Мышь линии SCID как модельное животное для оценки эффективности препаратов против натуральной оспы

К.А. Титова[1], Ал.А. Сергеев[1], А.С. Кабанов[1], Л.Е. Булычев[1], Ар.А. Сергеев[1], Д.О. Горбатовская[1], А.С. Замедянская[1], Л.Н. Шишкина[1], О.С. Таранов[1], В.В. Омигов[1], Е.Л. Завьялов[2], А.П. Агафонов[1], А.Н. Сергеев[1]

[1] Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия
[2] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

При профилактике и лечении многих инфекционных заболеваний необходимо принимать во внимание ослабление иммунной системы пациентов. Поэтому возникает потребность в моделировании инфекций, в частности натуральной оспы, на иммунодефицитных организмах. Для решения данной задачи исследована возможность использования аутбредных мышей иммунодефицитной линии SCID в качестве модельного объекта. При интраназальном заражении вирусом натуральной оспы (ВНО) этих мышей в дозе 5,2 $\log_{10}$ БОЕ (бляшкообразующая единица) не было обнаружено клинических признаков заболевания. При этом 50 %-я инфицирующая доза ($ИД_{50}$) ВНО для животных, оцениваемая по регистрации наличия вируса в их легких через 4 сут после заражения, была равна 3,5 $\log_{10}$ БОЕ и была относительно близка к таковой у человека, теоретически определенной путем выявления клинической картины заболевания. У мышей, интраназально зараженных дозой 5,2 $\log_{10}$ БОЕ (50 $ИД_{50}$) ВНО, было обнаружено размножение вируса только в органах респираторного тракта. Величины его концентраций в легких и носу напоминали таковые у больных людей и известных модельных животных (*Macaca cynomolgus* и мышь ICR), респираторно инфицированных близкими дозами ВНО. Причем существующие модельные животные значимо не отличались от мышей SCID по длительности присутствия вируса в легких. У мышей SCID, как и у человека и других модельных животных, были зарегистрированы сходные патоморфологические изменения в органах респираторного тракта воспалительно-некротического характера. Использование мышей SCID при оценке профилактической эффективности препаратов НИОХ-14 и ST-246 продемонстрировало адекватность полученных результатов таковым, описанным в научной литературе. Данное обстоятельство открывает перспективу применения мышей линии SCID в качестве экспериментальных объектов для моделирования натуральной оспы с целью разработки противовирусных препаратов, предназначенных для людей с выраженными иммунодепрессивными состояниями.

Ключевые слова: вирус натуральной оспы; мышь SCID; модельное животное; интраназальное инфицирование; 50 %-я инфицирующая доза; диссеминация вируса; патоморфологическое изменение; профилактическая эффективность.

Possibility of using a mouse SCID as a model animal to variola virus for evaluating anti-smallpox drug efficacy

K.A. Titova[1], Al.A. Sergeev[1], A.S. Kabanov[1], L.E. Bulychev[1], Ar.A. Sergeev[1], D.O. Galahova[1], A.S. Zamedyanskaya[1], L.N. Shishkina[1], O.S. Taranov[1], V.V. Omigov[1], E.L. Zavjalov[2], A.P. Agafonov[1], A.N. Sergeev[1]

[1] Federal Budget Research Institution «State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Novosibirsk region, Koltsovo, Russia
[2] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

At present, there is no animal model for smallpox that reflects the weakened immune system in people and can therefore help assess the prophylactic (highly preventive) efficiency of antiviral drugs. To fill in the gap, we have explored the possibility of using outbred immunodeficient SCID mice as a model animal for smallpox with the aid of virological, histological and electron microscopic and statistical methods. There was no clinical evidence of disease by intranasal infection of mice at a dose of 5,2 $\log_{10}$ PFU (plaque forming units). At the same time, the 50 % infective dose (ID_{50}) of VARV estimated for animals by registering the presence of the virus in their lungs after 4 days post i.n. infection was 3,5 $\log_{10}$ PFU and was relatively similar to that in humans, theoretically determined by identification of the clinical picture of the disease. Virus replication was detected only in the respiratory organs of mice, i.n. challenged with VARV at a dose of 5,2 $\log_{10}$ PFU (50 ID_{50}). The values for its concentrations in the lungs and nose resembled those for affected people and well-known animal models (Macaca cynomolgus and ICR mice), respiratory infected with VARV at similar doses. The existing model animals were not significantly different from SCID mice in the duration of viral presence in the lungs. Moreover, in SCID mice, as in humans and other animal models, similar pathomorphological changes in the respiratory organs of inflammatory necrotic nature have been reported. Using SCID mice in assessing the prophylactic efficacy of the antiviral drugs NIOCH-14 and ST-246 demonstrated the adequacy of the results obtained to those described in the literature. This opens up

DOI 10.18699/VJ15.065
УДК 578.82:615.28
Поступила в редакцию 16.07.2015 г.
Принята к публикации 31.07.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: aasergeev@vector.nsc.ru; titova_ka@vector.nsc.ru

the prospect of using SCID mice as an animal model for smallpox to develop antiviral drugs intended for people with severe immunosuppressive states.

