

## ВАРИАНТ ВИРУСА ГРИППА В, АДАПТИРОВАННЫЙ К МЫШАМ, ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЛЕЧЕБНОЙ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Е.А. Прокопьева<sup>1,2</sup>, О.Г. Курская<sup>1</sup>, М.В. Соломатина,<sup>1</sup> И.А. Соболев<sup>1</sup>, Т.А. Мурашкина<sup>1</sup>, А.А. Дёрко<sup>1</sup>, К.В. Корчагина<sup>3</sup>, А.Ю. Юнусова<sup>3</sup>, А.Ю. Алексеев<sup>1,4</sup>, А.М. Шестопалов<sup>1</sup>, С.В. Сысолятин<sup>5</sup>, А.Б. Ворожцов<sup>6</sup>, О.Е. Ваизова<sup>7</sup>, Е.Ю. Шерстобоев<sup>8</sup>, К.А. Шаршов<sup>1</sup>, А.М. Дыгай<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия

<sup>5</sup> Институт проблем химико-энергетических технологий, Бийск, Россия

<sup>6</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

<sup>7</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

<sup>8</sup> Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра, Томск, Россия

### Mouse-adapted influenza B virus for *in vitro* and *in vivo* assessment of therapeutic and preventive efficacy of antiviral drugs

E.A. Prokopyeva<sup>1,2</sup>, O.G. Kurskaya<sup>1</sup>, M.V. Solomatina<sup>1</sup>, I.A. Sobolev<sup>1</sup>, T.A. Murashkina<sup>1</sup>, A.A. Derko<sup>1</sup>, K.V. Korchagina<sup>3</sup>, A.Yu. Yunusova<sup>3</sup>, A.Yu. Alekseev<sup>1,4</sup>, A.M. Shestopalov<sup>1</sup>, S.V. Sysolyatin<sup>5</sup>, A.B. Vorozhtsov<sup>6</sup>, O.E. Vaizova<sup>7</sup>, E.Yu. Sherstoboev<sup>8</sup>, K.A. Sharshov<sup>1</sup>, A.M. Dygai<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> Dagestan State University, Makhachkala, Russia

<sup>5</sup> Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Biysk, Russia

<sup>6</sup> National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

<sup>7</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

<sup>8</sup> Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D. Goldberg of Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia

### Резюме

*Цель:* разработка нового, обладающего антигенной актуальностью, штамма вируса гриппа типа В, пригодного для моделирования гриппозной инфекции у экспериментальных мышей для оценки лечебной и профилактической эффективности противовирусных препаратов *in vivo* и *in vitro*.

*Материалы и методы:* была проведена адаптация вируса гриппа В на мышах линии BALB/c. Выполнена сравнительная оценка патогенности родительского и адаптированного вариантов вируса гриппа В в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Используя адаптированный вариант вируса гриппа В, проведена оценка ингибирования нейраминидазы с помощью противовирусных лекарственных средств (осельтамивира этоксисулцинат и Тамифлю®).

*Результаты:* полученный адаптированный вариант вируса гриппа В штамм B/Novosibirsk/40/2017-MA мо-

### Abstract

*Objective:* to develop a new antigenic relevance influenza B virus suitable for modeling influenza infection in mice to assess of *in vivo* and *in vitro* therapeutic and preventive efficacy of antiviral drugs.

*Materials and methods:* was carried out an adaptation of influenza B virus in BALB/c mice. Was performed comparative assessment of *in vivo* and *in vitro* pathogenicity of the parental virus and adapted influenza B virus. Was assessed inhibition of neuraminidase with antiviral drugs (oseltamivir ethoxyacrylate and Tamiflu) in relation to the adapted influenza B virus.

*Results:* adapted influenza B virus (B/Novosibirsk/40/2017-MA strain) models non-lethal influenza infection with pronounced clinical signs of the disease in experimental animals. Were described the destructive changes in lungs and brain that increases during infection. Analysis of internal organs (lungs, brain, liver, heart,

гелирует у экспериментальных животных нелетальную гриппозную инфекцию с выраженными клиническими признаками заболевания. Описаны деструктивные изменения в лёгких и головном мозге, нарастающие в ходе инфекции. Вирусологический анализ внутренних органов (лёгкие, головной мозг, печень, сердце, почки, селезёнка) выявил репликацию вируса гриппа только в лёгких. На данной модели гриппозной инфекции проведена оценка эффективности противовирусных лекарственных средств (осельтамивира этоксисукцинат и Тамифлю®) *in vivo* и *in vitro*. Доказана высокая эффективность инновационного лекарственного средства осельтамивира этоксисукцинат.

**Заключение:** полученный антигенно актуальный вирус гриппа В штамм B/Novosibirsk/40/2017-MA может быть использован для оценки эффективности противовирусных препаратов, а также в качестве дополнительного инструмента прогнозирования эффективности вакцины против дрейфующих штаммов.

**Ключевые слова:** адаптированный вариант вируса гриппа В, гриппозная модель, противовирусные лекарственные средства (осельтамивира этоксисукцинат и Тамифлю®).

## Введение

Вирус гриппа В относится к семейству *Orthomyxoviridae*. Он способен инфицировать людей, вызывая, наряду с вирусом гриппа А, ежегодные сезонные подъёмы заболеваемости, и тюленей, которые, в свою очередь, считаются природным резервуаром вируса гриппа типа В [1, 2, 3]. Инфекция, вызванная вирусом данного типа, может привести к серьёзному респираторному заболеванию, осложнения которого особенно часто регистрируются среди детей младшего школьного возраста (5–8 лет) [4]. В Соединённых Штатах Америки в каждом эпидемическом сезоне 2004–2011 гг. (за исключением пандемии 2009 г.) от 22 до 44% всех смертельных случаев, связанных с детским гриппом, были вызваны вирусом гриппа В. В Европе в эпидемическом сезоне 2017–2018 гг. доля заболеваний, вызванных вирусом гриппа В, составила 63% от всех случаев заболевания гриппом [5].

В 1940 г. был впервые выделен вирус гриппа В [6]. Начиная с 1980-х гг., стали выделять две генетические линии данного вируса: В/Victoria/2/87 (В/Vic) и В/Yamagata/16/88 (В/Yam). Вирусы, принадлежащие к разным генетическим линиям, различаются между собой по двум поверхностным белкам: HA (гемагглютинин) и NA (нейраминидаза). В 1980-х гг. доминировали В/Vic-подобные вирусы, а в 1990-х гг. — В/Yam-подобные. Вирусы разных линий практически не имеют антигенного перекреста при оценке в реакции торможения гемагглютинации [3, 7, 8].

С целью обеспечения защиты против сезонных вирусов гриппа создаются вакцины, которые в основном направлены на выработку антител к вирусному поверхностному белку HA. Постоянный антигенный дрейф HA требует регулярного обновления

*kidneys, spleen) were revealed viral load only in the lungs. Were evaluated in vivo and in vitro efficacy of antiviral drugs (oseltamivir ethoxysuccinate and Tamiflu®) on the model of influenza infection. Were proved the high efficiency of the innovative drug — oseltamivir ethoxysuccinate.*

**Conclusion:** the antigen-relevant adapted influenza B virus (B/Novosibirsk/40/2017-MA strain) can be used to assess the drug effectiveness against influenza, as well as an additional tool for predicting the effectiveness of the vaccine against drifting strains.

**Key words:** adapted influenza virus B; influenza model; antiviral drug (oseltamivir ethoxysuccinate and Tamiflu®).

вакцинных штаммов для антигенного соответствия циркулирующим в настоящее время вирусам [9]. Сезонные вакцины против гриппа подразделяются на трехвалентные, состоящие из штаммов вируса гриппа А/H1N1, А/H3N2, В/Yam или В/Vic, или четырехвалентные, содержащие все четыре перечисленных варианта вируса [10, 11, 12].

