

*Сергеев Артемий Александрович*

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

*03.02.02 – вирусология*

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

**Кольцово – 2016**

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

**Научный консультант:** Шишкина Лариса Николаевна, доктор биологических наук, заведующая отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Официальные оппоненты:** Панасенко Людмила Михайловна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры пропедевтики детских болезней Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России;  
Беклемишев Анатолий Борисович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией геномной инженерии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биохимии» Федерального агентства научных организаций России;  
Чуйкова Кира Игоревна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой инфекционных болезней факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Федерального агентства научных организаций России.

Защита состоится 2 декабря 2016 г. в 9<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/zaschita-dissertatsiy>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Зубавичене Наталья Маратовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Болезни инфекционной природы составляют одну пятую часть среди причин смерти людей в мире, по данным Всемирной организации здравоохранения за последние 15 лет (Saker et al., 2004; WHO, 2012). При этом из числа вирусных инфекций наибольшую значимость с эпидемиологической точки зрения представляют заболевания, входными воротами для которых являются органы респираторного тракта. Возбудители этих заболеваний имеют преимущественно аэрозольный механизм передачи и короткий инкубационный период (Zhao, Zhao, Xianing, 2005; Boone, Gerba, 2007; International Scientific Forum, 2012). К числу таких инфекций (из ряда особо опасных) относятся оспа обезьян и грипп птиц (А/Н5N1). Несмотря на то, что возбудители этих зооантропонозных заболеваний, принадлежащих к семействам *Poxviridae* (род *Orthopoxvirus*) и *Orthomyxoviridae*, были открыты достаточно давно, внимание ученых к данным патогенам не ослабевает и по настоящее время, что связано с шестью основными причинами:

- с высокой опасностью высокопатогенного вируса гриппа птиц (в/пат ВГП) А/Н5N1 и вируса оспы обезьян (ВОО) для человека (летальность достигала 60 и 17 % соответственно) (Gispen, 1975; Di Giulio, Eckburg, 2004; WHO, 2013);
- с низким уровнем иммунитета или его отсутствием у людей к гриппу птиц (А/Н5N1) и оспе обезьян: вакцинация от первого заболевания не проводится, а от натуральной оспы, которая защищает и от оспы обезьян, была прекращена с 1980 г. (Jezek et al., 1986; Wkly Epidemiol. Rec., 1997; Beigel et al., 2005);
- с продолжающимися эпидемическими вспышками гриппа птиц (А/Н5N1) и оспы обезьян (Борисевич и др., 2012; Levine et al., 2007; WHO, 2013);
- с отсутствием исчерпывающей информации о резервуарах ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1 в природе (Causey, Edwards, 2008; WHO, 2011);
- с существующей возможностью распространения ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1 по всему миру и выраженной генетической изменчивостью особенно последнего, которая в любой момент может существенно увеличить контагиозность вызываемого им заболевания среди людей, приведя к пандемии (Борисевич и др., 2012; Imai et al., 2012; Herfst et al., 2012);
- с отсутствием или ограниченностью спектра разрешенных к применению эффективных лечебно-профилактических химиопрепаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1), а также вакцин против последнего (Седова и др., 2012; Magee et al., 2008; Jordan et al., 2010).

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

**Степень разработанности.** К началу данного исследования известны модельные биосистемы для оспы обезьян, созданные на основе шести видов животных: иммунодефицитных мышей (Americo, Moss, Earl, 2010; Hutson et al., 2010; Stabenow et al., 2010),

сусликов (*Spermophilus tridecemlineatus*) (Tesh et al., 2004; Sbrana et al., 2007a,b), луговых собачек (*Cynomys ludovicianus*) (Xiao et al., 2005; Hutson et al., 2009, 2010), сонь Келлена (*Graphiurus kelleni*) (Schultz et al., 2009) и низших приматов (*Macaca cynomolgus* и *mulatta*) (Zaucha et al., 2001; Parker, Handley, Buller, 2008; Chapman et al., 2010). Тем не менее, все эти модельные виды животных имеют те или иные недостатки, касающиеся возможности их воспроизводства в неволе, дороговизны, удобства и адекватности их применения при моделировании оспы обезьян у людей:

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

- низшие приматы и луговая собачка, хотя и воспроизводят при инфицировании ВОО симптоматику оспоподобного заболевания, однако первые виды используются с высокими дозами ВОО ( $\geq 7$  Ig БОЕ – бляшкообразующая единица) для оценки защитной эффективности химиопрепаратов (Stittelaar et al., 2006; Huggins et al., 2009; Jordan et al., 2009), являются дорогими животными, применение которых в экспериментах сопряжено с большими трудозатратами, а второй вид плохо приживается в неволе и поэтому для экспериментов доставляется, как правило, из естественной среды обитания: Северная Америка (Свободная энциклопедия), что порождает необходимость проведения у него оценки состояния здоровья, а также наличия/отсутствия антител к ортопоксвирусам.

Из мелких лабораторных животных, удобных для оценки эффективности разрабатываемых для человека препаратов против гриппа птиц (А/Н5N1), чаще всего использовали инбредных мышей (BALB/c), а также вирусные штаммы, которые не являются актуальными для России, так как они были выделены на территории зарубежных стран (Yen et al., 2005; Koudstaal et al., 2009; Kitano et al., 2013).

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

- разработать стратегию поиска модельных биосистем для изучения защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1);

- провести экспериментальную и прогнозную оценку чувствительности человека и подопытных животных в отношении патогенных ортопоксвирусов и в/пат ВГП А/Н5N1 и выбрать для кандидатных модельных биосистем применительно к оспе обезьян и гриппу птиц (А/Н5N1) соответствующие штаммы и виды модельных животных для дальнейшего изучения;

- изучить динамику диссеминации ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1 в организме кандидатных модельных видов животных;

- исследовать патоморфологические изменения, включая выявление клеток-мишеней, в организме кандидатных модельных видов животных, инфицированных ВОО или в/пат ВГП А/Н5N1;

- оценить возможность использования кандидатных модельных биосистем для изучения защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1);

- провести испытания и определить пределы практического применения модельных биосистем для оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1).

#### **Научная новизна:**

1) определена чувствительность при интраназальном (и/н) заражении аутбредных мышей ICR и степных сурков к ВОО (центральноафриканский - ц/афр штамм V79-1-005) в виде величины ID<sub>50</sub> (50 %-я инфицирующая доза), оцененной по наличию соответственно инфекционного процесса в легких или внешней клинической картины оспоподобного заболевания; на основе данных относительно чувствительности первичных клеток-мишеней животных определены прогнозные значения ID<sub>50</sub> ВОО для сурков и мышей, а также вируса натуральной оспы - ВНО (штамм Ind-3a) для аутбредных мышей ICR; в опытах *in vitro* с применением первичных моноцитов-макрофагов человеческой крови оценено прогнозное значение ID<sub>50</sub> ВНО в отношении людей;

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

3) определена чувствительность по ЛД<sub>50</sub> при и/н и аэрозольном заражении аутбредных мышей ICR и кур генетической линии Род-Айланд к ВГП А/Н5N1 (штаммы A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Chicken/Crimea/04/2005, A/Chicken/Omsk/2006, A/Chicken/Krasnodar/02/2006, A/Chicken/Dagestan/2006, A/Duck/Kurgan/08/2005, A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005); по данным опытов *in vitro* с применением первичных клеток легких человека оценены прогнозные величины ID<sub>50</sub> в/пат ВГП А/Н5N1 (штаммы A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 и A/Chicken/Kurgan/05/2005) для людей; приведены результаты сравнительного изучения чувствительности кур по ЛД<sub>50</sub> ВГП А/Н5N1 (штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) при различных способах инфицирования: внутривенный, аэрозольный, и/н, оральный и интрагастральный;

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

5) с использованием разработанных модельных биосистем («степной сурок – штамм V79-1-005 ВОО», «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 ВОО» и «аутбредная мышь ICR - штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1»), запатентованных нами (Патенты РФ № 2496149, 2526504, 2361917), представлены данные по оценке противооспенной и противогриппозной активности некоторых известных и разрабатываемых препаратов.

### **Теоретическая и практическая значимость работы:**

- созданная нами методология поиска модельных видов животных для вирусных инфекций, основанная на изучении показателей взаимодействия подопытных животных с возбудителем заболевания по сравнению с таковыми у людей (известных видов модельных животных), использована при разработке трех модельных биосистем по оценке защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1);
- разработанная нами методология поиска модельных видов животных для вирусных инфекций уже применялась для создания модельных биосистем («морская свинка – штамм GРА вируса вакцинции» и «аутбредная мышь ICR - штамм A/Salekhard/01/2009 вируса гриппа - ВГ А/Н1N1pdm») с целью изучения протективной активности различных препаратов и может быть использована при поиске видов модельных животных для других инфекций вирусной природы;
- разработанные нами модельные биосистемы «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 ВОО», «степной сурок - штамм V79-1-005 ВОО» и «аутбредная мышь ICR – штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1» были успешно применены на этапе доклинических испытаний российских противооспенного химического соединения НИОХ-14 и противогриппозного препарата Реаферон-ЕС-липид®; что открывает перспективу их дальнейшего изучения в клинических исследованиях;
- разработанные нами модельные биосистемы «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 ВОО», «степной сурок - штамм V79-1-005 ВОО» и «аутбредная мышь ICR – штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1», а также методические рекомендации (МР) по их применению (МР 4.2.001-16, МР 4.2.002-16, МР 4.2.004-16 Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» - ГНЦ ВБ «Вектор») могут быть взяты для изучения защитной активности других препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1);
- ранее существующий подход прогнозной оценки величины ID<sub>50</sub> вируса, основанный на применении первичных клеточных культур животных и человека и продемонстрировавший при его использовании адекватность результатов таковым, полученным в прямых экспериментах на животных, может быть взят для исследования чувствительности разных видов млекопитающих к патогенным ортопоксвирусам и в/пат ВГП А/Н5N1;
- прогнозные величины ID<sub>50</sub> ВНО (штамм Ind-3a) для аутбредных мышей ICR, определенные на основе экспериментов (in vitro), уже использованы при создании модельной биосистемы для оценки защитного действия препаратов от натуральной оспы;
- прогнозные величины ID<sub>50</sub> ВНО, ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1 для людей, определенные на основе экспериментов (in vitro), могут быть полезными при поиске модельных биосистем не только для изучения защитной эффективности препаратов от соответствующих инфекций, но и для оценки показателей их патогенеза и контагиозности;
- при работе с мышами, сурками, первичными культурами клеток человека и животных с применением ВОО и ВНО по сей день в ГНЦ ВБ «Вектор» руководствуются методами, представленными в созданной нами инструкции № 1/02;
- в организациях, проводящих работы с возбудителями особо опасных инфекций, руководствуются разработанной нами методологией подготовки фрагментов органов и тканей от животных, инфицированных этими патогенами, для проведения патоморфологического изучения (методические указания - МУ 1.3.3103-13 Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека – Роспотребнадзор), которая обеспечивала гарантированную инактивацию жизнеспособного ВОО в этих биоматериалах при исследовании на остаточную инфекционность;

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

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

Для оценки чувствительности первичных клеток-мишеней подопытных животных и людей в отношении патогенных ортопоксвирусов и в/пат ВГП А/Н5N1 применяли ранее созданный нами подход по приготовлению этих клеток и проведению экспериментов *in vitro*. В ряде случаев была взята методология прогнозного определения значений ID<sub>50</sub> ВОО, ВНО и в/пат ВГП А/Н5N1 для животных и людей, базирующаяся на использовании их первичных клеток-мишеней для этих патогенов. В работе также были применены следующие методы исследований: вирусологические, культуральные, гистологические, электронно-микроскопические, серологические, молекулярно-генетические, аэрозольные и статистические.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Степень достоверности и апробация результатов.** Результаты исследований обработаны с использованием стандартных статистических методов (Закс, 1976) и пакета компьютерных программ «Statistica 6.0» (StatSoft Inc. 1984-2001) (Халафян, 2010) с определением достоверности отличий на 5 %-м уровне значимости.

Результаты работы были доложены на 19 российских и международных научных конференциях, конгрессах и митингах. В общей сложности в рамках тематики данной диссертации было получено 7 патентов Российской Федерации (РФ), опубликовано 20 статей в отечественных изданиях, 8 статей в зарубежных журналах, а также 2 монографии.



Личный вклад соискателя: в разработке стратегии подбора модельных биосистем для изучения защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) у человека; в прогнозной и экспериментальной (*in vitro*) оценке чувствительности человека к ВОО, ВНО и в/пат ВГП А/Н5N1 (при участии Сергеева Ал.А. – научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов»); в экспериментальной (*in vitro*) оценке чувствительности сурков и мышей к ВОО; в экспериментальной (*in vitro*) оценке чувствительности сурков и мышей к ВНО (при участии Овчинниковой А.С. – младший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов»); в экспериментальной (*in vivo*) оценке чувствительности сурков, мышей, мини-свиней и кроликов к ВОО (при участии Сергеева Ал.А. – научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов»); в экспериментальной (*in vivo*) оценке чувствительности кур, гусей и мышей к в/пат ВГП А/Н5N1; в изучении динамики распространения ВОО у инфицированных сурков и мышей; в изучении динамики распространения в/пат ВГП А/Н5N1 в организме инфицированных кур, гусей и мышей; в изучении патологических изменений в органах и тканях, инфицированных ВОО или в/пат ВГП А/Н5N1 кандидатных модельных животных (при участии Таранова О.С. – заведующий отделом микроскопических исследований); в проведении сравнительной оценки исследованных показателей взаимодействия кандидатных видов модельных животных с ВОО или в/пат ВГП А/Н5N1 при заражении через дыхательный тракт с таковыми у человека (известных видов модельных животных); в использовании разрабатываемых модельных биосистем «степной сурок – штамм V79-1-005 ВОО», «аутбредная мышь ICR – российский в/пат штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005 ВГП А/Н5N1» и «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 ВОО» с целью оценки возможности применения для изучения защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) (при участии Сергеева Ал.А. и Овчинниковой А.С. – сотрудники отдела «Коллекция микроорганизмов», а также Кабанова А.С. – научного сотрудника отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций).

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

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1 Обзор литературы

Данный раздел посвящен модельным биосистемам, которые используются для оценки защитной эффективности препаратов от инфекций человека, вызванных ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1. В нем представлена следующая информация: об истории выделения этих патогенов; о чувствительности к ним человека, животных и их первичных клеточных культур; о распространении возбудителей этих заболеваний в организме человека и животных; о патологических изменениях у человека и животных, инфицированных этими вирусами; об использовании модельных видов животных для оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) при изучении эффективности противовирусных препаратов; о подходах к созданию модельных биосистем для изучения защитной эффективности противооспенных и противогриппозных препаратов у человека. В конце данного обзора сделано заключение, обосновывающее необходимость проведения исследований в направлении разработки модельных биосистем для оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1).

## 2 Материалы и методы

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

**Лабораторные животные.** В работе использовали разные виды лабораторных животных, полученные из питомника ГНЦ ВБ «Вектор»: ~250 аутбредных мышей популяции ICR 10–16-суточных обоего пола (для экспериментов с ВОО и ВНО); ~1300 аутбредных мышей популяции ICR 18–22-суточных обоего пола (для экспериментов с в/пат ВГП А/Н5N1). Кроме того, в исследовании участвовали и другие виды подопытных животных: 16 степных сурков (*Marmota bobak*) породы Байбак 1,5-месячных массой 883–1577 г обоего пола и 29 сурков той же породы 12–24-месячных массой 3,5 (3,0–4,0) кг обоего пола (для экспериментов с ВОО и ВНО), полученных из Федерального государственного унитарного предприятия «Русский соболь» питомника г. Пушкино Московской области; ~200 кур генетической линии Род-Айланд и кросса Хайсекс Вайт массой 300 (250–350) г и 550 (500–600) г (для экспериментов с в/пат ВГП А/Н5N1), не вакцинированных против в/пат ВГП А/Н5N1 и полученных из филиала Закрытого акционерного общества «Ново-Барышевская птицефабрика» (п. Кольцово Новосибирской области), а также 5 разнополых цыплят той же линии и кросса 5–7-суточных (для экспериментов с ВНО), полученных с той же птицефабрики.

Все работы с животными выполнены в соответствии с одобренными биоэтической комиссией ГНЦ ВБ «Вектор» протоколами-заявками №ИМБТ/2-09.08 от 15 ноября 2008 г. и №1-01.2014 от 28 января 2014 г.

