

Ал.А.Сергеев, А.С.Кабанов, Л.Е.Булычев, О.В.Пьянков, Ар.А.Сергеев, О.С.Таранов, С.А.Боднев, Ю.В.Туманов, Л.Н.Шишкина, А.П.Агафонов, А.Н.Сергеев

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЫШИ В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛЬНОГО ЖИВОТНОГО ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Российская Федерация

Установлено, что 50 % инфицирующая доза (КИД₅₀) штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) у интраназально (и/н) зараженных мышей, оцениваемая по наличию внешних клинических признаков заболевания (взъерошенность шерсти, гнойный конъюнктивит и блефарит), составляет 4,8 lg БОЕ/гол. (бляшкообразующих единиц), а ЛИД₅₀, оцениваемая по наличию вируса в легких мышей через 7 сут после заражения (п/з), равна 2,35 lg БОЕ/гол. Виды клеток-мишеней для штамма V79-1-005 ВОО в органах дыхания мышей и морфологические характеристики его репродукции в этих клетках соответствуют таковым для ортопоксвирусных инфекций. Испытываемые препараты ST-246 и НИОХ-14, применяемые перорально 1 раз в сутки (за 1 сут до заражения и 7 сут п/з в дозе 60 мкг/г мыши), проявляли значимый лечебно-профилактический эффект, регистрируемый по вероятности инфицирования животных через 7 сут п/з 10 ЛИД₅₀ ВОО. Продемонстрирована возможность использования 8–15-суточных мышей ICR (массой 9–11 г) в качестве модельного животного для оценки эффективности лечебно-профилактического действия разрабатываемых препаратов против оспы обезьян и натуральной оспы.

Ключевые слова: вирус оспы обезьян, мышь, интраназальное инфицирование, 50 % инфицирующая доза, клинические признаки, противооспенные препараты, модельное животное.

Al.A.Sergeev, A.S.Kabanov, L.E.Bulychev, O.V.P'yankov, Ar.A.Sergeev, O.S.Taranov, S.A.Bodnev, Yu.V.Tumanov, L.N.Shishkina, A.P.Agafonov, A.N.Sergeev

Mice as Animal Model for Evaluation of Therapeutic Efficacy of Preparations against Monkeypox

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tovo, Russian Federation

Revealed is the fact that 50 % infective dose of V79-1-005 Monkeypox virus (MPV) strain for intranasally infected mice, estimated by the appearance of clinical signs (such as disheveled hair, purulent conjunctivitis, and blepharitis) designated as CID₅₀, is 4,8 lg PFU (plaque-forming unit), while 50 % infective dose, estimated by the presence of viral cells in the lungs of mice after 7 days postinfection, designated as LID₅₀, is 2, 35 lg PFU. Types of target cells for V79-1-005 MPV in the respiratory organs of mice and morphological characteristics of virus reproduction within those cells are the same as for Orthopoxvirus infections. Tested preparations, ST-246 and NIOKH-14, have had tangible therapeutic effect, registered based on the chance of animal infection with 10 LID₅₀ of MPV after 7 days postinfection, applying peroral administration once within 24 hours (24 hours before infection and 7 days after infection of mouse with 60 µg/g of a preparation). Displayed is the feasibility of using 8–15-days-old ICR mice (body weight 9–11 g) as an animal model for evaluation of therapeutic efficacy of the preparations under development against Monkeypox and smallpox.

Key words: Monkeypox virus, mouse, intranasal infection, 50 % infective dose, clinical signs, preparations against Monkeypox, animal model.

Прошло уже более 30 лет с тех пор, как была завершена программа глобальной ликвидации оспы путем иммунизации большей части населения Земли против данного заболевания. В результате сегодня в мире сложилась довольно опасная ситуация, при которой более половины населения Земли не имеет иммунитета против ортопоксвирусных инфекций. В этой связи актуальность проблемы разработки лекарственных препаратов против этих заболеваний резко возрастает.

