_ ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: ОТ МЕХАНИЗМОВ РЕПЛИКАЦИИ _____ И ПАТОГЕНЕЗА К ПОДХОДАМ ТЕРАПИИ

УДК 578.286; 57.084.1

МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНФЕКЦИИ SARS-CoV-2 У МЫШЕЙ ЗА СЧЕТ ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *АСЕ2* ЧЕЛОВЕКА ПУТЕМ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ AAV-hACE2

© 2022 г. Д. В. Глазкова^a, Е. В. Богословская^a, Ф. А. Урусов^{a, b, *}, Н. П. Карташова^c, Е. А. Глубокова^c, А. В. Грачева^c, Е. Б. Файзулоев^c, Г. В. Трунова^d, В. А. Хохлова^d, О. А. Безбородова^d, А. А. Панкратов^d, И. А. Ленева^c, Г. А. Шипулин^a

^аЦентр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации, Москва, 119992 Россия

 b Научно-исследовательский институт медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова, Москва, 105275 Россия

^сНаучно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, 105064 Россия

^dНациональный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 125284 Россия

> **e-mail: flanger.fx@mail.ru* Поступила в редакцию 25.01.2022 г. После доработки 08.04.2022 г. Принята к публикации 12.04.2022 г.

Один из важнейших этапов в создании препаратов и вакцин для борьбы с новой коронавирусной инфекцией, COVID-19, — это их тестирование на релевантной модели животных. В экспериментальной медицине удобной моделью, с хорошо изученной иммунологией, считаются лабораторные мыши. Однако эти животные не подвержены заражению коронавирусом-2, вызывающим тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2) у человека, из-за отсутствия на клетках его рецептора — ангиотензинпревращающего фермента-2 человека (hACE2), необходимого для проникновения вируса в клетку. Нами показано, что интраназальное введение аденоассоциированных вирусных векторов: AAV9 и AAV-DJ, — кодирующих hACE2, приводит к высокому уровню экспрессии гена этого белка, ACE2, в легких, в отличие от вектора AAV6, введение которого вызывает низкую экспрессию ACE2. При заражении SARS-CoV-2 мышей, экспрессирующих hACE2, вирус реплицировался в легких, что приводило к развитию бронхопневмонии на седьмые сутки после инфицирования. Таким образом, впервые предложена простая методика доставки гена ACE2 человека в легкие мышей путем интраназального введения аденоассоциированного вектора, позволяющая в короткие сроки получить модель животных для изучения инфекции SARS-CoV-2.

Ключевые слова: hACE2, SARS-CoV-2, AAV9, AAV6, AAV-DJ, мыши BALB/с DOI: 10.31857/S0026898422050068

Для разработки и тестирования терапевтических и профилактических лекарственных средств против любой инфекции, включая новую коронавирусную инфекцию, COVID-19, необходимо использовать релевантные модели животных. Наиболее распространенные и доступные животные – лабораторные мыши – не могут быть использованы для моделирования течения заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2. Это связано с тем, что для проникновения в хозяйскую клетку вирионам SARS-CoV-2 необходим клеточный рецептор – ангиотензинпревращающий фермент-2 человека (hACE2), - связываясь с которым, вирус начинает свой инфекционный цикл. Мышиный же ортолог hACE2 (Ace2) не узнается этим коронавирусом, то есть не служит его рецептором, и поэтому SARS-CoV-2 не может инфицировать клетки мышей. Появление в 2021 году трансгенных мышей, у которых ген hACE2, ACE2, присутствует в геноме и экспрессируется в клетках легких, отчасти решает эту проблему [1]. Однако эти животные не всегда доступны и, кроме того, ограничены линией с определенным генетическим бэкграундом, что не позволяет изучать влияние генетических особенностей на течение заболевания. Более простым и доступным решением может стать введение мышам вектора, несущего ген ACE2. Hassan A. и соавт. [2] показали, что интраназальное введение аденовирусного вектора (AdV), кодирующего hACE2, позволяет достичь экспрессии этого белка в легких мышей и получить животных, чувствительных к заражению SARS-CoV-2. Однако введение AdV сопровождается воспалительным процессом в бронхах, что может при последующем заражении искажать картину течения инфекции COVID-19. Также для доставки гена АСЕ2 было предложено использование адноассоциированных вирусных векторов (AAV-векторов), не вызывающих воспаления, хотя в этом случае эффективным оказалось только интратрахеальное введение AAV-вектора в респираторный тракт мышей [3, 4]. Следует отметить, что интратрахеальное введение относится к инвазивным методам, что сильно усложняет получение трансдуцированных животных. На основании этих фактов мы поставили перед собой задачу оптимизировать доставку гена ACE2 с помощью AAV-векторов в респираторный тракт мышей BALB/с и охарактеризовать экспериментальную модель инфекции COVID-19 у этих лабораторных животных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вирусы, клетки. Клетки линии HEK-293FT ("Invitrogen", США) культивировали в среде DMEM ("Gibco", США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; "Gibco") и 0.01 М НЕРЕЅ ("Gibco"). Клетки линии Vero CCL81 (АТСС, США) из коллекции Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (Россия) культивировали в среде DMEM с 5% FBS, 100 ME/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Лабораторный штамм SARS-CoV-2 Dubrovka (GenBank Acc. No. MW161041.1) был выделен на культуре клеток Vero CCL81 из назофарингеального мазка больного COVID-19. Штамм прошел 20 последовательных пассажей на клетках Vero CCL81 и вызывал выраженное цитопатическое действие.