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

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

**Методы получения первичных культур клеток крови и легких человека.** Процедуру взятия крови у добровольцев из вены и кусочков легкого от людей проводили согласно протоколу №3 от 02.12.13, утвержденному этической комиссией ГНЦ ВБ «Вектор». Для получения монослоя первичной культуры моноцитов-макрофагов крови (МПКМ-МК) была использована кровь от четырех добровольцев, 1–7 лет тому назад вакцинированных от натуральной оспы и от трех не вакцинированных добровольцев. При этом суспензию первичных культур мононуклеаров, приготовленных после центрифугирования крови в градиенте плотности фиколл-верографина 1,077 г/мл (Ковальчук и др., 2010), заливали по 1 мл в лунки культурального 24-луночного планшета после смены питательной среды на ростовую: среда RPMI-1640 с добавлением гентамицина (80 мкг/мл) и эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (10 % по объему), затем инкубировали в течение 24 часов в

атмосфере, имеющей 5 % CO<sub>2</sub>, при температуре 37 °С. Количество полученных в лунке моноцитов-макрофагов было  $9,0 (7,5-10,5) \times 10^5$ . По данным световой микроскопии эти клетки длительное время сохраняли в монослое свою жизнеспособность во время инкубирования при 34,5 °С: через 3 суток процент живых клеток составил ~95, а через 7 суток ~83.

Получение суспензий первичной культуры клеток легких (СПККЛ) человека осуществляли в соответствии с ранее разработанной методикой (Сергеев, 2008). При этом использовали кусочки здоровой легочной ткани от трех мужчин, полученные после проведения хирургической операции по удалению части легкого, пораженного онкологическим процессом. Отсутствие онкологических изменений в отобранных кусочках проверяли гистологическим методом. СПККЛ разливали в пробирки по 0,9 мл, содержащих  $3,0 (2,5-3,5) \times 10^5$  клеток. По результатам световой микроскопии, данная клеточная суспензия содержала различные типы живых человеческих клеток легких: эпителиоциты: альвеолоциты 1-го порядка 8,6 (7,5–9,7) %, альвеолоциты 2-го порядка 1,0 (0,1–1,9) %; реснитчатые клетки 2,1 (0,5–3,7) %; макрофаги 12,4 (9,0–15,8) %. Около 70 % оставшихся клеток в суспензиях были представлены лимфоцитами (60–65 %) и нейтрофилами (5–10 %). При этом жизнеспособность таких клеток в суспензии в процессе инкубирования при 37,0 °С через 1 сутки составила ~80 %, а через 2 суток - ~50 %. Приготовленные СПККЛ человека были использованы при работе с четырьмя штаммами ВГ.

В качестве отрицательного контроля использовали клеточный дебрис. Его готовили путем 3-кратного замораживания-оттаивания МПКМ-МК или СПККЛ с последующей проверкой на отсутствие жизнеспособных клеток методом световой микроскопии и путем посева на культуральный планшет.

**Методы получения первичных культур клеток подопытных видов животных.** У 10–16-суточных мышей, 12–24-месячных сурков и цыплят, не имеющих противоопытных антител в реакции нейтрализации (Leparc-Goffart et al., 2005), брали отдельные органы и ткани с целью приготовления первичных клеточных культур.

Для получения монослоя первичной культуры макрофагов селезенки (МПКМС) у аутбредных мышей ICR брали этот орган, гомогенизировали ее в пробирке стеклянным пестиком и отмывали средой RPMI-1640. Клеточную суспензию, полученную на ростовой питательной среде, вносили в лунки 24-луночного культурального планшета по 1 мл и инкубировали в течение 24 часов в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> при температуре 37 °С. Количество полученных таким образом макрофагов в лунке было в среднем  $(7,5-10,5) \times 10^5$ . По данным световой микроскопии, такие клетки длительное время (7 суток) сохраняли свою жизнеспособность в процессе инкубирования при 34,5 °С: спустя 3 суток процент живых клеток был ~95, а спустя 7 суток - ~83.

СПККЛ получали из легочной ткани аутбредных мышей ICR, сурков и цыплят в соответствии с ранее разработанной методикой (Сергеев, 2008). Данную суспензию разливали в пробирки по 0,9 мл, содержащих  $(4,0-6,0) \times 10^5$  клеток. По результатам световой микроскопии, такая клеточная суспензия содержала различные типы и количества клеток легких животных, аналогичные тем, которые описаны для СПККЛ людей. Жизнеспособность этих клеток в суспензии при инкубирования при 34,5 и 37,0 °С через 1 сутки составила ~80 %, через 2 суток – ~50 % и через 3 суток – ~30 %.

В качестве отрицательного контроля использовали клеточный дебрис, который готовили вышеописанным способом из МПКМС мыши или СПККЛ мыши, сурка и цыпленка.

**Вирусы.** В работе использовали ц/афр штамм BOO (V79-1-005 - Congo Basin

MPXV) и штамм Ind-3a ВНО, взятые из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ГНЦ ВБ «Вектор». Применяя данные штаммы, готовили вирусосодержащие суспензии в среде культивирования клеток: два препарата ВОО с титрами 6,7 (6,6...6,8) и 7,1 (7,0...7,2) lg БОЕ/мл и один препарат ВНО с титром 6,7 (6,6...6,8) lg БОЕ/мл.

Исследования также проводили с использованием полученных из той же Государственной коллекции восьми в/пат штаммов ВГП А/Н5N1 (внутривенный индекс патогенности, IVIP - от 2,7 до 3,0), выделенных от домашней птицы в России (A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005; A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005; A/Chicken/Kurgan/05/2005; A/Duck/Kurgan/08/2005; A/Chicken/Crimea/04/2005; A/Chicken/Omsk/2006; A/Chicken/Krasnodar/02/2006; A/Chicken/Dagestan/2006), непандемического штамма A/Novosibirsk/1/2009 ВГ А/Н1N1, выделенного от больного человека во время эпидемии в Новосибирске в начале 2009 года, и штамма A/Aichi/2/68 ВГ А/Н3N2, адаптированного к мышам. Девять первых штаммов были наработаны на 2 или 3-м пассажах от источника выделения на 9-суточных куриных эмбрионах. Используя эту же биосистему культивирования, был приготовлен и 10-й штамм. Препараты разных вирусных штаммов имели концентрацию 7,5–8,7 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл.

**Методы инфицирования животных.** До начала исследований на сурках было установлено в традиционно поставленной реакции нейтрализации (Leparc-Goffart et al., 2005), что в сыворотке их крови отсутствовали антитела к вирусу вакцинии. В экспериментах с использованием этих животных, инфицированных ВОО, делали измерение им ректальной температуры тела электронным термометром Thermoval (HARTMAN, Германия). Значение этого показателя у сурков до заражения вирусом составляло 36,1–36,9 °С. П/к суркам вводили по 1 мл вирусосодержащего материала в холку, а и/н - по 0,5 мл в каждую ноздрю (суммарно 1 мл). В экспериментах по п/к заражению сурков ВОО, брали по 4 животных 1,5-месячных на каждую дозу: 2,6; 4,1; 5,6; 7,1 lg БОЕ. Кроме того, производили и/н заражение 12–24-месячных сурков ВОО дозами -1,8; 0,2; 2,2; 4,2 и 5,0 lg БОЕ (по 4 особи на каждую дозу), а также 3,7 lg БОЕ (12 особей); 6,6 lg БОЕ (2 особи) и 7,8 lg БОЕ (1 особь). За инфицированными сурками следили в течение 21 суток после инфицирования (п.и.). Факт гибели животных вследствие инфекции, вызванной этим патогеном, подтверждали при определении наличия жизнеспособного ВОО и копий его генома в гомогенатах органов и тканей.

Мышам вводили и/н вирусосодержащий материал в объеме 0,03 мл суммарно в обе ноздри, беря для заражения различные его разведения. Эксперименты по аэрозольному инфицированию мышей с использованием только в/пат ВГП А/Н5N1 проводили аналогично методике, описанной ранее (Сергеев и др., 1999; 2002). Доза вируса, которую аспирировали мыши при экспонировании в аэрозоле, рассчитывали по формуле:

$$\text{Доза} = C \times T \times W,$$

где  $C$  – концентрация вирусного аэрозоля, ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>;  $T$  – время экспозиции, мин;  $W$  – минутный объем дыхания животных, см<sup>3</sup>/мин.

В ряде случаев эксперименты по определению величин ID<sub>50</sub> ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1, а также LD<sub>50</sub> в/пат ВГП А/Н5N1 для мышей при и/н и аэрозольном заражении проводили с 3-кратным повтором, используя по 4–8 особей на дозу. Факт гибели животных вследствие гриппозной инфекции подтверждали при определении наличия жизнеспособного в/пат ВГП А/Н5N1 и копий его генома в гомогенатах легких. Наблюдение за инфицированными мышами осуществляли в течение 7–21 суток.

Все эксперименты на курах были выполнены в ряде случаев 3-кратно с использованием только в/пат ВГП А/Н5N1, заражая каждым его разведением в основном по 4–8

особей. Внутривенное введение вирусосодержащего материала в объеме 0,2 мл осуществляли через подкрыльцевую вену. И/н и оральное заражение кур проводили традиционными методами, вводя в каждую ноздрю по 0,02 мл и в ротовую полость по 0,1 мл вирусосодержащего материала соответственно. Интрагастральное инфицирование кур осуществляли следующим способом: на первом этапе в пищевод животных вводили металлическую трубку диаметром 0,7 мм с оливой на конце; затем внутри нее в желудок пропускали пластиковый катетер (внутренний диаметр - 0,4 мм), через который и вводили шприцом вирусосодержащую суспензию в объеме 0,1 мл; после этого вынимали пластиковый катетер, а затем – и металлическую трубку. Данная манипуляция позволяла практически исключить травматическое воздействие на верхние отделы пищеварительного тракта кур при интрагастральном заражении и минимизировать вероятность попадания вирусосодержащего материала в ротовую полость и пищевод животных. Эксперименты по аэрозольному инфицированию кур проводили аналогично тому, как это описано в отношении мышей. При этом минутный объем дыхания используемых кур составлял 0,13 л/мин (Lasiewski, Calder, 1971). Наблюдение за курами осуществляли в течение 16 суток. Факт гибели кур вследствие гриппозной инфекции подтверждали при определении наличия жизнеспособного в/пат ВГП А/Н5N1 и копий его генома в гомогенатах легких.

**Методы изучения инфекционного процесса в первичных клеточных культурах.** Приготовленные первичные клеточные культуры инфицировали ВОО, ВНО или ВГ той или иной дозой, вводя по 0,1 мл вирусосодержащего материала в лунки культуральных планшет или пробирки. В каждой временной точке через 1/12-168 часов п.и. отбирали пробы по отдельности из 4-6 лунок или пробирок после 3-кратной заморозки-оттайки для определения наличия вируса или его биологической концентрации. Для электронно-микроскопического исследования инфицированные ВНО МПКМ-МК человека и МПКМС мыши отмывали, снимали резиновым полисменом и готовили образцы.

При изучении чувствительности к ВОО, ВНО и ВГ первичных культур клеток животных и человека оценивали 50 %-ю инфицирующую дозу для клеточных культур ( $CI_{50}$ ). Величину этого показателя нормировали на 1 млн. клеток, то есть определяли дозу, вызывающую инфицирование 50% образцов с монослоем или суспензией, каждая из которых содержит 1 млн. клеток, по формуле:

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

где  $CI$  - средняя концентрация клеток в монослое или суспензии, для которой определяли  $CI_{50c}$ . Значения  $CI_{50c}$  определяли в 3 независимых повторях для каждого вируса.

**Методы подготовки биоматериалов от инфицированных животных.** В процессе изучения накопления ВОО у сурков, павших после п/к заражения, отбирали образцы следующих тканей и органов: носовая перегородка со слизистой; легкие; трахея; сердце; печень; почки; поджелудочная железа; селезенка; головной мозг; подмышечные, поднижнечелюстные, паховые и брыжеечные лимфоузлы; кусочки кожи с оспенными элементами; яички и яичники. При изучении распространения ВОО и патологических изменений в тканях и органах и/н инфицированных сурков осуществляли забор биоматериала (клетки крови, сыворотка крови, носовая перегородка со слизистой, головной мозг, трахея, бифуркационные лимфоузлы, легкие, печень, селезенка, поджелудочная железа, мезентериальные лимфоузлы, двенадцатиперстная кишка, почки, надпочечники и кожа), используя по 1 животному на каждую точку по времени (2-12 суток п.и.). Для микроскопических исследований у этих и двух интактных животных брали те же образцы тканей и органов, а также дополнительно тимус. Забор крови у сурков осуществляли

из вены на поверхности голени. Из крови при центрифугировании получали сыворотку, а также сгусток форменных элементов. Для вирусологического исследования готовили гомогенаты органов и тканей (10 %-е), инфицированных ВОО сурков, методом механической деструкции пестиком в ступке в присутствии речного песка.

В некоторых случаях у мышей через 1-10 суток п.и. ВОО брали те или иные органы и ткани: кровь для получения из нее сыворотки и сгустка, а также носовую перегородку со слизистой, легкие, трахею, бифуркационные лимфоузлы, селезенку, головной мозг, поджелудочную железу, печень, почки и двенадцатиперстную кишку. Из этих биоматериалов, включая сгусток крови, от каждого животного по отдельности, взяв по 3-6 мышей на каждую временную точку, готовили 10%-е гомогенаты для вирусологического исследования. В ряде случаев для изучения патологических изменений проводили отбор тех же органов и тканей и дополнительно надпочечников, кусочков кожи и брыжеечных лимфоузлов от 4 мышей на каждую временную точку.

При изучении динамики накопления в/пат ВГП А/Н5N1 в организме и/н инфицированных кур готовили 10 %-е гомогенаты биоматериалов (носовая перегородка со слизистой, трахея, легкие, пищевод, желудок, тонкий и толстый кишечник, печень, поджелудочная железа, почка, клоака, селезенка, головной мозг, поперечнополосатая мышечная ткань), а также сыворотку, полученную путем центрифугирования из сгустка крови, взятой из сердца. Данную процедуру осуществляли через 1–54 часа п.и., используя по 3 животных на временную точку и объединяя соответствующие гомогенаты для каждой временной точки.

При изучении динамики накопления в/пат ВГП А/Н5N1 в организме и/н инфицированных мышей были приготовлены 10 %-е гомогенаты следующих органов и тканей: легкие, носовая перегородка со слизистой, трахея, головной мозг, селезенка, мочевой пузырь, почки, поперечнополосатая мышечная ткань и печень, а также гепаринизированная кровь. При этом отбор данного биоматериала осуществляли в течение 6–18 суток с интервалом в 1–8 суток, используя по 3 мыши на временную точку и объединяя соответствующие гомогенаты для каждой временной точки. Для патоморфологических исследований у мышей, и/н зараженных в/пат ВГП А/Н5N1, проводили забор различных тканей и органов (носовая перегородка со слизистой, трахея, легкие, пищевод, желудок, толстый и тонкий кишечник, почки, головной мозг), как правило, каждые сутки в течение 8 суток п.и., используя по 3 животных на временную точку.

**Методы вирусологического анализа проб.** Биологическую концентрацию ВОО и ВНО в биоматериалах определяли методом негативных колоний на культуре клеток Vero (Leparc-Goffart et al., 2005), а ВГ - титрованием на 9-суточных куриных эмбрионах с последующей его регистрацией в реакции гемагглютинации (Мейхм, 1988).

**Методы патоморфологических исследований.** Образцы тканей и органов мышей для световой микроскопии фиксировали в растворе параформальдегида (4 %-й), готовили парафиновые срезы и окрашивали. Для электронной микроскопии образцов применялась дополнительная их фиксация раствором осмиевой кислоты (1 %-й), ультратонкие срезы контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом. Исследования и микрофотосъемку проводили, используя светооптический микроскоп Imager Z1 (Zeiss, Германия) и электронный микроскоп JEM 1400 (Jeol, Япония).