К настоящему времени за рубежом разрабатываются противооспенные лекарственные средства, такие как CMX-001 и ST-246 [14]. При этом оценку эффективности их противовирусного действия осуществляют не только на культурах клеток, но и с использованием модельных животных. Что касается вируса оспы обезьян (ВОО), то в качестве таких животных ряд исследователей использует нечеловекоо-

бразных приматов, луговых собачек, африканских белок и иммунодефицитных мышей [6]. В то же время для работающей в России с вирусами натуральной оспы и оспы обезьян организации ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» использование этих видов модельных животных крайне затруднительно. Это связано с чрезвычайно высокой стоимостью нечеловекообразных обезьян и большими сложностями приобретения луговых собачек и африканских белок из стран дальнего зарубежья, связанными с регулярным проведением экспортного и таможенного контролей. С другой стороны, использование иммунодефицитных мышей BALB/c для заражения неадекватно моделирует инфекционный процесс, который возникает во время вспышки оспы обезьян среди людей, так как реально это заболевание, в основном, было зарегистрировано у людей с нормальной иммунной системой.

Целью настоящих исследований является изуче-

ние возможности использования мыши в качестве модельного животного для оценки эффективности лечебно-профилактического действия разрабатываемых нами препаратов против оспы обезьян.

Материалы и методы

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

Вирус. В работе использовали Центральную Африканский штамм вируса оспы обезьян V79-1-005, полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Используя данный штамм, был приготовлен препарат вирусосодержащей суспензии путем культивирования на культуре клеток Vero (биологическая концентрация препарата составляла $5,0 \cdot 10^6$ бляшкообразующих единиц в 1 мл – БОЕ/мл). Препарат в дальнейшем использовался для инфицирования мышей. Вирусосодержащий материал перед экспериментами хранили при температуре -70°C .

Химические соединения. В работе были использованы два химических соединения, синтезированных в Новосибирском институте органической химии (НИОХ) им. Н.Н.Ворожцова СО РАН, ранее проявивших противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов *in vitro*: 7-[N-(4-Трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновая кислота (НИОХ-14) и Гидрат N-{3,5-диоксо-4-азатетрацикло[5.3.2.0^{2,6}.0^{8,10}]додец-11-ен-4-ил}-2-гидроксibenзамида (НИОХ-32) [5]. В качестве положительного контроля использовали химическое соединение с установленной противооспенной активностью 4-трифторметил-N-(3,3а,4,4а,5,5а,6,6а-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етеноциклопроп[f]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид (ST-246), синтезированное в НИОХ им. Н.Н.Ворожцова СО РАН по описанной методике [8]. Все лабораторные образцы химических соединений были охарактеризованы и паспортизованы.

Животные. В исследованиях использовали интактных беспородных разнополых белых 8–15-суточных мышей ICR (массой 9–11 г), полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Наблюдение за инфицированными животными осуществляли в течение 7–21 сут с момента заражения. 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 [4].

Изучение накопления вируса в легких мышей. При изучении динамики накопления вируса в легких мышей было использовано по 3 животных на каждую временную точку (3, 5, 7, 10-е сутки), которых эвтаназировали методом цервикальной дислокации и брали легкие с целью приготовления 5 % гомогенатов

этих органов путем их механической дезинтеграции с помощью пестика в ступке с речным песком и добавлением 4 мл раствора Хенкса.

При проведении исследований по определению ИД₅₀ (по наличию вируса в легких мышей) ВОО и оценке эффективности действия испытываемых препаратов легкие инфицированных мышей для вирусологических исследований забирали только на 7-е сутки.

Перед титрованием гомогенаты легких инфицированных мышей хранили при температуре -70°C .

Метод инфицирования мышей. Перед интраназальным (и/н) заражением мышей наркотизировали с помощью эфирного наркоза. Определение 50 % инфицирующих доз (ИД₅₀) осуществляли двумя способами: по клиническим признакам заболевания (КИД₅₀) и по наличию вируса в легких мышей (ЛИД₅₀) через 7 сут после заражения. При этом мышей заражали ВОО по 4 головы на дозу (10^1 – 10^5 БОЕ/гол.), используя разведения с 10- или 100-кратным шагом, вводя вирусосодержащую жидкость по 0,03 мл суммарно в обе ноздри. При изучении динамики накопления вируса в легких мышей инфицирование этих животных осуществляли тем же способом, используя дозу заражения 10^5 БОЕ/гол. ВОО. При изучении эффективности действия лекарственных препаратов мышей заражали дозами 1 и 10 ЛИД₅₀ ВОО.

