

*На правах рукописи*

КАРТАШОВА НАДЕЖДА ПАВЛОВНА

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ИНФЕКЦИИ SARS-COV-2  
*IN VITRO* И *IN VIVO* ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВАКЦИННЫХ И  
ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

1.5.10. Вирусология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова)

**Научный руководитель:**

**Ленева Ирина Анатольевна** – доктор биологических наук, заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

**Официальные оппоненты:**

**Дешева Юлия Андреевна** – доктор медицинских наук, заведующая Отделом трансляционной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»).

**Шиловский Игорь Петрович** – доктор биологических наук, заместитель директора по науке и инновациям, заведующий лабораторией противовирусного иммунитета федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России).

**Ведущая организация:** Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

Защита диссертации состоится «16» марта 2026 года в 12.00 часов на заседании Диссертационного совета 21.1.018.02 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 16.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра: <http://www.gamaleya.org>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_ г.

Ученый секретарь диссертационного  
совета, д.м.н.

Бурцева Е. И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы и степень ее разработанности.** SARS-CoV-2 — это высокопатогенный коронавирус, который появился в конце 2019 года и вызвал пандемию острого респираторного заболевания COVID-19, что привело к огромным экономическим и социальным проблемам во всем мире. Борьба с вновь возникшим заболеванием и его последствиями осложняется отсутствием понимания его течения и патогенеза, в том числе осложнений и отдаленных последствий, и недостатком специфических средств для профилактики и лечения. При разработке лечебно-профилактических средств важнейшая роль принадлежит моделированию новой коронавирусной инфекции и ее последствий на животной модели, изучения в ней патогенеза заболевания и дальнейшего сопоставления полученных данных с клиническими наблюдениями. В связи с этим, актуальность исследований, посвященных созданию моделей инфекции SARS-CoV-2 и заболевания COVID-19 для разработки фундаментальных подходов к выбору обоснованной лекарственной терапии и специфической профилактики, не вызывает сомнений.

Работы по созданию моделей инфекции SARS-CoV-2 во всем мире были начаты с начала пандемии новой коронавирусной инфекции, с целью изучения жизненного цикла вируса, демонстрации патоморфологии, воспроизведения взаимодействия хозяина и вируса в клетках организма, в том числе человека, а также для получения первых сведений о противовирусной и иммуногенной активности этиотропных и вакцинных препаратов соответственно, и впоследствии для разработки новых препаратов.

Так, модели *in vitro* впервые продемонстрировали кинетику репликации вируса, тропизм клеток и их поражение, вызванное SARS-CoV-2, а также исследование противовирусной активности этиотропных препаратов. Так, в первые месяцы пандемии были получены данные об активности препаратов, на основании первых экспериментальных данных и клинических наблюдений, таких как: ремдесевир, фавипиравир, гидроксихлорохин, хлорохин, лопинавир/ритонавир, рибавирин и ивермектин. Однако, клеточные модели не демонстрируют как заболевание влияет на организм в целом, поскольку ткани человека или животного содержат множество типов клеток, гетерогенно экспрессирующих рецептор ACE2. Подобные ограничения создают необходимость в разработке животных моделей, которые демонстрируют влияние SARS-CoV-2 на организм хозяина, а, следовательно, способны адекватно демонстрировать эффект применения вакцин и лекарственных препаратов.

К моменту начала исследований, проведенных в диссертационной работе, в мире уже были получены трансгенные мыши, несущие человеческий ACE2 рецептор (K18-hACE2), на которых был изучен патогенез инфекции и на них проводили исследования эффективности новых этиотропных и вакцинных зарубежных препаратов. В то же время штаммы

коронавируса, выявленные в России, а также российские препараты практически не были изучены на животных моделях и публикации об этом отсутствовали в научной литературе. К моменту написания диссертации, в Научно-исследовательском институте вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, были изолированы, накоплены и охарактеризованы штаммы вируса SARS-CoV-2, полученные с назофарингеальных смывов больных людей на территории РФ, которые в дальнейшем использовались для проведения экспериментов

**Цель исследования.** Моделирование инфекции SARS-CoV-2 *in vitro* в культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3, и *in vivo* у трансгенных мышей K18-hACE2 и мышей линии BALB/c для экспериментальных исследований лекарственных препаратов и вакцин.

**Задачи исследования:**

1. Моделирование SARS-CoV-2 инфекции *in vitro* на культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3

2. Исследование на модели SARS-CoV-2 инфекции в культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3 активности препаратов, входящих во временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» версия 18 от 26.10.2023: умифеновира, и интерферона- $\alpha$ -2b человеческого рекомбинантного, а также препарата «Цитовир®-3» и вирулицидного эффекта «Тимоген®» спрея

3. Разработка модели SARS-CoV-2 инфекции на мышах линии BALB/c с инкорпорированным вектором и моделирование SARS-CoV-2 инфекции на трансгенных мышах K18-hACE2 и на мышах линии BALB/c; сравнительное изучение у них развития инфекции, индуцированной вариантами Ухань и Омикрон

4. Изучение экспериментальных образцов вакцин и лекарственных соединений в модели *in vivo* SARS-CoV-2 инфекции у трансгенных мышей K18-hACE2

**Научная новизна.** При разработке и характеристике моделей SARS-CoV-2 инфекции в культуре клеток и у лабораторных животных были использованы впервые выделенные уникальные штаммы вирусов, полученные в институте ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова из назофарингеальных мазков больных COVID-19 на культуре клеток Vero CCL81 и зарегистрированные в GenBank. Для изучения противовирусной активности препаратов в культуре клеток, впервые в отношении новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, был использован метод клеточного ИФА (In Cell-ELISA). В работе впервые в России продемонстрирована противовирусная активность в отношении новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, интерферона- $\alpha$ -2b человеческого рекомбинантного в культуре клеток Vero CCL81 и Calu-3, и умифеновира в культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3. Впервые на мышинных моделях линии BALB/c и трансгенных мышах K18-hACE2 в параллельных

сравнительных исследованиях проведено изучение развития инфекции, индуцированного вариантами Ухань и Омикрон. На модели трансгенных мышей B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlmn впервые изучены инновационные вакцинные препараты, разработанные ООО «Фирн-М» и экспериментальные соединения с противовирусной активностью, синтезированные центром высоких технологий (ЦВТ) «ХимРар».

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Получение экспериментальных моделей COVID-19, как *in vitro* в культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3, так и *in vivo* на модели трансгенных мышей, B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlmn, дает возможность изучать протективную активность кандидатных вакцин, и эффективность противовирусных препаратов в отношении SARS-CoV-2. Это даст понимание их возможности предотвратить или разорвать цикл вирусной репродукции и остановить переход болезни на более тяжелую стадию, что в конечном итоге позволяет улучшить исход заболевания у пациентов; экспериментальные модели SARS-CoV-2 инфекции могут использоваться другими исследователями, в частности, для изучения как лицензированных препаратов, так и кандидатных соединений против новой коронавирусной инфекции. Теоретическая значимость работы заключается в том, что изучение препаратов в экспериментальных моделях инфекции SARS-CoV-2 важно не только для отработки возможных подходов к выбору лекарственной терапии, но, с другой стороны, они являются инструментом получения новых данных о патогенезе путем сопоставления эффектов, оказываемых препаратами различных механизмов действия на маркеры инфекции. Корреляция клинических и экспериментальных данных позволит проводить дальнейшую оптимизацию лечения заболевания.