**Противовирусные препараты.** В работе использовали химиопрепараты, синтезированные в Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук: ST-246 (4-трифторметил-N-(3,3а,4,4а,5,5а,6,6а-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етеноциклопроп[ф]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид), обладающий высоким противоопухолевым эффектом (Jordan et al., 2010); 7-

[N`-(4-Трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0<sup>2,4</sup>]нон-8-ен-6-карбоновая кислота (ННОХ-14), ранее проявивший в опытах *in vitro* противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов (Селиванов и др., 2011); ННОХ-32 (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) со слабой антипоксвирусной активностью (Selivanov et al., 2011). Все они были охарактеризованы, а также паспортизованы, их подлинность подтверждалась ИК спектроскопией, данными спектров ЯМР и элементного анализа.

В работе с в/пат ВГП H5N1 исследовали коммерческие препараты с ранее доказанной лечебно-профилактической активностью против сезонного гриппа и птичьего гриппа (А/Н5N1) - Тамифлю® (Осельтамивир) производства фирмы Хоффманн-Ля Рош Лтд. (Швейцария), а также против сезонного гриппа - Реаферон ЕС-липид® производства ЗАО «Вектор-Медика» (Россия).

**Метод прогнозной оценки чувствительности человека и животных к вирусам.** Применяли созданный ранее частный алгоритм прогнозной оценки ID<sub>50</sub> для хозяина, используя данные экспериментов на первичных культурах клеток органа-мишени, взятых от лабораторного модельного вида животных и хозяина, адекватность которого ранее была показана для вирусов гриппа и Марбург (Жуков и др., 2007; Жуков, 2011; Zhukov et al., 2001). Была выбрана упрощенная модель прогнозирования, предназначенная для экспресс-оценки потенциальной чувствительности хозяина, благодаря тому, что в модели учитывается только один показатель восприимчивости клеток, характеризующийся CID<sub>50</sub>, при условии, что анализируемые клетки не только чувствительны к патогену, но и обладают продуцирующей вирус способностью (N > 0). Прогноз дозы вируса (CID<sub>50</sub>) для целевого объекта (человека или животного, отличающегося от модельного) и/или патогена (отличного от модельного) делали по уравнению:

$$\lg ID_{50} = \lg ID_{50m} - \lg CID_{50m} + \lg CID_{50},$$

где индекс «m» относит параметр к модельному виду животных и/или вирусу, а без индекса параметр соответствует целевому объекту и/или патогену. Дисперсию S<sup>2</sup><sub>prog</sub> прогнозной величины lg ID<sub>50</sub> считали равной величине дисперсии дозы lg ID<sub>50m</sub> модельного животного и/или вируса.

**Методы статистической обработки результатов.** Статистическую обработку результатов и их сравнение проводили общепринятыми для биомедицинских исследований методами (Закс, 1976). При этом оценивали виды распределений совокупностей значений, равенство их дисперсий, доверительные границы средних значений с заданной вероятностью 95 %. Сравнение средних величин по совокупностям значений их частных измерений проводили с использованием параметрических и непараметрических методов статистического анализа (Закс, 1976; Халафян, 2010). Непараметрические методы так же использовали при сравнительной оценке таблиц сопряженности признаков и для установления корреляционных зависимостей. Достоверность отличий подтверждали при p ≤ 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3 Стратегия поиска модельных биосистем для изучения защитной эффективности препаратов от инфекций человека, вызванных вирусами оспы обезьян и гриппа птиц А/Н5N1

Учитывая то, что в состав разрабатываемой модельной биосистемы, кроме соответствующего вида животных, должен входить возбудитель вирусного заболевания, крайне важно подобрать такой его штамм, который является актуальным с точки зрения

циркуляции во время последних эпидемических и эпизоотических вспышек инфекций, особенно на территории России. При выборе данного штамма необходимо также сделать акцент на тот, который обладает более высокой вирулентностью для человека.

С целью систематизации требований к видам модельных животных были отобраны следующие основные критерии, по которым важно получить сходные между человеком и исследуемым видом животных значения показателей взаимодействия с патогеном:

1) по возможности заражения модельного вида животных (необходим для создания условий по инициации инфекционного процесса предпочтительно во входных воротах инфекции);

2) по величине  $ID_{50}$  (необходим для формирования оптимальных схем количественного использования лекарственных препаратов, направленных на инактивацию известной дозы возбудителя заболевания, с целью предотвращения взаимодействия его во входных воротах инфекции с чувствительными клетками первичного органа-мишени);

3) по типу основных первичных органов-мишеней (сориентирован на возможность наиболее эффективной доставки лекарств в конкретный орган-мишень);

4) по видам основных клеток-мишеней в первичных органах-мишенях (сориентирован на возможность наиболее эффективной доставки лекарственных препаратов в соответствующие клетки-мишени);

5) по наличию п.и. патогеном ( $10-100 ID_{50}$ ) максимального уровня его репродукции в первичном органе-мишени, превышающего  $3 \lg ЭИД_{50}/мл$  (БОЕ/мл) гомогената (при максимальной пороговой величине чувствительности способа титрования  $1 \lg$  у.е./мл, при обычно встречающемся стандартном отклонении 0,5, а также при дельте не менее  $4\sigma$  между величинами порога чувствительности способа титрования и показателя репродукции возбудителя заболевания в исследуемом органе в контроле; интервал  $4\sigma$  включает в себя при нормальном распределении 99,99 % всех величин титров патогена [12]) (связан с возможностью использования метода количественной оценки эффективности лекарственных препаратов по результатам выявления вируса в первичном органе-мишени);

6) по типу основной системы (кровеносная или лимфатическая) доставки возбудителя заболевания к вторичным органам-мишеням (сориентирован на возможность наиболее эффективной доставки лекарственных препаратов в конкретную основную систему доставки вируса к вторичным органам-мишеням);

7) по механизму (пассивный - без размножения возбудителя заболевания в системе доставки, активный – с размножением) диссеминации патогена в направлении вторичных органов-мишеней (направлен, особенно при активном распространении вируса к вторичным органам-мишеням, на возможность наиболее эффективной доставки лекарств в конкретные клетки-мишени соответствующей системы доставки патогена);

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

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

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



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

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

Базируясь на этой стратегии, далее будут приведены экспериментальные данные по разработке модельных биосистем для оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1), нацеленные на подбор соответствующих штаммов возбудителей этих заболеваний, а также видов животных, воспроизводящих у человека в основном начальные стадии инфекционного процесса или все стадии, включая клиническую картину болезни, для изучения профилактической или профилактической и лечебной эффективности создаваемых противовирусных препаратов.

#### **4 Поиск модельных видов животных для оспы обезьян по изучению защитной эффективности препаратов для человека**

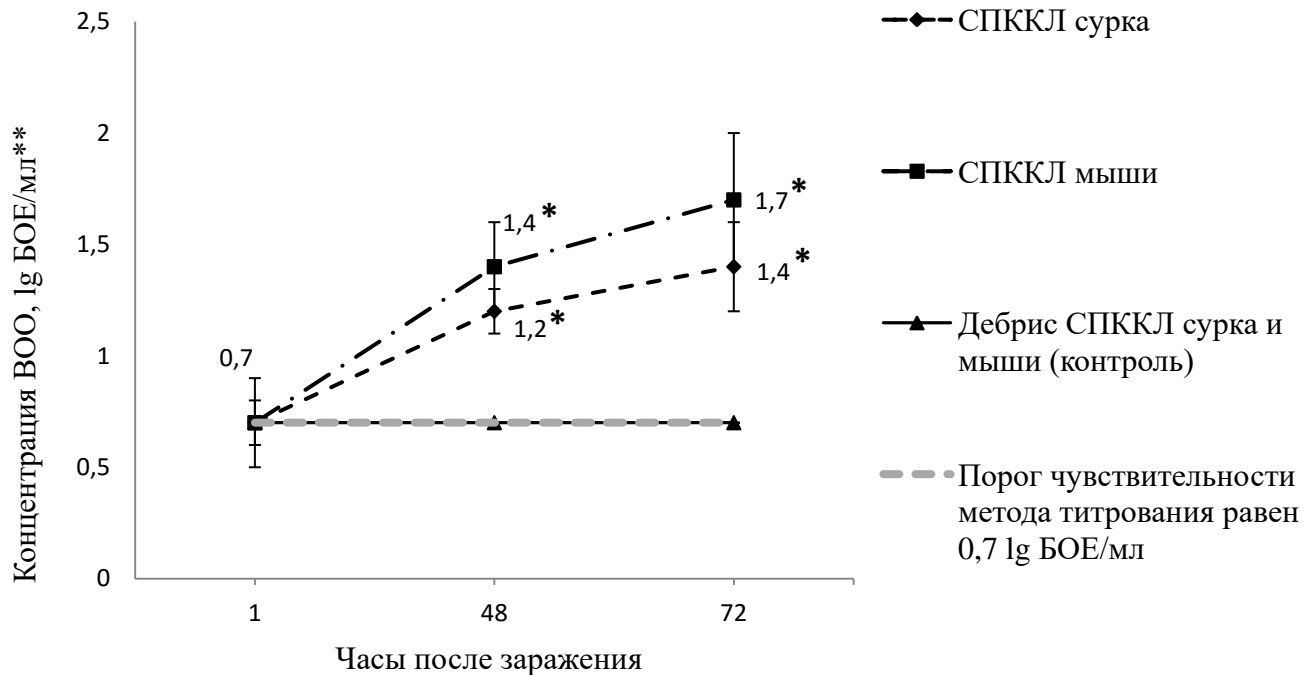
##### **4.1 Экспериментальная и прогнозная оценка чувствительности людей и подопытных животных к патогенным ортопоксвирусам**

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

С целью проверки работоспособности прогнозного метода оценки чувствительности человека к ВОО и ВНО были проведены исследования на первичных клеточных культурах легких животных и человека, содержащих в своем составе первичные традиционные клетки-мишени для этих вирусов (макрофаги и эпителиоциты респираторных органов). Учитывая то обстоятельство, что в России не было случаев оспы обезьян среди животных и людей, а также низкий показатель изменчивости возбудителя этого заболевания, в роли инфекционного агента применяли во всех экспериментах известный штамм ВОО V79-1-005, относящийся к кладе ц/афр штаммов, обладающих более выраженной вирулентностью для людей (летальность до 17 %), чем западноафриканский (летальные случаи не описаны). Среди имеющихся штаммов ВНО для исследований был выбран штамм Ind-3a в связи с тем, что он был выделен во время последней эпидемии натуральной оспы (60–70-е годы прошлого столетия) от больного человека в Азии (Индия).

**Данные по чувствительности первичных клеток-мишеней животных к возбудителю оспы обезьян.** Первоначально была проведена экспериментальная оценка степени чувствительности к ВОО первичных клеточных культур легких мышей и сурков.

Данные, представленные на рисунке 1, свидетельствуют о размножении ВОО в СПККЛ, полученных от этих видов животных: наблюдался достоверный прирост биологической концентрации патогена спустя 2 и 3 суток п.и. Причем более высокого уровня накопления вирус достигал через 3 суток п.и., чем через 2. В связи с этим позднее были проведены опыты по изучению чувствительности СПККЛ исследуемых видов животных к ВОО, рассчитанные по регистрации данных о наличии в них вируса или величины его концентрации спустя 72 часа п.и.



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

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

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

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

При этом были получены следующие величины инфекционности этого патогена для клеток животных: для сурков  $CID_{50} = 0,5 (0,2...0,8)$  лг БОЕ, а для мышей  $CID_{50} = 1,7 (1,4...2,0)$  лг БОЕ. Очевидно, что чувствительность первичных клеток сурков к этому вирусу была достоверно выше (на 1,2 лг) таковой у мышей.

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

**Данные по чувствительности первичных клеток-мишеней животных и человека к возбудителю натуральной оспы.** На следующем этапе при работе с ВНО была проведена оценка степени чувствительности макрофагов людей, используя первичную культуру моноцитов-макрофагов их крови. При этом необходимо было изучить возможность репродукции ВНО в этих клеточных культурах. Для этого были приготовлены на основе крови волонтера, не вакцинированного от натуральной оспы, МПКМ-МК, включая контроль (дебрис клеток). При проведении исследований применяли две инфицирующие дозы ВНО ( $0,003$  и  $0,017$  БОЕ/кл.), отбирая пробы для вирусологических исследований через 1, 24, 48, 72, 144 часа п.и.

Полученные экспериментальные данные свидетельствовали о репродукции ВНО в МПКМ-МК, при этом в зависимости от используемой в экспериментах заражающей дозы патогена наблюдали значимый прирост его биологической концентрации уже спустя 1 и 2 суток п.и. Максимального уровня накопления возбудитель заболевания достигал в основном через 6 суток п.и. При электронно-микроскопическом исследовании были обнаружены признаки размножения этого патогена в моноцитах-макрофагах человека (рисунок 2).

В последующих исследованиях по изучению чувствительности к ВНО моноцитов-макрофагов была взята кровь от четырех добровольцев, 1 – 7 лет тому назад привитых против натуральной оспы и имеющих титры антител: 76, 100, 128, 216 PRNT<sub>50</sub>/мл, и трех не привитых. Используя уже полученные результаты на МПКМ-МК человека, были рассчитаны значения показателя их чувствительности по наличию в них вируса спустя 144 часа п.и. При этом были определены следующие средние величины инфекционности этого патогена для клеток четырех вакцинированных волонтеров: CID<sub>50</sub> = 0,01 (-0,15...0,17) lg БОЕ, а также трех не вакцинированных: CID<sub>50</sub> = 0,09 (-0,37...0,55) lg БОЕ. Видно, что монослой моноцитов-макрофагов крови этих двух групп людей проявляли сходную высокую чувствительность к ВНО, что позволило нам провести оценку среднего значения показателя инфекционности: CID<sub>50</sub> = 0,04 (-0,08...0,16) lg БОЕ.

На следующем этапе была экспериментально определена степень чувствительности к ВНО макрофагов мышей, используя при этом первичную культуру такого типа клеток из селезенки (МПКМС). Сначала необходимо было изучить возможность размножения ВНО в данной клеточной культуре. Для этого монослой клеток каждой лунки инфицировали этим возбудителем заболевания двумя дозами 0,017 и 0,003 БОЕ/кл., беря пробы для вирусологического изучения через 1, 48, 72, 144, 168 часов п.и. Данные, проведенных исследований, свидетельствовали о размножении ВНО в МПКМС мышей, при этом наблюдался существенный прирост биологической концентрации этого вируса спустя 48, 72 и 168 часов п.и.

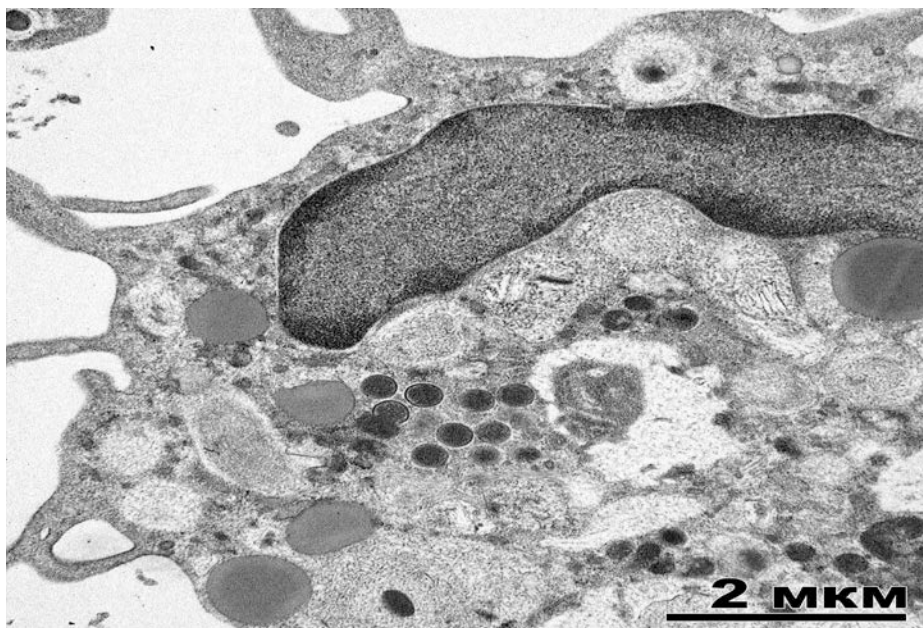


Рисунок 2 - Моноцит-макрофаг (трансмиссивная электронная микроскопия) из монослоя моноцитов-макрофагов человеческой крови через 3 суток после заражения вирусом натуральной оспы (штамм Ind-3a) в дозе 0,017 БОЕ/кл.: апоптотное состояние, в цитоплазме (слева вверху) несколько незрелых вирионов

Максимального уровня накопления в культурах клеток вирус достигал спустя 48 часов п.и. в дозе 0,017 БОЕ/кл. и спустя 168 часов п.и. в дозе 0,003 БОЕ/кл. В процессе проведения электронной микроскопии были выявлены признаки размножения вируса в мышинных макрофагах селезенки (рисунок 3). Используя результаты этих исследований, в последующем была изучена чувствительности МПКМС мышей к ВНО с учетом регистрации наличия вируса через 168 часов п.и. Величина этого показателя, оцененная в  $CI_{D_{50}}$ , составила 1,0 (0,7...1,3) lg БОЕ.

