинические признаки болезни (оспоподобную сыпь на слизистых оболочках и коже по всей поверхности тела, подчелюстной одно- или двусторонний лимфаденит, гнойно-серозные конъюнктивит, блефарит

и ринит, нарушение координации движения, тремор конечностей, взъерошенность шерсти и повышенная агрессивность) через 9–12 суток п.и.

Таблица 4.13 – Данные протективной активности химиопрепаратов в отношении вируса оспы обезьян (штамм V79-1-005) через 7 суток после интраназального инфицирования аутбредных мышей ICR в дозе 2,4 lg БОЕ (1 ID₅₀)

Наименование параметров	Величина параметров для мышей, обработанных по схеме* химиопрепаратами:				
	НИОХ-14	НИОХ-14	ST-246	ST-246	плацебо
Суточная доза химиопрепаратов, вводимых мышам	30 мкг/г	60 мкг/г	30 мкг/г	60 мкг/г	0,2 мл/мышь
Кол-во животных	6	6	6	6	6
Титр вируса в легких в lg БОЕ/легкие у каждой мыши спустя 7 суток после инфицирования (п.и.)	3,2	< 1,7	3,2	3,1	3,7
	< 1,7	< 1,7	2,3	< 1,7	3,3
	< 1,7	< 1,7	3,2	< 1,7	3,6
	< 1,7	< 1,7	< 1,7	< 1,7	< 1,7
	< 1,7	< 1,7	< 1,7	< 1,7	< 1,7
	< 1,7	< 1,7	< 1,7	< 1,7	< 1,7
Титр вируса в легких мышей в lg БОЕ/легкие, М (I ₉₅)	2,0 (1,4...2,6) (n=6)	1,7 (1,7...1,7) (n=6)	2,3 (1,6...3,0) (n=6)	1,9 (1,3...2,5) (n=6)	2,6 (1,6...3,6) (n=6)
ИППВ в легких мышей в lg	0,6	0,9	0,3	0,7	Н.о.
Кол-во (%) мышей с вирусом в легких спустя 7 суток п.и.	1 (17)	0 (0)	3 (50)	1 (17)	3 (50)
КЗИ в %	67	100	0	67	Н.о.
Примечания М – средняя величина I ₉₅ - доверительный интервал М с заданной вероятностью 95%					

Продолжение таблицы 4.13

$< 1,7$ – значение, находящееся ниже порога чувствительности способа титрования ($1,7 \lg$ БОЕ/легкие), использовано в виде значения его самого при расчете М
Н.о. – значение не определяется
ИППВ - индекс подавления продукции вируса = \lg титра вируса в легких животных в контроле - \lg титра вируса в легких животных в опыте
КЗИ - коэффициент защиты от инфицирования = $100\% \times (\% \text{ животных в контроле с наличием вируса в легких} - \% \text{ опытных животных с наличием вируса в легких}) / \% \text{ животных в контроле с наличием вируса в легких}$
Плацебо – раствор на основе метилцеллюлозы (0,75 %) и твина-80 (1 %), который использовали для получения суспензий химиопрепаратов ST-246 и НИОХ-14
* Препараты вводили за сутки до инфицирования, спустя 2 часа п.и. и далее ежедневно однократно в течение 6 суток п.и.

Таблица 4.14 - Данные протективной активности химиопрепаратов в отношении вируса оспы обезьян (штамм V79-1-005) через 7 суток после интраназального инфицирования аутбредных мышей ICR в дозе $3,4 \lg$ БОЕ ($10 ID_{50}$)

Наименование показателей	Величина показателей для мышей, обработанных по схеме* химиопрепаратами:			
	НИОХ-14	НИОХ-32	ST-246	плацебо
Суточная доза химиопрепаратов, вводимых мышам	60 мкг/г	60 мкг/г	60 мкг/г	0,2 мл/мышь
Кол-во животных	6	6	6	6
Титр вируса в легких в \lg БОЕ/легкие у каждой мыши спустя 7 суток после инфицирования (п.и.)	$< 1,7$	3,5	3,0	4,9
	$< 1,7$	4,9	$< 1,7$	4,9
	$< 1,7$	3,6	$< 1,7$	4,9
	$< 1,7$	4,9	$< 1,7$	4,9
	$< 1,7$	4,9	$< 1,7$	4,6
	$< 1,7$	4,9	$< 1,7$	4,9

Продолжение таблицы 4.14

Наименование показателей	Величина показателей для мышей, обработанных по схеме* химиопрепаратами:			
	НАОХ-14	НАОХ-32	ST-246	плацебо
Титр вируса в легких мышей в lg БОЕ/легкие, М (I ₉₅)	1,7 ** (1,7...1,7) (n=6)	4,5 (3,8...5,2) (n=6)	1,9 ** (1,3...2,5) (n=6)	4,9 (4,8...5,0) (n=6)
ИППВ в легких мышей в lg	3,2	0,4	3,0	Н.о.
Кол-во (%) мышей в вирусом в легких спустя 7 суток п.и.	0*** (0)	6 (100)	1*** (17)	6 (100)
КЗИ в %	100	0	83	Н.о.
<p>Примечания</p> <p>М – средняя величина</p> <p>I₉₅ - доверительный интервал для М с заданной вероятностью 95%</p> <p>< 1,7 – значение, находящееся ниже порога чувствительности способа титрования (1,7 lg БОЕ/легкие), использовано в виде значения его самого при расчете М</p> <p>Н.о. – значение не определяется</p> <p>ИППВ - индекс подавления продукции вируса = lg титра вируса в легких животных в контроле - lg титра вируса в легких животных в опыте</p> <p>КЗИ - коэффициент защиты от инфицирования = 100% × (% животных в контроле с наличием вируса в легких – % опытных животных с наличием вируса в легких) / % животных в контроле с наличием вируса в легких</p> <p>Плацебо - раствор на основе метилцеллюлозы (0,75 %) и твина-80 (1 %), который брали для получения суспензий химиопрепаратов ST-246, НАОХ-32 и НАОХ-14</p> <p>* Химиопрепараты вводили за сутки до заражения, спустя 2 часа п.и. и далее ежедневно однократно в течение 6 суток п.и.</p> <p>** Значимое отличие от контроля, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента с одинаковыми дисперсиями)</p> <p>*** Значимое отличие от контроля, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двусторонних критерия χ^2 и точного теста Фишера)</p>				

В дальнейшем с использованием ST-246 и НИОХ-14 были проведены аналогичные исследования на сурках, инфицированных ВОО дозой 3,6 lg БОЕ (25 ID₅₀), регистрируя и у них наличием клинической картины заболевания (таблица 4.15), включая летальный исход, а также титры антител к ВОО через 28 суток п.и. (таблица 4.16).

Таблица 4.15 – Данные протективной активности препаратов при оспе обезьян у степных сурков после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) дозой 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀)

Наименование показателей	Значение показателей для сурков, обработанных по схеме* химиопрепаратами:		
	НИОХ-14	ST-246	плацебо
Суточная доза химиопрепаратов, вводимых суркам	40 мг/кг	40 мг/кг	1,0 мл/сурка
Количество животных, взятых в эксперимент	4	4	4
Количество заболевших сурков	0**	0**	4
КЗЗ в %	100	100	Н.о.
Количество павших сурков	0	0	2
КЗГ в %	100	100	Н.о.
<p>Примечания</p> <p>Плацебо – раствор на основе метилцеллюлозы (0,75 %) и твина-80 (1 %), который использовали для приготовления суспензий химиопрепаратов ST-246 и НИОХ-14</p> <p>* Препараты вводили ежедневно однократно перорально за сутки до и в течение 6 суток после инфицирования</p> <p>** Значимое отличие от контроля, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью критерия χ^2 и точного теста Фишера)</p> <p>КЗЗ – коэффициент защиты от заболевания = % заболевших животных в контроле - % заболевших животных в опыте</p> <p>КЗГ – коэффициент защиты от гибели = $100 \% \times (\% \text{ погибших животных в контроле} - \% \text{ погибших животных в опыте}) / \% \text{ погибших животных в контроле}$</p> <p>Н.о. - величина не определяется</p>			

Таблица 4.16 – Данные по титрам антител к вирусу оспы обезьян – ВОО (штамм V79-1-005) у выживших степных сурков после и/н заражения дозой 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀) того же штамма ВОО и обработки химиопрепаратами ST-246 или НИОХ-14

Номер сурка	Наименование химиопрепаратов	Значение титров противооспенных антител в сыворотках крови сурков (в PRNT ₅₀ /мл) по временным точкам:	
		до инфицирования	спустя 28 суток после инфицирования
1	НИОХ-14	< 5	25
2	НИОХ-14	< 5	125
3	НИОХ-14	< 5	125
4	НИОХ-14	< 5	625
5	ST-246	< 5	125
6	ST-246	< 5	125
7	ST-246	< 5	625
8	ST-246	< 5	625
9	Плацебо	< 5	625
10	Плацебо	< 5	3125
<p>Примечания</p> <p>Плацебо - раствор на основе метилцеллюлозы (0,75 %) и твина-80 (1 %), который использовали для приготовления суспензий химиопрепаратов ST-246 и НИОХ-14</p> <p>PRNT₅₀ - обратный титр антител, вызывающий 50%-е снижение количества бляшек на инфицированном вирусом монослое культуры клеток, вычисленный по методу Спирмена-Кербера [12]</p> <p>< 5 - значение ниже порога чувствительности (5 PRNT₅₀/мл) использованного способа титрования</p>			

В то же время у сурков опытных групп, обработанных химическими соединениями ST-246 и НИОХ-14, не было зарегистрировано каких-либо симптомов болезни в течение всего периода наблюдения после и/н инфицирования ВОО. Это свидетельствовало о наличии достоверного лечебно-профилактического действия у испытанных химиопрепаратов. При этом использование химических соединений ST-246 и НИОХ-14 в

аналогичных дозах не выявило значимых различий между этими химиопрепаратами по эффективности действия. Спустя 28 суток п.и. у всех сурков опытных групп и выживших животных контрольной группы были обнаружены высокие титры антител к ВОО в реакции нейтрализации (таблица 4.16).

Важно отметить, что такие титры у выживших сурков п.и. вирусом и проведенных лечебно-профилактических мероприятий с применением химически соединений имели относительно высокие величины. Данное обстоятельство, по всей видимости, связано с тем, что механизм противовирусного действия химиопрепарата ST-246, а также его структурного аналога (ННХ-14) сориентирован на ингибирование формирования различных оболочечных форм ВОО (интрацеллюлярного, экстрацеллюлярного и клеточно-ассоциированного), что приводит к ограничению их распространения в организме животных, в том числе к вторичным органам-мишеням из первичных [94, 175, 231]. Тогда как патоген в другой форме (интрацеллюлярный зрелый), находящийся в первичных клетках-мишенях дыхательных органов сурков, также может инфицировать (но ограничено) рядом находящиеся клетки [306, 397, 463]. Это, вероятно, и обеспечивало создание относительно высокого уровня вирусной антигенной нагрузки у опытных групп сурков, приводящего к существенному росту гуморального иммунитета, сравнимого с таковым у контрольной группы выживших сурков.

В исследованиях, проведенных на двух видах животных (мышях и сурках), зараженных близкими дозами одного и того же штамма ВОО (V79-1-005): соответственно 3,4 lg БОЕ (10 ID₅₀ по накоплению вируса в легких) и 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀ по наличию клинической симптоматики заболевания), с использованием химиопрепаратов ST-246 и ННХ-14 по сходным схемам введения, были получены подобные или одни и те же достоверно высокие значения КЗИ и КЗЗ, что свидетельствует не только о наличии выраженного защитного эффекта у этих препаратов, но и о воспроизводимости результатов, полученных на данных модельных биосистемах. При этом важно отметить, что величина ID₅₀ ВОО для сурков, равная 2,2 lg БОЕ по наличию клинической симптоматики заболевания, по сути, соответствует таковой по наличию инфекционного процесса, если учесть то, что у не заболевших животных при инокуляции разными дозами вируса (2,2; 0,2; -1,8 lg БОЕ) ни в одном случае не было обнаружено антител к ВВ (п. 4.1.2). В этом случае значение ID₅₀ ВОО для сурков близко к таковому для мышей (ID₅₀ = 2,4 lg БОЕ), определенному по регистрации наличия инфекционного процесса. При этом оценочные

величины показателей эффективности химиопрепаратов ST-246 и НИОХ-14, полученные нами с использованием этих двух видов животных также не отличались между собой. Следовательно, данные результаты еще раз подтверждают мнение ряда исследователей [35, 264] о том, что для создания адекватной модели заболевания людей необходимо использование животных, чувствительность которых к выбранному штамму вируса будет близка человеку. В этой связи, учитывая сходные значения этого показателя к ВОО у сурков, мышей и людей (таблицы 4.7 и 4.7), можно ожидать, что значения эффективности тестированных препаратов на этих видах животных будут близкими к таковым у человека.

Эксперименты по оценке противовирусного действия НИОХ-14 и ST-246 ранее делали многие исследователи с различными видами ортопоксвирусов, культур клеток и известных модельных видов животных [22, 92, 393]. Результаты наших исследований, проведенных на мышах и сурках при использовании ВОО, подтвердили наличие такого эффекта у этих препаратов. Это обстоятельство свидетельствует о реальной возможности применения в дальнейшем для этой цели разработанных нами модельных для оспы обезьян видов животных.

С учетом исследований, проведенных в процессе разработки модельной биосистемы «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 ВОО», и испытаний были определены пределы ее практического применения:

- использование не менее 6 аутбредных мышей ICR (10–16-суточные) обоих полов на каждый опытный и контрольный препарат;
- использование ВОО (штамм V79-1-005), наработанного на культуре клеток или куриных эмбрионах, с известной для аутбредных мышей ICR (10–16-суточные) обоих полов при интраназальном заражении инфекционностью (ID_{50} по регистрации наличия вируса в легких спустя 7 суток п.и.) в пределах 2,0–2,8 lg БОЕ;
- инфицирование мышей ВОО и/н способом;
- введение мышам 10–100 ID_{50} (по наличию вируса в легких спустя 7 суток п.и.) ВОО (штамм V79-1-005) при и/н инфицировании в объеме 0,03 мл/мышь;
- использование профилактической или лечебно-профилактической схемы введения мышам опытных и контрольных препаратов (рекомендуется испытаниям подвергать препараты, ранее продемонстрировавшие противовирусное действие на ортопоксвирусах III и IV групп патогенности в экспериментах *in vitro* и *in vivo*);

- введение опытных и контрольных препаратов мышам пероральным способом;
- пероральное однократное введение мышам раствора, суспензии или эмульсии опытных и контрольных препаратов в объеме 0,2 мл/мышь;
- выявление у инфицированных ВОО мышей, обработанных опытным препаратом, наличия/отсутствия вируса в легких и его концентрации через 7 суток п.и. по результатам титрования их гомогенатов в сравнении с контролями;
- статистическое сравнение в опытных и контрольных группах мышей уровней накопления вируса в легких и величин показателя его наличия в этом органе.

С учетом исследований, проведенных в процессе разработки модельной биосистемы «степной сурок - штамм V79-1-005 ВОО», и испытаний были определены пределы ее практического применения:

- использование не менее 4 степных сурков (1–24-месячные) обоих полов на каждый опытный и контрольный препарат;
- использование ВОО (штамм V79-1-005), наработанного на культуре клеток или куриных эмбрионах, с известной для степных сурков (1–24-месячные) обоих полов при интраназальном заражении вирулентностью (ID_{50} по регистрации основных внешних клинических признаков оспоподобного заболевания, включая гибель) в пределах 1,0–3,4 lg БОЕ;
- инфицирование сурков ВОО и/е способом;
- введение суркам 10–100 ID_{50} (по наличию основных внешних клинических признаков оспоподобного заболевания, включая гибель) ВОО (штамм V79-1-005) при и/н инфицировании в объеме 1,0 мл/сурка;
- использование профилактической, лечебно-профилактической или лечебной схемы введения суркам опытных и контрольных препаратов (рекомендуется испытаниям подвергать препараты, ранее продемонстрировавшие противовирусное действие в опытах *in vitro* на ортопоксвирусах, не патогенных для человека - минимум на трех: вирусы эктромелии, осповакцины и оспы коров, и патогенных - вирус оспы обезьян и ВНО, а также в экспериментах *in vivo* на ортопоксвирусах, не патогенных для человека - минимум на двух: вирусы эктромелии и оспы коров, и патогенном - с использованием модельной биосистемы «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 ВОО»;
- введение суркам опытных и контрольных препаратов пероральным способом;

- пероральное однократное введение суркам раствора, суспензии или эмульсии опытных и контрольных препаратов в объеме 5,0 мл/сурка или их таблеток и капсул;
- выявление у инфицированных ВОО сурков, обработанных опытным препаратом, наличия/отсутствия основной внешней клинической картины оспоподобного заболевания (оспоподобная сыпь на слизистых оболочках и коже и подчелюстной одно- или двусторонний лимфаденит), включая гибель, в течение 25 суток п.и. в сравнении с контролями;
- статистическое сравнение в опытных и контрольных группах сурков величин показателя наличия внешних клинических признаков болезни, включая гибель.

Таким образом, с применением сурков, мышей и ВОО (штамм V79-1-005) на примере 3 химических соединений (НИОХ-14, НИОХ-32 и ST-246) подтверждено наличие противовирусного действия, ранее отмеченного многими исследователями на иных модельных биосистемах. Это свидетельствует о возможности применения биосистем «степной сурок - штамм V79-1-005 ВОО» и «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 ВОО» для изучения защитного действия химиопрепаратов от оспы обезьян. Определены пределы практического применения таких модельных биосистем.

5 ПОИСК МОДЕЛЬНОЙ БИОСИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ОТ ГРИППА ПТИЦ (А/Н5N1) У ЧЕЛОВЕКА

5.1 Чувствительность человека и подопытных животных к высокопатогенному вирусу гриппа птиц А/Н5N1

5.1.1 Прогнозная оценка 50%-й инфицирующей дозы вируса для человека по данным заражения его первичных клеток-мишеней

В следующей серии экспериментов были проведены исследования по определению прогнозной величины показателя инфекционной активности в/пат ВГП А/Н5N1 для человека по результатам, полученным с использованием его первичных клеток-мишеней для данного патогена. Это необходимо было сделать для того, чтобы понять, на какую инфекционную активность данного вируса в отношении людей ориентироваться при подборе его штамма из числа тех, которые выделены на территории России, для разрабатываемой модельной биосистемы по оценке эффективности противогриппозных препаратов.

С использованием штаммов А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 и А/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1, выделенных от кур на территории Новосибирской и Курганской областей в 2005 г., непандемического штамма А/Novosibirsk/1/09 ВГ А/Н1N1, выделенного от больного человека во время эпидемии в г. Новосибирск в начале 2009 г., и адаптированного к мышам штамма А/Aichi/2/68 ВГ А/Н3N2 были проведены эксперименты по оценке чувствительности к ним СПККЛ людей и вирус-продуктивной активности данной клеточной культуры. Применение таких культур клеток для данных исследований было связано с тем, что ведущие первичные клетки-мишени к ВГ у человека располагаются в респираторном тракте и являются эпителиоцитами, с которых и стартует соответствующий инфекционный процесс [53, 111, 251, 274, 382]. Причем такая клеточная культура, по данным световой микроскопии, имела в своем составе в основном все типы клеток, из которых состоит этот орган, включая эпителиоциты. Для проведения оценки чувствительности СПККЛ людей к ВГ необходимо было на первом этапе убедиться в способности взятых в исследование штаммов ВГ реплицироваться в этой культуре клеток в процессе культивирования при 37 °С. Чтобы зарегистрировать данный факт, учитывая то, что вирусы семейства *Orthomyxoviridae* не обладают высокой термостабильностью по сравнению с таковой у

ортопоксвирусов, сначала было проведено изучение динамики инактивации трех исследуемых штаммов при 37 °С в дебрисе СПККЛ человека. При этом в пробирки с 0,9 мл клеточного дебриса вносил по 0,1 мл суспензии, содержащей штаммы A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 ВГП A/H5N1, A/Novosibirsk/1/2009 ВГ A/H1N1 или A/Aichi/2/68 ВГ A/H3N2, в дозах 4,8; 4,2 или 3,5 lg ЭИД₅₀ соответственно с последующим инкубированием в течение 24 часов при 37 °С, отбирая через 5 мин, 3, 6, 18 и 24 часа по 4 пробирки с вирусосодержащим материалом для вирусологического исследования. Результаты этих исследований отражены в таблице 5.1.

Из данных таблицы видно, что в процессе инкубирования трех штаммов ВГ в составе клеточного дебриса при 37 °С происходила их выраженная термоинактивация, при этом их концентрация за исследуемые 18 часов снизилась в среднем на 2,3 lg.

В дальнейшем были проведены исследования по изучению динамик накопления трех штаммов ВГ в СПККЛ человека при культивировании при 37 °С в течение 5 мин, 18, 24, 30, 36 и 48 часов п.и. При этом п.и. СПККЛ одним из штаммов A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 ВГП A/H5N1, A/Novosibirsk/1/2009 ВГ A/H1N1 или A/Aichi/2/68 ВГ A/H3N2 в дозе 0,5, 0,05 или 0,005 ЭИД₅₀/кл. соответственно и последующего инкубирования в течение 48 часов п.и. были получены результаты, представленные в таблице 5.2.

Таблица 5.1 – Данные по динамикам инактивации трех штаммов вируса гриппа (ВГ) разных субтипов в составе дебриса* суспензии первичных культур клеток легких от человека при 37 °С

Наименование штаммов и вирусов	Удельная инфекционная активность штаммов ВГ в lg ЭИД ₅₀ /мл, М (I ₉₅) для n=4, в течение следующих сроков инкубирования в клеточном дебрисе:				
	5 мин	3 часов	6 часов	18 часов	24 часа
A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в/пат ВГП A/H5N1	4,8 (4,6...5,0)	4,2** (3,9...4,5)	3,8** (3,6...4,0)	2,5** (2,3...2,7)	1,7** (1,4...2,0)
A/Novosibirsk/1/2009 ВГ A/H1N1	4,2 (3,9...4,5)	3,8 (3,5...4,1)	3,0** (2,8...3,2)	1,8** (1,5...2,1)	Н.о.

Продолжение таблицы 5.1

Наименование штаммов и вирусов	Удельная инфекционная активность штаммов ВГ в lg ЭИД ₅₀ /мл, М (I ₉₅) для n=4, в течение следующих сроков инкубирования в клеточном дебрисе:				
	5 мин	3 часов	6 часов	18 часов	24 часа
A/Aichi/2/68 ВГ A/H3N2	3,5 (3,3...3,7)	3,0** (2,8...3,2)	2,3** (2,0...2,6)	1,2** (0,9...1,5)	Н.о.
<p>Примечания</p> <p>М – средняя величина</p> <p>n – число исследованных проб</p> <p>I₉₅ – доверительный интервал М с заданной вероятностью 95 %</p> <p>В/пат ВГП – высокопатогенный вирус гриппа птиц</p> <p>Н.о. – величину не определяли</p> <p>* Дебрис был приготовлен путем деструкции клеток (3-кратное замораживание-оттаивание) в концентрации 3,0 (2,5...3,5)×10⁵ кл./пробирку</p> <p>** Величина ниже таковой через 5 мин инкубирования соответствующего штамма вируса, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двусторонних t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни)</p>					

Из данных таблицы видно, что все три исследованных штамма размножались в СПККЛ человека через 18 часов п.и. Такое заключение нами было сделано на основании сравнительного анализа данных, полученных в этом опыте и предыдущем (таблица 5.1): отсутствие снижения (или недостоверное снижение на 0,2 и 0,4 lg) величины концентрации вируса через 18 часов п.и. СПККЛ (таблица 5.2) и выраженное падение значения данного показателя (более чем на 2,3 lg) за этот период после введения вирусного материала в клеточный дебрис (таблица 5.1). Используя полученную информацию, далее были проведены эксперименты по оценке величин продукции четырех штаммов ВГ, включая штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП A/H5N1, и их инфекционности в СПККЛ от трех человек, ориентируясь на регистрацию инфекционного процесса в клетках через 18 часов п.и. различными дозами вируса. Результаты таких исследований отражены в таблице 5.3.

Таблица 5.2 – Данные по динамике накопления трех штаммов вируса гриппа (ВГ) разных субтипов в суспензии первичных культур клеток легких от человека, по $3,0 (2,5...3,5) \times 10^5$ кл. в пробирке, при 37°C

Наименование штаммов и вирусов	Концентрация штаммов ВГ в $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, М (I_{95}) для $n=4$, в течение следующих сроков инкубирования в суспензии клеток:					
	5 мин	18 часов	24 часа	30 часов	36 часов	48 часов
A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в/пат ВГП А/Н5N1	5,2 (4,8...5,6)	5,0 * (4,5...5,5)	4,2 (3,6...4,8)	3,8 (3,2...4,4)	3,5 (2,9...4,1)	3,0 (2,6...3,4)
A/Novosibirsk/1/2009 ВГ А/Н1N1	4,2 (3,8...4,6)	3,8 * (3,2...4,4)	2,7 (2,2...3,2)	2,7 (2,0...3,4)	1,7 (1,2...2,2)	1,7 (1,0...2,4)
A/Aichi/2/68 ВГ А/Н3N2	3,2 (2,8...3,6)	3,0 * (2,5...3,5)	2,7 (2,2...3,2)	3,0 (2,6...3,4)	1,7 (1,2...3,2)	1,5 (1,1...1,9)
<p>Примечания</p> <p>М – средняя величина</p> <p>n – число исследованных проб</p> <p>I_{95} – доверительный интервал М с заданной вероятностью 95 %</p> <p>* Величина выше расчетной через 18 часов после инкубации вируса в клеточном дебрисе, учитывая его термоинактивацию на 2,3 \lg, таблица 5.1 (при сравнении с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента, $p \leq 0,05$)</p> <p>В/пат ВГП – высокопатогенный вирус гриппа птиц</p>						

Из данных таблицы видно, что СПККЛ людей достоверно ($p < 0,05$) проявляет более высокую чувствительность к штаммам A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 и A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1, примерно в 100 раз, по сравнению с таковой к штамму A/Aichi/2/68 ВГ А/Н3N2. Однако величина урожайности в СПККЛ людей штаммов в/пат ВГП была значимо ниже (примерно в 10 раз), чем у штамма A/Novosibirsk/1/2009 ВГ А/Н1N1. При этом значение этого показателя для штамма

A/Aichi/2/68 ВГ A/H3N2 было близко к таковому для штамма A/Novosibirsk/1/2009 ВГ A/H1N1.

Таблица 5.3 – Данные по чувствительности суспензии клеток легких (СПККЛ) человека к четырем штаммам вируса гриппа (ВГ) и их продуктивность (N) через 18 часов после заражения

Наименование штаммов и вирусов	CID ₅₀ ВГ для СПККЛ в lg ЭИД ₅₀ (n=3)		N ВГ в СПККЛ в lg ЭИД ₅₀ /кл. (n=3)	
	M	I ₉₅	M	I ₉₅
A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в/пат ВГП A/H5N1	1,8*	1,1...2,5	1,1**	0,6...1,6
A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП A/H5N1	1,9*	1,1...2,7	1,0***	0,5...1,5
A/Novosibirsk/1/2009 ВГ A/H1N1	3,1	2,5...3,7	2,1	1,6...2,6
A/Aichi/2/68 ВГ A/H3N2	4,0	3,2...4,8	1,9	1,5...2,3
<p>Примечания</p> <p>M – средняя величина</p> <p>n – число экспериментов</p> <p>I₉₅ – доверительный интервал M с заданной вероятностью 95 %</p> <p>CID₅₀ – 50 %-я клеточная инфицирующая доза</p> <p>В/пат ВГП – высокопатогенный вирус гриппа птиц</p> <p>* Величина ниже таковой для штамма A/Aichi/2/68 ВГ, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двустороннего z-критерия)</p> <p>** Величина ниже таковой для штамма A/Novosibirsk/1/2009 ВГ, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двусторонних t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни)</p> <p>*** Величина ниже таковой для штаммов A/Novosibirsk/1/2009 и A/Aichi/2/68 ВГ, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двусторонних t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни)</p>				

В рамках проведенных исследований представлены данные экспериментов *in vitro* по оценке чувствительности первичных клеток легких человека к трем штаммам вируса гриппа, относящимся к разным субтипам. Аналогичного плана информация была получена ранее для первичных клеток легких аутбредных мышей ICR в отношении штамма A/Aichi/2/68 ВГ А/Н3N2: $CID_{50} = 3,2$ (2,9...3,3) ЭИД₅₀, а также оценена величина ID₅₀, равная -1,2 (-1,6....-0,8) ЭИД₅₀, этого же штамма ВГ для самих мышей при аэрозольном их заражении с учетом доли апплицированного при этом аэрозоля в легких этого вида животных [11, 55]. Все эти значения доз, определенные в экспериментах *in vivo* и *in vitro*, были использованы для оценки прогнозных величин ID₅₀ штаммов A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 и A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1, а также штаммов A/Novosibirsk/1/2009 ВГ А/Н1N1 и A/Aichi/2/68 ВГ А/Н3N2 для человека в рамках ранее разработанного метода [11, 13], сущность которого описана в п. 4.1.3.1 данной работы. При этом человек был взят в качестве целевого объекта, а мышь - в качестве модельного. В результате проведенных расчетов была определена чувствительность людей к четырем исследуемым штаммам ВГ (таблица 5.4).

При сравнительной прогнозной оценке ID₅₀ человека к ВГ разных субтипов, основанной на использовании экспериментально полученных значений CID_{50} на человеческих СПККЛ, была отмечена примерно в 10 раз более высокая чувствительность человека к в/пат ВГП А/Н5N1 (штаммы A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 и A/Chicken/Kurgan/05/2005), чем к сезонному ВГ А/Н1N1 (штамм A/Novosibirsk/1/2009). При этом средние прогнозные значения ID₅₀ (-2,5 и -2,4 lg ЭИД₅₀) штаммов в/пат ВГП А/Н5N1 для людей, полученные со знаком минус, объясняются тем, что чувствительность использованного нами метода титрования на куриных эмбрионах была ниже, чем таковая для человеческих первичных клеток-мишеней. Причем, по данным электронной микроскопии, на 1 ЭИД₅₀ ВГ типа А приходится до 1000 вирусных частиц [11, 181]. То есть полученная нами средняя прогнозная величина ID₅₀ штаммов A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 и A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП, соответствовала 1–3 вирусным частицам. Многие исследователи изучали *in vitro* способность клеток респираторного тракта людей продуцировать в/пат ВГП А/Н5N1 [233, 274, 382], при этом была отмечена его репродукция и в клетках легких человека. Наши результаты, так же сориентированные на использование СПККЛ людей, подтвердили их способность продуцировать этот возбудитель заболевания.

Таблица 5.4 – Прогнозные данные по инфекционности четырех штаммов вируса гриппа (ВГ) в отношении людей

Наименование штаммов и вирусов	Прогнозная ID ₅₀ вируса в lg ЭИД ₅₀ для человека (n = 3)	
	М	I ₉₅
A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в/пат ВГП А/Н5N1	-2,5*	(-2,9...-2,1)
A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1	-2,4*	(-2,8...-2,0)
A/Novosibirsk/1/2009 ВГ А/Н1N1	-1,2**	(-1,6...-0,8)
A/Aichi/2/68 ВГ А/Н3N2	-0,3	(-0,7...0,1)
<p>Примечание</p> <p>М – средняя величина</p> <p>n – число экспериментов</p> <p>I₉₅ – доверительный интервал М с заданной вероятностью 95 %</p> <p>ID₅₀ – 50 %-я инфицирующая доза</p> <p>В/пат ВГП – высокопатогенный вирус гриппа птиц</p> <p>* Величина ниже таковой для штаммов A/Novosibirsk/1/2009 и A/Aichi/2/68 ВГ, p ≤ 0,05 (при сравнении с помощью двустороннего z-критерия)</p> <p>** Величина ниже таковой для штамма A/Aichi/2/68 ВГ, p ≤ 0,05 (при сравнении с помощью двустороннего z-критерия)</p>		

Результат исследований прогнозной величины ID₅₀ (-0,3 lg ЭИД₅₀) штамма A/Aichi/2/68 ВГ А/Н3N2 для человека существенно отличался (примерно в 10 раз) в большую сторону от такового, полученного для штамма A/Novosibirsk/1/2009 сезонного ВГ А/Н1N1. Данное обстоятельство, вероятно, объясняется тем, что штамм A/Aichi/2/68 ВГ А/Н3N2, выделенный от человека во время сезонной эпидемии гриппа в середине прошлого столетия, снизил свою инфекционную активность в отношении человека после проведенного пассирования через организм мыши с целью адаптации к этому виду животных.

Если считать сходными по чувствительности методы титрования ВГ на куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK, то прогнозное значение для человека $ID_{50} = -0,3$ ($-0,7...0,1$) ЭИД₅₀ штамма A/Aichi/2/68 ВГ A/H3N2, адаптированного к мышам, было близко к таковому субтипа A/H3N2 сезонного ВГ ($ID_{50} = -0,3-0,5 \lg \text{ТЦД}_{50}$), полученному в экспериментах при аэрозольном заражении людей [255] по результатам ссылки на этот источник другими исследователями [277]. К сожалению, в литературе нет информации ни о виде использованного авторами штамма сезонного ВГ субтипа A/H3N2, ни о его пассажной истории, ни о конкретной методике расчета данной дозы. Более низкая для человека инфекционная активность этого субтипа ВГ (примерно в 10 раз) по сравнению с таковой штамма A/Novosibirsk/1/2009 сезонного ВГ A/H1N1, возможно, объясняется, как минимум, одной или двумя причинами:

- 1) использованный штамм в экспериментах по заражению людей мог быть аттенуирован при многократном пассировании на культуре клеток MDCK или куриных эмбрионах;
- 2) при расчете величины ID_{50} для людей в экспериментах по заражению вирусным аэрозолем могла быть не учтена его доля, апплицированная в легких человека.

Несмотря на очень высокую чувствительность людей к в/пат ВГП субтипа A/H5N1, определенную нами на основании прогнозной оценки, полученной при использовании СПККЛ человека, этот возбудитель заболевания не вызывает эпидемий. Данный факт может быть объяснен несколькими обстоятельствами, которые тесным образом связаны с тремя основными элементами, составляющими эпидемический процесс: 1) источник инфекции, 2) механизмы передачи инфекции, 3) восприимчивость населения к инфекции. Если говорить о первом элементе (больной человек), то важно отметить, что в большинстве случаев (≥ 90 %) заболевание, вызываемое в/пат ВГП A/H5N1, по данным эпиданализа, протекает бессимптомно [372, 373, 383]. А у тех ≤ 10 % инфицированных людей, которые демонстрируют внешние клинические признаки болезни отмечается реже (1–50 % случаев) насморк [145, 149, 437], чем при сезонном гриппе (более 90 % случаев) [87, 126, 151]. В связи с этим выброс выделений из носа во время чихания и высмаркивания людей, имеющих симптоматику заболевания, должен быть ниже при гриппе птиц (A/H5N1). Если принять во внимание данные о преимущественно бессимптомном течении у людей гриппа птиц (A/H5N1), становится очевидным, что смертность среди инфицированных в/пат ВГП A/H5N1 на много меньше, чем она сейчас офи-

циально декларируется (~ 60%). Соответственно, в основном это заболевание протекает у людей без выраженных клинических признаков, а тяжелые случаи болезни, вероятно, связаны со случайным попаданием больших доз этого вируса в организм человека и с сопутствующими у него патологиями. Кроме того, в экспериментах (таблица 5.3), проведенных с использованием СПККЛ человека, была отмечена более низкая (примерно в 10 раз) продуктивная активность в/пат ВГП А/Н5N1 (штаммы A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 и A/Chicken/Kurgan/05/2005) по сравнению с таковой у сезонного ВГ Н1N1 (штамм A/Novosibirsk/1/2009). Данное обстоятельство может свидетельствовать о том, что и концентрация вируса в выделениях, выбрасываемых из организма человека, инфицированного в/пат ВГП А/Н5N1, примерно в 10 раз меньше, чем та, которая наблюдается при сезонном гриппе.

Что касается механизмов передачи инфекций, вызванных сезонным ВГ и в/пат ВГП А/Н5N1, то они, вероятно, сходны. Однако, исходя из того, что при гриппе птиц (А/Н5N1) у людей, проявляющих симптоматику заболевания, реже наблюдался насморк, может преобладать аэрозольный механизм передачи инфекции над контактным в основном за счет выброса аэрозоля, происходящего в процессе кашля, частота встречаемости которого аналогична у больных гриппом птиц (А/Н5N1) и сезонным гриппом [145, 149, 437]. Причем результаты исследования устойчивости сезонного ВГ Н1N1 (штамм A/Novosibirsk/1/2009) и в/пат ВГП Н5N1 (штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) в составе дебриса СПККЛ человека при температуре 37 °С были близкими (таблица 5.1), что косвенно свидетельствует о сходстве этих патогенов по длительности пребывания во внешней среде в жизнеспособном состоянии.

