

На правах рукописи

Титова Ксения Александровна

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

1.5.10 – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2021

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

Научный руководитель: Сергеев Александр Александрович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Официальные оппоненты: Беклемишев Анатолий Борисович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией геномной инженерии Научно-исследовательского института биохимии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования РФ;

Бабкин Игорь Викторович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Защита состоится «__» _____ 2021 г. в XX:00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора по адресу: р.п. Кольцово Новосибирской области, 630559, номер тел.: +7(383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора - <http://www.vector.nsc.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Непомнящих Татьяна Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Прошло уже 40 лет с тех пор, как была успешно завершена программа глобального искоренения натуральной оспы (НО) на Земном шаре. Тем не менее, угроза возникновения этой особо опасной инфекции существует и по настоящее время из-за возможности преднамеренного или случайного распространения ее возбудителя, потенциальными источниками которого могут быть:

- действующие, возможно, нелегальные его хранилища (Henderson et al., 1999; Jahrling, Fritz, Hensley, 2005; Anderson, 2012);

- останки людей, погибших от НО, контакт с которыми может происходить при археологических раскопках в грунтах вечной мерзлоты, где вирус сохраняется в жизнеспособном состоянии длительное время (Herrlich, 1960; Biagini et al., 2012; McCollum et al., 2014);

- искусственно созданный вирус по данным первичной структуры его генома (Parker et al., 2012).

При этом в мире сложилась довольно опасная ситуация: более половины его населения не имеет противооспенного иммунитета. В последние десятилетия отмечается увеличение масштабности и частоты эпидемических вспышек других ортопоксвирусных инфекций: оспы коров и оспы обезьян (Маренникова, Щелкунов, 1998; Reed et al., 2004; Борисевич и др., 2012). В то же время по сей день существует только один официально разрешенный (с середины 2018 г.) к применению (и то только в США) химиопрепарат (Tecovirimat на основе ST-246) для защиты людей от ортопоксвирусных инфекций (FDA, 2018). Одним из препятствий быстрому прогрессу в создании медицинских средств защиты от НО является отсутствие лабораторных моделей для массового скрининга препаратов по противооспенной активности в экспериментах с использованием вируса натуральной оспы (*variola virus* - VARV) и животных (Americo et al., 2010; Hutson et al., 2010; Stabenow et al., 2010), что делает актуальной проблему разработки таких моделей.

Степень разработанности. Основываясь на подходе, связанным с поиском лабораторных моделей, воспроизводящих внешнюю клиническую картину НО, до настоящего времени для оценки эффективности исследуемых препаратов от этого заболевания подобрана лишь одна такая модельная система (Jahrling et al., 2004; Huggins et al., 2009; Charman et al., 2010) на основе штамма Harper VARV (с неизвестной величиной вирулентности для человека) и *Macaca (M.) cynomolgus* (синонимы - *M. fascicularis* и *M. irus*). Однако данный модельный вид животных является крайне дорогостоящим и применение его в вирусологических экспериментах сопряжено с большой трудоемкостью, что существенно затрудняет его использование в крупномасштабных статистически значимых экспериментах по оценке эффективности разрабатываемых препаратов. Кроме того, несмотря на относительно близкую к человеку клиническую картину заболевания, вызываемого VARV у этих приматов, их чувствительность не менее чем в 10 000 раз ниже к данному патогену при инфицировании через респираторный тракт (Hahn, McGavran 1961; LeDuc, Jahrling, 2001; Jahrling et al., 2004), чем людей, для которых 50 %-я инфицирующая доза (ИД₅₀) при теоретическом расчете составляет 0-2 lg БОЕ (десятичный логарифм бляшкообразующих единиц) (Дроздов и др., 1987; Chimerix, 2012; Сергеев, 2016). Причем этот вид животных используется только для оценки терапевтической (лечебной) эффективности противооспенных препаратов, при этом его инфицирование осуществляется внутривенным методом, вводя 8 lg БОЕ VARV (Huggins et al., 2009;

Mucker et al., 2013), тогда как основные пути заражения человека этим патогеном реализуются через органы дыхательного тракта.

В то же время существует второй подход по поиску чувствительной лабораторной модели для оценки защитной эффективности противовирусных препаратов, сориентированный на воспроизведение не внешней клинической симптоматики вирусного заболевания у человека, а инфекционного процесса в первичных и вторичных органах-мишенях и клетках-мишенях, наличие которого позволит рассчитать ИД₅₀ (Сергеев и др., 2013).

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

Чтобы достичь данной цели, требовалось решить следующие задачи:

1) изучить чувствительность иммунокомпетентных мышей аутбредной популяции (а/б п.) ICR, а также мышей иммунодефицитных линий (и/д л.) SCID и Nude к вирулентному в отношении человека штамму India-3a VARV при их и/н заражении по величинам 50 %-й летальной дозы (ЛД₅₀) и ИД₅₀, вычисленной по наличию признаков заболевания или по наличию вируса в легких;

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

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

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

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

Научная новизна работы:

1) оценена восприимчивость при и/н заражении мышей а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные) и и/д л. SCID и Nude (18-21-суточные) к VARV (штамм India-3a) по величинам ИД₅₀, определенным по присутствию инфекционного процесса в легких по прошествии 3 или 4 суток после инфицирования (п.и.);

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

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

4) исследованы и доказаны защитные действия химически синтезированных соединений (НИОХ-14 и ST-246) и вакцины оспенной живой сухой для кожного применения, произведенной в Акционерном обществе «Научно-производственное объединение «Микроген» (АО «НПО «Микроген»), с использованием выбранных лабораторных моделей: «10-14-суточная мышь а/б п. ICR и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции» и «18-21-суточная мышь и/д л. SCID и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции».

ции» (в отношении НИОХ-14 и ST-246); «18-21-суточная мышь а/б п. ICR – и штамм India-3a VARV для ее и/н инокуляции» (в отношении противооспенной вакцины);

5) разработанные способы определения эффективности лечебно-профилактических препаратов от НО с помощью первых двух вышеупомянутых лабораторных моделей были запатентованы в Российской Федерации (Сергеев и др., 2014, 2015).

Теоретическая и практическая значимость работы:

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

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

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

2) с применением выбранных нами лабораторных моделей «10-14-суточные мыши а/б п. ICR, инфицированные штаммом India-3a VARV» и «18-21-суточные мыши и/д л. SCID, инфицированные штаммом India-3a VARV», были разработаны соответствующие методические рекомендации по их использованию (МР 4.2.005-16 и 4.2.003-16 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, титульные листы которых представлены в приложениях А и Б соответственно), и успешно осуществлены доклинические исследования российского химически синтезированного соединения НИОХ-14, включая его специфическую противооспенную активность, что делает возможным в дальнейшем его регистрацию в Министерстве здравоохранения РФ; результаты этих исследований были применены при выполнении Госконтрактов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора по федеральной целевой программе «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009-2014 годы)»;

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

Методология и методы исследования. С целью проверки применимости выбранных видов животного в качестве модельных для НО в работе использовали методологию оценки показателей их инфицирования VARV через респираторный тракт в сравнении с таковыми у человека (или известного модельного вида животных - *M. cynomolgus*), основанную на изучении у них инфекционного процесса. В исследованиях также были применены традиционные вирусологические, культуральные, гистологические, электронно-микроскопические, серологические и статистические методы исследований.

