

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-649>



Динамика ферментативной активности в первичной культуре адгезивных лейкоцитов сирийского хомячка, заражённых SARS-CoV-2 *ex vivo*

Абрамова С.А.^{1✉}, Ляпун И.Н.¹, Дробот Е.И.¹, Крылова Н.В.^{1, 2}, Иунихина О.В.^{1, 2}, Лубова В.А.¹, Мерлов Е.К.¹, Белов Ю.А.^{1, 2}, Сомова Л.М.¹, Щелканов М.Ю.^{1, 2}

¹Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия;

²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Аннотация

Введение. Сохраняющаяся эпидемическая актуальность SARS-CoV-2 даже после завершения в 2023 г. связанной с ним пандемии COVID-19 определяет необходимость дальнейшего изучения взаимодействия этого вируса с клетками первой линии защиты — нейтрофилами.

Цель работы — определить ферментативную активность лейкоцитов периферической крови сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*) в динамике SARS-CoV-2-инфекции *ex vivo*, характеризующую микробицидный потенциал клеток врождённого иммунитета.

Материалы и методы. В работе использовался штамм SARS-CoV-2/Vladivostok/R-8726/2021 в заражающих дозах 3 lg (ТЦД₅₀/мл) и 2 lg (ТЦД₅₀/мл) (ТЦД₅₀ — 50% тканевая цитопатическая доза для линии клеток Vero E6); время контакта заражающей вирусосодержащей жидкости с клеточной культурой — 1 ч. Количество жизнеспособных клеток в культуре адгезивных лейкоцитов подсчитывали с помощью инвертированного микроскопа, оснащённого цифровой камерой, и программы MCView. Удельную (в расчёте на 1 жизнеспособную клетку) активности аденозинтрифосфатазы (АТФазы), 5'-нуклеотидазы (аденозинмонофосфатазы, АМФазы), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), сукцинатдегидрогеназы (СДГ), миелопероксидазы (МПО) и цитохромоксидазы (ЦХО) определяли спектрофотометрическим методом после инкубации со специфическими субстратами инфицированных и неинфицированных клеточных культур через 1, 16, 24, 48 ч после инокуляции вируса (п.и.в.).

Результаты. Через 1 ч п.и.в. по сравнению с неинфицированными лейкоцитами была снижена удельная активность АТФазы, МПО, повышена активность АМФазы, ЛДГ, СДГ; через 16 ч п.и.в. снижена активность МПО, повышена активность АМФазы, ЛДГ, СДГ, на исходном уровне, т. е. примерно на уровне неинфицированного контроля находится активность АТФазы, ЦХО; через 24 ч п.и.в. снижена активность АМФазы, повышена активность АТФазы, на исходном уровне — активность ЛДГ, СДГ, МПО, ЦХО; через 48 ч п.и.в. повышена активность АТФазы, ЛДГ, СДГ, МПО, ЦХО, на исходном уровне — активность АМФазы. Изменения ферментативной активности зависят от величины заражающей дозы и коррелируют с накоплением вируса в культуральной среде.

Заключение. Выявленная динамика ферментативной активности в первичной культуре адгезивных лейкоцитов, инфицированных SARS-CoV-2 *ex vivo*, свидетельствует о снижении микробицидного потенциала клеток врождённого иммунитета в процессе этой инфекции.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, лейкоциты, нейтрофилы, аденозинтрифосфатаза, 5'-нуклеотидаза, лактатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, миелопероксидаза, цитохромоксидаза, микробицидный потенциал

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора (протокол № 2 от 16.05.2024).

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора (№ 141-00017-24-01) «Молекулярно-генетические и фенотипические свойства возбудителей респираторных инфекций. Поиск эффективных соединений из наземной и морской биоты Дальнего Востока для разработки средств профилактики и лечения».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Абрамова С.А., Ляпун И.Н., Дробот Е.И., Крылова Н.В., Иунихина О.В., Лубова В.А., Мерлов Е.К., Белов Ю.А., Сомова Л.М., Щелканов М.Ю. Динамика ферментативной активности в первичной культуре адгезивных лейкоцитов сирийского хомячка, заражённых SARS-CoV-2 *ex vivo*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(2):168–178.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-649>

EDN: <https://www.elibrary.ru/KTYMCV>

Dynamics of enzymatic activity in primary culture of Syrian hamster adherent leukocytes *ex vivo* infected with SARS-CoV-2

Svetlana A. Abramova^{1✉}, Irina N. Lyapun¹, Elena I. Drobot¹, Natalia V. Krylova^{1, 2},
Olga V. Iunikhina^{1, 2}, Valeria A. Lubova¹, Evgeniy K. Merlov¹, Iurii A. Belov^{1, 2},
Larisa M. Somova¹, Mikhail Yu. Shchelkanov^{1, 2}

¹Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia;

²Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Abstract

Introduction. The continued epidemic relevance of SARS-CoV-2, even after the end of the associated COVID-19 pandemic in 2023, necessitates further study of the interaction of this virus with the first line of cellular defense, neutrophils.

The aim of the study was to determine the enzymatic activity of peripheral blood leukocytes of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) in the dynamics of *ex vivo* SARS-CoV-2 infection, which characterizes the microbicidal potential of innate immunity cells.