Конструирование плазмиды рААV-hACE2. Плазмида pcDNA3-sACE2(WT)-Fc(IgG1), содержащая N-концевую часть гена *ACE2*, кодирующего белок hACE2, получена из "Addgene" (Addgene plasmid #154104) [5]. Сборку С-концевой части проводили методом ПЦР с удлинением перекрывающихся участков [6]. Перекрывающиеся N- и С-концевые участки амплифицировали и объединяли, используя ПЦР. Фрагмент, содержащий полный ген, интегрировали в плазмидный вектор pAAV-GFP ("CellBioLabs, Inc.", США) и получили плазмиду pAAV-hACE2, которую валидировали секвенированием.

Получение векторных частиц AAV-hACE2. Для наработки AAV-векторов использовали хелперную плазмиду pHelper ("CellBioLabs, Inc."), векторную плазмиду pAAV-hACE2 и одну из плазмид pAAV6-RC6, pAAV9-RC или pAAVDJ-RC, кодирующих белки капсидов AAV серотипов 6, 9 или DJ ("CellBioLabs, Inc."). Получение векторных частиц и их очистку проводили, используя протокол трансфекции с полиэтиленимином и очистки полиэтиленгликолем (PEG 8000), описанный Т. Кітига и др. [7].

Определение титра ААV методом ПЦР. Для определения титра AAV (числа векторных геномов в 1 мл, вг/мл) ДНК из образца выделяли с помощью набора реагентов АмплиТест РИБО-преп (ФГБУ "Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью" ФМБА России, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. ПЦР в реальном времени проводили на приборе RotorGene Q, используя праймеры на область ITR AAV и соответствующую программу амплификации [8].

Экспериментальные животные. В исследовании использовали самок мышей линии BALB/с с массой тела 18–20 г, которые были получены из "БиоПитомника СТЕЗАР" (Россия).

Введение мышам вектора AAV-hACE2. Суспензию векторных частиц вводили мышам интраназально в общем объеме 60 мкл (30 мкл в каждую ноздрю) под легким эфирным наркозом, держа животных под углом 45° с зафиксированным в закрытом положении ртом [9].

Заражение животных. Мышей заражали вирусом SARS-CoV-2, взятым в титре 3.2 × 10⁶ ТЦИД₅₀/мл, интраназально: общий объем — 60 мкл (по 30 мкл в каждую ноздрю) — под легким эфирным наркозом. Животным, входящим в группы сравнения, таким же образом и в таком же объеме интраназально вводили фосфатно-солевой буфер.

Определение инфекционного титра вируса в легких. Здесь и далее материал для исследований получали от гуманно умершвленных под наркозом животных. В стерильных условиях извлекали легкие, которые гомогенизировали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере. Суспензию осветляли центрифугированием. Клетки Vero ССL81 рассевали в 96-луночные планшеты ("Соstar", США) с плотностью 2×10^4 клеток на лунку и культивировали в течение 3 суток. Готовили 10-кратные разведения проб вируса из легких, которые вносили в лунки планшета (200 мкл/лунка) и инкубировали при 37°С в течение 5 суток до появления цитопатического действия в клетках вирусного контроля. Расчет титра вируса проводили по методу, описанному M.A. Ramakrishnan [10], и выражали в lg (ТЦИД₅₀/мл). Предел чувствительности метода составлял 1.5 lg.

