

## Патоморфологические изменения в легких морской свинки при моделировании инфекции, вызванной различными генетическими вариантами вируса SARS-CoV-2

*А.В. Шиповалов, Г.А. Кудров, Е.К. Ивлева, Е.В. Спиридонова,  
В.В. Омигов, О.В. Пьянков, О.С. Таранов*

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской области, Россия

**Резюме.** *Введение.* Основной характеристикой патогенности изучаемого вируса является его способность вызывать гибель чувствительных лабораторных животных. Отсутствие летальных лабораторных моделей для вируса SARS-CoV-2 требует поиска других подходов для оценки патогенности. Изучение инфекционного процесса в тканях легких морских свинок позволяет выявить особенности и закономерности течения заболевания, определить значимые гистологические признаки и основные критерии патогенности. Целью исследования было проведение сравнительного патоморфологического исследования легких морских свинок, инфицированных различными генетическими вариантами SARS-CoV-2, с использованием метода морфометрических стандартизированных критериев.

*Материалы и методы.* В эксперименте на аутбредных морских свинках (n=96) изучено структурное состояние легких в зависимости от патогенеза COVID-19. Животные в случайном порядке были разделены на семь опытных групп и одну контрольную по шесть самцов и шесть самок в каждой. Опытные группы были интраназально инфицированы штаммами геновариантов Ухань, альфа, бета, гамма, дельта и омикрон (последний представлен двумя генетическими линиями – BA.5.2 и EG.5) вируса SARS-CoV-2, животным контрольной группы вводили 0,9% NaCl. Динамику вирусной нагрузки определяли в назальных смывах по полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и инфекционному титру (на культуре клеток Vero E6). На 15-е сутки выживших животных выводили из эксперимента. Патоморфологическое исследование проводили методом оптической микроскопии гистологических препаратов легких.

*Результаты.* При гистологическом исследовании тканей легкого морской свинки отмечено сходство патологического процесса у морских свинок и пациентов с COVID-19, проявляющегося в виде диффузного альвеолярного повреждения. Выявлены достоверные различия по ряду патоморфологических признаков, вызванных коронавирусом разных генетических вариантов. Определенный морфометрическим методом максимум патологического действия SARS-CoV-2 на ткани легких был вызван геновариантом гамма. Дистелектазы в легких морских свинок, как достоверно различающийся для всех геновариантов SARS-CoV-2 признак, связанный с избыточной цитокиновой активностью, является, по нашему мнению, основным маркером патогенности штаммов SARS-CoV-2. Альвеолярно-геморрагический синдром характерен для всех изученных вариантов коронавируса, за исключением омикрон EG.5. Генетические линии варианта омикрон оказывают минимальное патологическое действие на ткани легких и не вызывают гибели морских свинок.

*Заключение.* Морская свинка может применяться в качестве релевантной животной модели COVID-19. Характер патоморфологических изменений легких зависит от геноварианта вируса SARS-CoV-2, вызывающих эти изменения.

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2, COVID-19, морская свинка, легкие, патоморфология, генетические варианты SARS-CoV-2

**Для корреспонденции:** Андрей Владимирович Шиповалов. E-mail: shipovalov\_av@vector.nsc.ru

**Для цитирования:** Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Ивлева Е.К., Спиридонова Е.В., Омигов В.В., Пьянков О.В., Таранов О.С. Патоморфологические изменения в легких морской свинки при моделировании инфекции, вызванной различными генетическими вариантами вируса SARS-CoV-2. Клини. эксп. морфология. 2024;13(4):47–57. DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.47-57.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 18.04.2024. Получена после рецензирования 24.05.2024. Принята в печать 24.06.2024.

# Pathomorphological changes in lung tissue of guinea pigs in SARS-CoV-2 infection model

A.V. Shipovalov, G.A. Kudrov, E.K. Ivleva, E.V. Spiridonova, V.V. Omigov, O.V. Pyankov, O.S. Taranov

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk oblast, Russia

**Abstract. Introduction.** The main characteristic of pathogenicity of SARS-CoV-2 virus is its ability to cause death in sensitive laboratory animals. The absence of lethal animal infection models requires the search for other approaches to assess pathogenicity. Studying infectious processes in guinea pig lungs allows us to identify the features and patterns of the disease, determine significant histological characteristics, and identify the main pathogenic criteria. We aimed to conduct a comparative pathomorphological study of lung tissue in guinea pigs infected with various SARS-CoV-2 variants using morphometric standardized criteria.

**Materials and methods.** We looked at structural changes in the lungs of 96 outbred guinea pigs depending on COVID-19 pathogenesis. The animals were randomly divided into seven experimental and one control groups of 6 males and 6 females each. The experimental groups were intranasally infected with the following SARS-CoV-2 strains: Wuhan, Alpha, Beta, Gamma, Delta, and Omicron (the last one represented by two genetic lineages BA.5.2 and EG.5). The control group was intranasally injected with 0.9% NaCl. The viral load over time was determined with RT-PCR on nasal flushes and infection titer (on Vero E6 cell culture). The animals that survived were removed from the experiment on day 15. Pathomorphological examination was performed with optical microscopy of histological lung specimens.

**Results.** We detected diffuse alveolar damage as a similar pathological feature in the lungs of both patients with COVID-19 and guinea pigs. Significant differences were revealed in the number of pathomorphological signs caused by various genetic variants of COVID-19. The most considerable pathological effect of SARS-CoV-2 on lung tissue was caused by the Gamma variant. We suppose guinea pig lung dystelectasis to be the main marker of pathogenicity of SARS-CoV-2 strains, since this sign differs significantly in SARS-CoV-2 variants and is associated with excessive cytokine activity. Alveolar hemorrhagic syndrome is characteristic of all the studied coronavirus variants except for Omicron EG.5. The genetic lineages of the omicron variant have a minimal pathological effect on lung tissue and do not cause death in guinea pigs.

**Conclusion.** Guinea pig is an appropriate animal for a SARS-CoV-2 model. Pathomorphological changes in the lungs depend on the SARS-CoV-2 variant causing them.

**Keywords:** SARS-CoV-2, COVID-19, guinea pig, lungs, pathomorphology, SARS-CoV-2 variants

**Corresponding author:** Andrey V. Shipovalov. E-mail: shipovalov\_av@mail.ru

**For citation:** Shipovalov A.V., Kudrov G.A., Ivleva E.K., Spiridonova E.V., Omigov V.V., Pyankov O.V., Taranov O.S. Pathomorphological changes in lung tissue of guinea pigs in SARS-CoV-2 infection model. Clin. exp. morphology. 2024;13(4):47–57 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.47-57.