Key words: variola virus; SCID mouse; animal model; intranasal infection; 50 % infectious dose; dissemination of the virus; pathological damage; prophylactic efficacy.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Титова К.А., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев А.А., Горбатовская Д.О., Замедянская А.С., Шишкина Л.Н., Таранов О.С., Омигов В.В., Завьялов Е.Л., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Мышь линии SCID как модельное животное для оценки эффективности препаратов против натуральной оспы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):487-493. DOI 10.18699/VJ15.065

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Titova K.A., Sergeev Al.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev Ar.A., Galahova D.O., Zamedyanskaya A.S., Shishkina L.N., Taranov O.S., Omigov V.V., Zavjalov E.L., Agafonov A.P., Sergeev A.N. Possibility of using a mouse SCID as a model animal to variola virus for evaluating anti-smallpox drug efficacy. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):487-493. DOI 10.18699/VJ15.065

К настоящему времени подобрано два вида модельных для натуральной оспы животных – *M. cynomolgus* (Jahrling et al., 2004) и мышь аутбредной линии ICR (Сергеев и др., 2014) – с целью оценки эффективности противовирусных препаратов. Однако обезьяны являются крайне дорогостоящими и их применение в вирусологических экспериментах сопряжено с большой трудоемкостью. Результаты же оценки эффективности лечебно-профилактических препаратов против натуральной оспы в экспериментах на макаках циномолгус и мышах популяции ICR применимы только для людей с нормально функционирующей иммунной системой. Некоторые существующие и разрабатываемые противооспенные препараты, например, из числа живых оспенных вакцин (Marennikova, Shchelkunov, 2005), могут создавать определенную угрозу для жизни человека, имеющего патологические изменения в органах, формирующих иммунитет, и проявлять при этом эффективность, отличающуюся от таковой у людей, не имеющих данной патологии. Причем с каждым годом число людей с подавленной функцией иммунной системы только растет.

С целью изучения активности противооспенных препаратов мы обратили внимание на поиск модельного животного для натуральной оспы из числа аутбредных линий мышей, с одной стороны, обладающих комбинированным иммунодефицитом, затрагивающим Т- и В-лимфоциты и иммуноглобулины, а с другой стороны, не имеющих изменений в клетках системы мононуклеарных фагоцитов (макрофагах), что крайне важно при проведении исследований с ортопоксвирусами (включая вирус натуральной оспы, ВНО), для которых основной клеткой-мишенью является макрофаг. Кроме того, аутбредные мыши в большей степени, чем инбредные, отражают действительное физиологическое состояние человеческой популяции, которая является далеко не инбредной (межсемейное, межнациональное и межрассовое скрещивание).

Целью настоящих исследований явилось изучение возможности использования мышей линии SCID, обладающих тяжелым комбинированным иммунодефицитом, в качестве модельных животных для натуральной оспы при оценке эффективности противооспенных препаратов.

Материалы и методы

Все эксперименты с живым ВНО были проведены в лаборатории с максимальным уровнем биологической защиты (BSL-4) с использованием изолирующих пневмокостюмов на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Вирус. В экспериментах использовали штамм Ind-3a ВНО из Государственной коллекции вирусов и риккетсий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», приготовленный при культивировании на клетках Vero и имеющий биоконцентрацию $6{,}7 \pm 0{,}1$ $\log_{10}$ БОЕ/мл. Вируссодержащий материал был расфасован в индивидуальные пробирки и хранился при температуре –70 °С.

Клеточная культура. Для наработки вируссодержащей суспензии и титрования различных биоматериалов использовали перевиваемую культуру клеток Vero, полученную из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Монослой клеток Vero выращивали в среде DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) в присутствии 10 %-й эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («HyClone», США) с добавлением пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). При культивировании вируса в качестве поддерживающей среды использовали ту же среду с антибиотиками, но с добавлением этой сыворотки (2 % по объему).

Животные. В исследованиях использовали разнополых 18–21-суточных мышей массой 12–14 г иммунодефицитной линии SCID Hairless Outbred SHO-PrkdcscidHrhr Mouse, полученных из Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 & RFMEFI62114X0010), куда данная линия поступила из Charles River Laboratories в 2012 г. Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях (National research Council, 2011). Исследования и манипуляции на животных были проведены с одобрения комитета по биоэтике ГНЦ ВБ «Вектор» № 1-01.2014 от 28 января 2014 г.

Введение химических соединений при инфицировании мышей вирусом. В работе было использовано химическое соединение, синтезированное в Новосибирском институте органической химии (НИОХ) им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, ранее проявившее противовирусную активность в отношении суррогатных ортопоксвирусов *in vitro* и *in vivo* – 7-[N′-(4-Трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновая кислота (НИОХ-14) (Шишкина и др., 2015). В качестве положи-

тельного контроля использовали химическое соединение с установленной противооспенной активностью – 4-трифторметил-N-(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етеноциклопроп[f]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид (ST-246), синтезированное в НИОХ по описанной методике (Bailey et al, 2007). Все лабораторные образцы химических соединений были охарактеризованы и паспортизованы. Оба препарата имели сходный механизм противовирусного действия, который связан с блокированием процесса формирования оболочки вириона в инфицированных клетках, негативно влияя на образование патогенетически значимого экстрацеллюлярного оболочечного вируса. Ежедневно мышам SCID однократно перорально вводили по 0,2 мл суспензии этих соединений в дозе 60 мкг/г массы за 1 сут до заражения, через 2 ч, 1, 2 и 3 сут после заражения ВНО. В качестве плацебо вводили 0,2 мл раствора, содержащего 0,75 % метилцеллюлозы и 1 % Твина 80, использованного для приготовления суспензии препаратов НИОХ и ST-246.