Экстракция РНК из образцов легких мышей. Легкие извлекали, гомогенизировали в стерильных условиях в 1 мл раствора ExtractRNA ("Евроген", Россия). Лизат осветляли центрифугированием и проводили экстракцию РНК хлороформом. Далее РНК выделяли с помощью набора реагентов АмплиТест РИБО-преп (ФГБУ "Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью" ФМБА России) согласно рекомендациям производителя. Анализ экспрессии гена *ACE2* в легких мышей. Образцы РНК обрабатывали ДНКазой в течение 20 мин, после чего прогревали при 70°С 10 мин. Количество мРНК hACE2 в образцах определяли с помощью ПЦР в реальном времени, используя праймеры: 5'-CTGGGAATCCAACCAACTCTG-3', 5'-CCACTACAATCACGTCCATC-3' – и зонд 5'-Fam-CCAGCCCCCCGTTAGTATTTGGCTC-BHQ1-3'. В качестве внутреннего контроля использовали ПЦР в реальном времени с праймерами на ген бета-глюкуронидазы мыши (*Gusb*).

Определение PHK SARS-CoV-2 в легких. Тестирование образцов PHK на наличие PHK SARS-CoV-2 проводили с помощью набора реагентов АмплиТест SARS-CoV-2 (ФГБУ "Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью" ФМБА России) согласно инструкции производителя.

Морфологическое исследование. Правое легкое мышей фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч, обезвоживали и заливали в Гистомикс ("BioVitrum", Россия). На этапе заливки материал ориентировали вдоль длинной оси. Серийные срезы толщиной 3–5 мкм изготавливали на ротационном микротоме Leica RM 2125 RTS ("Leica", Германия), затем окрашивали гематоксилином и эозином и заключали в канадский бальзам. Гистологические препараты исследовали под световым микроскопом BX 51 ("Olympus", Япония) с системой фоторегистрации материала.

Статистическая обработка. Для количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего. Статистический анализ выполняли с использованием программы Statistica 8.0. Достоверность различий между группами данных оценивали с применением *U*-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия гена ACE2 в легких мышей после введения вектора

Для получения модельных мышей с транзиентной экспрессией hACE2 необходимо доставить ген ACE2 в клетки легких. После интраназального введения AAV-вектор при вдыхании проникает в нижние дыхательные пути и трансдуцирует эпителиальные клетки легких. Экспрессия ACE2 в этих клетках приводит к появлению hACE2 на их поверхности, а значит к возможности связывания с ними вируса SARS-CoV-2. После связывания с hACE2 вирус проникает в клетку и запускает цикл репликации.

Для интраназального введения мы использовали модифицированную методику L. Santry и соавт. [9]. В первом эксперименте сравнивали экспрессию hACE2 в легких животных при использовании для доставки ACE2 AAV с капсидами трех разных серотипов: AAV9, AAV6 и AAV-DJ. AAVвекторы в дозах, указанных в табл. 1, вводили мышам в соответствии с процедурой, описанной в "Экспериментальной части"; ААV-вектор каждого серотипа вводили группе из трех животных. На 7, 14 и 21 сутки после введения AAV проводили забор легких и оценивали количество мРНК hACE2, используя обратную транскрипцию (ОТ) с ПЦР в реальном времени. Также для оценки эффективности выделения РНК и прохождения ОТ-ПЦР в образцах измеряли уровень мРНК бета-глюкуронидазы мыши (Gusb). Средний пороговый цикл (C_t) для мРНК Gusb составлял 18.4, а стандартное отклонение по C_t в образцах от разных животных не превышало 7%, что позволило сравнивать результаты измерения мРНК hACE2 без нормализации, используя в качестве параметра для сравнения значения С_т для ACE2.