**Funding.** The study was carried out within the framework of state budget funding.

**Received** 18.04.2024. **Received in revised form** 24.05.2024. **Accepted** 24.06.2024.

## Введение

За время пандемии COVID-19 зарегистрировано несколько генетических вариантов вируса SARS-CoV-2, создающих повышенный риск здоровью населения. Молекулярно-генетические и вирусологические исследования указывают на то, что вновь выявляемые генетические линии характеризуются как более трансмиссивные и одновременно менее патогенные [1]. В связи с этим 5 мая 2023 года Всемирная организация здравоохранения отменила статус пандемии для COVID-19 [2]. При этом заболевание, вызванное коронавирусом SARS-CoV-2, продолжает представлять серьезное испытание для мирового здравоохранения и научного сообщества. Исследования биологических характеристик новых штаммов SARS-CoV-2, направленные на более глубокое понимание патогенеза инфекции для оценки возможных рисков усиления

патогенности, остаются актуальными и критически важными [3].

Необходимое условие получения достоверных прогностических результатов – использование животных моделей. На сегодняшний день разработаны и успешно применены в доклинических испытаниях следующие модели: сирийские хомячки [4], приматы [5], хорьки [6] и трансгенные гуманизированные мыши, экспрессирующие человеческий ангиотензинпревращающий фермент 2 [7], однако летальность и развитие тяжелого заболевания с повреждением легких были показаны только для трансгенных мышей [8]. Тем не менее высокая стоимость и сложность их получения ограничивают широкое использование данной модели.

Сирийские хомячки проявили высокую восприимчивость к инфицированию SARS-CoV-2 и продемонстрировали разнообразный спектр тяжести

заболевания [4, 9]. При этом данная модель имеет свои ограничения, такие как 100% выздоровление к 14-м суткам после инфицирования [10] и специфичный иммунный ответ на S-белок, несхожий с человеческим [11].

Инфекционную патологию при отсутствии летальности у изучаемых животных возможно определить гистологическими методами, анализируя микропрепараты тканей легких. При этом картина патоморфологических изменений имеет значимые различия в зависимости от вида лабораторного животного, геноварианта вируса SARS-CoV-2, вызывающего инфекционный процесс, и инфицирующей дозы. Например, при заражении мышей BALB/c и сирийских хомячков высокими дозами коронавируса в тканях легких наблюдаются проявления альвеолярно-геморрагического синдрома, вызванные прямым цитопатическим действием вируса на альвеолоциты и эндотелий капилляров [12–13], что отмечено у пациентов с COVID-19 [14] и характерно для многих респираторных инфекционных агентов. Подобные поражения легочной ткани грызунов являются основными при исследовании *in vivo* вирулентности высокопатогенного вируса гриппа птиц [15].

С учетом сказанного выше обоснованным становится поиск новой животной модели. Морских свинок довольно часто используют в экспериментах, связанных с исследованием иммунного ответа на различные инфекции. К настоящему времени публикаций, подтверждающих восприимчивость данного вида к SARS-CoV-2, нет, как и публикаций, достоверно опровергающих это.

Цель исследования – проведение сравнительного патоморфологического исследования тканей легких морских свинок, инфицированных различными геновариантами вируса SARS-CoV-2, с использованием метода морфометрических стандартизированных критериев.

## Материалы и методы

В эксперименте использовали самцов и самок аутбредных морских свинок массой 200–250 граммов, полученных из питомника лабораторных животных ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Морским свинкам подкожно имплантировали транспондеры (чипы) IPTT-300 (BMDS, США) для бесконтактного измерения температуры и идентификации ID и помещали их по две в индивидуально вентилируемые клетки. Животные имели свободный доступ к пище и воде. Акклиматизация к условиям эксперимента была проведена в течение 7 дней до заражения. Во время экспериментов температура в клетках поддерживалась на уровне +22–24°C, относительная влажность 40–55%. Морских свинок взвешивали, измеряли температуру и оценивали на клинические признаки болезни ежедневно. Все эксперименты на животных одобрены биоэтическим комитетом ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол БЭК № 3 от 15.06.2021) и проводились в соответствии с соответствующими национальными (ГОСТ 33215-2014.

Межгосударственный стандарт. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур, ГОСТ 33216-2014. Межгосударственный стандарт. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами) и международными [16–19] руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных. Для моделирования инфекционного процесса использовали семь штаммов, относящихся к основным геновариантам вируса SARS-CoV-2: линия Ухань (EPI\_ISL\_406844), альфа (EPI\_ISL\_6565012), бета (EPI\_ISL\_6492245), гамма (EPI\_ISL\_6565014), дельта (EPI\_ISL\_7338789), омикрон BA.5.2 (EPI\_ISL\_16613436) и омикрон EG.5 (EPI\_ISL\_18520144). Морские свинки были разделены на восемь групп по 12 животных (шесть самцов и шесть самок). Перед заражением их анестезировали – внутримышечно вводили золетил 100 (Virbac, Франция) в дозе 20 мг/кг. Заражение животных проводили интраназально инокуляцией вируса в объеме 100 мкл, в дозе 4 lg ТЦД<sub>50</sub>. Животным контрольной группы вводили 100 мкл 0,9% раствора NaCl. Начиная со вторых суток после заражения получали смывы из полости носа. Инфекционный титр вируса определяли по 50% тканевой цитопатической дозе вируса для культуры клеток почки зеленой мартышки Vero E6. Параметром контроля вирусной нагрузки в пробах считали пороговое значение Ct в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Суммарные антитела к SARS-CoV-2 в сыворотке крови морских свинок определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. Через 15 суток после заражения у выживших животных брали кровь и выводили их из эксперимента, вводя сверхдозу (200 мг/кг) золетила 100 с последующим обескровливанием. Легкие фиксировали в 10% растворе забуференного формалина для гистологических исследований («БиоВитрум», Россия). После фиксации доли каждого легкого (верхушечная, сердечная, диафрагмальная и добавочная – для правого и верхушечная, сердечная, диафрагмальная – для левого) были изолированы и проведены через гистологический вакуумный инфльтрационный процессор замкнутого типа Tissue-Tek VIP 6 (Sakura, Япония). Срезы, полученные на автоматическом ротационном микротоме Accu-Cut SRM 200 (Sakura, Япония), окрашивали гематоксилином и эозином, затем покрывали покровной пленкой в автоматическом стейнере Tissue Tek Film (Sakura, Япония). Светооптическое исследование и микрофотосъемку проводили на микроскопе AxioImager Z1 (Zeiss, Германия) с использованием программного пакета AxioVision 4.8.2 (Zeiss, Германия). Оценку распространенности и степени выраженности патологических проявлений инфекции проводили при анализе сканов срезов, полученных на цифровом сканере микропрепаратов Olympus SlideView VS200 (Olympus, Германия; программный пакет