**Внедрение полученных результатов в практику.** Результаты работы внедрены в протоколы доклинических исследований по изучению иммуногенности и протективности инактивированной вакцины против новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 в обществе с ограниченной ответственностью «ФИРН М» (ООО «ФИРН М»). Основные научные положения, выводы и рекомендации диссертационной работы внесены в учебный курс аспирантов, обучающихся по направлению подготовки «1.5.10. Вирусология» в Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова»).

**Методология и методы исследования.** Методологическая основа диссертационной работы спланирована согласно поставленной цели исследования. Для решения поставленных задач на всех этапах исследования применялись общенаучные методы исследования и специальные методы, включающие методы работы с культурами клеток, молекулярной биологии, работы с животными. К таким методам относилась: оценка противовирусной активности препаратов на культуре клеток; определение экспрессии

нуклеопротеина SARS-CoV-2 методом клеточного ИФА (In-cell-ELISA), специально разработанный для выполнения задач исследования, ПЦР в реальном времени, а также патоморфологические исследования органов. Для оценки полученных результатов использовали классические методы прикладной статистики; визуализацию полученных данных осуществляли с применением программного обеспечения RStudio и программы Excel.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Охарактеризованы модели SARS-CoV-2 *in vitro* на культурах клеток VeroCCL81 и Calu-3.

2. Исследованные в охарактеризованных моделях *in vitro* умифеновир и интерферон- $\alpha$ -2b человеческий рекомбинантный и «Цитовир®-3» ингибируют размножение SARS-CoV-2 в культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3, препарат «Тимоген®» спрей обладает выраженной вирулицидной активностью в отношении коронавирусной инфекции.

3. Разработана модель SARS-CoV-2 инфекции *in vivo* на мышах линии BALB/c с инкорпорированным рецептором hACE2 на основе адено-ассоциированного-вектора и охарактеризована летальная модель SARS-CoV-2 на трансгенных мышах B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlmn. Заражение штаммом Dubrovka (Ухань-подобный) трансгенных мышей K18-ACE2 и мышей линии BALB/c с инкорпорированным рецептором, приводит к потере веса и размножению вируса в легких, а у трансгенных мышей также к смертности животных.

4. Образцы экспериментальной вакцины против SARS-CoV-2 варианта Ухань при двукратной вакцинации трансгенных мышей B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlmn обладают антигенной и протективной активностью.

5. В модели *in vivo* SARS-CoV-2 инфекции на трансгенных мышах экспериментальное соединение CV03, продемонстрировало высокую эффективность, практически полностью подавляя размножение вируса в легких животных.

6. Развитие инфекции SARS-CoV-2 у мышей линии BALB/c различно при заражении их Ухань-подобным и Омикрон-подобным штаммами вируса.

**Степень достоверности результатов.** Положения и выводы являются научно обоснованными. Полученные результаты являются достоверными и опираются на экспериментальные и литературные данные. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения R-Studio (версия 1.0.143). Анализ данных «доза-эффект» проводился в пакете «drc», вер. 3,0-1. Использовалась двухпараметрическая лог-логистическая функция (LL.2). Оценка эффективных доз, а именно 50% цитотоксической концентрации (ЦТД<sub>50</sub>) и 50% эффективной концентрации (ИК<sub>50</sub>),

проводилась с использованием доверительных интервалов, основанных на асимптотике. Данные выражали как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Расчет титра вируса в легких проводили по методу, описанному М.А. Ramakrishnan, и выражали в lg (ТЦИД<sub>50</sub>/мл). Предел чувствительности метода составлял 1.5 lg. Для количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего. Статистический анализ выполняли с использованием программы Statistica 8.0. Достоверность различий между группами данных оценивали с применением U-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**Апробация результатов.** Апробация диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук была пройдена 19 июня 2024 года на научной конференции отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол №2). Основные результаты диссертационной работы были представлены на трех конференциях с международным участием New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology, посвященные подготовке и юбилею 300-летия РАН (2021-2023) и в статьях ведущих научных журналов, рецензируемых в ВАК и Scopus.

**Декларация личного участия автора.** Основная часть экспериментальной работы, такой как планирование экспериментов, культуральная работа, заражение, вакцинация и лечение животных, взятие органов животных, подготовка гистологических срезов и статистическая обработка результатов выполнены лично автором или при его участии. Проведение ПЦР, а также предоставление вируса SARS-CoV-2, штаммы «Dubrovka» (номер GenBank: MW514307.1, вариант B.1.1.317), LIA (идент. № GenBank: ON032858.1, классификация вариант BA.1.15 Omicron), Podolsk (идент. № GenBank: ON032860.1) выполнено лабораторией молекулярной вирусологии. Постановка ИФА проводилась совместно с лабораторией медицинской биотехнологии. Изучение гистологических срезов выполнено совместно с отделением экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГБУ МНИОИ им. П.А. Герцена. Анализ и обсуждение полученных результатов также выполнены лично автором, самостоятельно или при непосредственном участии автора подготовлены публикации по материалам исследования. Суммарное личное участие автора в работе составляет не менее девяноста процентов

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности** Основные научные положения диссертации соответствуют п. 1, п. 6 и п. 11 паспорта научной специальности 1.5.10. «Вирусология».

**Публикации.** Результаты работы отражены в 14 научных публикациях в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 8 статей в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, входящих в международные

реферативные базы данных и системы цитирования Scopus и 6 тезисов на международных и отечественных научных конференциях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 183 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, а также заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и одного приложения. Работа иллюстрирована 34 рисунками и содержит 18 таблиц. Список литературы состоит из 262 источников, из них 34 отечественных и 228 зарубежных.

## СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

### Материалы и методы исследования

**Клетки:** клетки эпителия почки африканской зелёной мартышки Vero SCL81 (ATCC) из коллекции НИИВС им. И.И. Мечникова (далее – культура клеток Vero) Культура клеток рака легкого человека Calu-3 HTB-55 (ATCC) из коллекции НИИВС им. И.И. Мечникова. Перевиваемая линия клеток почки африканской зеленой мартышки (*Chlorocebus aethiops*) Vero E6, предоставленная Всероссийской Коллекцией клеточных культур при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

**Вирусы:** лабораторные штаммы коронавируса SARS-CoV-2 «Dubrovka» (Ухань-подобный, идент. № GenBank: MW161041.1), LIA (Омикрон подобный, идент. № GenBank: ON032858.1), Podolsk (Дельта подобный, идент. № GenBank: ON032860.1).

**Животные:** мыши линии BALB/c (самки 15 – 16 грамм, 4 – 5 недель) гаплотип H-2d (питомника «Стезар», Владимирская обл.), трансгенные мыши линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlmn, самки и самцы (15 – 16 грамм, 4 – 5 недель, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA), транспортируемые из ФИБХ РАН Питомник «Пушино» (Столбовая, Московская обл.). Все исследования на животных одобрены Комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ НИИВС им. И.И.Мечникова (Протокол № 6 от 05.06.2024).

**Изучаемые образцы терапевтических и вакцинных препаратов:** субстанция препарата умифеновир (ООО «ОТС Фарма»), Генферон Лайт спрей назальный дозированный и Генферон Лайт капли назальные (ЗАО «БИОКАД»), назальные капли Гриппферон (ООО «Фирн-М»), «Цитовир®-3», «Тимоген®» спрей и «Мирамистин®» (АО «МБНПК Цитомед»).