Говоря о восприимчивости людей к сезонному ВГ и в/пат ВГП А/Н5N1, необходимо отметить, что рецепторы СА с α -2,6 связью к галактозе, с которыми преимущественно взаимодействует сезонный ВГ, располагаются как в верхних, так и в нижних отделах дыхательного тракта людей, тогда как рецепторы СА с α -2,3 связью к галактозе, к которым адаптирован в/пат ВГП А/Н5N1, располагаются в основном в легких [252, 279, 382, 434]. В этой связи вероятность инфицирования людей в/пат ВГП А/Н5N1 через верхний отдел дыхательного тракта и трахею при реализации контактного механизма передачи и аэрозольного крайне низка. Заражение же человека этим патогеном может произойти в основном воздушно-капельным путем, причем за счет мелкодисперсного аэрозоля, который достаточно эффективно задерживается в легких. Тогда как инфици-

рование людей сезонным ВГ осуществляется при его попадании в любой из органов респираторного тракта в процессе реализации как контактного, так и аэрозольного механизмов передачи.

Вероятно, вышеперечисленные аргументы в определенном смысле объясняют отсутствие до настоящего времени эпидемий, вызванных в/пат ВГП субтипа А/Н5N1.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* с использованием первичной культуры клеток легких человека был зарегистрирован факт размножения в/пат ВГП А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005), сезонного ВГ А/Н1N1 (штамм А/Novosibirsk/1/2009) и адаптированного к мышам ВГ А/Н3N2 (штамм А/Aichi/2/68). С учетом данных по CID_{50} ВГ, полученных в экспериментах на СПККЛ людей, а также известных из научной литературы значений CID_{50} и ID_{50} , полученных на мышинной СПККЛ и при аэрозольном заражении мышей соответственно, определены прогнозные величины чувствительности людей к четырем штаммам ВГ:

- для штаммов А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 и А/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 $ID_{50} = -2,5 (-2,9...-2,1)$ и $-2,4 (-2,8...-2,0)$ lg ЭИД₅₀ соответственно;
- для штамма А/Novosibirsk/1/2009 ВГ А/Н1N1 $ID_{50} = -1,2 (-1,6...-0,8)$ lg ЭИД₅₀;
- для штамма А/Aichi/2/68 ВГ А/Н3N2 $ID_{50} = -0,3 (-0,7...0,1)$ lg ЭИД₅₀.

В экспериментах на СПККЛ людей определены величины урожайности четырех штаммов ВГ через 18 часов их культивирования:

- для штамма А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 – $1,1 (0,6...1,6)$ lg ЭИД₅₀/кл.;
- для штамма А/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 – $1,0 (0,5...1,5)$ lg ЭИД₅₀/кл.;
- для штамма А/Novosibirsk/1/2009 ВГ А/Н1N1 – $2,1 (1,6...2,6)$ lg ЭИД₅₀/кл.;
- для штамма А/Aichi/2/68 ВГ А/Н3N2 – $1,9 (1,5...2,3)$ lg ЭИД₅₀/кл.

5.1.2 Оценка 50 %-х инфицирующих доз вируса для подопытных животных при респираторном заражении

В настоящее время при проведении исследований по оценке эффективности противогриппозных препаратов многие зарубежные ученые использовали штаммы в/пат ВГП А/Н5N1, выделенные на территории своих стран. С целью выбора штамма этого вируса (для подобных исследований), актуального для России, был проведен скрининг

по вирулентности в отношении кур генетической линии Род-Айленд восьми штаммов в/пат ВГП А/Н5N1, которые были изолированы в нашей стране во время эпизоотии среди домашней птицы в 2005 г.

На первом этапе были проведены сравнительные исследования чувствительности кур массой 250–350 г к различным штаммам в/пат ВГП А/Н5N1 при и/н и аэрогенном заражении, создавая аэрозоль с медианно-массовым аэродинамическим диаметром частиц 1,1 мкм. Результаты таких исследований отражены в таблице 5.5.

При этом было отмечено, что через 3–5 суток п.и. у части животных появлялись некоторые клинические признаки заболевания (сниженная двигательная активность, нарушение походки, уменьшение частоты вокализации, цианоз и отек головы, отек задних конечностей, пятнистость и бледность голеней и другие) и летальный эффект. Показатели LD_{50} для этих штаммов в/пат ВГП, полученные при аэрозольном инфицировании кур, достоверно не различались и находились в пределах от 0,3 до 1,2 lg ЭИД₅₀ и не было отмечено так же значимых различий между данными штаммами по значениям LD_{50} , полученным при и/н заражении кур, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двустороннего z-критерия). В то же время чувствительность этой птицы ко всем испытанным штаммам вируса при аэрозольном инфицировании была существенно выше, чем таковая при и/н. При этом различия между величинами LD_{50} , полученными при этих способах введения вирусного материала, составляли 1,3–2,5 lg.

В дальнейшем было проведено в трех повторах сравнительное определение величин LD_{50} в/пат ВГП А/Н5N1 (на примере штамма A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) при инфицировании кур пятью различными способами: внутривенный, и/н, аэрозольный, оральный и интрагастральный (таблица 5.6).

Через 1–5 суток п.и. у заболевших животных появлялись некоторые клинические признаки заболевания (сниженная двигательная активность, нарушение походки, уменьшение нормальной вокализации, цианоз и отек головы, отек задних конечностей, пятнистость и бледность голеней и другие) и летальный эффект. Причем вирус проявлял существенно большую вирулентность для кур при его введении внутривенным способом по сравнению со всеми остальными. В то же время инфицирование кур через респираторный тракт (аэрозольным и и/н способами) было существенно эффективнее, чем оральным (в ~1000 и ~15 соответственно) и интрагастральным (в ~15000 и ~300 раз соответственно), $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двустороннего z-критерия).

Таблица 5.5 – Данные по вирулентности восьми штаммов высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 для кур генетической линии Род-Айленд при интраназальном (и/н) и аэрозольном (а/з) заражении

Наименование штаммов ВГП А/Н5N1	IVPI, n=10	LD ₅₀ ВГП при а/з заражении кур в lg ЭИД ₅₀ , М (I ₉₅) для n=4	LD ₅₀ ВГП при и/н за- ражении кур в lg ЭИД ₅₀ , М (I ₉₅) для n=4
A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005	2,7	1,0 (0,6...1,4)	2,3 (1,8...2,8)
A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005	2,7	1,0 (0,5...1,5)	2,7 (2,2...3,2)
A/Chicken/Krasnodar/02/2006	3,0	1,2 (0,7...1,7)	2,7 (2,2...3,2)
A/Chicken/Dagestan/2006	3,0	0,3 (-0,3...0,9)	2,8 (2,1...3,5)
A/Chicken/Omsk/2006	3,0	1,0 (0,6...1,4)	3,1 (2,4...3,8)
A/Chicken/Crimea/04/2005	2,8	0,8 (0,3...1,3)	2,5 (1,9...3,1)
A/Chicken/Kurgan/05/2005	3,0	0,9 (0,5...1,3)	2,2 (1,7...2,7)
A/Duck/Kurgan/08/2005	3,0	0,8 (0,4...1,2)	2,9 (2,4...3,4)
<p>Примечания</p> <p>М – средняя величина</p> <p>n – количество животных, взятое на разведение вируса</p> <p>I₉₅ - доверительный интервал М с заданной вероятностью 95 %</p> <p>LD₅₀ – 50 %-я летальная доза</p> <p>IVPI – величины внутривенного индекса патогенности для кур были заимствованы из паспортов на штаммы высокопатогенного ВГП А/Н5N1</p>			

Это обстоятельство свидетельствует о более высокой чувствительности к в/пат ВГП А/Н5N1 респираторных органов кур по сравнению с их желудочно-кишечным трактом. Причем аэрозольный способ заражения птицы существенно превосходил и/н по своей эффективности инфицирования (в ~30 раз). С использованием штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 был проведен эксперимент с целью выявления клинических признаков болезни у пяти домашних гусей генетической линии А. anser при и/н их инфицировании 5,5 lg ЭИД₅₀. При этом длительное наблюдение за такой птицей (30 суток) показало отсутствие какой-либо симптоматики заболевания.

Таблица 5.6 – Данные по вирулентности штамма A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 при разных способах заражения кур генетической линии Род-Айленд

№ п/п	Способ заражения	Объем инокулята в мл	LD ₅₀ ВГП в lg ЭИД ₅₀ , М (I ₉₅) для n=3
1	Внутривенный	0,2	0,0 (-0,4...0,4)
2	Аэрозольный	< 0,000001	1,0 (0,5...1,5)
3	Интраназальный	0,02	2,7 (2,2...3,2)
4	Оральный	0,1	3,9 * (3,5...4,3)
5	Интрагастральный	0,1	5,2 * (4,8...5,6)
Примечания М – средняя величина n – количество экспериментов I ₉₅ - доверительный интервал М с заданной вероятностью 95 % * Величина выше, чем при интраназальном, аэрозольном и внутривенном способах заражения, $p < 0,05$ (при сравнении с помощью двустороннего z-критерия) LD ₅₀ – 50 %-я летальная доза			

Результаты экспериментов на курах свидетельствуют об одинаково высокой вирулентности к ним всех исследованных штаммов в/пат ВГП А/Н5N1, что не дает возможности выбрать из них наиболее вирулентный. В дальнейшем были проведены исследования на 18–22-суточных аутбредных мышах ICR по оценке их чувствительности к 8 штаммам этого вируса при и/н и аэрозольном заражении. При этом, кроме оценки значений LD₅₀ вируса, у этих животных в некоторых случаях проводили и определение величин ID₅₀ при аэрозольном инфицировании, ориентируясь на регистрацию инфекционного процесса в ткани легких спустя 5 суток п.и. Результаты таких исследований отражены в таблице 5.7.

Через 5–10 суток после и/н и аэрозольного заражения у заболевших животных регистрировали ряд клинических признаков заболевания (взъерошенность шерсти, сниженная двигательная активность, конъюнктивит, нарушение координации движения) и летальный эффект.

Таблица 5.7 – Данные по вирулентности восьми штаммов высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 для аутобредных мышей ICR при интраназальном (и/н) и аэрозольном (а/з) заражения

Наименование штаммов ВГП А/Н5N1	ID ₅₀ ВГП при а/з заражении, lg ЭИД ₅₀ , М (I ₉₅) для n=8	LD ₅₀ ВГП при а/з заражении, lg ЭИД ₅₀ , М (I ₉₅) для n=8	LD ₅₀ ВГП при и/н заражении, lg ЭИД ₅₀ , М (I ₉₅) для n ₃ =3
A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005	1,9 * (1,3...2,5)	> 5,0	6,6 (5,9...7,3)
A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005	4,3 (3,7...4,9)	4,9 (4,4...5,4)	6,7 (6,0...7,4)
A/Chicken/Kurgan/05/2005	Н.д.	Н.д.	1,1 (0,8...1,4)
A/Duck/Kurgan/08/2005	2,3 (2,3...2,3)	3,8 (3,2...4,4)	4,2 (3,8...4,6)
A/Chicken/Crimea/04/2005	-0,7 (-0,7...-0,7)	-0,7 (-0,7...-0,7)	1,3 (1,0...1,6)
A/Chicken/Omsk/2006	Н.д.	Н.д.	2,2 (1,9...2,5)
A/Chicken/Krasnodar/02/2006	0,7 (-0,3...1,7)	1,3 (1,2...1,4)	1,7 (1,4...2,0)
A/Chicken/Dagestan/2006	0,9 (0,9...0,9)	1,8 (1,1...2,5)	2,7 (2,2...3,2)
<p>Примечания</p> <p>М – средняя величина</p> <p>n – количество животных, взятое на разведение вируса</p> <p>n₃ – количество экспериментов</p> <p>I₉₅ - - доверительный интервал М с заданной вероятностью 95 %</p> <p>LD₅₀ – 50 %-я летальная доза</p> <p>ID₅₀ – 50 %-я инфицирующая доза вируса, рассчитанная по его наличию в легких у мышей спустя 5 суток после заражения</p> <p>Н.д. – не делали</p>			

Проведенный корреляционный анализ взаимосвязи между величинами LD₅₀ (таблица 5.7), полученными при и/н и аэрозольном инфицировании животных, свидетельствовал о высокой степени корреляции между этими данными (коэффициент корреляции – $r = 0,94$). Кроме того, наблюдали существенные различия по летальной активности разных штаммов в/пат ВГП А/Н5N1 при респираторном заражении мышей. Большинство

исследованных штаммов в/пат ВГП (5 из 6) обладало близкой вирулентностью (A/Duck/Kurgan/08/2005 и A/Chicken/Dagestan/2006) или большей (A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005, A/Chicken/Crimea/04/2005 и A/Chicken/Krasnodar/02/2006) при аэрозольном инфицировании мышей, чем при и/н, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двустороннего z-критерия). При этом значения LD_{50} , полученные при этих способах инфицирования были выше, чем таковые ID_{50} , определенные при аэрозольном заражении для штаммов A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005, A/Duck/Kurgan/08/2005 и A/Chicken/Dagestan/2006, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двустороннего z-критерия).

По величинам данного показателя все исследованные штаммы были разделены на 3 группы (таблица 5.8).

Таблица 5.8 – Данные по групповой принадлежности российских штаммов высокопатогенного вируса гриппа птиц (в/пат ВГП) А/Н5N1 в зависимости от их вирулентности для аутбредных мышей ICR при интраназальном и аэрозольном инфицировании

Наименование штаммов в/пат ВГП А/Н5N1, разделенных по LD_{50} для мышей:		
$< 3,0 \lg ЭИД_{50}^*$	$3,0-4,5 \lg ЭИД_{50}^{**}$	$> 4,5 \lg ЭИД_{50}^{***}$
A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Chicken/Crimea/04/2005, A/Chicken/Omsk/2006, A/Chicken/Krasnodar/02/2006, A/Chicken/Dagestan/2006	A/Duck/Kurgan/08/2005	A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005, A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005
Примечание LD_{50} – 50 %-я летальная доза * Величина, соответствующая высокой степени вирулентности вируса для мышей ** Величина, соответствующая средней степени вирулентности вируса для мышей *** Величина, соответствующая низкой степени вирулентности вируса для мышей		

Основываясь на данных оценки LD_{50} различных штаммов в/пат ВГП А/Н5N1, полученных при и/н заражении аутбредных мышах ICR, для дальнейших исследований с использованием этого вида животных нами был выбран российский штамм

A/Chicken/Kurgan/05/2005 этого вируса, обладающий наиболее высокой летальной активностью и относящийся к группе высоковирулентных штаммов.

В своих экспериментальных исследованиях на курах ученые, как правило, приводили данные, связанные в основном с и/н, внутривенным и оральным способами заражения в/пат ВГП А/Н5N1 [123, 338, 407]. Причем эти данные для в/пат штаммов этого вируса практически совпадали с результатами, полученными нами.

Для выяснения степени чувствительности к этому патогену респираторного и желудочно-кишечного трактов кур в нашей работе дополнительно были применены и другие способы их инфицирования: интрагастральный и аэрозольный. Все использованные в работе штаммы ВГП, относящиеся к в/пат, проявляли достоверно не различающуюся высокую вирулентность для кур при аэрозольном заражении, несмотря на то, что их источники выделения различались по виду сельскохозяйственной птицы (курица, утка и индейка). Соответственно, штаммы в/пат ВГП А/Н5N1, выделенные от уток и индеек, могут потенциально вызывать серьезные эпизоотии и среди кур, что находится в согласии с данными других ученых [406, 407].

В то же время произведенная нами попытка и/н инфицирования домашних гусей штаммом A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 дозой 5,5 lg ЭИД₅₀ не привела к появлению у них каких-либо видимых признаков заболевания, а тем более к летальному исходу. В этом плане практически аналогичные результаты были получены другими исследователями с использованием пяти в/пат штаммов этого вируса, причем выделенных не только от птиц (кур, уток и гусей), но и от умершего человека [138]. Однако некоторые штаммы в/пат ВГП А/Н5N1 при заражении 3–4-недельных гусей комбинированным способом (и/н, интратрахеально, перорально и интраконъюнктивально), так же как в предыдущем исследовании, но большей дозой (6,5 lg ЭИД₅₀), вызывали некоторые клинические признаки заболевания у этой птицы, включая потерю веса, диарею, снижение активности и гибель [139, 283].

Сравнительные эксперименты на курах с их заражением разными методами показали более высокую чувствительность к в/пат ВГП А/Н5N1 респираторного тракта этих животных по сравнению с таковой желудочно-кишечного тракта, что в определенном смысле противоречит общеизвестному представлению о фекально-оральном механизме передачи гриппа птиц среди кур [198, 207, 338]. Кроме того, с учетом данных оценки вирулентности вируса, введенного орально и интрагастрально, отмечена в 20 раз боль-

шая чувствительность к патогену верхнего отдела желудочно-кишечного тракта кур (слизистая ротовой полости), чем нижнего. Эти кажущиеся противоречия объясняются следующими двумя обстоятельствами. Во-первых, существующими в норме у кур анатомическими особенностями неба, отделяющего ротовую полость от носовой, которое имеет щель практически от ноздрей до глотки (рисунок 5.1). Поэтому продукты питания (в том числе и вирусный материал), поступившие в ротовую полость этих животных, имеют тесный контакт и со слизистой оболочкой носа. Во-вторых, в экспериментах по и/н заражению кур нами было показано более раннее размножение в/пат ВГП А/Н5N1 в респираторном тракте этих животных (слизистая носовой полости) по сравнению с органами желудочно-кишечного тракта (таблицы 5.9 и 5.10), несмотря на то, что вирусосодержащая суспензия, вводимая и/н, несомненно, попадала и в пищеварительный тракт кур. Совокупность вышеперечисленных обстоятельств свидетельствует о том, что в/пат ВГП А/Н5N1, попавший с продуктами питания в ротовую полость кур, с высокой вероятностью первично инфицирует птицу через слизистую носовой полости. А это, в свою очередь, дает основание утверждать о существовании фекально-назального механизма передачи инфекции среди кур.

Сравнивая два способа респираторного инфицирования животных, обращает на себя внимание более высокая эффективность заражения птицы аэрозольным способом (в ~30 раз) по сравнению с и/н. Это обстоятельство, скорее всего, связано с тем, что при и/н заражении использовали существенно больший объем единовременно вводимого курам вирусного материала (более чем в 50000 раз, таблица 5.5) по сравнению с длительным (в течение 10 минут) аэрозольным их инфицированием. В связи с этим используемый при заражении кур мелкий аэрозоль (ММАД частиц – 1,1 мкм) вирусосодержащего материала с большей эффективностью распределялся (аплицировался) по их респираторному тракту, чем таковой при и/н заражении, при котором основная часть материала через щель в небе попадала на слизистую ротовой полости (пищеварительный тракт), обладающей существенно меньшей чувствительностью к в/пат ВГП А/Н5N1.

Известно, что некоторые штаммы в/пат ВГП А/Н5N1, выделенные как от птиц, так и от людей, при экспериментальном инфицировании мышей без предварительной адаптации либо вызывают заболевание, либо инфекционный процесс, носящий бессимптомный характер [91, 123, 177]. Нами так же было отмечено, что чувствительность мышей (по величине LD₅₀) к использованным в работе штаммам в/пат ВГП А/Н5N1 при

респираторном заражении так же существенно различалась, тогда как все штаммы между собой проявляли одинаково высокую вирулентность для кур при внутривенном, и/н и аэрозольном заражении.



Рисунок 5.1 – Верхняя стенка ротовой полости курицы генетической линии Род-Айленд: наличие анатомической особенности – щелеобразное отверстие между носовой и ротовой полостями через щель в верхнем небе, проходящую от ноздрей до глотки

Зарегистрированный коэффициент высокой степени корреляции между показателями летальной активности штаммов, полученными при и/н и аэрозольном инфицировании мышей, и близкие их значения свидетельствуют, вероятно, о существенном сходстве механизмов течения инфекционного процесса у животных данного вида при данных способах заражения. Отчетливый тропизм в/пат ВГП А/Н5N1 к легким мышей отмечался во многих опубликованных работах, посвященных этому патогену [91, 177, 452].

Таким образом, все изученные штаммы в/пат ВГП А/Н5N1, выделенные от птицы на территории России, проявляют высокую достоверно не различающуюся между собой вирулентность для кур генетической линии Род-Айленд: LD₅₀ от 0,3 до 1,2 lg ЭИД₅₀ при аэрозольном заражении и от 2,2 до 3,1 lg ЭИД₅₀ при интраназальном. При данном способе заражения чувствительность этих животных к в/пат ВГП (штамм

A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) в ~30 раз выше, чем при и/н, в ~500 раз выше, чем при оральном, и в ~10000 раз выше, чем при интрагастральном, что свидетельствует о более высокой восприимчивости к данному патогену респираторных органов кур по сравнению с их желудочно-кишечным трактом. Предполагается возможность существования фекально-назального механизма передачи в/пат ВГП А/Н5N1 у кур. Домашние гуси генетической линии *A. anser*, и/н инфицированные дозой 5,5 lg ЭИД₅₀ штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 этого вируса не проявляли какой-либо клинической картины заболевания.

Все исследованные штаммы в/пат ВГП А/Н5N1 по летальной активности для аутбредных мышей ICR при и/н (в некоторых случаях и аэрозольном) заражении могут быть разделены на три группы: высоковирулентные (LD₅₀ < 3,0 lg ЭИД₅₀) - A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Chicken/Crimea/04/2005, A/Chicken/Omsk/06, A/Chicken/Krasnodar/02/2006, A/Chicken/Dagestan/2006; средней степени вирулентности (LD₅₀ от 3,0 до 4,5 lg ЭИД₅₀) - A/Duck/Kurgan/08/2005; авирулентные (LD₅₀ > 4,5 lg ЭИД₅₀) - A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005. При этом через 5–10 суток после респираторного заражения летальными дозами у этих животных регистрировали ряд клинических признаков заболевания (взъерошенность шерсти, сниженная двигательная активность, конъюнктивит, нарушение координации движения) и гибель.

5.2 Диссеминация высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5N1 в организме кур генетической линии Род-Айланд, гусей генетической линии *A. anser* и аутбредных мышей ICR

5.2.1 Распространение вируса в организме кур и гусей

Для проведения дальнейших основных исследований на курах генетической линии Род-Айленд были выбраны два штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в/пат ВГП А/Н5N1, выделенные от кур на территории России и относящиеся соответственно к группам высоковирулентных и авирулентных штаммов по летальной активности для аутбредных мышей ICR при и/н инфицировании.

В первой серии экспериментов было проведено изучение динамики накопления в/пат ВГП А/Н5N1 в организме кур с использованием штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005, которым и/н инфицировали этих животных в дозе 3,2 lg

ЭИД₅₀ (10 LD₅₀ для кур при данном способе заражения). Результаты таких исследований отражены в таблице 5.9.

Таблица 5.9 – Данные по накоплению высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) в биоматериалах* от кур генетической линии Род-Айленд, интраназально зараженных 3,2 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)

№ п/п	Вид биоматериала	Концентрация ВГП в lg ЭИД ₅₀ /мл, М (I ₉₅) для n=3, в биоматериалах от кур через разные временные промежутки после инфицирования:				
		1 час	18 часов	30 часов	42 часа	54 часа
1	Стенки носовой полости со слизистой	< 0,2	0,4 (-0,2...1,0)	1,6 (1,2...2,0)	3,2 (2,6...3,8)	5,8 ** (5,6...6,0)
2	Трахея	< 0,2	< 0,2	< 0,2	1,5 (0,9...2,1)	3,7 ** (3,3...4,1)
3	Легкие	< 0,2	< 0,2	1,4 (0,8...2,0)	4,0 (3,4...4,6)	7,8 ** (7,2...8,4)
4	Клоака	< 0,2	< 0,2	1,1 (0,7...1,5)	2,2 (1,5...2,9)	6,4 ** (5,8...7,0)
5	Сыворотка крови	< 0,2	< 0,2	0,7 (0,3...1,1)	1,5 (1,0...2,0)	7,2 ** (6,8...7,6)
6	Почка	< 0,2	< 0,2	< 0,2	4,3 (3,7...4,9)	7,1 ** (6,5...7,7)
7	Кишечник	< 0,2	< 0,2	< 0,2	2,0 (1,4...2,6)	6,1 ** (5,7...6,5)
8	Печень	< 0,2	< 0,2	< 0,2	3,3 (2,9...3,7)	6,0 ** (5,4...6,6)
9	Селезенка	< 0,2	< 0,2	< 0,2	4,2 (3,7...4,7)	5,8 ** (5,4...6,2)
10	Головной мозг	< 0,2	< 0,2	< 0,2	3,7 (3,3...4,1)	5,7 ** (5,2...6,2)
11	Желудок	< 0,2	< 0,2	< 0,2	2,5 (1,9...3,1)	5,5 ** (5,1...5,9)

Продолжение таблицы 5.9

№ п/п	Вид биоматериала	Концентрация ВГП в lg ЭИД ₅₀ /мл, М (I ₉₅) для n=3, в биоматериалах от кур через разные временные промежутки после инфицирования:				
		1 час	18 часов	30 часов	42 часа	54 часа
12	Поперечнополосатая мышечная ткань	< 0,2	< 0,2	< 0,2	1,9 (1,3...2,5)	4,7 ** (4,3...5,1)
13	Пищевод	< 0,2	< 0,2	< 0,2	2,0 (1,4...2,6)	3,6 ** (3,1...4,1)
14	Поджелудочная железа	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	0,6 (0,2...1,0)
<p>Примечания</p> <p>М – средняя величина</p> <p>n – количество животных, использованных в временной точке</p> <p>I₉₅ - доверительный интервал М с заданной вероятностью 95 %</p> <p>LD₅₀ – 50 %-я летальная доза для кур</p> <p>< 0,2 - значение ниже порога чувствительности (0,2 lg ЭИД₅₀/мл) примененного метода титрования</p> <p>* Ткани и органы в составе гомогенатов (10 %-е по объему) и сыворотка крови</p> <p>** Значение выше такового соответствующего биоматериала через 42 часа после заражения, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двусторонних t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни)</p>						

Отмечено, что первичной тканью-мишенью для размножения в/пат ВГП в организме и/н зараженных кур являлась слизистая носовой полости, где возбудитель заболевания появился через 18 часов п.и. и достигал максимальной концентрации к 54 часам п.и. (5,8 lg ЭИД₅₀/мл). Позднее (через 30 часов п.и.) патоген начинал регистрироваться в легких, клоаке и сыворотке крови, размножаясь к 54 часам п.и. до высоких концентраций. Причем в легких в этот период наблюдалось самое высокое накопление вируса (7,8 lg ЭИД₅₀/мл) по сравнению с таковым во многих других органах кур. Затем (через 42 часа п.и.) в/пат ВГП обнаруживался практически во всех остальных изучаемых органах и тканях (кроме поджелудочной железы). При этом самых высоких концентраций вирус

достигал в этих органах и тканях (почки, кишечник, печень, селезенка, головной мозг, желудок, поперечнополосатая мышечная ткань, трахея, пищевод) так же к 54 часам п.и. Обращает на себя внимание и то обстоятельство, что в момент времени максимального накопления вируса по всем изучаемым органам и тканям выделялись три биологические пробы (легкие, почки и сыворотка крови), в которых уровни концентрации патогена превосходили $7,0 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$.

Аналогичные исследования по изучению динамики накопления в/пат ВГП A/H5N1 в некоторых органах (респираторного и желудочно-кишечного тракта) и сыворотке крови кур были выполнены и на штамме A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005, обладающим в отличие от штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 существенно меньшей летальной активностью для мышей при и/н инфицировании. Результаты таких исследований после проведенного и/н введения курам данного штамма в дозе $3,2 \lg \text{ЭИД}_{50}$ (3LD_{50} для кур при данном способе заражения) представлены в таблице 5.10.

Показано, что первичной тканью-мишенью для размножения вируса являлась слизистая носовой полости, в которой его концентрация достигала максимальной величины к 36 часам п.и., и возбудитель заболевания практически исчезал к 60 часам п.и. Через 36 часов п.и. патоген так же обнаруживался во многих исследованных органах животных как нижнего отдела дыхательного тракта (в большей степени в трахее, чем в легких), так и желудочно-кишечного, достигая максимальных значений к 60 часам п.и. в легких и органах пищеварительного тракта.

На следующем этапе нами были проведены исследования, связанные с изучением возможности использования метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для определения динамики накопления в/пат ВГП A/H5N1 во внутренних органах и/н инфицированных кур. Результаты сравнительного определения концентраций штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 этого вируса и его РНК соответственно путем титрования на куриных эмбрионах и с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени в гомогенатах органов и тканей, а также сыворотке крови и/н зараженных кур представлены в таблице 5.11.

Корреляционный анализ значений показателей концентраций жизнеспособного вируса и его РНК (таблица 5.11), свидетельствует о высокой степени зависимости между ними (коэффициент корреляции $r = 0,92$).

Таблица 5.10 – Данные по накоплению высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) в биоматериалах* от кур генетической линии Род-Айленд при интраназальном заражении $3,2 \lg \text{ЭИД}_{50}$ (3 LD_{50})

Вид биоматериала	Концентрация ВГП в $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, М (I_{95}) для n=3, в биоматериалах от кур через разные временные промежутки после инфицирования:			
	12 часов	24 часа	36 часов	60 часов
Сыворотка крови	< 0,2	< 0,2	2,5 (1,9...3,1)	< 0,2
Стенки носовой полости со слизистой	< 0,2	4,5 (3,9...5,1)	5,0 (4,3...5,7)	< 0,2
Трахея	< 0,2	< 0,2	3,0 (2,4...3,6)	< 0,2
Легкие	< 0,2	< 0,2	1,8 (1,3...2,3)	5,8 ** (5,2...6,4)
Пищевод	< 0,2	< 0,2	< 0,2	3,5 (2,9...4,1)
Желудок	< 0,2	< 0,2	3,5 (2,9...4,1)	4,5 ** (3,8...5,2)
Кишечник	< 0,2	< 0,2	1,8 (1,4...2,2)	3,5 ** (2,9...4,1)
<p>Примечания</p> <p>М – средняя величина</p> <p>n – количество животных, использованных в временной точке</p> <p>I_{95} - доверительный интервал М с заданной вероятностью 95 %</p> <p>LD_{50} – 50 %-я летальная доза для кур</p> <p>< 0,2 - значение ниже порога чувствительности ($0,2 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$) примененного метода титрования</p> <p>* Ткани и органы в составе гомогенатов (10 %-е по объему) и сыворотка крови</p> <p>** Значение выше таковой соответствующего биоматериала через 36 часов после заражения, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью по двусторонних t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни)</p>				

Таблица 5.11 – Данные по концентрациям штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) A/H5N1 и его рибонуклеиновых кислот (РНК) в биоматериалах* от интраназально инфицированных кур генетической линии Род-Айленд дозой 3,2 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)

Вид биоматериала (время после заражения, часы)	Концентрация ВГП при титровании на КЭ (lg ЭИД ₅₀ /мл)	Концентрация РНК ВГП в ОТ-ПЦР (lg копий РНК/мл)
Стенки носовой полости со слизистой (42)	3,7	3,8
Стенки носовой полости со слизистой (54)	6,3	6,2
Легкие (30)	1,2	4,0
Легкие (54)	7,2	6,5
Трахея (54)	4,3	5,2
Сыворотка крови (54)	7,2	7,2
Мозг (42)	3,7	4,8
Мышца (42)	1,8	3,2
Мышца (54)	4,8	5,8
Кишечник (42)	2,2	2,0
Кишечник (54)	6,3	6,0
Селезенка (54)	5,9	6,1
Желудок (54)	5,8	6,2
Примечание LD ₅₀ – 50 %-я летальная доза для кур ОТ-ПЦР - обратнo транскриптазная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени КЭ – куриные эмбрионы * Ткани и органы в составе гомогенатов (10 %-е по объему) и сыворотка крови		

Дополнительно были проведено изучение диссеминации штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 ВГП A/H5N1 по органам, тканям и сыворотке крови домашних гусей генетической линии A. anser при и/н заражении дозой 5,5 lg ЭИД₅₀. Результаты таких исследований отражены в таблице 5.12.

Таблица 5.12 – Данные по накоплению высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) в биоматериалах* от домашних гусей генетической линии А. anser, интраназально зараженных 5,5 lg ЭИД₅₀

Вид биоматериала	Концентрация ВГП в lg ЭИД ₅₀ /мл, М (I ₉₅) для n=3, в биоматериалах от гусей через разные временные промежутки после инфицирования:				
	3 суток	5 суток	7 суток	10 суток	15 суток
Легкие	< 0,2	< 0,2	< 0,2	2,5 (2,1...2,9)	< 0,2
Стенки носовой полости со слизистой	2,1 (1,5...2,7)	1,7 (1,1...2,3)	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Трахея	Н.д.	Н.д.	< 0,2	< 0,2	Н.д.
Почки	<0,2	<0,2	0,8 (0,4...1,2)	4,0 ** (3,4...4,6)	< 0,2
Сыворотка крови	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Кишечник	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Клоака	< 0,2	< 0,2	< 0,2	2,3 (1,7...2,9)	< 0,2
Исπραжнения	< 0,2	< 0,2	< 0,2	Н.д.	Н.д.
Головной мозг	2,3 (1,7...2,9)	1,3 (0,9...1,7)	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Поджелудочная железа	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Селезенка	< 0,2	< 0,2	< 0,2	2,5 (2,1...2,9)	< 0,2
Лимфоузел	< 0,2	< 0,2	< 0,2	Н.д.	Н.д.
<p>Примечания</p> <p>М – средняя величина</p> <p>n – количество животных, использованных в временной точке</p> <p>I₉₅ - доверительный интервал М с заданной вероятностью 95 %</p> <p>< 0,2 - значение ниже порога чувствительности (0,2 lg ЭИД₅₀/мл) примененного метода титрования</p> <p>* Ткани и органы в составе гомогенатов (10 %-е по объему) и сыворотка крови</p> <p>** Значение выше такового через 7 суток после заражения, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью по двусторонних t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни)</p>					

Из данных таблицы видно, что через 3 суток п.и. у гусей вирус обнаруживался в низкой концентрации лишь в двух тканях (в слизистой носовой полости и головном мозге) и исчезал из них спустя 7 суток п.и., вновь появившись только в почках. Через 10 суток п.и. вирус регистрировали в четырех органах (легкие, почки, клоака и селезенка), причем наиболее высокая его концентрация наблюдалась в почках гусей. К 15-м суткам п.и. данный патоген не был обнаружен ни в одном из органов этой птицы.

Наши результаты исследований (таблицы 5.9 и 5.10), выполненные на курах с использованием двух штаммов A/Chicken/Kurgan/05/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в/пат ВГП А/Н5N1, обладающих соответственно высокой и низкой вирулентностью для мышей при и/н инфицировании по показателю летальности, продемонстрировали, что при и/н заражении такой птицы первичной тканью-мишенью для этого вируса является слизистая носовой полости. Появление вируса одновременно через 30 часов п.и. в крови, легких и клоаке свидетельствовало о том, что его проникновение в эти органы происходило, скорее всего, гематогенным путем из слизистой носа, например через фенестрированный эндотелий кровеносных сосудов обонятельной области. Более позднее выявление штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 в трахее, чем в легких, подтвердило так же это предположение и продемонстрировало низкий уровень вероятности существования нисходящего пути распространения этого патогена от слизистой носа к трахее и легким.

В то же время в экспериментах со штаммом A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 у кур наблюдалось более позднее (на 12 часов), чем в носовой полости, одновременное появление вируса и в трахее, и в легких, причем в первом органе концентрация вируса была значительно выше таковой во втором. Данное обстоятельство не исключает наличия не только гематогенного пути распространения вируса в организме кур, но и все же нисходящего пути инфицирования дыхательного тракта. Накопление вируса в респираторных органах кур, вероятно, происходило за счет его размножения в эпителиоцитах [164, 367].

Высокая чувствительность слизистой клоаки к вирусу была отмечена и другими исследователями [336], которые предполагали наличие клоакального пути заражения кур от инфицированных фекалий или перьев этих или иных видов птиц [117, 346]. По сравнению со всеми другими исследованными органами более выраженное накопление вируса у кур отмечалось в легких (7,8 lg ЭИД₅₀/мл гомогената) через 54 часа п.и. Это об-

стоятельство в сочетании с высокой чувствительностью органов респираторного тракта этих животных к в/пат ВГП А/Н5N1 (п. 5.1.2) может явиться важным аргументом, свидетельствующим о существовании аэрозольного механизма передачи гриппа птиц (А/Н5N1) среди кур, что подтверждает соответствующее предположение других исследователей [406, 428].