VS200ASW 3.2) с увеличением объектива  $\times 20$ . При гистологическом исследовании тканей легких животных, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, применяли метод стандартизированных критериев, учитывающий следующие патоморфологические признаки: воспалительная инфильтрация межальвеолярных перегородок, перибронхиальная и периваскулярная воспалительная инфильтрация, кровоизлияния в просвет альвеол и бронхов, наличие фибрина в альвеолярном пространстве, выраженность отека, в том числе межальвеолярных перегородок, расширение и полнокровие сосудов. Степень распространенности основных патоморфологических проявлений – воспалительной инфильтрации и альвеолярно-геморрагического синдрома – оценивали по 5-балльной шкале: 1 балл – площадь патологических изменений на срезе занимает до 10% общей площади среза; 2 балла – от 10 до 25% площади среза; 3 балла – от 25 до 50% площади среза; 4 балла – от 50 до 75% площади среза; 5 баллов – площадь патологических изменений более 75% общей площади среза. Остальные признаки инфекции (периваскулярная и перибронхиальная инфильтрация, альвеолярный и периваскулярный отек, полнокровие сосудов) оценивали по 3-балльной шкале, где 1 балл – слабая, 2 балла – умеренная, 3 балла – выраженная. Для количественных переменных (площади патологических изменений ткани легкого) были рассчитаны базовые статистические показатели. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 13.0. Парное сравнение независимых выборок проведено с применением U-критерия Манна–Уитни, для взаимосвязанных выборок использован тест Вилкоксона. При сравнении показателей в более чем двух независимых группах использован тест Краскела–Уоллеса с тестом множественных сравнений Данна. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ . В качестве контроля сравнения использовали легкие интактных морских свинок, содержащихся в тех же условиях, что и животные опытных групп.

## Результаты

Независимо от геноварианта вируса у всех животных со второй недели отмечались клинические признаки заболевания в виде отказа от еды и воды, стремительного снижения веса. Начало гибели животных было зарегистрировано с десятых суток после инфицирования. Смертность в группах Ухань, альфа, бета, гамма и дельта варьировала от 25 до 75% без значимых межгрупповых различий.

В тканях органов-мишеней не была подтверждена репликация инфекционно активного вируса, однако РНК вируса SARS-CoV-2 обнаруживалась до пятих суток после инфицирования в смывах полости носа. У всех выживших после заражения животных были выявлены IgG к антигену SARS-CoV-2.

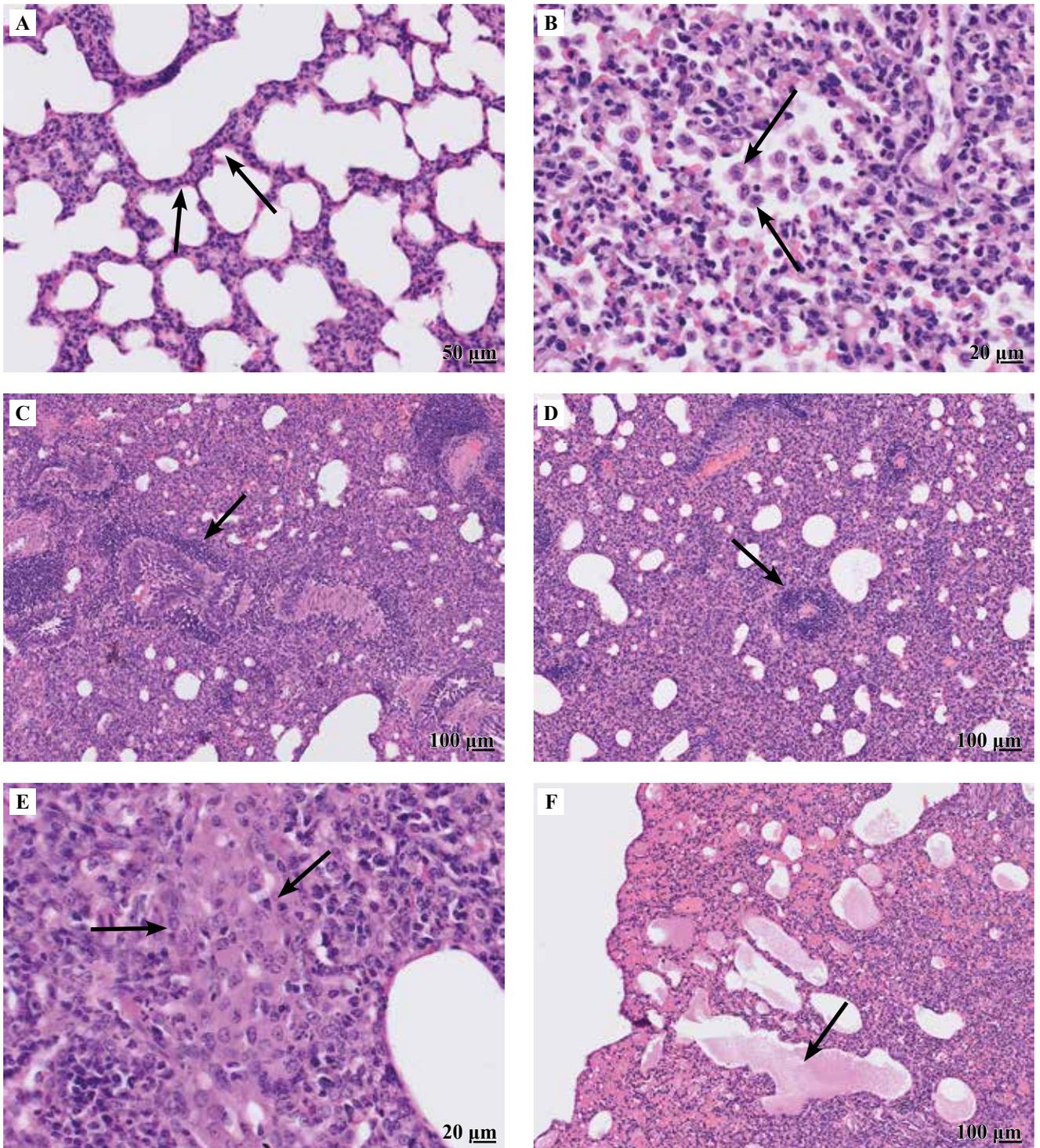
На аутопсии у всех животных отмечена характерная картина для острого повреждения легких: резкое уве-

личение объема, плотная, «резиновая», консистенция, висцеральная плевра лаковая, темно-красного цвета. Выявлено большое количество обтурирующих тромбов в основном стволе, легочных артериях и их ветвях, что указывает на развитие ДВС-синдрома.

