

*Сергеев Александр Александрович*

**Степной сурок – модельный вид животных для оспы обезьян**

*03.02.02 – вирусология*

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата медицинских наук**

**Кольцово – 2015**

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки (ФБУН) «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор».

**Научные руководители:** Шишкина Лариса Николаевна, доктор биологических наук, заведующая отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Сергеев Артемий Александрович, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией коллекции вируса натуральной оспы и ортопоксвирусов ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

**Официальные оппоненты:** Панасенко Людмила Михайловна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры пропедевтики детских болезней Новосибирского государственного медицинского университета

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 учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится «19» февраля 2016 г. в 11<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 208.020.01 при ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» по адресу: р.п. Кольцово, Новосибирского района, Новосибирской области, 630559, тел. 8 (383) 336-74-28. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук,  
профессор

Белявская Валентина Александровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Кроме вируса натуральной оспы (ВНО), к роду *Orthopoxvirus* (семейство *Poxviridae*) относится еще один патоген, вызывающий особо опасную вирусную инфекцию у людей (острое зооантропонозное заболевание): вирус оспы обезьян (ВОО). Несмотря на то, что этот возбудитель заболевания был открыт около 60 лет тому назад, внимание ученых, врачей инфекционистов и эпидемиологов к этому патогену продолжает только усиливаться в последние десятилетия. Это связано, по крайней мере, с четырьмя причинами:

- высокой патогенностью ВОО для человека (летальность среди людей достигает 17%) (Giulio et al., 2004; Gispén, 1975; Jezek et al., 1987);
- резким снижением напряженности иммунитета и величины иммунной прослойки у людей к этому патогену в связи с окончанием вакцинации против натуральной оспы, которая была прекращена более 30 лет тому назад (Cohen, 1997; Jezek et al., 1986);
- увеличением масштабов и частоты эпидемических вспышек оспы обезьян в 21-м веке по сравнению с 20-м веком (Борисевич и др., 2012; Levine et al., 2007; Rimoin et al., 2010);
- ограниченностью спектра разрабатываемых противооспенных лечебно-профилактических химиопрепаратов.

Все это делает актуальной проблему разработки эффективных препаратов для профилактики и лечения натуральной оспы и оспы обезьян. Однако для оценки эффективности действия разрабатываемых противовирусных препаратов на этапах научно-исследовательской работы и доклинических исследований по требованиям российского национального органа контроля (Научный центр экспертизы средств медицинского применения - НЦ ЭСМП), а также Управления по лекарственным препаратам и продовольственным продуктам США (FDA) и Европейского агентства по контролю лекарственных средств (EMA) необходимо иметь не менее двух видов животных, моделирующих соответствующее инфекционное заболевание у человека.

**Степень разработанности.** К настоящему времени многие исследователи провели поиск животных и выбрали среди них пять видов для оценки эффективности препаратов для оспы обезьян: иммунодефицитных мышей (Americo et al., 2010; Stabenow et al., 2010; Hutson et al., 2010a), сусликов (Sbrana et al., 2007a; Sbrana et al., 2007b; Tesh et al., 2004), чернохвостых луговых собачек (Hutson et al., 2009; Hutson et al., 2010b; Xiao et al., 2005), сонь Келлена (Schultz et al., 2009) и низших приматов (*M. fascicularis u mulatta*) (Wei et al., 2009; Song et al., 2013; Parker et al., 2006). Однако все эти виды модельных животных имеют те или иные существенные недостатки с точки зрения возможности их выращивания в неволе, дороговизны, удобства и адекватности их применения при моделировании оспы обезьян у людей:

- иммунодефицитные мыши при инфицировании ВОО не воспроизводят основную клиническую картину оспоподобного заболевания (сыпь и лимфаденит), могут 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 могут быть использованы для оценки эффективности противовирусных препаратов, в основе действия которых лежит механизм их влияния на иммунную систему; кроме того, инбредные мыши достаточно дорогие и не отражают разнообразие человеческой популяции, которая по существу

представляется аутбредной (межсемейное, межнациональное и межрасовое скрещивание);

- сони Келлена при инфицировании ВОО не воспроизводят основную симптоматику оспоподобного заболевания, не являются лабораторными животными, при выращивании в неволе требуют создания специальных условий, что сложно обеспечить в условиях вирусологического эксперимента, да и стоимость этого вида животных достаточно высокая;

- суслики при инфицировании ВОО не проявляют основную клиническую картину оспоподобного заболевания, не являются лабораторными животными, живут в степных, лесостепных, лугостепных, лесотундровых ландшафтах и трудно приживаются в неволе (плохо размножаются) и поэтому для экспериментов должны, как правило, доставляться из естественной среды обитания;

- черныхвостые луговые собачки в отличие от сусликов, воспроизводят при инфицировании ВОО основную симптоматику оспоподобного заболевания, а также хорошо приживаются в неволе, но имеют существенные недостатки, связанные с тем, что ареал их обитания ограничивается лишь Северной Америкой и отсутствием возможности приобретения этого вида животных в специализированных питомниках нашей страны;

- низшие приматы при заражении проявляют основные клинические признаки оспоподобного заболевания, но являются очень дорогостоящими животными, применение которых в вирусологических экспериментах сопряжено с большой трудоемкостью.

**Цели и задачи.** Целью нашего исследования было изучить возможность использования степного сурка в качестве модельного вида животных для оспы обезьян.

Для достижения данной цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) провести экспериментальную оценку чувствительности сурков и некоторых других подопытных животных к ВОО: мышей, кроликов и мини-свиней;
- 2) изучить распространение ВОО в организме сурков;
- 3) изучить патоморфологические изменения у сурков, инфицированных ВОО;
- 4) провести оценку эффективности противооспенных препаратов на сурках;
- 5) оценить возможность использования степного сурка в качестве модельного вида животных для оспы обезьян на основе полученных теоретических и экспериментальных данных.

**Научная новизна работы.** Определена чувствительность сурков к ВОО при интраназальном (и/н) введении: дозы инфицирования от 3,7 lg бляшкообразующих единиц (БОЕ) и выше приводили в 100% случаев через 7-9 сут после заражения (п.з.) к появлению выраженной и обширной симптоматики оспоподобного заболевания (гипертермия тела, одно- или двусторонний подчелюстной лимфаденит, дискретная оспоподобная сыпь на коже по всей видимой части поверхности тела и слизистых оболочках, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит, нарушение координации, тремор конечностей, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти), которая исчезала у выживших сурков через 19 - 25 сут п.з. Показано, что через 13 – 22 сут п.з. 25 – 50% заболевших животных (в экспериментах с использованием двух и более животных на дозу вируса) независимо от величины заражающей дозы погибло, а процент инфицированности сурков, регистрируемый по наличию внешних клинических проявлений оспоподобного заболевания, имел четкую зависимость «доза-эффект». У заболевших сурков после подкожного (п/к) инфицирования вирусом в диапазоне доз от 2,6 до 7,1 lg БОЕ отмечена выраженная клиническая симптоматика, аналогичная той,

которая наблюдалась у этого вида животных при и/н заражении, и 100%-й летальный эффект через 12 – 18 сут п.з. Результаты изучения динамики накопления ВОО по органам и тканям сурков при и/н заражении дозой 3,7 lg БОЕ подтвердили сходство с некоторыми известными показателями инфекционного процесса у человека при оспе обезьян и натуральной оспе: генерализованная инфекция, накопление вируса в кожных оспинах (включая величину его концентрации), низкая вероятность выявления вируса в крови при биотитровании и накопление его в слизистой носа. При этом факт размножения вируса не только в органах дыхательной системы сурков, но и в других висцеральных органах согласуется с таковым у модельных видов животных для оспы обезьян. У сурков, и/н инфицированных дозой 3,7 lg БОЕ, определены органы первичного размножения вируса: легкие с трахеей, а также основной механизм распространения патогена в организме этих животных, в том числе от первичных органов-мишеней: лимфогенный с его размножением в органах лимфатической системы. Показано, что у этих животных органами максимального накопления патогена являются легкие с трахеей, нос (носовая перегородка со слизистой) и кожа, в которых в ряде случаев концентрация вируса превышала 6 lg БОЕ/мл гомогената органа или ткани, выраженное размножение вируса отмечено у инфицированных животных в бифуркационных лимфоузлах и двенадцатиперстной кишке, достигающее концентраций 3 - 4 lg БОЕ/мл. У павших сурков после п/к инфицирования вирусом в дозах 5,6 и 7,1 lg БОЕ/гол. (2,3 и 3,8 lg БОЕ/г массы сурка), накопление патогена в наиболее высоких концентрациях ( $\geq 5,7$  lg БОЕ/мл) зарегистрировано в носу (в носовой перегородке со слизистой), трахее, легких, почках, паховых и подмышечных лимфоузлах, яичках или яичниках и в кусочках кожи с оспинами; средние значения этого показателя (от 4,0 до 5,7 lg БОЕ/мл) отмечены в головном мозге, поджелудочной железе, поднижнечелюстных и брыжеечных лимфоузлах, а самые низкие величины концентраций ВОО ( $< 4,0$  lg БОЕ/мл) - в сердце, печени и селезенке. У сурков, и/н инфицированных ВОО, зарегистрирован факт присутствия и размножения вируса в традиционных для ортопоксвирусов первичных клетках-мишенях для этого патогена (в клетках системы мононуклеарных фагоцитов и эпителиоцитах в органах респираторного тракта), а также в некоторых других типах клеток (эндотелиоцитах, плазмоцитах, фибробластах, ретикулярных и гладкомышечных клетках).