Схемы применения химически синтезированных соединений у инфицированных животных. Химически синтезированные соединения НИОХ-32, НИОХ-14 и ST-246 животным вводили перорально в дозе 30 и 60 мкг/г массы мыши за 1 сут до заражения ВОО и далее в течение 7 сут после заражения (п/з).

Вирусологический анализ проб. Определение концентрации и наличия жизнеспособного вируса в образцах гомогенатов легких животных проводили традиционным методом подсчета количества бляшек на монослое культуры клеток Vero в разведениях образцов [11]. Минимальное количество вируса, которое могло быть выявлено при использованном нами методе титрования, составляло $1,7 \lg$ БОЕ/легкие.

Электронно-микроскопическое исследование. Через 7 сут после и/н заражения мышей вскрывали, иссекали трахею и легкие и фиксировали в 4 % растворе параформальдегида при 4°C в течение 10 сут. Затем образцы промывали раствором Хенкса (буфер), дофиксировали 1 % раствором осмиевой кислоты, обезвоживали по стандартной методике в растворах этилового спирта возрастающей концентрации и ацетоне и заливали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы готовили на микротоме Райхерт-Янг (Австрия), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Срезы исследовали в электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония), фотосъемку проводили с помощью встроенной цифровой камеры Jeol и цифровой камеры бокового ввода Veleta (SIS, Германия).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку и сравнение результатов

осуществляли стандартными методами [3]. В случаях, когда в гомогенатах легких инфицированных мышей вирус ВОО не выявлялся из-за существующего порога чувствительности метода титрования, использовали значение минимального количества вируса, выявляемого при использованном нами методе титрования (1,7 lg БОЕ/легкие).

Сравнение долей инфицированных и неинфицированных мышей в экспериментальных группах проводили по критерию χ^2 и точному тесту Фишера [3]. Различия считали достоверными на 5 % уровне значимости (при $p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Первая серия экспериментальных исследований была проведена с целью определения ИД₅₀ и ЛД₅₀ ВОО (штамм V79-1-005 Центрально-Африканского происхождения) у 8-15-суточных беспородных мышей ICR при и/н способе заражения. При этом у инфицированных мышей лишь в максимальной дозе заражения (5 lg БОЕ) отмечались ярко выраженные признаки заболевания: взъерошенность шерсти, гнойный конъюнктивит и блефарит. С учетом данных клинических проявлений КИД₅₀ у этих животных составила 4,8 lg БОЕ/гол. Ряд ученых, проводя подобного рода исследования по и/н инфицированию мышей Центрально-Африканским штаммом ВОО (высоковирулентный для человека) [6, 7], зарегистрировал у них лишь скудную симптоматику: взъерошенность шерсти (не считая снижение массы тела), которая отсутствовала у мышей, зараженных Западно-Африканским штаммом ВОО (низковирулентный для человека). При этом авторам не удалось определить ИД₅₀ для Центрально-Африканского штамма ВОО по описанной клинической картине заболевания у этих животных. Наличие более богатой симптоматики у инфицированных животных в наших экспериментах по сравнению с таковой зарубежных исследователей объясняется, вероятно, существенной разницей в возрасте взятых в эксперименты мышей: в нашем случае были использованы животные меньшего возраста.

Некоторыми учеными были получены данные о 100 % летальности мышей при интраназальном инфицировании штаммом Копенгаген ВОО в дозе 6 lg БОЕ/гол. [12]. Такое несоответствие с нашими результатами объясняется, скорее всего, различием используемых в экспериментах штаммов ВОО и доз заражения.