Как видно из данных, приведенных в табл. 1, введение ACE2 с помощью вектора AAV6 приводило к экспрессии этого гена на очень низком уровне у части животных, у остальных мРНК hACE2 вообще не удалось обнаружить. После введения гена ACE2 с помощью векторов AAV9 и AAV-DJ наблюдали его стабильную экспрессию в легких. Уровень экспрессии АСЕ2 статистически значимо не отличался при доставке векторами AAV9 и ААV-DJ. При сравнении количества мРНК hACE2 в легких мышей при введении различных доз препаратов (от 6 \times 10⁹ до 6 \times 10¹⁰ для вектора AAV9 и от 6×10^9 до 2×10^{10} для вектора AAV-DJ) выявлено, что экспрессия АСЕ2 отличалась незначительно и сохранялась на одном уровне вплоть до 21 суток. Для дальнейших экспериментов был выбран вектор AAV-DJ, так как при наработке давал более высокий выход.

Развитие инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у трансдуцированных AAV-DJ-hACE2 мышей

Дизайн эксперимента по изучению развития инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, у трансдуцированных и нетрансдуцированных животных представлен в табл. 2.

На 4 и 7 сутки после заражения у животных забирали легкие для определения инфекционного титра вируса, PHK SARS-CoV-2 и проведения гистологического исследования — в соответствии с табл. 2.

Результаты измерения инфекционного титра SARS-CoV-2 в легких приведены в табл. 3. В незараженной группе 2 все образцы были отрицательными. В группе 3, трансдуцированной AAV-DJ-hACE2, на четвертые сутки после заражения инфекционный титр, lg ТЦИД₅₀/мл, составлял в среднем 3.08 ± 0.14 lg. В те же сроки у животных

2022

	Доза ^а	Среднее значение порогового цикла, C _t				
Вектор		время, сутки				
		7	14	21		
	6×10^{10}	19.7 ± 0.8	19.2 ± 1.0	20.3 ± 0.1		
AAV9	2×10^{10}	23.3 ± 1.8	20.4 ± 0.3	20.2 ± 0.3		
	6×10^{9}	21.0 ± 0.5	21.7 ± 0.4	20.1 ± 0.8		
AAV6	2×10^{10}	30.4 ± 1.6	30.2 (1 из 3) ^b	30.5 ± 0.2 (2 из 3) ^b		
	6×10^{9}	31.6 (1 из 3) ^b	33.2 (1 из 3) ^b	34.3 (1 из 3) ^b		
AAV-DJ	2×10^{10}	21.7 ± 2.0	20.3 ± 1.4	21.1 ± 1.1		
	6×10^{9}	21.0 ± 0.5	23.0 ± 1.6	20.5 ± 0.5		

Таблица 1. Средние значения пороговых циклов (C_t) для гена *ACE2* в образцах, полученных из легких мышей, после введения AAV-векторов

^а Доза приведена в числе геномных эквивалентов AAV, введенных одному животному. ^b Указано число образцов, положительных по ПЦР, для которых вычисляли среднее значение C_t.

Таблица 2. Дизайн эксперимента по заражению мышей SARS-CoV-2

№ª	Число мышей	Время, сутки						
		1	10	14 (4 dpi ^d)		17 (7 dpi ^d)		
		введение вектора ^b	заражение ^с	левое легкое	правое легкое	левое легкое	правое легкое	
1	3	_	_	н.з. ^е	н.з.	н.з.	Гистология	
2	6	+	_	PHK ^f	ИТ ^g	РНК ИТ	Гистология	
3	6	+	+	РНК	ИТ	РНК ИТ	Гистология	
4	6	_	+	РНК	ИТ	РНК ИТ	Гистология	

^a Номер группы; ^b вектор AAV-DJ-hACE2 в дозе 2 × 10¹⁰ вводили мышам интраназально; ^c мышей заражали вирусом SARS-CoV-2; ^d (day post-infection) — день после заражения; в каждой группе проводили забор легких у трех животных; ^e легкие не забирали; ^f определение PHK SARS-CoV-2; ^g инфекционный титр SARS-CoV-2.

группы 4 — не трансдуцированных вектором — титр был на порядок меньше и составлял 2.08 \pm \pm 0.14 lg. У животных, получивших AAV-DJ-hACE2, инфекционный титр снижался с 3.08 \pm \pm 0.14 lg на четвертых сутках до 2.17 \pm 0.14 lg на седьмые, а в группе 4 на седьмые сутки вирус не детектировался вообще.