На основе данных изучения диссеминации вируса в организме и/н инфицированных ВОО сурков в дозе 3,7 lg БОЕ, клинической картины инфекции и патоморфологических изменений в их органах и тканях разработана патогенетическая схема заболевания. При изучении лечебно-профилактической активности разрабатываемых противооспенных препаратов (на примере двух химически синтезированных соединений: ST-246 и НИОХ-14) на сурках с применением ВОО подтверждено наличие ранее отмеченного многими исследователями и нами (эксперименты с использованием различных видов ортопоксвирусов, культур клеток и соответствующих известных модельных видов животных) противовирусного эффекта, что свидетельствует о возможности использования для этой цели этого модельного вида животных. В рамках проведенных исследований на сурках с использованием ВОО был получен патент Российской Федерации (Патент РФ № 2526504, 2014).

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Разработанная методология выбора и оценки показателей инфицирования подопытных животных патогеном в сравнении с таковыми у известных модельных видов животных и человека, основанная на изучении у них течения инфекционного процесса, может быть использована при поиске модельных видов животных не только для оспы обезьян, но и

других генерализованных инфекций вирусной природы. По настоящее время в организациях, проводящих исследования с возбудителями особо опасных инфекций, включая ВОО, используется разработанная нами методика приготовления фрагментов органов и тканей от инфицированных животных для проведения патоморфологических исследований (МУ 1.3.3103-13), с применением которой обеспечивается гарантированная инаktivация данных патогенов в биоматериалах. Исследованный в рамках диссертации модельный вид животных для оспы обезьян (степной сурок) был использован с целью оценки эффективности разрабатываемого в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор») перспективного противооспенного препарата НИОХ-14. В том числе благодаря этим исследованиям, данный препарат успешно прошел доклиническое изучение, что открывает перспективу его дальнейшего продвижения в направлении клинических испытаний. Для проведения исследований на сурках с использованием ВОО были применены методы, описанные в разработанной инструкции (Организация и проведение работ с вирусами натуральной оспы и оспы обезьян в корпусе № 6: инструкция № 1/02/Булычев Л.Е. [и др.]. – Кольцово: Гос. научн. центр вирусол. и биотехн. «Вектор», 2012. – 43 с.).

**Методология и методы исследования.** С целью поиска модельных видов животных для оспы обезьян, базируясь на изучении течения инфекционного процесса, в работе использовали методологию, основанную на оценке показателей инфицирования подопытных животных вирусом при заражении через респираторный тракт в сравнении с таковыми у человека или известных модельных видов животных. При этом применяли традиционные вирусологические, серологические, гистологические и электронно-микроскопические методы исследований.

**Положения, выносимые на защиту:**

1) и/н инфицирование сурков в дозах от 3,7 lg БОЕ и выше сопровождается внешними оспоподобными клиническими признаками заболевания (гипертермия тела, подчелюстной лимфаденит, дискретная оспоподобная сыпь на коже и слизистых оболочках, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит), при этом их гибель не зависит от дозы инфицирования;

2) легкие и трахея являются органами первичного размножения ВОО при и/н заражении сурков, а основной механизм распространения патогена в организме этих животных, в том числе от первичных органов-мишеней - лимфогенный с его размножением в органах лимфатической системы;

3) у сурков, и/н зараженных ВОО, размножение вируса происходит в первичных клетках-мишенях (макрофаги и эпителиоциты органов респираторного тракта), а также в некоторых других типах клеток (эндотелиоцитах, плазмócитах, фибробластах, ретикулярных и гладкомышечных клетках);

4) высокая чувствительность сурков к ВОО при и/н заражении, внешние признаки оспоподобного заболевания и особенности его патогенеза позволяют рекомендовать этот вид животных в качестве лабораторной модели для оценки эффективности медицинских средств защиты в отношении инфекций, вызываемых у человека патогенными для него ортопоксвирусами.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Все результаты работы подвергались статистической обработке стандартными методами с оценкой достоверности отличий при 5 %-м уровне значимости вероятности ошибки ( $p \leq 0,05$ ) для 95 %-го доверительного уровня ( $I_{95}$ ). Результаты работы были доложены на шести

международных и российских научных форумах. Кроме того, по материалам диссертации было опубликовано пять печатных работ и получен один патент РФ.

Личный вклад соискателя: в разработку стратегии выбора вида животных, моделирующего оспу обезьян у человека, для оценки эффективности противовирусных препаратов; в теоретической оценке чувствительность человека к ВОО и в экспериментальной - сурков, мышей популяции ICR, мини-свиней и кроликов; в изучении динамики распространения ВОО в организме инфицированных сурков; в проведении предварительной сравнительной оценки полученных показателей инфицирования ВОО сурков через респираторный тракт с таковыми у человека (известных модельных видов животных); в использовании разрабатываемой нами модели для оспы обезьян с целью оценки адекватности полученных результатов в эксперименте с ВОО по определению эффективности препаратов с известной противоопушечной активностью; в изучении патоморфологических изменений в организме сурков, инфицированных вирусом.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение результатов собственных исследований, выводы и список литературы. Диссертация иллюстрирована 19 таблицами и 13 рисунками. Список литературы включает 165 источника, в том числе 130 работ зарубежных авторов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты с живым ВОО были проведены на базе ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» - ГНЦ ВБ «Вектор» (Россия) в максимально изолированной лаборатории (BSL-4 по зарубежной классификации) с использованием защитных пневмокостюмов.

**Лабораторные животные.** В исследованиях использовано 16 мышей аутбредной популяции ICR обоего пола, массой 9 - 11 г (8 - 15 сут) и 16 кроликов породы Шиншилла обоего пола, массой 1500 г (1,5 мес.), полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»; 16 лабораторных свиней породы Сибирская мини-свинья обоего пола, массой 6000±2000 г (2 мес.), полученных из питомника Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск); а также 16 степных сурков (*Marmota bobak*) обоего пола, массой 1230±347 г (1,5 мес.) и 29 сурков той же породы обоего пола, массой 3000-4000 г (12 - 24 мес.), полученных из Пушкинского питомника Московской области. Все манипуляции с животными, в том числе анестезию и эвтаназию, проводили в соответствии с действующими «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных», а также в соответствии с протоколом № 1-01.2014, утвержденным биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» 28 января 2014 г.

**Вирусы и их концентрации.** В работе использовали центральноафриканский штамм (Congo Basin MPXV) ВОО V79-1-005, штамм ЛИВП вируса осповакцины, штамм Гришак вируса оспы коров и штамм К-1 вируса оспы мышей, полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Штамм V79-1-005 ВОО поступил в коллекцию ГНЦ ВБ «Вектор» из Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC, США) 15 сентября 1999 года.

Полногеномный сиквенс этого штамма представлен в GenBank: HQ857562.1. Биологическая концентрация ВОО в двух приготовленных препаратах составляла 6,7 и 7,1 lg БОЕ/мл. Концентрации же вирусов осповакцины, оспы коров и оспы мышей в приготовленных препаратах составляли от 5,6 до 6,7 lg БОЕ/мл. Приготовленные на основе этих вирусов препараты имели биологические концентрации ВОО 6,7 и 7,1 lg БОЕ, а вирусов осповакцины, оспы коров и оспы мышей от 5,6 до 6,7 lg БОЕ/мл.

**Методы инфицирования животных вирусом.** Заражение кроликов и мини-свиней ВОО осуществляли и/н после использования ветеринарного препарата для наркоза «Золетил», который вводили внутримышечно (в/м) в дозе 20 мкг/кг массы кролика. Этим животным вирусосодержащую жидкость вводили по 0,5 мл в каждую ноздрю (суммарно 1 мл). После ингаляционного наркоза диэтиловым эфиром аутбредным мышам ICR и/н вводили вирусосодержащую жидкость в объеме 0,03 мл суммарно в обе ноздри. Сурков инфицировали двумя способами: п/к, вводя по 1 мл вирусосодержащей жидкости в холку, или и/н, вводя по 0,5 мл вирусосодержащей жидкости в каждую ноздрю (суммарно 1 мл). Перед проведением и/н инфицирования животных наркотизировали в/м с помощью «Золетил» в дозе 25 мкг/кг.