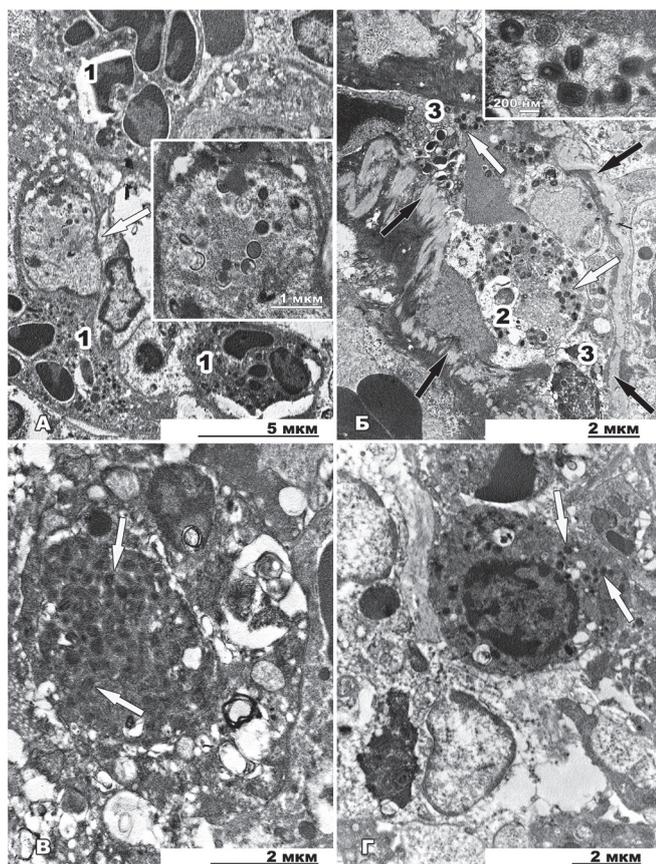
В связи с тем, что значение КИД₅₀ ВОО у мышей оказалась достаточно высокая для оценки эффективности лечебно-профилактического действия разрабатываемых препаратов, нами была проведена вторая серия экспериментов с целью определения ИД₅₀ ВОО у данного вида животных по другому более чувствительному методу ее оценки – по наличию ВОО в легких. Для определения данного показателя на первом этапе необходимо было изучить динами-

ку накопления вируса в легких мышей. В результате этого исследования было определено, что максимальное накопление вируса в этом органе у животных происходит через 7 сут п/з (более 4,5 lg БОЕ/лег.). После чего было определено значение ЛИД₅₀ по накоплению вируса в легких через 7 сут п/з, которое составило 2,35 lg БОЕ/гол. и оказалось на 2,45 lg ниже, чем значение КИД₅₀, полученное по наличию внешних клинических признаков заболевания у мышей. Следует отметить, что при использовании интраназального метода заражения мышей около 97 % вирусосодержащего материала попадает в желудочно-кишечный тракт и лишь около 3 % – в респираторный (наши неопубликованные данные, полученные с использованием физической метки). Если учесть только количество апплицированного в дыхательном тракте материала, то ЛИД₅₀ ВОО для мышей в нашем случае должна быть существенно ниже (на 1,5 lg) и составить около 0,85 lg БОЕ/органы дыхания (легкие, трахея), что свидетельствует о высокой чувствительности данного вида животных к ВОО.

Электронно-микроскопическое исследование трахеи и бронхов мышей через 7 сут п/з выявило деструктивные изменения реснитчатых эпителиоцитов, в которых зачастую разрушается апикальная плазмалемма, наблюдается нарушение строения и слушивание ресничек. В эпителии воздухоносных путей отмечаются некрозы, в области которых локализуется клеточный детрит, форменные элементы крови и волокна фибрина. Обращает на себя внимание массивная инфильтрация респираторной ткани воспалительно-клеточными элементами, встречаются активированные макрофаги (содержат многочисленные псевдоподии и секреторные гранулы в цитоплазме).

Морфологические признаки репродукции ВОО отмечаются в клетках эпителиальной выстилки трахеи и бронхов, соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки, в макрофагах и в эндотелиальных клетках сосудов подслизистой основы. Зоны некроза содержат многочисленные «обломки» зараженных клеток, не поддающиеся идентификации. На срезах инфицированных клеток прослеживаются последовательные стадии морфогенеза вируса: полумесяцы, сферические незрелые вирионы и зрелые вирусные частицы кирпичеобразной формы с центрально расположенным нуклеоидом двояковогнутой формы (рисунок). Морфологические характеристики репродукции ВОО в клетках легких мышей соответствуют таковым для ортопоксвирусов, описанных в литературе [1, 2, 10, 13]. Некротические изменения слизистой оболочки трахеи и бронхов распространяются до собственной пластинки слизистой. В целом, представленные экспериментальные данные соответствуют описанным патоморфологическим изменениям при и/н инфицировании ортопоксвирусами.