При тестировании PHK SARS-CoV-2 с помощью набора АмплиТест SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в реальном времени выделение PHK и качество анализа оценивали по внутреннему контролю, разброс значений C_t для которого не превышал 1, что позволило сравнивать значения C_t для PHK SARS-CoV-2 без нормализации. На четвертые сутки достоверных отличий в уровне PHK SARS-CoV-2 между группами 3 и 4 не было. Образцы, полученные от всех трех мышей группы 3, были положительными — среднее значение C_t составляло 26.7. В группе 4 один из трех образцов был отрицательным, значения C_t для остальных составляли 24.8 и 26.8. РНК SARS-CoV-2 в образцах, полученных на седьмые сутки, не определялась, за исключением одного образца из группы 3, где был выявлен ее низкий уровень ($C_t = 29.1$)

Морфологическое исследование легких мышей

На 17 сутки эксперимента (7 день после заражения SARS-CoV-2 групп 3 и 4) у части животных проводили морфологическое исследование легких. Показано, что легкие интактных мышей (группа 1) и мышей группы 2 (17 сутки после введения AAV-DJ-hACE2) имели нормальное строе-

		Время, сутки					
Группа	№ мыши		4 dpi	7 dpi			
i pynna		титр вируса, lg(ТЦИД ₅₀)	вирусная РНК, C _t	титр вируса, lg(ТЦИД ₅₀)	вирусная РНК, С _t		
1	1			н.о. ^а	н.о.		
	2			н.о.	н.о.		
	3			н.о.	н.о.		
2 (+AAV-DJ-hACE2)	1	b	_	—	—		
	2	_	—	_	—		
	3	_	—	_	-		
3 (+AAV-DJ -hACE2 +SARS-CoV-2)	1	3.25	28.4	2.25	29.1		
	2	3.0	24.1	2.25	—		
	3	3.0	27.5	2.0	—		
	Среднее значение	3.08 ± 0.14	26.7 ± 2.3	2.17 ± 0.14			
	1	2.0	_	н.о.	_		
4	2	2.25	24.8	н.о.	—		
(+SARS-CoV-2)	3	2.0	26.8	н.о.	_		
	Среднее значение	2.08 ± 0.14					

Таблица 3. Анализ инфекционного титра и PHK SARS-CoV-2 в легких мышей

^а Не определяли; ^b отрицательный результат.

ние (рис. 1a-e). На 7 сутки после инфицирования SARS-CoV-2 у мышей из группы 4 (не трансдуцированных AAV-DJ-hACE2) гистоструктура легких в целом соответствовала норме. Однако в стенке отдельных бронхов и в соединительной ткани вокруг единичных сосудов выявляли небольшие лимфогистиоцитарные скопления (рис. 1∂ , e).

При микроскопическом исследовании легких мышей из группы 3 (получивших AAV-DJ-hACE2) на 7 сутки после заражения SARS-CoV-2 – у двух мышей из трех обнаружены участки с выраженными альтеративными и воспалительными изменениями. В легком одной мыши безвоздушные очаги и участки со сниженной воздушностью занимали 60-70% площади среза, у другой -25-30% (рис. 2а). Просветы бронхов в этих очагах были заполнены гнойным экссудатом. Эпителиальная выстилка бронхов содержала клетки с дистрофическими изменениями, часть эпителиоцитов была слущена в просвет – вследствие цитопатического действия коронавируса. Собственная пластинка слизистой оболочки бронхов была умеренно инфильтрирована лимфоцитами, гистиоцитами и нейтрофилами (рис. 26). В адвентициальном слое бронхов отмечена гиперплазия бронхоассоциированной лимфоидной ткани (БАЛТ). В расположенных перибронхиально альвеолярных ходах, альвеолах и периваскулярно выявлена выраженная воспалительная инфильтрация из лимфоцитов и гистиоцитов, чередующаяся с обширными зонами гнойного воспаления, в которых просвет альвеол и межальвеолярные перегородки не определялись (рис. 2*в*). В зонах вне пневмонии видна гиперемия сосудов, выраженная гиперплазия БАЛТ и периваскулярной лимфоидной ткани (рис. 2*г*). Таким образом, на седьмые сутки после интраназального заражения SARS-CoV-2 мышей, экспрессирующих hACE2, в легких животных выявляли безвоздушные участки паренхимы, соответствовавшие бактериально-вирусной бронхопневмонии с началом абсцедирования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ни одну из моделей животных, используемых сегодня для моделирования COVID-19, нельзя считать идеальной и полностью отражающей течение инфекции в организме человека. Широко используемая модель заболевания на сирийских хомячках поддерживает размножение вируса и вызывает патологический процесс в легких животных, но не приводит к летальным исходам. Использование мышей имеет свои преимущества. Мыши – наиболее распространенные мелкие лабораторные животные, их использование дешевле и удобнее для проведения масштабных



