

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-97>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Сравнительный анализ остаточной нейровирулентности вакцинного и низкоаттенуированного штаммов вируса краснухи (*Matonaviridae: Rubivirus: Rubella virus*) в эксперименте на обезьянах вида макак резус (*Macaca mulatta*)

Шамсутдинова О.А.¹, Булгин Д.В.¹, Карал-оглы Д.Д.¹, Лаврентьева И.Н.², Клоц И.Н.¹¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» Минобрнауки, 354376, Сочи, Россия²ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 197101, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Краснуха в настоящее время представляет собой инфекцию, управляемую средствами специфической профилактики. Для ликвидации этого заболевания решающее значение имеют не только правильно выбранные стратегия и тактика вакцинопрофилактики, но и применение эффективных и безопасных вакцинных препаратов.

Цель исследования – изучение морфологических и патогенетических характеристик изменений, развивающихся в центральной нервной системе (ЦНС) и внутренних органах обезьян (*Haplorhini*), при интрацеребральной инокуляции 2 штаммами вируса краснухи (ВК) (*Matonaviridae: Rubivirus: Rubella virus*): высокоаттенуированным «Орлов-В» и низкоаттенуированным «Орлов-14».

Материал и методы. В экспериментах использовали серонегативных к ВК обезьян вида макак резус (*Macaca mulatta*) массой 3,3–5,1 кг ($n = 7$). Определение нейровирулентности штаммов выполняли посредством комплекса клинических, патоморфологических и вирусологических методов. Клиническое наблюдение за животными осуществляли ежедневно на протяжении 28 сут после инокуляции. Титрование вируса проводили в соответствии со стандартной методикой по цитопатическому действию (ЦПД) (показателю ТЦД₅₀/мл – тканевая цитопатическая доза) в культуре клеток ВНК-21. Титр ВК рассчитывали по методу Рида и Менча.

Результаты и обсуждение. Установлено, что в процессе аттенуации штамм «Орлов-В» утратил способность к репликации в клетках ЦНС и индуцированию в них умеренных/выраженных специфических изменений, а также к преодолению гематоэнцефалического барьера с поражением чувствительных органов и тканей. Указанный факт свидетельствует о низком уровне остаточной нейровирулентности вакцинного штамма.

Заключение. Полученные в рамках настоящего исследования результаты относительно клинических симптомов поражения ЦНС и характере патологического процесса в её тканях у экспериментальных животных моделей могут быть значимыми для совершенствования контроля безопасности живых краснушных вакцин. Эти данные позволяют рассматривать штамм «Орлов-В» в качестве кандидатного при дальнейшей работе по созданию краснушной вакцины на основе отечественного вакцинного штамма.

Ключевые слова: остаточная нейровирулентность; вирус краснухи (ВК); аттенуация; обезьяны макак резус (*Macaca mulatta*)

Для цитирования: Шамсутдинова О.А., Булгин Д.В., Карал-оглы Д.Д., Лаврентьева И.Н., Клоц И.Н. Сравнительный анализ остаточной нейровирулентности вакцинного и низкоаттенуированного штаммов вируса краснухи (*Matonaviridae: Rubivirus: Rubella virus*) в эксперименте на обезьянах вида макак резус (*Macaca mulatta*). *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(2): 133-141. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-97>

Для корреспонденции: Шамсутдинова Ольга Анатольевна, научный сотрудник лаборатории иммунологии и биологии клетки, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» Минобрнауки, 354376, Сочи, Россия, E-mail: shamsutdinova-o-a@yandex.ru

Участие авторов: Шамсутдинова О.А. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи; Булгин Д.В. – проведение экспериментальной части; Карал-оглы Д.Д. – концепция и дизайн исследования; Лаврентьева И.Н. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментальной части, анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи; Клоц И.Н. – подготовка текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Благодарности. Авторы выражают признательность ветеринарному врачу ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» Минобрнауки (НИИ МП) И.И. Чугуевой, принимавшей участие в клиническом наблюдении за животными.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике ФГБНУ НИИ МП (Протокол № 16 от 14.08.2019 г.)

Поступила 03.02.2022

Принята в печать 23.03.2022

Опубликована 30.04.2022

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-97>

Comparative analysis of residual neurovirulence of vaccine and low attenuated rubella virus (*Matonaviridae: Rubivirus: Rubella virus*) strains in the experiments on the macaque rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys

Olga A. Shamsutdinova¹, Dmitry V. Bulgin¹, Dzhina D. Karal-ogly¹,
Irina N. Lavrentieva², Igor N. Klots¹

¹FSBRI «Research Institute of Medical Primatology» of the Ministry of Education and Science of Russia, Sochi, 354376, Russia;

²FSBI «Saint Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 197101, Saint-Petersburg, Russia

Introduction. Rubella is currently an infection controlled by specific prophylaxis. Not only the right vaccine prophylaxis strategy and tactics, but also the use of effective and safe vaccine preparations is crucial for the elimination of this disease.

The **aim** of the investigation was to study the morphological and pathogenetic patterns of changes developing in the central nervous system (CNS) and internal organs of monkeys (*Haplorhini*) during intracerebral inoculation with 2 strains of rubella virus (*Matonaviridae: Rubivirus: Rubella virus*) (RV): highly attenuated Orlov-B, and low attenuated Orlov-14.

Material and methods. In the experiments, seronegative rhesus macaque monkeys (*Macaca mulatta*) weighing 3.3–5.1 kg ($n = 7$) were used. Neurovirulence of the strains was determined by a complex of clinical, pathomorphological, and virological methods.