**Изучение накопления вируса в биоматериалах у сурков.** При изучении накопления ВОО в организме погибших сурков после п/к заражения брали образцы следующих органов и тканей: носовая перегородка со слизистой, трахея, сердце, легкие, печень, поджелудочная железа, почки, селезенка, головной мозг, поднижнечелюстные лимфоузлы, паховые лимфоузлы, подмышечные лимфоузлы, брыжеечные лимфоузлы, яички, яичники и кусочки кожи с оспинами. Для патоморфологических исследований у этих животных и двух интактных осуществляли забор образцов тех же органов и тканей.

При изучении динамики накопления ВОО в органах и тканях и/н инфицированных сурков были использованы следующие биоматериалы (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). Для патоморфологических исследований у этих же животных и двух интактных осуществляли забор тех же образцов органов и тканей, включая дополнительно тимус. При заборе крови из поверхностной вены голени животных наркотизировали в/м с помощью препарата «Золетил» в дозе 25 мкг/кг. Из крови путем центрифугирования получали сыворотку и сгусток крови. При заборе органов и тканей сурков подвергали эвтаназии, вводя внутривенно летальную дозу (200 мкг/гол.) того же анестетика.

Полученные для вирусологического исследования образцы органов, тканей и сгустков крови замораживали, а потом готовили 5 %-е (по объему) гомогенаты путем растирания в ступке с речным песком и раствором Хенкса.

**Вирусологический анализ проб.** Концентрацию ВОО в использованных в работе образцах гомогенатов органов и тканей сурков определяли стандартным для поксвирусов методом негативных колоний на перевиваемой культуре клеток почки зеленой марышки - Vero (Leparc-Goffart et al., 2005).

**Патоморфологические исследования.** Для светооптического исследования образцы органов фиксировали в 4 %-м растворе параформальдегида. Дальнейшая обработка материала проводилась по общепринятой методике: последовательное обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации, пропитывание в смеси ксилол – парафин и заливка в парафиновые блоки. Парафиновые срезы толщиной 4 - 5 мкм готовили с помощью автоматического ротационного микротомы НМ-360 (Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Светооптическое исследование и



микрофотосъемка проводилась на микроскопе Imager Z1 (Zeiss, Gottingen, Германия), оснащенной камерой высокого разрешения HRc. При анализе снимков использовался программный пакет AxioVision Rel.4.8.2 (Carl Zeiss Micro-Imaging GmbH, Jena, Германия).

Для электронно-микроскопического исследования образцы дофиксировали 1 %-м раствором осмиевой кислоты, обезвоживали по стандартной методике в растворах этилового спирта возрастающей концентрации и ацетоне, и заливали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы готовили на микротоме Райхерт-Янг (Австрия), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Срезы исследовали в электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol Ltd., Tokyo, Япония), фотосъемку проводили с помощью встроенной цифровой камеры Jeol и цифровой камеры бокового вывода Veleta (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Munster, Германия). Снимки обрабатывались и анализировались с помощью программного пакета iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Munster, Германия).

**Химически синтезированные соединения.** В работе была использована свежеприготовленная серия химического соединения, синтезированного в Новосибирском институте органической химии (НИОХ) им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения российской академии наук (СО РАН), ранее проявившего противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов в опытах *in vitro*: 7-[N'-(4-Трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0<sup>2,4</sup>]нон-8-ен-6-карбоновая кислота - НИОХ-14 (Селиванов и др., 2011), а также химическое соединение, синтезированное этой же организацией, ранее проявившее слабую противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов в опытах *in vitro*: Гидрат N-{3,5-диоксо-4-азатетрацикло[5.3.2.0<sup>2,6</sup>.0<sup>8,10</sup>]додец-11-ен-4-ил}-2-гидроксибензамида (НИОХ-32).

В качестве положительного контроля использовали свежеприготовленную серию химического соединения с установленной противоопухолевой активностью 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), синтезированное для исследовательских целей в НИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН по описанной в патенте методике (Patent WO 2004/112718 A3).

**Метод определения цитотоксичности и противовирусной активности химических препаратов.** Для определения цитотоксичности и противовирусной активности препаратов нами была адаптирована методика с использованием 96-луночных планшетов (Baker et al., 2003).

**Схема применения химически синтезированных соединений на сурках, инфицированных вирусом.** При изучении эффективности действия антиортопоксвирусных препаратов сурков и/н заражали ВОО в дозе 3,7 lg БОЕ/гол. Химически синтезированные соединения НИОХ-14 и ST-246 вводили животным перорально, при этом животным после ручной фиксации (без анестезии) эти препараты вводили через угол ротового отверстия за большими коренными зубами в полость рта с помощью автоматической пипетки 5 мл суспензии того или иного препарата, приготовленного на основе раствора метилцеллюлозы (0,75 %) с твин-80 (1 %), в дозе 40 мг/кг массы сурка ежедневно однократно (за 1 сут до заражения ВОО и далее в течение 6 сут п.з.). При этом контрольной группе сурков по той же схеме и тем же способом вводили водный раствор, содержащий метилцеллюлозу и твин-80, который использовали для получения суспензии препаратов НИОХ-14 и ST-246.

**Определение титров антител к вирусу в сыворотке крови.** Титры антител к ВОО в образцах сыворотки крови сурков оценивали в реакции нейтрализации (РН) по

уменьшению количества негативных колоний в монослое клеток Vero (Leparc-Goffart et al., 2005).

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами (Закс, 1976) с помощью пакета компьютерных программ «Statistica 6.0» - StatSoftInc. 1984-2001 (Халафян, 2010) с оценкой достоверности отличий при 5 %-м уровне значимости вероятности ошибки ( $p \leq 0,05$ ) для 95 %-го доверительного уровня ( $I_{95}$ ). Для выявления различий между опытной и контрольной группами, принимая во внимание малую выборку ( $n=4$  для каждой группы), использовали непараметрический метод - точный тест Фишера (Закс, 1976; Халафян, 2010). Расчет ИД<sub>50</sub> производили на основании показателей количества инфицированных и погибших животных по методу Спирмена-Кербера (Закс, 1976). Титры ВОО в органах сурков представлены как среднее значение ( $M$ ) и 95 %-й доверительный интервал ( $I_{95}$ ). Для сравнения титров ВОО в органах использовали U-критерий Манна-Уитни и t-критерий Стьюдента (Закс, 1976; Халафян, 2010).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Экспериментальная оценка чувствительности мышей, сурков, кроликов и мини-свиней к вирусу оспы обезьян

На первом этапе был проведен эксперимент по изучению чувствительности сурков к ВОО при п/к заражении (таблица 1). Все испытанные нами дозы патогена (не зависимо от их величины) приводили к появлению у сурков выраженных клинических симптомов заболевания (гипертермия тела, одно- или двусторонний подчелюстной лимфаденит, дискретная оспоподобная сыпь на коже по всей видимой части поверхности тела и слизистых оболочках, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит, нарушение координации, тремор конечностей, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти) через 7 - 9 сут п.з. Причем летальный исход у п/к инфицированных сурков был отмечен во всех случаях через 12 – 18 сут п.з. При этом максимальное число погибших животных независимо от их дозы инфицирования было зарегистрировано через 12 сут п.з.

Таблица 1 - Данные по чувствительности сурков к вирусу оспы обезьян (штамм V79-1-005) при подкожном (п/к) заражении различными дозами

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

Учитывая то обстоятельство, что даже испытанные нами самые низкие дозы ВОО вызывали клинические признаки заболевания и гибель у всех сурков при п/к заражении, можно сделать вывод, что величины ИД<sub>50</sub> и ЛД<sub>50</sub> вируса для этих животных при п/к инфицировании ниже 2,5 lg БОЕ, что свидетельствует о высокой чувствительности сурков к ВОО.

Однако используемый нами метод заражения (п/к) в вышепредставленном эксперименте не имитирует основные механизмы передачи этой инфекции среди людей (аэрозольный и контактный), реализуемые, как правило, через респираторный тракт во время эпидемических вспышек оспы обезьян. В связи с этим, были проведены исследования по и/н заражению сурков, которые показали, что при данном методе введения ВОО, также как и при п/к инфицировании, эти животные обладали высокой чувствительностью к вирусу (таблица 2).

Таблица 2 - Данные по чувствительности сурков к вирусу оспы обезьян (штамм V79-1-005) при интраназальном (и/н) заражении различными дозами

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

У и/н инфицированных сурков регистрировали целый ряд клинических проявлений, аналогичных описанным в эксперименте по п/к заражению этих животных, которые наблюдали через 7 – 9 сут п.з., а через 13–22 сут п.з. лишь 6 из 13 заболевших сурков погибло. У выживших животных клинические признаки заболевания исчезали через 12 – 18 сут после их появления, при этом на месте расположения оспоподобных сыпозных элементов были образованы рубцы. Следует отметить, что нам не удалось определить ЛД<sub>50</sub> ВОО для этих животных, из-за того, что процент летальности у них не зависел от величины заражающей дозы (таблица 2). При этом процент инфицированности сурков, регистрируемый по наличию внешних клинических проявлений заболевания, имел зависимость «доза-эффект», что позволило нам определить ИД<sub>50</sub> ВОО у этих животных по фиксации наличия внешних клинических признаков заболевания (ИД<sub>50</sub>), которая составила 2,2 lg БОЕ.