К моменту гибели кур (через 54 часа п.и.) в некоторых органах их пищеварительной системы (кишечник, печень, желудок) возбудитель заболевания накапливался до высоких концентраций (5,0–6,1 lg ЭИД₅₀/мл гомогенатов), где он размножался, вероятно, в эндотелиальных и эпителиальных клетках [164]. Вероятно, эти органы инфицированных кур являются одним из источников поступления вируса в каловые массы. Более высокий уровень репликации вируса в этот период отмечен в клоаке, которая несомненно добавляет в ее содержимое существенную порцию патогена. Но самые высокие концентрации возбудителя заболевания регистрировали в почках (7,1 lg ЭИД₅₀/мл гомогената), где он размножался, вероятно, в эпителиальных клетках [164], что дает основание считать, что основной вклад в обсеменение патогеном клоакального содержимого инфицированных кур вносит вирус, поступающий в клоаку с мочой. Наличие вируса в высоких концентрациях во многих исследованных биоматериалах от кур перед их гибелью, вероятно, может быть объяснено его массивным размножением в клетках эндотелия кровеносных капилляров и макрофагах, а также в клетках паренхимы тканей и органов этих животных [107, 164, 345]. Некоторые ученые даже обнаружили репродукцию в/пат ВГП А/Н5N1 в мышечных клетках кур [141]. В наших экспериментах с этим, возможно, связано его накопление в данном виде ткани (таблица 5.9).

В то же время в отличие от ряда исследователей [123, 345] нам не удалось подтвердить факт размножения в/пат ВГП А/Н5N1 в поджелудочной железе (отсутствие или крайне низкий уровень накопления патогена в этом органе через 30–54 часа п.и.).

В отличие от экспериментальных данных, полученных нами на курах при изучении динамики накопления в/пат ВГП А/Н5N1 в их организме, мы обнаружили менее масштабный, слабо текущий и более растянутый по времени инфекционный процесс у домашних гусей, и/н инфицированных штаммом А/Chicken/Kurgan/05/2005 этого вируса дозой 5,5 lg ЭИД₅₀. Другие же исследователи инфицирование гусей осуществляли дозой 6,0 lg ЭИД₅₀ комбинированным способом (и/н, интратрахеально, орально и интраконъюнктивально) с использованием пяти штаммов в/пат ВГП А/Н5N1, причем выделенных

не только от птиц (кур, уток и гусей), но и от умершего человека [138]. При этом были получены результаты, подобные нашим, свидетельствующие о длительном присутствии в относительно низких концентрациях вируса в единственно исследованных органах: клоака и трахея. Однако некоторые штаммы в/пат ВГП А/Н5N1 при заражении 3–4-недельных гусей аналогичным комбинированным способом, но большей дозой ($6,5 \lg \text{ЭИД}_{50}$), могли накапливаться в почках и легких в более высоких концентрациях ($4,3$ и $4,5 \lg \text{ЭИД}_{50}$ соответственно), чем те, которые наблюдали мы, а также в печени, головном мозге и селезенке [139]. Возможно, даже такое персистирующее пребывание вируса в организме гусей обеспечивает его выброс в окружающую среду через дыхательные и мочевыводящие пути.

Часто для идентификации вируса гриппа и определения контаминации им объектов внешней среды используются молекулярно-биологические методы, в частности коммерческие и лабораторные варианты тест-систем, основанные на ОТ-ПЦР и количественной ПЦР с регистрацией сигнала накопления продуктов амплификации в режиме реального времени [141, 202, 292]. Однако эти молекулярно-биологические реакции не позволяют оценить концентрацию жизнеспособного (инфекционного) вируса в отличие от способа определения количества ЭИД_{50} в исследуемом образце при титровании, например, на куриных эмбрионах. Тем не менее, некоторые исследователи [141, 202, 428] применяли эти варианты ПЦР для изучения также патогенеза гриппа птиц. Судя по результатам наших исследований по сравнительному изучению накопления в/пат ВГП А/Н5N1 в различных органах и сыворотке крови и/н инфицированных кур, регистрируемого двумя методами (путем титрования на куриных эмбрионах и ОТ-ПЦР в режиме реального времени) с получением высокой степени корреляции между данными, применение этого молекулярно-генетического метода вполне оправдано.

Таким образом, первичная ткань-мишень для размножения в/пат ВГП А/Н5N1 (штаммы A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 и A/Chicken/Kurgan/05/2005) у кур генетической линии Род-Айленд, и/н инфицированных дозами $3,2 \lg \text{ЭИД}_{50}$ (3 LD_{50}) и $3,2 \lg \text{ЭИД}_{50}$ (10 LD_{50}) соответственно, находится в респираторном тракте животных (слизистая носовой полости), репликация вируса в которой регистрировалась уже через 18 часов п.и. Вторая волна накопления патогена наблюдалась во многих органах и сыворотке крови кур и начиналась через 30–42 часа п.и. К моменту гибели животных (54 часа п.и.) концентрация вируса во всех исследованных пробах достигала максимальных значений. При этом наивысшие величины накопления вируса, превышающие $6 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, были

отмечены в легких, сыворотке крови, клоаке, почках и кишечнике животных. Подтверждается возможность существования фекально-назального механизма передачи в/пат ВГП А/Н5N1 у кур. При и/н заражении домашних гусей генетической линии *A. anser* в/пат ВГП А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) дозой 5,5 lg ЭИД₅₀ наблюдали относительно кратковременное его накопление в течение 10 суток п.и. лишь в шести органах (нос, легкие, головной мозг, клоака, почки и селезенка) в невысоких концентрациях с максимальным значением в пределе 2,3–4,0 lg ЭИД₅₀/мл.

5.2.2 Распространение вируса в организме мышей

Для проведения дальнейших основных исследований на аутбредных мышах ICR было взято три штамма А/Chicken/Kurgan/05/2005, А/Duck/Kurgan/08/2005 и А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в/пат ВГП А/Н5N1, выделенных от домашней птицы на территории России и отнесенных нами соответственно к разным группам по летальной активности для мышей при респираторном инфицировании: высоковирулентной, средней степени вирулентности и авирулентной.

В первой серии экспериментов было проведено изучение динамики накопления в организме мышей высоковирулентного для них штамма А/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 при и/н инфицировании дозой 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀ для этого же вида животных при данном способе заражения). Результаты исследований отражены в таблице 5.13.

Таблица 5.13 – Данные по накоплению высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) в биоматериалах** от аутбредных мышей ICR, интраназально зараженных дозой 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)

Вид биоматериала от мышей	Концентрация ВГП в lg ЭИД ₅₀ /мл, М (I ₉₅) для n=3, в биоматериалах от мышей через разные временные промежутки после инфицирования:					
	1 сутки	2 суток	3 суток	4 суток	5 суток	6 суток
Сыворотка крови	3,0 (2,3...3,7)	3,5 (2,8...4,2)	4,5 (3,8...5,2)	5,3 * (4,8...5,8)	4,3 (3,5...5,1)	4,7 (3,8...5,6)
Легкие	5,7 (5,2...6,2)	6,2 (5,6...6,8)	6,9 (6,1...7,7)	7,0 (7,0...7,0)*	7,4 * (6,9...7,9)	5,1 (4,3...5,9)
Носовая перегородка со слизистой	< 0,2	2,3 (1,7...2,8)	2,0 (1,4...2,6)	1,8 (1,3...2,3)	2,8 (2,3...3,3)	3,0 (2,3...3,7)

Продолжение таблицы 5.13

Вид биоматериала от мышей	Концентрация ВГП в lg ЭИД ₅₀ /мл, М (I ₉₅) для n=3, в биоматериалах от мышей через разные временные промежутки после инфицирования:					
	1 сутки	2 суток	3 суток	4 суток	5 суток	6 суток
Трахея	2,3 (1,8...2,8)	4,8 (4,3...5,3)	6,5 * (6,5...6,5)	5,8 * (5,2...6,4)	6,0 * (5,4...6,6)	4,8 (4,0...5,6)
Головной мозг	< 0,2	1,5 (0,7...2,3)	1,7 (0,9...2,5)	3,0 (2,3...3,7)	6,0 * (5,3...6,7)	5,7 * (4,9...6,5)
Селезенка	< 0,2	< 0,2	4,0 (4,0...4,0)	3,8 (3,3...4,3)	3,5 (2,9...4,1)	3,5 (2,9...4,1)
Мочевой пузырь	< 0,2	< 0,2	3,0 (2,3...3,7)	3,0 (2,3...3,7)	2,5 (1,8...3,2)	2,3 (1,8...2,8)
Почки	2,2 (1,5...2,9)	1,9 (1,4...2,4)	3,0 (2,5...3,5)	3,2 (2,6...3,8)	3,9 (3,4...4,4)	5,2 * (4,6...5,8)
Поперечно-полосатая мышеч. ткань	< 0,2	< 0,2	< 0,2	3,2 (2,6...3,8)	3,0 (2,3...3,7)	< 0,2
Печень	< 0,2	2,3 (1,8...2,8)	2,6 (2,0...3,2)	2,6 (1,7...3,5)	2,3 (1,8...2,8)	2,3 (1,8...2,8)
<p>Примечания</p> <p>М – средняя величина</p> <p>n – количество животных, использованных в временной точке</p> <p>I₉₅ - доверительный интервал М с заданной вероятностью 95 %</p> <p>LD₅₀ – 50 %-я летальная доза для мышей</p> <p>< 0,2 - значение ниже порога чувствительности (0,2 lg ЭИД₅₀/мл) примененного метода титрования</p> <p>* Значение выше такового соответствующего биоматериала спустя 2 или 3 суток после заражения, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью по двусторонних t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни)</p> <p>** Ткани и органы в составе гомогенатов (10 %-е по объему) и сыворотка крови</p>						

Из данных таблицы видно, что через 1 сутки п.и. вирус появился сразу в двух органах респираторного тракта (легкие и трахея), а также в почках и в сыворотке крови мышей. При этом в легких концентрация этого патогена была существенно выше (на $\geq 2,7$ lg), чем таковые в других органах. Только спустя 2 суток п.и. вирус стали дополнительно регистрировать и в верхнем отделе дыхательного тракта (в слизистой носа), а

также в головном мозге и печени. Через 3–4 суток п.и. накопление вируса наблюдали во всех исследованных органах. Наиболее высокие концентрации патогена, превышающие 5 lg ЭИД₅₀/мл, были определены в легких, трахее, головном мозге, почках и сыворотке крови мышей. Высокий уровень накопления вируса (4 lg ЭИД₅₀/мл) был зарегистрирован также в селезенке.

Чтобы понять, не связано ли более раннее появление вируса у мышей в органах нижнего отдела дыхательного тракта, чем верхнего, с попаданием большого его количества в легкие этих животных при использованном методе и/н их заражения, был проведен эксперимент по оценке процента аппликации в/пат ВГП А/Н5N1 в составе аллантоисной жидкости в легких с трахеей сразу после и/н введения мышам. Для этого пять животных инфицировали указанным способом в/пат ВГП А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 7,0 lg ЭИД₅₀ и сразу после заражения (в течение 5 мин) забирали у них легкие с трахеей, приготавливая 10 %-е гомогенаты.

Результаты титрования гомогенатов и вирусаллантоисной жидкости, используемой для заражения животных, показали, что количество вируса в легких с трахеей было 5,0 (4,7...5,3) lg ЭИД₅₀, то есть всего лишь 1 % от его количества, введенного и/н способом. Этот результат в сочетании с данными о более раннем появлении в/пат ВГП А/Н5N1 у и/н зараженных мышей в органах нижнего отдела дыхательного тракта, чем верхнего, вероятно, свидетельствует о более высокой чувствительности клеток нижнего отдела дыхательного тракта, чем верхнего.

Далее были проведены эксперименты по изучению динамики накопления в организме мышей среднего по степени вирулентности для них штамма А/Duck/Kurgan/08/2005 высокопатогенного ВГП А/Н5N1 при и/н инфицировании дозой 5,2 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀ для этого же вида животных при данном способе заражения). Результаты таких исследований представлены в таблице 5.14.

Из данных таблица видно, что через 1 сутки п.и. вирус появился только сразу в двух органах респираторного тракта (легкие и трахея), а также в почках и в сыворотке крови мышей. При этом в легких концентрация этого патогена была существенно выше (на $\geq 3,2$ lg), чем таковые в других органах. Только спустя 2 суток п.и. вирус стал дополнительно регистрироваться и в верхнем отделе дыхательного тракта (в слизистой носа), а также в головном мозге и печени. Через 3–4 суток п.и. накопление вируса наблюдалось во всех исследованных органах. Наиболее высокие концентрации патогена, пре-

вышающие 5 lg ЭИД₅₀/мл, были определены в легких, трахее, головном мозге и сыворотке крови мышей. Высокий уровень накопления вируса > 4 lg ЭИД₅₀/мл был зарегистрирован также в почках и селезенке.

Далее были проведены эксперименты по изучению динамики накопления в организме мышей авирулентного для них штамма A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/05 в/пат ВГП А/Н5N1 при и/н инфицировании дозой 5,8 lg ЭИД₅₀ (10 ID₅₀, рассчитанные с учетом регистрации патогена в легких этих животных спустя 5 суток после и/н инфицирования). Результаты данных исследований отражены в таблице 5.15.

Таблица 5.14 - Данные по накоплению высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 (штамм A/Duck/Kurgan/08/05) в биоматериалах** от аутбредных мышей ICR, интраназально зараженных 5,2 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)

Вид биоматериала от мышей	Концентрация ВГП в lg ЭИД ₅₀ /мл, М (I ₉₅) для n=3, в биоматериалах от мышей через разные временные промежутки после инфицирования:						
	1 сутки	2 суток	3 суток	4 суток	6 суток	8 суток	10 суток
Сыворотка крови	2,3 (1,7...2,9)	4,1 (3,3...4,9)	5,6 (4,7...6,5)	4,6 (3,8...5,4)	5,3 (4,6...6,0)	4,0 (3,2...4,8)	4,0 (3,2...4,8)
Легкие	5,8 (5,0...6,6)	5,3 (4,5...6,1)	5,6 (4,9...6,3)	5,6 (5,6...5,6)	6,6 (5,9...7,3)	5,9 (5,0...6,8)	4,5 (3,8...5,2)
Носовая перегородка со слизистой	< 0,2	2,3 (1,7...2,9)	2,6 (2,1...3,1)	2,6 (2,1...3,1)	3,4 (2,7...4,1)	2,6 (2,1...3,1)	< 0,2
Трахея	2,3 (1,6...3,0)	3,4 (2,9...3,9)	5,9 (5,3...6,5)	6,4 (5,9...6,9)	5,9 * (5,3...6,5)	3,2 (2,7...3,7)	<0,2
Головной мозг	< 0,2	3,9 (3,3...4,5)	3,2 (2,3...4,1)	4,0 (3,4...4,6)	5,5 * (4,9...6,1)	5,5 * (4,9...6,1)	4,5 (4,0...5,0)
Селезенка	< 0,2	< 0,2	3,8 (3,2...4,4)	4,3 (3,6...5,0)	4,8 (4,2...5,4)	5,0 * (4,4...5,6)	< 0,2
Мочевой пузырь	< 0,2	< 0,2	2,3 (1,7...2,9)	3,4 (2,8...4,0)	3,4 (2,8...4,0)	3,9 * (3,4...4,4)	< 0,2

Продолжение таблицы 5.14

Вид биоматериала от мышей	Концентрация ВГП в lg ЭИД ₅₀ /мл, М (I ₉₅) для n=3, в биоматериалах от мышей через разные временные промежутки после инфицирования:						
	1 сутки	2 суток	3 суток	4 суток	6 суток	8 суток	10 суток
Почки	2,6 (1,9...3,3)	3,2 (2,2...4,2)	4,7 (3,8...5,6)	3,4 (2,6...4,2)	4,8 (4,2...5,4)	3,5 (2,6...4,4)	2,3 (1,7...2,9)
Поперечно-полосатая мышеч. ткань	< 0,2	< 0,2	< 0,2	2,3 (1,8...2,8)	2,6 (2,0...3,2)	< 0,2	< 0,2
Печень	< 0,2	2,3 (1,8...2,8)	2,6 (1,7...3,5)	2,3 (1,8...2,8)	1,6 (1,1...2,1)	1,2 (0,7...1,7)	< 0,2
<p>Примечания</p> <p>М – средняя величина</p> <p>n – количество животных, использованных в временной точке</p> <p>I₉₅ - доверительный интервал М с заданной вероятностью 95 %</p> <p>LD₅₀ – 50 %-я летальная доза для мышей</p> <p>< 0,2 - значение ниже порога чувствительности (0,2 lg ЭИД₅₀/мл) примененного метода титрования</p> <p>* Значение выше таковой соответствующего биоматериала спустя 2 или 3 суток после заражения, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двусторонних t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни)</p> <p>** Ткани и органы в составе гомогенатов (10 %-е по объему) и сыворотка крови</p>							

Из данных таблица видно, что через 1 сутки п.и. вирус появился сразу только в двух органах респираторного тракта (легкие и трахея), а также в почках и в сыворотке крови мышей. При этом концентрация этого патогена в легких была невысокой и близка к таковой в трахее. Спустя 2 суток п.и. возбудитель заболевания был обнаружен дополнительно только в головном мозге, а спустя 4 суток п.и. – и в печени. Важно отметить, что только через 6 суток п.и. вирус стал дополнительно регистрироваться и в верхнем отделе дыхательного тракта (в слизистой носа), а также в селезенке мочевом пузыре и мышечной ткани у мышей. В этот срок накопление вируса наблюдалось во всех исследованных органах. Наиболее высокие концентрации патогена, превышающие 5 lg

ЭИД₅₀/мл, были определены в легких и трахее. Высокий уровень накопления вируса > 4 lg ЭИД₅₀/мл был зарегистрирован также в сыворотке крови мышей. Через 6–8 суток п.и. патоген перестал выявляться в печени, селезенке, поперечнополосатой мышечной ткани и мочевом пузыре, а через 18 суток п.и. он был обнаружен только в легких этих животных.

Таблица 5.15 - Данные по накоплению высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) A/H5N1 (штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) в биоматериалах* от аутбредных мышей ICR, интраназально зараженных 5,8 lg ЭИД₅₀ (10 ID₅₀)

Вид биоматериала от мышей	Концентрация ВГП в lg ЭИД ₅₀ /мл, М (I ₉₅) для n=3, в биоматериалах от мышей через разные временные промежутки после инфицирования:						
	1 сутки	2 суток	4 суток	6 суток	8 суток	10 суток	18 суток
Сыворотка крови	1,2 (0,7...1,7)	2,6 (1,9...3,3)	2,6 (1,9...3,3)	4,1 * (3,5...4,7)	2,1 (1,5...2,7)	2,1 (1,5...2,7)	< 0,2
Легкие	2,8 (2,2...3,4)	4,6 (4,0...5,2)	4,9 (4,2...5,6)	5,4 (4,8...6,0)	4,4 (3,9...4,9)	3,9 (3,2...4,6)	3,9 (3,2...4,6)
Носовая перегородка со слизистой	< 0,2	< 0,2	< 0,2	3,4 (2,8...4,0)	3,4 (2,9...3,9)	5,0 (4,5...5,5)	< 0,2
Трахея	2,6 (2,0...3,2)	3,7 (3,0...4,4)	4,5 (3,8...5,2)	5,2 * (4,6...5,8)	3,7 (3,0...4,4)	3,7 (3,0...4,4)	< 0,2
Головной мозг	< 0,2	2,1 (1,6...2,6)	2,3 (1,7...2,9)	2,9 (2,0...3,8)	2,9 (2,0...3,8)	2,4 (1,8...3,0)	< 0,2
Селезенка	< 0,2	< 0,2	< 0,2	3,0 (2,5...3,5)	2,3 (1,7...2,9)	< 0,2	< 0,2
Мочевой пузырь	< 0,2	< 0,2	< 0,2	3,4 (3,4...3,4)	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Почки	1,2 (0,7...1,7)	2,1 (1,6...2,6)	2,9 (2,4...3,4)	3,9 * (3,2...4,6)	3,6 * (3,0...4,2)	3,4 (2,9...3,9)	< 0,2

Продолжение таблицы 5.15

Вид биоматериала от мышей	Концентрация ВГП в lg ЭИД ₅₀ /мл, М (I ₉₅) для n=3, в биоматериалах от мышей через разные временные промежутки после инфицирования:						
	1 сутки	2 суток	4 суток	6 суток	8 суток	10 суток	18 суток
Поперечно-полосатая мышеч. ткань	< 0,2	< 0,2	< 0,2	1,2 (0,7...1,7)	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Печень	< 0,2	< 0,2	1,6 (1,1...2,1)	1,6 (1,1...2,1)	1,2 (0,6...1,8)	< 0,2	< 0,2
<p>Примечания</p> <p>М – средняя величина</p> <p>n – количество животных, использованных в временной точке</p> <p>I₉₅ - доверительный интервал М с заданной вероятностью 95 %</p> <p>ID₅₀ – 50 %-я инфицирующая доза вируса, рассчитанная по его наличию в легких у мышей спустя 5 суток после заражения</p> <p>< 0,2 - значение ниже порога чувствительности (0,2 lg ЭИД₅₀/мл) примененного метода титрования</p> <p>* Значение выше таковой соответствующего биоматериала через 2 суток после заражения, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью двусторонних t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни)</p> <p>** Ткани и органы в составе гомогенатов (10 %-е по объему) и сыворотка крови</p>							

При изучении динамики накопления в/пат ВГП А/Н5N1 в органах и тканях мышей было выбрано три штамма, отнесенных нами к разным группам по летальной активности при и/н инфицировании животных: высоковирулентной (A/Chicken/Kurgan/05/2005), средней степени вирулентности (A/Duck/Kurgan/08/2005) и авирулентной (A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005). При этом в базах данных GeneBank и Influenza Research Database представлена информация о полных последовательностях геномов только первых двух штаммов. Информация о последовательности генома штамма A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 представлена только в части гена гемагглютина (НА): DQ231242. В общем, замены в различных генах у данных штаммов были приблизительно одинаковыми. В то же время, в отличие от штамма A/Duck/Kurgan/08/2005 у штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 выявлено наличие лизина в

позиции 627 гена PB2 (детерминанта вирулентности PB2-627K), что связывают с высоковирулентными свойствами штамма для мышей, а также такую замену обнаруживают только у штаммов, выделенных от человека [465]. У штамма A/Duck/Kurgan/08/2005 наблюдали глютаминовую кислоту в позиции 627 того же гена (PB2-627E), что свидетельствовало о сниженной вирулентности штамма для мышей за счет уменьшения репродукции вируса в клетках млекопитающих.

Несмотря на то, что инфицирование мышей тремя штаммами в/пат ВГП А/Н5N1 (A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Duck/Kurgan/08/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) мы осуществляли и/н способом, возбудитель заболевания во всех этих случаях был обнаружен первоначально (через 1 сутки п.и.) у этих животных, беря во внимание только респираторный тракт, в легких и трахее, что свидетельствовало, вероятно, о большей чувствительности этих органов к вирусу по сравнению с таковой слизистой носа. Подтверждением этого является и то, что в органы нижнего отдела дыхательного тракта мышей попадал всего лишь 1 % вируса от его количества, взятого в составе аллантоисной жидкости при и/н заражении этого вида животных. В то же время адаптированный к мышам штамм A/Aichi/2/68 (H3N2) ВГ уже через 12 часов после и/н заражения животных дозой $3 \lg \text{ЭИД}_{50}$ (10 LD_{50}) накапливался сразу в трех респираторных органах (легкие, трахея и нос) [39]. Такое несоответствие результатов, полученных на разных субтипах ВГ, может объясняться тем, что у данного вида животных в верхнем отделе респираторного тракта чаще встречаются рецепторы СА с α -2,6 связью к галактозе, чем с α -2,3 связью, с которыми преимущественно взаимодействует в/пат ВГП [252, 279, 382, 434]. В этом плане мышь имеет сходство с человеком. Ситуация, связанная с первичным размножением штаммов в/пат ВГП А/Н5N1 в органах нижнего отдела дыхательного тракта у мышей, соответствовала той, которая описана у инфицированных таким вирусом людей [114, 365]. Тем не менее, ряд исследователей относит мышей к числу тех животных (птицы, лошади, собаки, кошки и обезьяны), которые имеют рецепторы СА с α -2,3 связью к галактозе в верхнем отделе респираторного тракта [278, 365, 434]. При этом в наших экспериментах на курах, в отличие от мышей, удалось продемонстрировать первичное размножение штаммов в/пат ВГП А/Н5N1 в слизистой носа (таблицы 5.9 и 5.10).

В наших экспериментах источниками вируса, инициирующими его накопление в слизистой носа у мышей, могли являться как легкие с трахей (восходящая инфекция), так и кровь: гематогенное проникновение возбудителя заболевания через фенестриро-

ванный эндотелий кровеносных сосудов обонятельной области. Подтверждением этого было то, что концентрации в этих биоматериалах к моменту появления вируса на слизистой носа достигала величин, превышающих 4–5 lg ЭИД₅₀/мл. Если репродукцию штаммов A/Chicken/Kurgan/05/2005 и A/Duck/Kurgan/08/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 можно было наблюдать в слизистой носа мышей начиная с 2-х суток п.и., то у штамма A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 этого вируса - только через 6 суток п.и. Вероятно, такая задержка с появлением последнего (авирулентного для мышей) штамма в носу этих животных была связана с длительным (1–4 суток п.и.) относительно (других исследованных штаммов) низким уровнем его накопления в крови и легких.

Одновременно (через 1 сутки п.и.) с появлением в легких и трахее вирус начинал регистрироваться в крови и почках мышей, но в более низких концентрациях, чем в легких. Что свидетельствовало о том, что данный возбудитель заболевания, вероятно, только после размножения в органах нижнего отдела дыхательного тракта попал в кровь, через которую и произошло инфицирование почек. Причем высокие величины концентраций вируса в крови (ее сыворотке), которые в ряде случаев приближались к таковым в легких, демонстрировали, скорее всего, не пассивную его аккумуляцию там при поступлении из органов респираторного тракта мышей, а его размножение. Данное предположение подтверждается так же результатами исследований других ученых [39], которые наблюдали практически полное отсутствие сезонного ВГ в крови аутбредных мышей ICR при наличии огромных его концентраций в легких (7,0 lg ЭИД₅₀/мл) через 4 суток после и/н инфицирования аналогичной для этих животных дозой вируса (10 LD₅₀).

В наших экспериментах с использованием штаммов в/пат ВГП А/Н5N1, существенно различающихся по вирулентности для мышей, через 2–6 суток п.и. вирус все же аккумулялировался и в верхнем отделе дыхательного тракта мышей и во многих экстра-респираторных органах и тканях. Если накопление высоковирулентного и средней степени вирулентности штаммов в головном мозге, сыворотке крови, почках и селезенке мышей превышало 4 lg ЭИД₅₀/мл, то величины концентраций авирулентного штамма в этих биоматериалах были ниже. Появление вируса в экстра-респираторных органах, скорее всего, обусловлено его проникновением из крови, куда в свою очередь патоген был ранее доставлен из легких и трахеи. Причем в некоторых таких органах (головной мозг, селезенка и почки) можно уверенно констатировать размножение вируса: величины его концентраций в них иногда даже превышали таковые в сыворотке крови. Небольшая

разница (на ≤ 1 lg) между пиковыми значениями концентрации патогена в мочевом пузыре с таковыми в сыворотке крови, которые были чуть выше по некоторым временным точкам, так же свидетельствует о его размножении в этом органе, так как сравнительной оценке мы подвергали 10 %-е гомогенаты мочевого пузыря и неразведенную сыворотку крови. Кроме того, по результатам определения количества эритроцитов в различных органах этих животных (по определению уровня гемоглобина с помощью спектрофотометра) было зарегистрировано наличие в них (включая мочевой пузырь) лишь около 1 % крови.

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что размножение в/пат ВГП A/H5N1 у человека, так же как и у мышей, происходило преимущественно в органах респираторного тракта [159, 233, 274, 382]. Кроме того, накопление этого возбудителя заболевания у людей наблюдалось так же и в других экстра респираторных органах и тканях: головной мозг, кишечник [220, 269] и кровь [114, 220].

Течение нелетальной инфекции у мышей, вызванной и/н инфицированием авирулентным для них штаммом A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в/пат ВГП A/H5N1 (10 ID₅₀), сопровождалось постепенным снижением концентраций вируса через 8, 10 и 18 суток п.и. во всех органах и тканях вплоть до полного исчезновения в большинстве случаев (с учетом чувствительности использованного нами метода титрования). Исключением в этом плане были лишь легкие, в которых вирус продолжал выявляться и через 18 суток п.и. Такое изменение уровня накопления вируса, скорее всего, можно объяснить влиянием формирующегося у животных иммунного ответа.

В научной литературе нам не удалось найти подробную информацию, связанную с масштабным изучением динамики накопления в/пат ВГП A/H5N1 по широкому спектру органов и тканей у и/н зараженных мышей. Тем не менее, в ряде случаев в экспериментах с использованием линейных мышей (BALB/c) некоторые ученые, так же как и мы, обнаруживали вирус в легких, крови, головном мозге, почках, печени, селезенке и кишечнике [91, 177, 237]. Если величины концентраций вируса в легких у аутбредных мышей ICR, которые наблюдались в наших экспериментах, были сравнимы с таковыми у линейных мышей, то в других экстра респираторных органах накопление вируса существенно различалось. Как правило, мы отмечали более высокие значения этого показателя для крови, головного мозга, почек, селезенки, печени и кишечника. Такое несоот-

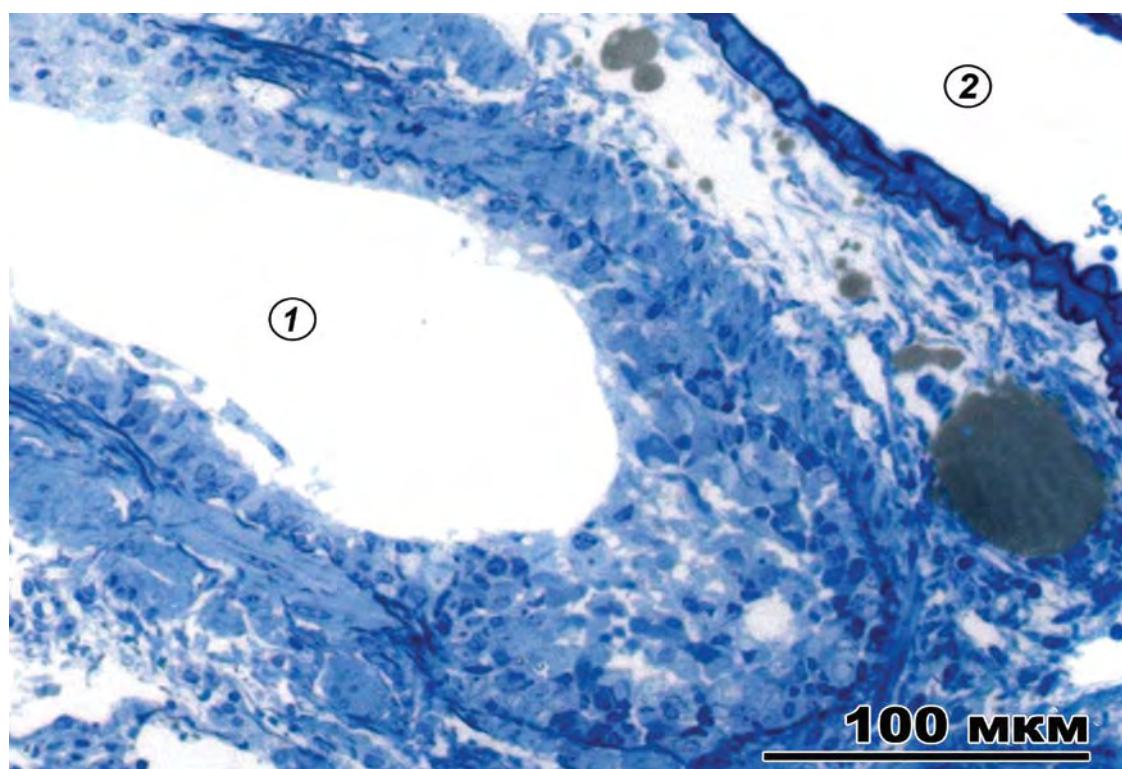
ветствие полученных результатов, вероятно, может быть объяснено различием в использованных штаммах в/пат ВГП А/Н5N1 и животных (аутбредные мыши ICR и BALB/c).

Таким образом, у аутбредных мышей ICR, и/н зараженных различными штаммами в/пат ВГП А/Н5N1 (10 LD₅₀ или ID₅₀) наблюдался генерализованный инфекционный процесс. При этом первичные органы-мишени дыхательного тракта для в/пат ВГП А/Н5N1 (независимо от степени летальной активности для мышей используемых штаммов А/Chicken/Kurgan/05/2005, А/Duck/Kurgan/08/2005 и А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 ВГП А/Н5N1), как и у людей, располагались в нижнем его отделе (легкие и трахея), где вирус появлялся спустя 24 часа п.и. Распространение патогена из первичных органов-мишеней происходило у мышей, как и у человека, в основном гематогенным путем, при этом его концентрация в крови достигала 4,1–5,6 lg ЭИД₅₀/мл. Тканями и органами максимального накопления вируса (> 5 lg ЭИД₅₀/мл для всех штаммов) у этих животных являлись легкие и трахея. Отмечена аккумуляция патогена и во всех исследованных экстрареспиаторных органах и тканях мышей: головной мозг, слизистая носа, почки, селезенка, печень, мочевой пузырь и поперечнополосатая мышечная ткань, что в ряде случаев воспроизводило ситуацию, наблюдаемую у людей, инфицированных в/пат ВГП А/Н5N1.

5.3 Патоморфологические изменения у аутбредных мышей ICR, инфицированных высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н5N1

В следующей серии экспериментов были проведены исследования, связанные со световой и электронной микроскопией органов и тканей аутбредных мышей ICR, и/н зараженных штаммом А/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 дозой 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀). Несмотря на то, что все использованные нами штаммы (А/Chicken/Kurgan/05/2005, А/Duck/Kurgan/08/2005 и А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) в предыдущей работе имели общее сходство между собой по развитию инфекционного процесса у мышей и кур (п. 5.2.1 и 5.2.2), необходимость выбора именно такого штамма для дальнейшего изучения была обусловлена тем, что по летальному эффекту он относился к группе штаммов, высоковирулентных для мышей (п. 5.1.2). Учитывая то, что основные патоморфологические изменения у и/н инфицированных мышей сосредоточены в органах респираторного тракта, особенно в нижнем его отделе, особое внимание будет уделено легким этих животных.

Самые ранние признаки поражения были отмечены через 1 сутки п.и. в легких мышей, которые были представлены дистрофией и десквамацией эпителиоцитов бронхов (рисунок 5.2).



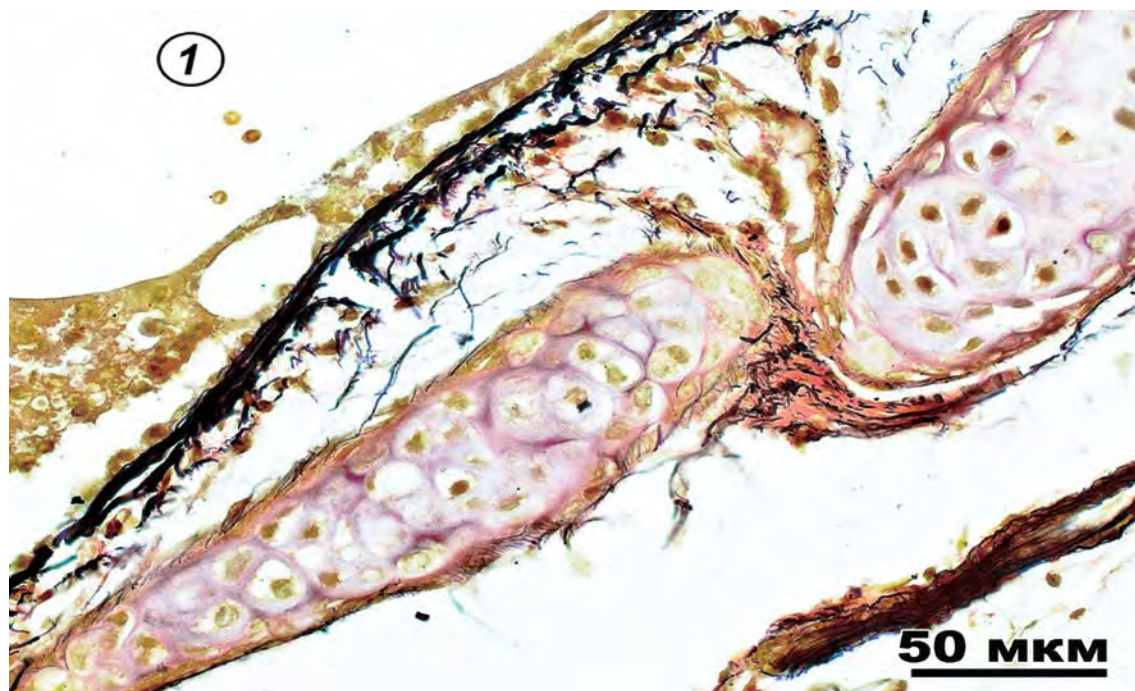
1 – просвет бронха

2 – просвет кровеносного сосуда

Рисунок 5.2 – Ткань легкого (световая микроскопия, окраска азуром II) аутбредной мыши ICR через 1 сутки после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀): выраженные дистрофические изменения и десквамация эпителиоцитов слизистой оболочки бронхов, скопление секрета и десквамированных клеток в их просвете

Спустя 2 суток п.и. аналогичные изменения появились в трахее, а через 3 суток п.и. – в слизистой носа (рисунки 5.3 и 5.4), которые нарастали вплоть до момента гибели животных. В этот период времени, кроме дистрофических процессов в ткани легкого, наблюдались ателектазы, спазмы мелких бронхов и воспалительно-клеточная инфильтрация перибронхиальной ткани с отеком и кровоизлияниями (рисунки 5.5 и 5.6), которые усиливались в ходе инфекции. Через 6–8 суток п.и. в легочной ткани мышей патологические изменения были часто ассоциированы с некрозами в альвеолярной зоне (рисунок 5.7). В период с 3 по 8-е сутки п.и. часто можно было зафиксировать кровоизлияния в ткани легкого. При этом в кровеносных сосудах этого органа происходила отслойка эндотелия, и было обнаружено много участков таких сосудов, в которых кровь непосредственно контактирует с их базальной мембраной. В просвете венозных и артериальных сосудов легких часто наблюдались тромбы разных размеров и на разных стадиях

развития, иногда полностью заполняющие просвет сосудов (рисунок 5.8). Состав тромбов был представлен в основном разрушенными клетками крови: эритроцитами, тромбоцитами и лейкоцитами разной степени повреждения. Однако через 7–8 суток п.и. у некоторых животных были обнаружены признаки регенерации эпителия бронхов и замещения некротических очагов соединительной тканью.