Results and discussion. It was found that during attenuation, the Orlov-B strain lost the ability to replicate in CNS cells and induce moderate/expressed specific changes in them, as well as to overcome the blood-brain barrier and cause the damage of sensitive organs and tissues. This fact indicates a low level of residual neurovirulence of the vaccine strain.

Conclusion. The results obtained in this study regarding the clinical symptoms of CNS lesions and the nature of the pathological process in its tissues in experimental animals can be significant for the improvement of safety control of live rubella vaccines. These data indicate that the Orlov-B strain can be considered as a candidate strain for further study on the development of a rubella vaccine based on the domestic vaccine strain.

Key words: residual neurovirulence, rubella virus (RV), attenuation, macaque rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys

For citation: Shamsutdinova O.A., Bulgin D.V., Karal-ogly D.D., Lavrentieva I.N., Klots I.N. Comparative analysis of residual neurovirulence of vaccine and low attenuated rubella virus (*Matonaviridae: Rubivirus: Rubella virus*) strains in the experiment on the macaque rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(2): 133-141. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-97>

For correspondence: Olga A. Shamsutdinova, Researcher of the Immunology and Cell Biology Laboratory, FSBRI «Research Institute of Medical Primatology» of the Ministry of Education and Science of Russia, 354376, Sochi, Russia. E-mail: shamsutdinova-o-a@yandex.ru

Information about the authors:

Shamsutdinova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-2742-3965>

Bulgin D.V., <https://orcid.org/0000-0003-1739-8505>

Karal-ogly D.D., <https://orcid.org/0000-0003-3606-1668>

Lavrentieva I.N., <http://orcid.org/0000-0002-2188-6547>

Klots I.N., <https://orcid.org/0000-0003-1025-3127>

Contribution: Shamsutdinova O.A. – research concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis, and interpretation of the data, preparing of the text; Bulgin D.V. – conducting of the experiments; Karal-ogly D.D. – research concept and design; Lavrentieva I.N. – research concept and design, conducting of the experiments, analysis, and interpretation of the data, preparing of the text; Klots I.N. – preparing of the text.

Funding. The research was funded by the State budget.

Acknowledgement. The authors are grateful to the veterinarian FSBRI «Research Institute of medical Primatology» I.I. Chugueva who took part in the clinical observation of animals.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Bioethics Commission of the FSBRI «Research Institute of medical Primatology» (Protocol No. 16 dated August 14, 2019).

Received 03 February 2022

Accepted 23 March 2022

Published 30 April 2022

Введение

Вирус краснухи (ВК) (*Matonaviridae: Rubivirus: Rubella virus*) – возбудитель антропонозной инфекции, протекающей в форме лёгкого инфекционного экзантематоза у детей и тяжёлого внутриутробного поражения плода у беременных. Развитие патологического процесса приводит к нарушению онтогенеза, формированию врождённых пороков развития и, как следствие, – самопроизвольным абортam, мертворождению и рождению детей с синдромом врождённой краснухи (СВК) [1, 2].

В настоящее время специфическая профилактика болезни (в первую очередь СВК) проводится с использованием живых вакцин [3, 4]. В связи с тем, что такие вакцинные препараты содержат живые (хотя и ослабленные) нейровирулентные штаммы, к последним предъявляются повышенные требования в отношении уровня их аттенуации [5, 6]. Так, при испытании на добровольцах производного первого лицензированного штамма HPV-77 – HPV-77DE5 [7] и экспериментальной серии вакцины, приготовленной из штамма «Орлов» на уровне 16 пассажа [8], в ряде случаев выявлены типичные для краснухи клинические реакции: выраженная среднепятнистая сыпь, повышение температуры тела и увеличение затылочных лимфатических узлов. При этом реактогенность Штамма «Орлов» составила 30%. Поэтому согласно действующим нормативным документам безопасность аттенуированных вакцинных препаратов (минимальная реактогенность) наряду с достаточной иммуногенностью служат важнейшими критериями пригодности штамма для приготовления на его основе живой аттенуированной вакцины [9].

Таким образом, определение характера и особенностей краснушного патологического процесса в центральной нервной системе (ЦНС) и внутренних органах обезьян (*Haplorhini*), подвергнутых интрацеребральному заражению вакцинными (в частности, «Орлов-В») штаммами и реактогенным штаммом «Орлов-14», на сегодняшний день остаётся весьма актуальным.

Целью данного исследования явилось изучение морфологических и патогенетических характеристик

изменений, развивающихся в ЦНС и экстраневрально у обезьян при интрацеребральной инокуляции 2 штаммами ВК: высокоаттенуированным «Орлов-В» и низкоаттенуированным – «Орлов-14».

Материал и методы

В работе использовали высокоаттенуированный вакцинный штамм «Орлов-В» (39 пассажей в первично-трипсинизированной культуре клеток почки кролика (ППК)) [10] и низкоаттенуированный штамм «Орлов-14» (14 пассажей в ППК) ВК, полученные из коллекции ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» (НИИЭМ).

Исследование проводили на 7 клинически здоровых обезьянах вида макак резус (*Macaca mulatta*) массой 3,3–5,1 кг, родившихся и содержащихся в питомнике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» (НИИМП). В эксперимент отбирали особей, не имевших в сыворотке крови нейтрализующих антител к ВК. Обезьяны были рандомизированы на 3 группы. В I группе животным ($n = 3$) осуществляли интрацеребральное введение препарата, содержавшего высокоаттенуированный штамм «Орлов-В» с инфекционным титром $4,7 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,5 \text{ мл}$ (ТЦД – тканевая цитопатическая доза). Обезьянам II группы ($n = 3$) вводили материал, содержавший низкоаттенуированный штамм «Орлов-14» с инфекционными титрами 3,8 и $4,7 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,5 \text{ мл}$, а особи III группы ($n = 1$) – растворитель для лиофилизированной коммерческой вакцины против краснухи (вода для инъекций).