В следующей серии экспериментов проводили оценку эффективности лечебно-профилактического



Репродукция Центрально-Африканского штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян в клетках респираторного отдела легкого мыши через 7 сут после интраназального заражения. Просвечивающая электронная микроскопия ультратонких срезов

А – вирусные частицы различной степени зрелости в цитоплазме клетки воспалительного очага (показано стрелкой). На врезке – увеличенный участок, содержащий вирусную фабрику: **1** – нейтрофил, содержащий гранулы; **Б** – кровеносный сосуд артериального типа. В просвете располагается зараженный ВОО макрофаг (**2**), вирусные частицы показаны белыми стрелками. Эндотелиоциты некротизированы, в одном из них (**3**) локализуются вирусные частицы. Черными стрелками показана базальная мембрана сосуда. Во врезке – увеличенный фрагмент снимка; **В** – макрофаг, стрелками указаны зрелые частицы вируса оспы обезьян; **Г** – клетка соединительной ткани, содержащая вирусные частицы (показано стрелками)

действия препаратов на мышах по накоплению ВОО в легких через 7 сут п/з, используя для инфицирования этих животных две дозы вируса: 1 и 10 ЛИД₅₀ (2,35 и 3,35 lg БОЕ/гол. соответственно). Результаты

этих исследований представлены в табл. 1 и 2. Из данных табл. 1 видно, что группы мышей по вероятности инфицирования, получавшие разные дозы исследуемых препаратов (30 мкг/г и 60 мкг/г массы мыши), не отличались от контроля. По данным табл. 2 отмечено, что количество инфицированных мышей при введении препаратов ST-246 и НИОХ-14 достоверно ниже, чем в контроле (при $p \leq 0,05$). Было установлено, что НИОХ-32 достоверно не отличался по этому признаку от контроля. Также отмечено, что при использовании НИОХ-14 и ST-246 в одинаковых дозах эти препараты не отличались между собой по эффективности действия. Подобного рода эксперименты были проведены зарубежными исследователями по оценке эффективности действия ST-246 на различных видах животных. В этих экспериментах также отмечался выраженный противовирусный эффект данного препарата [9, 15].

Вышеприведенные исследования по оценке эффективности лечебно-профилактического действия разрабатываемых препаратов против оспы обезьян, а также ранее полученные нами данные с применением этих химических соединений на ортопоксвирусах *in vitro* убедительно показали возможность использования 8–15-суточных мышей ICR (массой 9–11 г) для этой цели в качестве модельного животного. При этом величина противовирусного действия исследуемых препаратов может быть определена по показателю подавления накопления ВОО в легких мышей на 7-е сутки после и/н инфицирования. Также важными аргументами, подтверждающими возможность применения этого животного в качестве модельного, являются следующие: мыши обладают высокой чувствительностью к ВОО при респираторном инфицировании; при этом первичное размножение вируса у мышей и человека наблюдается в органах дыхательного тракта; виды первичных клеток-мишеней для ВОО у мышей и морфологические характеристики его репродукции в клетках легких этих животных характерны для ортопоксвирусных инфекций. В литературе не представлено данных прямых исследований таких клеток при ортопоксвирусных инфекциях у людей. У лабораторных животных в экспериментах показано, что первичными клетками-мишенями

Таблица 1

Результаты изучения лечебно-профилактической активности препаратов по подавлению накопления вируса оспы обезьян в легких мышей на 7-е сутки после интраназального инфицирования 1 ИД₅₀

Номер интраназально инфицированного вирусом животного	Концентрация ВОО в легких инфицированных мышей, обработанных разными дозами исследуемых препаратов, в lg БОЕ/легкие				
	НИОХ-14 (30 мкг/г)	НИОХ-14 (60 мкг/г)	ST-246 (30 мкг/г)	ST-246 (60 мкг/г)	Контроль*
1	3,24	<1,70	3,16	3,13	3,72
2	<1,70	<1,70	2,3	<1,70	3,28
3	<1,70	<1,70	3,19	<1,70	3,62
4	<1,70	<1,70	<1,70	<1,70	<1,70
5	<1,70	<1,70	<1,70	<1,70	<1,70
6	<1,70	<1,70	<1,70	<1,70	<1,70

*Мышам контрольной группы перорально вводили раствор метилцеллюлозы с твинном-80, который использовали для растворения препаратов НИОХ и ST-246; в случаях, когда в гомогенатах легких инфицированных мышей вирус ВОО не выявлялся из-за существующего порога чувствительности метода титрования, использовали значение минимального количества вируса, выявляемого при использованном нами методе титрования (1,7 lg БОЕ/легкие).