Для исследований на животных ЦВТ «ХимРар» предоставили лекарственные соединения CV01, CV02, CV03, CV04 и CV05 с зашифрованными формулами. Работа проводилась в рамках НИР №2021/867. Так же ООО «Фирн-М» были переданы образцы экспериментальных

модификаций вакцины для профилактики COVID-19: вакцина FMSK20 (серия 20/1), вакцина FMSK20 (серия 20/2), вакцина FMSK20 (серия 20/3).

**Методы.** Все исследования с жизнеспособным вирусом SARS-CoV-2 проводили в помещениях класса BSL-3 в присутствии не менее двух сотрудников, согласно санитарным правилам (СанПиН) 1.3.3118-13 "Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)" и СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

**Определение цитотоксического действия препаратов в культурах клеток.** Вычисление 50% цитотоксической дозы (ЦТД50) проводили при определении выживаемости клеток количественным методом с использованием МТТ, измеряя оптическую плотность (ОП) опыта и клеточного контроля в программе Microsoft Office Excel 365. Концентрация субстанций, уменьшающая значение ОП на 50% по сравнению с контролем клеток, принималась за 50% цитотоксическую дозу (ЦТД50), вычисление которой проводили при построении кривой зависимости (выживания) с использованием пакета «drc» в программе Rstudio (Version 1.0.143) [C.Ritz,2016]. Для количественных показателей результат представлен в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Исходя из значения ЦТД 50, рассчитывали рабочие концентрации исследуемого препарата для дальнейших экспериментов.

**Определение противовирусной активности препаратов против SARS-CoV-2.** Для оценки противовирусной эффективности исследуемых препаратов, использовали культуры клеток Vero и Calu-3. Перед началом эксперимента подбирали нетоксичные концентрации препаратов, основываясь на данных по данным цитотоксичности. В выбранных концентрациях препараты добавляли к культурам в указанное в экспериментах время. Затем культуры клеток заражали вирусом SARS-CoV-2 штамм «Dubrovka». Инкубацию проводили в течение указанного в эксперименте времени при температуре 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Учет результатов проводили тремя методами. Первый – оценка снижения цитопатического действия вируса по выживаемости клеток с использованием МТТ. Второй метод заключался в определении снижения инфекционного титра вируса после обработки препаратами. Третий метод основан на выявлении экспрессии вирусного нуклеопротеина SARS-CoV-2 с помощью метода ИФА (In Cell-ELISA), который был применён впервые.

**Вирулицидное действие препаратов против SARS-CoV-2.** Изучение вирулицидного действия препаратов в отношении коронавируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero CCL81 было проведено путём титрования инкубированного с препаратом вируса с использованием количественного теста МТТ.

**Моделирование развития инфекции SARS-CoV-2 на животных моделях.** При разработке модели на мышах линии BALB/c, интраназально под углом 45° с зафиксированным в закрытом положении ртом, вводился вектор AAV-hACE2, созданный на основе адено-ассоциированного-вектора (AAV), разработанный из хелперной плазмиды pHelper («CellBioLabs, Inc.») и векторных плазмид pAAV-hACE2 и pAAVDJ-RC, кодирующих белок капсида AAV серотипа DJ («CellBioLabs, Inc.») ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Впоследствии мыши по методике, описанной выше, интраназально, в объеме 60 мкл (по 30 мкл на каждую ноздрю) под легким эфирным наркозом, заражались вирусом SARS-CoV-2. По такой же методике производилось заражение трансгенных мышей K18-hACE2.

Для исследования развития инфекции, на определенные дни проводился отбор легких для определения содержания в них вируса и вектора AAV-hACE2 (у мышей линии BALB/c) методами ОТ-ПЦР. Помимо этого, проводились клинические наблюдения за животными с целью изучения выживаемости и изменения массы тела.

**Иммунизация и оценка эффективности вакцин.** Все животные иммунизировались приготовленными образцами внутримышечно двукратно с интервалом в 21 день. Животным из контрольной группы (группы вирусного контроля) вместо препаратов вакцины в соответствующие дни вводили по 0,2 мл стерильного ФСБ внутримышечно таким же образом, как и животным из экспериментальных групп. Сыворотки крови от 5 животных из каждой группы были получены на 14-ый день после второй иммунизации. После подготовки новых полученных сывороток крови были проведены ИФА (иммуноферментный анализ) и РН (реакция нейтрализации). В качестве контроля, использовались сыворотки крови, взятые до начала опыта.

**Определение протективной активности препаратов.** В день после получения первой партии сывороток крови (соответственно опыту, через 14 дней после второй вакцинации) было проведено заражение оставшихся животных из всех групп вирусом SARS-CoV-2 Dubrovka (4,5 lgТЦИД<sub>50</sub>/мл). Протективную активность образцов на модели инфекции оценивали по трем критериям: выживаемость, уменьшение снижения веса и снижение титра в легких в группах животных, вакцинированных препаратами, по сравнению с контрольной группой.

**Получение легких и других органов мышей.** На соответствующие каждому опыту дни после инфицирования вирусом в каждой группе забивали по 4 мыши и в стерильных условиях извлекали легкие, такни головного мозга. После трехкратной промывки в растворе 0,01 М ФСБ, органы гомогенизировали и ресуспендировали в 1 мл холодного стерильного раствора ФСБ. Суспензию осветляли от клеточного дебриса центрифугированием при 2000 g в течение 10 мин.

**Определение титра вируса в легких мышей.** Определение инфекционного титра вируса SARS-CoV-2 проводилось в культурах клеток Vero CCL81 методом 10-кратных разведений с  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ . Учет результата проявления ЦПД в клетках проводили с использованием количественного теста МТТ.

**Количественное определение мРНК hACE2 в легких мышей методом ПЦР.** На 7, 14 и 21 сутки после введения AAV проводили забор легких и оценивали количество мРНК hACE2, используя обратную транскрипцию (ОТ) с ПЦР в реальном времени. Также для оценки эффективности выделения РНК и прохождения ОТ-ПЦР в образцах измеряли уровень мРНК бета-глобуринадазы мыши (Gusb).

**Количественное определение РНК коронавируса SARS-CoV-2 в легких мышей методом ПЦР.** проводилось как описано [Ленева, И. А. Et al., 2022].

**Патоморфологическое изучение легких животных.** Гистологическое исследование проводилось совместно с отделением экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГБУ МНИОИ им. П.А. Герцена как описано [Ленева, И. А. Et al., 2022].

**Анализ данных.** Численные показатели выживаемости, изменения массы тела и титра вируса были подвергнуты статистической обработке в программе “Statistica 8.0”. Сравнение выживаемости в группах мышей проводили при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Статистически значимыми считали различия между группами, если параметр  $p$  не превышал 0,05. Расчет титра вируса проводили с использованием формулы Ramakrishnan M.A в программе Excel. Значение порогового цикла для количественного определения РНК в легких методом ПЦР-РВ определялось автоматически с помощью программы RealTime\_PCR v.7.7 («ДНК-Технология») на основе математического анализа формы кривой амплификации (метод геометрический,  $C_p$ ). Для расчета концентрации вирусной РНК применяли тип анализа оптических данных «количественный со стандартами».