До начала эксперимента обезьян вводили в состояние глубокого наркоза, который достигался внутривенной инфузией 0,1 мл ксилы (Interchemie Werken de Adelaar Eesti AS, Эстония) и 0,05 мл золетила (Valdepharm, Франция) из расчёта на 1,0 кг массы животного. После этого сверлом диаметром 1,5 мм формировали трепанационное отверстие глубиной 2,5 см, располагавшееся на 0,5 см каудальнее коронарного (венечного) шва и на 1 см латеральнее сагиттального шва. Вирусосодержащий материал в объёме 0,25 мл вводили через указанное отверстие в область таламуса каждого полушария головного мозга. С целью

последующего образования «биологического шва» в момент инокуляции кожу головы натягивали назад и фиксировали мануально. Для инфицирования использовали иглу диаметром 0,6 мм и длиной 5,0 см. Данная методика интрацеребрального заражения позволяла уменьшить вероятность повреждения стенок желудочков мозга и предупредить развитие посттравматических реакций.

Клиническое наблюдение за обезьянами проводили ежедневно в течение 28 сут, на протяжении которых регистрировали наличие либо отсутствие общих клинических симптомов (нарушение аппетита, повышение температуры тела, вялость, беспокойство) и признаков поражения ЦНС (тремор конечностей, нарушение координации, парезы, параличи).

Животных выводили из эксперимента на 12, 21 и 28 сут. Перед эвтаназией обезьян повторно вводили в глубокий наркоз путём инфузии в паховую вену 1 мл золетила в комбинации с 4 мл ксилы. После наступления глубокого сна выполняли введение в эту же вену 5 мл листенона (Takeda Austria GmbH, Австрия), что приводило к полной остановке сердца.

Для гистологического и вирусологического исследования в процессе аутопсии осуществляли забор тканей ЦНС (головной и спинной мозг), лимфатических узлов (поднижнечелюстные и задние шейные), внутренних органов (лёгкое, печень, селезёнка), а также цереброспинальной жидкости.

Титрование ВК производили по цитопатогенному действию (ЦПД) в клеточной культуре ВНК-21 (сублиния перевиваемых клеток почки новорождённого сирийского хомячка). Из тканей различных отделов ЦНС и висцеральных органов готовили 10% суспензию с физиологическим (0,9%) раствором натрия хлорида (NaCl). Для получения надосадочной жидкости суспензию центрифугировали на протяжении 10 мин при 1000 об/мин, после чего указанную жидкость использовали для приготовления последовательных 10-кратных разведений от 10^{-1} до 10^{-8} . Из пробирок с каждым разведением вносили по 100 мкл жидкости в 4 лунки 96-луночного планшета. Инфицированные и контрольные культуры клеток инкубировали в термостате с 5% углекислым газом (CO_2) при температуре 35 °С. Учёт результатов проводили на 12 сут по реакции ЦПД. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программного обеспечения STATISTICA v. 6.0. Различия считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

Гистологическому исследованию подлежали ткани передней и задней центральных извилин правого и левого полушария, таламуса (зрительных бугров), среднего мозга, моста (варолиева), мозжечка, продолговатого мозга, шейного и поясничного отделов спинного мозга, а также поднижнечелюстных и задних шейных лимфоузлов, лёгкого, селезёнки и печени. Соответствующий аутопсийный материал фиксировали в растворе нейтрального забуференного 10% формалина, обезживали в этиловом спирте

различной концентрации по общепринятой методике, заливали в парафиновые блоки, после чего готовили срезы толщиной 4–5 мкм. Последние окрашивали гематоксилином и эозином, а также крезильным фиолетовым по методу Ниссля. Морфологический анализ осуществляли при помощи биологического микроскопа для лабораторных исследований Axio Lab.A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) с цифровой камерой для микроскопов AxioCam 105 color (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

Локализацию и выраженность патоморфологических изменений в ЦНС животных оценивали по 4-балльной шкале, рекомендованной Министерством здравоохранения Российской Федерации, в соответствии с общей фармакопейной статьёй ОФС.1.7.2.0010.15 «Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи» [11].

Результаты

На протяжении периода клинического наблюдения за обезьянами I и III группы ни у одной из особей не отмечено общих клинических симптомов и неврологических проявлений, типичных для данного заболевания. Клиническое состояние экспериментальных моделей соответствовало физиологической норме. У обезьяны № 42 884 (II группа), инфицированной низкоаттенуированным штаммом ВК «Орлов-14» в титре 4,7 lg ТЦД₅₀/0,5 мл, на 10 сут эксперимента появились гипертермия до 39,5 °С, отсутствие аппетита и вялость. На 11 и 12 сут зафиксированные отклонения от физиологической нормы сохранялись, дополнительно отмечены слабость конечностей, тремор левой верхней конечности, отсутствие прыжков и лазанья по клетке.

У 2 животных II группы №№ 43 389 и 43 419, инокулированных этим же штаммом, но с меньшим значением инфекционного титра (3,8 lg ТЦД₅₀/0,5 мл), имели место незначительный субфебрилитет и снижение аппетита; каких-либо нарушений со стороны ЦНС не регистрировалось. При этом гипертермия у первой обезьяны сохранялась на протяжении 3 сут (15–17 сут эксперимента), а у второй – в течение 2 сут (с 14 по 15). По истечении лихорадочного периода их общее клиническое состояние не отличалось от физиологической нормы.