Результаты изучения лечебно-профилактической активности препаратов по подавлению накопления вируса оспы обезьян в легких мышей на 7-е сутки после интраназального инфицирования 10 ИД₅₀

Номер интраназально инфицированного вирусом животного	Концентрация ВОО в легких инфицированных мышей, обработанных разными дозами исследуемых препаратов, в lg БОЕ/легкие			
	НИОХ-14 (60 мкг/г)	НИОХ-32 (60 мкг/г)	ST-246 (60 мкг/г)	Контроль*
1	<1,70	3,52	3,00	4,90
2	<1,70	4,90	<1,70	4,90
3	<1,70	3,64	<1,70	4,90
4	<1,70	4,90	<1,70	4,90
5	<1,70	4,90	<1,70	4,60
6	<1,70	4,90	<1,70	4,90
Количество и (%) инфицированных мышей	0 (0) #	6 (100)	1 (16,7) #	6

*Мышам контрольной группы перорально вводили раствор метилцеллюлозы с твином-80, который использовали для растворения препаратов НИОХ и ST-246; в случаях, когда в гомогенатах легких инфицированных мышей вирус ВОО не выявлялся из-за существующего порога чувствительности метода титрования, использовали значение минимального количества вируса, выявляемого при использованном нами методе титрования (1,7 lg БОЕ/легкие).

– достоверное отличие от контроля по критерию χ^2 и точному тесту Фишера ($p \leq 0,05$).

у мышей для вирусов экстремелии [10] и оспы коров являются макрофаги [1, 2, 13]. Для ВОО при аэрозольном заражении обезьян первичными мишенями служат макрофаги и дендритные клетки [16]. Электронно-микроскопическое исследование у мышей установило, что вирус оспы коров реплицируется в эпителии носа, поддерживающих и базальных клетках обонятельного эпителия, эпителии и гладкомышечных клетках бронхиол, фибробластах, перинейральных и периостеальных фибробластах, сосудистых гладкомышечных клетках, макрофагах [13]. Аналогичный набор клеток-мишеней выявлен нами у мышей, инфицированных и/н ВОО.

Таким образом, установлено, что КИД₅₀ ВОО у и/н зараженных мышей, оцениваемая по наличию внешних клинических признаков заболевания (взъерошенность шерсти, гнойный конъюнктивит и блефарит), составляет 4,8 lg БОЕ/гол., а ЛИД₅₀, оцениваемая по наличию вируса в легких мышей через 7 сут п/з, равна 2,35 lg БОЕ/гол. Виды первичных клеток-мишеней для ВОО у мышей и морфологические характеристики его репродукции в клетках легких этих животных соответствуют ортопоксвирусной инфекции согласно литературным данным. Исследуемые препараты ST-246 и НИОХ-14, применяемые перорально 1 раз в сутки (за 1 сут до заражения и 7 сут п/з) в дозах 30 и 60 мкг/г массы мыши, проявляли значимый лечебно-профилактический эффект, регистрируемый по вероятности инфицирования животных через 7 сут п/з 10 ЛИД₅₀ ВОО.

В рамках полученных результатов была продемонстрирована возможность использования 8–15-суточных мышей ICR (массой 9–11 г) в качестве модельного животного для оценки эффективности лечебно-профилактического действия разрабатываемых препаратов против оспы обезьян. Кроме того, учитывая тот факт, что оспа обезьян у человека клинически протекает идентично натуральной оспе, а также не существует животных, чувствительных к вирусу натуральной оспы, заболевание у которых

протекает сходно с оспой человека, предложенная в данной работе модель на основе мышей линии ICR и вируса оспы обезьян может быть использована для оценки эффективности препаратов против натуральной оспы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках государственного контракта № 14.518.11.7035