1 – просвет трахеи

Рисунок 5.3 - Ткань трахеи (световая микроскопия, окраска по ван Гизону) аутбредной мыши ICR через 2 суток после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀): выраженные дистрофические изменения и десквамация эпителиоцитов слизистой оболочки трахеи

При тщательном проведении электронной микроскопии ткани легкого удавалось не однократно выявлять признаки репродукции вируса в эпителиоцитах (реснитчатых клетках) бронхов. При этом ядра зараженных клеток имели характерную для репродукции ВГ морфологию: электронно-плотные гранулярные включения, придающие ядру пятнистый вид, а цитоплазма часто содержала вирус-специфические структуры. Почкование вируса происходило на апикальной мембране клеток, вирионы локализовались между ресничками и микроворсинками (рисунок 5.9А,Б).

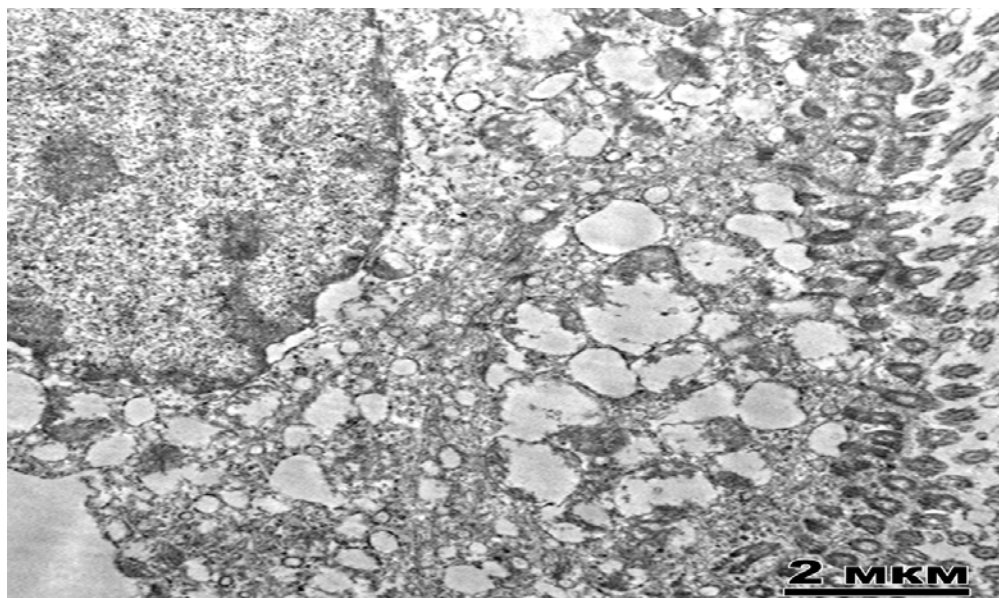


Рисунок 5.4 - Слизистая носа (трансмиссивная электронная микроскопия) аутбредной мыши ICR через 3 суток после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀): дистрофические изменения эпителия слизистой оболочки - утрата ресничек, вакуолизация цитоплазмы эпителиоцитов

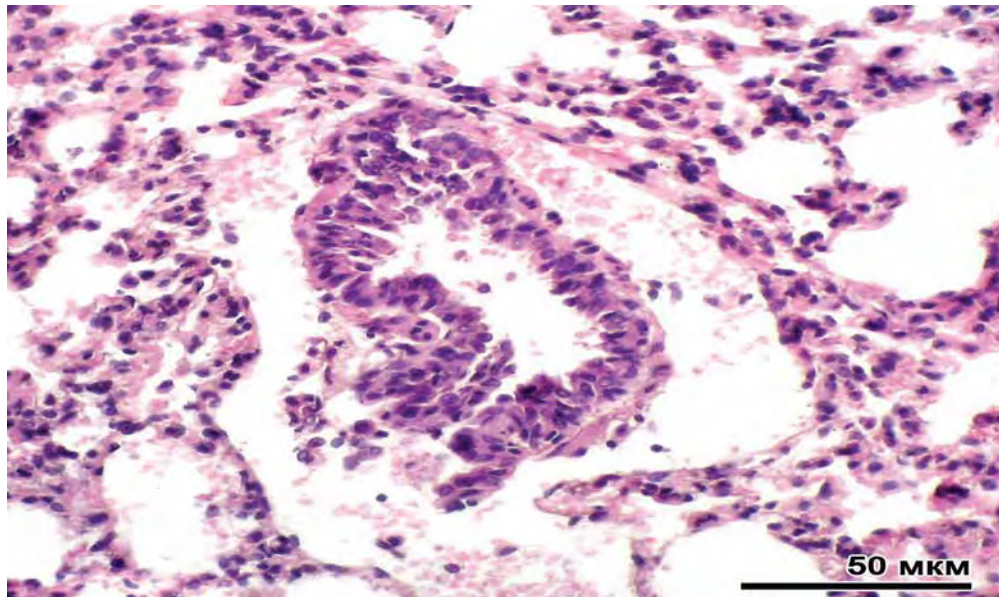


Рисунок 5.5 - Ткань легкого (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) аутбредной мыши ICR через 3 суток после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀): выраженные дистрофические изменения бронхиальных эпителиоцитов, воспалительно-клеточная инфильтрация стенки бронха, перибронхиальный отек и кровоизлияние

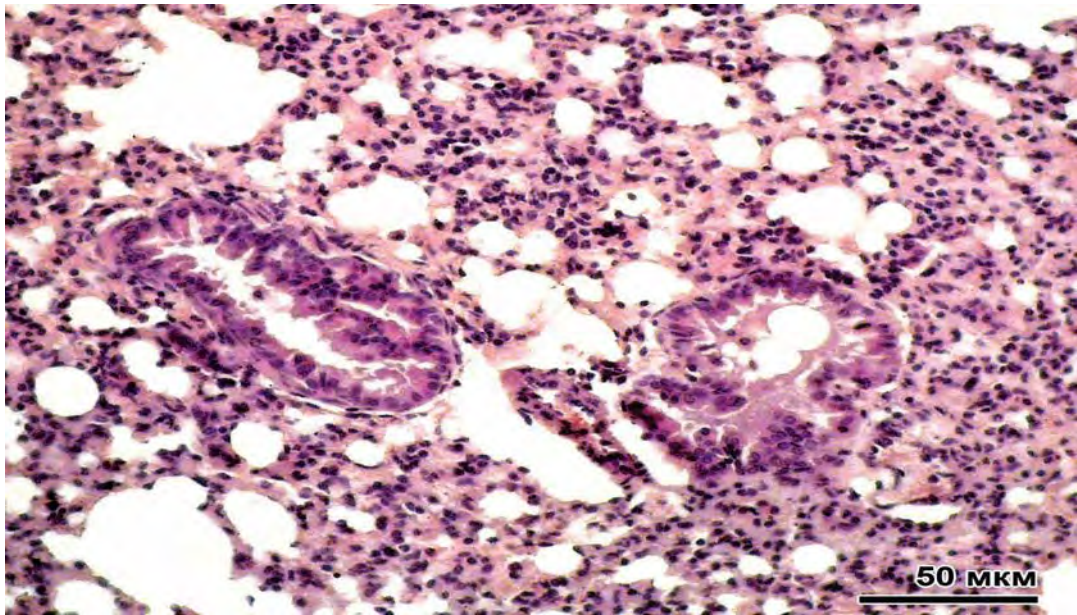
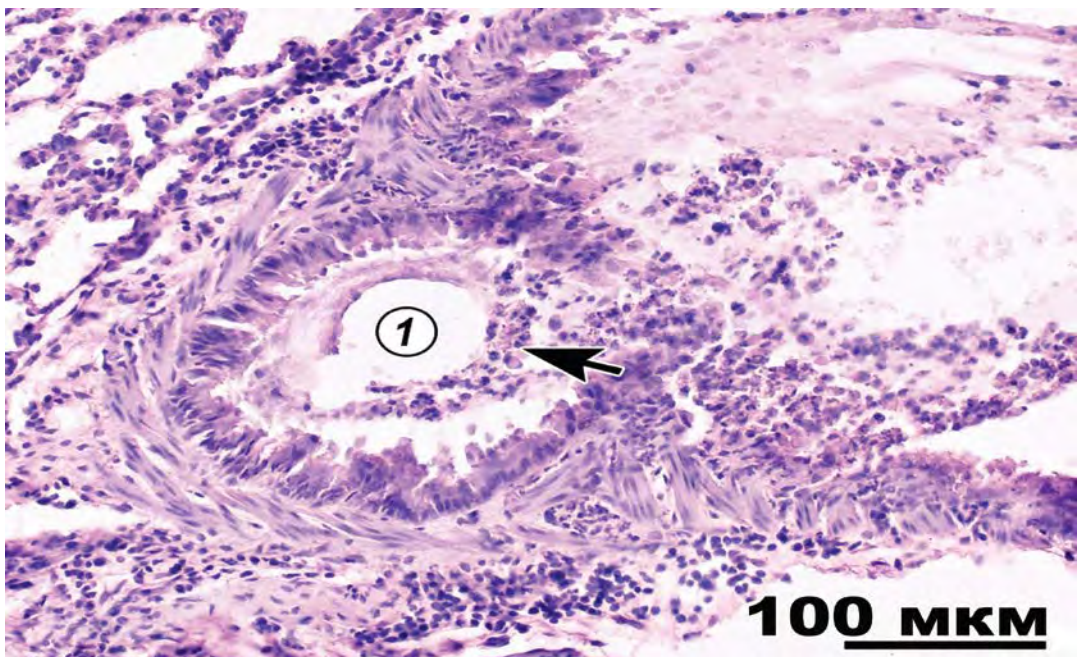
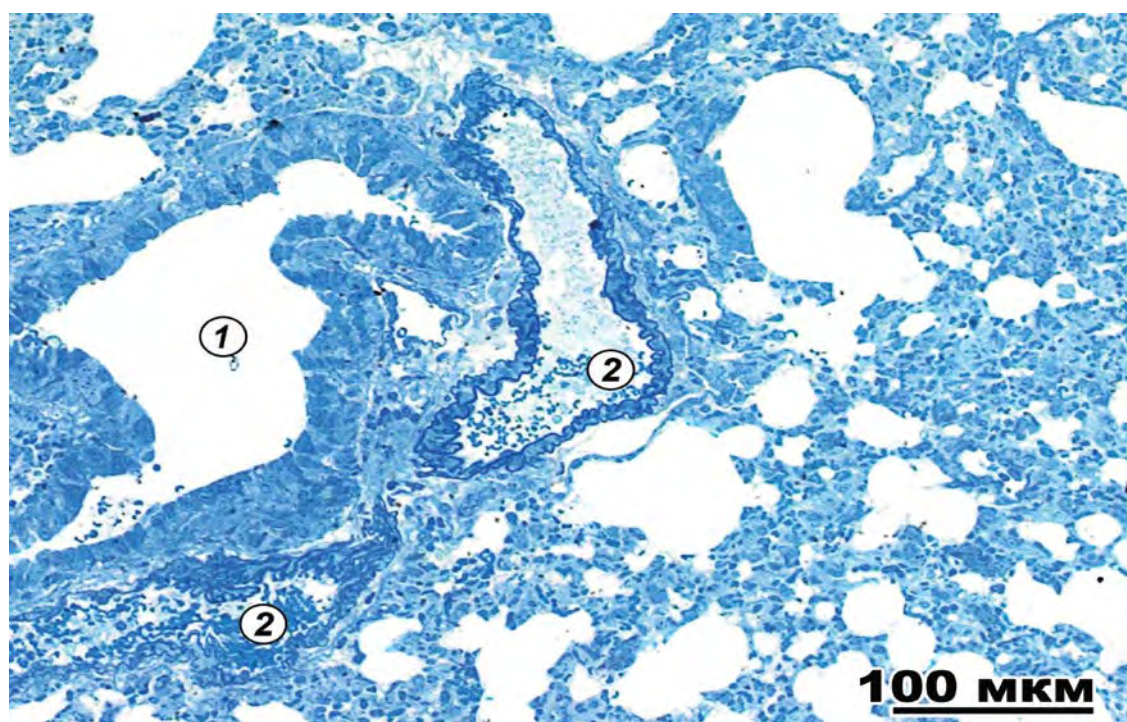


Рисунок 5.6 - Ткань легкого (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) аутбредной мыши ICR через 3 суток после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀): ателектазы и спазм мелких бронхов



1 – просвет бронха

Рисунок 5.7 - Ткань легкого (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) аутбредной мыши ICR через 6 суток после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀): некроз в альвеолярной зоне (черная стрелка)



1 – просвет бронха

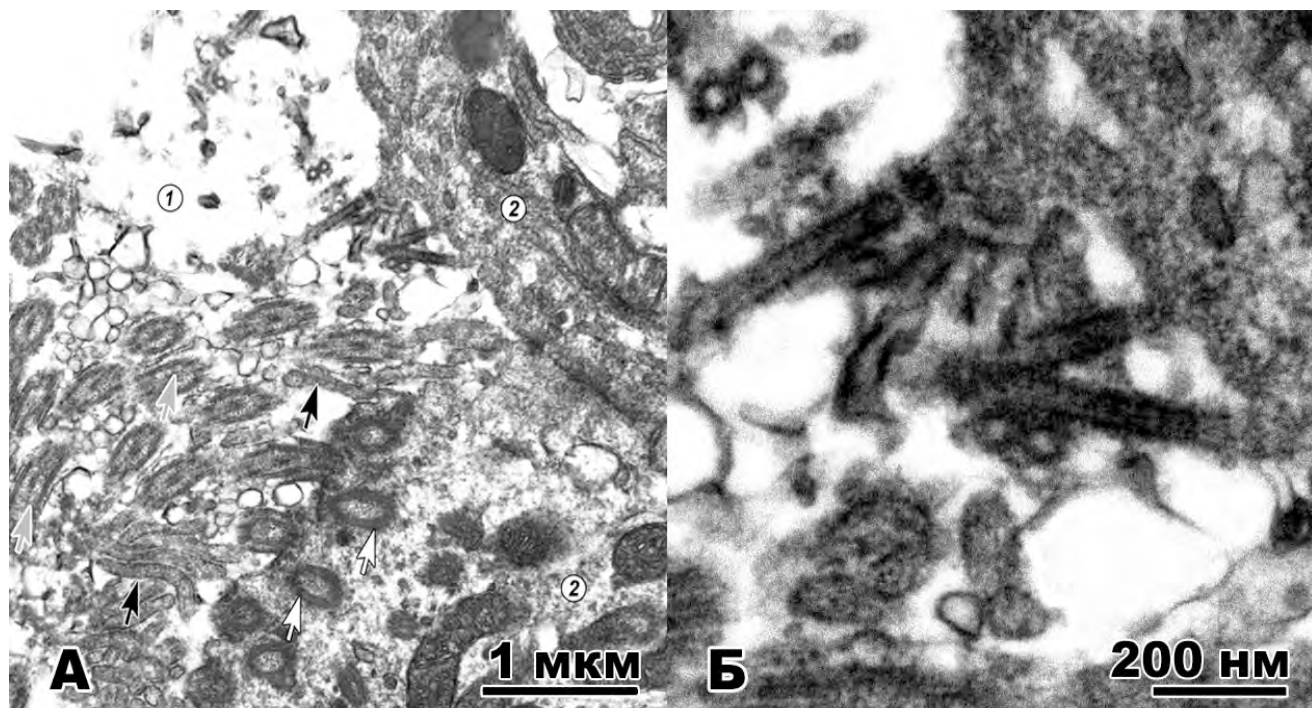
2 – просвет сосуда

Рисунок 5.8 - Ткань легкого (световая микроскопия, окраска азуром II) аутбредной мыши ICR через 6 суток после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀): агрегаты эритроцитов и коагуляция плазмы в артериальных сосудах, сопровождающих бронх; участки ателектаза и дистелектаза

Обнаружены также патоморфологические изменения и в некоторых других органах у инфицированных в/пат ВГП A/H5N1 мышей (головной мозг, почки и селезенка), причем эти изменения зачастую имели воспалительно-некротический характер, были сопряжены с гиперемией и кровоизлияниями, появлялись через 4–6 суток п.и. и нарастали к моменту гибели животных. В качестве примера приведем некоторые иллюстративные материалы гистологического изучения головного мозга таких мышей (рисунок 5.10 А,Б).

Заболевание у мышей сопровождалось выраженными изменениями в крови со сдвигом лейкоцитарной формулы влево: лейкопения, лимфопения и тромбоцитопения и большие количества клеток миелоцитарного ряда, которые, как правило, наблюдали че-

рез 3–5 суток п.и. Кроме того, часто появлялись аномальные эритроциты: эхиноциты и пойкилоциты.



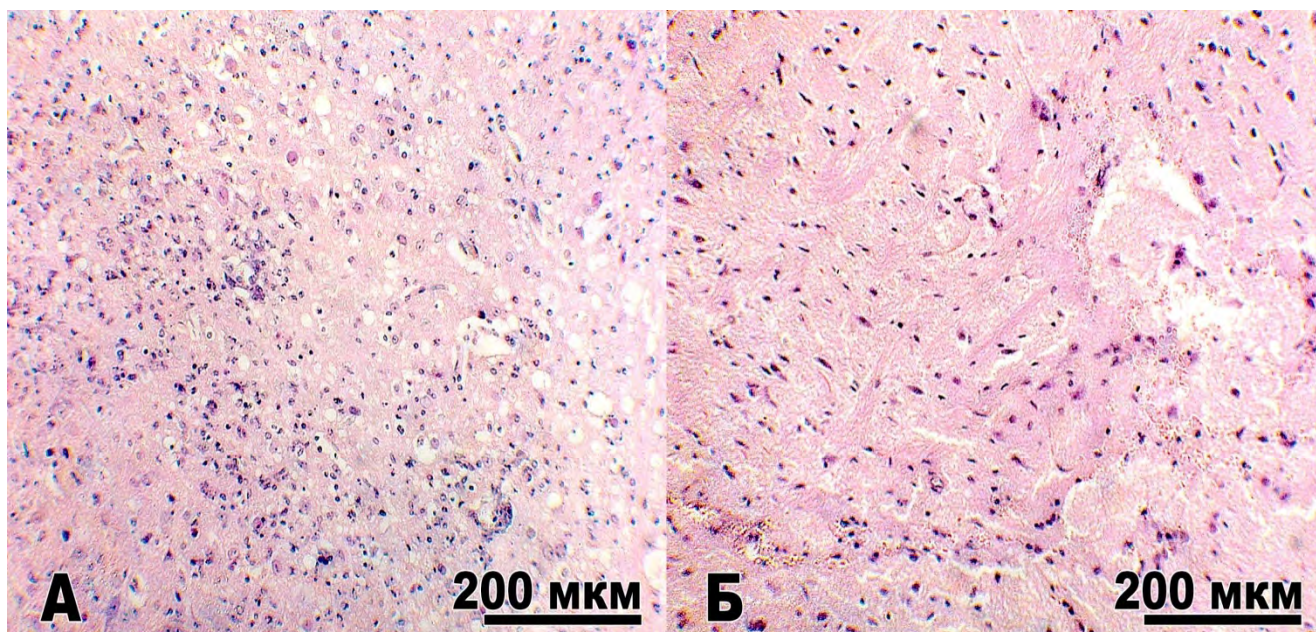
А – апикальная часть реснитчатой клетки (2), реснички (показаны серыми стрелками) с базальными тельцами (показаны белыми стрелками) и микроворсинки (показаны черными стрелками) которой в просвете бронха (1)

Б – нитевидные вирусные частицы в стадии почкования из реснитчатой клетки (увеличение части рисунка А)

Рисунок 5.9 - Слизистая стенки бронха (трансмиссивная электронная микроскопия) аутбредной мыши ICR через 1 сутки после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)

Основные патоморфологические повреждения начиная с первых суток и в последующем после и/н введения мышам штамма А/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀) наблюдались в органах респираторного тракта, и они, как правило, характеризовались воспалительно-деструктивными изменениями, включая диффузные бронхиальные и альвеолярные, кровоизлияниями и тромбозом сосудов. Аналогичные наблюдения были отмечены и у людей, инфицированных в/пат ВГП А/Н5N1 [157, 225, 423]. При этом, так же как и у людей, воспалительно-некротические повреждения в

слизистой носа у мышей происходили позднее, чем в органах нижнего отдела дыхательного тракта.



А – ткань коры с дистрофическими изменениями нейронов на фоне диффузной полиморфноклеточной воспалительной инфильтрации

Б – ткань белого вещества с отеком и обширными кровоизлияниями

Рисунок 5.10 - Ткань большого полушария головного мозга (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) аутбредной мыши ICR через 4 суток после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)

В общем виде сходная картина патологических изменений у инфицированных мышей и умерших людей от гриппа птиц (А/Н5N1) наблюдалась не только в тканях дыхательного тракта, но и в других экстрареспиаторных органах: головной мозг, почки и селезенка. Причем эти повреждения так же имели воспалительно-некротический характер с геморрагическими проявлениями [82, 344, 366].

С помощью иммуногистохимического и вирусологического методов были выявлены клетки-мишени для в/пат ВГП А/Н5N1 в органах респираторного тракта умерших от гриппа людей, которыми являются эпителиоциты и эндотелиоциты кровеносных капилляров легких [111, 251, 274, 382]. Причем в основном накопление вирусного антигена происходило в альвеолоцитах 2-го порядка. Нам же в прямых исследованиях, но с ис-

пользованием электронного микроскопа, удалось тоже определить клетки легких у инфицированных мышей, которые продуцировали в/пат ВГП А/Н5N1 и так же относятся к эпителиоцитам. Но вид этих эпителиоцитов (реснитчатые клетки бронхов) отличался от такового, выявленного у человека другими учеными. Кроме того, многократные наши целенаправленные попытки идентифицировать в этом органе мышей какие-либо другие виды клеток (альвеолярные макрофаги, бокаловидные и поддерживающие клетки, пневмоциты 1, 2 и 3-го порядков и эндотелиоциты кровеносных капилляров), инфицированные вирусом, оказались безуспешными. Некоторое несоответствие информации по видам выявленных чувствительных клеток легких людей и мышей к в/пат ВГП А/Н5N1 может быть связано с различием в уровнях достоверности данных полученных при исследованиях. В отличие от иммуногистохимического метода, который в основном регистрирует наличие антигенов вируса на поверхности тех или иных клеток, метод электронной микроскопии позволяет визуально идентифицировать сам возбудитель заболевания на стадии почкования, или его специфические структуры в ядре и цитоплазме клетки.

Грипп птиц (А/Н5N1) в отличие от сезонного гриппа более часто сопровождался у человека лейкопенией, лимфопенией и тромбоцитопенией [113, 114, 199]. Аналогичные данные при изучении мазков крови мышей, инфицированных в/пат ВГП А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005), были получены и нами.

Результаты наших патоморфологических исследований, выполненных на и/н зараженных аутбредных мышах ICR, так же продемонстрировали большое сходство с таковыми, полученными на инбредных мышах (BALB/c) другими учеными [91, 123, 247]. Причем эти исследователи, используя методы иммуногистохимии и гибридизационного анализа *in situ*, так же как и мы, выявили у линейных мышей бронхиальные эпителиоциты в качестве клеток-мишеней для в/пат ВГП А/Н5N1. Дополнительно они обнаружили накопление антигенов и генетического материала этого патогена и в других клетках этих животных: пневмоциты 2-го порядка, эндотелиоциты, периваскулярные лимфоциты, нейроны и глиальные клетки головного мозга и сердечно-мышечные клетки.

Таким образом, проведенные с использованием методов световой и электронной микроскопии исследования органов и тканей аутбредных мышей ICR, и/н зараженных штаммом А/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀), продемонстрировали усиливающиеся со временем воспалительно-некротические изме-

нения в легких этих животных начиная с ранней стадии инфекции (через 1 сутки п.и.), захватывающие на поздней ее стадии не только бронхиальную, но и альвеолярную часть ткани этого органа, и дополнительно (через 4–6 суток п.и. и позднее) кровоизлияния и тромбоз его кровеносных сосудов. Аналогичные нарастающие повреждения воспалительно-некротического характера были продемонстрированы в трахее и носовой полости этих животных начиная со 2 и 3-х суток п.и. соответственно. Через 4–6 суток п.и. и до момента гибели мышей наблюдались патоморфологические изменения и в некоторых экстрареспираторных органах мышей (головной мозг, почки и селезенка), напоминающие таковые, включая геморагии, в легких. Зарегистрированы признаки размножения вируса в эпителиоцитах бронхов (реснитчатая клетка): специфические структуры в ядре и цитоплазме клетки, а также отпочковывающиеся от нее частицы вируса. В общем виде патологические изменения в тканях и органах аутбредных мышей ICR, включая выявленный факт репродукции вируса в эпителиоцитах бронхов, были сходными с таковыми, описанными другими учеными у людей и линейных мышей BALB/c, зараженных в/пат ВГП А/Н5N1.

5.4 Оценка возможности применения модельной биосистемы «аутбредная мышь ICR – штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5N1» для изучения защитной эффективности препаратов у человека

Для изучения защитной эффективности препаратов от гриппа, в том числе гриппа птиц (А/Н5N1), по настоящее время активно используются модельные биосистемы, где в качестве лабораторных видов животных берут инбредных мышей разных линий, каждая из которых имеет слабовыраженное генетическое разнообразие, в то время как человеческая популяция по существу является аутбредной, а также вирусные штаммы, которые не являются актуальными для России, так как они были выделены на территории зарубежных стран. В связи с этим с целью поиска модельных животных была предпринята попытка оценить возможность применения наиболее доступных аутбредных мышей ICR для разрабатываемой нами кандидатной модельной биосистемы. При этом при выборе штамма в/пат ВГП А/Н5N1 были проведены эксперименты *in vitro* по изучению инфекционной активности (CI_{50}) на примере двух российских штаммов (A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 и A/Chicken/Kurgan/05/2005) в человеческих первич-

ных клетках-мишенях для данного патогена. Причем прогнозная чувствительность людей к этим штаммам, оцененная (по ID_{50}) при использовании результатов экспериментов *in vitro*, оказалась одинаковой и очень высокой (п. 5.1.1). В связи с этим выбор штамма для кандидатной модельной биосистемы был сориентирован на максимально высокий показатель вирулентности для мышей (по летальности) и на сходство других характеристик инфекционного процесса у этого вида животного и человека (в рамках разработанной нами стратегии - п. 3).

В процессе оценки вирулентных свойств восьми имеющихся у нас штаммов в/пат ВГП А/Н5N1, выделенных от домашней птицы в России и странах СНГ, был выбран один (А/Chicken/Kurgan/05/2005), который отличался самой высокой летальной активностью для мышей при и/н заражении. При этом клиническая картина заболевания у этих животных частично напоминала симптоматику болезни у людей, вызванной в/пат ВГП А/Н5N1. С использованием выбранного штамма были проведены исследования по изучению динамики его накопления по органам, тканям и сыворотке крови после и/н его введения $10 LD_{50}$ мышам и выявлены патоморфологические изменения в этих биоматериалах, кроме того, первичные и вторичные ткани и органы, а также клетки-мишени для данного вируса. Результаты такого изучения в обобщенном виде отражены в разработанной нами патогенетической схеме заболевания мышей (рисунок 5.11).

Важно отметить, что экспериментальные результаты, на основе которых была создана схема, во многом совпадают с теми, которые описаны в научных публикациях для существующих модельных животных и человека [240, 304, 423]. У мышей при и/н заражении штаммом А/Chicken/Kurgan/05/2005 ВГП наблюдалась генерализованная инфекция, стартующая, как правило, с дыхательного тракта с подключением в дальнейшем экстрареспираторных органов. Распространение вируса из первичных органов-мишеней происходило у мышей, как и у человека, в основном гематогенным путем. При этом у мышей данный инфекционный процесс сопровождался клинической картиной, частично напоминающей таковую у людей, зараженных в/пат ВГП А/Н5N1, и вызывал традиционные для человека патоморфологические изменения как в органах дыхательного тракта, включая выявленный факт репродукции вируса в эпителиоцитах бронхов, так и в некоторых экстрареспираторных органах.

Время после зар-я – п.и. (сутки)	Динамика распространения ВГП в организме мышей (ткани и органы с максимальной концентрацией вируса, lg ЭИД ₅₀)	Вид клеток, продуцирующих ВГП	Вид патологических изменений в тканях и органах	Внешняя клиническая картина заболевания
----------------------------------	--	-------------------------------	---	---

0	Входные ворота инфекции - респираторный тракт (2,1*)	Н.п.	Н.п.	Н.п.
	Первичные органы-мишени с апплицированным вирусом: легкие и трахея (0,1**)	Эпителиоциты респираторного тракта	Н.п.	Н.п.
1	Кровь – ее сыворотка (3,0) и кровеносная система доставки вируса к вторичным органам-мишеням	Н.п.	Н.п.	Н.п.
	Легкие (5,7), трахея (2,3), почки (2,2)	Тот же вид клеток	Начало воспалительно-некротических изменений в легких	Н.п.
2	Легкие (6,2), трахея (4,8), нос – носовая перегородка со слизистой (2,3), кровь – ее сыворотка (3,5), печень (2,3), почки (1,9), головной мозг (1,5)	Тот же вид клеток	Те же изменения, как и через 1 сутки п.и., но более выраженные, в том числе и в трахее	Н.п.

Время после заражения – п.и. (сутки)	Динамика распространения ВГП в организме мышей (ткани и органы с максимальной концентрацией вируса, lg ЭИД ₅₀)	Вид клеток, продуцирующих ВГП	Вид патологических изменений в тканях и органах	Внешняя клиническая картина заболевания
--------------------------------------	--	-------------------------------	---	---

3

Легкие (6,9), трахея (6,5), нос – носовая перегородка со слизистой (2,0), кровь – ее сыворотка (4,5), селезенка (4,0), почки (3,0), мочевой пузырь (3,0), печень (2,6), головной мозг (1,7)

Тот же вид клеток

Те же изменения, как и через 2 суток п.и., но более выраженные, в том числе и в слизистой носа

Н.п.

4 - 5

Легкие (7,4), трахея (6,0), нос – носовая перегородка со слизистой (2,8), кровь – ее сыворотка (5,3), головной мозг (6,0), селезенка (3,8), почки (3,9), мочевой пузырь (3,0), печень (2,6)

Тот же вид клеток

Те же изменения, как и через 3 суток п.и., но более выраженные и с кровоизлияниями, в том числе в других экстрареспираторных органах

Взъерошенность шерсти, сниженная двигательная активность, конъюнктивит

Время после зар-я – п.и. (сутки)	Динамика распространения ВГП в организме мышей (ткани и органы с максимальной концентрацией вируса, lg ЭИД ₅₀)	Вид клеток, продуцирующих ВГП	Вид патологических изменений в тканях и органах	Внешняя клиническая картина заболевания
6	Легкие (5,1), трахея (4,8), нос – носовая перегородка со слизистой (3,0), кровь – ее сыворотка (4,7), головной мозг (5,7), селезенка (3,5), почки (5,2), мочевого пузырь (2,3), печень (2,3)	Тот же вид клеток	Те же изменения, как и через 4–5 суток п.и., но менее выраженные	Та же, что и через 4–5 сут п.и., но более выраженная, а также иногда нарушение координации движения и гибель

* Значение соответствует дозе ВГП, вводимой и/н

** Величина определена с учетом 1 %-й аппликации вируса в легких мышей сразу же после и/н заражения (п. 5.2.2)

LD₅₀ – 50 %-я летальная доза для мышей

Н.п. – признаки по показателю не регистрировались в данной временной точке

Рисунок 5.11 - Патогенетическая схема заболевания у аутбредных мышей ICR, интраназально (и/н) инфицированных штаммом A/Chicken/Kurgan/05/2005 высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) A/H5N1 в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)

В этом смысле все значения показателей взаимоотношения мышей со штаммом A/Chicken/Kurgan/05/2005 ВГП А/Н5N1 в рамках указанных нами критериев (п. 3), направленных на поиск модельных биосистем с целью применения для изучения не только профилактической (экстренно-профилактической), лечебно-профилактической, но и терапевтической эффективности препаратов от гриппа птиц (А/Н5N1), в основном соответствовали таковым у человека и известных модельных животных (таблица 5.16).

Таблица 5.16 - Результаты оценки показателей взаимоотношения аутбредных мышей ICR с высокопатогенным вирусом гриппа птиц (в/пат ВГП) А/Н5N1 при респираторном инфицировании с таковыми у человека (известного модельного животного)

№ п/п	Наименование показателей по критериям	Значение показателей:		Наличие соответ- ствия
		для человека	для мыши	
1	Возможность заражения через главные входные ворота ин- фекции: дыхательный тракт	Реализуется при эпидемических вспышках	Реализуется экс- периментально ¹	Есть
2	ID ₅₀ или LD ₅₀ в lg ЭИД ₅₀ , М (I ₉₅)	-2,4 (-2,8...-2,0) ² ≥ -1,4 (-1,8...-1,0) ³	-0,9 (-1,2...-0,6) ⁴	Есть ⁵
3	Тип основных первичных ор- ганов-мишеней	Легкие с трахеей ⁶	Легкие с трахе- ей ¹	Есть
4	Вид клеток-мишеней в пер- вичных органах-мишенях	Эпителиоциты респираторного тракта ⁷	Эпителиоциты респираторного тракта ¹	Есть
5	Присутствие после респира- торного заражения патогеном (10–100 ID ₅₀) максимальной величины его концентрации в первичных органах-мишенях, превосходящей 3 lg ЭИД ₅₀ /мл	Имеется в легких ⁶	Имеется в лег- ких ¹	Есть

Продолжение таблицы 5.16

№ п/п	Наименование показателей по критериям	Значение показателей:		Наличие соответ- ствия
		для человека	для мыши	
6	Тип основной системы достав- ки патогена во вторичные ор- ганы-мишени	Гематогенный ⁸	Гематогенный ¹	Есть
7	Механизм доставки патогена во вторичные органы-мишени	Активный с раз- множением в эн- дотелиоцитах кровеносных со- судов ⁷	Активный с размножением в клетках крови и/или кровенос- ных сосудов ⁹	Есть
8	Присутствие после заражения патогеном (10–100 ID ₅₀) мак- симальной величины его кон- центрации в основных систе- мах его доставки во вторичные органы-мишени, превосходя- щей 3 lg ЭИД ₅₀ /мл	Имеется в крови ⁸	Имеется в кро- ви ¹	Есть
9	Тип основных вторичных ор- ганов-мишеней	Головной мозг, кишечник ¹⁰	Головной мозг, почки, селезен- ка ¹	Есть по первому органу
10	Вид основных клеток-мишеней во вторичных органах- мишенях	Эндотелиоциты кровеносных со- судов ⁷	Возможно эндо- телиоциты кро- веносных сосу- дов ⁹	Неизвет- но
11	Присутствие после заражения патогеном (10–100 ID ₅₀) мак- симальной величины его кон- центрации в основных вторич- ных органах-мишенях, превос- ходящей 3 lg ЭИД ₅₀ /мл	Не известно	Есть в головном мозге, почках и селезенке ¹	Неиз- вестно

Продолжение таблицы 5.16

№ п/п	Наименование показателей по критериям	Значение показателей:		Наличие соответст вия
		для человека	для мыши	
12	Основные внешние клиниче- ские проявления болезни, включая летальный эффект	Симптомы респи- раторной инфек- ции и полиорган- ной недостаточ- ности, включая летальность (~60 % ⁶)	Симптомы рес- пираторной ин- фекции и поли- органной недос- таточности, включая леталь- ность (100 % при дозе зара- жения ≥ 10 LD ₅₀ ¹)	Есть
<p>Примечания</p> <p>¹ Данные представлены в п. 5.1.2, 5.2.2 и 5.3</p> <p>² Прогнозная величина определена по наличию инфекционного процесса (п. 5.1.1) на основе экспериментов</p> <p>³ Величина определена по наличию симптоматики заболевания, наблюдаемой только у ≤ 10 % инфицированных людей (по данным эпиданализа) [371, 372, 382]</p> <p>⁴ Величина рассчитана с учетом 1 %-й аппликации вируса в легких мышей сразу же после и/н заражения (п. 5.2.2)</p> <p>⁵ Соответствие есть или величина LD₅₀ вируса для мышей превосходит таковую ID₅₀ вируса для человек по клинической симптоматике (включая летальный исход) заболевания</p> <p>⁶ Данные литературных источников [99, 222, 236, 405]</p> <p>⁷ Данные литературных источников в отношении первичных клеточных культур [251, 274, 3409]</p> <p>⁸ Данные литературных источников [53, 114, 465]</p> <p>⁹ Сравнительные данные наши (таблица 5.9) и других исследователей [39], а также данные в отношении мышей BALB/c [247]</p> <p>¹⁰ Данные литературных источников [220, 269]</p>				

Для сравнения чувствительности мышей и людей к штамму A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 в таблице представлены две разные величины этого параметра в отношении человека. При этом для такого сравнения не может быть прямо использовано прогнозное значение $ID_{50} = -2,4$ $(-2,8 \dots -2,0)$ lg ЭИД₅₀, полученное нами по регистрации наличия вируса в человеческих клетках легких, так как для мышей отсутствует аналогичная информация. В связи с этим, воспользовавшись литературными данными анализа эпидемических вспышек гриппа птиц (А/Н5N1) [372, 373, 383], по которым можно заключить, что симптоматика заболевания у инфицированных людей наблюдается только в ≤ 10 % случаев, представляется возможным определить для в/пат ВГП А/Н5N1 значение ID_{50} в отношении человека по клинической картине болезни (включая летальный исход), которое будет в 10 и более раз выше такового, оцененного по присутствию инфекционного процесса в ткани легких, и составит $\geq -1,4$ $(-1,8 \dots -1,0)$ lg ЭИД₅₀. Сравнивая эту величину с той, которая получена в экспериментах на мышах: $ID_{50} = -0,9$ $(-1,2 \dots -0,6)$ с учетом 1%-й аппликации вируса в легких при использованном методе и/н их инфицирования, можно отметить, что этот вид животных не уступают человеку по своей чувствительности к штамму A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1.