При вирусологическом исследовании у инфицированных штаммом «Орлов-В» и умерщвлённых на 12, 21 и 28 сут обезьян инфекционный вирус не выделен ни в одном из исследованных образцов (табл. 1). Однако у животных, заражённых штаммом «Орлов-14» в инфекционных титрах 4,7 и 3,8 lg ТЦД₅₀/0,5 мл и эвтаназированных соответственно на 12 и 21 сут от начала эксперимента, возбудитель детектирован в различных отделах ЦНС, лимфатических узлах и висцеральных органах. Следует отметить, что ни в ЦНС, ни в периферических органах обезьяны, инокулированной штаммом «Орлов-14» (3,8 lg ТЦД₅₀/0,5 мл) и выведенной из эксперимента на 28 сут, присутствие инфекционного ВК не обнаружено.

Локализацию и степень патоморфологических изменений в ЦНС обезьян определяли по 4-балльной шкале. По результатам гистологического исследования у особей, инокулированных вакцинным штаммом «Орлов-В» (группа I) в инфекционном титре 4,7 lg ТЦД₅₀/0,5 мл, какие-либо дегенеративные изменения в головном и спинном мозге отсутствовали. У обезьяны № 38 976, выведенной из эксперимента на 12 сут, распространение патологического процесса выявлено в двигательной зоне коры большого (головного) мозга и таламусе. Средний балл поражений ЦНС животного составил 0,3 (табл. 2).

У обезьян №№ 43 764 и 43 456, эвтаназированных соответственно на 21 и 28 сут от момента заражения штаммом «Орлов-В», в тканях головного и спинного мозга патологических изменений нейронов и глиальных клеток не выявлено. Во всех отделах оболочки мозга были тонкие, строение их соответствовало анатомическому делению, гиперемия отсутствовала. Ядра нейронов светлые, с чёткими нуклеолами. Чёрное (нисслевское) вещество отчётливо контурировано; глия без особенностей (рис. 1). Средний балл поражений ЦНС у данных животных был равен 0,0.

Исследование тканей ЦНС обезьян II группы в зависимости от периода наблюдения (12, 21 и 28 сут) выявило как дистрофические изменения нейронов и единичные васкулиты, так и выраженные воспалительные реакции, характерные для тяжёлого менингоэнцефало-

миелита. Так, у особи № 42 884, выведенной из эксперимента на 12 сут после инфицирования штаммом «Орлов-14» (титр 4,7 lg ТЦД₅₀/0,5 мл), обнаружено наличие значительной лимфоцитарной инфильтрации, очаговых/множественных васкулитов в месте инокуляции и за его пределами, а также явлений менингоэнцефаломиелита. Очаги воспаления зарегистрированы практически во всех отделах головного, а также в шейном и поясничном отделах спинного мозга. Средний балл поражений ЦНС у этой обезьяны составил 3,0.

Гистопатологическая картина имела место и у обезьяны № 43 389, инокулированной тем же штаммом в титре 3,8 lg ТЦД₅₀/0,5 мл и эвтаназированной на 21 сут от начала эксперимента. Присутствовали характерные для очагового энцефалита поражения: умеренная лимфогистиоцитарная инфильтрация мозговых оболочек с вовлечением в процесс сосудистых сплетений головного мозга, локальные воспалительные изменения как в сером, так и в белом мозговом веществе. Средний балл поражений ЦНС – 1,8.

Далее, у модели № 43 419, умерщвлённой на 28 сут после введения штамма «Орлов-14» (3,8 lg ТЦД₅₀/0,5 мл), выявлена слабая инфильтративно-продуктивная реакция. Единичные васкулиты, дистрофические изменения нейронов и мелкие инфильтраты обнаруживались в белом и сером веществе головного мозга. Средний балл поражений ЦНС обезьяны равен 1,3 (рис. 2).

Таблица 1. Титры вируса в различных отделах центральной нервной системы и внутренних органах обезьян, интрацеребрально инокулированных высокоаттенуированным штаммом «Орлов-В» и низкоаттенуированным штаммом «Орлов-14» вируса краснухи
Table 1. Virus titers in various parts of the central nervous system and peripheral organs of monkeys inoculated intracerebrally with a highly attenuated strain «Orlov-V» and a low attenuated strain «Orlov-14» of rubella virus

	Группа I Group I		Группа II Group II			Группа III Group III	
Номер животного Monkey ID	38 976	43 764	43 456	42 884	43 389	43 419	36 518
Время эвтаназии, сут Time of euthanasia, day	12	21	28	12	21	28	28
Исследуемый образец Tested sample	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /мл Virus titer, lg TCD ₅₀ /ml						
Головной мозг Brain	0,0	0,0	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0
Шейный отдел спинного мозга Cervical part of the spinal cord	0,0	0,0	0,0	3,2	0,0	0,0	0,0
Поясничный отдел спинного мозга Lumbar part of the spinal cord	0,0	0,0	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0
Цереброспинальная жидкость Cerebrospinal fluid	0,0	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0	0,0
Поднижечелюстные лимфатические узлы Submandibular lymph nodes	0,0	0,0	0,0	0,0	2,6	0,0	0,0
Задние шейные лимфатические узлы Posterior cervical lymph nodes	0,0	0,0	0,0	2,3	1,8	0,0	0,0
Лёгкое Lung	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Селезёнка Spleen	0,0	0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	0,0
Печень Liver	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Таблица 2. Оценка выраженности патоморфологических изменений в исследованных отделах центральной нервной системы экспериментальных приматов

Table 2. Assessment of the intensity of pathomorphological changes in the parts of the central nervous system of experimental primates