При гистологическом исследовании легких обнаружены патологические изменения, характерные для диффузного альвеолярного повреждения, – внутриальвеолярный отек. Наблюдалась инфильтрация межальвеолярных перегородок лимфоцитами и нейтрофилами (рис. 1 А). Встречались фокусы гиперплазии бронхиального и альвеолярного эпителия, что трактовалось нами как маркер репаративного процесса. Наряду с гиперплазией альвеолярного эпителия наблюдали его десквамацию (рис. 1 В). В легких морских свинок, инфицированных геновариантами Ухань, гамма и дельта, по ходу крупных и мелких бронхов, включая терминальные респираторные бронхиолы, наблюдали обильную воспалительную инфильтрацию. В отдельных бронхах выявили деструкцию стенки. На срезе бронхиол наблюдалась воспалительная инфильтрация (рис. 1 С). В отдельных сосудах, преимущественно венозного отдела, обнаружена периваскулярная инфильтрация, но без видимого повреждения стенки (рис. 1 D).

Появление многоядерных клеток в очагах инфильтрации респираторного отдела легких, как и изменение формы и размеров альвеолярного эпителия свидетельствуют о цитопатическом воздействии вируса SARS-CoV-2 (рис. 1 Е). Просветы альвеол были заполнены отечной жидкостью, в которой выявлялись макрофаги и нейтрофилы в качестве маркеров воспалительной реакции (рис. 1 F). Кровоизлияния с практически полным заполнением просвета альвеол эритроцитами встречались довольно часто. Регистрировались массы эритроцитов в просвете кровеносных сосудов, также отмечены полнокровие и тромбоз мелких сосудов.

Штамм геноварианта альфа (рис. 2 А) и референс-штамм Ухань (не приведен на рисунке) вызывали у животных сходные повреждения легких, проявляющиеся в основном в виде дистелектазов и инфильтрации межальвеолярных перегородок. Геновариант бета (рис. 2 В) по сравнению с другими VOC вариантами, исключая омикрон, вызывал менее выраженные патологические повреждения легких, дистелектазы имели очаговый характер и значительно меньшую площадь. В легких животных, инфицированных геновариантом гамма, площадь поражения и количество оцениваемых патологических изменений были максимальными (рис. 2 С). Среди основных патоморфологических признаков выделялись дистелектазы и полиморфная воспалительная инфильтрация межальвеолярных перегородок и стенок сосудов. Геновариант дельта вызывал схожую патологическую картину (рис. 2 D), при этом проявление признаков было менее интенсивным. Патоморфологические признаки, регистрируемые в легких лабораторных животных, инокулированных

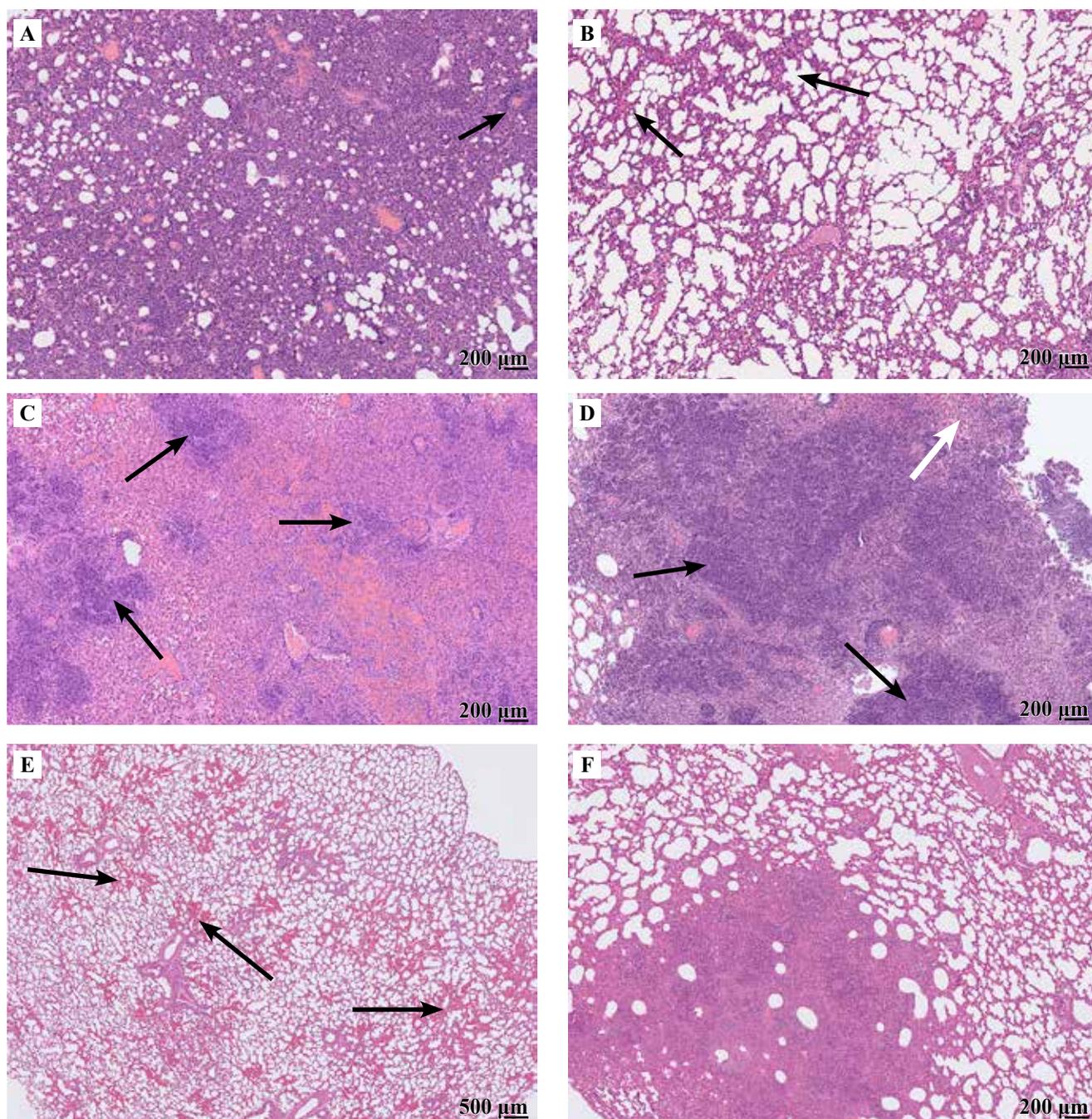


*Рис. 1.* Гистологический срез легкого морских свинок, инфицированных вирусом SARS-CoV-2.