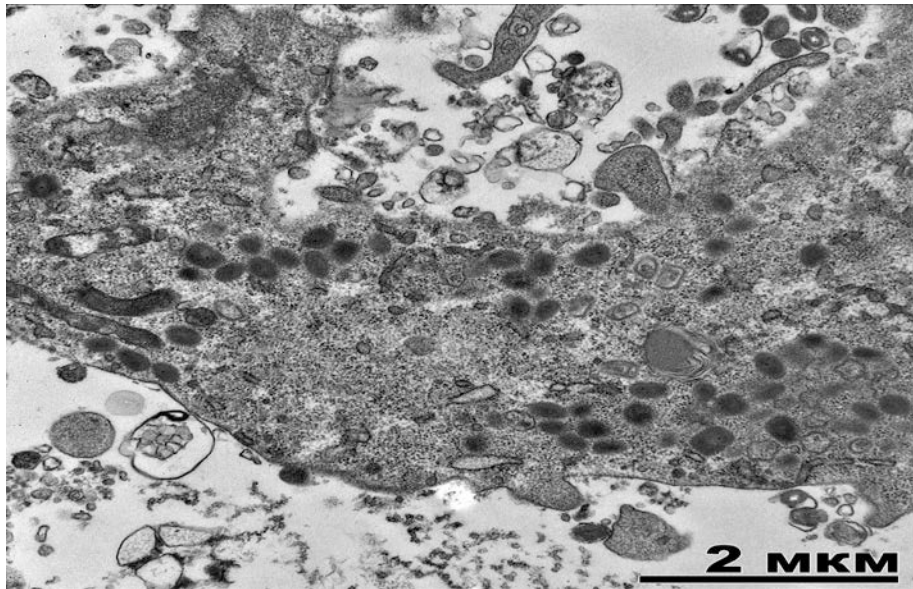


Рисунок 3 – Макрофаг (трансмиссивная электронная микроскопия) из монослоя макрофагов селезенки аутбредной мыши ICR спустя 144 часа после заражения вирусом натуральной оспы (штамм Ind-3а) в дозе 0,003 БОЕ/кл.: зрелые вирусные частицы в цитоплазме, признаки репродукции вируса

В дальнейшем была определена возможность размножения ВНО в СПККЛ, полученных от сурков, мышей и цыплят.

По данным рисунка 4 была отмечена репродукция ВНО в культуре клеток легких у подопытных животных, при этом регистрировали значимый прирост его концентрации в клетках мышей и сурков спустя 48 и 72 часа п.и. Наибольшего уровня накопления патоген достигал спустя 72 часа п.и. Затем были проведены опыты по изучению чувствительности легочных клеток только мышей и сурков к ВНО с учетом регистрации данных о его наличии в них спустя 72 часа п.и. В этом случае были определены следующие параметры инфекционности патогена: для СПККЛ сурка  $CI_{D_{50}} = 2,3$  (1,8...2,8) lg БОЕ; для СПККЛ мыши  $CI_{D_{50}} = 1,3$  (0,8...1,8) lg БОЕ. Очевидно, что чувствительность клеток легких мыши к ВНО была выше по сравнению с таковой у сурка.

Таким образом, репродукция ВНО наблюдалась в моноцитах-макрофагах крови человека, а также в мышинных селезеночных макрофагах, зараженных дозами вируса 0,003 и 0,017 БОЕ/кл. Данный процесс также регистрировался в клеточных культурах легких сурка, мыши и цыпленка, зараженных дозой ВНО 0,00001 БОЕ/кл. Определены величины  $CI_{D_{50}}$  ВНО в отношении моноцитов-макрофагов крови людей - 0,0 (-0,1...0,1) lg БОЕ, мышинных селезеночных макрофагов - 1,0 (0,7...1,3) lg БОЕ, а также в отношении клеточных культур легких сурков - 2,3 (1,8...2,8) lg БОЕ и мышей - 1,3 (0,8...1,8) lg БОЕ.



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

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

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

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

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

В экспериментах *in vivo* с использованием ВОО внимание было акцентировано не только на внешней клинической картине болезни, но и на исследовании инфекционного процесса в легких (первичный орган-мишень для этого патогена) подопытных видов животных после и/н заражения. При этом были проведены исследования по определению чувствительности мышей и сурков к ВОО. Применение именно этого метода инфицирования животных было связано с необходимостью имитации основных механизмов передачи оспы обезьян среди людей (аэрозольный и контактный), реализуемых в основном через дыхательный тракт во время эпидемических вспышек этого заболевания. Отмечено, что и/н введение ВОО в дозах -1,0; 1,0; 3,0; 5,0; 5,5 lg БОЕ не вызывало гибели у мышей. Тем не менее, с 7-х суток п.и. у них отмечали внешние клинические признаки болезни (взъерошенность шерсти, блефарит и гнойный конъюнктивит), которые исчезали спустя 11–13 суток п.и. В этой связи для мышей было оценено значение чувствительности к ВОО, которое рассчитывали по наличию внешних клинических признаков инфекции у этих животных ( $ID_{50} = 4,8$  lg БОЕ).

У сурков, и/н инфицированных ВОО, наблюдали целый комплекс клинических проявлений: подчелюстной лимфаденит (одно- или двусторонний), гипертермия тела, оспоподобная дискретная сыпь на слизистых оболочках и видимой части кожи на всей поверхности тела, серозно-гнойные ринит, блефарит и конъюнктивит, нарушение координации движения, повышенная агрессивность, тремор конечностей и взъерошенность шерсти. Данную симптоматику регистрировали через 7–9 суток п.и., а спустя 13–22 суток п.и. лишь 5 из 12 заболевших сурков погибло. Причем у выживших животных клинические симптомы заболевания исчезали спустя 12–18 суток после появления, а на месте, где располагались оспоподобные сыпозные элементы были образованы рубцы. Важно отметить, что в проведенных нами экспериментах не удалось определить LD<sub>50</sub> ВОО для этого вида животных по той причине, что процент их гибели не зависел от значения заражающей дозы в интервале от 2,2 до 6,6 lg БОЕ. Тогда как процент инфицированности сурков, регистрируемый по наличию симптоматики заболевания, имел выраженную зависимость «доза-эффект». Данное обстоятельство позволило нам оценить по этому признаку ID<sub>50</sub> ВОО для этих животных, которая составила 2,2 lg БОЕ. При п/к инфицировании сурков все испытанные дозы вируса (не зависимо от значений) приводили у них к появлению через 6–8 суток п.и. выраженных клинических признаков заболевания, аналогичных вышеописанным в эксперименте с и/н заражением этих животных, но с той лишь разницей, что плотность сыпозных элементов на коже и слизистых была более высокой. Причем летальный исход, наблюдаемый у п/к зараженных сурков, был зарегистрирован во всех случаях спустя 12–18 суток п.и.

В связи с тем, что величина ID<sub>50</sub> ВОО (по клинической картине заболевания) у мышей оказалась достаточно высокая, была проведена вторая серия экспериментов по оценке этого показателя, но по регистрации наличия в легких мышей инфекционного процесса. Для определения величины такой ID<sub>50</sub> необходимо было сначала исследовать динамику накопления патогена в легких мышей с целью выбора временной точки, в которой концентрация возбудителя заболевания в данном органе достигнет максимальных значений. При этом животных и/н инфицировали большой дозой вируса (5,0 lg БОЕ). По результатам такого исследования было определено, что самый высокий уровень накопления патогена в легких животных (6,0 lg БОЕ/легкие) наблюдался через 7 суток п.и. После чего была определена величина ID<sub>50</sub> ВОО (в трех независимых повторях) по наличию патогена в легких мышей в указанный срок. Для этого животных инфицировали дозами вирусом 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 lg БОЕ, используя по 6 мышей на дозу. В результате проведенных исследований было отмечено, что процент инфицированности животных, регистрируемый по наличию патогена в легких спустя 7 суток после и/н заражения, зависел от дозы вируса, что и позволило определить значение ID<sub>50</sub> ВОО (по наличию в легких инфекционного процесса) для этих животных, которое равнялось 2,4 (2,0...2,8 lg БОЕ и было ниже на 2,4 lg, чем величина ID<sub>50</sub>, определенная путем регистрации внешней клинической картины заболевания).

Таким образом, и/н заражение мышей ВОО только высокими дозами вызывало у них возникновение некоторой внешней клинической картины заболевания (взъерошенность шерсти, а также гнойный конъюнктивит и блефарит), с использованием которой и была определена для этих животных величина ID<sub>50</sub> вируса (4,8 lg БОЕ). Значение ID<sub>50</sub> для мышей при и/н заражении вирусом, определенное по регистрации инфекционного процесса в их легких, было 2,4 (2,0...2,8) lg БОЕ. После и/н инфицирования ВОО сурков зафиксировано появление выраженной и обширной симптоматики оспоподобного заболевания через 7–9 суток п.и., которая исчезала спустя 19–25 суток п.и. у выживших животных. Спустя 13–22 суток п.и. часть заболевших животных (25–50 %) независимо от

величины заражающей дозы погибло, а доля инфицированности сурков, регистрируемая по наличию симптоматики заболевания, имела четкую зависимость от вводимой дозы вируса. Значение  $ID_{50}$  ВОО для сурков при и/н заражении, определенное по наличию у них внешней клинической картины болезни, составило 2,2 (1,0...3,4) lg БОЕ. Отмечена сходная чувствительность мышей и сурков к этому вирусу при и/н заражении. У заболевших сурков при п/к инфицировании патогеном в диапазоне доз 2,6–7,1 lg БОЕ наблюдали выраженную симптоматику, сходную с той, которая была определена при и/н заражении, а также 100 %-й эффект гибели через 12–18 суток п.и.

#### 4.1.3 Прогнозная оценка чувствительности к патогенным ортопоксвирусам человека и подопытных животных

Обобщенные результаты прогнозного определения величин  $ID_{50}$  ВНО и ВОО для человека и подопытных животных, основанные на использовании значений их  $CID_{50}$  ВНО и ВОО для первичных клеток-мишеней, при сравнении с теми, которые были получены нами и другим авторами в прямых экспериментах при и/н заражении этих животных и путем экспертной или прогнозной оценки для человека, отражены в таблице 1.

Таблица 1 – Обобщенные данные по чувствительности к вирусам натуральной оспы (ВНО) и оспы обезьян (ВОО) аутбредных мышей ICR, степных сурков и людей, а также первичных клеток-мишеней от них

Наименование показателей	Вид вирусов	Величина показателей:		
		для мыши	для сурка	для человека
$CID_{50}$ , lg БОЕ, М ( $I_{95}$ ) из экспериментов in vitro	ВОО	1,7 (1,4...2,0) <sup>1</sup> n=3	0,5 (0,2...0,8) <sup>1</sup> n=3	Н.д.
	ВНО	1,0 (0,7...1,3) <sup>2</sup> n=3 1,3 (0,8...1,8) <sup>1</sup> n=3	2,3 (1,8...2,8) <sup>1</sup> n=3	0,0 (-0,1...0,1) <sup>3</sup> n=7
Прогнозная $ID_{50}$ , lg БОЕ, М ( $I_{95}$ ) из экспериментов in vitro	ВОО	2,0 (1,4...2,6) n=4	0,6 (-0,1...1,3) n=3	1,0 (0,6...1,4) n=7
	ВНО	1,8 (1,2...2,4) n=6	2,7 (2,3...3,1) n=1	1,0 (0,6...1,4) n=7
$ID_{50}$ , lg БОЕ, М ( $I_{95}$ ) в экспериментах in vivo	ВОО	1,4 (1,0...1,8) n=3	1,2 (0,0...2,4) <sup>4</sup> n=1	$\leq 1^5$
	ВНО	1,7 (1,3...2,1) <sup>4</sup> n=3	Н.д.	$\leq 1^5$ и $1-2^5$
Примечания М – средняя величина n – количество определений $I_{95}$ - доверительный интервал М с заданной вероятностью 95% <sup>1</sup> Величина получена при использовании монослоя макрофагов селезенки <sup>2</sup> Величина получена при использовании суспензии клеток легких <sup>3</sup> Величина получена при использовании монослоя моноцитов-макрофагов крови <sup>4</sup> Величина получена нами по ВОО для мышей и сурков или другими исследователями по ВНО для мышей (Titova et al., 2016) с учетом 10 %-й аппликации вируса в легких при интраназальном заражении <sup>5</sup> Величина определена путем экспертной или прогнозной оценки (Дроздов и др., 1987; Сергеев А.А., 2016; Chimerix, 2012)				

Видно, что представленные прогнозные результаты в отношении ВНО и ВОО для сурков и мышей, базирующиеся на опытах *in vitro*, значимо не отличались от таковых полученных в экспериментах *in vivo*,  $p \leq 0,05$  (при сравнении с помощью двустороннего z-критерия). Кроме того, оцененное прогнозное значение  $ID_{50}$  ВНО для людей согласуется с таковыми других исследователей, полученными путем экспертного определения. При этом важно отметить, что мыши по сравнению с сурками обладали близкой с людьми чувствительностью к ВНО. В то же время значения  $ID_{50}$  ВОО для обоих видов этих животных достоверно не отличались от такового, полученного прогнозным путем для человека.

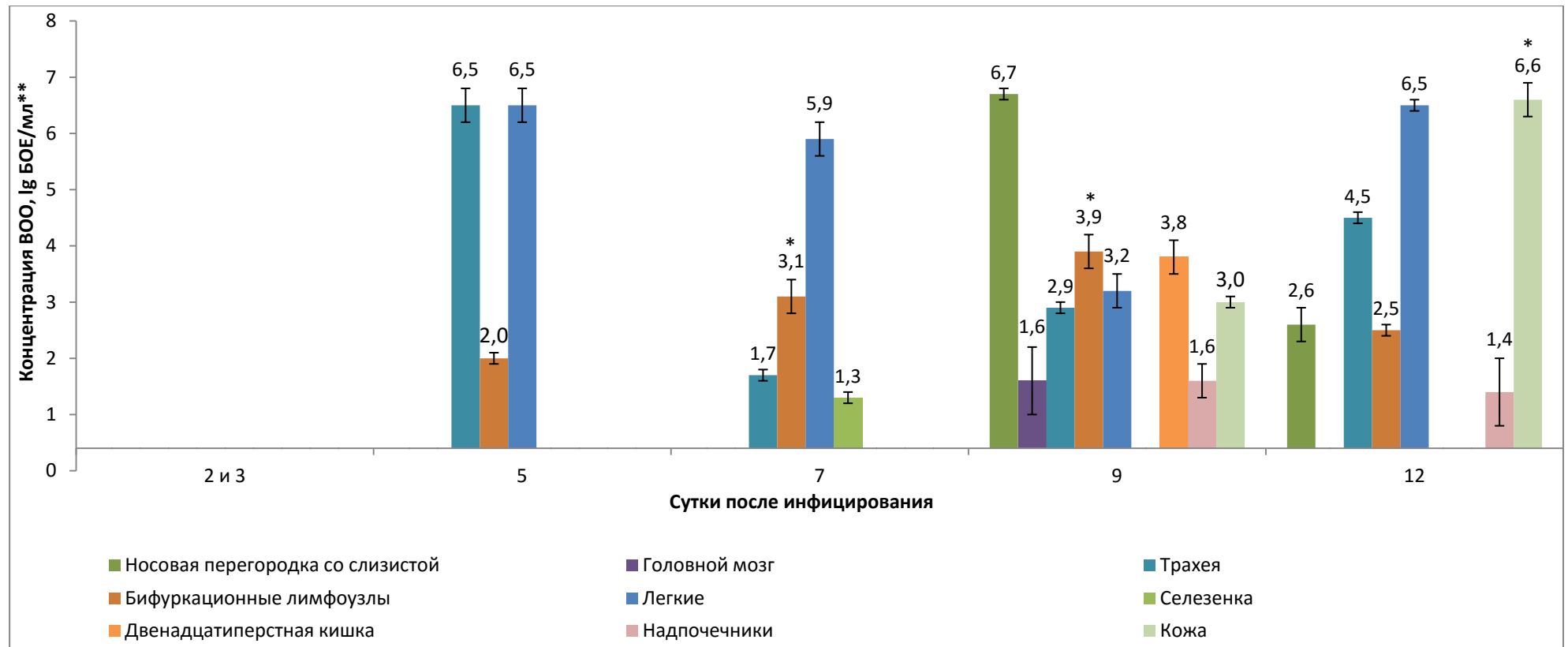
Таким образом, опираясь на результаты по чувствительности первичных клеточных культур человека и некоторых видов животных и известный способ экстраполяции  $ID_{50}$ , сделаны прогнозные расчеты величин  $ID_{50}$  ВНО (штамм Ind-3a) для человека, мыши и сурка, а также  $ID_{50}$  ВОО (штамм V79-1-005) для мыши и сурка. При этом значения этого параметра для животных достоверно ( $p \geq 0,05$ ) не отличались от таковых, оцененных по экспериментам *in vivo* в отношении ВОО для сурков и мышей и ВНО для мышей. Данное обстоятельство свидетельствует о возможности использования такого метода экстраполяции  $ID_{50}$ , в связи с чем с его помощью были определены прогнозные  $ID_{50}$  ВНО и ВОО для человека, которые составили одну и ту же величину: 1,0 (0,6...1,4) lg БОЕ и согласуется с результатами экспертной оценки других исследователей.