			Условные обозначения отделов центральной нервной системы, подлежащих гистологическому исследованию Symbols of the departments of the central nervous system of primates subject to histological examination															
			Отделы головного мозга Brain divisions												Отделы спинного мозга Spinal cord divisions			
			Л	А	Д	Г	Т	V	HP	З	xxxx	xxx	xx	x	ш.о.	п.о.		
			L	A	D	G	T	V	HP	O	SA	OP	CP	CAP	CSC	HSC		
Группа Group	№ животного Monkey ID	Время эвтаназии, сут Time of euthanasia, day	Выраженность патоморфологических изменений, баллы Intensity of pathomorphological changes, scores														Средний балл Mean score	
I	38 976	12	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3
	43 764	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
	43 456	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
II	42 884	12	3	3	3	4	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3,0
	43 389	21	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	1,8	
III	43 419	28	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	0	0	1,3	
	36 518	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	

Примечание. Л – лобная зона коры большого (головного) мозга; А – передние рога боковых желудочков и отделы подкорковых ганглиев: головка хвостатого ядра, передняя ножка внутренней капсулы, чечевицеобразное ядро; Д – двигательная зона коры большого (головного) мозга; Г – центральные части боковых желудочков, III желудочек, хвостатое ядро, таламус, внутренняя капсула, чечевицеобразное ядро; Т – теменная зона коры большого (головного) мозга; V – центральные части боковых желудочков и III желудочек, тело хвостатого ядра, ядра таламуса, задняя ножка внутренней капсулы; HP – гиппокамп, нижние рога боковых желудочков; З – затылочная зона коры большого (головного) мозга; xxxx – водопровод мозга (Сильвиев), чёрное (Нисслевское) вещество, ядра среднего мозга; xxx – оральная часть IV желудочка, собственные ядра моста (варолиева) и расположенные в нём участки проводящих путей; xx – центральная часть IV желудочка, ядра и участки проводящих путей, расположенные в дне ромбовидной ямки продолговатого мозга; x – каудальная часть IV желудочка, ядра олив, ретикулярная формация, ядра черепных нервов, участки проводящих путей; ш.о. – шейный отдел спинного мозга: ядра серого вещества и проводящие пути белого вещества; п.о. – поясничный отдел спинного мозга.

Note. L, frontal cerebral cortex; A, anterior horns of the lateral ventricles and sections of the subcortical ganglia: the head of the caudate nucleus, the anterior leg of the inner capsule, lenticular nucleus; D, motor area of the cerebral cortex; G, central parts of the lateral ventricles, third ventricle, caudate nucleus, thalamus, inner capsule, lenticular nucleus; T, parietal cerebral cortex; V, central parts of the lateral ventricles and the third ventricle, the body of the caudate nucleus, the nuclei of the thalamus, the posterior leg of the inner capsule; HP, hippocampus, lower horns of the lateral ventricles; O, occipital cerebral cortex; SA, cerebral aqueduct (aqueduct Sylvii), substantia nigra (Nisslevian substance), nuclei of the midbrain; OP, oral part of the fourth ventricle, own nuclei of the pons (Varolii) and the sections of the pathways located in it; CP, the central part of the fourth ventricle, nuclei and sections of the pathways located at the bottom of the rhomboid fossa of the medulla oblongata; CAP, caudal part of the fourth ventricle, olive nuclei, reticular formation, cranial nerve nuclei, sections of the pathways; CSC, cervical spinal cord: the nuclei of the gray matter and the pathways of the white matter; HSC, lumbar spinal cord.

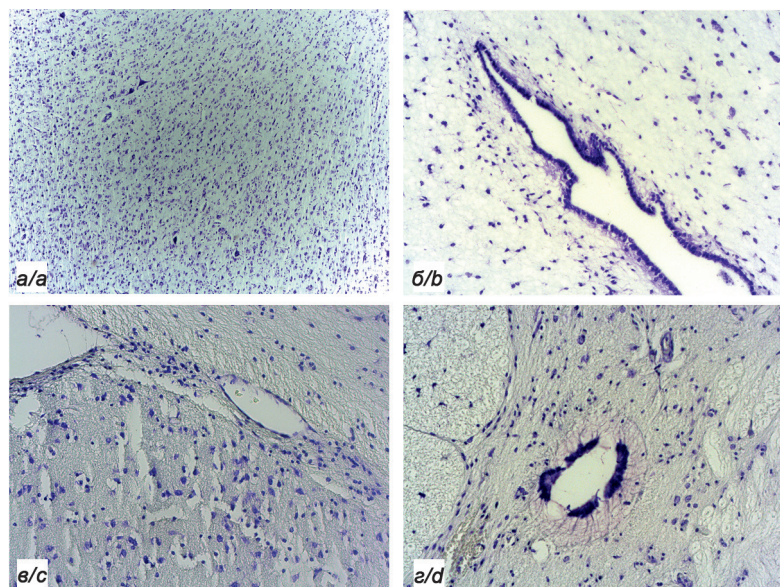


Рис. 1. Гистологическая структура мозговой ткани обезьяны № 43 456, эвтаназированной на 28 сут после заражения вакцинным штаммом «Орлов-В». а) – место введения. Типичное гистологическое строение мозговой ткани. Патологических изменений не выявлено; б) – таламус. Патологические изменения отсутствуют; в) – предцентральной извилина. Эпендимный эпителий типичного гистологического строения; г) – поясничный отдел спинного мозга. Структура мозговой ткани без особенностей. Глиальные элементы без явлений активации. Микрофотографии, окраска по методу Ниссля (краситель кризильный фиолетовый), увеличение ×200 (б–г).

Fig. 1. Histological structure of the brain tissue of monkey No. 43 456, euthanized on day 28 after infection with the vaccine strain Orlov-V: a), place of viral injection. There is typical histological structure of brain tissue. No pathological changes are found; b), thalamus. No pathological changes are found; c), precentral gyrus. Ependymal epithelium has a typical histological structure; d), lumbar part of the spinal cord. The structure of the brain tissue is normal. Glial elements are without activation phenomena. Microphotographs, Nissl staining (cresyl violet dye), magnification: ×50 (a); ×200 (b–d).