Таким образом, используя данные изучения диссеминации штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1, выделенного от домашней птицы на территории России, в организме аутбредных мышей ICR после и/н заражения 10 LD₅₀, клинической картины болезни и патологических изменений в тканях и органах разработана соответствующая патогенетическая схема заболевания этого вида животных. Отмечено, что данный вид животного имеет чувствительность к штамму A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1, близкую к таковой у человека: ID_{50} для мыши $-0,9$ $(-1,2 \dots -0,6)$ lg ЭИД₅₀ и для человека $\geq -1,4$ $(-1,8 \dots -1,0)$ lg ЭИД₅₀, если учесть что, по данным эпиданализа, симптоматика заболевания у инфицированных людей наблюдается только в ≤ 10 % случаев. Определено также существенное сходство показателей взаимоотношения этого штамма и мышей с таковыми у людей не только на этапах распространения патогена (от органов дыхательного тракта до экстрареспираторных, включая систему доставки вируса), но и по патоморфологическим изменениям и частично по симптоматике заболевания, включая летальный эффект. Все это свидетельствует о потенциальной возможности

использования модельной биосистемы «аутбредная мышь ICR – штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1» для определения как профилактической эффективности разрабатываемых препаратов, так и лечебной.

5.5 Испытание и пределы практического применения модельной биосистемы для гриппа птиц А/Н5N1 на основе аутбредной мыши ICR

Ранее (п. 5.1–5.4) были приведены экспериментальные и теоретические сведения, свидетельствующие о потенциальной возможности применения аутбредных мышей ICR и штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 в качестве модельной биосистемы для изучения защитной эффективности препаратов от гриппа птиц (А/Н5N1). В связи с этим с целью проверки работоспособности такой биосистемы были выполнены соответствующие исследования противовирусной активности имеющихся в России и за рубежом препаратов Реаферон ЕС-липид® и Тамифлю® (Озельтамивир) соответственно, ранее уже продемонстрировавших противогриппозный эффект на других модельных биосистемах.

На первом этапе мышей и/н заражали штаммом A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀) и вводили исследуемые препараты по профилактической, лечебно-профилактической и лечебной схемам. Результаты таких исследований отражены в таблице 5.17.

По данным таблицы 5.17, видно, что количество мышей, обработанных по профилактической схеме препаратом Реаферон-ЕС-липид®, но погибших от гриппа птиц А/Н5N1, было существенно меньше по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$), и не отличалось по этому показателю от групп животных, обработанных Тамифлю® по лечебно-профилактической или лечебной схеме. При этом КЗГ мышей для Реаферон-ЕС-липид® составил 39 %. В то же время не было отмечено защитного эффекта от гибели инфицированных в/пат ВГП А/Н5N1 мышей, которым вводили Реаферон-ЕС-липид® по лечебно-профилактической или лечебной схеме. СПЖ мышей в опытных группах животных, инфицированных в/пат ВГП А/Н5N1 и обработанных препаратом Реаферон-ЕС-липид® в профилактической схеме или Тамифлю® в лечебно-профилактической, лечебной схеме существенно превышало таковую у группы контроля ($p \leq 0,05$).

Обобщая эти результаты, можно отметить, что в экспериментах на мышах, интраназально зараженных 10 LD₅₀ в/пат ВГП А/Н5N1, препаратом Реаферон-ЕС-липидинт® обладал только в профилактической схеме перорального применения высокой защитной эффективностью от гриппа птиц (А/Н5N1): КЗГ = 39 % и СПЖ 12,3 суток, сравнимой с таковой у Тамифлю® (положительный контроль) в лечебно-профилактической и лечебной схемах применения: КЗГ = 61%, СПЖ 13,4 и 13,6 суток соответственно.

Дополнительно был проведен еще один эксперимент по оценке протективной активности препаратов Реаферон ЕС-липидинт® и Тамифлю®, аналогичный вышепредставленному, с той лишь разницей, что дозу заражения мышей штаммом A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 уменьшили на 0,5 lg. Результаты этого исследования представлены в таблице 5.18.

По данным таблицы 5.18, видно, что количество мышей, обработанных по профилактической или лечебно-профилактической схеме препаратом Реаферон-ЕС-липидинт®, но погибших от гриппа птиц А/Н5N1, было существенно ниже по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$), и не отличалось по этому показателю от групп животных, обработанных Тамифлю® по лечебно-профилактической схеме. В то же время не было отмечено защитного эффекта от гибели инфицированных в/пат ВГП А/Н5N1 мышей, которым вводили Реаферон-ЕС-липидинт® по лечебной схеме. СПЖ мышей в опытных группах животных, инфицированных в/пат ВГП А/Н5N1 и обработанных препаратом Реаферон-ЕС-липидинт® в профилактической и лечебно-профилактической схеме, а также Тамифлю® в лечебно-профилактической схеме были существенно выше, чем у группы контроля ($p \leq 0,05$).

Обобщая эти результаты, можно отметить, что в экспериментах на мышах, интраназально зараженных 3 LD₅₀ в/пат ВГП А/Н5N1, препаратом Реаферон-ЕС-липидинт® обладал как в профилактической, так и лечебно-профилактической схеме перорального применения высокой защитной эффективностью от гриппа птиц (А/Н5N1): КЗГ = 56 и 44 %, СПЖ 13,8 и 12,6 суток соответственно, сравнимой с таковой у Тамифлю® в лечебно-профилактической схеме применения: КЗГ = 56% и СПЖ 13,5 суток.

Наименование препаратов	Суточная доза препаратов для мышей	Проверяемый вид защитного действия	Кол-во животных (n)	СПЖ в сутках, М (I ₉₅),	Процент выживших животных	Уровень значимости для выживаемости (p и pY)	КЗГ в %
Реаферон-ЕС-липидт®	1000 ед./г	Профилактический*	20	12,3**** (10,6...14,0)	45****	p = 0,013 pY = 0,034	39
	1000 ед./г	Лечебно-профилактический**	20	10,9 (9,2...12,6)	30	p = 0,113 pY = 0,236	22
	1000 ед./г	Лечебный***	20	9,1 (7,9...10,3)	10	p = 1,0 pY = 0,59	0
Тамифлю®	10 мкг/г	Лечебно-профилактический**	20	13,4**** (11,6...15,1)	65****	p = 0,001 pY=0,000	61
	10 мкг/г	Лечебный***	20	13,6 **** (11,9...15,2)	65****	p = 0,001 pY=0,000	61
Плацебо (контроль)	0,2 мл/мышь	Лечебно-профилактический**	20	9,1 (7,8...10,3)	10	Н.о.	Н.о.
<p>Примечания</p> <p>М – средняя величина</p>							

Продолжение таблицы 5.17

I_{95} - доверительный интервал М с заданной вероятностью 95 %

LD_{50} – 50 %-я летальная доза для мышей

Плацебо – дистиллированная вода

* Мышам перорально вводили Реаферон-ЕС-липид® 2 раза в сутки за 4–1 сутки и за 1 час до заражения (д.з.)

** Мышам перорально вводили: Реаферон-ЕС-липид® 2 раза в сутки в день заражения и в течение 6 суток после инфицирования (п.и.); Тамифлю® за 1 час д.з., через 4 часа п.и., далее 2 раза в сутки в течение 6 суток; плацебо 2 раза в сутки за 4...0 суток д.з. и 1–10 суток п.и.

*** Мышам перорально вводили: Реаферон-ЕС-липид® 2 раза в сутки через 3–9 суток п.и.; Тамифлю® через 4 часа п.и., далее 2 раза в сутки в течение 4 суток

**** Величина выше, чем в контроле, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью критерия χ^2 , точного теста Фишера и для СПЖ U-критерия Манна-Уитни)

СПЖ – средняя продолжительность жизни животных с учетом их числа, проживших определенное количество дней п.и. до специфичной гибели, и числа выживших животных (за максимальное значение продолжительности жизни для выживших животных принимали 16 суток, т.е. следующий день после прекращения гибели инфицированных мышей)

КЗГ – коэффициент защиты от гибели = $100\% \times (\% \text{ погибших животных в отрицательном контроле} - \% \text{ погибших животных в опыте}) / \% \text{ погибших животных в отрицательном контроле}$

p – уровень значимости при сравнении относительных частот (погибшие, выжившие животные)

pY – уровень значимости при сравнении относительных частот с поправкой Йетса

Н.о. – величину не определяют

LD₅₀ – 50 %-я летальная доза для мышей

Продолжение таблицы 5.18

Плацебо – дистиллированная вода

* Мышам перорально вводили Реаферон-ЕС-липид® 2 раза в сутки за 4–1 сутки и за 1 час до заражения (д.з.)

** Мышам перорально вводили: Реаферон-ЕС-липид® 2 раза в сутки в день заражения и в течение 6 суток после инфицирования (п.и.); Тамифлю® за 1 час д.з., через 4 часа п.и., далее 2 раза в сутки в течение 6 суток; плацебо 2 раза в сутки за 4–0 суток д.з. и 1–10 суток п.и.

*** Мышам перорально вводили Реаферон-ЕС-липид® 2 раза в сутки через 3–9 суток п.и.

**** Величина выше, чем в контроле, $p \leq 0,05$ (при сравнении с помощью критерия χ^2 и точного теста Фишера и для СПЖ U-критерия Манна-Уитни)

СПЖ – средняя продолжительность жизни животных с учетом их числа, проживших определенное количество дней п.и. до специфичной гибели, и числа выживших животных (за максимальное значение продолжительности жизни для выживших животных принимали 16 суток, т.е. следующий день после прекращения гибели инфицированных мышей)

КЗГ – коэффициент защиты от гибели = $100\% \times (\% \text{ погибших животных в отрицательном контроле} - \% \text{ погибших животных в опыте}) / \% \text{ погибших животных в отрицательном контроле}$

p – уровень значимости при сравнении относительных частот (погибшие, выжившие животные)

pY – уровень значимости при сравнении относительных частот с поправкой Йетса

Н.о. – величину не определяют

Эксперименты по оценке протективной эффективности препарата Тамифлю® до нас проводили многие исследователи, в том числе с использованием разных штаммов в/пат ВГП А/Н5N1 и линий инбредных мышей [351, 455], и результаты таких исследований по оценке выживаемости животных в общем виде были сходны с нашими данными, полученными на аутбредных мышах ICR и российском штамме A/Chicken/Kurgan/05/2005 этого вируса. Более того, такой препарат активно и с успехом используется по настоящее время для лечения гриппа птиц (А/Н5N1) при эпидемических вспышках этого заболевания [147, 188, 392]. Все это свидетельствует о реальной возможности применения испытанной нами модельной биосистемы «аутбредная мышь ICR – штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1» для изучения защитной эффективности создаваемых препаратов. Используя данную биосистему, в наших экспериментах был так же выявлен выраженный профилактический эффект у российского препарата Реаферон-ЕС-липинт®, который ранее с успехом применялся для защиты людей от сезонного гриппа.

С учетом исследований, проведенных в процессе разработки модельной биосистемы «аутбредная мышь ICR –штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1», и испытаний были определены пределы ее практического применения:

- использование не менее 20 аутбредных мышей ICR (18–22-суточные) обоего пола на каждый опытный и контрольный препарат;
- использование штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1, прошедшего не более трех пассажей (от источника выделения) на куриных эмбрионах или культуре клеток с известной вирулентностью (LD_{50}) для аутбредных мышей ICR (18–22-суточные) обоего пола при интраназальном инфицировании в диапазоне 0,8–1,4 lg ЭИД₅₀;
- инфицирование мышей в/пат ВГП А/Н5N1 интраназальным способом;
- введение мышам 3–100 LD_{50} штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 при и/н инфицировании в объеме 0,03 мл/мышь;
- использование профилактической, лечебной или лечебно-профилактической схемы введения мышам опытных и контрольных препаратов (рекомендуется испытаниям подвергать препараты, ранее продемонстрировавшие противовирусное действие в опытах *in vitro* на в/пат ВГП А/Н5N1);
- введение мышам опытных и контрольных препаратов пероральным способом;

- пероральное введение мышам раствора, суспензии или эмульсии опытных и контрольных препаратов в объеме 0,2 мл/мышь;
- выявление у инфицированных в/пат ВГП А/Н5N1 мышей, обработанных опытным препаратом, наличие/отсутствие гибели и сроков ее наступления в течение 16 суток п.и. в сравнении с контролями;
- статистическое сравнение в опытных и контрольных группах мышей величин показателей средней продолжительности жизни и выживаемости.

Таким образом, с использованием биосистемы «аутбредная мышь ICR – штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1» на примере двух противогриппозных препаратов (Тамифлю® и Реаферон-ЕС-липинт®) подтверждено наличие у них защитного эффекта от гриппа птиц (А/Н5N1), ранее описанного многими исследователями на иных модельных биосистемах, что открывает перспективу ее дальнейшего применения. В экспериментах с помощью данной биосистемы отмечена выраженная профилактическая активность российского препарата Реаферон ЕС-липинт®, ранее применяемого только при сезонном гриппе. Определены пределы практического применению такой модельной биосистемы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ литературы (п. 1.1) по вопросу, связанному с разработкой подходов по созданию модельных биосистем для оценки эффективности средств медицинской защиты от вирусных инфекций, свидетельствует о том, что исследования в этом направлении сориентированы в основном на воспроизведение клинической симптоматики того или иного вирусного заболевания у людей. Нами же была создана и предложена более широкая стратегия дифференцированного поиска модельных биосистем (п. 3), направленная главным образом на воспроизведение тех или иных этапов инфекционного процесса в организме человека. Основываясь на данной стратегии, нами было определено направление исследований по поиску актуальных и доступных модельных биосистем, сориентированное на оценку показателей взаимоотношения некоторых нами отобранных видов подопытных животных с высоковирулентными для людей штаммами ВОО, и в/пат ВГП А/Н5N1 в сравнении с таковыми показателями у человека.

Учитывая, что в России не было ни одной вспышки оспы обезьян у людей и животных, в качестве возбудителя данного заболевания для созданной нами модельной биосистемы был использован известный штамм ВОО (V79-1-005), который относится к кладе ц/афр штаммов, обладающих более выраженной вирулентностью для людей (с летальностью - до 17 % [178, 227]), чем з/афр штаммы этого вируса (летальные случаи не описаны [454]) и имеющий высокую инфекционную активность, по нашим данным, в отношении степных сурков и аутбредных мышей ICR в экспериментах *in vivo*: 2,2 (1,0...3,4) и 2,4 (2,0...2,8) lg БОЕ соответственно. Для кандидатной модельной биосистемы, сориентированной на оценку защитной эффективности препаратов от натуральной оспы, предлагается ВНО (штамм Ind-3a), который продемонстрировал, по нашим данным, высокую инфекционность в экспериментах *in vitro* для человеческих первичных клеток-мишеней МПКМ-МК ($CI_{50} = 0,0$ (-0,1...0,2) lg БОЕ и рассчитанную нами при этом для людей прогнозную величину $ID_{50} = 1,0$ (0,6...1,4) lg БОЕ), а также в экспериментах *in vivo*, по данным литературы [440], на аутбредных мышках ICR высокую ID_{50} : 1,7 (1,3...2,1) lg БОЕ с учетом 10% аппликации вируса в легких при и/н способе заражения. Выбор данного штамма для таких исследований был также основан на том, что он был выделен от больного человека в Азии, во время последней эпидемии натуральной оспы (60–70-е годы прошлого столетия). В качестве возбудителя гриппа птиц (A/H5N1) для разработанной модельной биосистемы был использован российский штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП A/H5N1, который по нашим прогнозным данным, полученным на основе экспериментов *in vitro*, обладает высокой инфекционной активностью для человека, $ID_{50} = -2,4$ (-2,8...-2,0) lg ЭИД₅₀, и имеет самый высокий из восьми исследованных российских штаммов этого вируса показатель вирулентности для мышей при и/н инфицирования: $LD_{50} = -0,9$ (-1,2...-0,6) lg ЭИД₅₀ с учетом 1 % аппликации вируса в легких при данном способе заражения. Больше того, этот вид животных по такой чувствительности к штамму A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП A/H5N1 не уступает человеку, у которого $ID_{50} = \geq -1,4$ (-1,8...-1,0) lg ЭИД₅₀ и оценена по клиническим признакам заболевания с учетом того, что симптоматика заболевания у инфицированных людей наблюдается только в ≤ 10 % случаев.

К настоящему времени исследователи нашли шесть модельных для оспы обезьян видов животных: иммунодефицитные мыши (C57BL/6 *stat1*^{-/-} и CAST/EiJ) [90, 92, 163], сусликов [156, 193, 211], чернохвостых луговых собачек [101, 182, 213], сонь Келлена

[209] и приматов (*Macaca cynomolgus* и *mulatta*) [92, 339, 424]. Но все эти виды животных обладают теми или иными недостатками с точки зрения допустимости их выращивания в неволе, широты ареала обитания, стоимости, удобства и адекватности применения при моделировании у людей оспы обезьян. В то же время из мелких лабораторных животных с целью оценки эффективности разрабатываемых для человека препаратов против гриппа птиц (А/Н5N1), чаще всего использовали инбредных мышей [191, 351, 455]. Такие мыши имеют слабовыраженное генетическое разнообразие, в то время как человеческая популяция по сути является аутбредной (межрасовое скрещивание, межнациональное и межсеме́йное). В связи с этим в данной диссертационной работе приведены экспериментальные данные, нацеленные на подбор аутбредных видов животных для модельных биосистем. Такие животные, моделирующие оспу обезьян и грипп птиц (А/Н5N1) у людей на начальной или на всех его этапах инфекционного процесса, включая в этом случае также клиническую картину заболевания, могут быть использованы для испытания защитной эффективности создаваемых препаратов при различных схемах применения соответственно:

- профилактическая (экстренно-профилактическая) и лечебно-профилактическая;
- профилактическая (экстренно-профилактическая), лечебно-профилактическая и лечебная.

Взятые в основные исследования животные (аутбредные мыши ICR и степные сурки), при респираторном заражении проявляющие близкую к людям чувствительность в отношении ВОО, определенную нами с помощью экспериментальной и прогнозной оценки, можно разделить на 2 категории по основным показателям течения у них инфекционного процесса, вызванного этим возбудителями заболевания при и/н заражении:

1) степные сурки при оспе обезьян, которые воспроизводят основную внешнюю клиническую картину заболевания, в том числе летальный эффект, и инфекционный генерализованный процесс у людей или известных модельных видов животных, включающий в себя три этапа распространения патогена от органов и клеток-мишеней дыхательного тракта до экстрареспираторных, в том числе систему его доставки, а также патологические изменения в тканях и органах;

2) аутбредные мыши ICR при оспе обезьян, которые воспроизводят без внешней клинической картины заболевания инфекционный генерализованный процесс у людей или известных модельных видов животных в части, связанной с первым этапом распро-

странения этиологического агента и отчасти второго и третьего, в том числе типы клеточек-мишеней, а также патологические изменения преимущественно в первичных органах-мишенях.

Сурки в этом смысле, относящиеся к первой категории животных по основным показателям течения у них инфекционного процесса, вызванного ВОО, могут быть применены в экспериментах с этим вирусом как для изучения профилактической (экстренно-профилактической) и лечебно-профилактической активности препаратов, так и лечебной. В то же время аутбредные мыши ICR имеют все основания для участия в экспериментах с ВОО по оценке профилактической (экстренно-профилактической), а также лечебно-профилактической активности исследуемых препаратов. Выполненные исследования с использованием кандидатных модельных животных (сурки и мыши), а также ВОО (штамм V79-1-005) по определению эффективности противооспенных химически синтезированных соединений продемонстрировали реальную возможность применения их с этой целью.

Взятые в основные исследования аутбредные мыши ICR, при респираторном заражении проявляющие близкую к человеку чувствительность к в/пат ВГП А/Н5N1, определенную нами экспериментальным и прогнозным путями, занимают промежуточное место (между 2 категориями животных, описанных для ВНО) по основным показателям течения у них инфекционного процесса, вызванного в/пат ВГП А/Н5N1 при и/н заражении. Эти животные при гриппе птиц (А/Н5N1) воспроизводят частично внешнюю клиническую картину заболевания и инфекционный генерализованный процесс у людей или известных видов модельных животных, включающий в себя три этапа распространения патогена от органов и клеток-мишеней дыхательного тракта до экстра-респираторных, в том числе систему его доставки, а также патологические изменения в тканях и органах. В этом смысле аутбредные мыши ICR могут быть применены в экспериментах с в/пат ВГП А/Н5N1 как для изучения профилактической (экстренно-профилактической) и лечебно-профилактической активности препаратов, так и лечебной.

Обращая внимание на сурков, как на предлагаемую нами модель для оспы обезьян, необходимо отметить, что данный вид животных в отличие от приматов недорогой и менее трудоемкий в использовании с учетом биоэтических норм. В отличие от луговых собачек он выращивается в специализированных питомниках России, подвергается ве-

теринарному контролю, в том числе тестированию на отсутствие патогенных микроорганизмов, а также гельминтов, и может быть взят из дикой природы, учитывая широкий ареал его распространения (Америка, Европа и Азия) [64, 65]. Мышь ICR в отличие от используемых иммунодефицитных и линейных мышей в качестве модельных видов животных для гриппа птиц (А/Н5N1) и оспы обезьян является более дешевым иммунокомпетентным и аутбредным животным, в то время как человеческая популяция также по существу представляется в основном иммунокомпетентной и аутбредной (межрасовое скрещивание, межнациональное и межсемейное).

Основные данные исследований с ВОО, связанные с разработкой модельных биосистем «аутбредная мышь ICR - штамм V79-1-005 ВОО» и «степной сурок - штамм V79-1-005 ВОО», и ВНО, касающиеся подбора кандидатной модельной биосистемы «аутбредная мышь ICR - штамм Ind 3a ВНО», были запатентованы [60, 61] и представлены в отечественных и зарубежных научных публикациях [15, 22, 27, 46, 47, 62, 66, 72, 422, 425, 439]. Также был получен патент [75], опубликованы научные статьи в отечественных и зарубежных изданиях [3, 9, 25, 44, 48, 49, 50, 78, 105, 174, 268, 413], а также изданы две монографии [2, 4], сориентированные на разработку модельной биосистемы «аутбредная мышь ICR - штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1» для оценки эффективности создаваемых препаратов против гриппа птиц (А/Н5N1).

Применяя представленный подход по созданию модельных биосистем для определения эффективности противовирусных препаратов, нами разрабатываются и другие биосистемы «аутбредная мышь ICR - штамм Ind 3a ВНО», «мышь линии SCID - штамм Ind 3a ВНО» «морская свинка – штамм GPA BB» и «аутбредная мышь ICR - штамм A/Salekhard/01/2009 ВГ А/Н1N1pdm» с получением соответствующих патентов [58, 59, 74, 76] и опубликованием научных статей [20, 21, 26, 39, 79, 440]. Кроме того, данный подход может быть также применен для разработки модельных биосистем на основе генномодифицированных (накаутных и трансгенных) и других видов животных.

С использованием разработанных нами модельных биосистем «аутбредная мышь ICR - штамм V79-1-005 ВОО» и «степной сурок - штамм V79-1-005 ВОО» успешно было проведено доклиническое исследование в части, касающейся специфического действия российского противооспенного химиопрепарата НИОХ-14 и получен соответствующий патент [30]. Эксперименты с применением другой разработанной нами модельной биосистемой «аутбредная мышь ICR - штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП

А/Н5N1» продемонстрировали высокую эффективность противогриппозного препарата Реаферон-ЕС-липидт®, на способ применения которого был получен соответствующий патент [57] и опубликована научная статья [48].

Методология прогнозной оценки значения ID_{50} вируса, сориентированная на использование первичных клеточных культур животных и человека, продемонстрировала адекватность результатов при ее применении таковым, полученным в прямых экспериментах на животных. В связи с этим данная методология может быть взята с целью оценки чувствительности к исследуемым патогенам вирусной природы того или иного млекопитающего. Прогнозные величины ID_{50} ВНО, ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1 для людей, определенные на основе экспериментов (*in vitro*), могут быть полезными при поиске других модельных биосистем для изучения как защитной эффективности препаратов от соответствующих инфекций, так и показателей их контагиозности и патогенеза.

На сегодняшний день в организациях, проводящих работы с использованием возбудителей особо опасных инфекций, применяется разработанная нами методология приготовления фрагментов тканей и органов от животных инфицированных этими патогенами для проведения патоморфологического изучения (МУ 1.3.3103-13) [42], которая при исследовании на остаточную инфекционность обеспечивала надежную инактивацию жизнеспособного ВОО в этих биоматериалах. С применением мышей и сурков были разработаны соответствующие методические рекомендации (Оценка защитной эффективности химиопрепаратов с помощью биосистемы «мышь аутбредной популяции ICR - центральноафриканский штамм V79-1-005 вируса оспы обезьян»: МР 4.2.001-16/ Овчинникова А.С. [и др.]. - Кольцово: Гос. научн. центр вирусол. и биотехн. «Вектор», 2016. – 15 с.; Оценка защитной эффективности химиопрепаратов с помощью биосистемы «степной сурок - центральноафриканский штамм V79-1-005 вируса оспы обезьян»: МР 4.2.002-16/ Сергеев А.А [и др.]. - Кольцово: Гос. научн. центр вирусол. и биотехн. «Вектор», 2016. –13 с.). С учетом исследований, проведенных в процессе разработки этих модельных биосистем, а также испытаний, были определены пределы их практического применения. При работе с ВОО на мышах, сурках, первичных культурах клеток человека и животных были использованы методы, описанные в разработанных нами инструкции № 1/02 ГНЦ ВБ «Вектор».

Некоторые материалы данной диссертационной работы, касающиеся гриппа птиц (А/Н5N1), нашли практическое применение в рамках изданных Роспотребнадзором вре-

менных методических указаний [41]. С применением мышей были разработаны соответствующие методические рекомендации (Оценка защитной эффективности препаратов с помощью биосистемы «мышь аутбредной популяции ICR - штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 высокопатогенного вируса гриппа птиц A/H5N1»: МР 4.2.004-16/ Сергеев А.А [и др.]. - Кольцово: Гос. научн. центр вирусол. и биотехн. «Вектор», 2016. – 16 с. «Вектор»). С учетом исследований, проведенных в процессе разработки этой модельной биосистемы и испытания, были определены пределы ее практического применения.

По результатам выполненных исследований сделаны следующие выводы.

1 На основе структурированной методологии поиска модельных животных для вирусных инфекций, учитывающей не только воспроизведение клинических признаков, но и другие, в том числе начальные, стадии инфекционного процесса, созданы три модельные биосистемы: «степной сурок - штамм V79-1-005 вируса оспы обезьян», «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 вируса оспы обезьян» и «аутбредная мышь ICR – штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 высокопатогенного вируса гриппа птиц A/H5N1» для оценки защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (A/H5N1) у человека.

2 При интраназальном инфицировании степных сурков вирусом оспы обезьян (центральноафриканский штамм V79-1-005) в дозах от 2,2 lg БОЕ и выше развивалось оспоподобное заболевание с соответствующими внешними клиническими проявлениями, в частности, наблюдали гипертермию тела, дискретную сыпь на слизистых оболочках и видимой поверхности кожи, подчелюстной одно- или двусторонний лимфаденит, гнойно-серозный блефарит, конъюнктивит и ринит, нарушение координации движения, тремор конечностей, взъерошенность шерсти и повышенная агрессивность. При этом доля заболевших животных зависела от инфицирующей дозы патогена, тогда как по проценту гибели зараженных животных зависимости «доза-эффект» не было. После подкожного заражения сурков вирусом в исследованных дозах наблюдались такие же, как и после интраназального заражения, клинические признаки оспоподобного заболевания и гибель 100 % инфицированных животных.

3 У степных сурков, интраназально зараженных вирусом оспы обезьян, органами первичной репродукции вируса были трахея, легкие и бифуркационные лимфоузлы. В данной модельной биосистеме распространение патогена в организме животных от пер-

вичных к вторичным органам-мишеням происходило лимфогенным путем с размножением в лимфатических органах. При этом максимальное накопление вируса наблюдалось в легких, трахее, носу и коже зараженных животных. У сурков, погибших после подкожного инфицирования вирусом оспы обезьян, его обнаруживали в наиболее высоких титрах в легких, носу, трахее, почках, подмышечных и паховых лимфоузлах, яичниках или яичках и кожных кусочках с оспинами, в умеренных – в головном мозге, брыжеечных и поднижнечелюстных лимфоузлах и поджелудочной железе, а в самых низких – в селезенке, сердце и печени.

4 Клиническая картина заболевания у аутбредных мышей ICR наблюдалась при интраназальном инфицировании вирусом оспы обезьян в максимальных дозах (5,0 и 5,5 lg БОЕ) и сопровождалась скудной симптоматикой (гнойный блефарит, конъюнктивит и взъерошенность шерсти) без летального исхода. Вместе с тем по наличию вируса в легких через 7 суток после заражения мышей была определена 50 %-я инфицирующая доза патогена для данной модельной биосистемы, находящаяся в диапазоне 2,0–2,8 lg БОЕ.

5 У аутбредных мышей ICR, интраназально зараженных возбудителем оспы обезьян, наблюдалась генерализованная инфекция с гематогенным механизмом диссеминации вируса, включая его размножение в крови. Органами максимальной репродукции патогена у животных этого вида являлись легкие, нос и головной мозг, умеренно выраженная репродукция вируса обнаружена в печени, двенадцатиперстной кишке и почках.

6 У степных сурков и аутбредных мышей ICR, интраназально инфицированных вирусом оспы обезьян, его размножение наблюдалось в известных для ортопоксвирусов первичных клетках-мишенях (эпителиоциты и мононуклеарные фагоциты респираторных органов), а также в других клетках (эндотелиоциты, плазмоциты, фибробласты, ретикулярные и гладкомышечные клетки). У заболевших и погибших сурков после подкожного и интраназального заражения вирусом выявлены выраженные воспалительно-некротические повреждения, характерные для ортопоксвирусных инфекций, в респираторных органах, коже, селезенке, почках, лимфоузлах и тимусе. У интраназально инфицированных вирусом мышей патологические изменения были такими же, но ограничены в основном респираторными органами.

7 Восемь исследованных штаммов высокопатогенного вируса гриппа птиц A/H5N1 по летальному эффекту при интраназальном заражении аутбредных мышей ICR

разделились на три группы: высоковирулентная ($LD_{50} < 3,0 \lg ЭИД_{50}$) - A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Chicken/Crimea/04/2005, A/Chicken/Omsk/2006, A/Chicken/Krasnodar/02/2006, A/Chicken/Dagestan/2006; умеренно вирулентная ($LD_{50} = 3,0-4,5 \lg ЭИД_{50}$) - A/Duck/Kurgan/08/2005; авирулентная ($LD_{50} > 4,5 \lg ЭИД_{50}$) - A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005. В то же время все эти штаммы проявляли высокую вирулентность при аэрозольном и интраназальном заражении кур генетической линии Род-Айланд. Чувствительность кур к штамму A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005, судя по LD_{50} , при аэрозольном инфицировании была выше в 30 раз, чем при интраназальном, в 500 раз, чем при оральном, и в 10000 раз, чем при интрагастральном.

8 У аутбредных мышей ICR, интраназально зараженных штаммами высокопатогенного вируса гриппа птиц A/H5N1 A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Duck/Kurgan/08/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в дозах $10 LD_{50}$ или $10 ID_{50}$, органами его первичного размножения и максимальной репродукции являлись легкие и трахея. Накопление патогена отмечено и в других органах и тканях мышей: головной мозг, слизистая носа, почки, селезенка, печень, мочевого пузырь и поперечнополосатая мышечная ткань. При этом распространение патогена от первичных к вторичным органам-мишеням мышей происходило гематогенным путем. У кур, интраназально инфицированных штаммами высокопатогенного вируса гриппа птиц A/H5N1 A/Chicken/Kurgan/05/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в дозах 3 и $10 LD_{50}$, органом его первичной репродукции являлся нос. Кроме того, накопление вируса наблюдали во многих других органах и в сыворотке крови кур, что свидетельствует о гематогенном пути его диссеминации. При этом наиболее высокие концентрации вируса, отмечены в легких, сыворотке крови, клоаке, почках и кишечнике.

9 У мышей, интраназально инфицированных штаммом высокопатогенного вируса гриппа птиц A/H5N1 A/Chicken/Kurgan/05/2005, отмечено его размножение в традиционных для этого патогена первичных клетках-мишенях (эпителиоциты респираторных органов). При этом, как и у человека, в трахее и слизистой носа мышей наблюдали воспалительно-некротические изменения, а в легких, головной мозге, почках и селезенке дополнительно регистрировали кровоизлияния и тромбоз кровеносных капилляров.