Положения, выносимые на защиту:

1) мыши а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные), а также и/д л. SCID и Nude (18-21-суточные) обладают сравнимой чувствительностью к штамму India-3a VARV, судя по ИД₅₀, оцененной по регистрации вируса в легких после и/н инфицирования;

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

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

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

Степень достоверности и апробация результатов. Статистическую обработку и сравнение экспериментальных данных проводили стандартными методами с помощью пакета компьютерных программ «Statistica 6.0» (StatSoft Inc. 1984-2001).

Результаты этой работы были доложены на 7 российских и международных научных форумах, опубликованы в 8 печатных работах, включая 2 патента Российской Федерации на изобретения.

Личный вклад соискателя: в определении восприимчивости мышей а/б п. ICR и и/д л. SCID и Nude к VARV при проведении экспериментов по их и/н инфицированию; в исследовании динамики диссеминации VARV в организме зараженных мышей (с ведущим научным сотрудником лаборатории коллекции вируса натуральной оспы и ортопоксвирусов, кандидатом медицинских наук – к.м.н. Сергеевым Ал.А.); в исследовании гистологических изменений у зараженных мышей и их первичных культур клеток (макрофагов селезенки), инфицированных VARV (с заведующим отделом микроскопических исследований Тарановым О.С.); в определении возможности применения мышей а/б п. ICR и и/д л. SCID как модельных животных к НО, базируясь на имеющихся экспериментальных результатах; в изучении эффективности препаратов от НО при использовании VARV на мышцах а/б п. ICR и и/д л. SCID (с к.м.н. Сергеевым Ал.А.).

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, список сокращений и условных обозначений, список литературы и список иллюстративного материала. Диссертация иллюстрирована 20 таблицами и 14 рисунками. Список литературы включает 163 источника, в том числе 125 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Литературный обзор

В диссертационной работе приведена информация из научных источников, касающаяся видов лабораторных животных, используемых при оценке эффективности препаратов от НО. Было обращено внимание на чувствительность к VARV различных видов лабораторных животных и человека, в том числе их первичных клеток-мишеней для этого патогена; на его диссеминацию в их организме; на изменения в органах и тканях, а также на оценку эффективности препаратов от НО с использованием единственно суще-

ствующего модельного вида животных: *M. synomolgus*. Сделано заключение, мотивирующее необходимость проведения исследований по разработке другой лабораторной модели для НО.

2 Материалы и методы

Эксперименты с живым VARV были выполнены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» в максимально изолированной лаборатории (BSL-4 по зарубежной классификации) с применением изолирующих пневмокостюмов.

Вирусы. В работе был использован штамм India-3a VARV, полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Подлинность штамма VARV была подтверждена секвенированием его генома. Нарработку VARV проводили в культуре клеток Vero с использованием среды DMEM (ООО «БиолоТ», Россия). На основе данного штамма была приготовлена суспензия препарата VARV с концентрацией 6,7 lg БОЕ/мл.

Лабораторные животные. Для исследований были использованы следующие лабораторные животные:

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

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

- мыши и/д л. SCID, имеющие тяжелый комбинированный иммунодефицит (дефицит Т- и В-лимфоцитов и иммуноглобулинов), обоего пола массой 12-14 г (18-21-суточные) в количестве около 160 особей.

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с протоколом № 1-01.2014, утвержденным биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора 28 января 2014 г.

Противовирусные препараты. В исследованиях были использованы химические соединения, синтезированные в Новосибирском институте органической химии (НИОХ) им. Н.Н. Ворожцова СО РАН: 7-[N`-(4-Трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0_{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновая кислота (НИОХ-14), ранее проявившее противовирусную активность в опытах *in vitro* в отношении ортопоксвирусов (Селиванов и др., 2011); ST-246 (4-трифторметил-N-(3,3а,4,4а,5,5а,6,6а-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етеноциклопроп[*f*]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид) с установленной высокой противоопухолевой активностью (Bailey et al., 2007).

Все лабораторные образцы химиопрепаратов были охарактеризованы и паспортизованы и их подлинность была подтверждена инфракрасной спектроскопией, результатами элементного анализа и спектрами ядерного магнитного резонанса.

Перевиваемая клеточная культура. В работе была использована перевиваемая культура клеток Vero (клетки почки зеленой мартышки), полученная из коллекции клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Выращивание монослоя клеток Vero осуществляли в ростовой питательной среде: среда DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) с добавлением 10 % (по объему) эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («НуClone», США), стрептомицина (100 мкг/мл) и пенициллина (100 МЕ/мл). В качестве поддерживающей питательной среды при культивировании вируса

использовали среду DMEM с теми же антибиотиками, но с добавлением эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота в конечной концентрации 2 % (по объему).

Метод приготовления первичных культур клеток макрофагов селезенки мыши. При получении монослоя селезеночных макрофагов для исследований с VARV у мышей брали селезенку, клетки которой дезинтегрировали в пробирке с помощью стеклянного пестика и отмывали питательной средой RPMI-1640. Из приготовленной на основе ростовой питательной среды клеточной суспензии получали путем культивирования в 24-луночных пластиковых планшетах в атмосфере, содержащей 5% CO₂, при температуре 37 °С в течение 24 часов монослой макрофагов. Количество селезеночных макрофагов в лунке составляло 9,0 (7,5-10,5)×10⁵. По данным световой микроскопии, эти клетки в монослое сохраняли свою жизнеспособность длительное время (7 сут) в процессе инкубирования при 34,5 °С: через 3 сут ~98 %, а через 7 сут ~87 %.

Методы и дозы инфицирования животных и их первичной культуры макрофагов селезенки. В исследованиях на мышах а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные) и и/д л. SCID и Nude (18-21-суточные) содержащий VARV материал в дозах 1,2-5,2 БОЕ/мышь вводили (после проведения ингаляционного рауш-наркоза с помощью диэтилового эфира) и/н в объеме 0,03 мл суммарно в обе ноздри, используя для заражения различные его разведения. Заражение монослоя селезеночных макрофагов, полученного от мышей а/б п. ICR (10-14-суточные), осуществляли VARV в дозе 0,003 или 0,017 БОЕ/кл., вводя вирусосодержащий материал в объеме по 0,1 мл в лунки 24-луночного культурального планшета.

Методы подготовки биоматериалов от инфицированных животных. Забор проб органов и тканей (за исключением крови) у мышей осуществляли, предварительно проведя процедуру эвтаназии с помощью цервикальной дислокации. Для вирусологического исследования готовили 10 %-е гомогенаты органов и тканей, инфицированных VARV мышей методом механического растирания пестиком в ступке с речным песком. Забор крови у мышей осуществляли из ретроорбитального венозного синуса под эфирным рауш-наркозом, из которой центрифугированием получали сгусток форменных элементов и сыворотку.