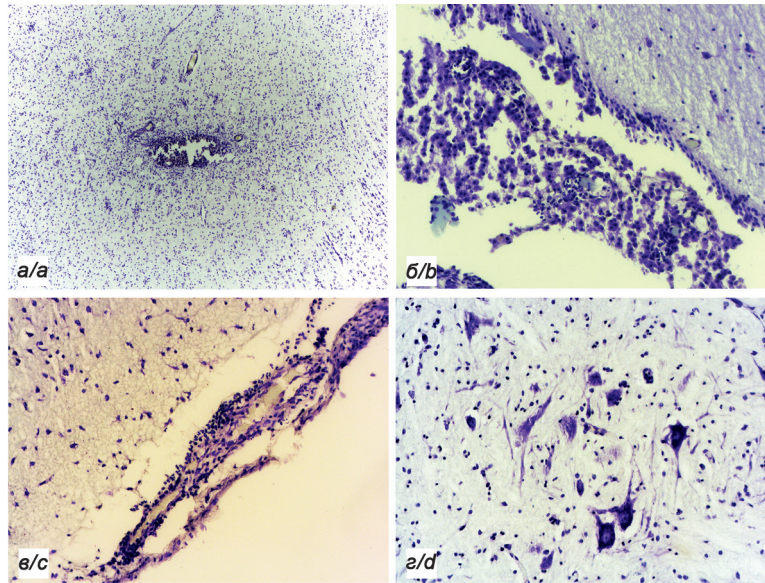


Рис. 2. Гистологическая структура мозговой ткани обезьяны № 43 419, умерщвлённой на 28 сут после заражения низкоаттенуированным штаммом «Орлов-14» в титре $3,8 \lg \text{TCD}_{50}/0,5 \text{ мл}$. *a)* – место введения. Очаговый глиоз, умеренно выраженные дистрофические изменения нейронов в зоне инокуляции; *б)* – таламус. Дистрофические изменения нервных клеток, явления васкулита; *в)* – прецентральный извилины. Очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация мягкой мозговой оболочки. Умеренные дистрофические изменения нейронов в зоне воспаления; *г)* – поясничный отдел спинного мозга. Типичное гистологическое строение ткани. Патологические изменения отсутствуют. Микрофотографии, окраска по методу Ниссля (краситель кризильный фиолетовый), увеличение $\times 50$ (*a*), $\times 200$ (*б*–*г*).

Fig. 2. Histological structure of the brain tissue of monkey No. 43 419, euthanized on day 28 after infection with a low attenuated strain «Orlov-14» in a titer of $3.8 \lg \text{TCD}_{50}/0.5 \text{ ml}$. *a)*, place of viral injection. There are focal gliosis and moderate dystrophic changes in nerve cells in the inoculation zone; *b)*, thalamus shows the dystrophic changes in neurons and signs of vasculitis; *c)*, precentral gyrus. There are focal lymphohistiocytic infiltration of the pia mater and moderate dystrophic changes in neurons in the area of inflammation; *d)*, lumbar part of spinal cord. The histological structure of the tissue is the typical one. No pathological changes are found. Microphotographs, Nissl staining (cresyl violet dye), magnification: $\times 50$ (*a*); $\times 200$ (*b*–*d*).

У обезьяны № 36 518 (III группа), умерщвлённой на 28 сут после инокуляции, в тканях головного и спинного мозга патологических изменений не выявлено. Ядра нервных клеток светлые с чёткими нуклеолами; чёрное вещество отчётливо контурировано, глия без особенностей. Средний балл поражений ЦНС у данной особи составил 0,0.

Что касается результатов гистологического исследования экстракраневральных органов экспериментальных моделей, то оно не выявило выраженных патологических изменений во всех исследованных тканях. Так, у всех животных строение лёгких, печени, почек, поджелудочной железы и селезёнки определялось как типичное, без особенностей; гиперемия и посторонняя клеточная инфильтрация отсутствовали. В лёгочной ткани на фоне сохранения воздушности определялись тонкие межальвеолярные перегородки, просветы альвеол и бронхов были свободными. Признаки активации затылочных, задних шейных и поднижнечелюстных лимфатических узлов имели место у обезьяны № 42884, инфицированной низкоаттенуированным штаммом «Орлов-14» и умерщвлённой на 12 сут эксперимента. У животных №№ 43 389 и 43 419, заражённых низкоаттенуированным штаммом «Орлов-14» и эвтаназированных на 21 и 28 сут соответственно, зарегистрированы изолированные признаки активации только в поднижнечелюстных лимфоузлах.

Обсуждение

Сравнительный анализ результатов, полученных при изучении остаточной нейровирулентности высокоаттенуированного штамма «Орлов-В» и низкоаттенуированного «Орлов-14» в тесте интрацеребрального заражения обезьян, имеет большое теоретическое и практическое значение. Низшие приматы (*Primates*) представляют собой наиболее адекватную лабораторную модель для экспериментального изучения аттенуированных штаммов ВК [12, 13]. Этот возбудитель патогенен, в частности, для обезьян вида макак резус, чувствительных к интраназальному, внутримышечному и внутривенному инфицированию [14]. По данным литературных источников, патогенез вызываемого ВК заболевания сходен с таковым у человека, в частности по параметрам продолжительности инкубационного периода и вирусывыделения, наличия виремии, динамики формирования вирусспецифических антител [15].