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

**Моделирование размножения SARS-CoV-2 в культуре клеток.** Для разработки модели было использовано три метода. Первый – оценка снижения цитопатического действия вируса по выживаемости клеток с помощью МТТ. Культуры клеток Vero CCL81 и Calu-3 заражали в высокой ( $3 \lg$  ТЦИД<sub>50</sub>/мл) и низкой ( $2 \lg$  ТЦИД<sub>50</sub>/мл) дозах, инкубируя 3-5 дней, визуальную оценивая ЦПД. Впоследствии клетки окрашивали и проводили измерение оптической плотности (ОП). Результаты показали, что ЦПД усиливается с увеличением времени инкубации и дозой заражения: на 3 день ОП составляла около 0,45–0,54, а на 5 день — около 0,11–0,12. Контрольные клетки имели ОП около 1,5–1,6 (рис. 1 А).

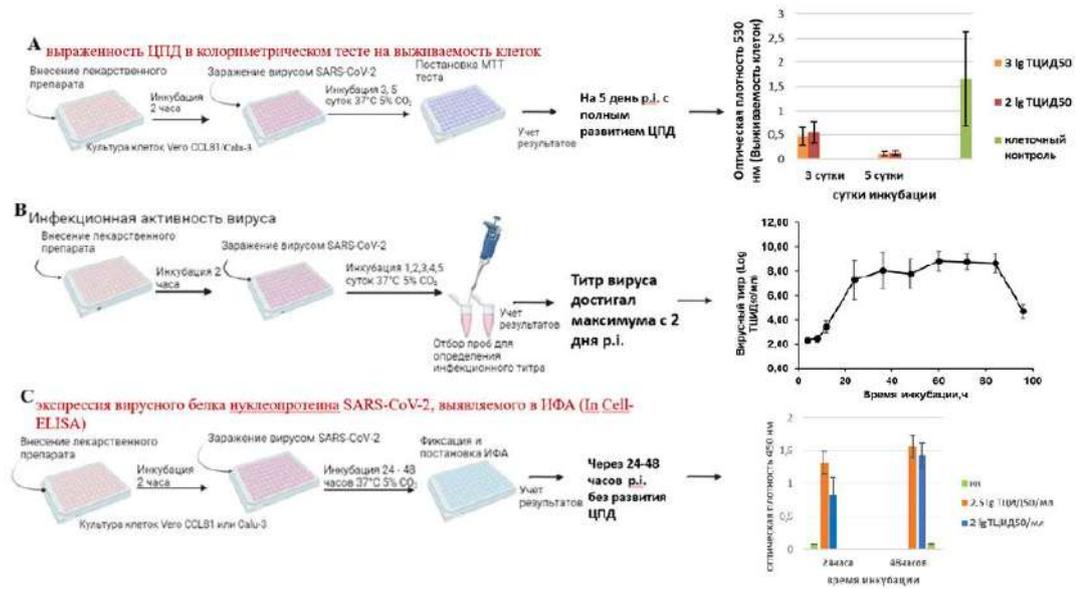


Рисунок 1 А – Схема эксперимента и результаты определения цитопатического действия вируса на культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3;

Б – Схема эксперимента и результаты определения инфекционного титра вируса на культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3;

В – Схема эксперимента и результаты детекции экспрессии вирусного белка нуклеопротеина SARS-CoV-2, выявляемого в ИФА на культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3

Второй метод заключался в определении снижения инфекционного титра вируса после обработки препаратами. Для этого отбирали пробы культур клеток Vero CCL81 или Calu-3, заражённых вирусом и обработанных препаратами на 2, 3 и 5 сутки инкубации и титровали методом 10-кратных разведений в культурах клеток (Vero CCL81 или Calu-3 соответственно). Как и в первом методе, при увеличении степени заражения титр вируса возрастал, однако в отличие от первого теста, максимальный уровень вирусного титра наблюдался на 3 сутки инкубации (рис. 1 В). Третий метод основан на выявлении экспрессии вирусного нуклеопротеина SARS-CoV-2 с помощью метода ИФА (In Cell-ELISA), который был применён впервые. После инкубации клеток с вирусом в дозах 2,5 и 2 lg ТЦИД<sub>50</sub> в течение 24 или 48 часов среду удаляли, а клетки фиксировали добавлением 80% ацетона в PBS для сохранения антигена. В качестве контрольных использовали клетки, не инфицированные вирусом. Экспрессию вирусного антигена выявляли с использованием моноклональных антител к нуклеопротеину SARS-CoV-2 (HyTest, RF) и конъюгата антител кролика к IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, A9044). При разработке системы было выявлено, что максимальная экспрессия вирусных белков и наиболее выраженная разница между заражёнными и контрольными клетками наблюдалась на 48

часах после заражения. При этом данные для культур клеток Vero CCL81 и Calu-3 были практически идентичны (рис. 1 С). Таким образом, нами было проведено моделирование новой коронавирусной инфекции в культуре клеток для изучения противовирусной активности препаратов в отношении новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2.

### **Изучение противовирусной активности на клеточных моделях**

**Изучение противовирусной активности препаратов, входящих во временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение коронавирусной инфекции COVID-19» версия 17 от 14.12.2022.** Клеточные модели были использованы для оценки противовирусной активности препаратов, входящих в рекомендации «профилактика, диагностика и лечение COVID-19» (версия 17 от 14.12.2022): умифеновира и интерферона- $\alpha$ -2b человеческого рекомбинантного (ИНФ- $\alpha$ ).

В первой серии экспериментов, нами был проведен скрининг цитотоксичности препаратов в диапазоне 5-30 мкг/мл для умифеновира и 0,01 – 10<sup>3</sup> МЕ/мл для ИНФ- $\alpha$ . После инкубации 72 часа на культурах Vero CCL81 и Calu-3 визуально не было выявлено цитотоксических изменений монослоя, что было подтверждено методом МТТ.

При исследовании противовирусной активности препаратов, было выявлено, что умифеновир селективно ингибировал репродукцию SARS-CoV-2, эффект усиливался с ростом концентрации препарата и снижением дозы вируса, снижая вирусный титр на 2 логарифма (3 lg ТЦИД<sub>50</sub> препаратов vs 5 lg ТЦИД<sub>50</sub> для вирусного контроля). Изучение эффекта препаратов на инфекционный титр вируса выявило, что ИНФ- $\alpha$  значительно, более чем на 2 lg ТЦИД 50 /мл ингибировал репликацию SARS-CoV-2, так же демонстрируя дозозависимый ответ.

В следующей серии экспериментов было проведено изучение активности умифеновира на снижение экспрессии вирусного белка SARS-CoV-2 методом ИФА. Было продемонстрировано подавление вирусной репродукции, при этом ингибирование было сильнее через 24 часа после заражения и при меньшей дозе вируса. Значения ИК50 через 48 часов были выше, чем через 24 часа, и составляли около 20±7.4 мкг/мл при заражении 2 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл. Эффективность умифеновира зависела от времени добавления: он был наиболее активен за 2 часа до заражения, а при более поздних сроках снижалась. Умифеновир в концентрации 31,5 мкМ (близкой к ЕС50) также снижал вирусный титр на 2 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл по сравнению с 5 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл в контроле. При этом умифеновир более эффективно снижал вирусное ЦПД при низкой дозе вируса (2 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл), чем при высокой (3 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл).

**Изучение противовирусной активности препарата «Цитовир®-3» в культуре клеток Vero в отношении вируса SARS-CoV-2.** Изучение противовирусной активности препарата «Цитовир®-3» в отношении SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero продемонстрировало, что в нетоксических концентрациях при введении препарата за 2 часа до заражения, способен ингибировать репродукцию вируса до 30% при концентрации 100мкг/мл (таблица 1). Эффективность препарата так же зависела от схемы добавления: наиболее выраженными были результаты при добавлении препарата за 24 часа до заражения и через 1 час и 24 часа после заражения, ингибируя SARS-CoV-2 до 50% в той же концентрации (таблица 1).