А – лимфоцитарная инфильтрация межальвеолярных перегородок. В – слущенные эпителиоциты в просвете альвеол. С – перибронхиальная инфильтрация. D – периваскулярная инфильтрация. E – изменение пневмоцитов (увеличение размеров, увеличение ядерно-цитоплазматического отношения, образование синцитиев) как проявление цитопатического эффекта. F – отечная жидкость в просвете альвеол. Окраска гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок указан на микрофотографиях

*Fig. 1.* Histological section of a guinea pig lung infected with SARS-CoV-2.

A – lymphocytic infiltration of interalveolar septa. B – exfoliated epithelial cells in the alveolar lumen. C – peribronchial infiltration. D – perivascular infiltration. E – changes of alveolar cells (increased size and nuclear-cytoplasmic ratio; syncytia formation) as manifestation of the cytopathic effect. F – edematous fluid in the alveolar lumen. H&E stain. Scale bar is displayed on the micrographs



**Рис. 2.** Гистологический срез легкого морских свинок, инфицированных вирусом SARS-CoV-2 разных генетических вариантов в дозе 30 ID50.

А – альфа. Выявленная воспалительная нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация межальвеолярных перегородок со снижением воздушности паренхимы, периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация преимущественно мелких сосудов. В – бета. Слабая воспалительная лимфоцитарная инфильтрация межальвеолярных перегородок с сохранением воздушности паренхимы. С – гамма. Обширное кровоизлияние с фокусами некроза легкого. D – дельта. Обширные зоны некроза на фоне альвеолярной геморрагии. E – омикрон BA.5.2. Диффузные мелкие геморрагии. F – омикрон EG.5. Крупный фокус инфильтрации межальвеолярных перегородок с полной потерей воздушности в данной зоне. Окраска гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок указан на микрофотографиях

**Fig. 2.** Histological section of a guinea pig lung infected with various genetic variants of SARS-CoV-2 at a dose of 30 ID50. A – Alpha. Pronounced inflammatory infiltration of interalveolar septa with decreased airiness of the parenchyma, perivascular lymphocytic infiltration of mainly small vessels. B – Beta. Weak inflammatory infiltration of interalveolar septa and maintenance of the airiness of the parenchyma. C – Gamma. Extensive hemorrhage with foci of lung necrosis. D – Delta. Extensive necrotic zones on the background of alveolar hemorrhage. E – Omicron BA.5.2. Diffuse small hemorrhages. F – Omicron EG.5. A major focus of infiltration of the interalveolar septa with a complete loss of airiness in this area. H&E stain. Scale bar is displayed on the micrographs

штаммами генетических линий варианта омикрон (рис. 2 E, F), обладали меньшей степенью выраженности по сравнению с таковыми при остальных геновариантах. При гистологическом исследовании выявлялся небольшой внутриальвеолярный отек, инфильтрация стенок альвеол, отмечены явления плазмо- и геморагии, выраженные признаки уплотнения легких отсутствовали. Однако вирус SARS-CoV-2 генетической линии омикрон EG.5 (рис. 2 F) не вызывал геморрагических проявлений, выявляемых при инфицировании морских свинок штаммом другой генетической линии – омикрон BA.5.2, что может свидетельствовать о постепенной аттенуации коронавируса в связи с адаптацией к человеческой популяции.

Для выявления достоверных различий между патоморфологическими изменениями тканей легких в группах морских свинок, инфицированных коронавирусом SARS-CoV-2 различных генетических линий, был проведен статистический анализ с учетом балла выраженности патологии (рис. 3).

Выраженность геморрагического синдрома значительно не различалась между группами, во всех группах медиана не превысила 1 балл. Исключением является группа омикрон EG.5, достоверно отличающаяся от групп Ухань ( $p=0,0075$ ), бета ( $p=0,0013$ ), гамма ( $p<0,0001$ ), дельта ( $p<0,0001$ ), омикрон BA.5.2 ( $p=0,0274$ ).

Степень выраженности дистелектаза была значительно выше у животных, инфицированных вариантами Ухань, альфа и гамма, со значением медианы в 3 балла. Меньшая степень выраженности патологии показана в группах бета и дельта, минимальная – у генетических линий варианта омикрон. Признак в группе Ухань достоверно отличен от такового в группах бета ( $p=0,0002$ ), дельта ( $p<0,0001$ ), омикрон EG.5 ( $p<0,0001$ ) и омикрон BA.5.2 ( $p<0,0001$ ). В группе альфа данная патология более выражена, чем в группах бета ( $p=0,0008$ ), дельта ( $p=0,0002$ ), омикрон EG.5 ( $p<0,0001$ ) и омикрон BA.5.2 ( $p<0,0001$ ). Группа гамма имеет достоверные различия с группами омикрон EG.5 ( $p=0,0250$ ) и омикрон BA.5.2 ( $p=0,0036$ ).

Воспалительная инфильтрация межальвеолярных перегородок проявлялась достоверно более выраженно у животных группы Ухань, альфа и гамма (медиана – 3 балла), менее выраженно – в группах бета и дельта (2 балла). Значения данного признака достоверно отличались между группами варианта омикрон и группами Ухань ( $p<0,0001$ ), альфа ( $p<0,0001$ ), гамма ( $p=0,0002$  для BA.5.2 и  $0,0013$  для EG.5). В группах Ухань и альфа этот показатель значительно отличался от таковых в группе бета ( $p=0,0025$  и  $0,0363$ , соответственно), а значения в группе Ухань от группы дельта ( $p=0,0049$ ).

Достоверное различие между значениями воспалительной инфильтрации стенки бронхов регистрировали в препаратах групп Ухань ( $p<0,0001$ ), гамма ( $p=0,0056$  для BA.5.2 и  $p=0,0068$  для EG.5) и дельта ( $p=0,0022$  для BA.5.2 и  $p=0,0029$  для EG.5) по сравнению с группами варианта омикрон.