В нашем исследовании в качестве положительно-контроля использован реактогенный штамм «Орлов-14», вводимый как в той же ($4,7 \lg \text{TCD}_{50}/0,5 \text{ мл}$), так и меньшей ($3,8 \lg \text{TCD}_{50}/0,5 \text{ мл}$) дозе по сравнению с вакцинным штаммом «Орлов-В».

В ходе экспериментов получены данные клинического наблюдения за моделями. У обезьян, заражённых

ных низкоаттенуированным штаммом «Орлов-14», в зависимости от полученной дозы инфекционного вируса наблюдали появление клинических и неврологических симптомов, типичных для краснухи. В то же время у особой группы штамма «Орлов-В» ни в одном случае не регистрировались клинически значимые симптомы, свидетельствующие о поражении ЦНС (тремор, изолированная слабость в конечностях, дискоординация, парезы и параличи). Не отмечено также изменений поведенческих характеристик животных; у обезьян сохранялись типичные движения в клетках (прыжки, лазанье, захват предметов). Таким образом, результаты мониторинга указывают на ареактогенность [16] штамма «Орлов-В» как один из главных критериев пригодности штаммов для живых аттенуированных вакцин.

В рамках данного эксперимента выполнено морфологическое (гистологическое) исследование состояния тканей ЦНС обезьян в тесте интрацеребрального заражения, являющееся на сегодняшний день единственным рекомендованным методом оценки специфической безопасности аттенуированных вакцинных штаммов. Сравнительный анализ гистопатологической картины различных отделов ЦНС животных в целом свидетельствует об утрате вакцинным штаммом «Орлов-В» способности размножаться в клетках ЦНС и индуцировать умеренные/выраженные дегенеративные изменения в головном и спинном мозге.

Суммируя изложенное, можно констатировать, что отсутствие вирусспецифических поражений в исследуемых тканях обезьян макак резус указывает на утрату в процессе аттенуации вакцинным штаммом «Орлов-В» способности к преодолению гематоэнцефалического барьера. Об этом свидетельствует также анализ результатов вирусологического исследования различных отделов ЦНС и внутренних органов животных, что, в свою очередь, указывает на низкий уровень остаточной нейровирулентности данного штамма и является важным показателем его безопасности.

Заключение

В работе проведена оценка нейровирулентности высокоаттенуированного штамма «Орлов-В» и низкоаттенуированного штамма «Орлов-14» в тесте интрацеребрального заражения обезьян. Полученные результаты относительно клинических симптомов поражения ЦНС и характере патологического процесса в её тканях у экспериментальных животных могут быть значимы для совершенствования контроля безопасности живых краснушных вакцин. Эти данные позволяют рассматривать штамм «Орлов-В» в качестве кандидата при дальнейших исследованиях по созданию живой краснушной вакцины на основе отечественного вакцинного штамма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bouthry E., Picone O., Hamdi G., Grangeot-Keros L., Ayoubi J.M., Vauloup-Fellous C. Rubella and pregnancy: diagnosis, management and outcomes. *Prenat. Diagn.* 2014; 34(13): 1246–53. <https://doi.org/10.1002/pd.4467>

2. Saffar H., Khalifelloo M., Saffar M.J., Abdollahi A., Parsaei M.R., Ghorbani G.R., et al. Measles and rubella serosusceptibility among population vaccinated with different schedules: the potential impact on measles-rubella elimination in Iran. *BMC Infect. Dis.* 2021; 21(1): 305. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-05970-7>
3. Di Pietrantonj C., Rivetti A., Marchione P., Debalini M.G., Demicheli V. Vaccines for measles, mumps, rubella, and varicella in children. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020; 4(4): CD004407. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004407.pub4>
4. Terracciano E., Amadori F., Pettinicchio V., Zaratti L., Franco E. Strategies for elimination of rubella in pregnancy and of congenital rubella syndrome in high and upper-middle income countries. *J. Prev. Med. Hyg.* 2020; 61(1): E98-E108. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2020.61.1.1310>
5. Croce E., Hatz C., Jonker E.F., Visser L.G., Jaeger V.K., Bühler S. Safety of live vaccinations on immunosuppressive therapy in patients with immune-mediated inflammatory diseases, solid organ transplantation or after bone-marrow transplantation – A systematic review of randomized trials, observational studies and case reports. *Vaccine.* 2017; 35(9): 1216–26. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.01.048>
6. Миронов А.Н., ред. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Том I.* М.: Гриф и К; 2012.
7. Yang M.H., Freitas A.R.R. Biological view of vaccination described by mathematical modellings: from rubella to dengue vaccines. *Math. Biosci. Eng.* 2019; 16(4): 3195–214. <https://doi.org/10.3934/mbe.2019159>
8. Мешалова В.Н., Жукова Е.А., Степанов А.Н. Прививочные свойства краснушной вакцины из штамма «Орлов». В кн.: *Детские вирусные инфекции. Труды Института Пастера.* Ленинград; 1979: 112–5.
9. Медуницын Н.В. Государственная система оценки безопасности вакцин. *Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики: информационный бюллетень.* 2000; (8): 4–6.
10. Лаврентьева И.Н., Сухобаевская Л.П., Жибрун А.Б. Штамм вируса краснухи для получения медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП). Патент РФ № 2081912; 1995. Available at: <https://www.freepatent.ru/patents/2492235>.
11. Общая фармакопейная статья ОФС.1.7.2.0010.15. Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи. Available at: <https://nevacert.ru/reestry/pharmacopoeia/ofs.1.7.2.0010.15> (accessed February 2, 2022).
12. Barrett J.R. Pediatric vaccines and neurodevelopment: primate study finds no adverse behavioral effects. *Environ. Health Perspect.* 2015; 123(6): A156. <https://doi.org/10.1289/ehp.123-A156>
13. Curtis B., Liberato N., Rulien M., Morrisroe K., Kenney C., Yutuc V., et al. Examination of the safety of pediatric vaccine schedules in a non-human primate model: assessments of neurodevelopment, learning, and social behavior. *Environ. Health Perspect.* 2015; 123(6): 579–89. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408257>
14. Gadad B.S., Li W., Yazdani U., Grady S., Johnson T., Hammond J., et al. Administration of thimerosal-containing vaccines to infant rhesus macaques does not result in autism-like behavior or neuropathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(40): 12498–503. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500968112>
15. Lapin B.A., Shevtsova Z.V. Monkey viral pathology in the Sukhum colony and modeling human viral infections. *J. Med. Primatol.* 2018; 47(4): 273–7. <https://doi.org/10.1111/jmp.12351>
16. Lim F.S., Han H.H., Bock H.L. Safety, reactogenicity and immunogenicity of the live attenuated combined measles, mumps and rubella vaccine containing the RIT 4385 mumps strain in healthy Singaporean children. *Ann. Acad. Med. Singap.* 2007; 36(12): 969–73.