Несмотря на то, что вирус гриппа В неоднократно вызывал массовые эпидемии среди людей, его генетические детерминанты вирулентности и трансмиссивности до сих пор недостаточно изучены. Ограниченные данные о круге хозяев и отсутствие животной модели затрудняют изучение факторов патогенности, исследование способов передачи вируса гриппа В, оценку действия противовирусных лекарств и эффективности вакцин [13].

**Цель исследования** — разработка нового, обладающего антигенной актуальностью, штамма вируса гриппа типа В, пригодного для моделирования гриппозной инфекции у экспериментальных мышей для оценки лечебной и профилактической эффективности противовирусных препаратов *in vivo* и *in vitro*.

## Материалы и методы

*Адаптация штамма вируса гриппа В/Novosibirsk/40/2017 (Victoria lineage) к мышам линии BALB/c*

Все работы с животными одобрены Комитетом по биомедицинской этике при ФИЦ ФТМ.

Штамм B/Novosibirsk/40/2017 (Victoria lineage) (далее В/2017) выделен из носоглоточного мазка человека (Новосибирская область, 2017 г.) в культуре клеток MDCK (Madin-Darby canine kidney). Адаптированный вариант вируса B/Novosibirsk/40/2017-MA

(далее В/2017-МА) получен в серии последовательных пассажей через лёгкие мышшей. Для этого 8-недельных мышшей (масса тела 18–20 г) линии BALB/c (питомник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор») анестезировали Рометаром (2 мг/кг) и инфицировали интраназально  $10^4$  TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infective dose) вируса В/2017 в 50 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ). На третьи сутки после инфицирования 3 мышшей умерщвляли путём декапитации и из их лёгких готовили 10% гомогенаты на ФСБ. После этого вновь проводили интраназальное заражение мышшей 10% гомогенатами лёгких в объёме 50 мкл. Параллельно на каждом пассаже оставляли по 4 животных для оценки клинических симптомов заболевания, измерения массы тела и определения летальности в течение 14 суток после инфицирования. Инфекционные титры вируса в лёгких мышшей на каждом пассаже определяли титрованием 10% гомогената из лёгких мышшей в культуре клеток MDCK [14].

Штаммы В/2017 и В/2017-МА депонированы в Государственную коллекцию возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора под регистрационными номерами V-811 и V-810 соответственно; нуклеотидные последовательности штаммов депонированы в базу данных GISAID под номерами EPI\_ISL\_338316 и EPI\_ISL\_338315, соответственно.

*Сравнительная оценка патогенности  
родительского и адаптированного вариантов  
вируса гриппа В для мышшей линии BALB/c*

Изучение патогенности штамма В/2017-МА в сравнении с родительским штаммом В/2017 проводили на мышшах линии BALB/c (возраст 6–8 недель, вес 18–20 г; питомник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»). Было сформировано 3 группы мышшей по 12 животных в каждой группе. Животных анестезировали Рометаром (2 мг/кг) и интраназально инфицировали  $10^4$  TCID<sub>50</sub> штамма В/2017 или 10 MID<sub>50</sub> (50% mouse infectious dose) штамма В/2017-МА соответственно; животным контрольной группы (неинфицированные) интраназально вводили 0,9% раствора хлорида натрия. В течение 14 дней ежедневно производили взвешивание животных, измерение температуры тела в наружном слуховом проходе, а также вели наблюдение за животными, регистрируя клинические признаки заболевания (конъюнктивит, взъерошенность шерсти, нарушение ритма дыхания, снижение динамики передвижений, согбенная поза).

На 3-и и 6-е сутки после инфицирования по 3 животных из каждой группы выводили из эксперимента путём декапитации и брали образцы внутренних органов (лёгкие, головной мозг, сердце, печень, почки, селезёнка) для сравнительного вирусологического анализа. Инфекционную активность вируса определяли по цитопатическому дей-

ствию в культуре клеток MDCK. Для этого планшеты с суточным монослоем культуры клеток MDCK инфицировали десятикратными разведениями гомогенатов органов мышшей в диапазоне концентраций 1:10 – 1:10000. Инфекционный титр вируса рассчитывали по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [15] и выражали в lg TCID<sub>50</sub>/ml.

Для светооптического исследования были взяты лёгкие, мозг и печень от 3 животных из каждой группы на 3-и, 6-е сутки после инфицирования, которые затем фиксировали в 4% растворе формалина, затем обезвоживали по стандартной методике и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм получали с помощью ротационного микротомы НМ 340Е (Carl Zeiss, Германия), окрашивали гематоксилином и эозином. Светооптическое исследование и микрофотосъёмку проводили на микроскопе Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия).

Для электронно-микроскопического исследования образцы лёгких, взятых на 3-е сутки после инфицирования, фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 4 ч при температуре 4°, дофиксировали в 1% растворе четырёхоксида осмия, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (50°, 70°, 96°, абсолютный), смеси спирта и ацетона и завершали проводку в ацетоне. Образцы лёгких заливали в смесь аральдита-эпона (1:6) (SPI, США) с добавлением катализатора DMP-30 и полимеризовали их при 60°. Полутонкие срезы готовили из твердых блоков, окрашивали Азуром 2 и исследовали в световом микроскопе для выделения участков для ультратонкого среза. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica, Германия), контрастировали насыщенным раствором уранилацетата и цитратом свинца (SPI, США). Образцы исследовали на просвечивающем электронном микроскопе. Снимки были собраны цифровой камерой Veleta (SIS, Германия), установленной сбоку.

*Использование адаптированного  
варианта вируса гриппа В для оценки  
антинейраминидазной активности  
препаратов in vitro*

Оценка антинейраминидазной активности препаратов «Тамифлю (Осельтамивир)®» (владелец Регистрационного удостоверения – Ф. Хоффманн – Ля Рош Лтд, Швейцария) и этил (3S,4R,5S)-4-ацетамидо-5-амино-3-(1-этилпропокси)-циклогекс-1-ен-1-карбоксилата этоксисукцинат (далее осельтамивира этосукцинат) производитель: Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН (г. Бийск) [16]) проводилась по модифицированной флуориметрии, с использованием флуориметрично-



го субстрата 2-(4-метилумбеллиферил)- $\alpha$ -D-N-ацетилнейраминовой кислоты (Munana; Sigma-Aldrich) [17]. Вирусы гриппа В/2017-МА и В/2017 стандартизировали до эквивалентной активности нейраминидазы и инкубировали с осельтамивира этоксисукцинатом и Тамифлю® при значениях разведений от  $5 \times 10^{-3}$  до 5М. Флуоресценцию свободного 4-метилумбеллиферила измеряли на мультимодальном ридере планшетного формата Varioscan (Thermo Fisher Scientific) при длинах волн возбуждения и излучения 360 нм и 460 нм соответственно.

Значения 50% ингибирующей микромолярной концентрации (IC<sub>50</sub>s – micromolar 50% inhibitory concentrations) были определены с помощью программы GraphPad Prism в сравнении со значениями, представленными для группы эталонных вирусов гриппа А и В, предоставленных антивирусной группой Международного общества по гриппу и другим респираторным вирусным заболеваниям (ISIRV) [18].

*Использование адаптированного варианта вируса гриппа В для оценки эффективности противовирусных препаратов in vivo*

Изучение специфической активности противовирусных препаратов осельтамивира этоксисукцинат и Тамифлю® проводили на мышах линии BALB/c (возраст 6–8 недель, вес 18–20 г; питомник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»). Было сформировано 4 группы мышей по 10 животных в каждой. Животных 1–3 групп анестезировали Рометаром (2 мг/кг) и инфицировали интраназально 10 MID<sub>50</sub> штамма В/2017-МА в объёме 50 мкл. Животным группы 4 с применением того же анестетика интраназально вводили 0,9% раствор хлорида натрия в объёме 50 мкл. Животным группы 1 per os вводили осельтамивира этоксисукцинат, а животным группы 2 – Тамифлю® по следующей схеме: первую дозу 25 мг/кг/сут. (в объёме 200 мкл) препарата вводили через 2 ч после инфицирования, далее – через каждые 24 ч в течение 4 дней. Животным групп 3 (контроль вируса) и 4 (неинфицированные контрольные мыши) per os вводили дистиллированную воду в объёме 200 мкл по аналогичной схеме. В течение 14 дней ежедневно животных взвешивали, измеряли температуру тела в наружном слуховом проходе, регистрировали клинические признаки заболевания.