Первым клиническим признаком заболевания у сурков, вызванного и/н заражением ВОО, было появление достоверно высоких значений температуры тела (при норме  $36,5 \pm 0,4$  °C):  $38,0 - 40,0$  °C, которые держались в течение 2 - 6 сут, а за 2 - 6 сут до гибели животных она снижалась и за сут до смерти достигала  $32^{\circ}\text{C}$ . Почти одновременно с началом гипертермии у сурков были зарегистрированы одно- или двусторонние подчелюстные лимфадениты. Через 1 – 2 сут от начала гипертермии на теле сурков появилась дискретная оспоподобная сыпь (рисунок 1), которая имела различную локализацию и дискретный характер с постепенно сменяющимися форменными элементами: макула, папула, везикула, пустула.

Через 0 – 2 сут после появления на коже сурков сыпозных элементов у этих животных начинали регистрироваться и другие признаки заболевания: сыпь на слизистых оболочках ротовой полости и ануса, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит, нарушение координации, тремор конечностей, повышенная агрессивность и взъерошенность шерсти.



Рисунок 1 - Сурок с сыпью на коже через 9 сут после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 2,2 lg БОЕ

Кроме этого, и/н способу заражения подвергали и других животных: мыши популяции ICR, кролики и мини-свиньи. Результаты экспериментов по оценке чувствительности к ВОО подопытных животных при таком способе инфицирования представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Данные биологической активности штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) при интраназальном (и/н) заражении различных видов животных

Наименование показателя	Значение показателей у и/н зараженных ВОО подопытных животных:			
	Мышь ICR	Кролик	Мини-свинья	Сурок
ИД <sub>50</sub> * (в 1г БОЕ), М (I <sub>95</sub> )	4,8 (4,2...5,4)	>4,0**	>5,0***	2,2 (1,0...3,4)
Клинические признаки заболевания	Гнойный конъюнктивит, блефарит, взъерошенность шерсти	Отсутствуют	Отсутствуют	Гипертермия, подчелюстной лимфаденит, дискретная оспоподобная сыпь на коже по всей видимой части поверхности тела и слизистых оболочках, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит, нарушение координации, тремор конечностей, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти
<p>Примечания</p> <p>* Величина определена по внешним клиническим проявлениям заболевания</p> <p>** Величина ИД<sub>50</sub> превышает максимально используемую дозу заражения кроликов 4,0 1г БОЕ</p> <p>*** Величина ИД<sub>50</sub> превышает максимально используемую дозу заражения мини-свиней 5,0 1г БОЕ соответственно</p> <p>М – средняя 50%-я инфицирующая доза</p> <p>(I<sub>95</sub>) - доверительный интервал для М с вероятностью 95%</p>				

Было отмечено, что и/н инфицирование ВОО не приводило к летальности среди мышей. Тем не менее, начиная с 7-х сут п.з. у них отмечали внешние клинические признаки заболевания (гнойный конъюнктивит, блефарит, взъерошенность шерсти), которые исчезали через 11 - 13 сут п.з. В связи с этим для мышей был определен показатель чувствительности к ВОО (таблица 3), который был рассчитан по регистрации наличия внешних клинических признаков заболевания у этих животных (ИД<sub>50</sub>=4,8 1г БОЕ при и/н заражении). У остальных взятых в эксперимент животных (кроликов и мини-свиней) не было выявлено внешних клинических признаков заболевания и тем более летального эффекта при использованных дозах и/н заражения ВОО.

Таким образом, в экспериментах *in vivo* и/н заражение аутбредных мышей только высокими дозами ВОО вызывало у них появление некоторой клинической картины заболевания (гнойный конъюнктивит и блефарит, взъерошенность шерсти), по регистрации которой и была определена величина ИД<sub>50</sub> у этих животных (4,8 1г БОЕ). При и/н инфицировании сурков ВОО было зафиксировано появление у них выраженной и обширной симптоматики (гипертермия тела, одно- или двусторонний подчелюстной лимфаденит, дискретная оспоподобная сыпь на коже по всей видимой части поверхности тела и слизистых оболочках, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит, нарушение координации, тремор конечностей, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти) через 7 – 9 сут п.з., которая исчезала у выживших животных через 19 - 25 сут п.з. При этом через 13 – 22 сут п.з. часть заболевших сурков (25 – 50%) погибла в экспериментах с использованием двух и более животных на заражающую

дозу вируса независимо от ее величины, а процент инфицированности сурков, регистрируемый по наличию внешних клинических проявлений заболевания, имел четкую зависимость «доза-эффект». Величина ИД<sub>50</sub> для сурков при и/н заражении ВОО, определенная на основании данных по регистрации у них клинической картины заболевания, составила 2,2 (1,0...3,4) lg БОЕ. У заболевших сурков после п/к инфицирования вирусом в диапазоне доз от 2,6 до 7,1 lg БОЕ отмечена выраженная клиническая симптоматика, аналогичная той, которая наблюдалась у сурков при и/н заражении, и 100%-й летальный эффект через 12 – 18 сут п.з., а у взятых в эксперименты кроликов и мини-свиней при и/н заражении патогеном в испытанных дозах, в том числе и максимальных (4,0 и 5,0 lg БОЕ соответственно), не было обнаружено внешних клинических признаков заболевания и тем более летального эффекта.

Учитывая результаты, полученные по относительно высокой чувствительности сурков к ВОО *in vivo*, в дальнейшей экспериментальной работе, связанной с разработкой модельных видов животных для оспы обезьян, мы использовали именно сурков.

### **Распространение вируса оспы обезьян в организме сурков**

Учитывая, что сурки по результатам регистрации клинической картины заболевания проявляли высокую чувствительность к ВОО при и/н заражении, в дальнейшей работе мы использовали именно этот вид животных для изучения диссеминации данного патогена в их организме после и/н инфицирования с целью сравнения с таковой у существующих модельных видов животных для оспы обезьян.

На первом этапе была изучена динамика накопления ВОО в органах, тканях и сыворотке крови сурков через 2, 3, 5, 7, 9 и 12 сут после и/н заражения дозой вируса 3,7 lg БОЕ, результаты этих экспериментов представлены в таблице 4.

Из данных таблицы 4 видно, что через 2 и 3 сут п.з. возбудитель заболевания не был обнаружен ни в одном из взятых биоматериалов от сурков. И только через 5 сут п.з. вирус впервые был зарегистрирован сразу в двух первичных органах-мишенях (трахея и легкие), а также в бифуркационных лимфоузлах. В этих органах вирус выявлялся в нашем эксперименте длительное время: с 5-х по 12-е сут п.з. В селезенке патоген был обнаружен только через 7 сут п.з. и то в низкой концентрации (1,3 lg БОЕ/мл), а в последующие сроки уже не выявлялся в этом органе. Через 9 сут п.з. ВОО был зарегистрирован не только в легких и трахее, но и в носовой перегородке со слизистой, головном мозге, двенадцатиперстной кишке, надпочечниках и коже. Причем через 12 сут п.з. в головном мозге и двенадцатиперстной кишке вирус перестал выявляться. В это же время мы наблюдали и существенное снижение концентрации патогена в носовой перегородке со слизистой, тогда как величина этого показателя в коже сурков, наоборот, достигла высокого уровня.

Таблица 4 – Данные по динамике накопления штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) в биоматериалах\* от сурков, интраназально инфицированных дозой 3,7 lg БОЕ

Вид биоматериалов от сурков	Концентрация ВОО (lg БОЕ/мл, М (I <sub>95</sub> ) для n=4) в биоматериале от сурков** через различное время (сут) после заражения:					
	2	3	5	7	9	12
Клетки крови	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Сыворотка	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Носовая перегородка со слизистой	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	6,7 (6,6...6,8)	2,6 (2,3...2,9)
Головной мозг	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	1,6 (1,0...2,2)	<0,4
Трахея	<0,4	<0,4	6,5 (6,2...6,8)	1,7 (1,6...1,8)	2,9 (2,8...3,0)	4,5 (4,4...4,6)
Бифуркационные лимфоузлы	<0,4	<0,4	2,0 (1,9...2,1)	3,1 (2,8...3,4)	3,9 (3,6...4,2)	2,5 (2,4...2,6)
Легкие	<0,4	<0,4	6,5 (6,2...6,8)	5,9 (5,6...6,2)	3,2 (2,9...3,5)	6,5 (6,4...6,6)
Печень	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Селезенка	<0,4	<0,4	<0,4	1,3 (1,2...1,4)	<0,4	<0,4
Поджелудочная железа	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Мезентериальные лимфоузлы	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Двенадцатиперстная кишка	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	3,8 (3,5...4,1)	<0,4
Почки	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Надпочечники	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	1,6 (1,3...1,9)	1,4 (0,8...2,0)
Кожа	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	3,0 (2,9...3,1)	6,6 (6,3...6,9)
<p>Примечания</p> <p>* Органы и ткани в составе 10%-х (по объему) гомогенатов, а также сыворотка крови</p> <p>** Гомогенаты органов и тканей каждой временной точки получены от 1 животного</p> <p>n – количество повторов титрования гомогенатов органов и тканей животных</p> <p>М – средняя величина концентрации вируса, рассчитанная для каждого биоматериала по данным 4-кратного повторения титрования</p> <p>(I<sub>95</sub>) - 95% доверительный интервал для М с вероятностью 95%</p> <p>&lt;0,4 - величина ниже порога чувствительности (0,4 lg БОЕ/мл) использованного метода титрования</p>						