Методы и дозы инфицирования мышей. Во всех экспериментах использовали мышей, которым интраназально вводили вируссодержащую жидкость в объеме 0,03 мл суммарно в обе ноздри. Причем перед проведением процедуры заражения животных наркотизировали с помощью изофлюранового наркоза.

При изучении клинической картины заболевания и динамики накопления вируса в легких мышей SCID (6 и 18 особей соответственно) интраназально заражали дозой 5,2 $\log_{10}$ БОЕ ВНО. В экспериментах по оценке чувствительности мышей к возбудителю заболевания, основанных на выявлении наличия его в легких, животных инфицировали, используя по 6 особей на дозу вируса (1,2; 2,2; 3,2; 4,2; 5,2 $\log_{10}$ БОЕ). Кроме того, ВНО вводили в одной дозе, равной 5,2 или 4,5 $\log_{10}$ БОЕ, при изучении динамики накопления патогена в органах, тканях и сыворотке крови животных (24 особи), патоморфологическом исследовании биоматериалов мышей (28 особей), изучении эффективности действия лекарственных препаратов. В последнем случае 27 животных делили на 3 группы.

Приготовление биоматериала подопытных мышей. Забор крови из ретроорбитального венозного синуса проводили у мышей, находящихся в состоянии эфирного наркоза. Забор же проб органов и тканей у экспериментальных животных осуществляли после проведения процедуры эвтаназии методом цервикальной дислокации. Для вирусологических исследований готовили 10 %-е (по объему) гомогенаты биоматериалов, взятых от инфицированных животных, путем их механической дезинтеграции с помощью пестика в ступке с речным песком и раствором Хенкса.

При изучении динамики накопления вируса в легких мышей было использовано по 3 особи на каждую временную точку (1, 2, 3, 4, 5 и 7-е сут после заражения), у которых брали легкие (от каждого по отдельности) с целью приготовления гомогенатов. При проведении исследований по определению чувствительности мышей к ВНО и оценке эффективности действия испытываемых препаратов осуществляли забор легких от каждого животного отдельно через 4 сут после заражения для приготовления гомогенатов. Для изучения динамики накопления ВНО в органах, тканях и сыворотке крови мышей было взято по 4 особи на каждую временную точку (1, 2, 3, 4, 5, 7-е сут после заражения). У данных мышей из ретроорбитального венозного синуса осуществляли забор крови, из которой путем центрифугирования получали сыворотку и сгусток форменных элементов для последующего приготовления гомогената. Кроме того, от этих животных брали биоматериал (носовая перегородка со слизистой, головной мозг, трахея, легкие, пищевод, печень, селезенка, двенадцатиперстная кишка и почки). Органы и ткани, включая сгустки форменных элементов крови, каждый по отдельности от 4 животных, взятых на соответствующую временную точку, подвергали гомогенизации для последующего вирусологического исследования. Перед титрованием биоматериалы инфицированных мышей хранили при температуре –70 °С. Для патоморфологического исследования забор органов и тканей (клетки крови, носовая перегородка со слизистой, головной мозг, трахея, бифуркационные лимфоузлы, легкие, печень, селезенка, поджелудочная железа, двенадцатиперстная кишка, брыжеечные лимфоузлы, почки, надпочечники, кусочки кожи) осуществляли через 1, 2, 3, 4, 5 и 7 сут после заражения, используя по 4 особи на каждую временную точку и контроль. При этом клетки крови получали ранее описанным способом.

Вирусологический анализ проб. Определение концентрации жизнеспособного вируса в используемой для заражения животных вируссодержащей суспензии, гомогенатах органов и тканей, а также в сыворотке крови проводили традиционным методом титрования и подсчета количества бляшек в монослое клеток Vero, инфицированных разными разведениями исследуемого материала (Leparc-Goffart et al., 2005). Минимальное количество вируса, которое могло быть выявлено при использованном нами методе титрования, составляло 0,4 $\log_{10}$ БОЕ/мл или БОЕ/легкие.

Патоморфологическое исследование. Для проведения световой и электронной микроскопии подготовку образцов органов животных, сами исследования и регистрацию результатов осуществляли так, как описано в ранее опубликованной работе (Sergeev et al., 2015a).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами (Закс, 1976) с помощью пакета компьютерных программ «Statistica 6.0» (StatSoft Inc. 1984–2001) с оценкой достоверности отличий ($p \leq 0{,}05$) для 95 %-го доверительного уровня (I_{95}). По формуле Спирмена – Кербера рассчитывали 50 %-ю инфицирующую дозу ($ИД_{50}$). В экспериментах по оценке лечебно-профилактического действия препаратов сравнение доли инфицированных животных в группах проводили по критерию χ^2, а для сравнения титров ВНО в легких мышей использовали *U*-критерий Манна – Уитни и *t*-критерий Стьюдента (Закс, 1976).