Таблица 1 – Ингибирование репродукции вируса SARS-CoV-2 препаратом «Цитовир®-3» в культуре клеток Vero при различных схемах добавления к клеткам

Ингибирование вирусной активности, %					
Схема введения, время до (-) и после (+) инфицирования	Концентрации препарата (мкг/мл)				
	5	10	50	75	100
- 24 часа	16	19	21	24	49
- 2 часа	4	0	16	32	31
+ 1 час	17	42	49	52	53
+24 часа	16	38	39	41	53
+ 48 часа	0	1	4	29	37
+72 часа	0	0	3	9	16

**Изучение вирулицидного действия препаратов «Тимоген®» спрей и «Мирамистин®» в отношении вируса SARS-CoV-2.** Помимо использования противовирусных препаратов широкого спектра действия, для предотвращения микробной контаминации активно применяют нестерильные жидкие лекарственные формы, содержащие антисептические компоненты, такие как «Тимоген®» спрей и «Мирамистин®». При исследовании вирулицидной активности препарата «Тимоген®» спрей в отношении SARS-CoV-2, было выявлено, что в неразведенном виде он обладает выраженной вирулицидной активностью *in vitro*, значительно снижая вирусный титр, демонстрируя дозозависимый ответ. В то же время «Мирамистин®»,

используемый в качестве контроля, не продемонстрировал заметной вирулицидной активности (таблица 2).

Таблица 2 - Вирулицидный эффект препаратов «Тимоген® спрей» и «Мирамистин®» в отношении вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero

Разведение вируса, lg ТЦИД <sub>50</sub> /мл	Препараты	Тимоген-спрей						Мирамистин		Вирусный контроль
		неразв *	1:5	1:10	1:50	1:100	1:500	неразв в*	1:500	
6,9	Титр вируса lg ТЦИД <sub>50</sub> /мл	4,17	4,50	5,50	5,50	4,50	4,83	4,50	4,50	4,83
5,2		2,83	4,93	5,17	5,17	4,83	5,17	4,50	4,83	5,17

Примечание: неразв – неразведенный препарат

**Моделирование инфекции SARS-CoV-2 на мышах линии BALB/c с инкорпорированным рецептором hACE2.** В первой серии экспериментов проводилось сравнение экспрессии hACE2 в легких животных при использовании адено-ассоциированного-вектора и одну из плазмид (pAAV6-RC6, pAAV9-RC или pAAVDJ-RC), кодирующие капсиды трех разных серотипов: AAV9, AAV6 и AAV-DJ. Рецептор вводился путем искусственного инкорпорирования в лёгкие мышей под легким эфирным наркозом, на 7, 14 и 21 сутки после введения AAV проводили забор легких и оценивали количество мРНК hACE2, используя обратную транскрипцию (ОТ) с ПЦР в реальном времени и путем измерения уровня мРНК бета-глобуринады мыши (Gusb) (рис 2 А). Исходя из полученных результатов, был выбран вектор AAV-DJ, поскольку давал наилучший результат.

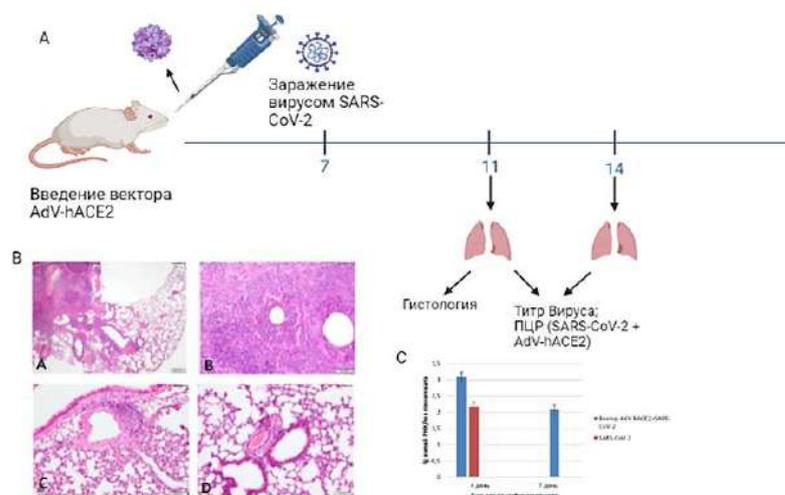


Рисунок 2 А – схема эксперимента. На 7 день после интраназального введения вектора AdV-hACE2, производили интраназальное заражение

вирусом SARS-CoV-2 штамм Dubrovka. На 11 и 14 дни опыта производился отбор легких для изучения патоморфологических изменений и определения содержания вируса;

**В** - Гистологические срезы: (А, В). Фрагменты гистологического среза доли лёгкого мыши, трансфицированной вектором AdV-hACE2 и инфицированной SARS-CoV-2. А – очаги бронхопневмонии с началом абсцедирования; В – просветы бронхиол заполнены гнойным экссудатом. А – увел.:  $\times 40$ , В – увел.:  $\times 200$ ; окр.: гематоксилин и эозин. (С, D). Фрагменты гистологического среза доли лёгкого мыши, инфицированной SARS-CoV-2. В адвентициальной оболочке некоторых бронхов и бронхиол, а также некоторых сосудов, расположены небольшие скопления лимфоцитов. С, D – увел.:  $\times 200$ . Окр.: гематоксилин и эозин;

**С** – Инфекционный титр вируса ( $\lg$  ТЦИД<sub>50</sub>/мл) и содержание вирусной РНК ( $\lg$  копий РНК/мл) SARS-CoV-2 в легких на 4 и 7 дни после инфекции

После подбора вектора и определения дня максимальной экспрессии вектора hACE2 в легких мышей, производилось интраназальное заражение вирусом SARS-CoV-2. На 4 день наблюдался наибольший вирусный титр в легких животных, снижаясь к 7 дню после заражения (рис. 2 С). Инкорпорированный вектор детектировался в оба дня. Гистологическое исследование показало, что в группах, инкорпорированных рецептором и зараженных вирусом SARS-CoV-2, определялись обширные очаги бронхопневмонии (рис. 2 В). Просветы бронхов были заполнены гнойным экссудатом, состоящим из гибнущих нейтрофилов и макрофагов. В группе, зараженной только вирусом SARS-CoV-2, в адвентициальной оболочке отдельных бронхов и некоторых сосудов определялись небольшие скопления лимфоцитов.

**Моделирование инфекции SARS-CoV-2 на трансгенных мышях K18-hACE2.** В качестве второго подхода для моделирования новой коронавирусной инфекции нами были использованы трансгенные мыши K18-hACE2. Животные заражались интраназально штаммом Dubrovka в дозах от 5,5 до 7,5  $\lg$  ТЦИД<sub>50</sub>/мл (рис. 3 А). Животные погибли на 7-й день после заражения, при этом потеря массы тела составила около 25% (рис 3 В, 3 С). Максимальный титр вируса в легких был зафиксирован на 4-й день —  $6,9 \pm 0,69 \lg$  ТЦИД<sub>50</sub>/мл, а на 7-й — снизился до  $4,9 \pm 0,57$ . Анализы ПЦР показали соответствующие уровни вирусной РНК —  $10,6 \pm 0,1$  и  $9,9 \pm 1,1 \lg$  копий/мл соответственно (рис. 3 D). Высокие титры вируса свидетельствуют об остром течении инфекции и приводят к летальному исходу. Таким образом, была создана и охарактеризована летальная модель для изучения

SARS-CoV-2. Эта модель успешно использовалась для оценки эффективности кандидатных вакцин и противовирусных препаратов.