Метод изучения динамики накопления вируса в первичной культуре макрофагов селезенки мыши. Монослои первичной культуры макрофагов селезенки мыши а/б п. ICR, инфицированные VARV, культивировали в лунках 24-луночного культурального планшета в поддерживающей питательной среде на основе RPMI-1640 при 34,5 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Для определения биологической концентрации вируса из 4 лунок после 3-кратной заморозки-оттайки отбирали пробы по отдельности в каждой временной точке (через 1, 48, 72, 144 и 168 часов п.з.). Для электронно-микроскопического исследования инфицированные VARV монослои макрофагов селезенки мыши отмывали, снимали резиновым полисменом и готовили образцы.

Схемы применения и критерии оценки эффективности противовирусных препаратов в экспериментах in vivo. При работе с VARV химически синтезированные соединения НИОХ-14 и ST-246 вводили мышам а/б п. ICR (10-14-суточные) и и/д л. SCID в дозе соответственно 60 или 50 мкг/г массы 1-кратно ежедневно за 1 сутки до заражения и соответственно в течение 2 и 3 суток с момента заражения. Контрольные группы животных в экспериментах с VARV обрабатывали раствором метилцеллюлозы с твином-80, который использовали для получения суспензии соединений НИОХ и ST-246, применяя аналогичные схемы и способ введения, что и для химически

синтезированных соединений.

В экспериментах на мышах, обработанных противовирусными препаратами, определяли концентрацию VARV в легких (после приготовления их гомогенатов) через 3 или 4 суток п.з. с целью оценки коэффициента защиты от инфицирования (КЗИ), который вычисляли по формуле: $\text{КЗИ} = \% \text{ животных с наличием вируса в легких в контрольной группе} - \% \text{ животных с наличием вируса в легких в опытной группе}$, а также индекса подавления продукции вируса (ИППВ) в легких, который вычисляли по формуле: $\text{ИППВ} = \lg \text{ количества вируса в легких в контрольной группе животных} - \lg \text{ количества вируса в легких в опытной группе животных}$.

Метод вирусологического анализа проб. Инфекционные титры VARV в биоматериалах определяли стандартным для поксвирусов методом негативных колоний на культуре клеток Vero без агарового покрытия (Leparc-Goffart et al., 2005).

Методы патоморфологических исследований. Для световой микроскопии образцы органов и тканей мышей фиксировали в 4 %-м растворе параформальдегида, готовили парафиновые срезы и окрашивали гематоксилином и эозином. Для электронно-микроскопического исследования образцов применялась дополнительная фиксация 1 %-м раствором осмиевой кислоты, ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Микроскопические исследования и микрофотосъемку проводили с использованием светооптического микроскопа Imager Z1 (Zeiss, Германия) и электронного микроскопа JEM 1400 (Jeol, Япония).

Методы статистической обработки результатов. Статистическую обработку и сравнение результатов проводили стандартными методами (Закс, 1976), используя пакет компьютерных программ «Statistica 6.0» (StatSoft Inc. 1984-2001) (Халафян, 2010).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3 Изучение возможности использования лабораторных моделей для натуральной оспы на основе мышей по оценке защитной эффективности препаратов для человека

3.1 Экспериментальная оценка чувствительности мышей к возбудителю натуральной оспы

На первом этапе были проведены исследования по оценке чувствительности 4 групп мышей (а/б п. ICR 10-14-суточных и 42-49-суточных, а также и/д л. SCID и Nude 18-21-суточных) по 6 в каждой к штамму India-3a VARV с целью выявления у них каких-либо внешних признаков заболевания, включая гибель. При этом животных и/н заражали одной дозой вируса: 5,2 lg БОЕ. По результатам проведенных экспериментов не было выявлено визуальной симптоматики ни у одного животного из 4 групп и тем более летального эффекта при использованной дозе и/н заражения VARV.

В связи с этим была проведена серия экспериментов по определению у этих животных ИД₅₀ VARV по его наличию в легких. Для определения величины данного показателя необходимо было сначала изучить динамику накопления патогена в легких мышей с целью выбора временной точки, когда концентрация вируса в этом органе достигнет максимальных значений. При этом каждую группу животных (мышь а/б п. ICR 10-14-суточных и 42-49-суточных, а также и/д л. SCID и Nude 18-21-суточных), и/н инфицировали высокой дозой VARV (4,2 или 5,2 lg БОЕ) и через разные промежутки времени (от 5-10 мин до 10 суток п.з.) у них брали легкие и оценивали накопление в них вируса. По результатам этих исследований были выбраны (для регистрации наличия инфекционного процесса в легких) 3-и сутки п.з. для мышей а/б п. ICR (10-14-суточных и 42-49-суточных) и 4-е сутки п.з. для мышей и/д л. SCID и Nude, когда концентрации VARV в легких достигали максимальных значений. С целью определения величин ИД₅₀ вируса

животных инфицировали, используя по 4 особи на дозу вируса, разведенного с 10-кратным шагом, и повторяя эксперименты 3 раза. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1.

Из данных таблицы видно, что исследованные группы животных высокочувствительны к VARV. Причем с учетом только количества апплицированного в легких мышей вирусосодержащего материала (10 %), введенного и/н методом, ИД₅₀ VARV для них должны быть существенно ниже, как минимум, на 1 lg (коэффициент). В таком случае величины этого показателя у них приближаются к таковой у человека: 1,0 (0,6-1,4) lg БОЕ, полученной прогнозируемым путем.

Таким образом, в экспериментах по и/н заражению а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные) и и/д л. SCID и Nude (18-21-суточные) максимальной дозой VARV (штамм India-3a) 5,2 lg БОЕ не было отмечено внешних клинических признаков заболевания. Определены величины ИД₅₀ VARV для животных при и/н их заражении, оцененные по регистрации вируса в легких: 2,7 (2,3-3,1) lg БОЕ для 10-14-суточных мышей а/б п. ICR, 2,8 (2,4-3,2) lg БОЕ для 42-49-суточных мышей а/б п. ICR, 3,5 (3,1-3,9) lg БОЕ для 18-21-суточных мышей и/д л. SCID и 3,3 (2,8-3,8) lg БОЕ для 18-21-суточных мышей и/д л. Nude, которые с учетом 10 %-й его аппликации в этом органе при данном методе инфицирования были близки к таковой для человека, полученной другими исследователями.

3.2 Распространение возбудителя натуральной оспы в организме мышей

Учитывая, что 10-14-суточные и 42-49-суточные мыши а/б п. ICR, а также 18-21-суточные мыши и/д л. SCID и Nude по результатам регистрации VARV в легких проявляли высокую чувствительность к этому патогену при и/н заражении (п. 3.1), сравнимую с таковой у человека, в дальнейшей работе мы изучили диссеминацию данного возбудителя заболевания в организме этих мышей после и/н заражения с целью сравнения с таковой у человека и существующего модельного вида животных (*M. musculus*). На первом этапе необходимо было изучить динамику накопления VARV в органах, тканях и сыворотке крови 10-14-суточных мышей а/б п. ICR через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 суток после и/н заражения вирусом в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД₅₀). Результаты этих экспериментов представлены в таблице 2.