Воспалительная инфильтрация стенок сосудов в группах Ухань ( $p<0,0001$ ) и гамма ( $p=0,0103$  для BA.5.2 и  $p=0,0002$  для EG.5) достоверно отличалась от таковой в группах варианта омикрон.

Такой патологический признак как полнокровие альвеолярных капилляров достоверно чаще встречался в препаратах группы Ухань по сравнению с группами гамма ( $p=0,0169$ ) и омикрон ( $p<0,0001$  для BA.5.2 и  $p=0,0020$  для EG.5). В группе бета этот признак встречался чаще, чем в группе омикрон BA.5.2 ( $p=0,0165$ ).

## Обсуждение

В данной работе было показано, что интраназальное инфицирование морских свинок (*Cavia porcellus*) генетическими вариантами вируса SARS-CoV-2 Ухань, альфа, бета, гамма, дельта и омикрон (последний представлен двумя генетическими линиями – BA.5.2 и EG.5) приводит к клиническому заболеванию, проявляющемуся со второй недели после заражения.

У инфицированных животных выявлены патологические изменения в тканях легких, соответствующие вирусной пневмонии. Степень тяжести выявленных патоморфологических изменений достоверно различалась между некоторыми вариантами SARS-CoV-2. В большинстве случаев повреждение легких послужило причиной гибели животных.

Показано, что основным патоморфологическим проявлением в легких морских свинок является диффузное альвеолярное повреждение в сочетании с альвеолярно-геморрагическим синдромом, что полностью соответствует гистологическим изменениям, наблюдаемым у пациентов, умерших от COVID-19 [20]. В результате нашего исследования также были выявлены характерные для коронавирусной инфекции [14] дисциркуляторные расстройства кровообращения в виде венозного полнокровия в мелких сосудах легких.

Известно, что поверхностные белки вируса SARS-CoV-2 могут воздействовать на Т-лимфоциты, вызывать цитокиновый шторм и серию иммунных ответов в организме [21]. Развитие интерстициального воспаления за счет активации цитокиновой системы приводит к утолщению и отеку межальвеолярных перегородок, снижая воздушность легких [22]. Следует отметить, что подобное влияние вирусиндуцированного воспаления на тяжесть инфекционного процесса характерно и для вируса гриппа, хотя и в меньшей степени [23–24].

На гистологических препаратах легких морских свинок наблюдали ярко выраженное уплотнение паренхимы легкого (дистелектаз). Данный патоморфологический признак, достоверно различающийся для всех геновариантов SARS-CoV-2, связан со способностью разных генетических вариантов коронавируса вызывать гипериммунные воспалительные реакции и, по нашему мнению, может служить критерием оценки тяжести заболевания.

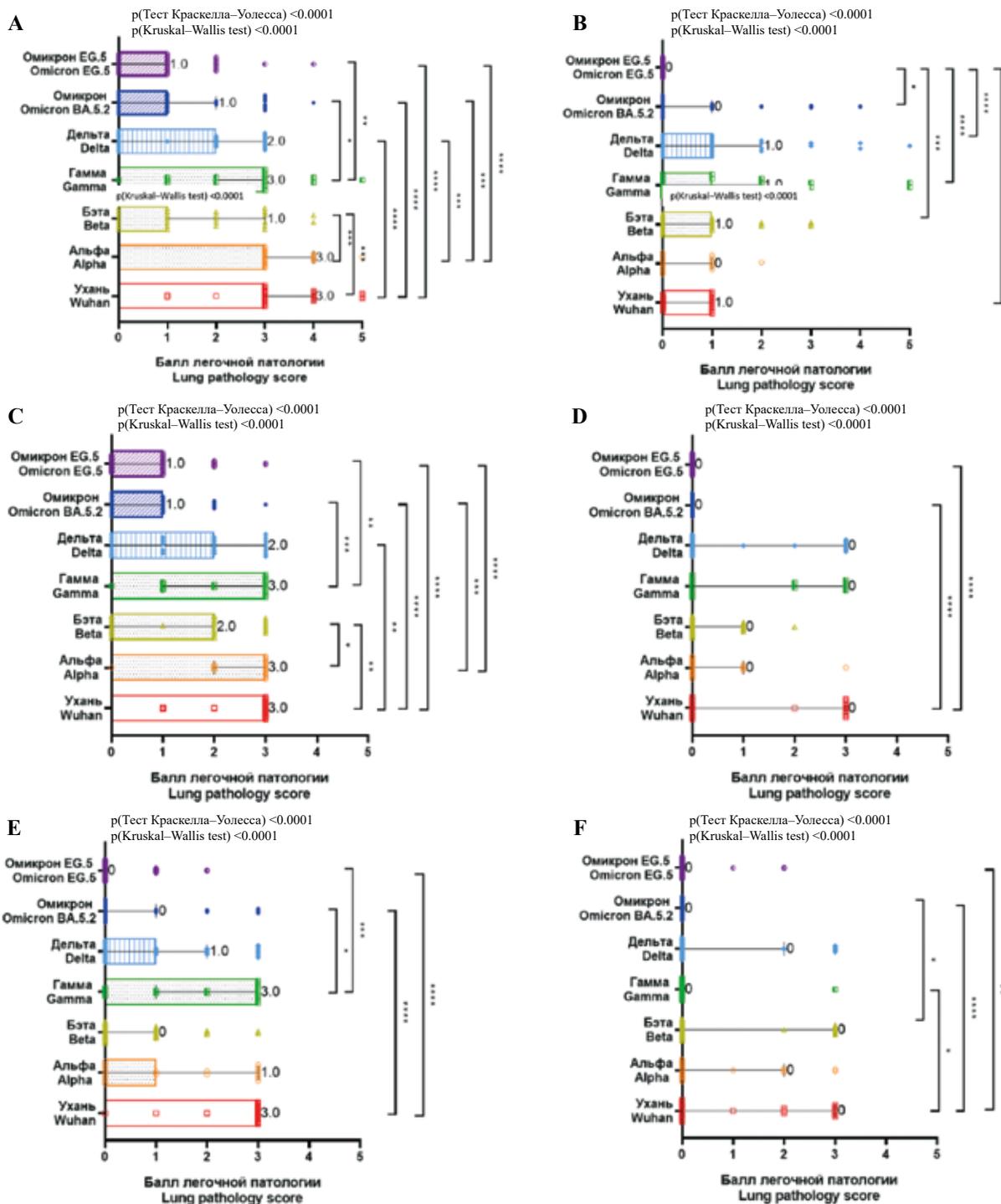


Рис. 3. Частота развития постинфекционной легочной патологии при экспериментальном инфицировании морской свинки геновариантами SARS-CoV-2 в дозе 30 ID50.