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Виноградов И.В., Кочнева Г.В., Малкова Е.М., Щелкунов С.Н., Рябчикова Е.И. Изучение инфекции, вызываемой штаммом EP-2 вируса оспы коров у мышей разного возраста. *Вопр. вирусол.* 2003; 5:34–8.
2. Виноградов И.В., Кочнева Г.В., Малкова Е.М., Щелкунов С.Н., Рябчикова Е.И. Интраназальная инфекция у мышей, зараженных штаммом EP-2 вируса оспы коров, выделенным от слона. *Вопр. вирусол.* 2005; 4:37–42.
3. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика; 1976. 598 с.
4. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Перевод с английского. Washington, D.C.: National Academy Press; 1996. 138 p.
5. Селиванов Б.А., Беланов Е.Ф., Бормотов Н.И., Балахнин С.М., Серова О.А., Святочко В.А., Киселев Н.Н., Казачинская Е.И., Локтев В.Б., Тихонов А.Я. Производные трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6,7-дикарбоновой кислоты высоко эффективно ингибируют репликацию различных видов ортопоксвирусов. *Докл. Акад. наук.* 2011; 441(3):414–8.
6. Chen N., Li G., Liszewski K.M., Atkinson J.P., Jahrling P.B., Feng Z., Schriewer J., Buck C., Wang C., Lefkowitz E.J., Esposito J.J., Harms T., Damon I.K., Roper R.L., Upton C., Buller R.M.L. Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo basin. *J. Virol.* 2005; 340:46–63.
7. Hutson C.L., Abel J.A., Carroll D.S., Olson V.A., Braden Z.H., Hughes C.M., Dillon M., Hopkins C., Karem K.L., Damon I.K., Osorio J.E. Comparison of West African and Congo Basin monkeypox viruses in BALB/c and C57BL/6 mice. *PLoS One.* 2009; 5(1):e8912.
8. Jordan R., Bailey T.R., Rippin S.R. Compounds, compositions and methods for treatment and prevention of orthopoxvirus infections and associated diseases. Patent WO 2004/112718 A3; 2005. International Patent Classification C07D 209/56.
9. Jordan R., Goff A., Frimm A., Corrado M.L., Hensley L.E., Byrd C.M., Mucker E., Shamblyn J., Bolken T.C., Wlazlowski C., Johnson W., Chapman J., Twenhafel N., Tyavanagimatt S., Amantana A., Chinsangaram J., Hruby D.E., Huggins J. ST-246 antiviral efficacy in a nonhuman primate monkeypox model: determination of the minimal effective dose and human dose justification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(5):1817–22.
10. Kochneva G.V., Urmanov I.H., Ryabchikova E.I., Streltsov V.V., Serpinsky O.I. Fine mechanisms of ectromelia virus thymidine

kinase-negative mutants avirulence. *Virus Res.* 1994; 34(1):49–61.

11. *Leparc-Goffart I., Poirier B., Garin D., Tissier M.-H., Fuchs F., Crance J.-M.* Standardization 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.

12. *Marennikova S.S., Seluhina E.M.* Susceptibility of some rodent species to monkeypox virus, and course of the infection. *Bull. World Health Organ.* 1976; 53:13–20.

13. *Martinez M.J., Bray M.P., Huggins J.W.* A mouse model of aerosol-transmitted orthopoxviral disease: morphology of experimental aerosol-transmitted orthopoxviral disease in a cowpox virus – BALB/c mouse system. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000; 124(3):362–77.

14. *Sliva K., Schnierle B.* From actually toxic to highly specific – novel drugs against poxviruses. *J. Virol.* 2007; 4:8.

15. *Stabenow J., Buller R.M., Schriewer J., West C., Sagartz J.E., Parker S.A.* Mouse model of lethal infection for evaluating prophylactics and therapeutics against monkeypox virus. *J. Virol.* 2010; 84(8):3909–20.

16. *Zaucha G., Jahrling P., Geisbert T., Swearingen J., Hensley L.* The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). *Lab. Invest.* 2001; 81:1581–600.