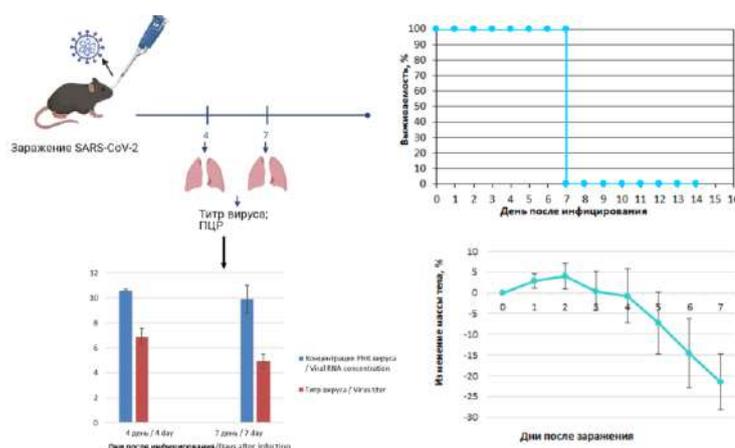


Рис.3. А - Схема эксперимента. Животные заражались вирусом SARS-CoV-2 штамм Dubrovka, на 4 и 7 дни после инфекции производилось гуманное умерщвление животных и отбор легких для определения содержания вируса;

В –Выживаемость трансгенных мышей K18-hACE2, инфицированных вирусом SARS-CoV-2 штамм Dubrovka;

С –Масса тела трансгенных мышей K18-hACE2, инфицированных вирусом. Линия показывает среднее значение веса  $\pm$  стандартное отклонение;

Д –Инфекционный титр вируса (lg ТЦИД<sub>50</sub>/ мл) и содержание вирусной РНК (lg копий РНК/ мл) SARS-CoV-2 в легких на 4 и 7 дни после инфекции.

**Изучение экспериментальных образцов вакцин на мышинной модели коронавирусной пневмонии.** В данном опыте производилась оценка иммуногенности и протективной активности вакцин, основанных на S-белке SARS-CoV-2, с различными адъювантами (гидрокид алюминия, флагеллин и их комбинации). Мышей двукратно вакцинировали с интервалом 21 день внутримышечно объемом 0,2 мл (по 0,1 мл на мышцу задней конечности). После вакцинации через 14 дней производилось заражение мышей вирусом SARS-CoV-2 штамма Dubrovka. Образцы сывороток и легких забирались в определённые сроки (рис. 4).

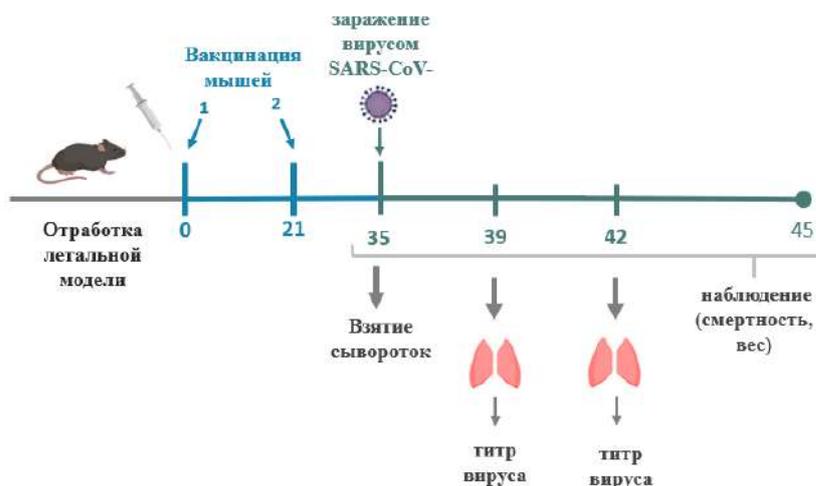


Рисунок 4 – Схема эксперимента изучения экспериментальных образцов вакцин на мышинной модели коронавирусной пневмонии.

После второй иммунизации у большинства вакцинированных животных выявлялись антитела к S-белку методом ИФА и вируснейтрализующие антитела в реакции нейтрализации (РН). Наиболее выраженная иммуногенность наблюдалась у вакцины FMSK20 (серия 20/1), содержащей S-белок + гидроксид алюминия. Так же данный экспериментальный образец вакцины полностью защищал мышей от гибели после заражения вирусом SARS-CoV-2. Вакцинация приводила к значительному снижению титра вируса в легких, более чем на 2 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл по сравнению с вирусным контролем, что коррелировало с данными, полученными при постановке ПЦР, так же увеличивалась средняя продолжительность жизни – 14 дней против 7 у вирусного контроля.

**Изучение противовирусной активности инновационных препаратов на мышинной модели коронавирусной пневмонии.** Для проведения экспериментов, компания ЦВТ ХимРар (лаборатория разработки методов генной терапии) предоставила 5 образцов ингибиторов протеаз с зашифрованными формулами. Введение препаратов осуществлялось внутрибрюшинно за 1 час до заражения и через 6 часов после него, а затем дважды в сутки в течение 4 дней с последующим наблюдением за ними (рис. 5). Эффективность образцов на модели инфекции оценивали по титру вируса в легких животных и уменьшению снижения веса в группах леченных животных по сравнению с контрольной группой.

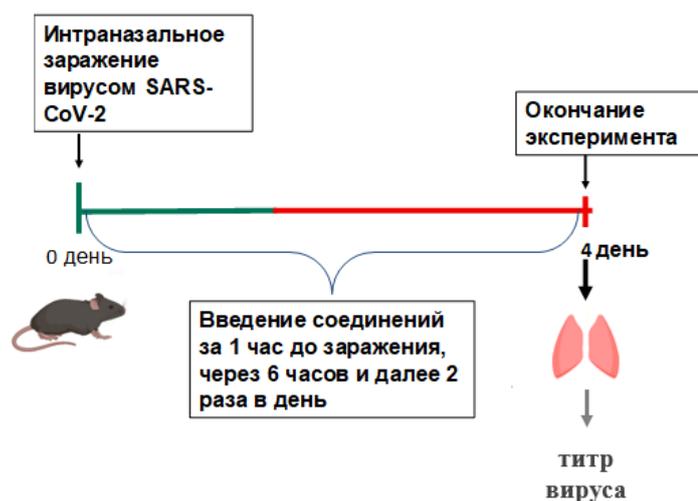


Рисунок 5 – Схема эксперимента по изучению противовирусной активности инновационных препаратов на мышинной модели коронавирусной пневмонии

Результаты продемонстрировали, что наиболее эффективным препаратом оказался CV03 — при обеих дозах (100 и 200 мг/кг) он полностью подавлял размножение вируса (титр  $<1,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ), предотвращая снижение массы тела животных. По результатам первого опыта, был проведен второй с выборкой различных препаратов, а также их комбинаций. Дизайн эксперимента совпадал с первым опытом. В группах, леченных препаратом CV03 в обеих дозах (25 и 50 мг/кг) или его комбинацией с другим препаратом, где было полное или значительное подавление размножение вируса. Однако, использование данного препарата в комбинациях с другими, не увеличивало его эффективность, титр вируса практически не изменялся, что коррелировало с данными по потере веса у животных, которой практически не наблюдалась.