*Статистическая обработка результатов*

Полученные в ходе исследования данные обрабатывались стандартными методами нахождения средних значений и их средних ошибок. Обработку данных производили в программе Microsoft Office Excel 2016. Значения IC<sub>50</sub> рассчитывали с помощью программы GraphPad Prism.

## Результаты и обсуждение

*Адаптация штамма вируса гриппа В/Novosibirsk/40/2017 (Victoria lineage) к мышам линии BALB/c*

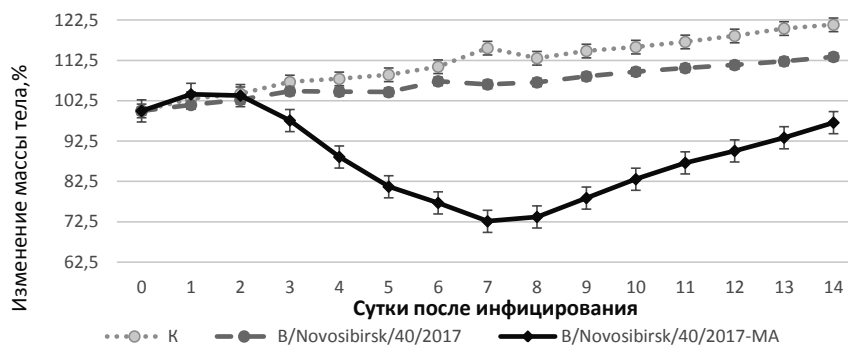
В процессе пассирования родительского штамма В/2017 через лёгкие мышей после каждого пассажа определяли инфекционный титр вируса в лёгких. После первого пассажа инфекционный титр вируса составил 3,5 lg TCID<sub>50</sub>/ml с последующим увеличением титра до 5,88 lg TCID<sub>50</sub>/ml к 17-му пассажу. У всех животных 17-го пассажа отмечались клинические признаки заболевания, начиная с 3-х суток после инфицирования, проявляющиеся в значимом снижении массы тела до 30%, гипотермии, взъерошенности шерсти. Значение 50% инфекционной дозы для мышей (MID<sub>50</sub>) адаптированного варианта вируса В/2017-МА составило  $4,6 \pm 0,26$  lg/ml, или 1,88 TCID<sub>50</sub>.

*Сравнительная оценка патогенности родительского и адаптированного вариантов вируса гриппа В для мышей линии BALB/c*

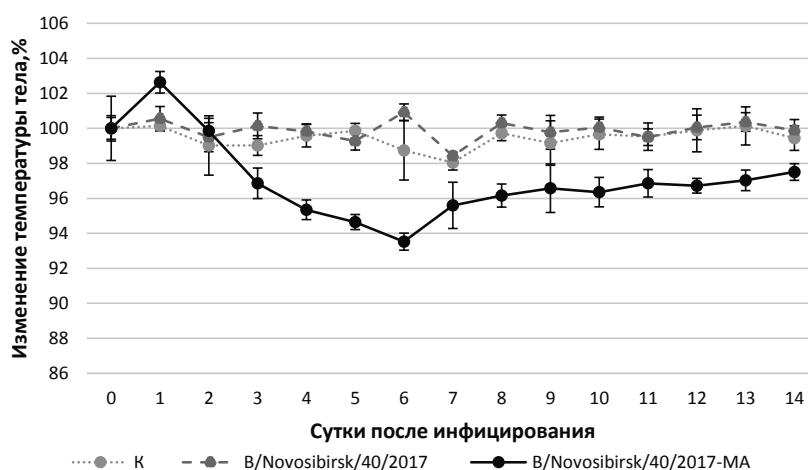
Поскольку доклинические испытания противогриппозных лекарственных препаратов проводят, главным образом, на мышах [19], патогенность полученного штамма В/2017-МА была исследована в экспериментах на этих животных в сравнении с родительским штаммом В/2017.

У мышей, инфицированных штаммом В/2017-МА, с 3-х суток обнаруживались клинические проявления гриппозной инфекции: взъерошенность шерсти, сгорбленная поза, учащенный ритм дыхания, у 3–5% инфицированных животных отмечался конъюнктивит; регистрировали снижение массы и температуры тела (рис. 1, 2). Максимальное уменьшение массы тела (на  $27,4 \pm 0,2\%$  относительно исходных значений) отмечали на 7-е сутки после инфицирования. Затем регистрировали положительную динамику изменения массы тела, которая, однако, не достигала исходных значений к окончанию срока наблюдения. У неинфицированных животных контрольной группы и животных, инфицированных штаммом В/2017, динамика изменения массы тела была положительной в течение всего периода наблюдения.

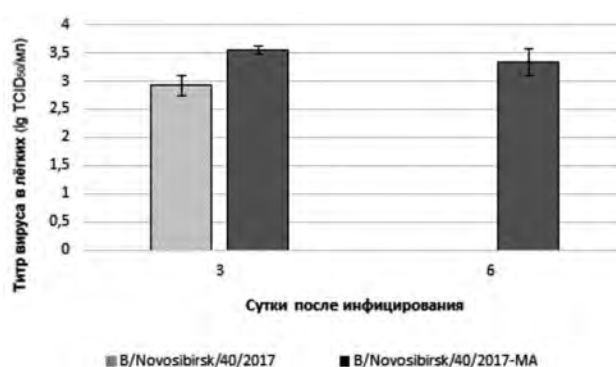
Вирусологический анализ внутренних органов (лёгкие, головной мозг, сердце, печень, почки, селезёнка) выявил наличие вируса гриппа только в лёгких, как у животных, инфицированных адаптированным вариантом вируса гриппа В штаммом В/2017-МА, так и у животных, инфицированных родительским штаммом вируса В/2017. При этом в лёгких животных, инфицированных штаммом В/2017-МА, вирус детектировали более продолжительное время (до 6-х суток после инфицирования). Средние значения инфекционного титра вируса представлены на рисунке 3.



**Рис. 1.** Динамика изменения массы тела мышей линии BALB/c, инфицированных штаммом B/Novosibirsk/40/2017 и штаммом B/Novosibirsk/40/2017-MA:  $\bullet\bullet\bullet\bullet$  К – животные контрольной группы, получавшие интраназально однократно 0,9% раствор NaCl;  $\text{---}\bullet\text{---}$  B/Novosibirsk/40/2017 – животные группы сравнения, инфицированные интраназально  $10^4$  TCID<sub>50</sub> родительского штамма B/Novosibirsk/40/2017;  $\text{---}\bullet\text{---}$  B/Novosibirsk/40/2017-MA – животные, инфицированные интраназально 10 MID50 штамма B/Novosibirsk/40/2017-MA. \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 – достоверность при сравнении данных от групп инфицированных мышей (по t критерию Стьюдента)



**Рис. 2.** Динамика изменения температуры тела мышей линии BALB/c, инфицированных штаммом B/Novosibirsk/40/2017 и штаммом B/Novosibirsk/40/2017-MA:  $\bullet\bullet\bullet\bullet$  К – животные контрольной группы, получавшие интраназально однократно 0,9% раствор NaCl;  $\text{---}\bullet\text{---}$  B/Novosibirsk/40/2017 – животные группы сравнения, инфицированные интраназально  $10^4$  TCID<sub>50</sub> родительского штамма B/Novosibirsk/40/2017;  $\text{---}\bullet\text{---}$  B/Novosibirsk/40/2017-MA – животные, инфицированные интраназально 10 MID50 штамма B/Novosibirsk/40/2017-MA. \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 – достоверность различий при сравнении данных от групп инфицированных мышей (по t критерию Стьюдента)