References

1. *Vinogradov I.V., Kochneva G.V., Malkova E.M., Shchelkunov S.N., Ryabchikova E.I.* [Investigations of infection caused by EP-2 vaccinia virus strain in mice of different age]. *Vopr. Virusol.* 2003; 5:34–8.
2. *Vinogradov I.V., Kochneva G.V., Malkova E.M., Shchelkunov S.N., Ryabchikova E.I.* [Intranasal infection in mice, inoculated with EP-2 vaccinia virus strain, isolated from an elephant]. *Vopr. Virusol.* 2005; 4:37–42.
3. *Zaks L.* [Statistical Estimation]. M.: Statistics, 1976. 598 p.
4. National research Council. [Guidelines on Laboratory Animal Care and Use]. Washington: National Academy; 1996.
5. *Selivanov B.A., Belanov E.F., Bormotov N.I., Balakhin S.M., Serova O.A., Svyatchenko V.A., Kiselev N.N., Kazachinskaya E.I., Loktev V.B., Tikhonov A.Ya.* [Derivatives of the tricycle[3.2.2.0²-4]non-8-EN-6,7 dicarboxylic acid inhibit replication of various Orthopoxvirus species to a maximum effect]. *Doklady Akademii Nauk.* 2011; 441(3):414–18.
6. *Chen N., Li G., Liszewski K.M., Atkinson J.P., Jahrling P.B., Feng Z., Schriewer J., Buck C., Wang C., Lefkowitz E.J., Esposito J.J., Harms T., Damon I.K., Roper R.L., Upton C., Buller R.M.L.* Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo basin. *J. Virol.* 2005; 340:46–63.
7. *Hutson C.L., Abel J.A., Carroll D.S., Olson V.A., Braden Z.H., Hughes C.M., Dillon M., Hopkins C., Kareem K.L., Damon I.K., Osorio J.E.* Comparison of West African and Congo Basin monkeypox viruses in BALB/c and C57BL/6 mice. *PLoS One.* 2009; 5(1):e8912.

8. *Jordan R., Bailey T.R., Rippin S.R.* Compounds, compositions and methods for treatment and prevention of orthopoxvirus infections and associated diseases. Patent WO 2004/112718 A3; 2005. International Patent Classification C07D 209/56.

9. *Jordan R., Goff A., Frimm A., Corrado M.L., Hensley L.E., Byrd C.M., Mucker E., Shamblin J., Bolken T.C., Wlazlowski C., Johnson W., Chapman J., Twenhafel N., Tyavanagimatt S., Amanatana A., Chinsangaram J., Hruby D.E., Huggins J.* ST-246 antiviral efficacy in a nonhuman primate monkeypox model: determination of the minimal effective dose and human dose justification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(5):1817–22.

10. *Kochneva G.V., Urmanov I.H., Ryabchikova E.I., Streltsov V.V., Serpitsky O.I.* Fine mechanisms of ectromelia virus thymidine kinase-negative mutants avirulence. *Virus Res.* 1994; 34(1):49–61.

11. *Leparc-Goffart I., Poirier B., Garin D., Tissier M.-H., Fuchs F., Crance J.-M.* Standardization 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.

12. *Marennikova S.S., Seluhina E.M.* Susceptibility of some rodent species to monkeypox virus, and course of the infection. *Bull. World Health Organ.* 1976; 53:13–20.

13. *Martinez M.J., Bray M.P., Huggins J.W.* A mouse model of aerosol-transmitted orthopoxviral disease: morphology of experimental aerosol-transmitted orthopoxviral disease in a cowpox virus – BALB/c mouse system. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000; 124(3):362–77.

14. *Sliva K., Schnierle B.* From actually toxic to highly specific – novel drugs against poxviruses. *J. Virol.* 2007; 4:8.

15. *Stabenow J., Buller R.M., Schriewer J., West C., Sagartz J.E., Parker S.A.* Mouse model of lethal infection for evaluating prophylactics and therapeutics against monkeypox virus. *J. Virol.* 2010; 84(8):3909–20.

16. *Zaucha G., Jahrling P., Geisbert T., Swearingen J., Hensley L.* The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). *Lab. Invest.* 2001; 81:1581–600.

Authors:

Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., P'yankov O.V., Sergeev Ar.A., Taranov O.S., Bodnev S.A., Tumanov Yu.V., Shishkina L.N., Agafonov A.P., Sergeev A.N. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Об авторах:

Сергеев Ал.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев Ар.А., Таранов О.С., Боднев С.А., Туманов Ю.В., Шишкина Л.Н., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 13.09.12.