Из данных таблицы видно, что уже через 1 сутки п.з. возбудитель заболевания был обнаружен только в легких мышей, затем через 2 суток п.з. патоген был зарегистрирован в высоких концентрациях в легких и носовой перегородке со слизистой. К 10-м суткам п.з. вирус не удалось выявить в этих биоматериалах с помощью использованного метода титрования. Тогда как в предшествующий этому срок наблюдения (7 суток п.з.) в носовой перегородке со слизистой не было отмечено падения концентрации вируса, а в легких было. Через 3 и 5 суток п.з. патоген был обнаружен в относительно низких концентрациях в головном мозге мышей. При этом во все сроки наблюдения от 1 до 10-х суток п.з. вирус вообще не был зарегистрирован в других исследованных биоматериалах (клетки крови, сыворотка крови, трахея, пищевод, печень, селезенка, почки, двенадцатиперстная кишка). Самые большие значения концентрации VARV, превышающие 3,5 lg БОЕ/мл, были определены в легких через 2, 3 и 4 суток п.з. и в носовой перегородке со слизистой через 2, 3, 4 и 7 суток п.з.

Учитывая то, что достаточно подробная информация о диссеминации VARV в организме мышей а/б п. ICR (10-14 суток), нами только что была представлена, на втором этапе был проведен усеченный вариант такого исследования по количеству временных точек забора биоматериала от животных (через 1, 3, 5 суток п.з.) и видов органов, но на

Таблица 1 – Данные по 50 %-м инфицирующим дозам (ИД₅₀) вируса натуральной оспы (штамм India-3a), рассчитанным по наличию вируса в легких, для мышей аутбредной популяции (а/б п.) ICR и иммунодефицитных линий (и/д л.) SCID и Nude при интраназальном заражении

Категория мышей	Возраст мышей	ИД ₅₀ * (М), lg БОЕ	I ₉₅ *	ИД ₅₀ ** (М), lg БОЕ	I ₉₅ **
А/б п. ICR n=6	10-14 суток	2,7	2,3-3,1	1,7	1,3-2,1
А/б п. ICR n=6	42-49 суток	2,8	2,4-3,2	1,8	1,4-2,2
И/д л. SCID n=6	18-21 сутки	3,5	3,1-3,9	2,5	2,1-2,9
И/д л. Nude n=4	18-21 сутки	3,3	2,8-3,8	2,3	1,8-2,8

Примечания

БОЕ – бляшкообразующая единица

М – среднее значение

I₉₅ – доверительный интервал для М с вероятностью 95 %, рассчитанный по формуле Спирмена-Кербера

n – число животных

*Величины подсчитаны по фактам наличия патогена в легких мышей а/б п. ICR по прошествии 3 суток после заражения и мышей и/д л. SCID и Nude по прошествии 4 суток после заражения

**Величины рассчитаны с учетом количества апплицированного в легких мышей вирусосодержащего материала (10 %), введенного мышам и/н методом

Таблица 2 – Данные накопления штамма India-3a вируса натуральной оспы в организме 10-14-суточных мышей аутбредной популяции ICR, интраназально инфицированных дозой 4,2 Ig БОЕ (30 ИД₅₀)

Вид биоматериалов* от мышей	Концентрация вируса, Ig БОЕ/мл, М (I ₉₅) для n=4, в биоматериалах от мышей через разные промежутки времени (сутки) после заражения:							
	1	2	3	4	5	6	7	10
Клетки крови	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Сыворотка крови	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Носовая перегородка со слизистой	<0,4	4,8 (4,5-5,1)**	3,9 (3,6-4,2)**	3,9 (3,7-4,1)**	3,0 (2,6-3,4)**	2,9 (2,7-3,1)**	4,2 (3,9-4,5)**	<0,4
Трахея	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Легкие	2,7 (2,4-3,0)	4,6 (4,2-5,0)**	4,1 (3,7-4,5)**	3,7 (3,4-4,0)**	3,1 (2,8-3,4)	3,2 (2,8-3,6)	1,0 (0,7-1,3)	<0,4
Головной мозг	<0,4	<0,4	1,3 (0,7-1,9)**	<0,4	2,3 (2,0-2,6)**	<0,4	<0,4	<0,4
Пищевод	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Печень	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Селезенка	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Почки	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Двенадцатиперстная кишка	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4

Примечания
 БОЕ – бляшкообразующая
 ИД₅₀ – 50 %-я инфицирующая доза, рассчитанная по наличию вируса в легких животных через 3 суток после заражения
 М – среднее значение
 I₉₅ – доверительный интервал для М с вероятностью 95 %
 n – число мышей, взятых на временную точку
 <0,4 - величина ниже порога чувствительности (0,4 Ig БОЕ/мл) использованного метода титрования
 *Органы и ткани в виде 10 %-х гомогенатов, а также сыворотка крови
 **Величина отличается от таковой, полученной для соответствующего органа (ткани) через 1 сутки после заражения, при p≤0,05 (сравнение по двусторонним t-критерию Стьюдента и U-критерию Манна-Уитни)

42-49-суточных мышях той же популяции. Этим мышам заражали и/н способом, вводя дозу вируса 4,2 lg БОЕ (25 ИД₅₀). Результаты показали, что уже через 1 сутки п.з. возбудитель заболевания был обнаружен только в легких мышей, затем через 3 сутки п.з. патоген был зарегистрирован в высоких концентрациях в легких и носовой перегородке со слизистой, а к 7-м суткам п.з. наблюдалась тенденция падение значения этого показателя только в легких. При этом во все сроки наблюдения от 1 до 7-х суток п.з. вирус вообще не был зарегистрирован в других исследованных биоматериалах (клетки крови, сыворотка крови, трахея, головной мозг, селезенка).

Для оценки возможности размножения VARV в макрофагах мышей а/б п. ICR (10-14-суточные) был проведен эксперимент с использованием их первичной культуры селезеночных макрофагов. Для этого монослой клеток каждой лунки инфицировали VARV в дозе 0,003 или 0,017 БОЕ/кл., отбирая пробы для вирусологического исследования через 1, 48, 72, 144 и 168 часов п.з. Результаты исследований свидетельствовали о размножении VARV в монослое первичной культуре селезеночных макрофагов мыши, при этом наблюдали значимый прирост биологической концентрации этого вируса уже через 48, 72 и 168 часов п.з. Максимального уровня накопления в этой клеточной культуре вирус достигал через 48 часов п.з. дозой 0,017 БОЕ/кл. и через 168 часов п.з. дозой 0,003 БОЕ/кл., а при проведении электронной микроскопии в ней были обнаружены признаки его размножения (рисунок 1).