10 На модельных биосистемах «степной сурик - штамм V79-1-005 вируса оспы обезьян», «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 вируса оспы обезьян» при перо-

ральном применении химически синтезированных соединений НИОХ-14 и ST-246 показано наличие у них антиортопоксвирусной активности, ранее описанной другими исследователями, что доказывает возможность использования данных модельных биосистем для изучения защитного действия препаратов от оспы обезьян. При использовании модельной биосистемы «аутбредная мышь ICR – штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 высокопатогенного вируса гриппа A/H5N1» и препаратов Тамифлю и Реаферон-ЕС-липид показано их противовирусное действие, ранее зарегистрированное в других исследованиях, что является доказательством правомерности применения данной модельной биосистемы для изучения эффективности противогриппозных препаратов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БОЕ	- бляшкообразующая единица
ВГ	- вирус гриппа
ВГП	- вирус гриппа птиц
ВНО	- вирус натуральной оспы
ВВ	- вирус вакцинии
В/м	- внутримышечно
ВОЗ	- Всемирная организация здравоохранения
ВОО	- виру оспы обезьян
В/пат	- высокопатогенный
ГНЦ ВБ «Вектор»	- Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
З/афр	- западноафриканский
И/н	- интраназально
КЗГ	- коэффициент защиты от гибели = $100\% \times (\% \text{ погибших животных в контроле} - \% \text{ погибших животных в опыте}) / \% \text{ погибших животных в контроле}$
КЗЗ	- коэффициент защиты от заболевания = $\% \text{ заболевших животных в контроле} - \% \text{ заболевших животных в опыте}$
КЗИ	- коэффициент защиты от инфицирования = $100\% \times (\% \text{ животных имеющих вирус в исследуемом органе в контроле} - \% \text{ животных имеющих вирус в исследуемом органе в опыте}) / \% \text{ животных имеющих вирус в исследуемом органе в контроле}$
КРС	- крупный рогатый скот
МПКМ-МК	- монослой первичной культуры моноцитов-макрофагов крови
МПКМС	- монослой первичной культуры макрофагов селезенки
МПКПМ	- монослой первичной культуры перитонеальных макрофагов
МР	- методические рекомендации
НИОХ	- Новосибирский институт органической химии
ООЕ	- оспиннообразующая единица

ОТ-ПЦР	- обратнo транскриптазная полимеразная цепная реакция
П.и.	- после инфицирования
П/к	- подкожный
РНК	- рибонуклеиновая кислота
Роспотребнадзор	- Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
РФ	- Российская Федерация
СО РАН	- Сибирского отделения российской академии наук
СПЖ	- средняя продолжительность жизни
СПКГК	- суспензия первичной культуры гранулоцитов крови
СПККЛ	- суспензия первичной культуры клеток легких
СПКМК	- суспензия первичной культуры мононуклеаров крови
США	- Соединенные Штаты Америки
ТЦД ₅₀	- 50 %-я тканевая цитопатогенная доза
Ц/афр	- центральноафриканский
ЭИД ₅₀	- 50 %-я эмбриональная инфицирующая доза
СА	- сиаловая кислота
CID ₅₀	- 50 %-я инфицирующая доза для культуры клеток
DMEM	- культуральная питательная среда
ID ₅₀	- 50 %-я инфицирующая доза
IVPI	- внутривенный индекс патогенности для кур
LD ₅₀	- 50 %-я летальная доза
p	- вероятность ошибки 1-го рода
PRNT ₅₀	- обратный титр антител, вызывающий 50 %-е снижение количества бляшек в инфицированном вирусом монослое культуры клеток
RPMI-1640	- культуральная питательная среда
Vero	- перевиваемая культура клеток почки зеленой мартышки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Бургасов, П.Н. Натуральная оспа/ П.Н. Бургасов, Г.П. Николаевский. - М.: Медицина, 1972. - 208 с.
- 2 Вакциноуправляемые респираторные вирусные инфекции. Грипп, корь, эпидемический паротит, краснуха/ А.П. Агафонов, О.А. Агафонова, М.Ш. Азаев [и др.]; под ред. И.Г. Дроздова. - Новосибирск: Изд-во Типография № 1, 2008. – 210 с.
- 3 Валидация модифицированного алгоритма прогнозирования восприимчивости хозяина к вирусам с учетом параметров восприимчивости первичных культур клеток-мишеней и факторов врожденного иммунитета/ В.А. Жуков, Л.Н. Шишкина, А.С. Сафатов [и др.]// Вестник РАМН. – 2010. - №5. – С. 24-29.
- 4 Вирус гриппа А (H5N1): атлас патологических изменений внутренних органов домашней птицы / Г.Г. Онищенко, Е.М. Малкова, О.С. Таранов [и др.]; под ред. Г.Г.Онищенко, И.Г.Дроздова. - Новосибирск: Информ-Экспресс, 2009. - 240 с.
- 5 Вирус оспы обезьян – возбудитель оспоподобного заболевания человека/ С.С. Маренникова, Э.М. Шелухина, Н.Н. Мальцева, И.Д. Ладный// Вопр. Вирусол. – 1971. – №4. – С. 463-469.
- 6 Возможный механизм сохранения некоторых ортопоксвирусов в природе/ Э.М. Шелухина, Л.С. Шенкман, Э.Э. Розина, С.С. Маренникова// Вопр. вирусол. – 1979. - №4. – С. 368-372.
- 7 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.
- 8 Гриппозные рекомбинантные вакцины/ Е.С. Седова, Д.Н. Щербинин, А.И. Мигунов [и др.]// Acta naturae. – 2012. - №4(4). – С. 17-27.
- 9 Диссеминация вируса гриппа птиц А/Н5N1 при интраназальном инфицировании кур/ О.К. Демина, А.А. Сергеев, О.В. Пьянков [и др.]// Пробл. особо опасных инф. – 2012. - №112. – С. 65-69.
- 10 Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов. Основные положения/ РД 42-28-8-89. – М., 1989.
- 11 Жуков, В.А. Методология прогнозирования восприимчивости хозяина к вирусным инфекциям и её использование для выбора противовирусных препаратов: дис.

... докт. биол. наук: 03.00.06/ Жуков Владимир Александрович. - Кольцово, Новосибирская обл., 2011. - 324 с.

12 Закс Л. Статистическое оценивание/ Л. Закс. - М.: Статистика, 1976. – 598 с.

13 Изучение возможности прогнозирования чувствительности к гриппу различных отделов респираторного тракта хозяина/ В.А. Жуков, Л.Н.Шишкина, А.А. Сергеев [и др.]// Вестник РАМН. – 2007. - №5. – С. 32-37.

14 Изучение восприимчивости клеток-мишеней и активности фагоцитов легких при снижении резистентности мышей к вирусу гриппа на фоне глюкокортикоидной иммуносупрессии/ М.А. Сметанникова, Л.Н. Шишкина, В.А. Жуков [и др.]// Вестник РАМН. – 2007. - №1. – С. 3-8.

15 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.

16 Изучение противовирусной активности химически синтезированных соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*/ А.С. Кабанов, Л.Н. Шишкина, А.А. Сергеев [и др.]// Диагностика и профилактика инфекционных болезней: Материалы научно-практической конференции “Диагностика и профилактика инфекционных болезней”, Новосибирск, 26 – 28 сент. 2013. - Изд-во «Ареал», 2013. – С.184-186.

17 Изучение профилактической и терапевтической эффективности нового отечественного химиопрепарата Ингавирин® в отношении возбудителя гриппа А (H5N1)/ С.Я. Логинова, С.В. Борисевич, О.М. Шкляева и [др.]// Антибиотики и химиотерапия. – 2010. – №55(7-8). – С. 10-12.

18 Изучение чувствительности белых мышей к вирусу гриппа (А/АИЧИ/2/68) при аэрогенном заражении с учетом осаждения аэрозоля в их дыхательном тракте/ А.Н. Сергеев, О.Г. Пьянкова, Л.Е. Булычев [и др.]// Вопр. вирусол. – 1999. - №44(2). – С. 69-71.

19 Изучение чувствительности животных и первичных культур клеток-мишеней к особо опасным ортопоксвирусам/ А.А. Сергеев, А.С. Кабанов, Л.Е. Булычев [и др.]// Диагностика и профилактика инфекционных болезней: Материалы научно-практической конференции “Диагностика и профилактика инфекционных болезней”, Новосибирск, 26 – 28 сент. 2013. - Изд-во «Ареал», 2013. – С. 23-25.

20 Изучение эффективности анаферона детского у мышей, инфицированных пандемическим вирусом гриппа А (H1N1/09)v/ Л.Н. Шишкина, М.О. Скарнович, А.С. Кабанов [и др.]/ ЖМЭИ. – 2011. - №1. – С. 83-86.

21 Изучение эффективности Ингавирина *in vivo* в отношении штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1/09)v/ Л.Н. Шишкина, В.Е. Небользин, М.О. Скарнович [и др.]/ Антибиотики и химиотерапия. – 2010. - №55(5/6). – С. 32-35.

22 Изучение эффективности химических синтезированных соединений против ортопоксвирусов/ Л.Е. Булычев, А.А. Сергеев, А.С. Кабанов [и др.]/ Дальневост. журнал инфек. пат. – 2012. - №20. – С. 102-105.

23 Инфекционные болезни и эпидемиология: Учебник/ В.И. Покровский, С.Г. Пак, Н.И. Брико, Б.К. Данилкин. - 2-е изд. - М.: Геотар-Мед, 2004.

24 Инфекционные свойства вируса натуральной оспы на первичных культурах моноцит-макрофагов человека и мыши/ А.С. Замедьянская, К.А. Титова, А.А. Сергеев [и др.]/ 1-я международная конференция молодых ученых: Сборник тезисов Новосиб. Гос. Ун-та, Новосибирск, 5-10 сент. 2014. - РИЦ НГУ, 2014. – С. 64–67.

25 Инфекционные свойства штаммов вируса гриппа птиц А/Н5N1 в экспериментах на мышах/ А.А. Сергеев, О.В. Пьянков, О.К. Демина [и др.]/ Пробл. особо опасных инф. – 2011. - №3(109). – С. 40-43.

26 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.

27 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.

28 Капцова, Т.И. Разработка экспериментальных моделей натуральной оспы: дис. ... канд. мед. наук: 03.00.06/ Капцова Татьяна Ивановна. - М., 1967. – 147 с.

29 Клинико-вирусологические характеристики заболевания морских свинок, аэрогенно инфицированных вирусом Марбург/ М.Ю. Луб, А.Н. Сергеев, О.В. Пьянков [и др.]/ Вопр. Вирусол. – 1995. - №3. – С. 119-121.

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

31 Луговые собачки [Электронный ресурс]/ Википедия. Свободная энциклопедия. – Режим доступа: https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9B%D1%83%D0%B3%D0%BE%D0%B2%D1%8B%D0%B5_%D1%81%D0%BE%D0%B1%D0%B0%D1%87%D0%BA%D0%B8.

32 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.

33 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.

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

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

36 Мейхм, Б. Вирусология. Методы/ Б. М. Мейхм. - М.: Мир, 1988. - 395 с.

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

38 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.

39 Некоторые патогенетические характеристики гриппозной инфекции у белых мышей/ О.Г. Пьянкова, Л.Е. Булычев, А.Н. Сергеев [и др.]// Вопр. Вирусол. – 1997. - №5. – С. 216-218.

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

41 Организация и проведение лабораторной диагностики заболеваний, вызванных высокопатогенными штаммами вируса гриппа типа А (ВГА), у людей: Временные

МУ: Введены в действие письмом № 01/5963-9-23 руководителя Роспотребнадзора от 01.05.09. Режим доступа: <http://27.rospotrebnadzor.ru/documents/ros/letters/2587/>.

42 Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I-IV групп патогенности: МУ 1.3.3103-13: утв. руководителем Роспотребнадзора 16.08.2013. – бюл. норм. и метод. документов Госсанэпиднадзора. - 2014. - №4. - Система ГАРАНТ: <http://base.garant.ru/70585158/#ixzz3L0vBHjmT>.

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

44 Особенности поражения легких при интраназальном заражении мышей штаммами разной вирулентности вируса гриппа субтипа H5N1/ Е.И. Рябчикова, Е.М. Малкова, О.С. Таранов [и др.]//Современные проблемы инфекционной патологии человека: Сб. науч. трудов Минздрав Республики Беларусь, ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии». - Минск, 2008. - Вып. 1. - С. 108 – 112.

45 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.

46 Оценка чувствительности животных к особо опасным ортопоксвирусам с использованием первичных культур клеток легких/ А.С. Замедянская, Ал.А. Сергеев, К.А. Титова [и др.]// Пробл. особо опасных инф., 2016; 1: 75-78.

47 Оценка чувствительности человека к вирусу натуральной оспы с использованием первичных культур моноцитов-макрофагов/ А.С. Замедянская, К.А.Титова, Ал.А. Сергеев [и др.]// Вопр. вирусол., 2016; 2: 69-73.

48 Оценка эффективности схем применения препарата Реаферона-ЕС-липидта у мышей, инфицированных вирусом гриппа птиц/ О.К. Демина, А.А. Сергеев, А.П. Агафонов [и др.]//Достижения современной биотехнологии: Сб. науч. тр.; Под ред. проф. И. Г. Дроздова. - Новосибирск, 2008. - С. 17 – 23.

49 Патологические изменения воздухопроводящего компартмента легких мышей при экспериментальном гриппе птиц А/H5N1/ Е.М. Малкова, О.С. Таранов, А.П. Агафонов [и др.]// Биомедицинский журнал (www.medlme.ru). - 2009. – №10. - С. 492-507.

50 Патологические изменения респираторного компартмента легких мышей при экспериментальном гриппе птиц А/Н5N1/ Е.М. Малкова, О.С. Таранов, А.П. Агафонов [и др.]// Биомедицинский журнал (www.medime.ru). - 2009. - №10. - С. 508-523.

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

52 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.

53 Репродукция вируса гриппа в клетках эндотелия кровеносных сосудов человека/ И.Н. Жилинская, А.А. Азаренок, Е.В. Ильинская [и др.]// Вопр. Вирусол. – 2012. - №2. – С. 20-23.

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

55 Сергеев, А.А. Изучение репродукции вируса гриппа в первичных культурах клеток респираторных органов для прогноза его инфекционности *in vivo*: дисс. ... канд. мед. наук: 03.02.02/ Сергеев Артемий Александрович. – Кольцово Новосибирской обл., 2008. - 173 с.

56 Сергеев, А.А. Сурок - модельное животное для оспы обезьян: исследование и использование при оценке эффективности противовирусных препаратов: дисс. ... канд. мед. наук: 03.00.06/ Сергеев Александр Александрович. – Кольцово Новосибирской обл., 2016. - 132 с.

57 Способ защиты организма от инфекции, вызванной штаммами субтипа H1N1 вируса гриппа А препаратом на основе альфа-2 интерферона человека: пат. 2523554 Рос. Федерация: МПК А61K38/21 А61P31/16/ А.П. Агафонов, Л.Н. Шишкина, А.А. Сергеев [и др.]; заявитель и патентообладатель Гос. научн. центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - № 2013113846/15; заявл. 27.03.13; опубл 20.07.2014, бюл. №20. - 15 с: ил.

58 Способ оценки активности лечебно-профилактических препаратов против вируса натуральной оспы: пат. 2522483 Рос. Федерация: МПК А61K 35/76 А61P 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.

59 Способ оценки активности лечебно-профилактических препаратов против вируса натуральной оспы: пат. 2565812 Рос. Федерация: МПК C12N 7/00 A61K 35/76 A61P 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.

60 Способ оценки противооспенной активности лечебно-профилактических препаратов: пат. 2496149 Рос. Федерация: МПК G09B 23/28/ А.А. Сергеев, А.С. Кабанов, Л.Е. Булычев [и др.]; заявитель и патентообладатель Гос. научн. центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - № 2012125678/14; заявл. 19.06.12; опубл. 20.10.13, бюл. № 29. - 12 с: ил.

61 Способ оценки противооспенной активности лечебно-профилактических препаратов: пат. 2526504 Рос. Федерация: МПК C12N 7/00 A61K 35/76 A/61K 39/275 A61P 31/20/ А.А. Сергеев, А.С. Кабанов, Л.Е. Булычев [и др.]; заявитель и патентообладатель Гос. научн. центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - №2013113847/10; заявл. 27.03.13; опубл. 20.08.14, бюл. № 23. - 17 с: ил.

62 Сравнительное изучение противовирусной активности химических соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах *in vivo*/ А.С. Кабанов, А.А. Сергеев, Л.Н. Шишкина [и др.]/// Вопр. вирусол. – 2013. - № 4. – С. 39-43.

63 Сравнительный анализ восприимчивости и продуктивности клеток-мишеней респираторного тракта мышей и крыс при заражении вирусом гриппа *in vitro*/ В.А. Жуков, Л.Н. Шишкина, А.А. Сергеев [и др.]/// Вестник РАМН. – 2008. - №2. – С. 12-16.

64 Сурки [Электронный ресурс]/ Википедия. Свободная энциклопедия. – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D1%83%D1%80%D0%BA%D0%B8>.

65 Сурки [Электронный ресурс]/ Энциклопедия животных. - Режим доступа: <http://www.animalsglobe.ru/surki/>.

66 Течение заболевания у сурков при интраназальном заражении вирусом оспы обезьян/ А.А. Сергеев, А.С. Кабанов, Л.Е. Булычев [и др.]/// Вопр. вирусол. – 2015. - №6. – С. 37-41.

67 Течение инфекции у морских свинок, аэрогенно зараженных вирусом везикулярного энцефаломиелита лошадей/ Л.Е. Булычев, А.Н. Сергеев, А.Б. Рыжиков [и др.]/// Вопр. вирусол. – 1995. - №3. – С. 122-124.

68 Тихонов, В.Н. Лабораторные мини-свиньи: генетика и медико-биологическое использование/ В.Н. Тихонов. - Новосибирск: изд-во СО РАН, 2010. - 304 с.

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

70 Халафян, А.А. Statistica 6. Статистический анализ данных/ А.А.Халафян. - 2-е изд. - М.: ООО «Бином-Пресс», 2010. - 310 с.

71 Ходакевич, Л.Н. Экологические и эпидемиологические аспекты оспы обезьян: дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.06/ Ходакевич Лев Николаевич. - М., 1990. - 320 с.

72 Чувствительность различных видов животных к вирусу оспы обезьян/ А.А. Сергеев, Л.Е. Булычев, О.В. Пьянков [и др.]// Пробл. особо опасных инф. - 2012. - №1(111). - С. 88-92.

73 Шелухина, Э.М. Биология и экология ортопоксиров, патогенных для человека: дис. ... д-ра. мед. наук: 03.00.06/ Шелухина Эльвира Матвеевна. - М; 1980. - 336 с.

74 Штамм A/Salekhard/01/2009(H1N1)v вируса гриппа для изучения лечебно-профилактической эффективности препаратов против пандемического варианта вируса гриппа А: пат. 2457242 Рос. Федерация: МКП С12N 1/00 А61К 39/145 / А.П. Агафонов, В.А. Терновой, Л.Н. Шишкина [и др.]; заявитель и патентообладатель Гос. научн. центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - № 2011124677/10; заявл. 16.06.2011; опубл. 27.07.2012, бюл. № 21. - 19 с: ил.

75 Штамм вируса гриппа птиц A/Chicken/Kurgan/05/2005 субтип H5N1 для изучения активности лечебных и профилактических препаратов против вируса гриппа: пат. 2361917 Рос. Федерация: МКП С12N 7/00 А61К 39/145 / А.П. Агафонов, В.А. Терновой, М.М. Писарева [и др.]; заявитель и патентообладатель Гос. научн. центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - №2008106698/13; заявл. 20.02.2008; опуб. 20.07.2009, бюл. №20. - 18 с: ил.

76 Штамм GРА вируса осповакцины для исследования эффективности противовирусных препаратов in vivo и оценки схем купирования нежелательных поствакцинальных реакция при первичном оспопрививании: пат. 2542400 Рос. Федерация: МКП С12N 7/00 А61К 39/42 А61К 35/76 / Д.О. Горбатовская, А.А. Сергеев, Е.В. Шевцова [и

др.]; заявитель и патентообладатель Гос. научн. центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - № 2013155851/10; заявл. 16.12.2013; опуб. 20.02.2015, бюл. № 5. - 20 с: ил.

77 Экспериментальная лихорадка Эбола у макак резусов/ О.В. Пьянков А.Н. Сергеев, О.Г. Пьянкова, А.А. Чепурнов// *Вопр. вирусол.* – 1995. - №3. – С. 113-115.

78 Экспериментальное обоснование аэрозольного применения Реаферона. Часть III. Экспериментальная оценка возможности аэрозольного применения реаферона для профилактики и лечения модельной инфекции гриппа/ С.А. Киселев, Е.А. Ставский, А.А. Сергеев [и др.]// *Достижения современной биотехнологии: Сб. науч. тр.; Под ред. проф. И. Г. Дроздова.* - Новосибирск, 2008. - С.40 – 50.

79 Эффективность Ингавирина *in vitro* и *in vivo* в отношении штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1/09)v/ Л.Н. Шишкина, В.Е. Небользин, А.С. Кабанов [и др.]// *ЖМЭИ.* – 2011. - №2. –С.93-96.

80 Abortive replication of influenza virus in mouse dendritic cells/ L.J. Ioannidis, E.E. Verity, S. Crawford [et al.]// *J. Virol.* – 2012. – Vol. 86. – P. 5922–5925.

81 Abortive replication of vaccinia virus in activated rabbit macrophages/ N.A. Buchmeier, S.R. Gee, F.A. Murphy, W.E. Rawls// *Infect. Immun.* – 1979. – Vol. 26(1). – P. 328-338.

82 A child with avian influenza A (H5N1) infection/ K. Chokeyhaibulkit, M. Uprasertkul, P. Puthavathana [et al.]// *Pediat. Infec. Dis. J.* – 2005. – Vol. 24. – P. 162-166.

83 Activities of alkoxy-alkyl esters of cidofovir (CDV), cyclic CDV, and (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine against orthopoxviruses in cell monolayers and in organotypic cultures/ I. Lebeau, G. Andrei, F. Dal Pozzo [et al.]// *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2006. – Vol. 50(7). – P. 2525-2529.

84 Activities of several classes of acyclic nucleoside phosphonates against camelpox virus replication in different cell culture models/ S. Duraffour, R. Snoeck, M. Krecmerova [et al.]// *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2007. – Vol. 51(12). – P. 4410–4419.

85 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.

86 Adaptation of pandemic H1N1 influenza viruses in mice/ N.A. Ilyushina, A.M. Khalenkov, J.P. Seiler [et al.]// *J. Virol.* – 2010. – Vol. 84. – P. 8607–8616.

- 87 Afilalo, M. Evaluation and management of seasonal influenza in the emergency department/ M. Afilalo, E. Stern, M. Oughton// *Emerg. Med. Clin. N. Am.* – 2012. – Vol. 30. – P. 271–305.
- 88 Age-related sensitivity and pathological differences in infections by 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus/ S. Sun, G. Zhao, W. Xiao [et al.]// *Virology J.* – 2011. – Vol. 8. – Art. 52.
- 89 Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets/ S. Herfst, E.J.A. Schrauwen, M. Linster [et al.]// *Science*. – 2012. – Vol. 336(6088). – P. 1534-1541.
- 90 Americo, J.L. Identification of wild-derived inbred mouse strains highly susceptible to monkeypox virus infection for use as small animal models/ J.L. Americo, B. Moss, P.L. Earl// *J. Virol.* – 2010. – Vol. 84(16). – P. 8172–8180.
- 91 A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A (H5N1) viruses isolated from humans/ X. Lu, T.M. Tumpey, T. Morken [et al.]// *J. Virol.* – 1999. – Vol. 73(7). – P. 5903-5911.
- 92 A mouse model of lethal infection for evaluating prophylactics and therapeutics against monkeypox virus/ J. Stabenow, R.M. Buller, J. Schriewer [et al.]// *J. Virol.* – 2010. – Vol. 84(8). – P. 3909-3920.
- 93 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.
- 94 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.
- 95 A novel highly reproducible and lethal nonhuman primate model for orthopox virus infection/ M. Kramski, K. Matz-Rensing, C. Stahl-Hennig [et al.]// *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 5(4)/ - e10412.
- 96 A novel respiratory model of infection with monkeypox virus in cynomolgus macaques/ A.J. Goff, J. Chapman, C. Foster [et al.]// *J. Virol.* – 2011. – Vol. 85(10). – P. 4898-4909.
- 97 Antivaccinia activities of acyclic nucleoside phosphonate derivatives in epithelial cells and organic cultures/ R. Snoeck, A. Holy, C. Dewolf-Peeters [et al.]// *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2002. – Vol. 46. – P. 3356-3361.

- 98 Antiviral treatment is more effective than smallpox vaccination upon lethal monkeypox virus infection/ K.J. Stittelaar, J. Neyts, L. Naesens [et al.]// *Nature*. – 2006. – Vol. 439. – P. 745–748.
- 99 Apoptosis and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) virus in humans/ M. Uiprasertkul, T.C. Kitphati, P. Pathavathana [et al.]// *Emerg. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 13. – P. 708-712.
- 100 A pox-like disease in cynomolgus monkeys/ P. von Magnus, E.K. Andresen, K.B. Petersen, A. Birch-Andersen// *Acta Path. Microbiol. Scand.* – 1959. – Vol. 46. – P. 156-176.
- 101 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.
- 102 A protein-based smallpox vaccine protects non-human primates from a lethal monkeypox virus challenge/ G.W. Buchman, M.E. Cohen, Y. Xiao [et al.]// *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – P. 6627–6636.
- 103 Arita, I. Smallpox and Monkeypox in Non-human Primates/ I. Arita, D.A. Henderson// *Bull. WHO*. – 1968. – Vol. 39. – P. 277-283.
- 104 Armstrong, S.M. Endothelial activation and dysfunction in the pathogenesis of influenza A virus infection/ S.M. Armstrong, I. Darwish, W.L. Lee// *Virulence*. – 2013. – Vol. 4(6). – P. 537-142.
- 105 Assessing the risk of Influenza virus strains isolated from birds and mammals to humans/ G. Vdovichenko, A. Sergeev, O.K. Demina [et al.]// *J. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 14(1). – e87-e88.
- 106 Assessment of the protective effect of Imvamune and Acam2000 vaccines against aerosolized monkeypox virus in Cynomolgus macaques/ G.J. Hatch, V.A. Graham, K.R. Bewley [et al.]// *J. Virol.* – 2013. – Vol. 87(14). – P. 7805–7815.
- 107 Association of increased pathogenicity of Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens with highly efficient viral replication accompanied by early destruction of innate immune responses/ K. Suzuki, H. Okada, T. Itoh [et al.]// *J. Virol.* – 2009. – Vol. 83(15). – P. 7475-7486.
- 108 A tale of two clades: monkeypox viruses/ A.M. Likos, S.A. Sammons, V.A. Olson [et al.]// *J. Gen. Virol.* – 2005. – Vol. 86. – P. 2661–2672.

- 109 Attenuated and replication-competent vaccinia virus strains M65 and M101 with distinct biology and immunogenicity as potential vaccine candidates against pathogens// L. Sánchez-Sampedroa, E.C. Gómez, E. Mejías-Pérez [et al.]// *Virol.* – 2013. – Vol. 87 (12). – P. 6955-6974.
- 110 Attenuated NYCBH vaccinia virus deleted for the E3L gene confers partial protection against lethal monkeypox virus disease in cynomolgus macaques/ K.L. Denzler, T. Babas, A. Rippeon et al.// *Vaccine.* – 2011. – Vol. 29. – P. 9684–9690.
- 111 Avian flu: influenza virus receptors in the human airway/ K. Shinya, M. Ebina, S. Yamada [et al.]// *Nature.* – 2006. – Vol. 440. – P. 435–436.
- 112 Avian influenza A (H9N2): computational molecular analysis and phylogenetic characterization of viral surface proteins isolated between 1997 and 2009 from the human population/ A.M. Butt, S. Siddique, M. Idrees, Y. Tong// *Virol. J.* – 2010. – Vol. 7. – P. 319.
- 113 Avian influenza A (H5N1) infection in eastern Turkey in 2006/ A.F. Oner, A. Bay, S. Arslan [et al.]// *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 355. – P. 2179–2185.
- 114 Avian influenza A (H5N1) infection in humans/ J.H. Beigel, J. Farrar, A.M. Han [et al.]// *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 353(13). – P. 1374-1385.
- 115 Avian influenza A (H7N2) outbreak in the United Kingdom// *Euro Surveill.* – 2007. – Vol. 12. - E070531 2.
- 116 Avian influenza virus A(H10N7) circulating among humans in Egypt/ Washington: PAHO. - 2004. - Available from: http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2010/Avian_Influenza_Egypt_070503.pdf.
- 117 Avian influenza virus (H5N1) replication in feathers of domestic waterfowl/ Y. Yamamoto, K. Nakamura, M. Okamatsu [et al.]// *Emerg. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 14(1). – P. 149-151.
- 118 Avila, F.R. Specific macrophage immunity to vaccinia virus: macrophage-virus interaction/ F.R. Avila, R.M. Schultz, W.A.F. Tompkins// *Infect. Immun.* – 1972. – Vol. 6. – P. 9-16.
- 119 Azambuja, M.I. A parsimonious hypothesis to the cause of influenza lethality and its variations in 1918-1919 and 2009/ M.I. Azambuja// *Med. Hypotheses.* – 2010. – Vol. 74 (4). – P. 681-684.

120 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.

121 Bayer-Garner, I.B. Monkeypox virus: histologic, immunohistochemical and electron-microscopic findings/ I.B. Bayer-Garner// *J. Cut. Pathol.* – 2005. – Vol. 32. – P. 28-34.

122 Bernard, S.M. Qualitative assessment of risk for monkeypox associated with domestic trade in certain animal species, United States/ S.M. Bernard, S.A. Anderson// *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 12(12). – P. 1827-1833.

123 Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong/ P. Gao, S. Watanabe, I. Toshihiro [et al.]// *J. Virol.* – 1999. – Vol. 73(4). – P. 3184–3189.

124 Blicklé, J.F. Meglitinide analogues: a review of clinical data focused on recent trials/ J.F. Blicklé// *Diabetes & Metabolism.* – 2006. - Vol. 32 (2). - P. 113–120.

125 Boone, S.A. Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease/ S.A. Boone, C.P. Gerba// *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. - Vol. 73 (6). – P. 1687-1696.

126 Bouvier, N.M. Animal models for influenza virus pathogenesis and transmission/ N.M. Bouvier, A.C. Lowen// *Viruses.* – 2010. – Vol. 2. – P. 1530–1563.

127 Bras, G. The morbid anatomy of smallpox/ G. Bras// *Docum. Med. Geogr. Trop.* – 1952. – Vol. 4. – P. 303-351.

128 Breman, J. Monkeypox: an emerging infection for humans?/ J. Breman. - In: *Emerging infections 4.* - eds W. Scheld, W. Craig, J. Hughes. - Washington, DC: ASM Press, 2000. – P. 45–67.

129 Buchmeier, M.J. Variation between strains of hamsters in the lethality of Pichinde virus infections/ M.J. Buchmeier, W.E. Rawls// *Infect. Immun.* – 1977. – Vol. 16(2). – P. 413-421.

130 Bronchotracheal response in human influenza: type A, Asian strain, as studied by light and electron microscopic examination of bronchoscopic biopsies/ J.J. Walsh, L.F. Dietlein, F.N. Low [et al.]// *Arch. Int. Med.* – 1961. – Vol. 108. – P. 376-388.

131 Campbell, C.H. Fowl plague virus from man/ C.H. Campbell, R.G. Webster, S.S. Breese Jr.// *J. Infect. Dis.* – 1970. – Vol. 122(6). – P. 513-516.

- 132 Carter, J.B. Virology: principals and applications/ J.B. Carter, V.A. Saunders. - Chichester, England: John Willey and Sons, Ltd., 2007. - P. 383.
- 133 Castrucci, M.R. Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus/ M.R. Castrucci, Y.J. Kawaoka// Virol. – 1993. – Vol. 67. – P. 759–764.
- 134 Causey, D. Ecology of avian influenza virus in birds/ D. Causey, S.V. Edwards// J. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 197. – P. 29–33.
- 135 CDC. Update: influenza activity — United States and worldwide, 2002–03 season, and composition of the 2003–04 influenza vaccine/ Morb. Morta. Wkly. Rep. – 2003. – Vol. 52. – P. 516–521.
- 136 CDC. Update: influenza activity — United States and worldwide, 2003–04 season, and composition of the 2004–05 influenza vaccine/ Morb. Morta. Wkly. Rep. – 2004. – Vol. 53. – P. 547–552.
- 137 Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness/ K. Subbarao, A. Klimov, J. Katz [et al.]// Science. - 1998. – Vol. 279. – P. 393–396.
- 138 Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong/ K.F. Shortridge, N.N. Zhou, Y. Guan [et al.]// Virology. – 1998. – Vol. 252. – P. 331–342.
- 139 Characterization of H5N1 influenza viruses that continue to circulate in geese in Southeastern China/ R.G. Webster, Y. Guan, M. Peiris [et al.]// J. Virol. – 2002. – Vol. 76(1). – P. 118–126.
- 140 Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from South Korea/ C.-W. Lee, D.L. Suarez, T.M. Tumpey [et al.]// J. Virol. – 2005. – Vol. 79(6). –P. 3692–3702.
- 141 Chicken and duck myotubes are highly susceptible and permissive to 2 influenza virus infection/ B. Baquero-Perez, S.V. Kuchipudi, J. Ho [et al.]// J. Virol. – 2014. - doi:10.1128/JVI.03421-14.
- 142 Chimerix. CMX001 for treatment of smallpox. 2012. 48 p.
- 143 Cidofovir and (S)-9-[3-hydroxy-(2-phosphonomethoxy)propyl]adenine are highly effective inhibitors of vaccinia virus DNA polymerase when incorporated into the template strand/ W.C. Magee, K.A. Aldern, K.Y. Hostetler, D.H. Evans// Antimicrob. Agents Chemother. – 2008. – Vol. 52. – P. 586–597.

144 Cidofovir protects mice against lethal aerosol or intranasal cowpox virus challenge/ M. Bray, M. Martinez, D.F. Smee [et al.]// *J. Infect. Dis.* – 2000. – Vol. 181(1). – P. 10-19.

145 Clinical characteristics of 26 human cases of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus infection in china/ H. Yu, Z. Gao, Z. Feng [et al.]// *PLoS One.* – 2008. – Vol. 3. – e2985.

146 Clinical characteristics of human monkeypox, and risk factors for severe disease/ G.D. Huhn, A.M. Bauer, K. Yorita [et al.]// *Clin. Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 41. – P. 1742-1751.

147 Clinical effectiveness of neuraminidase inhibitors-oseltamivir, zanamivir, laninamivir, and peramivir-for treatment of influenza A(H3N2) and A(H1N1)pdm09 infection: an observational study in the 2010-2011 influenza season in Japan/ Y. Shobugawa, R. Saito., C. Daput [et al.]// *J. Infect. Chemother.* – 2012. – Vol. 18(6). – P. 858-864.

148 Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus/ K.Y. Yuen, P.S. Chan, M. Peiris [et al.]// *Lancet.* - 1998. – Vol. 351. – P. 467–471.

149 Clinical features of human influenza A (H5N1) infection in Vietnam: 2004–2006/ N.T. Liem, C.V. Tung, N.D. Hien [et al.]// *Clin. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 48. – P. 1639–1646.

150 Clinical manifestations of human monkeypox influenced by route of infection/ M.G. Reynolds, K.L. Yorita, M.J. Kuehnert [et al.]// *J. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 194. – P. 773-780.

151 Clinical signs and symptoms predicting influenza infection/ A.S. Monto, S. Gravenstein, M. Elliott [et al.]//*Arch. Intern. Med.* – 2000. – Vol.160(21). – P. 3243-3247.

152 Clonal vaccinia virus grown in cell culture fully protects monkeys from lethal monkeypox challenge/ K.A. Marriott, C.V. Parkinson, S.I. Morefield [et al.]// *Vaccine.* – 2008. – Vol. 26(4). – P. 581-588.

153 Coadministration of cidofovir and smallpox vaccine reduced vaccination side effects but interfered with vaccine-elicited immune responses and immunity to monkeypox/ H. Wei, D. Huang, J. Fortman [et al.]// *J. Virol.* – 2009. – Vol. 83(2). – P. 1115–1125.

154 Cold-adapted variants of influenza A virus: evaluation in adult seronegative volunteers of A/Scotland/840/74 and A/Victoria/3/75 cold-adapted recombinants derived from the

cold-adapted A/Ann Arbor/6/60 strain/ B.R. Murphy, H.P.JR. Holley, E.J. Berquist [et al.]// *Infect. Immun.* – 1979. – Vol. 23(2). – P. 253-259.

155 Comparative analysis of monkeypox virus infection of cynomolgus macaques by the intravenous or intrabronchial inoculation Route/ R.F. Johnson, J.Dyall, D.R. Ragland [et al.]// *J. Virol.* – 2011. – Vol. 85(5). – P. 2112–2125.

156 Comparative pathology of North American and central African strains of monkeypox virus in a ground squirrel model of the disease/ E. Sbrana, S.Y. Xiao, P.C. Newman, R.B. Tesh// *Am. J. Trop. Med. Hygiene.* - 2007. – Vol. 76(1). – P. 155-164.

157 Comparative pathology of select agent influenza A virus infections/ T. Kuiken, J. van den Brand, D. van Riel [et al.]// *Vet. Pathol.* – 2010. – Vol. 47(5). – P. 893-914.

158 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.

159 Comparative study of influenza virus replication in MDCK cells and in primary cells derived from adenoids and airway epithelium/ N.A. Ilyushina, M.R. Ikizler, Y. Kawaoka [et al.]// *J. Virol.* – 2012. – Vol. 86(21). – P. 11725–11734.

160 Comparison of efficacies of RWJ-270201, Zanamivir, and Oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses/ E.A. Govorkova, I.A. Leneva, O.G. Goloubeva [et al.]// *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. - Vol. 45. – P. 102723-102732.

161 Comparison of monkeypox virus clade kinetics and pathology within the prairie dog animal model using a serial sacrifice study design/ C.L. Hutson, D.S. Carroll, N. Gallardo-Romero [et al.]// *BioMed Research International.* – 2015. – Art. ID 965710. - 19 p. - Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/965710>.