Результаты

В первой серии экспериментов, связанных с определением показателя чувствительности мышей SCID к ВНО, провели попытку выявления внешних клинических признаков заболевания у этих животных, интраназально инфицированных вирусом в дозе 5,2 $\log_{10}$ БОЕ. При

Таблица 1. Динамика накопления штамма Ind-3a вируса натуральной оспы (ВНО) в биоматериалах[a] от мышей линии SCID, интраназально инфицированных дозой 5,2 $\log_{10}$ БОЕ (50 $ИД_{50}$)

Вид биоматериалов	Концентрация ВНО ($\log_{10}$ БОЕ/мл, $M \pm I_{95}$) в биоматериалах ($n = 4$) через разные промежутки времени (сут) после заражения					
	1	2	3	4	5	7
Клетки крови	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Сыворотка крови	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Головной мозг	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Носовая перегородка со слизистой	< 0,4	< 0,4	2,7 ± 0,4	2,2 ± 0,5	1,9 ± 0,3	< 0,4
Трахея	< 0,4	3,0 ± 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Легкие	3,3 ± 0,3	4,2 ± 0,3	3,9 ± 0,4	3,8 ± 0,3	3,7 ± 0,4	2,9 ± 0,3
Пищевод	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Печень	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Селезенка	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Почки	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Двенадцатиперстная кишка	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4

[a] – органы и ткани в составе 10 %-х (по объему) гомогенатов, а также сыворотка крови; n – количество мышей, взятых на временную точку; M – среднее; I_{95} – 95 %-й доверительный интервал; < 0,4 – величина ниже порога чувствительности (0,4 $\log_{10}$ БОЕ/мл) использованного метода титрования.

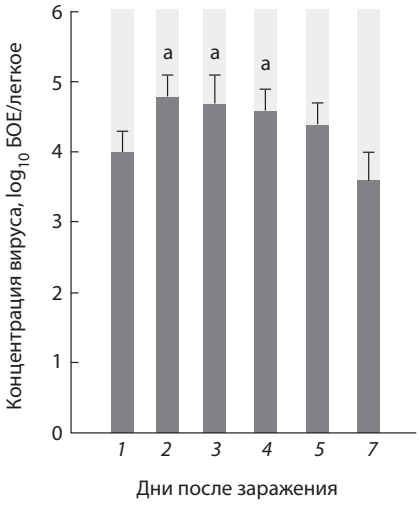

Рис. 1. Динамика накопления штамма Ind-3a вируса натуральной оспы в легких мышей линии SCID ($n = 3$, число животных на каждую временную точку), интраназально инфицированных дозой 5,2 $\log_{10}$ БОЕ (50 $ИД_{50}$).

Средние значения концентраций приведены на логарифмической шкале. a – величина концентрации вируса выше, чем таковая через 1 сут после заражения, $p < 0,05$.

этом не было зарегистрировано какой-либо симптоматики у мышей в процессе наблюдений в течение 21 сут после заражения. Для выяснения возможности существования бессимптомного течения заболевания у этих животных было проведено изучение динамики накопления патогена у мышей, интраназально зараженных дозой 5,2 $\log_{10}$ БОЕ, в основном органе входных ворот для натуральной оспы – легких (рис. 1). При этом был отмечен существенный рост величин концентрации вируса в этом органе через 2–4 сут после заражения по сравнению с таковой через 1 сут после заражения.

На следующем этапе с использованием результатов предыдущих исследований был проведен эксперимент на мышах, интраназально инфицированных разными дозами ВНО, по оценке $ИД_{50}$, рассчитанной с учетом фиксации данных о наличии вируса в легких через 4 сут после заражения. При этом было определено, что значение этого показателя – 3,5 ± 0,7 $\log_{10}$ БОЕ.

Затем было проведено изучение динамики диссеминации ВНО в органах, тканях и сыворотке крови мышей через 1, 2, 3, 4, 5 и 7 сут после интраназального инфицирования дозой 5,2 $\log_{10}$ БОЕ (50 $ИД_{50}$ для этого вида животных). Результаты этих экспериментов представлены в табл. 1.

Из данных таблицы видно, что уже через 1 сут после заражения возбудитель заболевания был обнаружен только в легких мышей SCID, затем через 2 сут патоген в относительно высоких концентрациях был зарегистрирован в легких и трахее, а через 3 сут вирус появился и в носу (носовой перегородке со слизистой), но не детектировался в трахее. В течение 3 сут (с 3-х по 5-е сут после заражения) ВНО продолжал регистрироваться только в легких и носу (носовой перегородке со слизистой), перестав выявляться в последнем органе через 7 сут после заражения, тогда как в легких он определялся в это время в низкой концентрации по сравнению с таковой через 2–5 сут после заражения. При этом во все сроки исследования от 1 до 7 сут после заражения вирус вообще не был обнаружен с помощью использованного метода титрования в других исследованных биоматериалах (клетки крови, сыворотка крови, головной мозг, пищевод, печень, селезенка, почки, двенадцатиперстная кишка). Самые высокие значения концентраций ВНО из трех продуцирующих вирус органов имели легкие через 2–5 сут после заражения, когда их величины находились в диапазоне от 3,7 до 4,2 $\log_{10}$ БОЕ/мл.