А – дистелектаз. В – геморрагии. С – воспалительная инфильтрация межальвеолярных перегородок. Д – воспалительная инфильтрация стенок бронхов. Е – воспалительная инфильтрация стенок сосудов. Ф – полнокровие альвеолярных капилляров. На диаграмме: точки – индивидуальные значения, вершины гистограмм – медианы, горизонтальные линии – 95% доверительные интервалы.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Fig. 3. Frequency of post-infection pulmonary pathology in experimental inoculation of guinea pigs with SARS-CoV-2 variants at a dose of 30 ID50.

A – dystelektasis. B – hemorrhages. C – inflammatory infiltration of interalveolar septa. D – inflammatory infiltration of bronchial walls. E – inflammatory infiltration of blood vessel walls. F – dilation and congestion of capillaries in alveolar walls. Legend: individual values (points); medians (tops); 95% confidence intervals (horizontal lines).

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Описанные патоморфологические изменения легких морских свинок, вызванные вирусом SARS-CoV-2, характерны и для других животных моделей, исследованных нами ранее, – мышей линии BALB/c [12] и сирийских хомячков [13] при низких дозах инфицирования.

Можно констатировать, что применяемый в нашем исследовании для сравнительной оценки степени повреждения легкого как основного органа-мишени метод морфометрических стандартизированных критериев может быть использован как при изучении биологических свойств новых генетических вариантов и линий вируса SARS-CoV-2 на разных видах лабораторных животных, так и для исследований *in vivo* перспективных терапевтических препаратов и вакцин против COVID-19.

### Заключение

В работе представлены результаты исследования, показывающие сходство гистологически выявляемых изменений тканей легкого, поврежденного инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, у человека и морской свинки, что позволяет использовать выбранное нами модельное животное для изучения COVID-19.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.В. Шиповалов, О.В. Пьянков, О.С. Таранов.  
Сбор и обработка материала – Г.А. Кудров, А.В. Шиповалов, Е.К. Ивлева, Е.В. Спиридонова, В.В. Омигов.  
Написание текста – А.В. Шиповалов, Е.К. Ивлева.  
Редактирование – А.В. Шиповалов, О.В. Пьянков, О.С. Таранов.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – A.V. Shipovalov, O.V. Pyankov, O.S. Taranov.  
Collected the data and performed the analysis – G.A. Kudrov, A.V. Shipovalov, E.K. Ivleva, E.V. Spiridonova, V.V. Omigov.  
Wrote the paper – A.V. Shipovalov, E.K. Ivleva.  
Edited the manuscript – A.V. Shipovalov, O.V. Pyankov, O.S. Taranov.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

### Литература/References

1. *Shrestha LB, Foster C, Rawlinson W, Tedla N, Bull RA.* Evolution of the SARS-CoV-2 omicron variants BA.1 to BA.5: implications for immune escape and transmission. *Rev Med Virol.* 2022;32:e2381. DOI: 10.1002/rmv.2381.
2. World Health Organization (WHO), “Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Situation Overview” (WHO, 2024). Available from: <https://www.who.int/europe/emergencies/situations/covid-19> (accessed 01.04.2024).
3. *Carabelli AM, Peacock TP, Thorne LG, Harvey WT, Hughes J.* SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(3):162–77. DOI: 10.1038/s41579-022-00841-7.
4. *Imai M, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Loeber S, Halfmann PJ, Nakajima N et al.* Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117(28):16587–95. DOI: 10.1073/pnas.2009799117.
5. *Mukhopadhyay L, Yadav PD, Gupta N, Mohandas S, Patil DY, Shete-Aich A et al.* Comparison of the immunogenicity & protective efficacy of various SARS-CoV-2 vaccine candidates in non-human primates. *Indian J Med Res.* 2021;153(1&2):93–114. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR\_4431\_20.
6. *Richard M, Kok A, de Meulder D, Bestebroer TM, Lamers MM, Okba NMA et al.* SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nat Commun.* 2020;11(1):3496. DOI: 10.1038/s41467-020-17367-2.
7. *Sun SH, Chen Q, Gu HJ, Yang G, Wang YX, Huang XY et al.* A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis. *Cell Host Microbe.* 2020;28(1):124–33.e4. DOI: 10.1016/j.chom.2020.05.020.
8. *Pandey K, Acharya A, Mohan M, Ng CL, Reid SP, Byrareddy SN.* Animal models for SARS-CoV-2 research: a comprehensive literature review. *Transbound Emerg Dis.* 2021;68(4):1868–85. DOI: 10.1111/tbed.13907.
9. *Port JR, Yinda CK, Owusu IO, Holbrook M, Fischer R, Bushmaker T et al.* SARS-CoV-2 disease severity and transmission efficiency is increased for airborne compared to fomite exposure in Syrian hamsters. *Nat Commun.* 2021;12(1):4985. DOI: 10.1038/s41467-021-25156-8.
10. *Чепур С.В., Тюнин М.А., Мясников В.А., Алексеева И.И., Владимиров О.О., Ильинский Н.С. и др.* Поражение органов и тканей SARS-CoV-2: биологическая модель на сирийских хомяках *Mesocricetus auratus* для экспериментальных (доклинических) исследований. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(4):25–34. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.25-34.  
*Chepur SV, Tyunin MA, Myasnikov VA, Alekseeva II, Vladimirova OV, Ilinskiy NS et al.* Organ and tissue damage related to SARS-CoV-2: the biological model for experimental (preclinical) trials on golden hamsters *Mesocricetus auratus*. *Clinical and experimental morphology.* 2021;10(4):25–34 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.25-34.
11. *Merkuleva IA, Shcherbakov DN, Borgoyakova MB, Isaeva AA, Nesmeyanova VS, Volkova NV et al.* Are hamsters a suitable model for evaluating the immunogenicity of RBD-based anti-COVID-19 subunit vaccines? *Viruses.* 2022;14(5):1060. DOI: 10.3390/v14051060.
12. *Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Томилов А.А., Боднев С.А., Болдырев Н.Д., Овчинникова А.С. и др.* Изучение восприимчивости линий мышей к вызывающим обеспокоенность вариантам вируса SARS-CoV-2. Проблемы особо опасных инфекций. 2022;1:148–155. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-148-155.  
*Shipovalov AV, Kudrov GA, Tomilov AA, Bodnev SA, Boldyrev ND, Ovchinnikova AS et al.* Susceptibility to SARS-CoV-2 virus variants of concern in mouse models. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2022;1:148–155 (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-148-155.
13. *Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Томилов А.А., Боднев С.А., Болдырев Н.Д., Овчинникова А.С. и др.* Патогенность вызы-