162 Comparison of monkeypox viruses pathogenesis in mice by in vivo imaging/ J.E. Osorio, K.P. Iams, C.U. Meteyer, T.E. Rocke// *PLoS ONE.* – 2009. – Vol. 4(8). - e6592.

163 Comparison of West African and Congo Basin monkeypox viruses in BALB/c and C57BL/6 mice/ C.L. Hutson, J.A. Abel, D.S. Carroll [et al.]// *PloS ONE.* - 2010. – Vol. 5(1). - e8912.

164 Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong/ D.L. Suarez, M.L. Perdue, N. Cox et al.// *J. Virol.* – 1998. – Vol. 72(8). – P. 6678–6688.

- 165 Corrin, B. Pathology of the Lungs/ B. Corrin, A.G. Nicholson. - 2nd ed. Churchill Livingstone. – Elsevier: PA: Philadelphia, 2006. – 289 s.
- 166 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.
- 167 Criteria for determining that an AI virus isolation causing an outbreak must be considered for eradication/ Report of the Committee on transmissible diseases of poultry and other avian species. In Proceedings of the 98th Annual Meeting of the U.S. Animal Health Association. - USAHA, Grand Rapids, Mich., 1994. - p. 522. - Available from: http://www.oie.int/eng/normes/en_mmanual.htm.
- 168 Critical role of airway macrophages in modulating disease severity during influenza virus infection of mice/ M.D. Tate, D.L. Pickett, N. van Rooijen [et al.]// J. Virol. – 2010. – Vol. 84. – P. 7569–7580.
- 169 Crosstalk between autophagy and apoptosis in RAW 264.7 macrophages infected with ectromelia orthopoxvirus/ L. Martyniszyn, L. Szulc-Dabrowska, A. Boratynska-Jasinska [et al.]// Viral Immunol. – 2013. – Vol. 26(5). – P. 322–335.
- 170 Cytokine production by primary human macrophages infected with highly pathogenic H5N1 or pandemic H1N1 2009 influenza viruses/ S. Sakabe, K. Iwatsuki-Horimoto, R. Takano [et al.]// J. Gen. Virol. – 2011. – Vol. 92. – P. 1428–1434.
- 171 DAS181, a novel sialidase fusion protein, protects mice from lethal avian influenza H5N1 virus infection/ J.A. Belser, X. Lu, K.J. Szretter [et al.]// J. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 196. – P. 1493-1498.
- 172 Deletion of the monkeypox virus inhibitor of complement enzymes locus impacts the adaptive immune response to monkeypox virus in a nonhuman primate model of infection/ R.D. Estep, I. Messaoudi, M.A. O'Connor [et al.]// J. Virol. – 2011. – Vol. 85(18). – P. 9527–9542.
- 173 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.
- 174 Development of a new procedure for precise determination of viral aerosol lethal dose (ALD₅₀) for birds/ I.E. Agranovski, O.V. Pyankova, O.G. Pyankova [et al.]// J. Aerosol Sci. – 2010. – Vol. 41(2). – P. 161–169.

- 175 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.
- 176 Differences and similarities in viral life cycle progression and host cell physiology after infection of human dendritic cells with modified vaccinia virus Ankara and vaccinia virus/ A. Chahroudi, D.A. Garber, P. Reeves [et al.]// *J. Virol.* – 2006. – Vol. 80. – P. 8469–8481.
- 177 Differential host determinants contribute to the pathogenesis of 2009 pandemic H1N1 and human H5N1 influenza A viruses in experimental mouse models/ A. Otte, M. Sauter, L. Alleva [et al.]// *Am. J. Pathol.* – 2011. – Vol. 179. – P. 230–239.
- 178 Di Giulio, D.B. Human monkeypox: an emerging zoonosis/ D.B. Di Giulio, P.B. Eckburg// *Lancet Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 4. – P. 15–25.
- 179 Distinct pathogenesis of Hong Kong-Origin H5N1 viruses in mice compared to that of other highly pathogenic H5 avian influenza viruses/ J.K. Dybing, S. Schultz-Cherry, D.E. Swayne [et al.]// *J. Virol.* – 2000. – Vol. 74 (3). – P. 1443–1450.
- 180 DNA/MVA HIV-1/AIDS vaccine elicits long-lived vaccinia virus-specific immunity and confers protection against a lethal monkeypox challenge/ P. Nigam, P.L. Earl, J.L. Americo [et al.]// *Virology*. – 2007. – Vol. 366. – P. 73–83.
- 181 Donald, H.B. Counts of influenza virus particles/ H.B. Donald, A. Isaacs// *J. Gen. Microbiol.* – 1954. – Vol. 10. – P. 457-464.
- 182 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.
- 183 Downie, A.W. Survival of variola virus in dried exudate and crusts from smallpox patients/ A.W. Downie, K.R. Dumbell// *Lancet*. - 1947. – Vol. 1. – P. 550-553.
- 184 Downie, A.W. The isolation and cultivation of variola virus on chorioallantois of chick embryos/ A.W. Downie, K.R. Dumbell/ *J. Path. Bact.* – 1947. – Vol. 59(1-2). – P. 189-198.
- 185 Earl, P.L. Lethal monkeypox virus infection of CAST/EiJ mice is associated with a deficient gamma interferon response/ P.L. Earl, J.L. Americo, B. Moss// *J. Virol.* – 2012. – Vol. 86(17). – P. 9105-9112.

- 186 Ecological niche and geographic distribution of human monkeypox in Africa/ R.S. Levine, A.T. Peterson, K.L. Yorita [et al.]// PLoS ONE. – 2007. – Vol. 2(1). - e176. doi:10.1371/journal.pone.0000176.
- 187 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.
- 188 Effect of a single inhalation of laninamivir octanoate in children with influenza/ Y. Katsumi, O. Otabe, F. Matsui [et al.]// Pediatrics. – 2012. – Vol. 129(6). - e1431-e1436.
- 189 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.
- 190 Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial/ A. M. Henao-Restrepo, I.M. Longini, M. Egger [et al.]// Elsevier Ltd/Inc/BV. – 2015. - Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61117-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61117-5).
- 191 Efficacy of repeated intravenous injection of peramivir against influenza A (H1N1) 2009 virus infection in immunosuppressed mice/ M. Kitano, M. Kodama, Y. Itoh [et al.]// J. Antimicrob. Agents Chemother. – 2013. – Vol. 57(5). – P. 2286 –2294.
- 192 Efficacy of ST-246 versus lethal poxvirus challenge in immunodeficient mice/ D.W. Grosenbach, A. Berhanu, D.S. King [et al.]// PNAS 2010; 107 (2): 838–843.
- 193 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.
- 194 Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans/ F.S. Dawood, S. Jain, L. Finelli [et al.]// N. Engl. J. Med. – 2009. – Vol. 360. – P. 2605-2615.
- 195 Endemic human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 2001–2004/ A.W. Rimoin, N. Kisalu, B. Kebela-Ilunga [et al.]// Emerg. Infect. Dis. - 2007. – Vol. 13(6). – P. 934-937.
- 196 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.

197 Endothelial cells as central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection/ J.R. Teijaro, K.B. Walsh, S. Cahalan [et al.]// *Cell*. – 2011. – Vol. 146. – P. 980–991.

198 Environmental transmission of low pathogenicity avian influenza viruses and its implications for pathogen invasion/ P. Rohani, R. Breban, D.E. Stallknecht, J.M. Drake// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106(25). – P. 10365–10369.

199 Epidemiology of cases of H5N1 virus infection in Indonesia, July 2005–June 2006/ E.R. Sedyaningsih, S. Isfandari, V. Setiawaty [et al.]// *J. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 196. – DOI: 10.1086/519692.

200 Establishment of the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) as a novel animal model for comparing smallpox vaccines administered preexposure in both high- and low-dose monkeypox virus challenges/ M.S. Keckler, D.S. Carroll, N.F. Gallardo-Romero [et al.]// *J. Virol.* – 2011. – Vol. 85(15). – P. 7683–7698.

201 Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study/ F.S. Dawood, A.D. Iuliano, C. Reed [et al.]// *Lancet Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 12(9). – P. 687–695.

202 Eurasian tree sparrows, risk for H5N1 virus spread and human contamination through buddhist ritual: an experimental approach/ R.A. Gutierrez, S. Sorn, J.M. Nicholls, P. Buchy// *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6(12). – e28609.

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

204 Evaluation of influenza A/Hong Kong/123/77 (H1N1) ts-1A2 and cold-adapted recombinant viruses in seronegative adult volunteers/ B.R. Murphy, M.B. Rennels, R.G.JR. Douglas [et al.]// *Infect. Immun.* – 1980. – Vol. 29(2). – P. 348–355.

205 Evaluation of the efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA)/Imvamune against aerosolized rabbitpox virus in a rabbit model/ N.L. Garza, J.M. Hatkin, V. Livingston [et al.]// *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27. – P. 5496–5504.

206 Evidence for persistence of ectromelia virus in inbred mice, recrudescence following immunosuppression and transmission to naïve mice/ I.G. Sakala, G. Chaudhri, A.A. Scalzo [et al.]// *PLoS Pathog.* – 2015. – Vol. 11(12). – e1005342.

207 Evolution and ecology of influenza A viruses/ R.G. Webster, W.J. Bean, O.T. Gorman [et al.]// Microbiol. Rev. – 1992. – Vol. 56. – P. 152–179.

208 Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets/ M. Imai, T. Watanabe, M. Hatta [et al.]// Nature. – 2012. – Vol. 486. – P. 420–428.

209 Experimental infection of an African dormouse (*Graphiurus kelleni*) with monkeypox virus/ D.A. Schultz, J.E. Sagartz, D.L. Huso, R.M. Buller// Virology. – 2009. – Vol. 383. – P. 86-92.

210 Experimental infection of *Cynomolgus* macaques (*Macaca fascicularis*) with aerosolized monkeypox virus/ A. Nalca, V.A. Livingston, N.L. Garza [et al.]// PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5(9). - e12880.

211 Experimental infection of ground squirrels (*Spermophilus tridecemlineatus*) with monkeypox virus/ R.B. Tesh, D.M. Watts, E. Sbrana [et al.]// Emerg. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 10. – P. 1563-1567.

212 Experimental infection of H5N1 HPAI in BALB/c mice/ V.A. Evseenko, E.K. Bukin, A.V. Zaykovskaya [et al.]// Virol. J. – 2007. - Vol. 4. – Art. 77.

213 Experimental infection of prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) with monkeypox virus/ S.Y. Xiao, E. Sbrana, D.M. Watts [et al.]// Emerg. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 11. – P. 539–545.

214 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.

215 Exploring the potential of variola virus infection of cynomolgus 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.

216 Expression of foreign genes in cultured human primary macrophages using recombinant vaccinia virus vectors/ C.C. Broder, P.E. Kennedy, F. Michaels, E.A. Berger// Gene. – 1994. – Vol. 142. – P. 167–174.

217 Extensive lesions of monkeypox in a prairie dog (*Cynomys* sp.)/ I.M. Langohr, G.W. Stevenson, H.L. Thacker, R.L. Regnery// Vet. Pathol. – 2004. – Vol. 41. – P. 702–707.

218 F11-receptor (F11R/JAM) mediates platelet adhesion to endothelial cells: role in inflammatory thrombosis/ A. Babinska, M.H. Kedees, H. Athar [et al.]// *Thromb. Haemost.* – 2002. – Vol. 88. – P. 843–850.

219 Factors associated with death or hospitalization due to pandemic 2009 influenza A(H1N1) infection in California/ J.K. Louie, M. Acosta, K. Winter [et al.]// *JAMA.* – 2009. – Vol. 302(17). – P. 1896–1902.

220 Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma/ M.D. de Jong, B.V. Cam, P.T. Qui [et al.]// *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 352. – P. 686–691.

221 Fatal monkeypox in wild-living sooty mangabey, Cote d'Ivoire, 2012/ A. Radonic, S. Metzger, P.W. Dabrowski [et al.]// *Emerg. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 20. – P. 1009–1011.

222 Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia/ M.D. de Jong, C.P. Simmons, T.T. Thanh [et al.]// *Nature Med.* – 2006. – Vol. 12. – P. 1203–1207.

223 Fenner, F. The orthopoxviruses/ F. Fenner, R. Wittek, K.R. Dumbell. - San Diego, California, USA: Academic press, INC., 1988. – 432 p.

224 Further assessment of monkeypox virus infection in gambian pouched rats (*Cricetomys gambianus*) using in vivo bioluminescent imaging/ E.A. Falendysz, J.G. Lopera, F. Lorenzsonn [et al.]// *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2015. – Vol. 9(10). - e0004130.

225 Gao, R. Progresses on studies of highly pathogenic avian influenza H5N1 cross-species infection and its pathogenesis/ R. Gao// *Austin Virol. Retrovirol.* – 2014. – Vol. 1(1). - Available from: www.austinpublishinggroup.com.

226 Gispen, R. Histopathological and virological studies on monkeypox/ R. Gispen, J.D. Verlinde, P. Zwart// *Arch. Ges. Virusforsch.* – 1967. – Bd. 21. – S. 205–216.

227 Gispen, R. Relevance of some poxvirus infections in monkeys to smallpox eradication/ R. Gispen// *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* – 1975. – Vol. 69. – P. 299–302.

228 Globalization and infectious diseases, a review of the linkages/ L. Saker, K. Lee, B. Cannito [et al.] – Geneva, Switzerland: UNDP/World Bank/WHO Special Program on Tropical Diseases Research, 2004. – 62 p.

229 Gordon, S.M. Update on 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus/ S.M. Gordon// *Cleve Clin. J. Med.* – 2009. – Vol. 76. – P. 577–582.

230 Greer, B. Electron microscope study of the interaction of vaccinia virus with macrophages from immunized and nonimmunized rabbits/ B. Greer, D. Delfs, H. McElree// *Infect. Immun.* – 1974. – Vol. 9 (2). – P. 452-459.

231 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.

232 Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice/ M. Hatta, Y. Hatta, J.H. Kim [et al.]// *PLoS Pathogens.* – 2007. – Vol. 3. – P. 1375–1379.

233 Growth of influenza A virus in primary, differentiated epithelial cells derived from adenoids/ Y. Endo, K.N. Carroll, M.R. Ikizler, P.F. Wright// *J. Virol.* – 1996. – Vol. 70(3). – P. 2055–2058.

234 Guarner, J. Comparison of the pathology caused by H1N1, H5N1, and H3N2 influenza viruses/ J. Guarner, R. Falcon-Escobedo// *Arch. Med. Res.* – 2009. – Vol. 40. – P. 655-661.

235 H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice/ L.A. Perrone, J.K. Plowden, A. Garcia-Sastre [et al.]// *PLoS Pathogens.* – 2008. – Vol. 4. – e1000115.

236 H5N1 infection of the respiratory tract and beyond: a molecular pathology study/ J. Gu, Z. Xie, Z. Gao [et al.]// *Lancet.* – 2007. – Vol. 370. – P. 1137-1145.

237 H5N1 influenza virus pathogenesis in genetically diverse mice Is mediated at the level of viral load/ A.C. Boon, D. Finkelstein, M. Zheng [et al.]// *MBio.* – 2011. – Vol. 2(5). – e00171-11.

238 Haemorrhagic smallpox/ A.W. Downie, D.S. Fedson, L. St. Vincent [et al.]// *J. Hyg.* – 1969. – Vol. 67. – P. 619-629.

239 Haemorrhagic smallpox I. Preliminary haematological studies/ J.F. Roberts, G. Coffee, S.M. Creel [et al.]// *Bull. WHO.* – 1965. – Vol. 33. – P. 607-613.

240 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.

241 Hahon, N. Air-borne infectivity of the variolavaccinia group of poxviruses for the cynomolgus monkey, *Macaca irus*/ N. Hahon, M.H. McGavran// *J. Infect. Dis.* – 1961. – Vol. 109. – P. 294–298.

242 Hahon, N. Factors influencing variola virus growth on chorioallantoic membrane of embryonated eggs/ N. Hahon, M. Ratner, E. Kozikowski// *J. Bact.* – 1958. – Vol. 75 (6). – P. 707-712.

243 Hahon, N. Pathogenesis of variola in *Macaca irus* monkeys/ N. Hahon, B.J. Wilson// *Am. J. Hyg.* – 1960. – Vol. 71. – P. 69-80.

244 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.

245 Hatta, M. A clue to the molecular mechanism of virulence of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses isolated in 2004/ M. Hatta, Y. Kawaoka// *Uirusu.* – 2005. – Vol. 55. – P. 55–61.

246 Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infects alveolar macrophages without virus production or excessive TNF- α induction/ D. Van Riel, L.M.E. Leijten, M. van der Eerden [et al.]// *PLoS Pathogens.* – 2011. – Vol. 7. - e1002099.

247 Histopathological evaluation of the diversity of cells susceptible to H5N1 virulent avian influenza virus/ H. Ogiwara, F. Yasui, K. Munekata [et al.]// *Am. J. Pathol.* – 2014. – Vol. 184. - P. 171-183.

248 Histopathologic and immunohistochemical features of fatal influenza virus infection in children during the 2003-2004 season/ J. Guarner, C.D. Paddock, W.J. Shieh [et al.]// *Clin. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 43. – P. 132-140.

249 Hooper, J.W. Four-gene-combination DNA vaccine protects mice against a lethal vaccinia virus challenge and elicits appropriate antibody responses in nonhuman primates/ J.W. Hooper, D.M. Custer, E. Thompson// *Virology.* – 2003. – Vol. 306(1). – P. 181–195.

250 Host defense mechanisms against influenza virus: interaction of influenza virus with murine macrophages in vitro/ M.A. Wells, P. Albrecht, S. Daniel, F.A. Ennis// *Infect. Immun.* – 1978. – Vol. 22. – P. 758–762.

251 Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals/ D. van Riel, V.J. Munster, E. de Wit [et al.]// *Am. J. Pathol.* – 2007. – Vol. 171. – P. 1215–1223.

252 Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium/ M.N. Matrosovich, T.Y. Matrosovich, T. Gray [et al.]// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 4620-4624.

- 253 Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003/ K.M. Butt, G.J. Smith, H. Chen [et al.]// J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 5760–5767.
- 254 Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus/ E.C. Claas, A.D. Osterhaus, R. van Beek [et al.]// Lancet. - 1998. – Vol. 351. – P. 472–477.
- 255 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.
- 256 Human monkeypox, 1970-79/ J.G. Breman, Kalisa-Ruti, M.V. Steniowski [et al.]// Bull. WHO. – 1980. – Vol. 58(2). – P. 165-182.
- 257 Human monkeypox: an emerging zoonotic disease/ S. Parker, A. Nuara, R.M. Buller, D.A. Schultz// Future Microbiol. – 2007. – Vol. 2. – P. 17-34.
- 258 Human monkeypox: a newly emerged orthopoxvirus zoonosis in the tropical rain forests of Africa/ I. Arita, Z. Jezek, L. Khodakevich, K. Ruti// Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1985. – Vol. 34. – P. 781-789.
- 259 Human monkeypox: a study of 2,510 contacts of 214 patients/ Z. Jezek, S.S. Marennikova, M. Mutumbo [et al.]// J. Infect. Dis. – 1986. – Vol. 154(4). – P. 551-555.
- 260 Human monkeypox infection: a family cluster in the midwestern United States/ J.J. Sejvar, Y. Chowdary, M. Schomogyi [et al.]// J. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 190. – P. 1833–1840.
- 261 Human monkeypox in Kasai Oriental, Democratic Republic of the Congo (former Zaire): preliminary report of October 1997 investigation/ Wkly Epidemiol. Rec. – 1997. – Vol. 72. – P. 369–372.
- 262 Human monkeypox Kasai Oriental, Zair (1996 - 1997)/ Wkly Epidemiol. Rec. – 1997. – Vol. 72(15). – P. 101-104.
- 263 Human monkeypox: secondary attack rates/ Z. Jezek, B. Grab, M.V. Szczeniowski [et al.]// Bull. WHO. – 1988. – Vol. 66 (4). – P. 465-470.
- 264 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.
- 265 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.
- 266 Induction of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses using dendritic cells pulsed with EBNA-3A peptides or UV-inactivated, recombinant EBNA-3A

vaccinia virus/ M. Subklewe, A. Chahroudi, A. Schmaljohn [et al.]// *Blood*. – 1999. – Vol. 94(4). – P. 1372-1381.

267 Induction of proinflammatory cytokines in human macrophage by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease?/ C.Y. Cheung, L.L. Poon, A.S. Lau [et al.]// *Lancet*. – 2002. – Vol. 360. – P. 1831-1837.

268 Infection of chickens caused by avian influenza virus A/H5N1 delivered by aerosol and other routes/ A.A. Sergeev, O.K. Demina, O.V. Pyankov [et al.]// *Transbound. Emerg. Dis.* – 2013. – Vol. 60. – P. 159-165.

269 Influenza A H5N1 replication sites in humans/ M. Uiprasertkul, P. Puthavathana, K. Sangsiriwut [et al.]// *Emerg. Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 11. – P. 1036-1041.

270 Influenza A H9N2: aspects of laboratory diagnosis/ M. Peiris, W.C. Yam, K.H. Chan [et al.]// *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – Vol. 37. – P. 3426–3427.

271 Influenza and pandemic H1N1 2009 bulletin. - Available from: <http://www.wpro.who.int/NR/rdonlyres/B89007E1-FC03-4060-848C-E3616E333B3B/0/1N1BulletinVol2Issue120100119.pdf>.

272 Influenza A strain-dependent pathogenesis in fatal H1N1 and H5N1 subtype infections of mice/ M.-M. Garigliany, A. Habyarimana, B. Lambrecht [et al.]// *Emerg. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 16(4). – P. 595-603.

273 Influenza at the human–animal interface. - Geneva: WHO, 2013. - Available from: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_7October13.pdf.

274 Influenza H5N1 virus infection of polarized human alveolar epithelial cells and lung microvascular endothelial cells/ M.C.W. Chan, R.W.Y. Chan, W.C.L. Yu [et al.]// *Respi. Res.* – 2009. – Vol. 10. – Art. 102.

275 Influenza virus A (H10N7) in chickens and poultry abattoir workers, Australia/ G.G. Arzey, P.D. Kirkland, K.E. Arzey [et al.]// *Emerg. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 18. – P. 814–816.

276 Influenza virus A infection of human monocyte and macrophage subpopulations reveals increased susceptibility associated with cell differentiation/ M.A. Hoeve, A.A. Nash, D. Jackson [et al.]// *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. - e29443.

277 Influenza virus in human exhaled breath: an observational study/ P. Fabian, J.J. McDevitt, W.H. DeHaan [et al.]// *PLoS ONE*. – 2008. – Vol. 3(7). - e2691.

278 Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells/ A. Ibricevic, A. Pekosz, M.J. Walter [et al.]// J. Virol. – 2006. – Vol. 80. – P. 7469–7480.

279 Influenza virus receptors in the human airway/ K. Shinya, M. Ebina, S. Yamada [et al.]// Nature. – 2006. – Vol. 440. – P. 435-436.

280 Inhalational monkeypox virus infection in cynomolgus macaques/ R.E. Barnewall, D.A. Fisher, A.B. Robertson [et al.]// Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2012. – Vol. 2. – Art. 117.

281 In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses/ Y. Itoh, K. Shinya, M. Kiso [et al.]// Nature. – 2009. – Vol. 460. – P. 1021-1025.

282 In vitro inhibition of monkeypox virus production and spread by interferon- β / S.C. Johnston, K.L. Lin, J.H. Connor [et al.]// Virol. J. – 2012. – Vol. 9. – Art. 5.

283 Isolation and characterization of prevalent strains of avian influenza viruses in China/ X. Tang, G. Tian, J. Zhao, K.Y. Zhou// Chin. J. Anim. Poult. Infect. Dis. – 1998. – Vol. 20. – P. 1–5.

284 Jahrling, P.B. Interferon induction sensitivity as correlates to virulence of VEE virus for hamsters/ P.B. Jahrling, Z.Navarro, W.F. Sherer// Arch. Virol. – 1976. – Vol. 51. – P. 23-25.

285 Jezek, Z. Human monkeypox. Monographs in virology/ Z. Jezek, F. Fenner: ed. J.L. Melnick - Basel-Munchen-Paris-London-New York-New Delhi-Singapore-Tokyo-Sydney: Karger, 1988. - 140 p.

286 Kleiber, M. The fire of life / M. Kleiber. - New York – London: John Wiley and Sons, 1961. – 346 p.

287 Koszinowski, U. Interactions between vaccinia virus and sensitized macrophages in vitro/ U. Koszinowski, F. Kruse, R. Thomssen// Arch. Virol. – 1975. – Vol. 48(4). – P. 335-345.

288 Kurtz, J. Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis/ J. Kurtz, R.J. Manvell, J. Banks// Lancet. – 1996. – Vol. 348. – P. 901–902.

289 Lambert, L.C. Influenza vaccines for the future/ L.C. Lambert, A.S. Fauci// N. Eng. J. Med. – 2010. – Vol. 363(21). – P. 2036–2044.

290 Lasiewski, R.C. A preliminary allometric analysis of respiratory variables in resting birds/ R.C. Lasiewski, W.A. Calder// Respi. Physiol. – 1971. – Vol. 11(2). – P. 152-166.

291 Lc16m8, a highly attenuated vaccinia virus vaccine lacking expression of the membrane protein b5r, protects monkeys from monkeypox/ M. Saijo, Y. Ami, Y. Suzuki [et al.]// J. Virol. – 2006. – Vol. 80. – P. 5179–5188.

292 Lee, C.W. Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus/ C.W. Lee, D.L. Suarez// J. Virol. Methods. – 2004. – Vol. 119(2). – P. 151–158.

293 Lillie, R.D. Smallpox and vaccinia. The pathologic histology/ R.D. Lillie// Arch. Pathol. – 1930. – Vol. 10. – P. 241–291.

294 Lu, L. Reassortment patterns of avian influenza virus internal segments among different subtypes/ L. Lu, S.J. Lycett, A.J. Leigh Brown// BMC Evol. Biol. – 2014. – Vol. 14. – P. 16.

295 Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection/ T. Mauad, L.A. Hajjar, G.D. Callegari [et al.]// Am. J. Respi. Critic. Care Med. – 2010. – Vol. 181. – P. 72–79.

296 Lymphocyte and macrophage responses after vaccinia virus infections/ C. McLaren, H. Cheng, D.L. Spicer, W.A.F. Tompkins// Infect. Immun. – 1976. – Vol. 14(4). – P. 1014–1021.

297 Magee, W.C. Mechanism of inhibition of vaccinia virus DNA polymerase by cidofovir diphosphate/ W.C. Magee, K.Y. Hostetler, D.H. Evans// Antimicrob. Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49. – P. 3153–3162.

298 Mahy, B.W.J. Virology Methods Manual/ B.W.J. Mahy, H.O. Kangro; edited by: B.W.J. Mahy, H.O. Kangro. – London: Academic Press, 1996. – 374 p.

299 Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo/ A.W. Rimoin, P.M. Mulembakani, S.C. Johnston [et al.]// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – Vol. 107(31). – P. 16262–16267.

300 Marennikova, S.S. Comparative studies on the properties of variola virus strains. 1. Characterization of chorioallantoic membrane lesions and pathogenicity for chick embryos after different methods of inoculation/ S.S. Marennikova, E.M. Shafikova// Acta Virol. – 1969. – Vol. 13. – P. 538–543.

- 301 Marennikova, S.S. Susceptibility of some rodent species to monkeypox virus, and course of the infection/ S.S. Marennikova, E.M. Selukhina// Bull. WHO. – 1976. – Vol. 53. – P. 13-20.
- 302 Marennikova, S.S. Experimental infection of squirrels *Sciurus vulgaris* by monkeypox virus/ S.S. Marennikova, E.M. Shelukhina, O.A. Zhukova// Acta Virol. – 1989. – Vol. 33. – P. 399.
- 303 Marennikova, S.S. Orthopoxviruses pathogenic for humans/ S.S. Marennikova, S.N. Shchelkunov. – NY: Springer New York, 2005. – 424 p.
- 304 Margine, I. Animal models for influenza viruses: implications for universal vaccine development/ I. Margine, F. Krammer// Pathogens. – 2014. – Vol. 3. – P. 845-874.
- 305 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.
- 306 McIntosh, A.A. Vaccinia virus glycoprotein A34R is required for infectivity of extracellular enveloped virus/ A.A. McIntosh, G.L. Smith// J. Virol. – 1996. – Vol. 70. – P. 272–281.
- 307 Milhaud, C. Analyse d'un cas de variole du singe (monkeypox) chez le chimpanzee (*Pan troglodytes*)/ C. Milhaud, M. Klein, J. Virat// Exp. Anim. – 1969. – Vol. 2. – P. 121-135.
- 308 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.
- 309 Modified vaccinia virus Ankara protects macaques against respiratory challenge with monkeypox virus/ K.J. Stittelaar, G. van Amerongen, I. Kondova [et al.]// J. Virol. – 2005. – Vol. 79 – P. 7845–7851.
- 310 Mogensen, S.C. Role of macrophages in natural resistance to virus infections/ S.C. Mogensen// Microbiol. Rev. – 1979. – Vol. 43(1). – P. 1-26.
- 311 Molecular changes associated with adaptation of human influenza A virus in embryonated chicken eggs/ L. Widjaja, N. Ilyushina, R.G. Webster, R.J. Webby// Virology. – 2006. – Vol. 350(1). – P. 137-145.
- 312 Molecular correlates of influenza A H5N1 virus pathogenesis in mice/ J.M. Katz, X. Lu, T.M. Tumpey [et al.]// J. Virol. – 2000. – Vol. 74(22). – P. 10807–10810.

313 Molecular smallpox vaccine delivered by alphavirus replicons elicits protective immunity in mice and non-human primates/ J.W. Hooper, A.M. Ferro, J.W. Golden [et al.]// *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – P. 494–511.

314 Monkeypox. - Geneva: WHO, 2011. Fact sheet N161. - Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs161/en/>.

315 Monkeypox. I. Clinical, virologic and immunologic studies/ H.A. Wenner, F.D. Macasaet, P.S. Kamitsuka, P. Kidd// *Am. J. Epidemiol.* – 1968. - Vol. 87. – P. 551-566.

316 Monkeypox disease in irradiated cynomolgus monkeys/ S.J. McConnell, Y.F. Herman, D.E. Mattson, L. Erickson// *Nature*. - 1962. – Vol. 195. – P. 1128-1129.

317 Monkeypox disease transmission in an experimental setting: prairie dog animal model/ C.L. Hutson, D.S. Carroll, N. Gallardo-Romero [et al.]// *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6(12). - e28295.

318 Monkeypox transmission and pathogenesis in prairie dogs/ J. Guarner, B.J. Johnson, C.D. Paddock [et al.]// *Emerg. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 10(3). - 426-431.

319 Monkeypox zoonotic associations: insights from laboratory evaluation of animals associated with the multi-state US outbreak/ C.L. Hutson, K.N. Lee, J. Abel [et al.]// *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2007. - 76(4). - P. 757–767.

320 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.

321 Murine alveolar macrophages limit replication of vaccinia virus/ R. Rivera, M. Hutchens, K.E. Luker [et al.]// *Virology*. – 2007. – Vol. 363. – P. 48–58.

322 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.

323 Mutations in polymerase genes enhanced the virulence of 2009 pandemic H1N1 influenza virus in mice/ W. Zhu, Y. Zhu, K. Qin [et al.]// *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7 (3). - e33383.

324 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.

325 Narang, A.S. Anticancer drug development. Unique aspects of pharmaceutical development/ A.S. Narang, D.S. Desai; (eds.) Y. Lu, R.I. Mahato Pharmaceutical perspectives of cancer therapeutics. – Lond, NY: Springer Science + Business Media, LCC, 2009. – P. 694.

326 Natuk, R.J. Vaccinia virus proteins on the plasma membrane of infected cells. III. Infection of peritoneal macrophages/ R.J. Natuk, J.A. Holowczak// *Virology*. – 1985. – Vol. 147. – P. 354-372.

327 Naturally occurring mutations in the PA gene are key contributors to increased virulence of pandemic H1N1/09 influenza virus in mice/ Y. Sun, Q. Xu, Y. Shen [et al.]// *J. Virol.* – 2014. – Vol. 88(8). – P. 4600 – 4604.

328 Nelson, J.A. H5N1 Influenza A Virus and Infected Human Plasma/ J.A. Nelson// *Emer. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 12(6). – P. 1041-1043.

329 Neumann, G. The first influenza pandemic of the new Millennium/ G. Neumann, Y. Kawaoka// *Infl. Other Respi. Viruses*. – 2011. – Vol. 5(3). – P. 157-166.

330 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.

331 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.

332 Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia/ M. Hirst, C.R. Astell, M. Griffith [et al.]// *Emerg. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 10. – P. 2192–2195.

333 Occupational risks during a monkeypox outbreak, Wisconsin, 2003/ D.R. Croft, M.J. Sotir, C.J. Williams [et al.]// *Emerg. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 13(8). – P. 1150-1157.

334 Origin and molecular characteristics of a novel 2013 avian influenza A H6N1 virus causing human infection in Taiwan/ J. Yuan, L. Zhang, X. Kan [et al.]// *Clin. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 57. – P. 1367–1368.

335 Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia/ Y. Orba, M. Sasaki, H. Yamaguchi [et al.]// *J. Gen. Virol.* – 2015. – Vol. 96. – P. 390–394.

336 Oseltamivir reduces transmission, morbidity, and mortality of highly pathogenic avian influenza in chickens/ A. Meijer, J.A. van der Goot, G. Koch [et al.]// *Intern. Congress Series*. – 2004. – Vol. 1263. – P. 495-498.

337 Pandemic H1N1 influenza infection and vascular thrombosis/ P.E. Bunce, S.M. High, M. Nadjafi [et al.]// Clin. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 52. - e14–e17.

338 Pantin-Jackwood, M.J. Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds/ M.J. Pantin-Jackwood, D.E. Swayne// Rev. Sci. Tech. – 2009. – Vol. 28(1). – P. 113-136.

339 Parker, S. Therapeutic and prophylactic drugs to treat orthopoxvirus infections/ S. Parker, L. Handley, R.M. Buller// Future Virol. – 2008. – Vol. 3. – P. 595–612.

340 Pathobiological features of a novel, highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus/ Y.-I. Kim, P.N.Q. Pascua, H.-I. Kwon [et al.]// Emerg. Microb. Infect. – 2014. – Vol. 3. - e75.

341 Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey/ N. Nagata, M. Saijo, M. Kataoka [et al.]// Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2014. – Vol. 7(7). P. 4359-4370.

342 Pathogenicity of a highly pathogenic avian influenza virus, A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) in different species of birds and mammals/ N. Isoda, Y. Sakoda, N. Kishida [et al.]// Arch. Virol. – 2006. – Vol. 151. – P. 1267–1279.

343 Pathogenicity of different PR8 influenza A virus variants in mice is determined by both viral and host factors/ P. Blazejewska, L. Koscinski, N. Viegas [et al.]// Virology. – 2011. –Vol. 412(1). – P. 36-45.

344 Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus/ K.F. To, P.K.S. Chan, K.F. Chan [et al.]// J. Med. Virol. – 2001. – Vol. 63. – P. 242-246.

345 Pathology of specific-pathogen-free chickens inoculated with H5N1 avian influenza viruses isolated in Japan in 2004/ K. Nakamura, T. Imada, K. Imai [et al.]// Avian Dis. – 2008. – Vol. 52(1). – P. 8-13.

346 Perkins, L.E. Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species/ L.E. Perkins, D.E. Swayne// Vet. Pathol. - 2001. – Vol. 38. – P. 149-164.

347 Peters, J.C. A monkeypox enzooty in the “Blijdorp” Zoo/ J.C. Peters// Tijdschr. Diergeneeskd. – 1966. – Bd. 91. – S. 387-391.

348 Postexposure immunization with modified vaccinia virus Ankara or conventional Lister vaccine provides solid protection in a murine model of human smallpox/ N. Paran, Y. Suezter, S. Lustig [et al.]// J. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 199(1). – P. 39-48.

349 Poxvirus antigen staining of immune cells as a biomarker to predict disease outcome in monkeypox and cowpox virus infection in non-human primates/ H. Song, K. Janosko, R.F. Johnson [et al.]// PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8(4). – e60533.

350 Poxvirus as a vector to transduce human dendritic cells for immunotherapy: abortive infection but reduced APC function/ L. Jenne, C. Hauser, J.-F. Arrighi [et al.]// Gene Therapy. – 2000. – Vol. 7. – P. 1575–1583.

351 Pre- and postexposure use of human monoclonal antibody against H5N1 and H1N1 influenza virus in mice: viable alternative to oseltamivir/ W. Koudstaal, M.H. Koldijk, J.P.J. Brakenhoff [et al.]// J. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 200. – P. 1870-1873.