При проведении гистологических и электронно-микроскопических исследований мышей, интраназально инфицированных ВНО в дозе 5,2 $\log_{10}$ БОЕ (50 $ИД_{50}$), было отмечено, что патоморфологические изменения у этих животных были ограничены органами респираторного тракта (воспалительные и деструктивные очаги в легких, трахее и слизистой носовой полости) (рис. 2).

В следующей серии экспериментов проводили оценку эффективности профилактического действия препаратов на мышах, наблюдая за величинами

концентраций ВНО в легких животных через 4 сут после интраназального заражения дозой 4,5 $\log_{10}$ БОЕ (10 $ИД_{50}$). Результаты этих исследований представлены в табл. 2.

Из данных таблицы видно, что количество обработанных препаратом НИОХ-14 мышей SCID с зарегистрированным содержанием ВНО в легких через 4 сут после заражения достоверно ниже, чем в контроле (при $p \leq 0{,}05$), чего нельзя сказать в отношении препарата ST-246. В то же время оба используемых препарата по сравнению с контролем вызывали эффект значимого снижения средних концентраций вируса в легких мышей через 4 сут после заражения. При этом введение НИОХ-14 и ST-246 в одинаковых дозах не выявило существенных различий между этими препаратами по эффективности противооспенного действия.

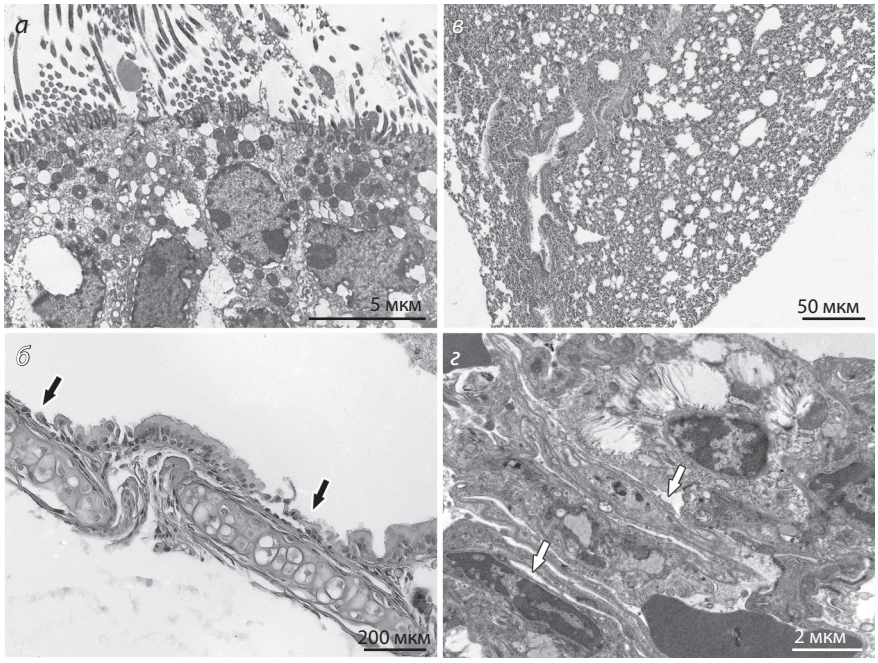

Рис. 2. Световая и электронная микроскопия респираторных органов мышей иммунодефицитной линии SCID после заражения интраназальным способом штаммом Ind-3a вируса натуральной оспы (ВНО) в дозе 5,2 $\log_{10}$ БОЕ.

а – электронограмма слизистой носа мыши через 4 сут после заражения: дистрофические изменения эпителия слизистой оболочки – утрата ресничек, вакуолизация цитоплазмы эпителиоцитов; *б* – гистограмма слизистой трахеи мыши через 3 сут после заражения: эпителиальный слой частично утрачен (стрелки); *в* – гистограмма ткани легкого мыши через 5 сут после заражения: резко выраженная воспалительная инфильтрация паренхимы с преобладанием ателектазов и интенсивный периваскулярный отек; *г* – электронограмма ткани легкого мыши через 5 сут после заражения: ателектазы, стрелками указаны спавшиеся просветы альвеол.