Рис. 1. Морфологическая характеристика легких мышей на 17 сутки эксперимента. Представлены легкие животных из контрольной группы 1 (a, δ), из группы 2 (17 сутки после введения AAV-DJ-hACE2) (e, e) и из группы 4 (7 день после заражения SARS-CoV-2) (∂ , e). В легких животных групп 1 и 2 (a-e) просветы бронхов свободные, в их стенке видны единичные лимфоциты, равномерно воздушные просветы альвеолярных ходов и альвеол, тонкие межальвеолярные перегородки. В группе 4 в стенке бронха и периваскулярно расположены небольшие лимфогистиоцитарные скопления. Окраска гематоксилином и эозином; увеличение: ×40 (a, e, ∂) и ×200 (δ , e, e).

исследований. Важное преимущество мышей – возможность детально исследовать Т-клеточный ответ, причем как с точки зрения его развития при инфекции COVID-19, так и после вакцинации [11]. Большой интерес представляет "летальная модель" трансгенных мышей, в геном которых встроен ген, кодирующий ACE2 человека – *ACE2*, – но доступ к таким животным ограничен.

Попытки обеспечить транзиентную экспрессию *ACE2* для создания модели мышей, пригод-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 5 2022



Рис. 2. Морфологическая характеристика легких мышей из группы 3, трансдуцированных AAV-DJ-hACE2 и зараженных SARS-CoV-2, на 17 сутки эксперимента. a — Картина бронхопневмонии; δ — просвет крупного бронха содержит гнойный экссудат, эпителий с дистрофическими изменениями, лейкопедез, воспалительная инфильтрация стенки; e — очаг бронхопневмонии: просветы бронхов, бронхиол и альвеол заполнены гнойным экссудатом со значительной примесью макрофагов; e — зона вне бронхопневмонии: муфтообразный периваскулярный лимфогистиоцитарный инфильтрат, гиперплазия БАЛТ, полнокровие сосуда. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: ×40 (a), ×200 (δ), ×100 (e, e).

ной для инфицирования как SARS-CoV-1, так и SARS-CoV-2, предпринимались ранее. Для доставки гена АСЕ2 использовали аденовирусный вектор или аденоассоциированные векторы [2-4, 12]. С.-Р. Sun и соавт. [12] показали, что интраназальное введение мышам ААV6-hACE2 приводит к низкой трансдукции, в то время как интратрахеальное введение - к высокой эффективности трансдукции клеток легких. L. Santry и др. [9] предложили модифицированную методику интраназального введения, которая позволила провести эффективную доставку вектора AAV6 с маркерным геном GFP в легкие мышей. Мы также использовали модифицированную методику для интраназального введения AAV. Однако введение вектора AAV6-hACE2 приводило к очень низкому или недетектируемому уровню экспрессии hACE2 в легких мышей. В то же время использование векторов других серотипов: AAV9 и AAV-DJ — позволило успешно трансдуцировать клетки легких и достигнуть высокого и воспроизводимого уровня экспрессии ACE2. Таким образом, нам удалось избежать проблем, сопряженных с использованием интратрахеального введения вектора — сложного и инвазивного метода, который приводит к большой вариабельности результатов.

При заражении животных, трансдуцированных AAV-DJ-hACE2, SARS-CoV-2 эффективно реплицировался в легких модельных мышей: инфекционный титр на 4 сутки составлял 3.08 lg и на 7 сутки снижался до 2.17 lg. Эти данные несколько отличаются от результатов, полученных В. Israelow и соавт. [3], которые показали полную элиминацию инфекционного вируса из легких на 7 сутки при использовании схожей модели. Неожиданным для нас фактом стало определение инфекционного вируса в низком титре у тех животных, которым не вводили AAV-hACE2, на 4 сутки после заражения SARS-CoV-2.

Данные по выявлению вирусной РНК оказались менее информативными, чем результаты по определению инфекционного титра: на 4 сутки после заражения вирусную РНК обнаруживали и в группе мышей, получивших AAV-DJ-hACE2, и в группе без AAV-DJ-hACE2. То, что вирусная РНК может циркулировать у мышей, не поддерживающих репликацию SARS-CoV-2, было продемонстрировано и в ранее опубликованных работах [3, 13].