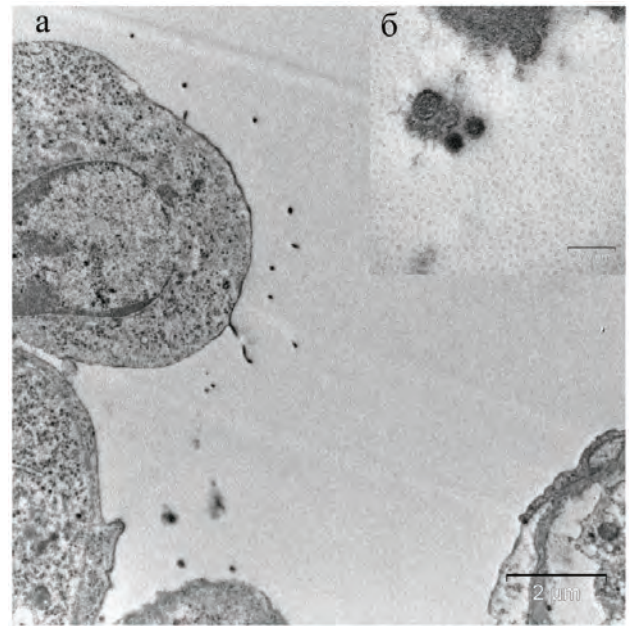


**Рис. 3.** Титры вируса в лёгких мышей линии BALB/c, выведенных из эксперимента на 3-и и 6-е сутки, после инфицирования  $10^4$  TCID<sub>50</sub> штамма B/Novosibirsk/40/2017 и 10 MID50 штамма B/Novosibirsk/40/2017-MA

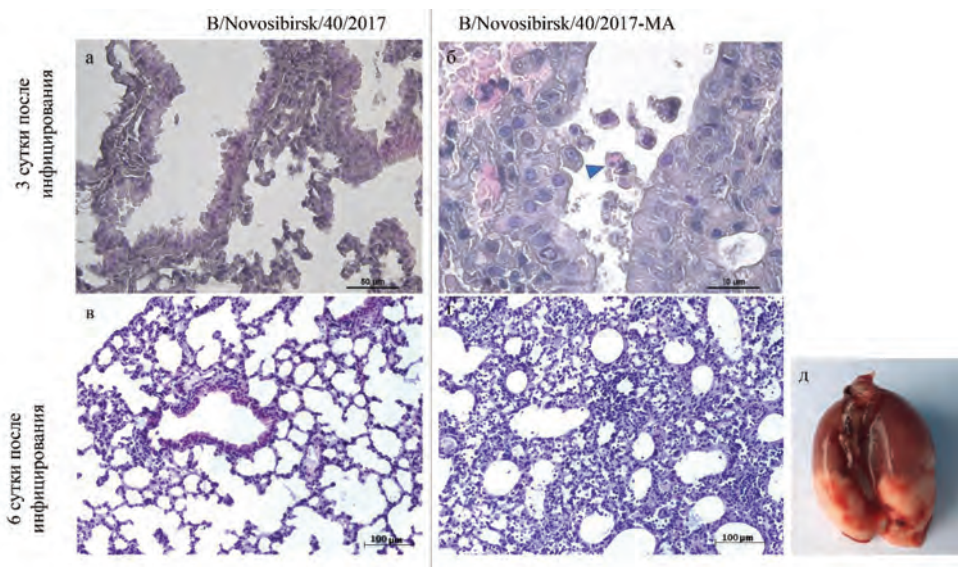
Морфофункциональные изменения в лёгких мышей, инфицированных штаммом В/2017, были незначительны на 3-и сутки после инфицирования и охарактеризованы в виде немногочисленного количества эозинофильных клеток в бронхиолах и небольшой кровенаполненности капилляров. В то же время под воздействием штамма В/2017-МА регистрировали более выраженные патоморфологические изменения в лёгких мышей: усиленная десквамация эпителия бронхиол и мелких бронхов с образованием апоптозных телец; большее количество эозинофильных клеток в бронхиолах; лимфоцитарная инфильтрация различных участков лёгких; стаз капилляров. К 6-м суткам после инфицирования штаммом В/2017-МА в лёгких мышей линии BALB/c было выявлено развитие гриппозной пневмонии с преимущественным поражением верхней части левого лёгкого, а также верхней и средней долей правого лёгкого (рис. 4).

При светооптическом исследовании головного мозга были обнаружены патоморфологические изменения только на 6-е сутки под воздействием штамма В/2017-МА, которые охарактеризованы периваскулярными отёками, некрозами глиальных клеток. В печени мышей обеих групп изменений не выявлено.

С помощью трансмиссионного электронного метода зарегистрировано отпочковывание с поверхности альвеолоцитов 1-го типа вирусных частиц на 3-и сутки после инфицирования штаммом В/2017-МА (рис. 5).



**Рис. 5.** Отпочковывание вирионов гриппа В с поверхности альвеолоцитов 1-го типа на 3-и сутки после инфицирования штаммом В/Novosibirsk/40/2017-МА. Метод ультратонких срезов с применением негативного контрастирования; а — отпочковывание вирусных частиц с поверхности альвеолоцитов 1-го типа; бар = 20 мкм; б — вирион гриппа В; бар = 200 нм



**Рис. 4.** Патологические изменения в лёгких мышей на 3-и и 6-е сутки после инфицирования штаммом В/Novosibirsk/40/2017 и штаммом В/Novosibirsk/40/2017-МА. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: а —  $\times 400$ , бар = 50 мкм; б —  $\times 630$ , бар = 10 мкм; в, г —  $\times 200$ , бар = 100 мкм; патоморфологические изменения под воздействием штамма В/Novosibirsk/40/2017 — (а, в) — и под воздействием штамма В/Novosibirsk/40/2017-МА — (б, г); стрелкой отмечена усиленная десквамация эпителия бронхиол и мелких бронхов с образованием апоптозных телец; д — макроскопия легкого мыши на 6-е сутки после инфицирования штаммом В/Novosibirsk/40/2017-МА



*Использование адаптированного варианта вируса гриппа В для оценки антинейраминидазной активности препаратов in vitro*

Определены дозы лекарственных средств осельтамивира этоксисукцината и Тамифлю®, способные подавлять 50% активности вируса гриппа ( $IC_{50}$ ), на примере штаммов В//2017 и В/2017-МА. Для осельтамивира этоксисукцината в отношении штамма В/2017  $IC_{50} = 75,68 \pm 10,42 \mu M$  и для штамма В/2017-МА  $IC_{50} = 107,645 \pm 53,96 \mu M$ . Для Тамифлю® в отношении штамма В/2017  $IC_{50} = 122,7 \pm 24,04 \mu M$  и, соответственно, для штамма В/2017-МА  $IC_{50} = 43,47 \pm 8,12 \mu M$ .

*Использование адаптированного варианта вируса гриппа В для оценки эффективности противовирусных препаратов in vivo*

Сравнительный анализ данных о массе и температуре тела экспериментально инфицированных и получавших лекарственные препараты животных показал, что минимальная масса тела была зарегистрирована на 6-е сутки после инфицирования, составив 90,68% у животных, получавших осельтамивира этоксисукцинат, и 89,66% от исходной массы у животных, получавших Тамифлю®. При этом средние значения массы тела животных, получавших лечение, были достоверно выше по сравнению с данными от нелеченных животных: применение осельтамивира этоксисукцината t-критерий Стьюдента равен 5,33 при  $p < 0,001$ ; применение Тамифлю® t-критерий Стьюдента равен 6,64 при  $p < 0,001$ . Кроме того, средняя масса тела инфицированных животных, не получавших лечения, достигла минимальных значений на 9-е сутки после инфицирования, составив 74,7% от исходной, что было достоверно ниже средней массы тела животных, получавших осельтамивира этоксисукцинат (t-критерий Стьюдента равен 11,77 при  $p < 0,001$ ) и Тамифлю® (t-критерий Стьюдента равен 11,61 при  $p < 0,001$ ).