Обсуждение

При оценке показателей чувствительности мышей к ВНО при интраназальном и внутрибрюшинном способах инфицирования большинство исследователей (Murti, Shrivastav, 1957; Mayr, Herrlich, 1960; Капцова, 1967) ориентировалось в основном на выявлении у них клинических признаков заболевания, включая летальный эффект, отмечая при этом относительно низкую восприимчивость животных к вирусу, тогда как наши исследования были направлены на регистрацию не только внешних признаков заболевания, но и инфекционного процесса (по наличию вируса в первичных органах-мишенях), что существенно снизило порог чувствительности метода оценки показателя восприимчивости этих животных к вирусу за счет появившейся возможности регистрировать бессимптомное течение заболевания. Это позволило нам получить величину данного показателя для мышей SCID к ВНО ($ИД_{50} = 3{,}5 \pm 0{,}7$ $\log_{10}$ БОЕ), оцененную по развитию у них инфекционного процесса в легких. Причем данная величина достоверно не отличалась от таковой одного известного модельного животного (мышей ICR), но оказалась в 10–10^6 раз ниже, чем значения $ИД_{50}$, полученные для другого животного (*M. cynomolgus*), и в 10^6–10^7 раз ниже, чем величина дозы реально используемой для заражения этих приматов ВНО при оценке эффективности разрабатываемых противооспенных препаратов (Huggins et al., 2009; Mucker et al., 2013; Сергеев и др., 2014).

Сам факт размножения вируса в органах дыхательной системы мышей SCID после респираторного заражения ВНО в определенной степени согласуется с таковым у человека и известных модельных животных (Hahon, Wilson, 1960; Sarkar et al., 1973; Jahrling et al., 2004; Сергеев и др., 2014). При этом исследователи (аналогично нашим данным для носовой перегородки со слизистой, табл. 1) обнаруживали максимальные концентрации вируса в глоточных смывах людей (3–5 $\log_{10}$ ООЕ/мл) и *M. cynomolgus* (2,0–4,5 $\log_{10}$ БОЕ/мл) (Sarkar et al., 1973; Jahrling et al., 2004), а также в гомогенатах ноздрей и носоглотки *M. cynomolgus* и мышей ICR (2,0–4,8 $\log_{10}$ ООЕ/мл) (Hahon, Wilson, 1960; Сергеев и др., 2014). Однако длительность присутствия вируса в верхнем отделе респираторного тракта у приматов и человека (Hahon, Wilson, 1960; Marennikova, Shchelkunov, 2005) была существенно больше ($\geq$ 11 сут), чем у интраназально инфицированных мышей SCID (3 сут). Титры вируса в легких модельных животных (*M. cynomolgus* и мышь ICR) при респираторном заражении дозами 4,7 $\log_{10}$ ООЕ и 4,2 $\log_{10}$ БОЕ, соответственно, имели значения 3,8–5,5 $\log_{10}$ ООЕ/мл (Hahon, Wilson, 1960; Сергеев и др., 2014), близкие таковым, полученным нами на мышах SCID, интраназально зараженных сходной дозой ВНО (5,2 $\log_{10}$ БОЕ). По длительности инфекционного процесса в легких приматов и мышей (8–11 сут) существенных различий не было.

Проведенный сравнительный анализ данных литературы относительно патоморфологических изменений у человека и модельных животных (*M. cynomolgus* и мышь ICR) после заражения ВНО через респираторный тракт (Cann et al., 2013; Сергеев и др., 2014) и результатов наших исследований на интраназально инфицированных мышах SCID свидетельствовал об их

Таблица 2. Профилактическая активность препаратов у интраназально инфицированных мышей линии SCID штаммом Ind-3a вируса натуральной оспы, доза 4,5 log_{10} БОЕ (10 $ИД_{50}$)

Показатель	Препараты, ежедневно вводимые перорально однократно за 1 сут до, в день и в течение 3 сут после заражения		
	НИОХ-14	ST-246	контроль
Суточная доза вводимого препарата, мкг/г	50	50	[a]
Кол-во животных, взятых в эксперимент	10	9	8
Концентрация ВНО в легких (в log_{10} БОЕ/легкие, $M \pm I_{95}$) у каждой мыши через 4 сут после интраназального инфицирования	2,1 ± 2,2	2,4 ± 0,1	3,2 ± 0,8
	1,3 ± 0,1	2,2 ± 0,2	2,9 ± 0,9
	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,2	3,6 ± 0,0
	2,2 ± 0,6	2,1 ± 0,4	3,1 ± 0,3
	2,7 ± 0,7	2,1 ± 0,2	3,6 ± 0,1
	< 0,4	2,3 ± 0,5	3,0 ± 0,0
	< 0,4	2,3 ± 0,4	3,3 ± 0,4
	< 0,4	< 0,4	3,3 ± 0,9
	< 0,4	< 0,4	
	< 0,4		
Средняя концентрация вируса в легких мышей через 4 сут после заражения, log_{10} БОЕ/легкое ($M \pm I_{95}$)	2,1 ± 0,6[b] (*n* = 5)	2,3 ± 0,1[b] (*n* = 7)	3,3 ± 0,2 (*n* = 8)
Индекс подавления накопления вируса[c], log_{10} БОЕ/легкое	1,2	1,0	–
Кол-во (%) инфицированных мышей через 4 сут после заражения	5 (50)[d]	7 (78)	8 (100)
% защиты от инфицирования[e]	50	22	–

n – число животных; M – среднее; I_{95} – 95 %-й доверительный интервал; [a] – мышам контрольной группы вводили раствор метилцеллюлозы с Твином 80, который использовали для приготовления суспензии препаратов НИОХ-14 и ST-246; < 0,4 – величина ниже порога чувствительности (0,4 log_{10} БОЕ/легкие) использованного метода титрования; [b] – достоверное отличие от контроля (двусторонний *t*-тест Стьюдента с одинаковыми дисперсиями); [c] – величина, равная разности между log_{10} концентрации вируса в легких мышей в контроле и log_{10} концентрации вируса в легких мышей в опыте; [d] – достоверное отличие от контроля (точный тест Фишера *p* одностороннее < 0,05); [e] – величина, равная разнице между % инфицированных мышей в контроле и % инфицированных мышей в опыте; «–» – величина не определяется.