Органами и тканями максимального накопления ВОО являются легкие (через 5 и 12 сут п.з.), трахея (через 5 сут п.з.) и слизистая оболочка полости носа (через 9 сут п.з.) и кожа (через 12 сут п.з.). В то же время во все сроки исследования в клетках и сыворотке крови, печени, поджелудочной железе, мезентериальных лимфоузлах и почках ВОО вообще не удалось обнаружить при проведении использованного нами метода титрования. Дополнительно было проведено изучение показателей накопления ВОО в органах и тканях некоторых сурков, павших в эксперименте, связанном с п/к их

заражением дозами вируса 7,1 lg БОЕ (три животных) и 5,6 lg БОЕ (два животных). Результаты этих экспериментов представлены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5 - Данные по накоплению штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) в биоматериалах\* от павших сурков после подкожного (п/к) заражения дозой 7,1 lg БОЕ

Вид биоматериалов от сурков	Концентрации вируса в lg БОЕ/мл (М (I <sub>95</sub> ) для n=4) в биоматериалах от следующих сурков**:		
	№ 1	№ 2	№ 3
Головной мозг	5,1 (5,0...5,2)	4,8 (4,7...4,9)	3,7 (3,5...3,9)
Носовая перегородка со слизистой	>5,7	4,5 (4,4...4,6)	>5,7
Трахея и с участком ее бифуркации	>5,7	>5,7	4,8 (4,7...4,9)
Легкие	>5,7	4,9 (4,8...5,0)	4,1 (4,0...4,2)
Сердце	2,6 (1,9...3,3)	<0,4	1,0 (0,7...1,3)
Печень	2,6 (2,1...3,1)	<0,4	<0,4
Селезенка	<0,4	<0,4	2,0 (1,5...2,5)
Поджелудочная железа	4,8 (4,7...4,9)	<0,4	3,2 (2,8...3,6)
Почка	4,3 (4,1...4,5)	4,3 (4,2...4,4)	>5,7
Поднижнечелюстные лимфоузлы	4,2 (3,8...4,6)	<0,4	4,1 (3,8...4,4)
Подмышечные лимфоузлы	5,7 (5,6...5,8)	1,5 (1,2...1,8)	4,9 (4,7...5,1)
Паховые л/у	<0,4	4,9 (4,7...5,1)	>5,7
Брыжеечные лимфоузлы	<0,4	2,7 (2,4...3,0)	4,7 (4,6...4,8)
Яичко или яичник	<0,4	>5,7	>5,7
Кусочек кожи с оспинкой	>5,7	>5,7	>5,7
Примечания * Органы и ткани в составе 10%-х (по объему) гомогенатов ** Гомогенаты органов и тканей каждой временной точки получены от 1 животного n – количество повторов титрования гомогенатов органов и тканей животных М – средняя величина концентрации вируса, рассчитанная для каждого биоматериала по данным 4-кратного повторения титрования (I <sub>95</sub> ) - доверительный интервал для М с вероятностью 95% <0,4 - величина ниже порога чувствительности (0,4 lg БОЕ/мл) использованного метода титрования >5,7 – в случаях, когда при титровании в максимально взятом нами разведении гомогената (1:1000) количество БОЕ в клеточном монослое превышало 50, использовали значение >5,7 lg БОЕ/мл			

Из данных таблиц 5 и 6 видно, что накопление ВОО наблюдается в той или иной степени практически во всех исследованных органах и тканях погибших сурков. Данный факт подтверждается тем, что величины концентраций вируса во многих органах и тканях этих животных существенно превышают использованные нами дозы их заражения при пересчете на грамм массы сурков (2,3 и 3,8 lg БОЕ/г). Причем наибольшие концентрации этого патогена были обнаружены в носовой перегородке со слизистой, трахее, легких, почках, паховых и подмышечных лимфоузлах, яичках или



яичниках и в кусочках кожи с оспинами ( $\geq 5,7$  lg БОЕ/мл). Средние значения этого показателя (от 4,0 до 5,7 lg БОЕ/мл) отмечались в ряде случаев у сурков в головном мозге, поджелудочной железе, поднижнечелюстных и брыжеечных лимфоузлах, а самые низкие были зарегистрированы у этих животных в сердце, печени и селезенке ( $< 4,0$  lg БОЕ/мл).

Таблица 6 - Данные по накоплению штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) в биоматериалах\* от павших сурков после подкожного (п/к) заражения дозой 5,6 lg БОЕ

Вид биоматериалов от сурков	Концентрации вируса в lg БОЕ/мл (М (I <sub>95</sub> ) для n=4) в биоматериалах от следующих сурков**:	
	№ 5	№ 6
Головной мозг	1,5 (1,0...2,0)	<0,4
Носовая перегородка со слизистой	5,1 (4,7...5,5)	>5,7
Трахея и с участком ее бифуркации	3,2 (3,1...3,3)	5,0 (4,7...5,3)
Легкие	5,0 (4,7...5,3)	>5,7
Сердце	<0,4	1,5 (1,1...1,9)
Печень	<0,4	3,6 (3,1...4,1)
Селезенка	<0,4	<0,4
Поджелудочная железа	<0,4	2,6 (2,3...2,9)
Почка	<0,4	3,0 (2,9...3,1)
Поднижнечелюстные лимфоузлы	3,0 (2,8...3,2)	5,1 (4,8...5,4)
Подмышечные лимфоузлы	<0,4	<0,4
Паховые л/у	3,1 (2,6...3,6)	4,0 (3,7...4,3)
Брыжеечные лимфоузлы	<0,4	<0,4
Яичко или яичник	5,2 (4,7...5,7)	>5,7
Кусочек кожи с оспинкой	>5,7	>5,7
Примечания * Органы и ткани в составе 10%-х (по объему) гомогенатов ** Гомогенаты органов и тканей каждой временной точки получены от 1 животного n – количество повторов титрования гомогенатов органов и тканей животных М – средняя величина концентрации вируса, рассчитанная для каждого биоматериала по данным 4-кратного повторения титрования (I <sub>95</sub> ) - доверительный интервал для М с вероятностью 95% <0,4 - величина ниже порога чувствительности (0,4 lg БОЕ/мл) использованного метода титрования >5,7 – в случаях, когда при титровании в максимально взятом нами разведении гомогената (1:1000) количество БОЕ в клеточном монослое превышало 50, использовали значение >5,7 lg БОЕ/мл		

Таким образом, результаты исследований по изучению динамик накопления ВОО по органам и тканям сурков при заражении через респираторный тракт (и/н) дозой 3,7 lg БОЕ подтвердили совпадение в ряде случаев с некоторыми известными показателями инфекционного процесса у человека при оспе обезьян и натуральной оспе: генерализованная инфекция, накопление вируса в кожных оспинах (включая величину его концентрации), низкая вероятность выявления вируса в крови при титровании и накопление его в слизистой оболочке полости носа. При этом факт размножения вируса

не только в органах дыхательной системы сурков, но и в других висцеральных органах согласуется с таковым у человека и некоторых модельных видов животных для оспы обезьян. Определены органы первичного размножения вируса: легкие с трахеей, а также основной механизм распространения патогена в организме этих животных, в том числе от первичных органов-мишеней: лимфогенный с его размножением в органах лимфатической системы. Показано, что органами максимального накопления патогена у сурков, и/н инфицированных вирусом, являются легкие с трахеей, нос (носовая перегородка со слизистой) и кожа, где в ряде случаев концентрация вируса превышала 6 lg БОЕ/мл, выраженное размножение вируса отмечено у инфицированных животных в двенадцатиперстной кишке и бифуркационных лимфоузлах, достигающее концентраций 3 - 4 lg БОЕ/мл. У павших сурков после п/к инфицирования вирусом в дозах 5,6 и 7,1 lg БОЕ накопление патогена в наиболее высоких концентрациях ( $\geq 5,7$  lg БОЕ/мл) зарегистрировано в носу (носовая перегородка со слизистой), трахее, легких, почках, паховых и подмышечных лимфоузлах, яичках или яичниках и в кусочках кожи с оспинами, средние значения этого показателя (от 4,0 до 5,7 lg БОЕ/мл) отмечены в головном мозге, поджелудочной железе, поднижнечелюстных и брыжеечных лимфоузлах, а самые низкие величины концентраций ВОО ( $< 4,0$  lg БОЕ/мл) - в сердце, печени и селезенке.