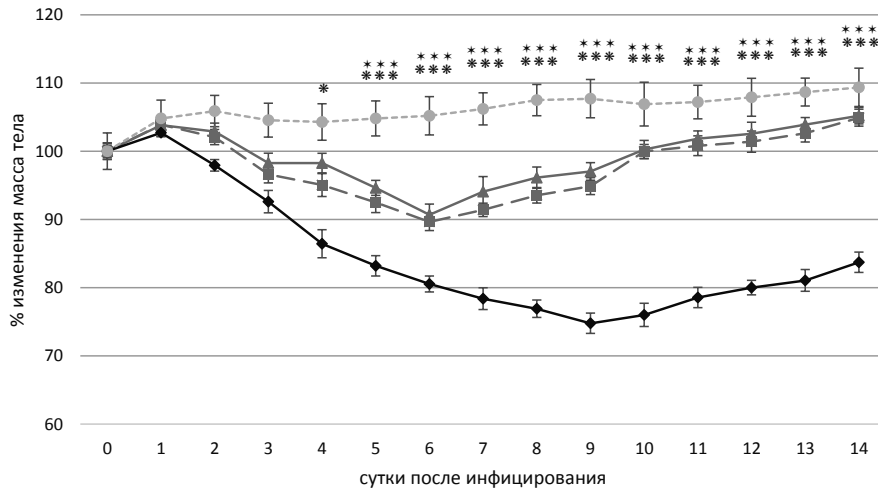
Самые низкие значения температуры тела животных, получавших лекарственные препараты, отмечались на 5-е сутки после инфицирования, но они были достоверно выше среднего значения температуры тела инфицированных животных, не получавших лечения, которые, в свою очередь, составили на 5-е сутки  $33,50 \pm 0,22^\circ C$  ( $34,89 \pm 0,15^\circ C$  у животных, получавших осельтамивир этоксисукцинат, t-критерий Стьюдента равен 5,22 при  $p < 0,001$ ;  $35,15 \pm 0,22^\circ C$  у животных, получавших Тамифлю®, t-критерий Стьюдента равен 5,30 при  $p < 0,001$ ). Кроме того, отмечено, что изменения температуры тела у животных, получавших лечение, не имели достоверных различий относительно исходных значений. Средняя температура тела не-

леченных животных достигала минимальных значений на 8-е сутки после инфицирования, составив  $33,02 \pm 0,45^\circ C$ , что было достоверно ниже температуры тела у животных, получавших осельтамивира этоксисукцинат, ( $35,64 \pm 0,46^\circ C$ , t-критерий Стьюдента равен 4,07 при  $p < 0,001$ ), и у животных, получавших Тамифлю® ( $36,06 \pm 0,47^\circ C$ , t-критерий Стьюдента равен 4,67 при  $p < 0,001$ ), измеренной на эти же сутки. Летальности среди животных не наблюдалось ни в одной из экспериментальных групп в течение всего периода наблюдения. Динамика изменения массы и температуры тела животных представлена на рисунках 6 и 7.

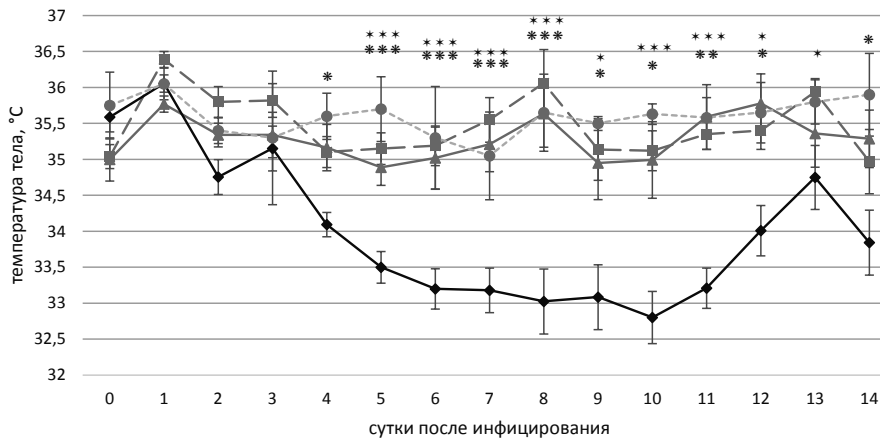
Вирус гриппа В имеет важную эпидемиологическую значимость, особенно среди детского населения, вызывая, наряду с вирусом гриппа А, ежегодные сезонные подъёмы заболеваемости. Отсутствие информации о круге хозяев вируса гриппа В и адекватной гриппозной модели затрудняют изучение факторов патогенности, исследование способов передачи и оценку действия противовирусных лекарств, анализ эффективности вакцин. В вирусологии существует отдельное направление по получению рекомбинантных штаммов для вакцин [20, 21, 22, 23, 24], однако полученные штаммы вируса гриппа В аттенуированны и апатогенны для экспериментальных животных, что, в свою очередь, не предоставляет возможности для изучения патологического процесса гриппозной инфекции и затрудняет проведение оценки действия противогриппозных препаратов при исследованиях *in vivo*. Более того, многие из представленных рекомбинантных штаммов утратили антигенную актуальность на сегодняшний день.

В данном исследовании мы использовали новый, обладающий антигенной актуальностью, вирус гриппа типа В штамм В/2017-МА для моделирования гриппозной инфекции у экспериментальных мышей с целью оценки лечебной и профилактической эффективности противовирусных препаратов и вакцин *in vivo* и *in vitro*.

В ходе анализа полученных данных было показано, что на 3-и сутки после инфицирования адаптированный вариант вируса гриппа В штамм В/2017-МА реплицируется в лёгких инфицированных животных в достоверно более высоком титре по сравнению с родительским штаммом и более продолжительное время (до 6 суток). Патоморфологические изменения в лёгких мышей линии BALB/c регистрируются только под воздействием адаптированного варианта вируса гриппа В и характеризуются развитием бронхита к третьим суткам после инфицирования. В головном мозге были выявлены патоморфологические изменения в виде некрозов микроглии и периваскулярных отёков, но не обнаружена вирусная репликация, что, вероятно, связано с отсутствием способности у адаптированного



**Рис. 6.** Динамика изменения массы тела мышей линии BALB/c, инфицированных штаммом В/Novosibirsk/40/2017-МА и получавших противогриппозные средства:  $\text{---}\bullet\text{---}$  К – животные, получавшие интраназально однократно 0,9% раствора NaCl, затем получавшие per os дистиллированную воду в течение 5 дней;  $\text{—}\blacklozenge\text{—}$  В/Novosibirsk/40/2017-МА – животные, инфицированные интраназально 10 MID<sub>50</sub> штамма В/Novosibirsk/40/2017-МА, затем получавшие per os дистиллированную воду в течение 5 дней;  $\text{—}\blacktriangle\text{—}$  «В/Novosibirsk/40/2017-МА + осельтамивира этоксисукцинат/oseltamivir ethoxysuccinate» – животные, инфицированные интраназально 10 MID<sub>50</sub> штамма В/Novosibirsk/40/2017-МА, затем получавшие per os осельтамивира этоксисукцинат в течение 5 дней;  $\text{—}\blacksquare\text{—}$  «В/Novosibirsk/40/2017-МА + Тамифлю®/Tamiflu®» – животные, инфицированные интраназально 10 MID<sub>50</sub> штамма В/Novosibirsk/40/2017-МА, затем получавшие per os Тамифлю® в течение 5 дней. \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 – достоверность различий при сравнении данных от мышей группы В/Novosibirsk/40/2017-МА и «В/Novosibirsk/40/2017-МА + Тамифлю®/Tamiflu®» (по t-критерию Стьюдента). \*, – p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 – достоверность различий при сравнении данных от мышей группы В/Novosibirsk/40/2017-МА и «В/Novosibirsk/40/2017-МА + осельтамивира этоксисукцинат/oseltamivir ethoxysuccinate» (по t критерию Стьюдента).