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

**Диссеминация вируса по органам и тканям сурков.** Учитывая то, что сурки по данным регистрации внешней клинической картины заболевания демонстрировали высокую чувствительность к ВОО при и/н инфицировании, сравнимую с таковой у человека, в дальнейшей работе мы использовали именно этот вид животных, в том числе для изучения динамики накопления данного возбудителя заболевания в его организме при и/н инфицировании для сравнения с таковой человека и существующих модельных видов животных.

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





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

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

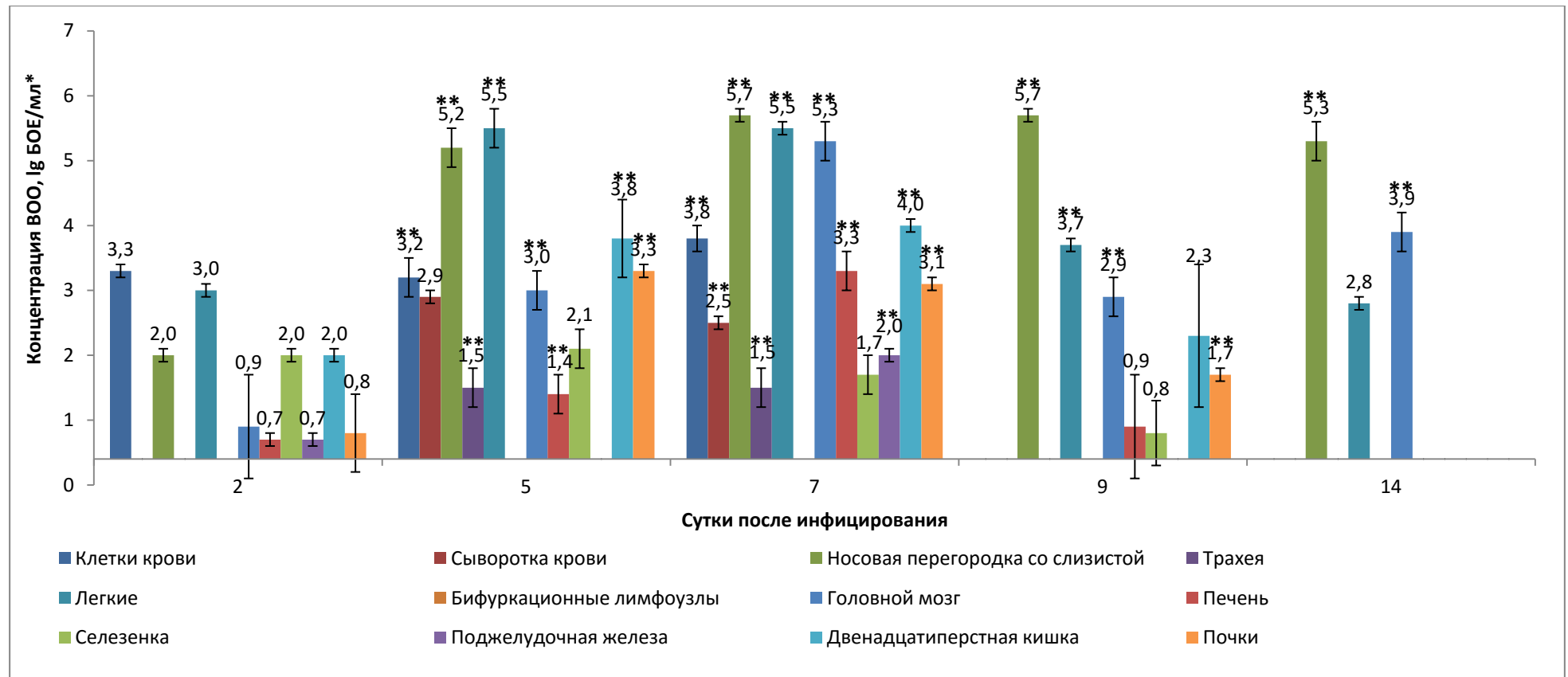
ID<sub>50</sub> – 50 %-я инфицирующая доза вируса, рассчитанная по наличию внешних клинических признаков заболевания у сурков  
Рисунок 5 – Данные по накоплению вируса оспы обезьян – ВОО (штамма V79-1-005) в биоматериалах от степных сурков, интраназально зараженных дозой 3,7 lg БОЕ (30 ID<sub>50</sub>)

Дополнительно провели изучение параметров накопления ВОО в тканях и органах некоторых сурков, погибших в эксперименте по п/к их заражению вирусом в дозах 7,1 lg БОЕ (3 животных) и 5,6 lg БОЕ (2 животных). При этом накопление патогена наблюдалось в разной степени почти во всех исследованных тканях и органах. Причем наиболее высокие концентрации этого вируса ( $\geq 5,7$  lg БОЕ/мл) были обнаружены в носу (носовая перегородка со слизистой), легких, трахее, почках, подмышечных и паховых лимфоузлах, яичниках или яичках и в фрагментах кожи с оспинами. Диапазон средних величин этого показателя (4,0–5,7 lg БОЕ/мл) отмечали у сурков в ряде случаев в головном мозге, брыжеечных и поднижнечелюстных лимфоузлах и поджелудочной железе, а самые низкие значения концентраций вируса ( $< 4,0$  lg БОЕ/мл) были зарегистрированы у данных животных в печени, селезенке и сердце.

Таким образом, данные изучения динамики накопления ВОО в органах и тканях сурков при инфицировании через дыхательный тракт (и/н) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID<sub>50</sub>) подтвердили в ряде случаев их подобие некоторым известным показателям инфекционного процесса у людей при натуральной оспе и оспе обезьян: накопление вируса в оспинах кожи (включая величину его концентрации), генерализация инфекции, низкая вероятность выявления вируса в крови в процессе титрования и накопление его в органах верхнего отдела дыхательного тракта. При этом наличие репродукции ВОО не только в респираторных органах сурков, но и в иных висцеральных органах соответствует таковой у модельных животных для оспы обезьян и человека. Определены органы первичного размножения ВОО (легкие с трахеей), основной механизм распространения вируса в организме сурков, в том числе из первичных органов-мишеней: лимфогенный с его репродукцией в лимфоидных органах. Показано, что органами наибольшего накопления патогена у и/н инфицированных животных этого вида, являются легкие, трахея, нос (носовая перегородка со слизистой), а так же кожа, где концентрация вируса в ряде случаев была выше 6 lg БОЕ/мл. Выраженная репродукция вируса отмечена у инфицированных животных в бифуркационных лимфоузлах и двенадцатиперстной кишке, достигающая титров 3–4 lg БОЕ/мл. У сурков, павших после п/к инфицирования дозами 5,6; 7,1 lg БОЕ, накопление вируса в наиболее высоких титрах ( $\geq 5,7$  lg БОЕ/мл) наблюдалось в носу (носовая перегородка со слизистой), легких, трахее, почках, подмышечных и паховых лимфоузлах, яичниках или яичках и в фрагментах кожных оспин. Средние величины этого показателя (4,0–5,7 lg БОЕ/мл) были отмечены в поджелудочной железе, головном мозге, брыжеечных и поднижнечелюстных лимфоузлах, а самые низкие ( $< 4,0$  lg БОЕ/мл) - в селезенке, сердце и печени.

**Диссеминация вируса в организме мышей.** Учитывая то, что мыши по данным регистрации ВОО в легких демонстрировали высокую чувствительность к этому патогену при и/н инфицировании, сравнимую с таковой у человека, в дальнейшую работу был взят именно этот вид животных, в том числе с целью изучения диссеминации в его организме возбудителя заболевания после и/н заражения для сравнения с человеком и существующими модельными животными.

Из данных рисунка 6 видно, что уже спустя 2 суток п.и. мышей ВОО обнаруживался в относительно высоких титрах сразу в нескольких тканях и органах: в клетках крови, носовой перегородке со слизистой, легких, селезенке и двенадцатиперстной кишке. Затем через 5 суток п.и. патоген был зарегистрирован в титрах 1,4–3,3 lg БОЕ/мл и во многих иных органах (трахее, головном мозге, почках и печени), а также в сыворотке крови. При этом величины концентрации патогена в носовой перегородке со слизистой и легких существенно превысили таковые других органов, тканей и сыворотки.



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

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

ID<sub>50</sub> – 50 %-я инфицирующая доза вируса, рассчитанная по его наличию в легких мышей через 7 суток после заражения

Рисунок 6 – Данные по накоплению вируса оспы обезьян - ВОО (штамм V79-1-005) в биоматериалах аутбредных мышей ICR, интраназально инфицированных с помощью дозы 3,8 lg БОЕ (25 ID<sub>50</sub>)

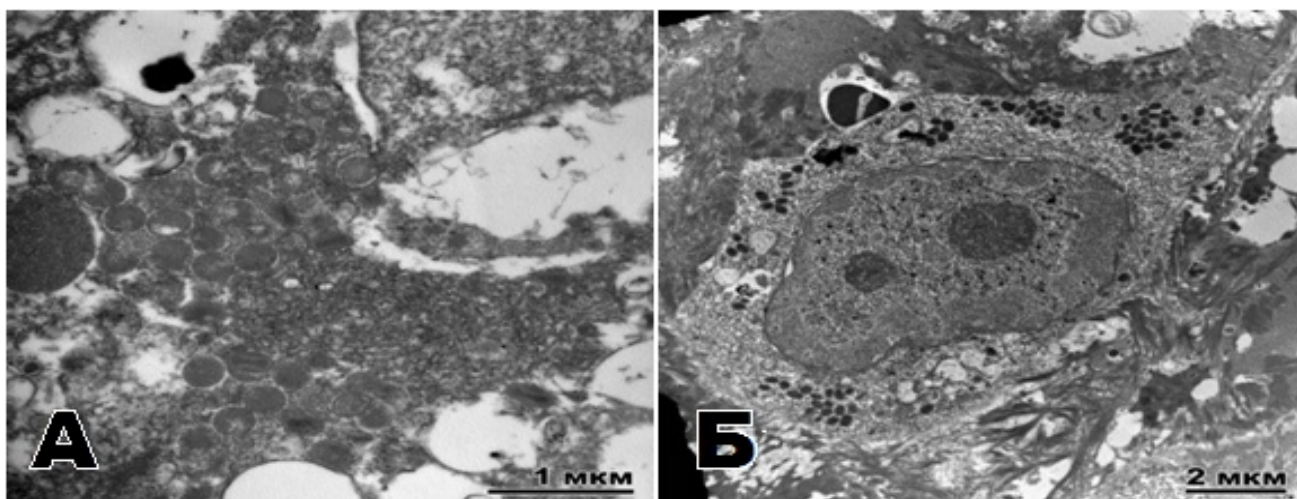
Через 7 суток п.и. ситуация практически не изменилась в сравнении с 5-ми сутками, если не брать в расчет резкое повышение концентрации вируса в печени (3,3 lg БОЕ/мл) и головном мозге (5,3 lg БОЕ/мл), а также его появление в поджелудочной железе. Спустя 9 суток п.и. концентрация вируса практически во всех органах, кроме носа (носовая перегородка со слизистой), резко уменьшилась вплоть до нерегистрируемых величин, а спустя 14 суток п.и. величина данного показателя была  $< 0,4$  lg БОЕ/мл у подавляющего большинства видов биоматериала, не считая головного мозга, носовой перегородки со слизистой и легких. Самые большие значения титров ВОО были выявлены в носу (носовая перегородка со слизистой), головном мозге и легких, причем данная картина в ряде случаев была зарегистрирована спустя 5, 7, 9 суток п.и. При этом во все сроки наблюдения (2–14 суток п.и.) вирус вообще не выявлялся в бифуркационных лимфоузлах.

Таким образом, результаты экспериментов по изучению динамики репродукции ВОО по тканям и органам мышей при заражении через дыхательный тракт (и/н) в дозе 3,8 lg БОЕ (25 ID<sub>50</sub>) подтвердили сходство в некоторых случаях с известными параметрами инфекционного процесса у людей при натуральной оспе и оспе обезьян: наличие генерализованной инфекции, а также накопление патогена в слизистой полости носа. Причем факты размножения ВОО не только в респираторных органах животных, но и в иных висцеральных согласуются с таковыми у модельных видов животных для оспы обезьян. Выявлен основной механизм диссеминации вируса от первичных органов-мишеней в организме мышей: гематогенный с размножением его в крови и/или в кровеносной системе. Отмечено, что органами максимальной репродукции ВОО у и/н инфицированных мышей являются нос, легкие и головной мозг, в которых в ряде случаев титры вируса превышали 5 lg БОЕ/мл. Выраженное накопление вируса (3–4 lg БОЕ/мл) у таких животных показано в печени, почках и двенадцатиперстной кишке.

#### **4.3 Патоморфологические изменения у степных сурков и аутбредных мышей ICR, зараженных возбудителем оспы обезьян**

У п/к или и/н зараженных сурков разными дозами ВОО (2,6–7,8 lg БОЕ) наиболее выраженные патологические изменения были локализованы не только в респираторных органах, но и в иных (кожа, селезенка, тимус, лимфоузлы и другие), коррелируя со степенью тяжести клинических проявлений (независимо от дозы заражения). У мышей, и/н зараженных ВОО дозами 5,0 lg БОЕ (400 ID<sub>50</sub>) и 3,8 lg БОЕ (25 ID<sub>50</sub>), наиболее выраженные патологические изменения были сосредоточены в основном в респираторном тракте. Как и у известных модельных видов животных для оспы обезьян, у сурков и мышей были отмечены подобные гистологические изменения воспалительно-некротического характера в тканях и органах с более часто встречающимися у сурков тромбозами кровеносных сосудов и кровоизлияниями.

У сурков и мышей, инфицированных ВОО, показан факт присутствия вируса и его размножения в традиционных для ортопоксвирусов первичных клетках-мишенях (макрофаги и эпителиоциты респираторных органов) – рисунок 7 (на примере сурка), а также в других типах клеток (эндотелиоциты, плазмоциты, фибробласты, ретикулярные и гладкомышечные клетки). Отмечено, что морфологические признаки репродукции вируса в чувствительных клетках животных этих видов соответствовали таковым для данного возбудителя заболевания, приведенным в научной литературе.



А- Альвеолярный макрофаг

Б - Бронхиальный эпителиоцит

Рисунок 7 – Первичные клетки-мишени легких (трансмиссивная электронная микроскопия) степного сурка после интраназального заражения вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) в дозе 3,7 lg БОЕ (30 ID<sub>50</sub>): вирусные частицы в цитоплазме

#### 4.4 Испытание модельных биосистем для оспы обезьян на основе степного сурка и аутбредной мыши ICR

Для проверки работоспособности модельных биосистем на основе аутбредной мыши ICR и степного сурка, и/н инфицированных ВОО, были проведены эксперименты по изучению противовирусного действия разрабатываемого в России химического соединения НИОХ-14 при сравнении с американским химиопрепаратом ST-246 (положительный контроль), который ранее уже продемонстрировал соответствующий защитный эффект, и российским химическим соединением НИОХ-32, имеющим низкую антиортопоксвирусную активность.