### **Патоморфологические изменения у сурков, инфицированных вирусом оспы обезьян**

Учитывая то обстоятельство, что у сурков при респираторном заражении ВОО (штамм V79-1-005), также как и людей, наблюдается генерализованный инфекционный процесс, начинающийся с респираторного тракта с последующим подключением других висцеральных органов, в дальнейшей работе мы провели изучение патоморфологических изменений в организме этого вида животных после и/н инфицирования данным возбудителем заболевания с целью выявления степени их сходства с таковыми у человека и существующих модельных видов животных.

Для осуществления патоморфологического изучения органов и тканей от инфицированных ВОО сурков необходимо было провести процедуру выноса их фрагментов из заразной зоны ЛСК-4 (корпус № 6) в чистую. В связи с этим нами была отработана методология приготовления таких фрагментов, описанная в пункте и в разработанных нами в связи с этим методических указаний (МУ 1.3.3103-13) 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», которая при исследовании на остаточную инфекционность обеспечивала гарантированную инактивацию ВОО в этих биоматериалах.

Используя переданные в чистую зону фрагменты органов и тканей от инфицированных ВОО сурков, было проведено их световое и электронно-микроскопическое изучение. При этом у данных животных было показано развитие патологических изменений во многих органах и тканях, начиная с 7-х сут после и/н заражения, а также у погибших сурков после п/к и и/н инфицирования. Эти изменения были связаны с тяжестью клинических проявлений и не коррелировали с дозой и/н инфицирования (2,2 и 7,8 lg БОЕ) и п/к (2,5; 4,1; 5,6 и 7,1 lg БОЕ). В отделах респираторной системы самым заметным было деструктивное изменение эпителиальной выстилки, связанное с активным размножением вируса в клетках и развитием процесса

воспаления. Повреждения усиливались миграцией в эти области иммунокомпетентных клеток. Обращали на себя внимание полиморфные изменения эндотелия сосудов, включавшие апоптозные явления и некроз. Эндотелиальные клетки в состоянии апоптоза характеризовались резким уплотнением и распадом ядер (кариопикноз и кариорексис), а также редукцией цитоплазматических структур. Размеры митохондрий в сохраненных фрагментах цитоплазмы эндотелия часто были увеличены, однако сохранялись форма и параллельное расположение крист. Наиболее часто вирусные частицы определялись в цитоплазме эпителиоцитов (рисунок 2 и 3), макрофагов (рисунок 4), эндотелиоцитов, плазмоцитов. Примечательно, что вирусные частицы, находящиеся в пределах цитоплазмы одной клетки, отличались по степени морфологической зрелости, что свидетельствовало о репродукции вируса в пределах каждого из перечисленных клеточных типов. В цитоплазме эндотелиоцитов, находящихся в состоянии некроза, выявлялось большое количество вирусных частиц на различной стадии зрелости. Кроме того, в альвеолярном просвете часто регистрировали плеоморфные вирусные частицы.

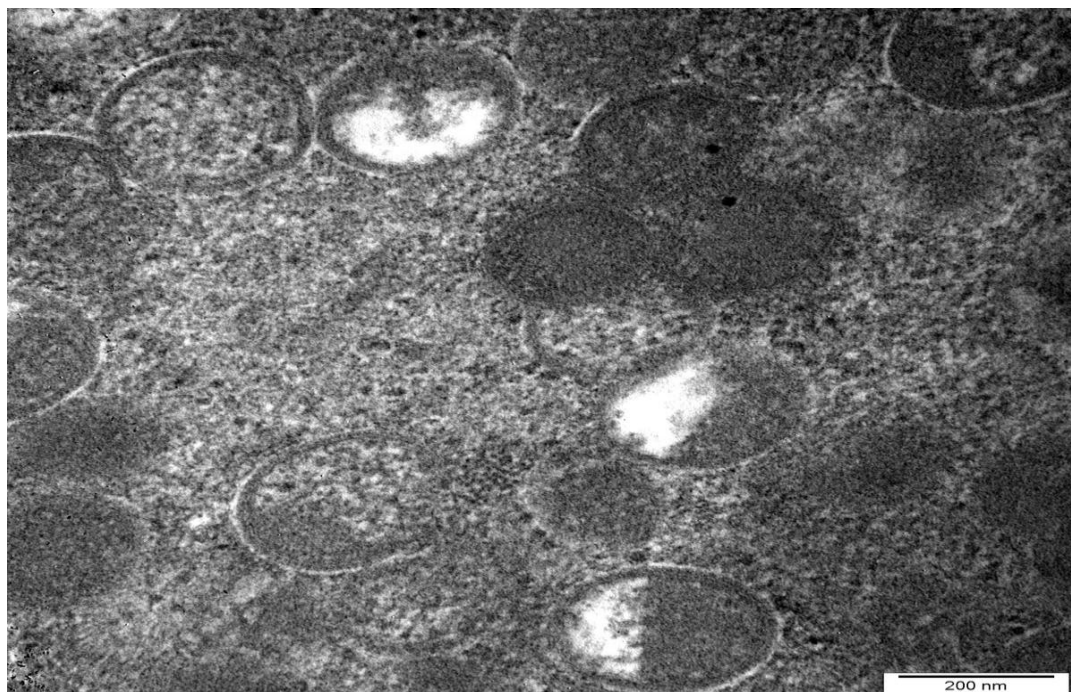


Рисунок 2 – Трансмиссионная электронная микроскопия, цитоплазма реснитчатого эпителиоцита трахеи с вироплазмой (вирусных частиц различной степени зрелости) у сурка через 7 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян

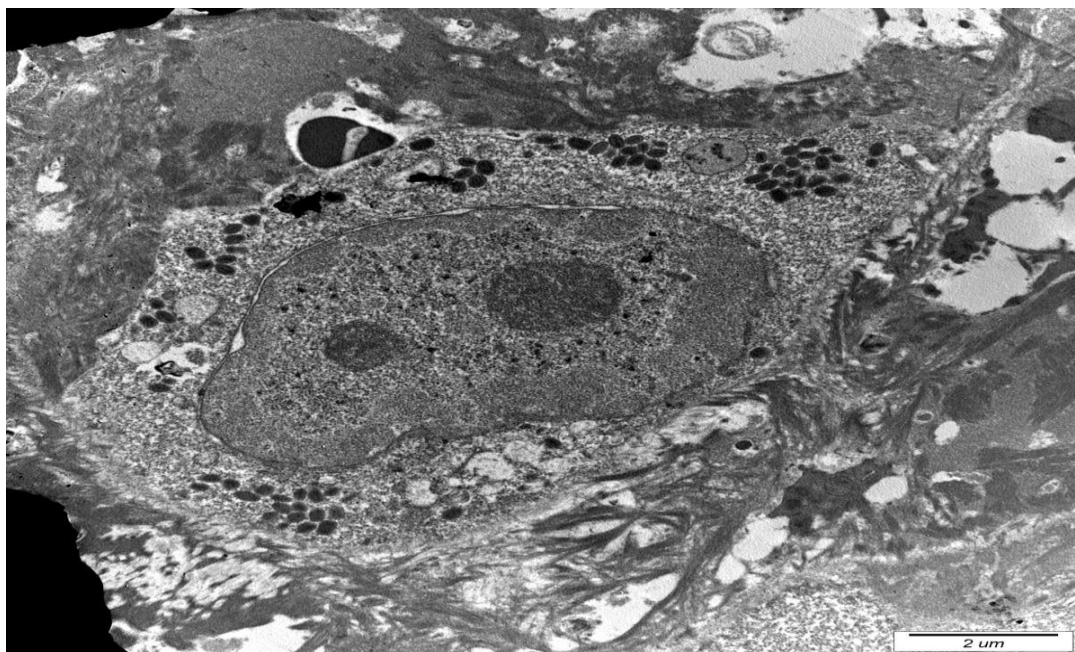


Рисунок 3 – Трансмиссионная электронная микроскопия, альвеолоцит, в цитоплазме которого групповые скопления вирусных частиц, перицеллюлярное скопление фибрина, у сурка через 9 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян

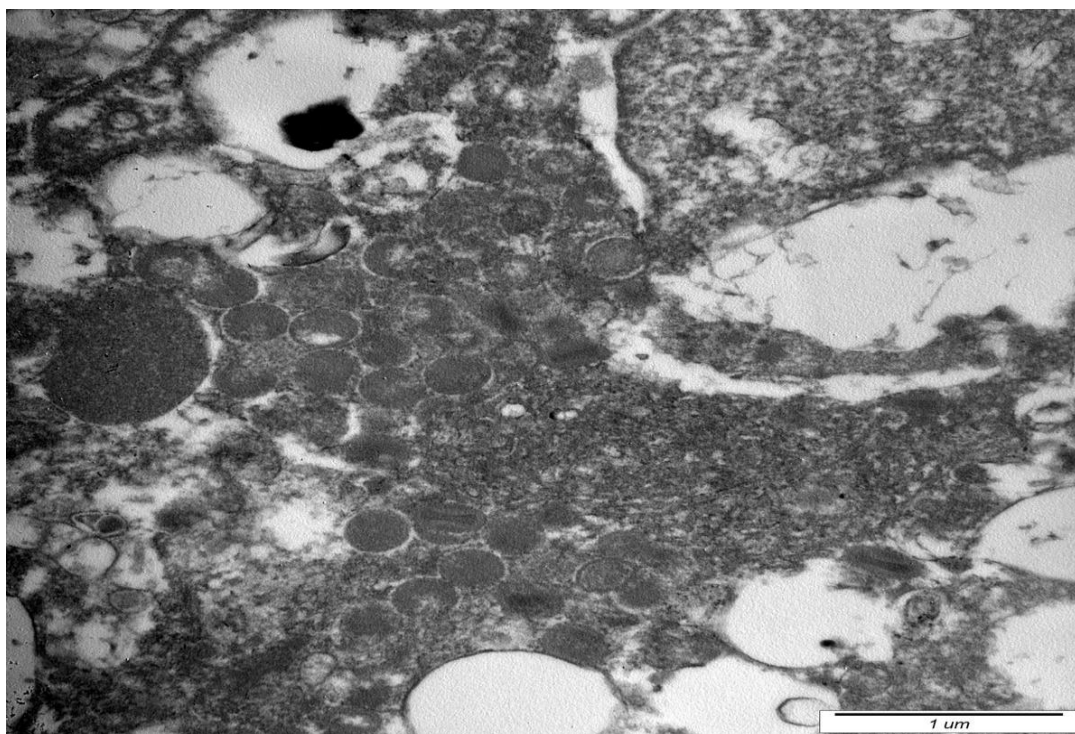


Рисунок 4 – Трансмиссионная электронная микроскопия, макрофаг с вирусными частицами в цитоплазме у сурка через 7 сут после интраназального заражения дозой 3,7 lg БОЕ штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян

Кроме вышеперечисленных клеток-мишеней для ВОО, в организме инфицированных сурков размножение вируса было зарегистрировано и в других типах клеток (например, в фибробластах, ретикулярных и гладкомышечных клетках).

В слизистой оболочке носовой полости и трахеи инфицированных сурков отмечали выраженные очаги некроза. Важным элементом в развитии патологического процесса при заражении сурков ВОО являлись нарушения микроциркуляции в виде развития стаза и сладжа эритроцитов в капиллярах, внутрисосудистого гемолиза эритроцитов, формирования тромбов. Все это позволяло предположить, что в развитии летального заболевания играет важную роль тромбогеморрагический синдром.

Одним из основных органов-мишеней при инфицировании ВОО являлась кожа, где наблюдалась интенсивная воспалительная реакция. Обильный полиморфноклеточный инфильтрат нередко захватывал всю глубину органа, и патологический процесс имел выраженную тенденцию к некротизации.

В селезенке наиболее типичной находкой являлись гиперплазия фолликулов и локальные некрозы. Вместе с тем следует отметить, что наряду с гиперплазией фолликулов и очагами некрозов, у некоторых животных встречались обширные зоны, где фолликулы отсутствовали полностью. У всех и/н инфицированных сурков (начиная с 7-х сут п.з.) и погибших после п/к и и/н заражения наблюдалась в той или иной степени выраженная некротизация паренхимы тимуса (в одном случае тотальная) и лимфоузлов. При тотальном некрозе ткани тимуса визуальная идентификация структур паренхимы этого органа была в значительной степени затруднена и проводилась по остаточным профилям синусоидных сосудов и окружающих элементов ретикулярной стромы. В печени часто присутствовали очаги инфильтрации мононуклеарами. В почках на фоне умеренно выраженного отека интерстиции наблюдали крупные полиморфноклеточные инфильтраты, зачастую располагавшиеся под капсулой. Патоморфологическое изучение других органов сурков показало наличие умеренно или слабо выраженных воспалительных изменений.

Таким образом, у и/н или п/к зараженных сурков различными дозами ВОО (от 2,6 до 7,8 lg БОЕ) наиболее выраженные патоморфологические изменения сосредоточены не только в респираторном тракте, но и в других органах (кожа, селезенка, лимфоузлы, тимус и др.), коррелируя (независимо от дозы заражения) со степенью тяжести у них клинических проявлений. Как и у некоторых других известных модельных видов животных к данному патогену, у сурков отмечены сходные гистологические изменения воспалительного и некротического характера в органах и тканях. У сурков, инфицированных вирусом, зарегистрирован факт присутствия и размножения вируса в традиционных первичных клетках-мишенях для этого патогена (в клетках системы мононуклеарных фагоцитов и эпителиоцитах в органах респираторного тракта), а также в некоторых других типах клеток (эндотелиоцитах, плазмócитах, фибробластах, ретикулярных и гладкомышечных клетках). Показано, что морфологические характеристики репродукции патогена в чувствительных клетках этих животных соответствовали таковым для этого возбудителя заболевания, описанным в научной литературе.

### **Оценка эффективности противооспенных препаратов на сурках**

С целью проверки возможности применения степного сурка в качестве модельного вида животных были проведены соответствующие исследования по изучению противовирусной активности разрабатываемого в России препарата НИОХ-14 в сравнении с американским ST-246, ранее уже продемонстрировавшим соответствующий защитный эффект.

Несмотря на то, что ранее рядом ученых была экспериментально доказана противооспенная активность препаратов НИОХ-14 и ST-246, необходимо было перед проведением экспериментов на сурках убедиться в присутствии противовирусного эффекта у полученных из НИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН свежеприготовленных серий этих препаратов. После проведения таких исследований в опытах *in vitro* с использованием вирусов осповакцины, оспы коров, оспы мышей и ВОО было отмечено выраженное противовирусное действие у препаратов этих серий. Это позволило нам провести изучение показателей их лечебно-профилактического действия в экспериментах на сурках, и/н инфицированных ВОО. Результаты таких исследований представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Лечебно-профилактическая активность препаратов при оспе обезьян у сурков после интраназального заражения штаммом V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) в дозе 3,7 lg БОЕ

Наименование показателя	Значения показателей для сурков, обработанных препаратами перорально ежедневно однократно за 1 сут до и в течение 6 сут после заражения:		
	НИОХ-14	ST-246	Плацебо*
Суточная доза вводимых препаратов (мг/кг массы сурков)	40	40	*
Количество животных в каждой группе (n)	4	4	4
Количество и доля (%) заболевших сурков	0 (0)**	0 (0)**	4 (100)
Процент защиты от инфицирования (заболевания)***	100	100	Н.о.
Количество погибших сурков	0	0	2
Примечания * Суркам контрольной группы вводили раствор метилцеллюлозы с твином–80, который использовали для получения суспензии препаратов НИОХ-14 и ST-246 ** Достоверное отличие от контроля по критерию точному тесту Фишера ( $p \leq 0,05$ ), $n_{\text{опыт}} + n_{\text{контроль}} = 8$ *** Величина разницы между % не заболевших животных в опыте и контроле Н.о. - величина не определяется			

Из данных, приведенных в таблице 7, видно, что все сурки в контрольной группе заболели, при этом у животных отмечали появление клинической симптоматики (одно- или двусторонний подчелюстной лимфаденит, оспоподобная сыпь на коже по всей видимой части поверхности тела и слизистых оболочках, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит, нарушение координации, тремор конечностей, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти) через 9 - 12 сут п.з. В то же время у сурков опытных групп, обработанных препаратами НИОХ-14 и ST-246, не было зарегистрировано каких-либо признаков заболевания в течение всего срока наблюдения после и/н заражения ВОО. Это убедительно свидетельствует о наличии значимого лечебно-профилактического эффекта у испытанных нами препаратов. При этом использование НИОХ-14 и ST-246 в одинаковых дозах на сурках, зараженных ВОО, не

выявило существенных различий между этими препаратами по эффективности противовирусного действия.

Через 28 сут п.з. у всех сурков как опытных групп, так и выживших животных контрольной группы были обнаружены достаточно высокие титры антител к ВОО в реакции нейтрализации (таблица 8).

Таблица 8 – Титры антител у выживших сурков после интраназального инфицирования штаммом V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) в дозе 3,7 lg БОЕ и последующей обработки лечебно-профилактическими препаратами

Номер сурка	Вид препарата	Обратные значения титров противооспенных антител у сурков по временным точкам:	
		до заражения	через 28 сут после заражения
1	ННОХ-14	< 5	25
2	ННОХ-14	< 5	125
3	ННОХ-14	< 5	125
4	ННОХ-14	< 5	625
5	ST-246	< 5	125
6	ST-246	< 5	125
7	ST-246	< 5	625
8	ST-246	< 5	625
9	*	< 5	625
10	*	< 5	3125
Примечания * Суркам контрольной группы вводили раствор метилцеллюлозы с твином–80, который использовали для получения суспензии препаратов ННОХ и ST-246 < 5 - величина ниже порога чувствительности (5) использованного метода титрования			

Таким образом, при изучении лечебно-профилактической активности разрабатываемых противооспенных препаратов (на примере двух химически синтезированных соединений: ST-246 и ННОХ-14) на сурках с применением ВОО подтверждено наличие ранее отмеченного нами и многими исследователями (эксперименты с использованием различных видов ортопоксвирусов, культур клеток и соответствующих известных модельных видов животных) противовирусного эффекта, что свидетельствует об адекватности используемого нами для этой цели модельного вида животных.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Говоря о сурках, как о предлагаемой нами модели для оспы обезьян, важно отметить, что данные животные (в отличие от луговых собачек, используемых в экспериментах после вылавливания из дикой природы: ареал их обитания ограничен лишь Северной Америкой) могут выращиваться в специализированных питомниках, например России, и подвергаться ветеринарному контролю, включая тестирование на отсутствие патогенных микроорганизмов и гельминтов, а также могут быть взяты из дикой природы с широким ареалом их распространенности (Америка, Европа и Азия).