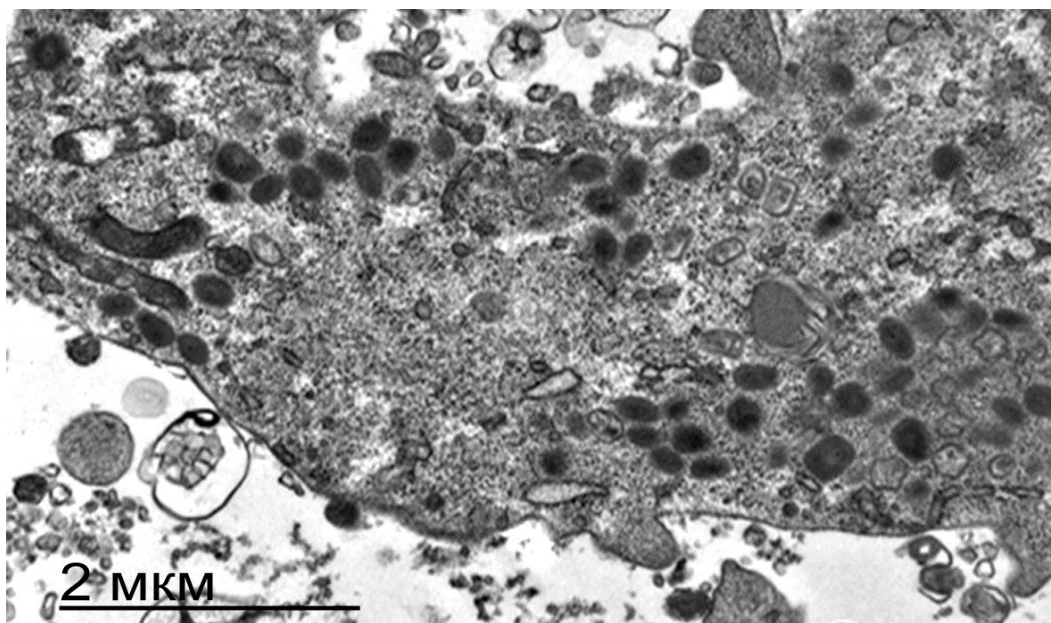


Рисунок 1 – Электронограмма макрофага из монослоя первичной культуры макрофагов селезенки 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR через 144 часа после заражения штаммом India-3a вируса натуральной оспы в дозе 0,003 БОЕ/кл.: признаки репродукции вируса, зрелые вирионы в цитоплазме

На третьем этапе была изучена динамика накопления VARV в органах, тканях и сыворотке крови мышам и/д л. SCID через 1, 2, 3, 4, 5, 7 суток после и/н заражения вирусом в дозе 5,2 lg БОЕ (50 ИД₅₀). Результаты этих экспериментов представлены в таблице 3.

Из данных таблицы видно, что уже через 1 сутки п.з. возбудитель заболевания был обнаружен только в легких мышей, затем через 2 суток п.з. патоген был зарегистрирован в высоких концентрациях в этом органе, а также в низкой - в носовой перегородке со слизистой и трахее. К 7-м суткам п.з. вирус не удалось выявить в носовой

Таблица 3 – Данные накопления штамма India-3a вируса натуральной оспы в организме 18-21-суточных мышей иммунодефицитной линии SCID, интраназально инфицированных дозой $5,2 \lg \text{БОЕ}$ (50 ИД_{50})

Вид биоматериалов* от мышей	Концентрация вируса, $\lg \text{БОЕ/мл}$, $M (I_{95})$ для $n=4$, в биоматериалах от мышей через разные промежутки времени (сутки) после заражения:					
	1	2	3	4	5	7
Клетки крови	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Сыворотка крови	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Носовая перегородка со слизистой	<0,4	<0,4	2,7 (2,3-3,1)**	2,2 (1,7-2,7)**	2,0 (1,7-2,3)**	<0,4
Трахея	<0,4	3,0 (2,6-3,4)**	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Легкие	3,3 (3,0-3,6)	4,2 (3,8-4,6)**	3,9 (3,6-4,2)**	3,8 (3,4-4,2)	3,7 (3,3-4,1)	2,9 (2,6-3,2)
Головной мозг	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Пищевод	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Печень	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Селезенка	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Двенадцатиперстная кишка	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Почки	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
<p>Примечания</p> <p>БОЕ – бляшкообразующая</p> <p>ИД_{50} – 50 %-я инфицирующая доза, рассчитанная по наличию вируса в легких животных через 4 суток после заражения</p> <p><0,4 - величина ниже порога чувствительности ($0,4 \lg \text{БОЕ/мл}$) использованного метода титрования</p> <p>M – среднее значение</p> <p>I_{95} – доверительный интервал для M с вероятностью 95 %</p> <p>n – число мышей, взятых на временную точку</p> <p>*Органы и ткани в виде 10 %-х гомогенатов, а также сыворотка крови</p> <p>**Величина отличается от таковой, полученной для соответствующего органа (ткани) через 1 сутки после заражения, при $p \leq 0,05$ (сравнение по двусторонним t-критерию Стьюдента и U-критерию Манна-Уитни)</p>						

перегородке со слизистой с помощью использованного метода титрования, а его концентрация в легких в это время существенно снизилась по сравнению с той, которую наблюдали через 2, 3 и 4 суток п.з. В трахее мышей возбудитель заболевания был обнаружен только 1-кратно (через 2 суток п.з.) и в относительно низком титре. При этом во все сроки наблюдения от 1 до 7-х суток п.з. вирус вообще не был зарегистрирован в других исследованных биоматериалах (клетки крови, сыворотка крови, головной мозг, пищевод, печень, селезенка, почки, двенадцатиперстная кишка). Самые большие значения концентрации VARV, превышающие 3,5 lg БОЕ/мл, были определены в легких через 2, 3 и 4 суток п.з., а превышающие или равные 2,0 lg БОЕ/мл, - в носовой перегородке со слизистой через 3, 4 и 5 суток п.з.

Учитывая то, что достаточно подробная информация о диссеминации VARV в организме мышей и/д л. SCID нами только что была представлена, на четвертом этапе был проведен усеченный вариант такого исследования по количеству временных точек забора биоматериала от животных (через 3, 6, 10 суток) и видов органов (легкие, носовая перегородка со слизистой, трахея и головной мозг), но на других иммунодефицитных мышях (линия Nude). Животных этой линии заражали и/н способом, вводя дозу вируса 5,2 lg БОЕ (80 ИД₅₀). При этом, как и у мышей линии SCID, накопление VARV наблюдалось в легких, носовой перегородке со слизистой и трахее.

Сам факт размножения вируса в органах дыхательной системы аутбредных и иммунодефицитных мышей при заражении VARV через респираторный тракт согласуется с таковым у человека и известного модельного вида животных (*M. cynomolgus*). При этом некоторые исследователи обнаруживали максимальные концентрации вируса в глоточных смывах людей (3-5 lg ООЕ /мл - оспообразующая единица/мл) и *M. cynomolgus* (2,0-4,5 lg БОЕ/мл), а также в гомогенатах ноздрей и носоглотки *M. cynomolgus* (2,0-4,8 lg ООЕ/мл) аналогично нашим данным с накоплением вируса в носу у мышей. Однако длительность присутствия вируса в верхнем отделе респираторного тракта у приматов и человека была лишь немного больше (≥ 11 суток), чем у и/н инфицированных аутбредных мышей (6-8 суток) и иммунодефицитных (3 суток). Титры вируса в легких модельного вида животных (*M. cynomolgus*) при заражении через дыхательный тракт дозой VARV 4,7 lg ООЕ имели близкие значения (3,8-5,5 lg ООЕ/мл) таковым, полученным нами на мышах, и/н зараженных сходной дозой VARV (4,2 или 5,2 lg БОЕ). При этом не было существенных различий по длительности инфекционного процесса в легких приматов и мышей (7-11 суток).