References

1. Bouthry E., Picone O., Hamdi G., Grangeot-Keros L., Ayoubi J.M., Vauloup-Fellous C. Rubella and pregnancy: diagnosis, management and outcomes. *Prenat. Diagn.* 2014; 34(13): 1246–53. <https://doi.org/10.1002/pd.4467>
2. Saffar H., Khalifelloo M., Saffar M.J., Abdollahi A., Parsaei M.R., Ghorbani G.R., et al. Measles and rubella serosusceptibility among population vaccinated with different schedules: the potential impact

- on measles-rubella elimination in Iran. *BMC Infect. Dis.* 2021; 21(1): 305. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-05970-7>
3. Di Pietrantonj C., Rivetti A., Marchione P., Debalini M.G., Demicheli V. Vaccines for measles, mumps, rubella, and varicella in children. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020; 4(4): CD004407. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004407.pub4>
 4. Terracciano E., Amadori F., Pettinicchio V., Zaratti L., Franco E. Strategies for elimination of rubella in pregnancy and of congenital rubella syndrome in high and upper-middle income countries. *J. Prev. Med. Hyg.* 2020; 61(1): E98-E108. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2020.61.1.1310>
 5. Croce E., Hatz C., Jonker E.F., Visser L.G., Jaeger V.K., Bühler S. Safety of live vaccinations on immunosuppressive therapy in patients with immune-mediated inflammatory diseases, solid organ transplantation or after bone-marrow transplantation – A systematic review of randomized trials, observational studies and case reports. *Vaccine.* 2017; 35(9): 1216–26. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.01.048>
 6. Mironov A.N., ed. *Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Drugs. Volume 1 [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Tom 1]*. Moscow: Grif i K; 2012. (in Russian)
 7. Yang M.H., Freitas A.R.R. Biological view of vaccination described by mathematical modellings: from rubella to dengue vaccines. *Math. Biosci. Eng.* 2019; 16(4): 3195–214. <https://doi.org/10.3934/mbe.2019159>
 8. Meshalova V.N., Zhukova E.A., Stepanov A.N. Vaccination properties of rubella vaccine from the «Orlov» strain. In: *Children's viral infections: Proceedings of the Pasteur Institute [Privivochnye svoystva krasnushnoy vaksiny iz shtamma «Orlov». V kn.: Detskie virusnye infektsii: Trudy Instituta Pastera]*. Leningrad; 1979: 112–5. (in Russian)
 9. Medunitsyn N.V. State system for assessing the safety of vaccines [*Gosudarstvennaya sistema otsenki bezopasnosti vaksin]. Vaksinatziya. Novosti vaksinoprofilaktiki: informatsionnyy byulleten'*. 2000; (8): 4–6. (in Russian)
 10. Lavrent'eva I.N., Sukhobaevskaya L.P., Zhebrun A.B. Rubella virus strain for the production of medical immunobiological preparations (MIBP). Patent RF № 2081912; 1995. Available at: <https://www.freepatent.ru/patents/2492235>. (in Russian)
 11. General Pharmacopoeial Article of OFS.1.7.2.0010.15. Assessment of the specific safety of industrial strains and seed viruses of measles, mumps, and rubella. Available at: <https://nevacert.ru/reestr/pharmacopoeia/of.1.7.2.0010.15> (accessed February 2, 2022). (in Russian)
 12. Barrett J.R. Pediatric vaccines and neurodevelopment: primate study finds no adverse behavioral effects. *Environ. Health Perspect.* 2015; 123(6): A156. <https://doi.org/10.1289/ehp.123-A156>
 13. Curtis B., Liberato N., Rulien M., Morrisroe K., Kenney C., Yutuc V., et al. Examination of the safety of pediatric vaccine schedules in a non-human primate model: assessments of neurodevelopment, learning, and social behavior. *Environ. Health Perspect.* 2015; 123(6): 579–89. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408257>
 14. Gadad B.S., Li W., Yazdani U., Grady S., Johnson T., Hammond J., et al. Administration of thimerosal-containing vaccines to infant rhesus macaques does not result in autism-like behavior or neuropathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(40): 12498–503. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500968112>
 15. Lapin B.A., Shevtsova Z.V. Monkey viral pathology in the Sukhum colony and modeling human viral infections. *J. Med. Primatol.* 2018; 47(4): 273–7. <https://doi.org/10.1111/jmp.12351>
 16. Lim F.S., Han H.H., Bock H.L. Safety, reactogenicity and immunogenicity of the live attenuated combined measles, mumps and rubella vaccine containing the RIT 4385 mumps strain in healthy Singaporean children. *Ann. Acad. Med. Singap.* 2007; 36(12): 969–73.