большом сходстве: имелись поражения органов дыхания, носящие воспалительно-деструктивный характер. При этом ранее в экспериментах *in vitro* с использованием клеток системы мононуклеарных фагоцитов (селезеночных моноцитов-макрофагов), полученных от мышей ICR, вирусологическим и электронно-микроскопическим методами были выявлены признаки размножения ВНО в этих клетках (Сергеев и др., 2014). Результаты данных экспериментов вполне можно экстраполировать на мышей SCID, учитывая то обстоятельство, что тяжелый комбинированный иммунодефицит, созданный у мышей этой линии, затронул только Т- и В-клеточное звено и не привел к каким-либо изменениям в других клетках организма, в том числе системы мононуклеарных фагоцитов (Belizário, 2009). С помощью вирусологического метода (при титровании гомогенатов трахеи и носовой перегородки со слизистой) у интраназально зараженных мышей SCID на начальном этапе (через 2-е и 3-е сут после заражения) было обнаружено накопление ВНО (табл. 2), что в совокупности с данными по воспалительно-деструктивным изменениям именно слизистой респираторного тракта этих животных свидетельствовало о вовлечении в инфекционный процесс эпителиоцитов. В научной литературе также отмечен факт размножения ВНО в макрофагах и эпителиоцитах респираторных органов у модельных для натуральной оспы животных при аэрозольном, интраназальном и внутривенном заражении (Hahon, Wilson, 1960; Jahrling et al., 2004; Wahl-Jensen et al., 2011; Сергеев и др., 2014).

В отличие от человека и модельного животного (*M. cynomolgus*), у которых при респираторном заражении наблюдалось генерализованное течение заболевания с соответствующей симптоматикой, у мышей SCID инфекционный процесс протекал бессимптомно (так же, как и у мышей ICR) и ограничивался первичными респираторными органами. Данное обстоятельство исключает возможность использования этих животных для оценки терапевтической эффективности разрабатываемых противооспенных препаратов, но сохраняет возможность их применения для изучения профилактической (экстренно-профилактической) активности. Это обусловлено тем, что профилактическое (экстренно-профилактической) введение препаратов ориентировано на борьбу с вирусом именно в первичных органах-мишенях, которые при натуральной оспе располагаются в респираторном тракте.

При изучении профилактической активности известных противооспенных препаратов ST-246 и НИОХ-14 на мышах SCID с применением ВНО подтверждено наличие

ранее отмеченного нами и многими исследователями (эксперименты с использованием различных видов ортопоксвирусов, культур клеток и соответствующих известных модельных животных) (Smith et al., 2009; Sergeev et al., 2015a, b) противовирусного эффекта, что свидетельствует об адекватности использования нами для этой цели аутбредных иммунодефицитных мышей SCID.

Таким образом, несмотря на то что мыши SCID при респираторном инфицировании ВНО не воспроизводили клиническую картину оспоподобного заболевания, они обладали относительно близкой к человеку чувствительностью к данному вирусу (по результатам регистрации наличия вируса в легких) и моделировали первое звено инфекционного процесса при натуральной оспе у людей (или модельных животных – макаки циномолгус и мыши ICR), включая размножение вируса в органах респираторного тракта, патоморфологические изменения в них и типы первичных клеток-мишеней, а также адекватно демонстрировали при интраназальном заражении ВНО наличие противовирусного эффекта у исследуемых препаратов. Все это делает возможным реальное использование данных животных в экспериментах с ВНО для оценки профилактического (экстренно-профилактического) действия разрабатываемых противооспенных препаратов для людей с подавленной иммунной системой. Изучение же лечебной (терапевтической) и профилактической (экстренно-профилактической) активности лекарственных средств против натуральной оспы может быть проведено с использованием ВНО на ранее известных иммунокомпетентных моделях (*M. cynomolgus* и мышь ICR соответственно).

Благодарности

Данная научная работа проведена при финансовой поддержке ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и Роспотребнадзора в рамках Государственного задания по теме № 03-5-14.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Закс Л. Статистическое оценивание. М., 1976.

Капцова Т.И. Разработка экспериментальных моделей натуральной оспы. Дис. канд. мед. наук. М., 1967.

Сергеев Ар.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев Ал.А., Таранов О.С., Титова К.А., Пьянков О.В. Замедянская А.С., Горбатовская Д.О., Агафонов А.П., Сергеев А.Н., Шишкина Л.Н. Способ оценки активности лечебно-профилактических препаратов против вируса натуральной оспы. Патент РФ № 2522483. Бюл. № 20 от 20.07.14.