Таким образом, у мышей а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные) и и/д л. SCID и Nude (18-21-суточные), и/н зараженных VARV (штамм India-3a) 25-80 ИД₅₀, наблюдали инфекцию, ограниченную в основном органами респираторного тракта. Показано, что органами регулярного накопления патогена у этих животных являются легкие и нос, где в ряде случаев его концентрация превышала 4 lg БОЕ/мл гомогената. Полученные данные на мышах подтвердили сходство с некоторыми опубликованными показателями инфекционного процесса в первичных органах-мишенях у человека и известного модельного вида животных (*M. cynomolgus*) при НО: по факту накопления патогена в легких и в носу, а также по его концентрациям и частично по длительности его присутствия в них. В первичной культуре макрофагов селезенки 10-14-суточных мышей а/б п. ICR, инфицированной VARV (штамм India-3a), отмечен факт присутствия патогена и размножения.

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

Светооптические и электронно-микроскопические исследования проводили, используя различные органы и ткани, взятые через 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 10 суток после и/н инфицирования мышей а/б п. ICR и и/д л. SCID дозами VARV 4,2 (30 ИД₅₀) и 5,2 lg БОЕ (50 ИД₅₀) соответственно. При этом у таких мышей наблюдали сходные патоморфологические изменения, которые носили в основном воспалительно-деструктивный характер и были в основном локализованы в органах респираторного тракта. Они начинали проявляться достаточно рано: уже через 3 суток п.з., затем с максимальной степенью выраженности определялись через 5 и 7 суток п.з., а через 10 суток п.з. они практически не обнаруживались. На рисунках 2 и 3 зарегистрированы паталогические изменения в слизистой носа и легких мышей а/б п. ICR и и/д л. SCID через 3 и 5 суток п.з. VARV.

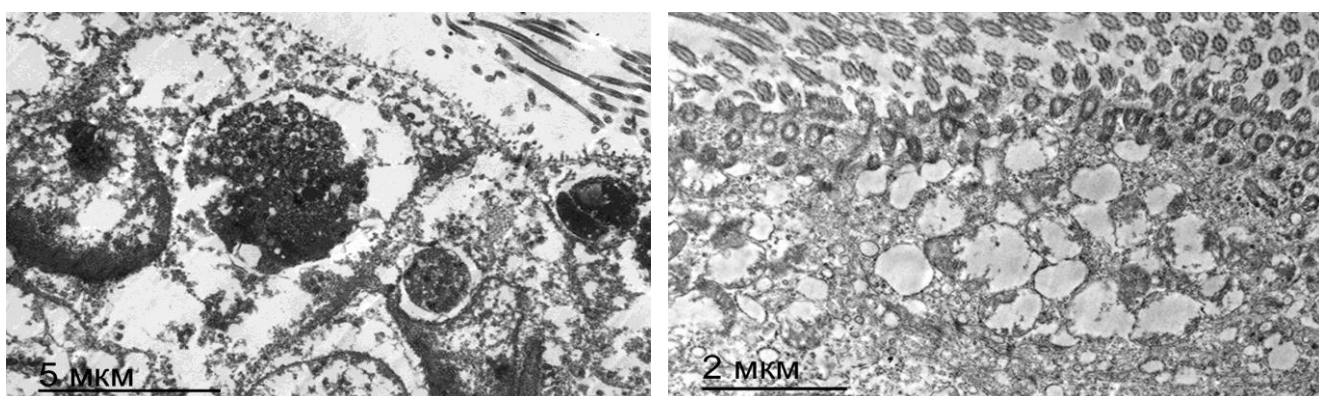


Рисунок 2 – Электронограмма ткани слизистой носа 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR (фото слева) и 18-21-суточной мыши иммунодефицитной линии SCID (фото справа) через соответственно 3 и 5 суток после интраназального заражения штаммом India-3a вируса натуральной оспы в дозе соответственно 4,2 lg БОЕ (30 ИД₅₀) и 5,2 lg БОЕ (50 ИД₅₀): дистрофические изменения эпителия - утрата ресничек, вакуолизация цитоплазмы эпителиоцитов

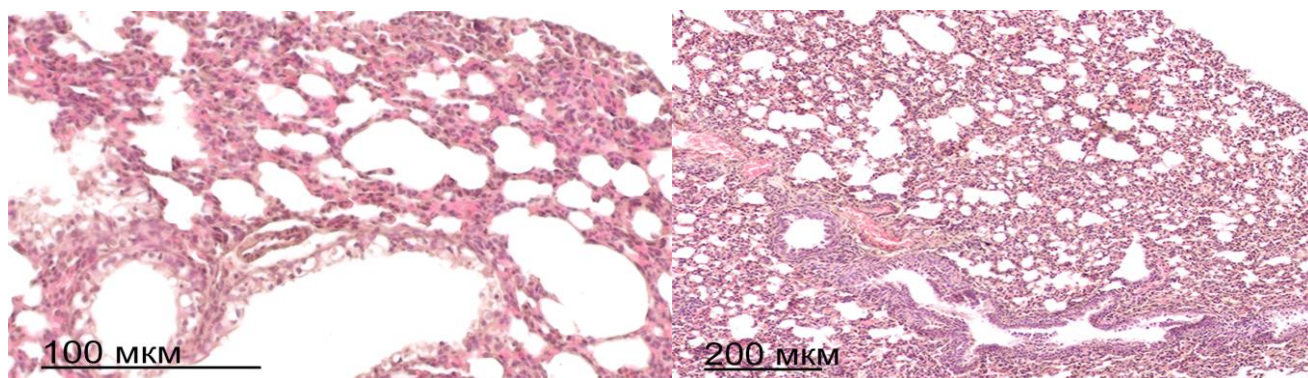


Рисунок 3 - Гистологический препарат (окраска гематоксилином и эозином) ткани легкого 10-14-суточной мыши аутбредной популяции ICR (фото слева) и 18-21-суточной мыши иммунодефицитной линии SCID (фото справа) через 5 суток после интраназального заражения штаммом India-3a вируса натуральной оспы в дозе соответственно 4,2 lg БОЕ (30 ИД₅₀) и 5,2 lg БОЕ (50 ИД₅₀): резко выраженная воспалительная инфильтрация паренхимы с преобладанием ателектазов и интенсивный периваскулярный отек

Кроме того, в трахее у этих же групп животных через 5 суток п.з. наблюдали выраженную вакуольную дистрофию покровных эпителиоцитов. Все патоморфологические изменения в органах респираторного тракта, наблюдаемые у мышей, были сходными с таковыми у людей при НО и известного модельного вида животных для этой инфекции (*M. synomolgus*).