**Рис. 7.** Динамика изменения температуры тела мышей линии BALB/c, инфицированных штаммом В/Novosibirsk/40/2017-МА и получавших противогриппозные средства:  $\text{---}\bullet\text{---}$  К – животные, получавшие интраназально 0,9% раствор NaCl, затем получавшие per os дистиллированную воду в течение 5 дней;  $\text{—}\blacklozenge\text{—}$  В/Novosibirsk/40/2017-МА – животные, инфицированные интраназально 10 MID<sub>50</sub> штамма В/Novosibirsk/40/2017-МА, затем получавшие per os дистиллированную воду в течение 5 дней;  $\text{—}\blacktriangle\text{—}$  «В/Novosibirsk/40/2017-МА + осельтамивира этоксисукцинат/oseltamivir ethoxysuccinate» – животные, инфицированные интраназально 10 MID<sub>50</sub> штамма В/Novosibirsk/40/2017-МА, затем получавшие per os осельтамивира этоксисукцинат в течение 5 дней;  $\text{—}\blacksquare\text{—}$  «В/Novosibirsk/40/2017-МА + Тамифлю®/Tamiflu®» – животные, инфицированные интраназально 10 MID<sub>50</sub> штамма В/Novosibirsk/40/2017-МА, затем получавшие per os Тамифлю® в течение 5 дней. \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 – достоверность различий при сравнении данных от мышей группы В/Novosibirsk/40/2017-МА и «В/Novosibirsk/40/2017-МА + Тамифлю®» (по t критерию Стьюдента). \*, – p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 – достоверность различий при сравнении данных от мышей группы В/Novosibirsk/40/2017-МА и «В/Novosibirsk/40/2017-МА + этоксисукцинат/oseltamivir ethoxysuccinate» (по t критерию Стьюдента).



варианта вируса гриппа В проходить гематоэнцефалический и/или гематоликворный барьер, но при этом он оказывает влияние на реологические свойства крови. Также не выявлено вирусной нагрузки и в других органах (сердце, почки, селезенка, печень), кроме лёгких, что говорит об отсутствии генерализации инфекции. При инфицировании штаммом В/2017-МА не зарегистрированы летальные случаи среди экспериментальных мышей, что характеризует полученный нами адаптированный вариант вируса гриппа В как нелетальный штамм, способный моделировать гриппозную пневмонию, развивающуюся на 6-е сутки. На сегодняшний день адекватные гриппозные модели крайне востребованы для тестирования противогриппозных лекарств и вакцин [8, 13, 25, 26, 27]. Однако многие авторы используют в своих исследованиях неадаптированные штаммы вирусов гриппа, которые не способны вызывать картину воспаления в лёгких мышей, сравнимую с той, что развивается у человека. Некоторые работы иностранных авторов выполнены на нокаутных мышах [28, 29], затрагивающих узкую область исследуемых проблем гриппа среди иммунодефицитных больных. Главное преимущество разработанного нами нового, обладающего антигенной актуальностью штамма вируса гриппа типа В заключается в его пригодности для моделирования наиболее распространенной формы гриппозной инфекции, а также способности вируса инфицировать часто используемых в лабораториях мышей линии BALB/c.

Поскольку вирусы гриппа типов А и В вызывают ежегодные сезонные подъёмы заболеваемости, они обладают эпидемиологической, социальной и экономической значимостью [3, 12]. В качестве лекарственных средств, используемых при лечении гриппа, применяют иммуностимулирующие препараты, такие как Амиксин®, Кагоцел® и противогриппозные препараты, воздействующие непосредственно на вирус. Всемирная организация здравоохранения рекомендует для лечения и профилактики гриппа только этиотропные препараты, воздействующие непосредственно на вирусную продукцию. Среди них выделяют блокаторы ионного М2-канала (Римантадин®, Амантадин®, Орвирем®), блокаторы полимеразы (балаксавир марбоксил (Ксофлуза®)), ингибиторы NP-белка (Ингаверин®), специфический шаперон гемагглютинаина (Арбидол®), а также ингибиторы нейраминидазы (фосфат осельтамивира (Тамифлю®); занамивир (Реленза®); перамивир (Рапиваб®) [30]. Последние относятся к препаратам второго поколения, и именно они характеризуются принципиально новым подходом к химиотерапии вирусных инфекций за счёт селективного ингибирования фермента нейраминидазы, которая контролирует процессы отпочковывания и высво-

бождения зрелых вирусных частиц (вирионов) с поверхности инфицированной клетки-хозяина в результате отщепления остатков сиаловых кислот от гемагглютинаина. Помимо этого, нейраминидаза играет одну из ключевых ролей и на начальных этапах инфицирования, обеспечивая проникновение вирусов гриппа в клетки. Благодаря специфической активности нейраминидазы эффективно работает в отношении вируса гриппа А и В типов. Из двух ингибиторов нейраминидазы наиболее эффективным считается фосфат осельтамивира (Тамифлю®) из-за более высокой биодоступности (30–100%) по сравнению с препаратом Реленза® [31]. Однако применение химиопрепаратов для профилактики и лечения гриппа осложняется наблюдающаяся в последние годы резистентность вирусов гриппа к химиопрепаратам [3, 32].

В связи с вышеизложенным было проведено сравнительное изучение специфической эффективности двух противогриппозных препаратов: инновационного осельтамивира этоксисукцината и аналогового Тамифлю® при лечении гриппозной инфекции у экспериментальных животных, вызванной адаптированным вариантом вируса гриппа В.

В нашем исследовании не было выявлено достоверных отличий значений массы и температуры тела между группами животных, инфицированных адаптированным вариантом вируса гриппа В и затем получавших в течение 5 дней *per os* осельтамивира этоксисукцинат или Тамифлю®.

Анализ действия исследуемых лекарственных средств *in vitro* показал, что осельтамивира этоксисукцинат и Тамифлю® снижают активность нейраминидазы вируса гриппа В (родительский и адаптированный варианты) одинаково эффективно. В связи с тем, что исследуемое лекарственное средство осельтамивира этоксисукцинат является модифицированной версией Тамифлю® и показана его высокая эффективность в отношении адаптированного варианта вируса гриппа В аналогично с Тамифлю®, то существует возможность использовать инновационный осельтамивира этоксисукцинат в случае возникновения резистентных штаммов к Тамифлю®.

## Выводы

1. Полученный штамм В/2017-МА вируса гриппа В способен моделировать у экспериментальных животных нелетальную гриппозную инфекцию с выраженными клиническими признаками заболевания, что, в свою очередь, позволяет получить наиболее близкую картину патологии, схожую с той, что наблюдается при инфицировании вирусом гриппа В людей, и провести оценку лечебной и профилактической эффективности противовирусных препаратов *in vivo* и *in vitro*.

2. Адекватные гриппозные мышинные модели могут быть использованы в качестве дополнительного инструмента для прогнозирования эффективности вакцины против дрейфующих штаммов, а также оценки лекарственной эффективности против гриппа.

### Благодарности

Разделы статьи «Адаптация штамма вируса гриппа В/Novosibirsk/40/2017 (Victoria lineage) к мышам линии BALB/с» и «Сравнительная оценка патогенности родительского и адаптированного вариантов вируса гриппа В для мышей линии BALB/с» выполнены за счёт средств гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-10055).

Разделы статьи «Использование адаптированного варианта вируса гриппа В для оценки антинейраминидазной активности препаратов *in vitro*» и «Использование адаптированного варианта вируса гриппа В для оценки эффективности противовирусных препаратов *in vivo*» выполнены за счёт средств гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук и докторов наук № МК-3318.2019.4.