Шишкина Л.Н., Сергеев А.Н., Агафонов А.П., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев А.А., Горбатовская Д.О., Пьянков О.В., Борматов Н.И., Щукин Г.И., Селиванов Б.А., Тихонов А.Я. Лечебно-профилактическое средство против вируса натуральной оспы и способы его получения и применения. Патент РФ № 2543338. Бюл. № 6 от 27.02.15.

Bailey T.R., Rippin S.R., Opsitnick E., Burns C.J., Pevear D.C., Collett M.S., Rhodes G., Tohan S., Huggins J.W., Baker R.O., Kern E.R., Keith K.A., Dai D., Yang G., Hruby D., Jordan R. N-(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-Octahydro-1,3-dioxo-4,6-ethenocycloprop[f]isoindol-2-(1*H*)-yl)carboxamides: identification of novel orthopoxvirus egress inhibitors. J. Med. Chem. 2007;50(7):1442-1444.

Belizário J.E. Immunodeficient mouse models: An overview. Open Immunol. J. 2009;2:79-85.

Cann J.A., Jahrling P.B., Hensley L.E., Wahl-Jensen V. Comparative pathology of smallpox and monkeypox in man and macaques. J. Comp. Path. 2013;148:6-21.

Hahon N., Wilson B.J. Pathogenesis of variola in *Macaca irus* monkeys. Amer. J. Hyg. 1960;71:69-80.

Huggins J., Goff A., Hensley L., Mucker E., Shamblin J., Wlazlowski C., Johnson W., Chapman J., Larsen T., Twenhafel N., Karem K., Damon I.K., Byrd C.M., Bolken T.C., Jordan R., Hruby D. Nonhuman primates are protected from smallpox virus or monkeypox virus challenges by the antiviral drug ST-246. Antimicrob. Agents Chemother. 2009;53(6):2620-2625.

Jahrling P.B., Hensley L.E., Martinez M.J., LeDuc J.W., Rubins K.H., Relman D.A., Huggins J.W. Exploring the potential of variola virus infection of cynomolgus macaques as a model for human smallpox. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004;101(Iss. 42):15197-15200.

Leparc-Goffart I., Poirier B., Garin D., Tissier M.-H., Fuchs F., Crance J.-M. Standartization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation. J. Clin. Virol. 2005; 32:47-52.

Marennikova S.S., Shchelkunov S.N. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. Springer: N.Y., USA, 2005.

Mayr A., Herrlich A. Zuchting des Variolavirus in der infantilen Maus. Arch. Ges. Virusforsch. 1960;10(2):226-235.

Mucker E.M., Goff A.J., Shamblin J.D., Grosenbach D.W., Damon I.K., Mehal J.M., Holman R.C., Carroll D., Gallardo N., Olson V.A., Clemmons C.J., Hudson P., Hruby D.E. Efficacy of Tecovirimat (ST-246) in nonhuman primates infected with variola virus (smallpox). Antimicrob. Agents Chemother. 2013;57(Iss. 12):6246-6253.

Murti B.R., Shrivastav J.B. A study biological behavior of variola virus. II. Experimental inoculation of laboratory animals. Indian J. Med. Sci. 1957;11(Iss. 8):580-587.

National research Council: Guidelines on laboratory animal care and use, 8th ed. National research Council of the National Academies, Washington: The National Academies Press, 2011.

Sarkar J.K., Mitra A.C., Mukherjee M.K., De S.K., Guha Mazumdar D. Virus excretion in smallpox. I. Excretion in the throat, urine and conjunctive of patients. Bull. WHO. 1973;48:517-522.

Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev A.A., Pyankov O.V., Bodnev S.A., Galahova D.O., Zamedyanskaya A.S., Titova K.A., Glotov A.G., Taranov O.S., Omigov V.V., Shishkina L.N., Agafonov A.P., Sergeev A.N. The possibility of using the ICR mouse as an animal model to assess anti-monkeypox drug efficacy. Transbound. Emerg. Dis. 2015a; DOI: 10.1111/tbed.12323

Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev A.A., Pyankov O.V., Bodnev S.A., Galahova D.O., Zamedyanskaya A.S., Titova K.A., Glotova T.I., Taranov O.S., Omigov V.V., Shishkina L.N., Agafonov A.P., Sergeev A.N. Using the ground squirrel (Marmota bobak) as an animal model to assess monkeypox drug efficacy. Transbound. Emerg. Dis. 2015b; DOI: 10.1111/tbed.12364

Smith S.K., Olson V.A., Karem K.L., Jordan R., Hruby D.E., Damon I.K. *In vitro* efficacy of ST246 against smallpox and monkeypox. Antimicrob. Agents Chemother. 2009;53:1007-1012.

Wahl-Jensen V., Cann J.A., Rubins K.H., Huggins J.W., Fisher R.W., Johnson A.J., de Kok-Mercado F., Larsen T., Raymond J.L., Hensley L.E., Jahrling P.B. Progression of pathogenic events in cynomolgus macaques infected with variola virus. PLoS One. 2011;6: e24832.