Таким образом, у интраназально зараженных мышей а/б п. ICR (10-14-суточные) и и/д л. SCID (18-21-суточные) дозами соответственно 30 и 50 ИД₅₀ VARV (штамм India-3a) наиболее выраженные патоморфологические изменения воспалительно-некротического характера, сходные с таковыми у человека при НО, были сосредоточены в основном в респираторных органах.

3.4 Оценка возможность использования мышей аутбредной популяции ICR и иммунодефицитной линии SCID для изучения эффективности препаратов от натуральной оспы у человека

Ранее (п. 3.1–3.3) была представлена экспериментальная и теоретическая информация, показавшая потенциальную возможность использования мышей а/б п. ICR (10-14-суточные и 42-49-суточные) и и/д л. SCID и Nude (18-21-суточные) для исследования эффективности препаратов от НО. В этой связи для проверки адекватности результатов использования таких моделей тем, которые уже получены на других моделях, были проведены эксперименты по изучению противовирусного действия разрабатываемого в России химически синтезированного соединения НИОХ-14 при сравнении с американским соединением ST-246 (положительный контроль), который ранее уже продемонстрировал соответствующий защитный эффект. На первом этапе для этой цели использовали 10-14-суточных мышей а/б п. ICR, которых и/н инфицировали дозой вируса (штаммы India-3a) 3,7 lg БОЕ (10 ИД₅₀) и вводили перорально 1-кратно ежедневно за 1 сутки до заражения и соответственно в течение 2 суток с момента заражения 60 или 50 мкг/г массы животного соответственно НИОХ-14 или ST-246. При этом наблюдали за изменениями концентраций патогена в легких мышей спустя 3 суток п.и. Результаты таких исследований отражены в таблице 4.

По данным таблицы видно, что средние значения титров VARV в легких мышей, ранее обработанных химическими соединениями НИОХ-14 и ST-246 (опытные группы), не отличались между собой и были существенно ниже, чем таковое, которое наблюдалось у животных, получавших плацебо (контрольная группа), при $p \leq 0,05$. При этом величины ИППВ в легких животных опытных групп составили 2,0 lg. Количество обработанных соединением НИОХ-14 мышей с зарегистрированным содержанием VARV в легких через 3 суток п.з. было существенно ниже, чем таковое в контрольной группе животных (при $p \leq 0,05$). Соединения НИОХ-14 и ST-246 не отличались по этому показателю. При этом величины КЗИ мышей обеих опытных групп составили 57 %.

Обобщая результаты, представленные в таблице 4, можно отметить наличие защитной эффективности химически синтезированного соединения НИОХ-14, сравнимой с таковой ST-246, в испытанной схеме и дозе перорального применения на 10-14-суточных мышях а/б п. ICR, и/н зараженных 10 ИД₅₀ VARV (штамм India-3a).

На втором этапе (таблица 5) для оценки лечебно-профилактической активности НИОХ-14 и ST-246 были использовали 10-14-суточных мышей а/б п. ICR, которых и/н инфицировали дозой вируса (штамм India-3a) 5,2 lg БОЕ (50 ИД₅₀) и вводили перорально

Таблица 4 – Защитная активность химически синтезированных соединений, перорально вводимых 10-14-суточным мышам аутбредной популяции ICR, интраназально зараженным штаммом India-3a вируса натуральной оспы дозой 3,7 lg БОЕ (10 ИД₅₀)

Наименование показателей	Значения показателей для мышей, обработанных по схеме* препаратами:		
	НИОХ-14	ST-246	плацебо
Суточная доза вводимых препаратов на массу мыши	60 мкг/г	60 мкг/г	0,2 мл/мышь
Количество животных	7	7	7
Титры вируса в lg БОЕ/легкие у каждой мыши через 3 суток после заражения (п.з.)	2,4	2,5	4,5
	2,5	2,3	4,5
	2,1	2,3	4,4
	<1,1	<1,1	3,5
	<1,1	<1,1	2,8
	<1,1	<1,1	2,7
Средний титр вируса в lg БОЕ/легкие, М (I ₉₅) для n=7	1,6 (1,0...2,2)**	1,6 (1,0...2,2)**	3,6 (2,8...4,4)
ИППВ в lg в легких мышей	2,0	2,0	Н.о.
Кол-во (%) мышей с вирусом в легких	3*** (43)	3*** (43)	7 (100)
КЗИ в %	57	57	Н.о.
<p>Примечания</p> <p><1,1 – величина, находящаяся ниже порога чувствительности (1,1 lg БОЕ/легкие) метода титрования (использована при расчете М в виде самой величины порога чувствительности)</p> <p>БОЕ – бляшкообразующая единица</p> <p>ИД₅₀ – 50 %-я инфицирующая доза, рассчитанная по наличию вируса в легких животных через 3 суток п.з.</p> <p>ИППВ - индекс подавления продукции вируса = М титра вируса в гомогенатах легких мышей, обработанных плацебо – М титра вируса в гомогенатах легких мышей, обработанных соединением НИОХ-14 или ST-246</p> <p>КЗИ - коэффициент защиты от инфекции = % животных с вирусом в легких мышей, обработанных плацебо – % животных с вирусом в легких мышей, обработанных соединением НИОХ-14 или ST-246</p> <p>Н.о. – величина не определяется</p> <p>Плацебо - раствор, содержащий 0,75 % метилцеллюлозы и 1 % твина-80, который использовали для суспензирования соединений НИОХ-14 и ST-246</p> <p>М – среднее значение</p> <p>I₉₅ - доверительный интервал для М с вероятностью 95 %</p> <p>n – число подопытных мышей</p> <p>*Препараты вводили 1-кратно ежедневно за 1 сутки до заражения и в течение 2 суток с момента заражения</p> <p>**Отличие от контроля при p≤0,05 (в соответствии с двусторонним U-критерием Манна-Уитни)</p> <p>***Отличие от контроля при p≤0,05 (в соответствии с односторонним точным тестом Фишера)</p>			

Таблица 5 – Защитная активность химически синтезированных соединений, перорально вводимых 18-21-суточным мышам иммунодефицитной линии SCID, интраназально зараженным штаммом India-3a вируса натуральной оспы дозой 5,2 lg БОЕ (50 ИД₅₀)