### Литература

- Bodewes, R. Recurring influenza B virus infections in seals / R. Bodewes, D. Morick, G. de Mutsert et al. // Emerging infectious diseases. – 2013. – № 19(3). – P. 511-2
- Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, et al. Influenza B virus in seals. *Science*, 2000;288(5468):1051-1053.
- Su S, Chaves SS, Perez A, et al. Comparing clinical characteristics between hospitalized adults with laboratory-confirmed influenza A and B virus infection. *Clin. Infect. Dis.*, 2014;59(2):252-255.
- Чен, М. Мир в начале пандемии гриппа 2009 года. ВОЗ. Заявление для прессы Генерального директора ВОЗ д-ра Маргарет Чен 11 июня 2009 г [https://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1\\_pandemic\\_phase6\\_20090611/ru/](https://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/ru/) (01.07.2019)
- Adlhoch C, Snacken R, Melidou A, et al. The European Influenza Surveillance Network. Dominant influenza A(H3N2) and B/Yamagata virus circulation in EU/EEA, 2016/17 and 2017/18 seasons, respectively. *Euro Surveill.* 2018;23(13):pii = 18-00146. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.13.18-00146>
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. – 2019. – <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Chen R, Holmes EC. Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics. *Mol. Biol. Evol.*, 2006; 23(12):2336-2341.
- McCullers JA, Hoffmann E, Huber VC, et al. A single amino acid change in the C-terminal domain of the matrix protein M1 of influenza B virus confers mouse adaptation and virulence. *Virology*, 2005;336(2):318 – 326.
- McCullers JA. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clinical microbiology reviews*, 2006;19(3):571 – 582.
- Jain A, Dangi T, Jain B, et al. Genetic changes in influenza A(H3N2) viruses circulating during 2011 to 2013 in northern India (Lucknow). *J Med. Virol.*, 2015;87(8):1268-1275.
- Rota PA, Rocha ER, Harmon MW, et al. Laboratory characterization of a swine influenza virus isolated from a fatal case of human influenza. *Journal of clinical microbiology*, 1989;27(6):1413-1416.
- Shaw MW, Xu X, Li Y, et al. Reappearance and global spread of variants of influenza B/Victoria/2/87 lineage viruses in the 2000-2001 and 2001-2002 seasons. *Virology*, 2002;303(1):1-8.
- Kim E, Park S, Kwon H, et al. Mouse adaptation of influenza B virus increases replication in the upper respiratory tract and results in droplet transmissibility in ferrets. *Scientific Reports*, 2015;11(5):1-14.
- Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. WHO Global Influenza Surveillance Network, 2011. 153p.
- Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз., 1962. 182 с. [Ashmarin I.P., Vorobjev A.A. Statistical methods in microbiological research. L.: Medgiz., 1962. 182 p. (In Russ.)]
- Патент на изобретение РФ № 2639158 Этил (3S,4R,5S)-4-ацетамидо-5-амино-3-(1-этилпропокси)циклогекс-1-ен-1-карбоксилата этоксисукцинат в качестве противовирусного препарата и способ его получения, опубл. 20.12.2017, МПК C07C 233/52, A61K 31/16, A61P 31/12.
- Gubareva LV, Webster RG, Hayden FG. Detection of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors by an enzyme inhibition assay. *Antiviral Res.* 2002;53(1):47 – 61.
- ISIRV. 2014. Panel of influenza A and B viruses is for the assessment of neuraminidase inhibitor susceptibility. [https://isirv.org/site/images/AVG\\_panel\\_leaflet\\_Nov14.pdf](https://isirv.org/site/images/AVG_panel_leaflet_Nov14.pdf). Accessed February 2016
- Zhang C, Zhao Z, Guo Z, et al. Amino Acid Substitutions Associated with Avian H5N6 Influenza A Virus Adaptation to Mice. *Front. Microbiol.* 8:1763. doi: 10.3389/fmicb.2017.01763
- Патент на изобретение РФ № 2105063 Штамм вируса INFLUENZA В (Ленинград) 14/76/50, предназначенный для получения безвредных и высокорепродуктивных вирусов гриппа В для производства инактивированных и живых гриппозных вакцин, опубл. 20.02.1998, МПК C12N 7/00, A61K 39/145.
- Патент на изобретение РФ № 2215786 Штамм вируса гриппа В/60/ Иоханнесбург/99/50 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и детей, опубл. 10.11.2003, МПК МПК C12N 7/00, A61K 39/145.
- Патент на изобретение РФ № 2307161 Штамм вируса гриппа В/60/Джиллин/03/1 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и детей, дата публ. 27.09.2007. МПК C12N 7/00, A61K 39/145.
- Патент на изобретение РФ № 2605926 Штамм вируса гриппа В/60/Пхукет/2013/26 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей, опубл. 27.12.2016, МПК C12N 7/00, A61K 39/145, A613 31/16.
- Патент на изобретение РФ № 25229772 Холодоадаптированный штамм вируса гриппа В-В/Виктория/2/63/87, предназначенный в качестве штамма-донора аттенуации для получения реассортантов холодоадаптированных штаммов для живой гриппозной вакцины, опубл. 27.09.2014, МПК C12N 7/00, A61K 39/145.
- Boianelli A, Nguyen VK, Ebsen T, et al. Modeling Influenza Virus Infection: A Roadmap for Influenza Research Viruses. 2015;7(10): 5274 – 5304. doi: 10.3390/v7102875
- Groves HT, McDonald JU, Langat P, et al. Mouse Models of Influenza Infection with Circulating Strains to Test Seasonal Vaccine Efficacy. *Front. Immunol.* 2018;9:126. doi: 10.3389/fimmu.2018.00126
- Santos JJS, Finch C, Sutton T, et al. Development of an alternative modified live influenza B virus vaccine. *J. Virol.* 2017, doi:10.1128/JVI.00056-17

28. Asahi Y, Yoshikawa T, Watanabe I, et al. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knock-out mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J. Immunol.*, 2002;168(6):2930-2938.

29. Sakai K, Ami Y, Nakajima N, et al. Tmprss2 Independence for Haemagglutinin Cleavage In Vivo Differentiates Influenza B Virus from Influenza A. *Virus. Sci Rep.*, 2016;6: 1-10.

30. WHO. (2018). <http://www.euro.who.int/ru/health-topics/communicable-diseases/influenza/seasonal-influenza/clinical-management/about-antiviral-drugs>

31. Бурцева, Е.И. Обзор данных по эффективности и мониторинг чувствительности к осельтамивиру штаммов вирусов гриппа / Е.И. Бурцева // *Врач.* — 2010. — № 12. — С. 67–70.

## References

1. Bodewes, R. Recurring influenza B virus infections in seals / R. Bodewes, D. Morick, G. de Mutsert et al. // *Emerging infectious diseases.* — 2013. — № 19(3). — P. 511-2

2. Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, et al. Influenza B virus in seals. *Science*, 2000;288(5468):1051-1053.

3. Su S, Chaves SS, Perez A, et al. Comparing clinical characteristics between hospitalized adults with laboratory-confirmed influenza A and B virus infection. *Clin. Infect. Dis.*, 2014;59(2):252-255.

4. Chen M. World at the beginning of the 2009 influenza pandemic. WHO. Who Director-General Dr Margaret Chan's press statement 11 June 2009 [https://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1\\_pandemic\\_phase6\\_20090611/ru/](https://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/ru/) (01.07.2009)

5. Adlhoch C, Snacken R, Melidou A, et al. The European Influenza Surveillance Network. Dominant influenza A(H3N2) and B/Yamagata virus circulation in EU/EEA, 2016/17 and 2017/18 seasons, respectively. *Euro Surveill.* 2018;23(13):pii = 18-00146. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.13.18-00146>

6. ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. — 2019. — <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>

7. Chen R, Holmes EC. Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics. *Mol. Biol. Evol.*, 2006; 23(12):2336-2341.

8. McCullers JA, Hoffmann E, Huber VC, et al. A single amino acid change in the C-terminal domain of the matrix protein M1 of influenza B virus confers mouse adaptation and virulence. *Virology*, 2005;336(2):318–326.

9. McCullers JA. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clinical microbiology reviews*, 2006;19(3):571–582.

10. Jain A, Dangi T, Jain B, et al. Genetic changes in influenza A(H3N2) viruses circulating during 2011 to 2013 in northern India (Lucknow). *J Med. Virol.*, 2015;87(8):1268-1275.

11. Rota PA, Rocha ER, Harmon MW, et al. Laboratory characterization of a swine influenza virus isolated from a fatal case of human influenza. *Journal of clinical microbiology*, 1989;27(6):1413-1416.