Этот вид животных, как и луговые собачки, и обезьяны, при респираторном инфицировании ВОО воспроизводит не только первое звено инфекционного процесса у

человека или признанных модельных видов животных (размножение вируса в первичных органах-мишенях для вируса), но и второе, и третье (активная доставка вируса основным лимфогенным путем от первичных органов-мишеней к вторичным и размножение вируса во вторичных органах-мишенях), а также внешние клинические признаки оспоподобного заболевания и может быть использовано как для оценки профилактической (экстренно-профилактической) эффективности противооспенных препаратов, так и лечебной (терапевтической).

По результатам проведенных исследований были сделаны следующие выводы.

1 При интраназальном инфицировании сурки проявляли высокую чувствительность к вирусу оспы обезьян с появлением выраженной и обширной симптоматики оспоподобного заболевания: гипертермия тела, подчелюстной лимфаденит, дискретная оспоподобная сыпь на коже и слизистых оболочках, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит. При этом заражение вирусом в дозах от 3,7 lg БОЕ и выше приводило в 100% случаев к заболеванию сурков через 7 - 9 суток после инфицирования, а доля заболевших животных зависела от величины дозы заражения (0,2; 2,2 и 3,7 lg БОЕ). Вместе с тем, процент летальности заболевших животных не зависел от величины заражающей дозы.

2 Подкожное инфицирование сурков вирусом оспы обезьян в дозах от 2,5 до 7,1 lg БОЕ приводило к гибели 100 % животных при выраженных клинических симптомах заболевания, аналогичным тем, которые наблюдались у этого вида животных при интраназальном заражении.

3 У сурков, интраназально инфицированных вирусом оспы обезьян в дозе 3,7 lg БОЕ, органами первичного размножения вируса являлись легкие, трахея и бифуркационные лимфоузлы. Установлено, что распространение патогена в организме этих животных от первичных органов-мишеней к вторичным происходит по лимфогенному пути с его размножением в органах лимфатической системы. При этом максимальное накопление патогена наблюдалось в легких, трахее, слизистой носовой перегородки и коже, где в разные сроки после заражения концентрация вируса превышала 6 lg БОЕ/мл гомогената тканей органа.

4 У сурков, погибших после подкожного инфицирования вирусом оспы обезьян в дозах 5,6 и 7,1 lg БОЕ, накопление патогена в наиболее высоких концентрациях ( $\geq 5,7$  lg БОЕ/мл) зарегистрировано в носу, трахее, легких, почках, паховых и подмышечных лимфоузлах, яичках или яичниках и в кусочках кожи с оспинами; средние значения этого показателя (от 4,0 до 5,7 lg БОЕ/мл) отмечены в головном мозге, поджелудочной железе, поднижнечелюстных и брыжеечных лимфоузлах, а самые низкие величины концентраций вируса ( $< 4,0$  lg БОЕ/мл) - в сердце, печени и селезенке.

5 У сурков, интраназально инфицированных вирусом оспы обезьян, зарегистрирован факт его присутствия и размножения в традиционных для ортопоксвирусов первичных клетках-мишенях для этого патогена (в клетках системы мононуклеарных фагоцитов и эпителиоцитах в органах респираторного тракта), а также в некоторых других типах клеток (эндотелиоцитах, плазмócитах, фибробластах, ретикулярных и гладкомышечных клетках).

6 У всех сурков, подкожно и интраназально зараженных вирусом оспы обезьян в дозах от 2,5 до 7,1 lg БОЕ и 2,2 до 7,8 lg БОЕ соответственно, наблюдались выраженные патоморфологические изменения воспалительно-некротического характера в органах респираторного тракта, коже, селезенке, лимфоузлах, тимусе и почках.



7 При пероральном введении химически синтезированных соединений НИОХ-14 и ST-246, обладающих антиортопоксвирусной активностью, суркам, интраназально инфицированным вирусом оспы обезьян в дозе 3,7 lg БОЕ, не было зарегистрировано каких-либо внешних клинических признаков оспоподобного заболевания в течение всего срока наблюдения, что подтверждает возможность использования сурков в качестве лабораторной модели оспы обезьян для тестирования лечебно-профилактической эффективности противооспенных препаратов.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Основные статьи**

1 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 инф. – 2013. - №2. – С. 60-65.

2 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.

3 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.

4 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.

5 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.

### **Патент**

1 Способ оценки противооспенной активности лечебно-профилактических препаратов: пат. 2526504 Рос. Федерация: МКП С12N7/00 А61К35/76 А61К39/275 А61Р 31/20/ Сергеев А.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е. [и др.]; заявитель и патентообладатель Гос. научн. центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - № 2013113847/10; заявл. 27.03.13; опубл. 20.08.14, бюл. № 23. – 2 с: ил.

### **Тезисы научных форумов**

1 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.]// Материалы научно-практической конференции “Диагностика и профилактика инфекционных болезней”, Новосибирск, 26 – 28 сент. 2013. - Новосибирск, изд-во «Ареал», 2013. – С.184-186.

2 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. – Новосибирск, изд-во «Ареал», 2013. – С. 23-25.

3 Сурок как модельное животное для оспы обезьян с целью оценки эффективности противооспенных препаратов/ А.А. Сергеев, К.А.Титова, А.С. Кабанов [и др.]// 1-я международная конференция молодых ученых: Сборник тезисов Новосиб. Гос. Ун-та, Новосибирск, 5 - 10 сент. 2014. – Новосибирск, изд-во РИЦ НГУ, 2014. – С. 73-77.

4 Мыши ICR в качестве модельного животного для оценки эффективности препаратов против оспы обезьян/ А.А. Сергеев, А.С. Замедянская, Д.О. Галахова [и др.]// Материалы II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания», Сочи, 2 - 5 ноября 2015. – Москва, изд-во ООО «Пре100принт», 2015 - С. 134 – 135.

5 Discovery of new antivirals for smallpox treatment and prevention / Development of therapeutic anti-smallpox antibodies / Assessment of the neutralizing activity of vaccine blood sera using live variola virus/ L.E. Bulychev, O.V. Pyankov, Al.A. Sergeev [et al.]// WHO Advisory Committee on Variola Virus Research Report of the Fourteenth Meeting, Geneva, 16–17 Oct. 2012, - Geneva, WHO, 2012. – P. 29.

6 Efficacy study of chemically synthesized compounds against orthopoxviruses/ Ar.A. Sergeev, L.E. Bulychev, O.V. Pyankov [et al.]// WHO Advisory Committee on Variola Virus Research Report of the Thirteenth Meeting, Geneva, 31 Oct. – 1 Nov. 2011, - Geneva, WHO, 2011. – P. 28.

### Методические указания

1 Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I-IV групп патогенности: МУ 1.3.3103-13: утв. Глав.гос. сан. врачом России 16.08.2013. – Бюл. норм. и метод. документов Госсанэпиднадзора. - 2014. - №4. - Система ГАРАНТ: <http://base.garant.ru/70585158/#ixzz3L0vBNjmT>.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БОЕ	- бляшкообразующая единица
ВНО	- вирус натуральной оспы
ВОО	- вирус оспы обезьян
В/м	- внутримышечно
ГНЦ ВБ «Вектор»	- Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
ИД <sub>50</sub>	- 50%-я инфицирующая доза
И/н	- интраназально
ЛД <sub>50</sub>	- 50%-я летальная доза
НИОХ	- Новосибирский институт органической химии
НЦ ЭСМП	- Научный центр экспертизы средств медицинского применения
П.з.	- после заражения
П/к	- подкожно
СО РАН	- Сибирское отделение российской академии наук
ФБУН	- Федеральное бюджетное учреждение науки
CDC	- Центры по контролю и профилактике заболеваний
EMA	- Европейское агентство по контролю лекарственных средств
FDA	- Управление по лекарственным препаратам и продовольственным продуктам США
I <sub>95</sub>	- доверительный интервал для М с вероятностью 95%
L <sub>g</sub>	- десятичный логарифм
М	- средняя величина
N	- количество животных
P	- вероятность ошибки, уровень значимости
Vero	- перевиваемая культура клеток почки зеленой мартышки