Наименование показателей	Значения показателей для мышей, обработанных по схеме* препаратами:		
	НИОХ-14	ST-246	плацебо
Суточная доза вводимых препаратов на массу мыши	50 мкг/г	50 мкг/г	0,2 мл/мышь
Количество животных	10	9	8
Титры вируса в lg БОЕ/легкие у каждой мыши через 4 суток после заражения (п.з.)	2,1	2,4	3,2
	1,3	2,2	2,9
	2,3	2,4	3,6
	2,2	2,1	3,1
	2,7	2,1	3,6
	<1,1	2,3	3,0
	<1,1	2,3	3,3
	<1,1	<1,1	3,3
	<1,1	<1,1	
	<1,1		
Средний титр вируса в lg БОЕ/легкие, М (I ₉₅) для n=8-10	1,6 (1,1...2,1)** (n=10)	2,0 (1,6...2,4)** (n=9)	3,3 (3,1...3,5) (n=8)
ИППВ в lg в легких мышей	1,7	1,3	Н.о.
Кол-во (%) мышей с вирусом в легких	5*** (50)	7 (78)	8 (100)
КЗИ в %	50	22	Н.о.
<p>Примечания</p> <p><1,1 – величина, находящаяся ниже порога чувствительности (1,1 lg БОЕ/легкие) метода титрования (использована при расчете М в виде самой величины порога чувствительности)</p> <p>БОЕ – бляшкообразующая единица</p> <p>ИД₅₀ – 50 %-я инфицирующая доза, рассчитанная по наличию вируса в легких животных через 4 суток п.з.</p> <p>ИППВ - индекс подавления продукции вируса = М титра вируса в гомогенатах легких мышей, обработанных плацебо – М титра вируса в гомогенатах легких мышей, обработанных соединениями НИОХ-14 или ST-246</p> <p>КЗИ - коэффициент защиты от инфекции = % животных с вирусом в легких мышей, обработанных плацебо – % животных с вирусом в легких мышей, обработанных НИОХ-14 или ST-246</p> <p>Н.о. – величина не определяется</p> <p>Плацебо - раствор, содержащий 0,75 % метилцеллюлозы и 1 % твина-80, который использовали для суспензирования соединений НИОХ-14 и ST-246</p> <p>М – среднее значение</p> <p>I₉₅ - доверительный интервал для М с вероятностью 95 %</p> <p>n – число подопытных мышей</p> <p>*Препараты вводили 1-кратно ежедневно за 1 сутки до заражения и в течение 3 суток с момента заражения</p> <p>**Отличие от контроля при p≤0,05 (в соответствии с двусторонним U-критерием Манна-Уитни)</p> <p>***Отличие от контроля при p≤0,05 (сравнение по двустороннему точному тесту Фишера)</p>			

1-кратно ежедневно за 1 сутки до заражения и соответственно в течение 3 суток с момента заражения 60 или 50 мкг/г массы животного соответственно НИОХ-14 или ST-246. При этом наблюдали за изменениями концентраций патогена в легких мышей спустя 4 суток п.и.

По данным таблицы видно, что средние значения титров VARV в легких мышей, ранее обработанных соединениями НИОХ-14 и ST-246 (опытные группы), не отличались между собой и были существенно ниже, чем таковое, которое наблюдалось у животных, получавших плацебо (контрольная группа), при $p \leq 0,05$. При этом величины ИППВ в легких мышей опытных групп составили 1,7 lg для соединения НИОХ-14 и 1,3 lg для ST-246. Количество обработанных соединением НИОХ-14 мышей с зарегистрированным содержанием VARV в легких через 4 суток п.з. было существенно ниже, чем таковое в контрольной группе животных (при $p \leq 0,05$). Соединения НИОХ-14 и ST-246 не отличались по этому показателю. При этом величины КЗИ мышей опытных групп составили 50 % для соединения НИОХ-14 и 22 % для ST-246.

Обобщая результаты, представленные в таблице 5, можно отметить наличие защитной эффективности химически синтезированного соединения НИОХ-14, сравнимой с таковой ST-246, в испытанной схеме и дозе перорального применения на мышах и/д л. SCID, и/н зараженных 50 ИД₅₀ VARV (штамм India-3a).

С учетом исследований, проведенных в процессе изучения лабораторных моделей «10-14-суточная мышь а/б п. ICR – штамм India-3a VARV» и «18-21-суточная мышь и/д л. SCID – штамм India-3a VARV» отмеченного многими исследователями на иных лабораторных моделях, а также испытаний были определены пределы их практического применения для оценки противооспенной эффективности разрабатываемых химиопрепаратов.

Таким образом, с применением мышей а/б п. ICR (10-14-суточные) и и/д л. SCID (18-21-суточные), а также VARV (штамм India-3a) на примере 2 химически синтезированных соединений (НИОХ-14 и ST-246) подтверждено наличие противовирусного действия, ранее отмеченного многими исследователями на иных лабораторных моделях для НО. Это свидетельствует о возможности применения лабораторных моделей: «10-14-суточная мышь а/б п. ICR - штамм India-3a VARV» и «18-21-суточная мышь и/д л. SCID – штамм India-3a VARV» для изучения защитной эффективности химиопрепаратов от НО. Определены пределы практического применения таких моделей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований были сделаны следующие выводы.

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

2 Чувствительность 10-14-суточных и 42-49-суточных мышей аутбредной популяции ICR и 18-21-суточных мышей иммунодефицитных линий SCID и Nude к вирусу натуральной оспы (штамм India-3a) одинаковая, судя по отсутствию отличий между величинами ИД₅₀ при интраназальном заражении данным вирусом всех исследованных групп мышей.

3 При интраназальном заражении 10-14-суточных и 42-49-суточных мышей аутбредной популяции ICR и 18-21-суточных мышей иммунодефицитных линий SCID и Nude вирусом натуральной оспы (штамм India-3a) в дозе 25-80 ИД₅₀ инфекционный

процесс ограничивается в основном органами респираторного тракта. Органами наибольшего накопления патогена у этих животных являются легкие и нос, где в ряде случаев его концентрация достигала 4,8 lg БОЕ/мл гомогената.

4 У 10-14-суточных мышей аутбредной популяции ICR и 18-21-суточных мышей иммунодефицитной линии SCID, интраназально зараженных вирусом натуральной оспы (штамм India-3a) в дозах 30 и 50 ИД₅₀ соответственно, наиболее выраженные патоморфологические изменения воспалительно-некротического характера, сходные с таковыми у человека при натуральной оспе, были сосредоточены в основном в респираторных органах.

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

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

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

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

4 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.

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

6 Using the ICR and SCID mice as animal models for smallpox to assess antiviral drug efficacy/ К.А. Titova, A.A. Sergeev, A.S. Zamedyanskaya [et al.]// J. Gen. Virol. - 2015. - doi: 10.1099/vir.0.000216.

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

8 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

А/б п.	- аутбредная популяция
БОЕ	- бляшкообразующая единица
ГНЦ ВБ «Вектор»	- Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
И/д л.	- иммунодефицитная линия
И/н	- интраназально
ИППВ	- индекс подавления продукции вируса = средняя величина титра вируса в гомогенатах легких мышей, обработанных плацебо – средняя величина титра вируса в гомогенатах легких мышей, обработанных препаратом
КЗИ	- коэффициент защиты от инфекции = % животных с вирусом в легких мышей, обработанных плацебо – % животных с вирусом в легких мышей, обработанных препаратом
НО	- натуральная оспа
НIOX	Новосибирский институт органической химии
ООЕ	- оспинообразующая единица
П.з.	- после заражения
Роспотребнадзор	- Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
СО РАН	- Сибирское отделение Российской академии наук
США	- Соединенные Штаты Америки
ФБУН	- Федеральное бюджетное учреждение науки
СО ₂	- двуокись углерода
Ig	- десятичный логарифм
М.	- <i>Mascasa</i>
РРМІ-1640	- вирусологическая питательная среда
Vero	- перевиваемая культура клеток почки зеленой мартышки
VARV	- variola virus (вирус натуральной оспы)