Репликация SARS-CoV-2 в легких животных, трансдуцированных AAV-DJ-hACE2, приводила к развитию бактериально-вирусной бронхопневмонии на 7 сутки после заражения, в отличие от животных, не получивших AAV-DJ-hACE2. Присоединению бактериальной микрофлоры, вероятно, способствовало нарушение мукоцилиарного барьера воздухоносных путей, обусловленное прямым действием вируса на мерцательный эпителий бронхов. В легких нетрансдуцированных мышей на 7 сутки после заражения SARS-CoV-2 патологических изменений не обнаружено.

Таким образом, в проведенных нами экспериментах продемонстрирована возможность быстрого получения релевантной модели мышей, которые чувствительны к заражению SARS-CoV-2 и могут быть использованы для исследования эффективности разрабатываемых вакцин и препаратов для профилактики и лечения COVID-19.

Представленная нами модель может быть в дальнейшем усовершенствована для получения "летальной модели" инфекции SARS-CoV-2, которая наиболее востребована для исследования вакцин и лекарственных препаратов. Интересным направлением в оптимизации модели может быть введение AAV-hACE2 гуманизированным мышам. Использование таких мышей позволяет более точно имитировать клинические проявления COVID-19 у человека, в частности хроническое течение, развитие фиброза легких, а также системную лимфопению [13].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60100. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

Все работы с животными проводились в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986); Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199Н от 1 апреля 2016 года, Principles of Good Laboratory

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 5 2022

Practice (OECD, ENV/MC/CUEM (98)17, 1997); ГОСТ 33044-2014 "Принципы надлежащей лабораторной практики" (идентичен GLP OECD); Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies (21 CFR Part 58, 1978, USA, FDA), рассмотрены и утверждены комиссией ΦГБНУ "Научноисследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова" по уходу и использованию животных на предмет соответствия регулирующим актам.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Winkler E.S., Bailey A.L., Kafai N.M., Nair S., McCune B.T., Yu J., Fox J.M., Chen R.E., Earnest J.T., Keeler S.P., Ritter J.H., Kang L.I., Dort S., Robichaud A., Head R., Holtzman M.J., Diamond M.S. (2020) SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. *Nat. Immunol.* 21(11), 1327–1335.
- Hassan A.O., Case J.B., Winkler E.S., Thackray L.B., Kafai N.M., Bailey A.L., McCune B.T., Fox J.M., Chen R.E., Alsoussi W.B., Turner J.S., Schmitz A.J., Lei T., Shrihari S., Keeler S.P., Fremont D.H., Greco S., McCray P.B., Jr., Perlman S., Holtzman M.J., Ellebedy A.H., Diamond M.S. (2020) A SARS-CoV-2 infection model in mice demonstrates protection by neutralizing antibodies. *Cell.* 182(3), 744–753.e4.
- Israelow B., Song E., Mao T., Lu P., Meir A., Liu F., Alfajaro M.M., Wei J., Dong H., Homer R.J., Ring A., Wilen C.B., Iwasaki A. (2020) Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. *J. Exp. Med.* 7, 217(12), e20201241.
- Sun J., Zhuang Z., Zheng J., Li K., Wong R. L., Liu D., Huang J., He J., Zhu A., Zhao J., Li X., Xi Y., Chen R., Alshukairi A. N., Chen Z., Zhang Z., Chen C., Huang X., Li F., Lai X., Chen D., Wen L., Zhuo J., Zhang Y., Wang Y., Huang S., Dai J., Shi Y., Zheng K., Leidinger M.R., Chen J, Li Y., Zhong N., Meyerholz D.K., McCray P.B. Jr, Perlman S., Zhao, J. (2020) Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination, and treatment. *Cell.* 182(3), 734– 743.
- Chan K.K., Dorosky D., Sharma P., Abbasi S.A., Dye J.M., Kranz D.M., Herbert A.S., Procko E. (2020). Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2. *Science*. 369(6508), 1261–1265.
- Higuchi R., Krummel B., Saiki R. (1988) A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 16(15), 7351–7367.
- Kimura T., Ferran B., Tsukahara Y., Shang Q., Desai S., Fedoce A., Pimentel D.R., Luptak I., Adachi T., Ido Y., Matsui R., Bachschmid M.M. (2019) Production of adeno-associated virus vectors for *in vitro* and *in vivo* applications. *Sci. Rep.* 9(1), 13601.
- Aurnhammer C., Haase M., Muether N., Hausl M., Rauschhuber C., Huber I., Nitschko H., Busch U., Sing A., Ehrhardt A., Baiker A. (2012) Universal real-

time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. *Hum. Gene Ther. Methods.* **23**(1), 18–28.