По данным таблицы 2 видно, что количество обработанных химическими соединениями ST-246 и НИОХ-14 мышей с отмеченным содержанием патогена в легких спустя 7 суток п.и. существенно ниже по сравнению с контролем (при  $p \leq 0,05$ ). Кроме того, было установлено, что химиопрепарат НИОХ-32 не отличался значимо по этому показателю от контроля. Причем использование в одинаковых дозах химических соединений ST-246 и НИОХ-14 не выявило достоверных различий между ними по эффективности защитного действия.

В дальнейшем с использованием ST-246 и НИОХ-14 были проведены аналогичные исследования на сурках (таблица 3).

Все сурки контрольной группы заболели, при этом у них отмечали внешние клинические признаки оспоподобной болезни через 9–12 суток п.и. В то же время у сурков опытных групп, обработанных химическими соединениями ST-246 и НИОХ-14, не было зарегистрировано каких-либо симптомов заболевания в течение всего периода наблюдения после и/н инфицирования ВОО. Это свидетельствовало о наличии достоверного лечебно-профилактического действия у испытанных химиопрепаратов. При этом использование химических соединений ST-246 и НИОХ-14 в аналогичных дозах не выявило значимых различий между ними по эффективности действия. С учетом исследований, проведенных в процессе разработки модельных биосистем «аутбредная мышь ICR –

штамм V79-1-005 ВОО» и «степной сурок - штамм V79-1-005 ВОО», и испытаний были определены пределы их практического применения.

Таблица 2 - Данные протективной активности химиопрепаратов в отношении вируса оспы обезьян (штамм V79-1-005) через 7 суток после интраназального инфицирования аутбредных мышей ICR в дозе 3,4 lg БОЕ (10 ID<sub>50</sub>)

Наименование показателей	Величина показателей для мышей, обработанных по схеме* химиопрепаратами:			
	ННХ-14	ННХ-32	ST-246	плацебо
Суточная доза химиопрепаратов, вводимых мышам	60 мкг/г	60 мкг/г	60 мкг/г	0,2 мл/мышь
Кол-во животных	6	6	6	6
Титр вируса в легких в lg БОЕ/легкие у каждой мыши спустя 7 суток после инфицирования (п.и.)	< 1,7	3,5	3,0	4,9
	< 1,7	4,9	< 1,7	4,9
	< 1,7	3,6	< 1,7	4,9
	< 1,7	4,9	< 1,7	4,9
	< 1,7	4,9	< 1,7	4,6
	< 1,7	4,9	< 1,7	4,9
Титр вируса в легких мышей в lg БОЕ/легкие, М (I <sub>95</sub> )	1,7 ** (1,7...1,7) (n=6)	4,5 (3,8...5,2) (n=6)	1,9 ** (1,3...2,5) (n=6)	4,9 (4,8...5,0) (n=6)
ИППВ в легких мышей в lg	3,2	0,4	3,0	Н.о.
Кол-во (%) мышей в вирусом в легких спустя 7 суток п.и.	0*** (0)	6 (100)	1*** (17)	6 (100)
КЗИ в %	100	0	83	Н.о.
<p>Примечания</p> <p>М – средняя величина</p> <p>I<sub>95</sub> - доверительный интервал для М с заданной вероятностью 95%</p> <p>&lt; 1,7 – значение, находящееся ниже порога чувствительности способа титрования (1,7 lg БОЕ/легкие), использовано в виде значения его самого при расчете М</p> <p>Н.о. – значение не определяется</p> <p>ИППВ - индекс подавления продукции вируса = lg титра вируса в легких животных в контроле - lg титра вируса в легких животных в опыте</p> <p>КЗИ - коэффициент защиты от инфицирования = 100% × (% животных в контроле с наличием вируса в легких – % опытных животных с наличием вируса в легких) / % животных в контроле с наличием вируса в легких</p> <p>Плацебо - раствор на основе метилцеллюлозы (0,75 %) и твина-80 (1 %), который брали для получения суспензий химиопрепаратов ST-246, ННХ-32 и ННХ-14</p> <p>* Химиопрепараты вводили за сутки до заражения, спустя 2 часа п.и. и далее ежедневно однократно в течение 6 суток п.и.</p> <p>** Значимое отличие от контроля, <math>p \leq 0,05</math> (при сравнении с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента с одинаковыми дисперсиями)</p> <p>*** Значимое отличие от контроля, <math>p \leq 0,05</math> (при сравнении с помощью двусторонних критерия <math>\chi^2</math> и точного теста Фишера)</p>				

Таблица 3 – Данные протективной активности препаратов при оспе обезьян у степных сурков после интраназального инфицирования вирусом оспы обезьян (штамм V79-1-005) дозой 3,7 lg БОЕ (30 ID<sub>50</sub>)

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

Таким образом, с использованием сурков, мышей и ВОО (штамм V79-1-005) на примере 3 химических соединений (ННХ-14, ННХ-32 и ST-246) продемонстрирована возможность выявления противовирусного действия, ранее отмеченного многими исследователями на иных модельных биосистемах. Это свидетельствует о перспективности применения биосистем «степной сурок - штамм V79-1-005 ВОО» и «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 ВОО» для изучения защитного действия химиопрепаратов от оспы обезьян.

## 5 Поиск модельной биосистемы для изучения защитной эффективности препаратов от гриппа птиц (А/Н5N1) у человека

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

**Прогнозная оценка 50%-й инфицирующей дозы вируса для человека по данным заражения его первичных клеток-мишеней.** Были проведены исследования по определению прогнозной величины показателя инфекционной активности штаммов A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 и A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1, непандемического штамма A/Novosibirsk/1/09 ВГ А/Н1N1 и адаптированного к мышам штамма A/Aichi/2/68 ВГ А/Н3N2 для человека. При этом были использованы результаты, по-

лученные на первичных клетках-мишенях (СПККЛ) человека для ВГ с учетом известных данных для штамма A/Aichi/2/68 ВГ А/Н3N2 в отношении мышей:  $CI_{50}$  для СПККЛ и  $ID_{50}$  для самих животных (Жуков, 2011).

В экспериментах *in vitro* с использованием первичной культуры клеток легких человека были зарегистрированы факты размножения в/пат ВГП А/Н5N1 (штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005), сезонного ВГ А/Н1N1 (штамм A/Novosibirsk/1/2009) и адаптированного к мышам ВГ А/Н3N2 (штамм A/Aichi/2/68). С учетом данных по  $CI_{50}$  ВГ, полученных в экспериментах на СПККЛ людей, а также известных из научной литературы значений  $CI_{50}$  и  $ID_{50}$ , полученных на мышью СПККЛ и при аэрозольном заражении мышей соответственно, определены прогнозные величины чувствительности людей к четырем штаммам ВГ (таблица 4).

Таблица 4 – Прогнозные данные по инфекционности четырех штаммов вируса гриппа (ВГ) в отношении людей

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

**Оценка 50 %-х инфицирующих доз вируса для подопытных животных при респираторном заражении.** С целью выбора штамма в/пат ВГП А/Н5N1 для дальнейших исследований был проведен скрининг по вирулентности в отношении кур генетической линии Род-Айленд восьми штаммов в/пат ВГП А/Н5N1, которые были изолированы в нашей стране во время эпизоотии среди домашней птицы в 2005 г.

На первом этапе были проведены сравнительные исследования чувствительности кур к различным штаммам в/пат ВГП А/Н5N1 при и/н и аэрогенном заражении, создавая аэрозоль с медианно-массовым аэродинамическим диаметром частиц 1,1 мкм. При этом было отмечено, что через 3–5 суток п.и. у части животных появлялись общеизвестные клинические признаки заболевания и летальный эффект. Показатели  $LD_{50}$  для исследованных нами штаммов, полученные при аэрозольном инфицировании кур, достоверно не различались и находились в пределе от 0,3 до 1,2 lg ЭИД<sub>50</sub>. Не было отмечено так же значимых различий между данными штаммами по значениям  $LD_{50}$ , полученным при и/н



заражении кур,  $p \leq 0,05$ . В то же время чувствительность этой птицы ко всем испытанным штаммам вируса при аэрозольном инфицировании была существенно выше, чем таковая при и/н. При этом различия между величинами  $LD_{50}$ , полученными при этих способах введения вирусного материала, составляли 1,3–2,5 lg.

В дальнейшем было проведено в трех повторах сравнительное определение величин  $LD_{50}$  в/пат ВГП А/Н5N1 (на примере штамма A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) при инфицировании кур пятью различными способами: внутривенный, и/н, аэрозольный, оральный и интрагастральный (таблица 5). Через 1–5 суток п.и. у животных появлялись клинические признаки заболевания и летальный эффект. Причем вирус проявлял существенно большую вирулентность для кур при его введении внутривенным способом по сравнению со всеми остальными. В то же время инфицирование кур через респираторный тракт (аэрозольным и и/н способами) было существенно эффективнее, чем оральным (в  $\sim 1000$  и  $\sim 15$  соответственно) и интрагастральным (в  $\sim 15000$  и  $\sim 300$  соответственно),  $p \leq 0,05$ .

Таблица 5 – Данные по вирулентности штамма A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 при разных способах заражения кур генетической линии Род-Айленд

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

Результаты экспериментов на курах свидетельствуют об одинаково высокой вирулентности к ним всех исследованных штаммов в/пат ВГП А/Н5N1, что не дает возможности выбрать из них наиболее вирулентный. В дальнейшем были проведены исследования на мышах по оценке их чувствительности к 8 штаммам этого вируса при и/н и аэрозольном заражении. По величинам  $LD_{50}$  для этих животных все исследованные штаммы были разделены на 3 группы (таблица 6).

Таким образом, все изученные штаммы в/пат ВГП А/Н5N1, выделенные от птицы на территории России, проявляют высокую достоверно не различающуюся между собой вирулентность для кур генетической линии Род-Айленд:  $LD_{50}$  от 0,3 до 1,2 lg ЭИД<sub>50</sub> при аэрозольном заражении и от 2,2 до 3,1 lg ЭИД<sub>50</sub> при и/н. При аэрозольном заражении чувствительность этих животных к в/пат ВГП (штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) в  $\sim 30$  раз выше, чем при и/н, в  $\sim 500$  раз выше, чем при оральном, и в  $\sim 10000$  раз выше, чем при интрагастральном, что свидетельствует о более высокой восприимчивости к данному патогену респираторных органов кур по сравнению с их желудочно-кишечным

трактом. Все исследованные штаммы в/пат ВГП А/Н5N1 по летальной активности для мышей при и/н (в некоторых случаях и аэрозольном) заражении могут быть разделены на три группы: высоковирулентные, средней степени вирулентности и авирулентные.

Таблица 6 – Данные по групповой принадлежности российских штаммов высокопатогенного вируса гриппа птиц (в/пат ВГП) А/Н5N1 в зависимости от их вирулентности для аутбредных мышей ICR при интраназальном и аэрозольном инфицировании

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

Основываясь на данных оценки LD<sub>50</sub> различных штаммов в/пат ВГП А/Н5N1, полученных при и/н заражении мышей, для дальнейших исследований с использованием этого вида животных нами был выбран российский штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 этого вируса, обладающий наиболее высокой летальной активностью и относящийся к группе высоковирулентных штаммов.

## 5.2 Диссеминация высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5N1 в организме кур генетической линии Род-Айланд и аутбредных мышей ICR

**Распространение вируса в организме кур.** Было проведено изучение динамики накопления в/пат ВГП А/Н5N1 в организме кур с использованием штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005. Отмечено, что первичной тканью-мишенью для размножения в/пат ВГП в организме и/н зараженных кур являлась слизистая носовой полости, где возбудитель заболевания появился через 18 часов п.и. и достигал максимальной концентрации к 54 часам п.и. (5,8 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл). Позднее (через 30 часов п.и.) патоген начинал регистрироваться в легких, клоаке и сыворотке крови, размножившись к 54 часам п.и. до высоких концентраций. Причем в легких в этот период наблюдалось самое высокое накопление вируса (7,8 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл) по сравнению с таковым во многих других органах кур. Затем (через 42 часа п.и.) в/пат ВГП обнаруживался практически во всех остальных изучаемых органах и тканях (кроме поджелудочной железы). При этом самых высоких концентраций вирус достигал в почках, кишечнике, печени, селезенке, головном мозге, желудке, поперечнополосатой мышечной ткани, трахее и пищеводе) также к 54 часам п.и. В момент времени максимального накопления вируса по всем изучаемым органам и тканям выделялись три биологические пробы (легкие, почки и сыворотка крови), в которых уровни концентрации патогена превосходили 7,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл.

Таким образом, первичная ткань-мишень для размножения в/пат ВГП А/Н5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) у кур, и/н инфицированных дозой 3,2 lg ЭИД<sub>50</sub> (10

LD<sub>50</sub>), находится в респираторном тракте животных (слизистая носовой полости), репликация вируса в которой регистрировалась уже через 18 часов п.и. Вторая волна накопления патогена наблюдалась во многих органах и сыворотке крови кур и начиналась через 30–42 часа п.и. К моменту гибели животных (54 часа п.и.) концентрация вируса во всех исследованных пробах достигала максимальных значений. При этом наивысшие величины накопления вируса, превышающие 6 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл, были отмечены в легких, сыворотке крови, клоаке, почках и кишечнике животных.

**Распространение вируса в организме мышей.** Было проведено изучение динамики накопления в организме мышей высоковирулентного для них штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 (таблица 7).

Из данных таблицы видно, что через 1 сутки п.и. вирус появился сразу в двух органах респираторного тракта (легкие и трахея), а также в почках и в сыворотке крови мышей. При этом в легких концентрация этого патогена была существенно выше (на  $\geq 2,7$  lg), чем таковые в других органах. Только спустя 2 суток п.и. вирус стали дополнительно регистрировать и в верхнем отделе дыхательного тракта (в слизистой носа), а также в головном мозге и печени. Через 3–4 суток п.и. накопление вируса наблюдали во всех исследованных органах. Наиболее высокие концентрации патогена, превышающие 5 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл, были определены в легких, трахее, головном мозге, почках и сыворотке крови мышей. Высокий уровень накопления вируса (4 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл) был зарегистрирован также в селезенке.