- вающих обеспокоенность вариантов вируса SARS-CoV-2 для сирийского хомячка. Проблемы особо опасных инфекций. 2022;3:164–169. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-164-169. Shipovalov AV, Kudrov GA, Tomilov AA, Bodnev SA, Boldyrev ND, Ovchinnikova AS et al. Pathogenicity of the SARS-CoV-2 virus variants of concern for the Syrian golden hamster. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections. 2022;3:164–169 (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-164-169.
14. Тодоров С.С., Казьмин А.С., Дерibas В.Ю., Тодоров С.С. (мл.). Патологическая анатомия поражения сосудов легких при COVID-19. Клиническая и экспериментальная морфология. 2022;11(2):6–12. DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.6-12. Todorov SS, Kazmin AS, Deribas VYu, Todorov SS (Jr). Pathological anatomy of lung vessels in COVID-19. Clinical and experimental morphology. 2022;11(2):6–12 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.2.6-12.
15. Шестопалова Л.В., Прокопьева Е.А., Корчагина К.В., Максимова Д.А., Зайковская А.В., Шкурупи В.А. и др. Ультраструктурные изменения альвеолоцитов и макрофагов легких под влиянием высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N1. Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. 2011;9(1):58–65. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=15602474> (получено 01.04.2024). Shestopalova LV, Prokopiyeva EA, Korchagina KV, Maksimova DA, Zaikovskaya AV, Shkurupi VA et al. Ultrastructural changes of lung alveolocytes and macrophages by influence of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus. Vestnik NSU. Series: Biology and Clinical Medicine. 2011;9(1):58–65 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=15602474> (accessed 01.04.2024).
16. National research council of the national academies. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th. ed. Washington: National Academies Press, 2011. 220 p. DOI: 10.17226/12910.
17. P Flecknell (ed.). Laboratory animal anaesthesia. 4th. ed Oxford: Academic Press, 2015. 321 p. DOI: 10.1016/C2013-0-13494-0.
18. JG Fox, LC Anderson, G Otto, KR Pritchett-Corning, MT Whary (eds.). Laboratory animal medicine. 3rd. ed. London: Academic Press, 2015. 1746 p.
19. American Veterinary Medical Association. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. 121 p. Available from: <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf> (accessed 01.04.2024).
20. О.В. Зайратьянц (ред.). Патологическая анатомия COVID-19. Атлас. Москва: НИИ организации здравоохранения и медицинского менеджмента ДЗМ, 2020. 140 с. OV Zairatians (ed.). Pathological anatomy of COVID-19. Atlas. Moscow: State Budgetary Institution “Research Institute for Healthcare Organization and Medical Management of Moscow Healthcare Department”, 2020. 140 p. (In Russ.).
21. Сомова Л.М., Коцюрбий Е.А., Дробот Е.И., Ляпун И.Н., Щелканов М.Ю. Клинико-морфологические проявления дисфункции иммунной системы при новой коронавирусной инфекции COVID-19. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(1):11–20. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.11-20. Somova LM, Kotsyurbiy EA, Drobot EI, Lyapun IN, Shchelkanov MYu. Clinical and morphological manifestations of immune system dysfunction in new coronavirus infection (COVID-19). Clinical and experimental morphology. 2021;10(1):11–20 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.11-20.
22. Савченко С.В., Грицингер В.А., Тихонов В.В., Ламанов А.Н., Новоселов В.П., Кошляк Д.А. Клинико-анатомический анализ летальности от COVID-19 при скорострессной смерти и у умерших в лечебно-профилактических учреждениях. Судебно-медицинская экспертиза. 2021;64(3):5–10. DOI: 10.17116/sudmed2021640315. Savchenko SV, Gritsinger VA, Tikhonov VV, Lamanov AN, Novoselov VP, Koshlyak DA. Clinical and anatomical analysis of mortality from COVID-19 in sudden death and in those who died in health care facilities. Sudebno-meditsinskaya ekspertisa = Forensic Medical Expertise. 2021;64(3):5–10 (In Russ.). DOI: 10.17116/sudmed2021640315.
23. Almansa R, Martinez-Orellana P, Rico L, Iglesias V, Ortega A, Vidaña B et al. Pulmonary transcriptomic responses indicate a dual role of inflammation in pneumonia development and viral clearance during 2009 pandemic influenza infection. PeerJ. 2017;5:e3915. DOI: 10.7717/peerj.3915.
24. To KK, Hung IF, Li IW, Lee KL, Koo CK, Yan WW et al. Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection. Clin Infect Dis. 2010;50(6):850–9. DOI: 10.1086/650581.

### Информация об авторах

Андрей Владимирович Шиповалов – старший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Глеб Александрович Кудров – младший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Елена Константиновна Ивлева – младший научный сотрудник отдела микроскопических исследований ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Екатерина Викторовна Спиридонова – стажер-исследователь отдела микроскопических исследований ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Владимир Вилорьевич Омигов – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией патоморфологии отдела микроскопических исследований ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Олег Викторович Пьянков – кандидат биологических наук, заведующий отделом «Коллекция микроорганизмов» ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Олег Святославович Таранов – заведующий отделом микроскопических исследований ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

**Author information**

Andrey V. Shipovalov – Senior Researcher, Department “Collection of microorganisms”, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”.

<https://orcid.org/0000-0003-1201-8307>

Gleb A. Kudrov – Junior Researcher, Department “Collection of microorganisms”, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”.

<https://orcid.org/0000-0002-8251-7040>

Elena K. Ivleva – Junior Researcher, Department of Microscopic Research, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”.

<https://orcid.org/0000-0003-1194-7219>

Ekaterina V. Spiridonova – Trainee Researcher, Department of Microscopic Research, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”.

<https://orcid.org/0009-0006-8655-6713>

Vladimir V. Omigov – Cand. Sci. (Med.), Head of the Pathomorphology Laboratory, Department of Microscopic Research, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”.

<https://orcid.org/0000-0002-2028-6099>

Oleg V. Pyankov – Cand. Sci. (Biol.), Head of Department “Collection of microorganisms”, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”.

<https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>

Oleg S. Taranov – Head of Department of Microscopic Research, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”.

<https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>