352 Prier, J.E. A pox disease of monkeys/ J.E. Prier, R.M. Sauer// Ann. N.Y. Acad. Sci. 1960. – Vol. 85. – P. 951-959.

353 Primary human macrophages serve as vehicles for vaccinia virus replication and dissemination/ D. Byrd, N. Shepherd, J. Lan [et al.]// J. Virol. – 2014. – Vol. 88 (12). – P. 6819–6831.

354 Progression of pathogenic events in cynomolgus macaques infected with variola virus/ V. Wahl-Jensen, J.A. Cann, K.H. Rubins [et al.]// PLoS One, 2011; 6: e24832.

355 Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells/ M.C. Chan, C.Y. Cheung, W.H. Chui [et al.]// Respi. Res. – 2005. – Vol. 6. – Art. 135.

356 ProMED-mail. Avian influenza, human (02): China (HK) H9N2ex (HN)/ Archive Number 20140102.2148327. - 2 Jan 2014. - Available from: <http://www.promedmail.org>.

357 ProMED-mail. Avian influenza, human (36): China (JX) H10N8/ Archive Number 20140126.2233164. - 26 Jan 2014. - Available from: <http://www.promedmail.org>.

358 ProMED-mail. Avian influenza, human (157): China (ZJ) H10N8, fatal/ Archive Number 20131217.2121718. - 17 Dec 2013. - Available from: <http://www.promedmail.org>.

359 ProMED-mail. Avian influenza, human (164): China (HK) H9N2/ Archive Number 20131230.2143709. - 30 Dec 2013. - Available from: <http://www.promedmail.org>.

360 Prophylaxis of Rift valley fever with antiviral drugs, immune serum, interferon inducer, and a macrophage activator/ C.I. Peters, J.A. Reynolds, T.W. Slone [et al.]// Antiviral Res. – 1986. – Vol. 6. – P. 285-297.

361 Protection against multiple subtypes of influenza viruses by virus-like particle vaccines based on a hemagglutinin conserved epitope/ S. Chen, D. Zheng, C. Li [et al.]// *Bio-Med Res. Intern.* – 2015. - ID 901817, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/901817>.

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

363 Rapid protection in a monkeypox model by a single injection of a replication-deficient vaccinia virus/ P.L. Earl, J.L. Americo, L.S. Wyatt [et al.]// *Proc. Natl .Acad. Sci. U.S.A.* – 2008. – Vol. 105. – P. 10889–10894.

364 Reading, P.C. Involvement of the mannose receptor in infection of macrophages by influenza virus/ P.C. Reading, J.L. Miller, E.M. Anders// *J. Virol.* – 2000. – Vol. 74. – P. 5190–5197.

365 Reducing risk. Reducing the risk of emergence of pandemic influenza. Global influenza programme. – WHO, 2010. - 13 p.

366 Reemergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease/ J.S. Peiris, W.C. Yu, C.W. Leung [et al.]// *Lancet.* – 2004. – Vol. 363. – P. 617-619.

367 Replication and adaptive mutations of low pathogenic avian influenza viruses in tracheal organ cultures of different avian species/ H. Petersen, M. Matrosovich, S. Pleschka, S. Rautenschlein// *PLOS ONE.* – 2012. – Vol. 7(8). - e42260.

368 Replication of hemorrhagic fever viruses in monocytic cells/ R.M. Lewis, J.C. Morrill, P.B. Jahrling, T.M. Cosgriff// *Rev. Infect. Dis.* – 1989. – Vol. 11(S4). - S736-S742.

369 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.

370 Riedel, S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination/ S. Riedel// *BUMC Proceedings.* – 2005. – Vol. 18(1). – P.21–25.

371 Riedel, S. Smallpox and biological warfare: a disease revisited/ S. Riedel// *BUMC Proceedings.* – 2005. – Vol. 18(1). – P. 13–20.

372 Risk factors associated with subclinical human infection with avian influenza A (H5N1) virus—Cambodia, 2006/ S. Vong, S. Ly, M.D. Van Kerkhove [et al.]// *J. Infect. Dis.* – 2009. - Vol. 199. – P. 1744 –1752.

373 Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong, 1997–1998/ C.B. Bridges, W. Lim, J. Hu-Primmer [et al.]// J. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 185. – P. 1005–1010.

374 Roberts, J.A. Histopathogenesis of ectromelia. 1. Respiratory infection/ J.A. Roberts// Brit. J. Exp. Pathol. – 1962. – Vol. 43. – P. 451–461.

375 Rodgers, B.C. Influenza virus replication in human alveolar macrophages/ B. Rodgers, C.A. Mims// J. Med. Virol. – 1982. – Vol. 9. – P. 177–184.

376 Rodgers, B. Interaction of influenza virus with mouse macrophages/ B. Rodgers, C.A. Mims// Infect. Immun. – 1981. – Vol. 31. – P. 751–757.

377 Role of host cytokine responses in the pathogenesis of avian H5N1 viruses in mice/ K.J. Szretter, S. Gangappa, X. Lu [et al.]// J. Virol. – 2007. – Vol. 81. – P. 2736–2744.

378 Roos, R. Study puts global 2009 H1N1 infection rate at 11% to 21%/ R. Roos// CIDRAP News story. – 2009. - Available from: <http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2011/08/study-puts-global-2009-h1n1-infection-rate-11-21>.

379 Rothberg, M.B. Complications of viral influenza/ M.B. Rothberg, S.D. Haessler, R.B. Brown// Am. J. Med. – 2008. – Vol. 121. – P. 258–264.

380 Salomon, R. Inhibition of the Cytokine Response Does Not Protect against Lethal H5N1 Influenza Infection/ R. Salomon, E. Hoffmann, R.G. Webster// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104. – P. 12479–12481.

381 Schmid, R.F. Физиология человека/ R.F. Schmid, G.Thews. - М.: Мир, 1986. - С. 19.

382 Seasonal and pandemic human influenza viruses attach better to human upper respiratory tract epithelium than avian influenza viruses/ D. van Riel, M.A. den Bakker, L.M.E. Leijten [et al.]// Amer. J. Pathol. – 2010. – Vol. 176(4). – P. 1614–1618.

383 Seroprevalence of avian influenza A (H5N1) virus among poultry workers in Jiangsu province, China: an observational study/ X. Huo, R. Zu, X. Qi [et al.]// BMC Infect. Dis. – 2012. – Vol. 12(93). - Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/12/93>.

384 Severity of pneumonia due to new H1N1 influenza virus in ferrets is intermediate between that due to seasonal H1N1 virus and highly pathogenic avian influenza H5N1 virus/ J.M. van den Brand, K.J. Stittelaar, G. van Amerongen [et al.]// J. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 201. – P. 993–999.

385 Side-by-side comparison of gene-based smallpox vaccine with MVA in nonhuman primates/ J.W. Golden, M. Josleyn, E.M. Mucker [et al.]// PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7(7). - e42353.

386 Smallman-Raynor, M. Avian influenza A (H5N1) age distribution in humans/ M. Smallman-Raynor, A.D. Cliff// Emerg. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 13. – P. 510-512.

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

388 Smallpox DNA vaccine protects nonhuman primates against lethal monkeypox/ J.W. Hooper, E. Thompson, C. Wilhelmsen [et al.]// J. Virol. – 2004. – Vol. 78. – P. 4433–4443.

389 Smallpox vaccine does not protect macaques with AIDS from a lethal monkeypox virus challenge/ Y. Edghill-Smith, M. Bray, C.A. Whitehouse [et al.]// J. Infect. Dis. - 2005. – Vol. 191(3). – P. 372-381.

390 Smallpox vaccine-induced antibodies are necessary and sufficient for protection against monkeypox virus/ Y. Edghill-Smith, H. Golding, J.Manischewitz [et al.]// Nat. Med. - 2005. – Vol. 11(7). – P. 740-747.

391 Smallpox vaccine with integrated IL-15 demonstrates enhanced in vivo viral clearance in immunodeficient mice and confers long-term protection against a lethal monkeypox challenge in cynomolgus monkeys/ R.J. Zielinski, J.V. Smedley, P.Y. Perera [et al.]// Vaccine. – 2010. – Vol. 28. – P. 7081–7091.

392 Smith, J.R. Oseltamivir in human avian influenza infection/ Smith J.R.// J. Antimicrob. Chemother. – 2010. – Vol. 65 (Suppl 2). - ii25–33.

393 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.

394 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.

395 Start of a pandemic: influenza A H1N1 virus/ M.E. Manjarrez, D. Rosete, A. Higuera et al.// Respiratory Diseases; M. Ghanei (Ed.), ISBN: 978-953-307-964-6, InTech. - Available from: <http://www.intechopen.com/books/respiratory-diseases/start-of-a-pandemic-influenza-a-h1n1-virus>.

396 Statement on food safety considerations of novel H1N1 influenza virus infections in humans/ EFSA J. – 2010. – Vol. 8(6). – Art. 1629.

397 Stern, R.J. Attenuation of B5R mutants of rabbitpox virus in vivo is related to impaired growth and not an enhanced host inflammatory response/ R.J. Stern, J.P. Thompson, R.W. Moyer// Virology. – 1997. – Vol. 233. – P. 118–129.

398 Studahl, M. Influenza virus and CNS manifestations/ M. Studahl// J. Clin. Virol. – 2003. – Vol. 28. – P. 225–232.

399 Studies on a pox disease of mankeys. II. Isolation of the etiological agent/ J.E. Prier, R.M. Sauer, R.G. Malsberger, J.M. Sillaman// Amer. J. Vet. Res. - 1960. - Vol. 21. - P. 381–384.

400 Studies on the genetic determinants of influenza virus pathogenicity for mice with the use of reassortants between mouse-adapted and non-adapted variants of the same virus strain/ I.A. Rudneva, N.V. Kaverin, N.L. Varich [et al.]// Arch. Virol. – 1986. – Vol. 90(3-4). – P. 237–248.

401 Studies on the pathogenesis of monkey pox: 2. Dose-response and virus dispersion/ H.A. Wenner, C.T. Cho, C.R. Bolano, P.S. Kamitsuka// Arch. Gesamte Virusforsch. – 1969. – Bd. 27. – S. 166–178.

402 Studies on the pathogenesis of monkey pox: 3. Histopathological lesions and sites of immunofluorescence/ H.A. Wenner, C.R. Bolano, C.T. Cho, P.S. Kamitsuka// Arch. Gesamte Virusforsch. – 1969. – Bd. 27. – S. 179–197.

403 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.

404 Subunit recombinant vaccine protects against monkeypox/ J.M. Heraud, Y. Edghill-Smith, V. Ayala [et al.]// J. Immunol. – 2006. – Vol. 177(4). – P. 2552–2564.

405 Susiva, C. First Fatal Avian Influenza A (H5N1) in Siriraj Hospital: A Case Report/ C. Susiva C., K. Limprayoon// Siriraj Med. J. – 2005. – Vol. 57(7). – P. 272–274.

406 Swayne, D.E. Pathogenicity of avian influenza viruses in poultry/ D.E. Swayne, M. Pantin-Jackwood// Dev. Biol. – 2006. – Vol. 124. – P. 61–67.

407 Swayne, D.E. Using mean infectious dose of high- and low-pathogenicity avian influenza viruses originating from wild duck and poultry as one measure of infectivity and adaptation to poultry/ D.E. Swayne, R.D. Slemons// Avian Dis. – 2008. - 52(3). – P. 455–460.

408 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(11). – P. 4118-4124.

409 Taubenberger, J.K. The pathology of influenza virus infections/ J.K. Taubenberger, D.M. Morens// *Ann. Rev. Path.* – 2008. – Vol. 3. – P. 499-522.

410 Taylor, H.R. A case report of fowl plague keratoconjunctivitis/ H.R. Taylor, A.J. Turner// *Br. J. Ophthalmol.* – 1977. – Vol. 61(2). – P. 86-88.

411 The comparative pathology of severe acute respiratory syndrome and avian influenza A subtype H5N1 - a review/ W.F. Ng, K.F. To, W.W. Lam [et al.]// *Human Pathol.* – 2006. – Vol. 37. – P. 381-390.

412 The consensus trial study group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure/ *N. Engl. J. Med.* – 1987. – Vol. 316. – P. 1429-1435.

413 The course of infection in respiratory infected chickens caused by avian influenza virus A/H5N1/ A. Sergeev, O.V. Pyankov, O.K. Demina [et al.]// *Intern. J. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 14(1). - e336-e337.

414 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.

415 The distinctive features of influenza virus infection of dendritic cells/ A. Bender, M. Albert, A. Reddy [et al.]// *Immunobiol.* – 1998. – Vol. 198. – P. 552–567.

416 The fate of influenza A virus after infection of human macrophages and dendritic cells/ K.R. Short, A.G. Brooks, P.C. Reading, S.L. Londrigan// *J. Gen. Virol.* – 2012. – Vol. 93. – P. 2315–2325.

417 The histopathology and electron microscopy of a human monkeypox lesion/ M.J. Stables, A.A. Watson, J.F. Boyd [et al.]// *Transcr. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* – 1985. – Vol. 79. P. 192-202.

418 The infection potential in the domestic setting and the role of hygiene practice in reducing infection/ International Scientific Forum on Home Hygiene, 2002. - Available from: <http://www.ifh-homehygiene.org/2003/2library/2lbr00.asp#IFHCONSENSUSPUBLICATIONS>.

419 The invasion routes of neurovirulent A/Hong Kong/483/97 (H5N1) influenza virus into the central nervous system after respiratory infection in mice/ C.H. Park, M. Ishinaka, A. Takada [et al.]// *Arch. Virol.* – 2002. – Vol. 147. – P. 1425–1436.

420 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.

421 The method of extrapolation of virus ID₅₀ from one mammalian species to another/ V.A. Zhukov, L.N. Shishkina, A.N. Sergeev [et al.]// Infect. Dis. Rev. – 2001. – Vol. S3. - P. 124-126.

422 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.

423 The pathology and pathogenesis of experimental severe acute respiratory syndrome and influenza in animal models/ J.M.A. van den Brand, B.L. Haagmans, D. van Riel [et al.]// J. Comp. Path. – 2014. – Vol. 151. – P. 83-112.

424 The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)/ G. Zaucha, P. Jahrling, T. Geisbert [et al.]// Lab. Invest. – 2001. – Vol. 81. – P. 1581–1600.

425 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.

426 The role of squirrels in sustaining monkeypox virus transmission/ L. Khodakevich, M. Szczeniowski, M.D. Manbu [et al.]// Trop. Geogr. Med. – 1987. – Vol. 39. – P. 115–122.

427 The top 10 causes of death. - Geneva: WHO, 2012. Fact sheet N 310. Updated May 2014. - Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index2.html>.

428 Tissue tropism of a Thailand strain of high-pathogenicity avian influenza virus (H5N1) in tissues of naturally infected native chickens (*Gallus gallus*), Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and ducks (*Anas spp.*)/ C. Antarasena, R. Sirimujalin, P. Prommuang [et al.]// Avian Pathol. – 2006. – Vol. 35(3). – P. 250-253.

429 Transmissibility of the monkeypox virus clades via respiratory transmission: investigation using the prairie dog-monkeypox virus challenge system/ C.L. Hutson, N. Gallardo-Romero, D.S. Carroll [et al.]// PloS ONE. – 2013. – Vol. 8(2). - e55488.

430 Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 a (H1N1) influenza viruses in ferrets and mice/ T.R. Maines, A. Jayaraman, J.A. Belser [et al.]// Science. – 2009. – Vol. 325. – P. 484–487.

431 Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands/ M. Koopmans, B. Wilbrink, M. Conyn [et al.]// *Lancet*. – 2004. – Vol. 363. – P. 587–593.

432 Transmission of monkeypox among persons exposed to infected prairie dogs in Indiana in 2003/ J.C. Kile, A.T. Fleischauer, B. Beard [et al.]// *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* – 2005. – Vol. 159. – P. 1022–1025.

433 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.

434 Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract/ J.M. Nicholls, M.C.W. Chan, W.Y. Chan [et al.]// *Nature Med.* – 2007. – Vol. 13. – P. 147–149.

435 Updated rapid risk assessment: human infection with a novel avian influenza A(H7N9) virus, China; - Third update. - Stockholm: ECDC, 2014. - Available from: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/influenza-AH7N9-China-rapidrisk-assessment-27-January-2014.pdf>.

436 Update: multistate outbreak of monkeypox—Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003/ *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* – 2003. – Vol. 52. – P. 616–618.

437 Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. Writing committee of the second World Health Organization consultation on clinical aspects of human infection with avian influenza A (H5N1) virus/ *N. Engl. J. Med.* - 2008. – Vol. 358(3). – P. 261–273.

438 U.S. Department of health and human services Food and drug administration, Center for drug evaluation and research (CDER), Center for biologics evaluation and research (CBER). Product development under the animal rule guidance for industry/ FDA, USA: 2015. - Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm399200.htm>.

439 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.

440 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.

441 Vaccinia virus induces apoptosis of infected macrophages/ Z. Humlova, M. Vokurka, M. Esteban, Z. Melkova// J. Gen. Virol. – 2002. – Vol. 83. – P. 2821–2832.

442 Vaccinia virus induces strong immuno-regulatory cytokine production in healthy human epidermal keratinocytes: a novel strategy for immune evasion/ L. Liu, Z. Xu, R.C. Fuhlbrigge [et al.]// J. Virol. – 2005. – Vol. 79. – P. 7363–7370.

443 Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion/ J. Engelmayer, M. Larsson, M. Subklewe [et al.]// J. Immunol. – 1999. – Vol. 163. – P. 6762-6768.

444 Vaccinia virus-mediated damage of murine ovaries and protection by virus-expressed interleukin-2/ G. Karupiah, B. Coupar, I. Ramshaw [et al.]// Immunol. Cell Biol. – 1990. – Vol. 68(5). – P. 325-333.

445 Vaccinia virus-related events and phenotypic changes after infection of dendritic cells derived from human monocytes/ R. Drillien, D. Spehner, A. Bohbot, D. Hanau// Virology. – 2000. – Vol. 268. – P. 471-481.

446 Van Reeth, K. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk/ K. Van Reeth// Vet. Res., BioMed Central. – 2007. – Vol. 38 (2). – P. 243-260.

447 Variations in the hemagglutinin of the 2009 H1N1 pandemic virus: potential for strains with altered virulence phenotype?/ J. Ye, E.M. Sorrell, Y. Cai [et al.]// PLoS Pathogens. – 2010. – Vol. 6(10). - e1001145.

448 Verdinexor, a novel selective inhibitor of nuclear export, deduces influenza A virus replication in vitro and in vivo/ O. Perwitasari, S. Johnson, X. Yan [et al.]// J. Virol. - 2014. – Vol. 88(17). – P. 10228–10243.

449 Veterinary virology/ F. Fenner, P.A. Bachmann, E.P.J. Gibbs [et al.]. – London: Acad. Press, Inc, 1987. - P. 659.

450 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.

451 Viral replication and innate host responses in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with influenza H5N1 and H1N1 viruses/ W.C.L. Yu, R.W.Y. Chan, J. Wang [et al.]// J. Virol. – 2011. – Vol. 85. – P. 6844–6855.

452 Viral replication rate regulates clinical outcome and CD8 T cell responses during highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in mice/ Y. Hatta, K. Hershberger, K. Shinya [et al.]// PLoS Pathogens. – 2010. – Vol. 6. - e1001139.

453 Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in non-human primates/ M. Saijo, Y. Ami, Y. Suzuki [et al.]// J. Gen. Virol. – 2009. – Vol. 90. – P. 2266–2271.

454 Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo Basin// N. Chen, G. Li, M.K. Liszewski [et al.]// J. Virol. – 2005. – Vol. 340. – P. 46–63.

455 Virulence may determine the necessary duration and dosage of oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 influenza virus in mice/ H.L. Yen, A.S. Monto, R.G. Webster [et al.]// J. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 192. – P. 665–672.

456 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.

457 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.

458 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.

459 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.

460 Weekly epidemiological record. – Geneva: WHO, 2011. – P. 469–480.

461 Wolff, H.L. The survival of smallpox virus (variola minor) in natural circumstances/ H.L. Wolff, J.J. Croon// Bull. WHO. – 1968. – Vol. 38. – P. 492-493.

462 Zambon, M.C. The pathogenesis of influenza in humans/ M.C. Zambon// Rev. Med. Virol. – 2001. - Vol. 11. – P. 227-241.

463 Zhang, W.H. Vaccinia virus F12L protein is required for actin tail formation, normal plaque size, and virulence/ W.H. Zhang, D. Wilcock, G.L. Smith// J. Virol. – 2000. – Vol. 74. – P. 11654–11662.

464 Zhao, B. Numerical study of the transport of droplets or particles generated by respiratory systems indoors/ B. Zhao, Z. Zhao, L. Xianing// Build. Environ. - 2005. – Vol. 40. – P. 1032-1039.

465 Reversion of PB2-627E to -627K during replication of an H5N1 Clade 2.2 virus in mammalian hosts depends on the origin of the nucleoprotein./ J. Bogs, D. Kalthoff , J. Veits [et al.]// J. Virol. – 2011. – Vol. 85(20). – P. 10691-8. doi: 10.1128/JVI.00786-11.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

- Таблица 1.1 Некоторые данные по вирулентности и инфекционности различных штаммов высокопатогенного вируса гриппа птиц (в/пат ВГП) А/Н5N1 и вируса гриппа (ВГ) А/Н1N1pdm09 при интраназальном введении мышам разных линий
- Таблица 1.2 Данные по накоплению вируса гриппа (ВГ) А/Н1N1, А/Н1N1pdm18, А/Н1N1pdm09 или высоко- и низкопатогенного вируса гриппа птиц (в/пат и н/пат ВГП) А/Н5N1 в органах и тканях интраназально инфицированных мышей
- Таблица 1.3 Данные патологических изменений у мышей, интраназально инфицированных вирусом гриппа (ВГ) А/Н1N1, А/Н1N1pdm09, высоко- или низкопатогенным вирусом гриппа птиц (в/пат и н/пат ВГП) А/Н5N1
- Таблица 1.4 Данные по эффективности разных лечебно-профилактических препаратов в экспериментах на лабораторных мышах, интраназально (и/н) зараженных вирусом гриппа (ВГ) А/Н1N1pdm09 и высокопатогенным вирусом гриппа птиц (в/пат ВГП) А/Н5N1
- Таблица 2.1 Используемые схемы введения аутбредным мышам популяции ICR препаратов Реаферон-ЕС-липидт® и Тамифлю®, а также плацебо в экспериментах с высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н5N1
- Таблица 4.1 Данные оценки титров антител к вирусам натуральной оспы (ВНО) и вакцинии (ВВ) в сыворотках крови людей, привитых против натуральной оспы
- Таблица 4.2 Данные чувствительности аутбредных мышей ICR, степных сурков, кроликов породы Шиншилла и свиней породы Сибирская мини-свинья к вирусу оспы обезьян (штамм V79-1-005) при интраназальном заражении
- Таблица 4.3 Данные по чувствительности степных сурков к вирусу оспы обезьян (штамм V79-1-005) при интраназальном заражении различными дозами
- Таблица 4.4 Данные по чувствительности степных сурков к вирусу оспы обезьян (штамм V79-1-005) при подкожном инфицировании различными

дозами

- Таблица 4.5 Прогнозные значения 50 %-х инфицирующих доз (ID_{50}) возбудителей натуральной оспы (ВНО) и оспы обезьян (ВОО) для аутбредных мышей ICR, степных сурков и людей
- Таблица 4.6 Обобщенные данные по чувствительности к вирусам натуральной оспы (ВНО) и оспы обезьян (ВОО) аутбредных мышей ICR, степных сурков и людей, а также первичных клеток-мишеней от них
- Таблица 4.7 Результаты оценки показателей взаимоотношения аутбредных мышей ICR с вирусом оспы обезьян (ВОО) при респираторном инфицировании с таковыми у человека (известных модельных видов животных)
- Таблица 4.8 Результаты оценки показателей взаимоотношения степных сурков с вирусом оспы обезьян (ВОО) при респираторном инфицировании с таковыми у человека (известными видами модельных животных)
- Таблица 4.9 Данные тестирования противовирусного действия химиопрепаратов на культуре клеток Vero в отношении вируса экстремелии (штамма К-1)
- Таблица 4.10 Данные тестирования противовирусного действия химиопрепаратов на культуре клеток Vero в отношении вируса вакцинии (штамм ЛИВП)
- Таблица 4.11 Данные тестирования противовирусного действия химиопрепаратов на культуре клеток Vero в отношении вируса оспы коров (штамм Гришак)
- Таблица 4.12 Данные тестирования противовирусного действия химиопрепаратов на культуре клеток Vero в отношении вируса оспы обезьян (штамм V79-1-005)
- Таблица 4.13 Данные протективной активности химиопрепаратов в отношении вируса оспы обезьян (штамм V79-1-005) через 7 суток после интраназального инфицирования аутбредных мышей ICR в дозе 2,4 lg БОЕ (ID_{50})
- Таблица 4.14 Данные протективной активности химиопрепаратов в отношении вируса оспы обезьян (штамм V79-1-005) через 7 суток после интраназального инфицирования аутбредных мышей ICR в дозе 3,4 lg БОЕ

(10 ID₅₀)

- Таблица 4.15 Данные протективной активности препаратов при оспе обезьян у степных сурков после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) дозой 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀)
- Таблица 4.16 Данные по титрам антител к вирусу оспы обезьян (штамм V79-1-005) у выживших степных сурков после и/н заражения дозой 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀) и обработки химиопрепаратами ST-246 или НИОХ-14
- Таблица 5.1 Данные по динамике инактивации трех штаммов вируса гриппа (ВГ) разных субтипов в составе дебриса суспензии первичных культур клеток человеческих легких при 37 °С
- Таблица 5.2 Данные по динамике накопления трех штаммов вируса гриппа (ВГ) разных субтипов в суспензии первичных культур клеток человеческих легких, по 3,0 (2,5...3,5)×10⁵ кл. в пробирке, при 37 °С
- Таблица 5.3 Данные по чувствительности суспензии клеток легких человека (СПККЛЧ) к четырем штаммам вируса гриппа (ВГ) и их продуктивность (N) через 18 часов после заражения
- Таблица 5.4 Прогнозные данные по инфекционности четырех штаммов вируса гриппа (ВГ) в отношении людей
- Таблица 5.5 Данные по вирулентности восьми штаммов высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 для кур генетической линии Род-Айленд при интраназальном (и/н) и аэрозольном (а/з) заражении
- Таблица 5.6 Данные по вирулентности штамма А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 при разных способах заражения кур генетической линии Род-Айленд
- Таблица 5.7 Данные по вирулентности восьми штаммов высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 для аутбредных мышей ICR при интраназальном (и/н) и аэрозольном (а/з) заражении
- Таблица 5.8 Данные по групповой принадлежности российских штаммов высокопатогенного вируса гриппа птиц (в/пат ВГП) А/Н5N1 в зависимости от их вирулентности для аутбредных мышей ICR при интраназальном и аэрозольном инфицировании

- Таблица 5.9 Данные по накоплению высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) в биоматериалах от кур генетической линии Род-Айленд, интраназально зараженных 3,2 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)
- Таблица 5.10 Данные по накоплению высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) в биоматериалах от кур генетической линии Род-Айленд при интраназальном заражении 3,2 lg ЭИД₅₀ (3 LD₅₀)
- Таблица 5.11 Данные по концентрациям штамма А/Chicken/Kurgan/05/2005 высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 и его рибонуклеиновых кислот (РНК) в биоматериалах от интраназально инфицированных кур генетической линии Род-Айленд дозой 3,2 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)
- Таблица 5.12 Данные по накоплению высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) в биоматериалах от домашних гусей генетической линии А. anser, интраназально зараженных 5,5 lg ЭИД₅₀
- Таблица 5.13 Данные по накоплению высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) в биоматериалах от аутбредных мышей ICR, интраназально зараженных дозой 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)
- Таблица 5.14 Данные по накоплению высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 (штамм А/Duck/Kurgan/08/05) в биоматериалах от аутбредных мышей ICR, интраназально зараженных 5,2 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)
- Таблица 5.15 Данные по накоплению высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) в биоматериалах от аутбредных мышей ICR, интраназально зараженных 5,8 lg ЭИД₅₀ (10 ID₅₀)
- Таблица 5.16 Результаты оценки показателей взаимоотношения аутбредных мышей ICR с высокопатогенным вирусом гриппа птиц (в/пат ВГП) А/Н5N1 при респираторном инфицировании с таковыми у человека (известного модельного животного)

- Таблица 5.17 Данные по защитной активности препаратов, перорально вводимых аутбредным мышам ICR, интраназально инфицированным штаммом A/Chicken/Kurgan/05/2005 высокопатогенного вируса гриппа птиц A/H5N1 10 LD₅₀
- Таблица 5.18 Данные по защитной активности препаратов, перорально вводимых аутбредным мышам ICR, интраназально инфицированных штаммом A/Chicken/Kurgan/05/2005 высокопатогенного вируса гриппа птиц A/H5N1 3 LD₅₀
- Рисунок 2.1 Блок-схема аэрозольного стенда с малой динамической камерой
- Рисунок 4.1 Данные по накоплению вируса оспы обезьян - ВОО (штамм V79-1-005) в суспензии первичной культуры клеток легких (СПККЛ), по 5,0 (4,0...6,0)×10⁵ кл. в пробирке, аутбредной мыши ICR и степного сурка, инфицирующая доза - 0,00001 БОЕ/кл.
- Рисунок 4.2 Данные по накоплению вируса натуральной оспы – ВНО (штамм Ind-3a) в первичных клеточных культурах крови, не вакцинированного от натуральной оспы человека
- Рисунок 4.3 Данные по культивированию вируса вакцинии – ВВ (штамм Л-ИВП) в монослое первичной культуры моноцитов-макрофагов крови (МПКМ-МК), по 9,0 (7,5...10,5) × 10⁵ кл. в лунке, не вакцинированного от натуральной оспы человека
- Рисунок 4.4 Моноцит-макрофаг (трансмиссивная электронная микроскопия) из монослоя моноцитов-макрофагов человеческой крови через 3 суток после заражения вирусом натуральной оспы (штамм Ind-3a) в дозе 0,017 БОЕ/кл.
- Рисунок 4.5 Моноцит-макрофаг (трансмиссивная электронная микроскопия) из суспензии мононуклеаров человеческой крови через 6 суток после заражения вирусом натуральной оспы (штамм Ind-3a) в дозе 0,008 БОЕ/кл.
- Рисунок 4.6 Данные по накоплению вируса натуральной оспы - ВНО (штамм Ind-3a) в монослоях первичных культур макрофагов селезенки (МПКМС) и перитонеальных макрофагах (МПКПМ), по 9,0 (7,5...10,5)×10⁵ кл. в лунке, аутбредной мыши ICR

- Рисунок 4.7 Макрофаг (трансмиссивная электронная микроскопия) из монослоя макрофагов селезенки аутбредной мыши ICR спустя 72 часа после заражения вирусом натуральной оспы (штаммом Ind-3a) в дозе 0,017 БОЕ/кл.
- Рисунок 4.8 Макрофаг (трансмиссивная электронная микроскопия) из монослоя макрофагов селезенки аутбредной мыши ICR спустя 144 часа после заражения вирусом натуральной оспы (штамм Ind-3a) в дозе 0,003 БОЕ/кл.
- Рисунок 4.9 Данные по накоплению вируса натуральной оспы - ВНО (штамм Ind-3a) в суспензии первичной культуры клеток легких (СПККЛ), по 5,0 (4,0...6,0)×10⁵ кл. в пробирке, аутбредной мыши ICR, степного сурка и цыпленка линии Род-Айленд, инфицирующая доза - 0,00001 БОЕ/кл.
- Рисунок 4.10 Степной сурок через 9 суток после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) дозой 2,2 lg БОЕ (1 ID₅₀)
- Рисунок 4.11 Степной сурок через 10 суток после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) дозой 4,2 lg БОЕ (100 ID₅₀)
- Рисунок 4.12 Степной сурок через 12 суток после подкожного инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) дозой 2,6 lg БОЕ
- Рисунок 4.13 Кривые экспоненциальной зависимости процента заболеваемости среди людей оспой обезьян и натуральной оспой от дозы вирусов натуральной оспы (ВНО) и оспы обезьян (ВОО)
- Рисунок 4.14 Данные по накоплению вируса оспы обезьян – ВОО (штамма V79-1-005) в биоматериалах от степных сурков, интраназально зараженных дозой 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀)
- Рисунок 4.15 Данные по накоплению вируса оспы обезьян - ВОО (штамм V79-1-005) в биоматериалах от погибших степных сурков после подкожного инфицирования дозой 7,1 lg БОЕ
- Рисунок 4.16 Данные по накоплению вируса оспы обезьян - ВОО (штамма V79-1-005) в биоматериалах от погибших степных сурков после подкожного инфицирования дозой 5,6 lg БОЕ
- Рисунок 4.17 Данные по накоплению вируса оспы обезьян - ВОО (штамм V79-1-005) в биоматериалах аутбредных мышей ICR, интраназально инфи-

цированных с помощью дозы 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀)

- Рисунок 4.18 Реснитчатый эпителиоцит трахеи (трансмиссивная электронная микроскопия) степного сурка спустя 7 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀)
- Рисунок 4.19 Альвеолярный макрофаг (трансмиссивная электронная микроскопия) степного сурка спустя 7 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀)
- Рисунок 4.20 Бронхиальный эпителиоцит (трансмиссивная электронная микроскопия) степного сурка спустя 9 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀)
- Рисунок 4.21 Плазмоцит в лимфоузле (трансмиссивная электронная микроскопия) степного сурка спустя 12 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀)
- Рисунок 4.22 Участок стенки капилляра в собственной пластинке слизистой оболочки трахеи (трансмиссивная электронная микроскопия) степного сурка спустя 9 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀)
- Рисунок 4.23 Альвеолы (трансмиссивная электронная микроскопия) степного сурка спустя 9 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀)
- Рисунок 4.24 Ткани органов дыхательного тракта (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) степного сурков с изменениями спустя 9 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀)
- Рисунок 4.25 Ткань кожи (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) степных сурков спустя 9 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀)
- Рисунок 4.26 Ткани внутренних органов (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) степных сурков спустя 9 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀)

- Рисунок 4.27 Ткань дыхательного отдела легкого (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) аутбредной мыши ICR через 7 суток после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀)
- Рисунок 4.28 Ткань бронхиального участка легкого (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) аутбредной мыши ICR через 7 суток после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀)
- Рисунок 4.29 Ткань капилляра дыхательного отдела легкого (трансмиссивная электронная микроскопия) аутбредной мышью ICR через 9 суток после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀)
- Рисунок 4.30 Альвеолярный макрофаг (трансмиссивная электронная микроскопия) аутбредной мыши ICR через 7 суток после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀)
- Рисунок 4.31 Ткань легкого (трансмиссивная электронная микроскопия) аутбредной мышью ICR через 7 суток после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀)
- Рисунок 4.32 Ткань артериального кровеносного сосуда легкого (трансмиссивная электронная микроскопия) аутбредной мышью ICR через 7 суток после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀)
- Рисунок 4.33 Соединительнотканная клетка почки (трансмиссивная электронная микроскопия) аутбредной мыши ICR через 7 суток после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀)
- Рисунок 4.34 Патогенетическая схема заболевания аутбредных мышью ICR, интраназально инфицированных вирусом оспы обезьян – ВОО (штамм V79-1-005) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID₅₀)
- Рисунок 4.35 Патогенетическая схема заболевания степных сурков, интраназально инфицированных вирусом оспы обезьян – ВОО (штамм V79-1-005) в

дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID₅₀)

- Рисунок 5.1 Верхняя стенка ротовой полости курицы генетической линии Род-Айленд
- Рисунок 5.2 Ткань легкого (световая микроскопия, окраска азуром II) аутбредной мыши ICR через 1 сутки после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)
- Рисунок 5.3 Ткань трахеи (световая микроскопия, окраска по ван Гизону) аутбредной мыши ICR через 2 суток после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)
- Рисунок 5.4 Слизистая носа (трансмиссивная электронная микроскопия) аутбредной мыши ICR через 3 суток после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)
- Рисунок 5.5 Ткань легкого (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) аутбредной мыши ICR через 3 суток после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)
- Рисунок 5.6 Ткань легкого (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) аутбредной мыши ICR через 3 суток после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)
- Рисунок 5.7 Ткань легкого (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) аутбредной мыши ICR через 6 суток после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)
- Рисунок 5.8 Ткань легкого (световая микроскопия, окраска азуром II) аутбредной мыши ICR через 6 суток после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)
- Рисунок 5.9 Слизистая стенки бронха (трансмиссивная электронная микроскопия)

аутбредной мыши ICR через 1 сутки после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)

Рисунок 5.10 Ткань большого полушария головного мозга (световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином) аутбредной мыши ICR через 4 суток после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)

Рисунок 5.11 Патогенетическая схема заболевания у аутбредных мышей ICR, интраназально (и/н) инфицированных штаммом A/Chicken/Kurgan/05/2005 высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) A/H5N1 в дозе 2,1 lg ЭИД₅₀ (10 LD₅₀)