Таблица 7 – Данные по накоплению высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) в биоматериалах\*\* от аутбредных мышей ICR, интраназально зараженных дозой 2,1 lg ЭИД<sub>50</sub> (10 LD<sub>50</sub>)

Вид биоматериала от мышей	Концентрация ВГП в lg ЭИД <sub>50</sub> /мл, М (I <sub>95</sub> ) для n=3, в биоматериалах от мышей через разное время после инфицирования:					
	1 сутки	2 суток	3 суток	4 суток	5 суток	6 суток
Сыворотка крови	3,0 (2,3...3,7)	3,5 (2,8...4,2)	4,5 (3,8...5,2)	5,3 * (4,8...5,8)	4,3 (3,5...5,1)	4,7 (3,8...5,6)
Легкие	5,7 (5,2...6,2)	6,2 (5,6...6,8)	6,9 (6,1...7,7)	7,0 (7,0...7,0)*	7,4 * (6,9...7,9)	5,1 (4,3...5,9)
Носовая перегородка со слизистой	< 0,2	2,3 (1,7...2,8)	2,0 (1,4...2,6)	1,8 (1,3...2,3)	2,8 (2,3...3,3)	3,0 (2,3...3,7)
Трахея	2,3 (1,8...2,8)	4,8 (4,3...5,3)	6,5 * (6,5...6,5)	5,8 * (5,2...6,4)	6,0 * (5,4...6,6)	4,8 (4,0...5,6)
Головной мозг	< 0,2	1,5 (0,7...2,3)	1,7 (0,9...2,5)	3,0 (2,3...3,7)	6,0 * (5,3...6,7)	5,7 * (4,9...6,5)
Селезенка	< 0,2	< 0,2	4,0 (4,0...4,0)	3,8 (3,3...4,3)	3,5 (2,9...4,1)	3,5 (2,9...4,1)
Мочевой пузырь	< 0,2	< 0,2	3,0 (2,3...3,7)	3,0 (2,3...3,7)	2,5 (1,8...3,2)	2,3 (1,8...2,8)
Почки	2,2 (1,5...2,9)	1,9 (1,4...2,4)	3,0 (2,5...3,5)	3,2 (2,6...3,8)	3,9 (3,4...4,4)	5,2 * (4,6...5,8)
Поперечно-полосатая мышеч. ткань	< 0,2	< 0,2	< 0,2	3,2 (2,6...3,8)	3,0 (2,3...3,7)	< 0,2

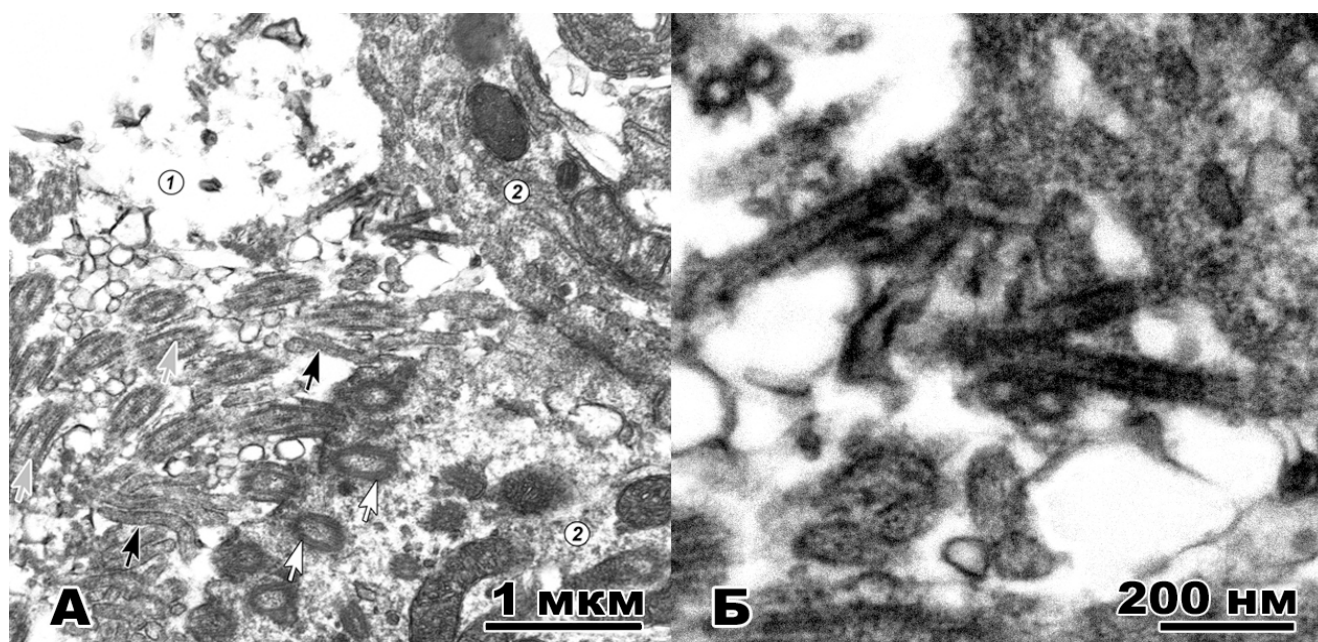
Продолжение таблицы 7

Вид биоматериала от мышей	Концентрация ВГП в lg ЭИД <sub>50</sub> /мл, М (I <sub>95</sub> ) для n=3, в биоматериалах от мышей через разное время после инфицирования:					
	1 сутки	2 суток	3 суток	4 суток	5 суток	6 суток
Печень	< 0,2	2,3 (1,8...2,8)	2,6 (2,0...3,2)	2,6 (1,7...3,5)	2,3 (1,8...2,8)	2,3 (1,8...2,8)
<p>Примечания</p> <p>М – средняя величина</p> <p>n – количество животных, использованных в временной точке</p> <p>I<sub>95</sub> - доверительный интервал М с заданной вероятностью 95 %</p> <p>LD<sub>50</sub> – 50 %-я летальная доза для мышей</p> <p>&lt; 0,2 - значение ниже порога чувствительности (0,2 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл) примененного метода титрования</p> <p>* Значение выше такового соответствующего биоматериала спустя 2 или 3 суток после заражения, <math>p \leq 0,05</math> (при сравнении с помощью по двусторонних t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни)</p> <p>** Ткани и органы в составе гомогенатов (10 %-е по объему) и сыворотка крови</p>						

Таким образом, у мышей, и/н зараженных штаммом A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 (10 LD<sub>50</sub>), наблюдался генерализованный инфекционный процесс. При этом у них первичные органы-мишени дыхательного тракта для в/пат ВГП А/Н5N1, как и у людей, располагались в нижнем его отделе (легкие и трахея), где вирус появлялся спустя 24 часа п.и. Распространение патогена из первичных органов-мишеней происходило у мышей, как и у человека, в основном гематогенным путем, при этом его концентрация в крови достигала 4,1–5,6 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. Тканями и органами максимального накопления вируса (> 5 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл) у этих животных являлись легкие и трахея. Отмечена аккумуляция патогена и во всех исследованных экстрареспиаторных органах и тканях мышей: головной мозг, слизистая носа, почки, селезенка, печень, мочевой пузырь и поперечнополосатая мышечная ткань, что в ряде случаев воспроизводило ситуацию, наблюдаемую у людей, инфицированных в/пат ВГП А/Н5N1.

### **5.3 Патоморфологические изменения у аутбредных мышей ICR, инфицированных высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н5N1**

Проведенные с использованием методов световой и электронной микроскопии исследования органов и тканей мышей, и/н зараженных штаммом A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 в дозе 2,1 lg ЭИД<sub>50</sub> (10 LD<sub>50</sub>), продемонстрировали усиливающиеся со временем воспалительно-некротические изменения в легких этих животных начиная с ранней стадии инфекции (через 1 сутки п.и.), захватывающие на поздней ее стадии не только бронхиальную, но и альвеолярную часть ткани этого органа, и дополнительно (через 4–6 суток п.и. и позднее) кровоизлияния и тромбоз его кровеносных сосудов. При этом были обнаружены признаки размножения вируса в эпителиоцитах бронхов (реснитчатая клетка): специфические структуры в ядре и цитоплазме клетки, а также отпочковывающиеся от нее частицы вируса (рисунок 8). Нарастающие повреждения воспалительно-некротического характера были продемонстрированы в трахее и носовой полости этих животных, начиная со 2 и 3-х суток п.и. соответственно.



А – апикальная часть реснитчатой клетки (2), реснички (показаны серыми стрелками) с базальными тельцами (показаны белыми стрелками) и микроворсинки (показаны черными стрелками) которой в просвете бронха (1)

Б – нитевидные вирусные частицы в стадии почкования из реснитчатой клетки (увеличение части рисунка А)

Рисунок 8 - Слизистая стенки бронха (трансмиссивная электронная микроскопия) аутбредной мыши ICR через 1 сутки после интраназального инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) в дозе 2,1 lg ЭИД<sub>50</sub> (10 LD<sub>50</sub>)

Через 4–6 суток п.и. и до момента гибели мышей наблюдались патоморфологические изменения и в некоторых экстрареспирационных органах мышей (головной мозг, почки и селезенка), напоминающие таковые, включая геморагии, в легких. В общем виде патологические изменения в тканях и органах мышей, включая выявленный факт репродукции вируса в эпителиоцитах бронхов, были сходными с таковыми, описанными другими учеными у людей и линейных мышей BALB/c, зараженных в/пат ВГП А/Н5N1.

#### 5.4 Испытание модельной биосистемы для гриппа птиц А/Н5N1 на основе аутбредной мыши ICR

С целью проверки работоспособности модельной биосистемы «аутбредная мышь ICR – штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1» были выполнены соответствующие исследования противовирусной активности имеющихся в России и за рубежом препаратов Реаферон ЕС-липинт® и Тамифлю® (Озельтамивир) соответственно, ранее уже продемонстрировавших противогриппозный эффект на других модельных биосистемах.

По данным таблицы 8 видно, что количество мышей, обработанных по профилактической схеме препаратом Реаферон-ЕС-липинт®, но погибших от гриппа птиц А/Н5N1, было существенно меньше по сравнению с контролем ( $p \leq 0,05$ ) и не отличалось по этому показателю от групп животных, обработанных Тамифлю® по лечебно-профилактической или лечебной схеме.

Таблица 8 – Данные по защитной активности препаратов, перорально вводимых аутбредным мышам ICR, интраназально инфицированным штаммом A/Chicken/Kurgan/05/2005 высокопатогенного вируса гриппа птиц A/H5N1 10 LD<sub>50</sub>

Наименование препаратов	Суточная доза препаратов для мышей	Проверяемый вид защитного действия	Кол-во животных (n)	СПЖ в сутках, М (I <sub>95</sub> ),	Процент выживших животных	Уровень значимости для выживаемости (p и pY)	КЗГ в %
Реаферон-ЕС-липид®	1000 ед./г	Профилактический*	20	12,3***** (10,6...14,0)	45*****	p = 0,013 pY = 0,034	39
	1000 ед./г	Лечебно-профилактический**	20	10,9 (9,2...12,6)	30	p = 0,113 pY = 0,236	22
	1000 ед./г	Лечебный***	20	9,1 (7,9...10,3)	10	p = 1,0 pY = 0,59	0
Тамифлю®	10 мкг/г	Лечебно-профилактический**	20	13,4***** (11,6...15,1)	65*****	p = 0,001 pY=0,000	61
	10 мкг/г	Лечебный***	20	13,6 ***** (11,9...15,2)	65*****	p = 0,001 pY=0,000	61
Плацебо (контроль)	0,2 мл/мышь	Лечебно-профилактический**	20	9,1 (7,8...10,3)	10	Н.о.	Н.о.

Примечания

М – средняя величина

I<sub>95</sub> - доверительный интервал М с заданной вероятностью 95 %

LD<sub>50</sub> – 50 %-я летальная доза для мышей

Плацебо – дистиллированная вода

\* Мышам перорально вводили Реаферон-ЕС-липид® 2 раза в сутки за 4–1 сутки и за 1 час до заражения (д.з.)

\*\* Мышам перорально вводили: Реаферон-ЕС-липид® 2 раза в сутки в день заражения и в течение 6 суток после инфицирования (п.и.); Тамифлю® за 1 час д.з., через 4 часа п.и., далее 2 раза в сутки в течение 6 суток; плацебо 2 раза в сутки за 4...0 суток д.з. и 1–10 суток п.и.

\*\*\* Мышам перорально вводили: Реаферон-ЕС-липид® 2 раза в сутки через 3–9 суток п.и.; Тамифлю® через 4 часа п.и., далее 2 раза в сутки в течение 4 суток

\*\*\*\* Величина выше, чем в контроле,  $p \leq 0,05$  (при сравнении с помощью критерия  $\chi^2$ , точного теста Фишера и для СПЖ U-критерия Манна-Уитни)

СПЖ – средняя продолжительность жизни животных с учетом их числа, проживших определенное количество дней п.и. до специфичной гибели, и числа выживших животных (за максимальное значение продолжительности жизни для выживших животных принимали 16 суток, т.е. следующий день после прекращения гибели инфицированных мышей)

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

p – уровень значимости при сравнении относительных частот (погибшие, выжившие животные)

pY – уровень значимости при сравнении относительных частот с поправкой Йетса

Н.о. – величину не определяют

При этом коэффициент защиты от гибели мышей для препарата Реаферон-ЕС-липид® составил 39 %. В то же время не было отмечено защитного эффекта от гибели инфицированных в/пат ВГП А/Н5N1 мышей, которым вводили Реаферон-ЕС-липид® по лечебно-профилактической или лечебной схеме. Средняя продолжительность жизни мышей в опытных группах животных, инфицированных в/пат ВГП А/Н5N1 и обработанных препаратом Реаферон-ЕС-липид® по профилактической схеме или Тамифлю® по лечебно-профилактической и лечебной схемам, существенно превышало таковую у группы контроля ( $p \leq 0,05$ ). С учетом исследований, проведенных в процессе разработки модельной биосистемы «аутбредная мышь ICR –штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1», и испытаний были определены пределы ее практического применения.

Таким образом, с использованием биосистемы «аутбредная мышь ICR – штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1» на примере двух противогриппозных препаратов (Тамифлю® и Реаферон-ЕС-липид®) подтверждено наличие у них защитного эффекта от гриппа птиц (А/Н5N1), ранее описанного многими исследователями на иных модельных биосистемах, что открывает перспективу ее дальнейшего применения. В экспериментах с помощью данной биосистемы отмечена выраженная профилактическая активность российского препарата Реаферон ЕС-липид®, ранее применяемого только при сезонном гриппе.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам выполненных исследований сделаны следующие выводы.

1 На основе структурированной методологии поиска модельных животных для вирусных инфекций, учитывающей не только воспроизведение клинических признаков, но и другие, в том числе начальные стадии инфекционного процесса, созданы три модельные биосистемы: «степной сурок - штамм V79-1-005 вируса оспы обезьян», «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 вируса оспы обезьян» и «аутбредная мышь ICR – штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005 высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5N1» для оценки защитной эффективности препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) у человека.

2 При интраназальном инфицировании степных сурков вирусом оспы обезьян (центральноафриканский штамм V79-1-005) в дозах от 2,2 lg БОЕ и выше развивалось оспоподобное заболевание с соответствующими внешними клиническими проявлениями, в частности, наблюдали гипертермию тела, дискретную сыпь на слизистых оболочках и видимой поверхности кожи, подчелюстной одно- или двусторонний лимфаденит, гнойно-серозный блефарит, конъюнктивит и ринит, нарушение координации движения, тремор конечностей, взъерошенность шерсти и повышенная агрессивность. При этом доля заболевших животных зависела от инфицирующей дозы патогена, тогда как по проценту гибели зараженных животных зависимости «доза-эффект» не было. После подкожного заражения сурков вирусом в исследованных дозах наблюдались такие же, как и после интраназального заражения, клинические признаки оспоподобного заболевания и гибель 100 % инфицированных животных.

3 У степных сурков, интраназально зараженных вирусом оспы обезьян, органами первичной репродукции вируса были трахея, легкие и бифуркационные лимфоузлы. В данной модельной биосистеме распространение патогена в организме животных от первичных к вторичным органам-мишеням происходило лимфогенным путем с размножением в лимфатических органах. При этом максимальное накопление вируса наблюдалось в легких, трахее, носу и коже зараженных животных. У сурков, погибших после



подкожного инфицирования вирусом оспы обезьян, его обнаруживали в наиболее высоких титрах в легких, носу, трахее, почках, подмышечных и паховых лимфоузлах, яичниках или яичках и кожных кусочках с оспинами, в умеренных – в головном мозге, брыжеечных и поднижнечелюстных лимфоузлах и поджелудочной железе, а в самых низких – в селезенке, сердце и печени.

4 Клиническая картина заболевания у аутбредных мышей ICR наблюдалась при интраназальном инфицировании вирусом оспы обезьян в максимальных дозах (5,0 и 5,5 lg БОЕ) и сопровождалась скудной симптоматикой (гнойный блефарит, конъюнктивит и взъерошенность шерсти) без летального исхода. Вместе с тем по наличию вируса в легких через 7 суток после заражения мышей была определена 50 %-я инфицирующая доза патогена для данной модельной биосистемы, находящаяся в диапазоне 2,0–2,8 lg БОЕ.

5 У аутбредных мышей ICR, интраназально зараженных возбудителем оспы обезьян, наблюдалась генерализованная инфекция с гематогенным механизмом диссеминации вируса, включая его размножение в крови. Органами максимальной репродукции патогена у животных этого вида являлись легкие, нос и головной мозг, умеренно выраженная репродукция вируса обнаружена в печени, двенадцатиперстной кишке и почках.

6 У степных сурков и аутбредных мышей ICR, интраназально инфицированных вирусом оспы обезьян, его размножение наблюдалось в известных для ортопоксвирусов первичных клетках-мишенях (эпителиоциты и мононуклеарные фагоциты респираторных органов), а также в других клетках (эндотелиоциты, плазмоциты, фибробласты, ретикулярные и гладкомышечные клетки). У заболевших и погибших сурков после подкожного и интраназального заражения вирусом выявлены выраженные воспалительно-некротические повреждения, характерные для ортопоксвирусных инфекций, в респираторных органах, коже, селезенке, почках, лимфоузлах и тимусе. У интраназально инфицированных вирусом мышей патологические изменения были такими же, но ограничены в основном респираторными органами.