**Моделирование SARS-CoV-2 у мышей линии BALB/c для изучения развития инфекции вариантов, отличающихся повышенной эпидемиологической значимостью (VOC).** В ходе пандемии SARS-CoV-2 вирус постоянно мутировал, приводя к возникновению вариантов, отличающихся повышенной эпидемиологической значимостью (VOC). Так, в 2022 году штамм омикрон (B.1.1.529) практически полностью вытеснил ранние варианты, что создает риск формирования новых зоонозных резервуаров и дальнейшего распространения вируса. штамм – Омикрон, способен заражать устойчивых к SARS-CoV-2 мышей дикого типа, однако полного анализа чувствительности произведено не было. В связи с этим, нами было принято решение использовать мышей линии BALB/c для сравнения развития инфекции при параллельном заражении штаммами Dubrovka (Ухань-подобным) и LIA (Омикрон-подобным). В качестве контрольных мышей при исследовании развития инфекции штамма Dubrovka (Ухань-подобным) использовали трансгенных мышей K18-hACE2. Мыши

заражались интраназально и на 4 день после заражения гуманно умерщвлялись для отбора органов с целью изучения количества РНК методом ОТ-ПЦР-РВ и патоморфологического изучения органов (рис. 6).



Рисунок 6 – Схема эксперимента по сравнению развития инфекции разных вариантов SARS-CoV-2 на мышах линии BALB/c

При заражении K18-hACE2 штаммом Dubrovka наблюдалась 100% летальность к 7 дню, выраженные клинические признаки и значительная потеря массы тела. В то время как у BALB/c инфекция протекала без тяжелых клинических проявлений и смертности; вирусная нагрузка в легких была высокой на 4 день у штамма Dubrovka и сохранялась у штамма LIA, однако к 7 дню вирус не обнаруживался в легких BALB/c при заражении LIA (рис. 7).



Рисунок 7 – размножение вируса в органах мышей, инфицированных штаммами Dubrovka и LIA

Патоморфологическое исследование показало, что гистологическая картина лёгких мышей BALB/c, инфицированных штаммом Dubrovka (Ухань-подобным), в целом соответствовала таковой у интактных мышей. Однако в лёгких зараженных мышей чаще, чем у незаражённых животных, встречались небольшие скопления лимфоцитов, располагавшиеся в стенке бронхов либо периваскулярно. Эти слабо выраженные воспалительные

изменения, вероятно, являются иммунным ответом на антигенную стимуляцию и не оказывают значительного повреждающего действия. Несмотря на высокое содержание вируса в лёгких, при заражении мышей BALB/c вариантом LIA (Омикрон-подобным) признаки развития интерстициальной (вирусной) пневмонии, так же, как и в случае заражения штаммом Dubrovka (Ухань-подобный), не обнаружены. Полученные данные об адаптации Омикрон-подобного штамма SARS-CoV-2 к мышам вызывают опасения по поводу распространения тропизма новых вариантов к – новым хозяевам, которые изначально были невосприимчивы к данной инфекции. Это создает потенциальный риск возникновения новых зоонозных резервуаров и возможного распространения новых вариантов у людей, что диктует необходимость постоянного мониторинга возникающих вариантов SARS-CoV-2.

## ВЫВОДЫ

1. Охарактеризованы клеточные модели для изучения течения коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 в культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3 с использованием методов ингибирования ЦПД, снижения инфекционного титра вируса и экспрессии вирусных белков в In-cell-ELISA.
2. Установлено, что умифеновир и интерферон- $\alpha$ -2b рекомбинантный человеческий обладают противовирусной активностью в моделях SARS-CoV-2 инфекции на культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3, выявляемой методами ингибирования ЦПД, снижения инфекционного титра вируса и экспрессии вирусных белков в In-cell-ELISA. Умифеновир (от  $10.4 \pm 2.4$  мкг/мл до  $28.0 \pm 1.0$  мкг/мл) и интерферон- $\alpha$ -2b (от 5000 МЕ/мл до 10000 МЕ/мл) селективно подавляли репродукцию SARS-CoV-2, ингибирование увеличивалось с возрастанием их концентрации и с уменьшением дозы заражения вирусом.
3. Препарат «Цитовир®-3» в концентрациях 75 мкг/мл и 100 мкг/мл ингибировал ЦПД, индуцируемое SARS-CoV-2, на 52% - 53% при внесении препарата через час после инфицирования клеток. «Тимоген®» спрей в дозировке 25мкг/мл обладал выраженной вирулицидной активностью, снижая инфекционный титр SARS-CoV-2 на 2,34 lg ТЦИД50/мл в модели *in vitro*.
4. Разработана модель SARS-CoV-2 инфекции *in vivo* на мышях линии BALB/c с инкорпорированным рецептором hACE2 на основе адено-ассоциированного-вектора и охарактеризована летальная модель SARS-CoV-2 на трансгенных мышях B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlmn. Заражение штаммом Dubrovka (Ухань-подобный) трансгенных мышей K18-ACE2 и мышей линии BALB/c с

инкорпорированным рецептором, приводит к заболеванию, выражающемуся в потере веса и размножению вируса в легких, а у трансгенных мышей также к смертности животных.

5. Двухкратная вакцинация экспериментальными образцами вакцины на основе S белка SARS-CoV-2 Ухань-подобного варианта с различными адъювантами обеспечивала образование IgG антител к Spike белку SARS-CoV-2, вируснейтрализующих антител, а также предотвращала потерю их веса и снижала размножение вируса в легких и от гибели инфицированных трансгенных мышей K18-ACE2.

6. Изучение эффективности 5 соединений из класса ингибиторов протеаз выявило наиболее активное соединение CV03, лечение которым в дозах 100 и 200 мг/кг практически полностью подавляло размножение вируса в легких трансгенных мышей K18-ACE2.

7. Сравнительная характеристика развития инфекции, вызванной различными вариантами SARS-CoV-2, у мышей BALB/c показала, что при заражении штаммами Dubrovka (Ухань-подобный) и LIA (Омикрон-подобный) инфекция протекала без клинических признаков (смертности и потери массы), однако высокое содержание вирусной РНК в легких, и тканях мозга выявлялась только при заражении штаммом LIA (Омикрон-подобный).

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

1. Игнатъев Г.М. Формирование специфического иммунитета у лабораторных животных после одновременной вакцинации против сезонного гриппа и COVID-19. / Игнатъев Г.М., Ленева И.А., Отрашевская Е.В., Козловская Л.И., **Карташова Н.П.**, Федякина И.Т., Шустова Е. Ю, Синюгина А.А., Зверев В.В., Трухин В.П., Ишмухаметов А.А. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2021. —Т.98, № 6. — С. 648-656. DOI: 10.36233/0372-9311-183
2. Черепович Б. С. Псевдонейтрализующий тест для доклинических исследований вакцин против SARS-CoV-2. / Черепович Б. С., Кудряшова А. М., **Карташова Н. П.**, Грачева А. В., Мануйлов В. А., Ленева И. А., Борисова О. В., Свитич О. А. // Медицинская иммунология. — 2024. — Т26, №3. — С. 569-576. DOI: 10.15789/1563-0625-PTF-2905
3. Смирнов В.С. Возможности подавления цитопатогенного действия коронавируса SARS-CoV-2 по результатам изучения противовирусной активности препарата Цитовир®-3 in vitro. / Смирнов В.С., Ленева И.А., Кудрявцева Т.А., Файзулов Е.Б., Заплутанов В.А., Петленко С.В.,