- Santry L.A., Ingrao J.C., Yu D.L., de Jong J.G., van Lieshout L.P., Wood G.A., Wootton S.K. (2017) AAV vector distribution in the mouse respiratory tract following four different methods of administration. *BMC Biotechnol.* 17(1), 43.
- Ramakrishnan M.A. (2016) Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. World J. Virol. 5(2), 85–86.
- Veit S., Jany S., Fux R., Sutter G., Volz A. (2018) CD8+ T cells responding to the middle east respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein delivered by vaccinia virus MVA in mice. *Viruses.* 10(12), 718.
- Sun C.-P., Jan J.-T., Wang I.-H., Ma H.-H., Ko H.-Y., Wu P.-Y., Kuo T.-J., Liao H.-N., Lan Y.-H., Sie Z.-L., Chen Y.-H., Ko Y.-A., Liao C.-C., Chen L.-Y., Lee I.-J., Tsung S.-I., Lai Y.-J., Chiang M.-T., Liang J.-J., Liu W.-C., Wang J.-R., Yuan J.P.-Y., Lin Y.-S., Tsai Y.-C., Hsieh S.-L., Li C.-W., Wu H.-C., Ko T.-M., Lin Y.-L., Tao M.-H. (2021) Rapid generation of mouse model for emerging infectious disease with the case of severe COVID-19. *PLoS Pathog.* 17(8), e1009758.
- Sefik E., Israelow B., Mirza H., Zhao J., Qu R., Kaffe E., Song E., Halene S., Meffre E., Kluger Y., Nussenzweig M., Wilen C.B., Iwasaki A., Flavell R.A. (2022) A humanized mouse model of chronic COVID-19. *Nat. Biotechnol.* 40, 906–920. https://doi.org/10.1038/s41587-021-01155-4

GENERATION OF SARS-CoV-2 MOUSE MODEL BY TRANSIENT EXPRESSION OF THE HUMAN ACE2 GENE MEDIATED BY INTRANASAL ADMINISTRATION OF AAV-hACE2

D. V. Glazkova¹, E. V. Bogoslovskaya¹, F. A. Urusov^{1, 2,} *, N. P. Kartashova³, E. A. Glubokova³, A. V. Gracheva³, E. B. Faizuloev³, G. V. Trunova⁴, V. A. Khokhlova⁴, O. A. Bezborodova⁴, A. A. Pankratov⁴, I. A. Leneva³, and G. A. Shipulin¹

¹ Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks, Federal Medical-Biological Agency of the Russian Federation, Moscow, 119992 Russia

² Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, 105275 Russia

³ Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064 Russia

⁴ National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation,

Moscow, 125284 Russia

*e-mail: flanger.fx@mail.ru

One of the most important steps in the development of drugs and vaccines against a new coronavirus infection is their testing on a relevant animal model. Laboratory mouse is the most preferred mammalian model in experimental medicine with well-studied immunology. However, mice are not susceptible to infection with SARS-CoV-2 due to the lack of human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2), which is the cell receptor of SARS-CoV-2 and necessary for the entry of the virus into the cell. In present work, it was shown that intranasal administration of adeno-associated vectors AAV9 and AAV-DJ encoding the hACE2 provided a high level of expression of *ACE2* gene in the lungs of mice. In contrast, the introduction of the AAV6 vector led to low level *ACE2* expression. Infection with SARS-CoV-2 of the mice expressing hACE2 in the lungs led to virus replication and development of bronchopneumonia on the 7th day after infection. Thus, a simple method for delivering the human *ACE2* gene to the mice lungs by intranasal administration of the AAV vector has been proposed. This approach enabled rapid generation of mouse model for studying coronavirus infection.

Keywords: hACE2, SARS-CoV-2, AAV9, AAV6, AAV-DJ, BALB/c mice