12. Shaw MW, Xu X, Li Y, et al. Reappearance and global spread of variants of influenza B/Victoria/2/87 lineage viruses in the 2000-2001 and 2001-2002 seasons. *Virology*, 2002;303(1):1-8.

13. Kim E, Park S, Kwon H, et al. Mouse adaptation of influenza B virus increases replication in the upper respiratory tract and results in droplet transmissibility in ferrets. *Scientific Reports*, 2015;11(5):1-14.

14. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. WHO Global Influenza Surveillance Network, 2011. 153p.

15. Ashmarin I.P., Vorobjev A.A. Statistical methods in microbiological research. L.: Medgiz., 1962. 182 p. (In Russ.)

16. Patent for the invention of the Russian Federation № 2639158 Ethyl (3S,4R,5S)-4-acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)cyclohex-1-EN-1-carboxylate ethoxysuccinate as an antiviral drug and a method for its preparation, publ. 20.12.2017, IPC C07C 233/52, A61K 31/16, A61P 31/12.

17. Gubareva LV, Webster RG, Hayden FG. Detection of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors by an enzyme inhibition assay. *Antiviral Res.* 2002;53(1):47–61.

18. ISIRV. 2014. Panel of influenza A and B viruses is for the assessment of neuraminidase inhibitor susceptibility. [https://isrv.org/site/images/AVG\\_panel\\_leaflet\\_Nov14.pdf](https://isrv.org/site/images/AVG_panel_leaflet_Nov14.pdf). Accessed February 2016

19. Zhang C, Zhao Z, Guo Z, et al. Amino Acid Substitutions Associated with Avian H5N6 Influenza A Virus Adaptation to Mice. *Front. Microbiol.* 8:1763. doi: 10.3389/fmicb.2017.01763

20. Patent for the invention of the Russian Federation № 2105063 strain of INFLUENZA B virus (Leningrad) 14/76/50, designed to produce harmless and highly productive influenza B viruses for the production of inactivated and live influenza vaccines, publ. 20.02.1998, IPC C12N 7/00, A61K 39/145.

21. Patent for the invention of the Russian Federation № 2215786 Strain of influenza B/60/ Johannesburg/99/50 for the production of live influenza intranasal vaccine for adults and children, publ. 10.11.2003, IPC C12N 7/00, A61K 39/145.

22. Patent for the invention of the Russian Federation № 2307161 Strain of influenza B/60/Jilin/03/1 for the production of live influenza intranasal vaccine for adults and children, publ date. 27.09.2007. IPC C12N 7/00, A61K 39/145.

23. Patent for the invention of the Russian Federation № 2605926 Strain of influenza B/60/Phuket/2013/26 for the production of live influenza intranasal vaccine for adults and children, publ. 27.12.2016, IPC C12N 7/00, A61K 39/145, A61Z 31/16.

24. Patent for the invention RF № 25229772 Holodnodeformirovannye strain of the flu virus In In Victoria/2/63/87 intended as strain-donor of attenuation for obtaining reassortants holodnodeformirovannyh strains for live influenza vaccine, publ. 27.09.2014, IPC C12N 7/00, A61K 39/145.

25. Boianelli A, Nguyen VK, Ebensen T, et al. Modeling Influenza Virus Infection: A Roadmap for Influenza Research Viruses. 2015;7(10): 5274–5304. doi: 10.3390/v7102875

26. Groves HT, McDonald JU, Langat P, et al. Mouse Models of Influenza Infection with Circulating Strains to Test Seasonal Vaccine Efficacy. *Front. Immunol.* 2018;9:126. doi: 10.3389/fimmu.2018.00126

27. Santos JJS, Finch C, Sutton T, et al. Development of an alternative modified live influenza B virus vaccine. *J. Virol.* 2017, doi:10.1128/JVI.00056-17

28. Asahi Y, Yoshikawa T, Watanabe I, et al. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knock-out mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J. Immunol.*, 2002;168(6):2930-2938.

29. Sakai K, Ami Y, Nakajima N, et al. Tmprss2 Independence for Haemagglutinin Cleavage In Vivo Differentiates Influenza B Virus from Influenza A. *Virus. Sci Rep.*, 2016;6: 1-10.

30. WHO. (2018). <http://www.euro.who.int/ru/health-topics/communicable-diseases/influenza/seasonal-influenza/clinical-management/about-antiviral-drugs>

31. Burceva E. Review of efficacy data and monitoring of oseltamivir susceptibility to influenza virus strains. *Vrach = Doctor*, 2010, no. 12, pp 67-70.

*Авторский коллектив:*

*Прокопьева Елена Александровна* – старший научный сотрудник лаборатории разработки и испытаний фармакологических средств Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины; доцент кафедры фундаментальной медицины Института медицины и психологии Новосибирского государственного университета, к.б.н.; тел.: 8(383)363-40-00, e-mail: e.prokoreva@g.nsu.ru

*Курская Ольга Григорьевна* – старший научный сотрудник лаборатории разработки и испытаний фармакологических средств Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, к.м.н.; тел.: 8(383)363-40-00; e-mail: kurskaya\_og@mail.ru

*Соломатина Мария Владимировна* – научный сотрудник лаборатории разработки и испытаний фармакологических средств Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, к.б.н.; тел.: 8(383)363-40-00; e-mail: Mariaza@ngs.ru

*Соболев Иван Андреевич* – научный сотрудник лаборатории разработки и испытаний фармакологических средств Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, к.б.н.; тел.: 8(383)363-40-00; e-mail: i\_sobolev@ngs.ru

*Мурашкина Татьяна Александровна* – научный сотрудник лаборатории разработки и испытаний фармакологических средств Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, магистрант; тел.: 8(383)363-40-00; e-mail: murashkinatiana89@gmail.com

*Дёрко Анастасия Александровна* – младший научный сотрудник лаборатории разработки и испытаний фармакологических средств Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, магистрант; тел.: 8(383)363-40-00; e-mail: a.derko@g.nsu.ru

*Корчагина Ксения Владимировна* – аспирант группы микроскопических исследований Института химической биологии и фундаментальной медицины; e-mail: ksenkor1985@gmail.com

*Юнусова Анастасия Юрьевна* – аспирант группы микроскопических исследований Института химической биологии и фундаментальной медицины; e-mail: ellap@bk.ru

*Алексеев Александр Юрьевич* – старший научный сотрудник лаборатории разработки и испытаний фармакологических средств Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины; доцент Института экологии и устойчивого развития Дагестанского государственного университета, к.б.н.; тел.: 8(383)363-40-00, e-mail: al-alexok@ngs.ru

*Шестопалов Александр Михайлович* – заведующий отделом экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний лаборатории разработки и испытаний фармакологических средств Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, д.б.н., профессор; тел.: 8(383)333-64-56, e-mail: shestopalov2@ngs.ru

*Сысолятин Сергей Викторович* – заведующий лабораторией медицинской химии Института проблем химико-энергетических технологий, д.х.н., профессор; тел.: 8(3854)30-59-55, e-mail: abv1953@mail.ru

*Ворожцов Александр Борисович* – проректор по научной и инновационной деятельности Национального исследовательского Томского государственного университета, д.ф.-м.н; профессор; тел.: 8(3822)252-95-78, e-mail: abv1953@mail.ru

*Ваизова Ольга Евгеньевна* – профессор кафедры фармакологии Сибирского государственного медицинского университета, д.м.н., доцент; тел.: 8(3822)901-101, доб.1934, e-mail: vaizova@mail.ru

*Шерстобоев Евгений Юрьевич* – заведующий отделом иммунофармакологии Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра, д.м.н., профессор; тел.: 8(3822)41-77-05, e-mail: eugeneboev@gmail.com

*Шаршов Кирилл Александрович* – старший научный сотрудник лаборатории моделирования и мониторинга инфекционных процессов лаборатории разработки и испытаний фармакологических средств Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, к.б.н.; тел.: 8(383)363-40-00, e-mail: sharshov@yandex.ru

*Дыгай Александр Михайлович* – научный руководитель Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра, д.м.н., профессор, академик РАН; тел.: 8(3822)41-83-72, e-mail: dygai\_am@pharmso.ru