- Карташова Н.П.**, Грачева А.В., Корчевая Е.Р. // Антибиотики и Химиотерапия. — 2021. — Т. 66, № 5–6. — С. 4–10. DOI: 10.37489/0235-2990-2021-66-5-6-4-10
4. Ленева И.А. Местная противовирусная активность препарата «Тимоген®», спрей назальный дозированный, в отношении коронавируса SARS-CoV-2 *in vitro*. / Ленева И.А., Смирнов В.С., Кудрявцева Т.А., Файзулов Е.Б., Грачева А.В., **Карташова Н.П.**, Заплутанов В.А., Петленко С.В. // Антибиотики и Химиотерапия. — 2021. — Т. 66, № 5-6. — С.11-16. DOI: 10.37489/0235-2990-2021-66-5-6-11-16
  5. Leneva I. Antiviral Activity of Umifenovir *In Vitro* against a Broad Spectrum of Coronaviruses, Including the Novel SARS-CoV-2 Virus. / Leneva I, **Kartashova N**, Poromov A, Gracheva A, Korchevaya E, Glubokova E, Borisova O, Shtro A, Loginova S, Shchukina V, Khamitov R, Faizuloev E. // *Viruses*. — 2021. — Vol. 13, №8. — P. 1665. DOI: 10.3390/v13081665
  6. Д. В. Глазкова. Моделирование инфекции SARS-CoV-2 у мышей за счет транзientной экспрессии гена ACE2 человека путем интраназального введения AAV-hACE2. / Д. В. Глазкова, Е. В. Богословская, Ф. А. Урусова, **Н. П. Карташова**, Е. А. Глубокова, А. В. Грачева, Е. Б. Файзулов, Г. В. Трунова, В. А. Хохлова, О. А. Безбородова, А. А. Панкратов, И. А. Ленева, Г. А. Шипулина. // Молекулярная биология. — 2022. — Т. 56, № 5. — С. 1-9. DOI: 10.31857/S0026898422050068
  7. Ленева И.А. Сравнительное изучение ухань-подобного и омикрон-подобного вариантов SARS-CoV-2 на экспериментальных животных моделях. / Ленева И.А., Смирнова Д.И., **Карташова Н.П.**, Грачева А.В., Иванина А.В., Глубокова Е.А., Корчевая Е.Р., Панкратов А.А., Трунова Г.В., Хохлова В.А., Свитич О.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. // Вопросы вирусологии. — 2022. — №5. — С. 439 – 449. DOI: 10.36233/0507-4088-135
  8. **Карташова Н.П.** Противовирусная активность комбинации интерферона альфа-2b и таурина *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2. / **Карташова Н.П.**, Иванина А.В., Глубокова Е.А., Фалынскова И.Н., Поромов А.А., Ленева И.А. // Антибиотики и Химиотерапия. — 2022. — Т. 66, № 9-10. — С. 35-41 DOI: 10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-35-41
  9. Игнатъев Г.М. Совместное использование вакцин «ФЛЮ-М» и «Ковивак» в эксперименте. / Игнатъев Г.М., Ленева И.А., Козловская Л.И., **Карташова Н.П.**, Волок В.П., Отрашевская Е.В., Федякина И.Т.,

- Шустова Е.Ю., Трухин В.П., Зверев В.В., Ишмухаметов А.А. // Сборник тезисов онлайн-конгресса с международным участием под редакцией В.Г. Акимкина «Молекулярная диагностика и биобезопасность-2021. COVID-19: эпидемиология, диагностика, профилактика». — Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2021. — С. 134-135.
10. **Карташова Н.П.** Противовирусная активность этиотропных препаратов в культуре клеток в отношении SARS-COV-2. / **Карташова Н.П.**, Ленева И.А., Грачева А.В., Корчевая Е.Р., Файзулов Е.Б. // Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН под редакцией В. В. Зверева «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology». — Москва, ООО «Издательство «Перо», 2021. — С 19.
11. **Карташова Н.П.** Разработка летальной модели коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 на трансгенных мышах линии B6.CG-TG(K18-ACE2)2PRLMN/HEMI HEMIZYGOUS FOR TG(K18-ACE2)2prlmn и оценка иммуногенности и протективности вакцины. / **Карташова Н.П.**, Глубокова Е.А., Ленева И.А., Грачева А.В., Корчевая Е.Р., Файзулов Е.Б. // Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН под редакцией В. В. Зверева «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Epidemiology and Immunology». — Москва, ООО «Издательство «Перо», 2022. — С 15-16.
12. Глубокова Е.А. Разработка экспериментальной модели инфекции SARS-Cov-2 у мышей при интраназальном введение аденоассоциированного вектора, кодирующего рецептор hACE2. / Глубокова Е.А., **Карташова Н.П.**, Ленева И.А., Панкратов А.А., Грачева А.В., Корчевая Е.Р., Файзулов Е.Б. // Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН под редакцией В. В. Зверева «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Epidemiology and Immunology». — Москва, ООО «Издательство «Перо», 2022. — С 6-7.
13. **Карташова Н.П.** Сравнительное изучение патогенеза штаммов SARS-COV-2 на мышинных моделях. / **Карташова Н.П.**, Глубокова Е.А., Иванина А.В., Ленева И.А., Грачева А.В., Корчевая Е.Р., Файзулов Е.Б. // Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН под редакцией В. В. Зверева «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology,

Immunology and Epidemiology». — Москва, ООО «Издательство «Перо», 2023. — С 22-23.

14. Глубокова Е.А. Ингибирование SARS-COV-2 инфекции новыми противовирусными препаратами у трансгенных мышей линии B6.CG-TG(K18-ACE2)2PRLMN/HEMI HEMIZYGOUS FOR TG(K18-ACE2)2PRLMN. / Глубокова Е.А., Ленева И.А., **Карташова Н.П.**, Файзулов Е.Б. // Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН под редакцией В. В. Зверева «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology». — Москва, ООО «Издательство «Перо», 2023. — С 15.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

SARS-COV-2 – тяжёлый острый респираторный синдром, вызванный коронавирусом-2

COVID 19 – коронавирусное заболевание 2019 года

Vero CCL81 – клетки эпителия почки африканской зелёной мартышки

Calu-3 – клетки метастаз аденокарциномы легких человека

РНК – рибонуклеиновая кислота

ACE2 – ангиотензин-превращающий фермент 2

hACE2 – рецептор ACE2, аналогичный человеческому

RTC - репликационно-транскрипционный комплекс коронавирусов

ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор

ТМБ - тетраметилбензидин

MEM – минимальная среда Игла

DMEM – модифицированная по методу Дульбекко минимальная среда Игла

ФБС – фетальная бычья сыворотка

ДМСО – диметил сульфоксид

МТТ- колориметрический тест для оценки выживаемости клеток

МПК – максимально переносимая концентрация

ЦТД – цитотоксическая доза

SD – стандартное отклонение

ЦПД – цитопатическое действие

РС – рабочая среда

РН – реакция нейтрализации

ИФА – иммуноферментный анализ

RBD – рецептор-связывающий домен белка S

ОП – оптическая плотность

ИП – индекс позитивности

КП – коэффициент подавления

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ОТ-ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени

ИК50 – ингибирующая концентрация 50

ТЦИД, ТСІD – тканевая цитопатическая инфекционная доза

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

МОІ – multiplicity of infection (множественность заражения)

AAV – адено-ассоциированный вектор

Сt – средний пороговый цикл