7 Восемь исследованных штаммов высокопатогенного вируса гриппа птиц A/H5N1 по летальному эффекту при интраназальном заражении аутбредных мышей ICR разделились на три группы: высоковирулентная ( $LD_{50} < 3,0 \text{ lg ЭИД}_{50}$ ) - A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Chicken/Crimea/04/2005, A/Chicken/Omsk/2006, A/Chicken/Krasnodar/02/2006, A/Chicken/Dagestan/2006; умеренно вирулентная ( $LD_{50} = 3,0\text{--}4,5 \text{ lg ЭИД}_{50}$ ) - A/Duck/Kurgan/08/2005; авирулентная ( $LD_{50} > 4,5 \text{ lg ЭИД}_{50}$ ) - A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005. В то же время все эти штаммы проявляли высокую вирулентность при аэрозольном и интраназальном заражении кур генетической линии Род-Айланд. Чувствительность кур к штамму A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005, судя по  $LD_{50}$ , при аэрозольном инфицировании была выше в 30 раз, чем при интраназальном, в 500 раз, чем при оральном, и в 10000 раз, чем при интрагастральном.

8 У аутбредных мышей ICR, интраназально зараженных штаммами высокопатогенного вируса гриппа птиц A/H5N1 A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Duck/Kurgan/08/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в дозах 10  $LD_{50}$  или 10  $ID_{50}$ , органами его первичного размножения и максимальной репродукции являлись легкие и трахея. Накопление патогена отмечено и в других органах и тканях мышей: головной мозг, слизистая носа, почки, селезенка, печень, мочевого пузырь и поперечнополосатая мышечная ткань. При этом распространение патогена от первичных к вторичным органам-мишеням мышей происходило гематогенным путем. У кур, интраназально инфицированных штаммами высокопатогенного вируса гриппа птиц A/H5N1 A/Chicken/Kurgan/05/2005 и

A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в дозах 3 и 10 LD<sub>50</sub>, органом его первичной репродукции являлся нос. Кроме того, накопление вируса наблюдали во многих других органах и в сыворотке крови кур, что свидетельствует о гематогенном пути его диссеминации. При этом наиболее высокие концентрации вируса, отмечены в легких, сыворотке крови, клоаке, почках и кишечнике.

9 У мышей, интраназально инфицированных штаммом высокопатогенного вируса гриппа птиц A/H5N1 A/Chicken/Kurgan/05/2005, отмечено его размножение в традиционных для этого патогена первичных клетках-мишенях (эпителиоциты респираторных органов). При этом, как и у человека, в трахее и слизистой носа мышей наблюдали воспалительно-некротические изменения, а в легких, головной мозге, почках и селезенке дополнительно регистрировали кровоизлияния и тромбоз кровеносных капилляров.

10 На модельных биосистемах «степной сурок - штамм V79-1-005 вируса оспы обезьян», «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 вируса оспы обезьян» при пероральном применении химически синтезированных соединений НИОХ-14 и ST-246 показано наличие у них антиортопоксвирусной активности, ранее описанной другими исследователями, что доказывает возможность использования данных модельных биосистем для изучения защитного действия препаратов от оспы обезьян. При использовании модельной биосистемы «аутбредная мышь ICR – штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 высокопатогенного вируса гриппа A/H5N1» и препаратов Тамифлю и Реаферон-ЕС-липид показано их противовирусное действие, ранее зарегистрированное в других исследованиях, что является доказательством правомерности применения данной модельной биосистемы для изучения эффективности противогриппозных препаратов.

Методология создания модельных биосистем для вирусных инфекций, учитывающая не только воспроизведение клинических признаков, но и другие, в том числе начальные стадии инфекционного процесса, рекомендуется для разработки таких инструментов не только для оспы обезьян и гриппа птиц (A/H5N1), но и иных инфекций. По завершении создания модельных биосистем «аутбредная мышь ICR – штамм V79-1-005 ВОО», «степной сурок - штамм V79-1-005 ВОО» и «аутбредная мышь ICR – штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП A/H5N1» были подготовлены соответствующие МР (4.2.001-16, 4.2.002-16, 4.2.004-16 ГНЦ ВБ «Вектор»), которые рекомендуются для изучения защитной активности разрабатываемых препаратов от оспы обезьян и гриппа птиц (A/H5N1). Ранее существующий подход прогнозной оценки величины ID<sub>50</sub> вируса, основанный на применении первичных клеточных культур животных и человека и продемонстрировавший при его использовании адекватность результатов таковым, полученным в прямых экспериментах на животных, может быть взят для исследования чувствительности разных млекопитающих к патогенным ортопоксвирусам и в/пат ВГП A/H5N1. Прогнозные величины ID<sub>50</sub> ВНО, ВОО и в/пат ВГП A/H5N1 для людей, определенные на основе экспериментов (in vitro), могут быть полезными при поиске модельных биосистем не только для изучения защитной эффективности препаратов от соответствующих инфекций, но и для оценки показателей их патогенеза и контагиозности. Методология подготовки фрагментов органов и тканей от животных, инфицированных возбудителями особо опасных инфекций, для проведения патоморфологического изучения была представлена в МУ 1.3.3103-13 Роспотребнадзора и должна использоваться в организациях России, проводящих работы с такими патогенами. Методология забора и приготовления биологических образцов от людей, инфицированных в/пат ВГ типа А, для вирусологических исследований была изложена нами в МУ Роспотребнадзора от

01.05.2009 г. №01/5963-9-23 и от 24.05.2009 г. №01/7161-9-34 и должна применяться в организациях, работающих с данным вирусом.

Перспективы дальнейшей разработки темы данной диссертации связаны с возможностью создания новых модельных биосистем на основе предложенной методологии и усовершенствования уже созданных за счет введения в их состав новых актуальных для России высоковирулентных в отношении человека штаммов ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1, которые могут быть выделены в будущем.

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

1 Вакциноуправляемые респираторные вирусные инфекции. Грипп, корь, эпидемический паротит, краснуха/ А.П. Агафонов, О.А. Агафонова, М.Ш. Азаев [и др.]; под ред. И.Г. Дроздова. - Новосибирск: Изд-во Типография № 1, 2008. – 210 с.

2 Валидация модифицированного алгоритма прогнозирования восприимчивости хозяина к вирусам с учетом параметров восприимчивости первичных культур клеток-мишеней и факторов врожденного иммунитета/ В.А. Жуков, Л.Н. Шишкина, А.С. Сафатов [и др.]// Вестник РАМН. – 2010. - №5. – С. 24-29.

3 Вирус гриппа А (H5N1): атлас патологических изменений внутренних органов домашней птицы / Г.Г. Онищенко, Е.М. Малкова, О.С. Таранов [и др.]; под ред. Г.Г.Онищенко, И.Г.Дроздова. - Новосибирск: Информ-Экспресс, 2009. - 240 с.

4 Диссеминация вируса гриппа птиц А/Н5N1 при интраназальном инфицировании кур/ О.К. Демина, А.А. Сергеев, О.В. Пьянков [и др.]// Пробл. особо опасных инф. – 2012. - №112. – С. 65-69.

5 Изучение возможности прогнозирования чувствительности к гриппу различных отделов респираторного тракта хозяина/ В.А. Жуков, Л.Н.Шишкина, А.А. Сергеев [и др.]// Вестник РАМН. – 2007. - №5. – С. 32-37.

6 Изучение восприимчивости клеток-мишеней и активности фагоцитов легких при снижении резистентности мышей к вирусу гриппа на фоне глюкокортикоидной иммуносупрессии/ М.А. Сметанникова, Л.Н. Шишкина, В.А. Жуков [и др.]// Вестник РАМН. – 2007. - №1. – С. 3-8.

7 Изучение противовирусной активности химически синтезированных соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах *in vitro*/ А.С. Кабанов, А.А. Сергеев, Л.Е. Булычев [и др.]// Пробл. особо опасных инфекций. – 2013. - №2. – С. 54-59.

8 Изучение эффективности анаферона детского у мышей, инфицированных пандемическим вирусом гриппа А (H1N1/09)v/ Л.Н. Шишкина, М.О. Скарнович, А.С. Кабанов [и др.]// ЖМЭИ. – 2011. - №1. – С. 83-86.

9 Изучение эффективности Ингавирина *in vivo* в отношении штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1/09)v/ Л.Н. Шишкина, В.Е. Небользин, М.О. Скарнович [и др.]//Антибиотики и химиотерапия. – 2010. - №55(5/6). – С. 32-35.

10 Изучение эффективности химических синтезированных соединений против ортопоксвирусов/ Л.Е. Булычев, А.А. Сергеев, А.С. Кабанов [и др.]// Дальневост. журнал инфек. пат. – 2012. - №20. – С. 102-105.

11 Инфекционные свойства штаммов вируса гриппа птиц А/Н5N1 в экспериментах на мышах/ А.А. Сергеев, О.В. Пьянков, О.К. Демина [и др.]// Пробл. особо опасных инф. – 2011. - №3(109). – С. 40-43.

12 Использование мыши в качестве модельного животного для оценки эффективности лечебно-профилактического действия препаратов против оспы обезьян/ А.А. Сер-

геев, А.С. Кабанов, Л.Е. Булычев [и др.]// Пробл. особо опасных инфекций. – 2013. - №2. – С. 60-65.

13 Лечебно-профилактическое средство против вируса натуральной оспы и способы его получения и применения: пат. 2543338 Рос. Федерация: МПК А61Р 31/12 А61К 31/16 / Л.Н. Шишкина, А.Н. Сергеев, А.П. Агафонов [и др.]; заявитель и патентообладатель Гос. научн. центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - № 2013146046/15; заявл. 15.10.13; опубл. 27.02.2015; бюл. №6. – 15 с: ил.

14 Особенности поражения легких при интраназальном заражении мышей штаммами разной вирулентности вируса гриппа субтипа H5N1/ Е.И. Рябчикова, Е.М. Малкова, О.С. Таранов [и др.]//Современные проблемы инфекционной патологии человека: Сб. науч. трудов Минздрав Республики Беларусь, ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии». - Минск, 2008. - № 1. - С. 108 – 112.

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

16 Оценка чувствительности человека к вирусу натуральной оспы с использованием первичных культур моноцитов-макрофагов/ Замедянская А.С., Титова К.А., Сергеев Ал.А. [и др.]// Вопр. вирусол. – 2016. №2. – С. 69-73.

17 Оценка эффективности схем применения препарата Реаферона-ЕС-липидта у мышей, инфицированных вирусом гриппа птиц/ О.К. Демина, А.А. Сергеев, А.П. Агафонов [и др.]//Достижения современной биотехнологии: Сб. науч. тр.; Под ред. проф. И. Г. Дроздова. - Новосибирск, 2008. - С. 17–23.

18 Патологические изменения воздухопроводящего компартмента легких мышей при экспериментальном гриппе птиц А/Н5N1/ Е.М. Малкова, О.С. Таранов, А.П. Агафонов [и др.]// Биомедицинский журнал ([www.medlme.ru](http://www.medlme.ru)). - 2009. – №10. - С. 492-507.

19 Патологические изменения респираторного компартмента легких мышей при экспериментальном гриппе птиц А/Н5N1/ Е.М. Малкова, О.С. Таранов, А.П. Агафонов [и др.]// Биомедицинский журнал ([www.medime.ru](http://www.medime.ru)). - 2009. - №10. - С. 508-523.

20 Способ защиты организма от инфекции, вызванной штаммами субтипа H1N1 вируса гриппа А препаратом на основе альфа-2 интерферона человека: пат. 2523554 Рос. Федерация: МПК А61К38/21 А61Р31/16/ А.П. Агафонов, Л.Н. Шишкина, А.А. Сергеев [и др.]; заявитель и патентообладатель Гос. научн. центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - № 2013113846/15; заявл. 27.03.13; опубл. 20.07.2014, бюл. №20. - 15 с: ил.

21 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.

22 Способ оценки активности лечебно-профилактических препаратов против вируса натуральной оспы: пат. 2565812 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.

23 Способ оценки противооспенной активности лечебно-профилактических препаратов: пат. 2496149 Рос. Федерация: МПК G09B 23/28/ А.А. Сергеев, А.С. Кабанов, Л.Е. Булычев [и др.]; заявитель и патентообладатель Гос. научн. центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - № 2012125678/14; заявл. 19.06.12; опубл. 20.10.13, бюл. № 29. - 12 с: ил.

24 Способ оценки противооспенной активности лечебно-профилактических препаратов: пат. 2526504 Рос. Федерация: МПК C12N 7/00 A61K 35/76 A/61K 39/275 A61P 31/20/ А.А. Сергеев, А.С. Кабанов, Л.Е. Булычев [и др.]; заявитель и патентообладатель Гос. научн. центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - №2013113847/10; заявл. 27.03.13; опубл. 20.08.14, бюл. № 23. - 17 с: ил.

25 Сравнительное изучение противовирусной активности химических соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах *in vivo*/ А.С. Кабанов, А.А. Сергеев, Л.Н. Шишкина [и др.]// *Вопр. вирусол.* – 2013. - № 4. – С. 39-43.

26 Сравнительный анализ восприимчивости и продуктивности клеток-мишеней респираторного тракта мышей и крыс при заражении вирусом гриппа *in vitro*/ В.А. Жуков, Л.Н. Шишкина, А.А. Сергеев [и др.]// *Вестник РАМН.* – 2008. - №2. – С. 12-16.

27 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.

28 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.

29 Штамм вируса гриппа птиц A/Chicken/Kurgan/05/2005 субтип H5N1 для изучения активности лечебных и профилактических препаратов против вируса гриппа: пат. 2361917 Рос. Федерация: МКП C12N 7/00 A61K 39/145 / А.П. Агафонов, В.А. Терновой, М.М. Писарева [и др.]; заявитель и патентообладатель Гос. научн. центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - №2008106698/13; заявл. 20.02.2008; опуб. 20.07.2009, бюл. №20. – 18 с: ил.

30 Assessing the risk of Influenza virus strains isolated from birds and mammals to humans/ G. Vdovichenko, A. Sergeev, O.K. Demina [et al.]// *J. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 14(1). - e87-e88.

31. Development of a new procedure for precise determination of viral aerosol lethal dose (ALD<sub>50</sub>) for birds/ I.E. Agranovski, O.V. Pyankov, O.G. Pyankova [et al.]// *Aerosol Sci.* – 2010. - Vol. 41(2). – P. 161–169.

32 Infection of chickens caused by avian influenza virus A/H5N1 delivered by aerosol and other routes/ A.A. Sergeev, O.K. Demina, O.V. Pyankov [et al.]// *Transbound. Emerg. Dis.* – 2013. – Vol. 60. – P. 159-165.

33 The course of infection in respiratory infected chickens caused by avian influenza virus A/H5N1/ A. Sergeev, O.V. Pyankov, O.K. Demina [et al.]// *Intern. J. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 14(1). - e336-e337.

34 The method of extrapolation of virus ID<sub>50</sub> from one mammalian species to another/ V.A. Zhukov, L.N. Shishkina, A.N. Sergeev [et al.]// *Infect. Dis. Rev.* – 2001. – Vol. S3. - P. 124-126.

35 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.

36 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.

37 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.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БОЕ	- бляшкообразующая единица
ВГ	- вирус гриппа
ВГП	- вирус гриппа птиц
ВНО	- вирус натуральной оспы
ВОО	- виру оспы обезьян
В/пат	- высокопатогенный
ГНЦ ВБ «Вектор»	- Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
И/н	- интраназально
МПКМ-МК	- монослой первичной культуры моноцитов-макрофагов крови
МПКМС	- монослой первичной культуры макрофагов селезенки
МР	- методические рекомендации
МУ	- методические указания
П.и.	- после инфицирования
П/к	- подкожно
Роспотребнадзор	- Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
СПККЛ	- суспензия первичной культуры клеток легких
Ц/афр	- центральноафриканский
ЭИД <sub>50</sub>	- 50 %-я эмбриональная инфицирующая доза
СІD <sub>50</sub>	- 50 %-я инфицирующая доза для культуры клеток
DMEM	- питательная среда
ID <sub>50</sub>	- 50 %-я инфицирующая доза
LD <sub>50</sub>	- 50 %-я летальная доза
p	- вероятность ошибки 1-го рода
PRNT <sub>50</sub>	- обратный титр антител, вызывающий 50%-е снижение количества бляшек на инфицированном вирусом монослое культуры клеток
RPMI-1640	- питательная среда
Vero	- перевиваемая культура клеток почки зеленой мартышки