Materials and methods. The SARS-CoV-2/Vladivostok/R-8726/2021 strain was used at infectious doses of 3 lg (TCID₅₀/mL) and 2 lg (TCID₅₀/mL) (TCID₅₀ is the 50% tissue cytopathic dose for the Vero E6 cell line); the contact time of the infecting virus-containing liquid with the cell culture was 1 h. The number of viable cells in the adherent leukocyte culture was counted using an inverted microscope equipped with a digital camera and MCVIEW program. The specific (per 1 viable cell) activities of adenosine triphosphatase (ATPase), 5'-nucleotidase (adenosine monophosphatase, AMPase), lactate dehydrogenase (LDH), succinate dehydrogenase (SDH), myeloperoxidase (MPO) and cytochrome oxidase (CCO) were determined spectrophotometrically after incubation with specific substrates of infected and uninfected cell cultures 1, 16, 24, 48 h after virus inoculation.

Results. The enzymatic activity of leukocytes 1 h after virus inoculation, compared to uninfected leukocytes, was as follows: specific activity of ATPase, MPO was decreased, activity of AMPase, LDH, SDH was increased; 16 h after virus inoculation, activity of MPO was decreased, activity of AMPase, LDH, SDH was increased, activity of ATPase and CCO was at the initial level, i.e. approximately at the level of the uninfected control; 24 h after virus inoculation, AMPase activity was decreased, ATPase activity was increased, LDH, SDH, MPO, CCO activity was at the initial level; 48 h after virus inoculation, ATPase, LDH, SDH, MPO, CCO activity was increased, AMPase activity was at the initial level. Changes in enzymatic activity depend on the infecting dose and correlate with virus accumulation in the culture medium.

Conclusion. The revealed dynamics of enzymatic activity in the primary culture of adherent leukocytes *ex vivo* infected with SARS-CoV-2 indicates a decrease in the microbicidal potential of cells of innate immunity in the course of this infection.

Keywords: SARS-CoV-2, leukocytes, neutrophils, ATPase, 5'-nucleotidase, lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, myeloperoxidase, cytochrome oxidase, microbicidal potential

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 Ethics Committee of the Somov Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 2, May 16, 2024).

Funding source. The study was performed within the framework of the state assignment of the Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor (№ 141-00017-24-01) "Molecular-genetic and phenotypic properties of respiratory pathogens. Search for effective compounds from terrestrial and marine biota of the Far East for the development of prophylactic and treatment agents".

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Abramova S.A., Lyapun I.N., Drobot E.I., Krylova N.V., Iunikhina O.V., Lubova V.A., Merlov E.K., Belov I.A., Somova L.M., Shchelkanov M.Yu. Dynamics of enzymatic activity in primary culture of Syrian hamster adherent leukocytes *ex vivo* infected with SARS-CoV-2. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(2):168–178.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-649>

EDN: <https://www.elibrary.ru/KTYMCV>

Введение

Коронавирус тяжёлого острого респираторно-го синдрома 2-го типа (SARS-CoV-2 — severe acute respiratory coronavirus 2) (Nidovirales: Coronaviridae, *Betacoronavirus*, подрод *Sarbecovirus*) является этиологическим агентом коронавирусного заболевания 2019 г. (COVID-19), пандемия которого (2020–2023 гг.) стала самой продолжительной и одной из наиболее смертоносных среди острых респираторных заболеваний в новейшей истории человечества [1]. После окончания пандемического периода SARS-CoV-2 не исчез из человеческой популяции, а превратился в одну из составляющих в структуре сезонного подъёма заболеваемости острыми респираторными заболеваниями [2]. По этой причине изучение патогенеза SARS-CoV-2-инфекции не теряет своей актуальности, ряд аспектов этого процесса изучен недостаточно полно. В связи с этим особый интерес вызывает процесс взаимодействия вируса с клетками периферической крови, в частности, с клетками врождённого иммунитета — нейтрофилами и моноцитами.

В доступной литературе изложены теоретические предположения о возможной способности вируса SARS-CoV-2 инфицировать нейтрофилы. Так, N. Rong и соавт. сообщили о рецепторе CD147, альтернативном рецептору ACE2, который обуславливает тропизм вируса, экспрессируется в нейтрофилах здоровых доноров и активируется у пациентов с COVID-19 [3]. Другим неканоническим рецептором является лектиновый рецептор C-типа, который опосредует образование нейтрофильных внеклеточных ловушек при COVID-19 [4]. Исходя из этого можно сделать предположение о том, что вирус способен непосредственно влиять на лейкоциты крови.

Описанные нами ранее морфологические изменения лейкоцитов периферической крови также свидетельствуют об их значительном вовлечении в процесс SARS-CoV-2-инфекции [5–8]. Однако в научной литературе отсутствует подробная информация о характере и динамике ферментативной активности лейкоцитов при инфицировании данным вирусом. Имеются отдельные сообщения об изменениях активности миелопероксидазы (МПО) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови пациентов с диагнозом COVID-19, причём выражение этих изменений коррелирует с тяжестью основного заболевания [9–11]. По этой причине необходимо изучить не только морфологические, но и морфофункциональные изменения в комплексе с целью суждения о метаболических процессах клеток врождённого иммунитета под влиянием SARS-CoV-2.

Целью данной работы является определение ферментативной активности лейкоцитов периферической крови сирийских хомячков в динамике

SARS-CoV-2-инфекции *ex vivo*, характеризующей микробицидный потенциал клеток врождённого иммунитета.

Материалы и методы

Первичную адгезивную культуру лейкоцитов сирийского хомячка (*Mesocricetus auratus*) получали из крови 15 особей в возрасте 4 мес и массой около 100 г. Все процедуры с животными выполняли строго в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, от 18.03.1986. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора (протокол № 2 от 16.05.2024).

Кровь собирали из сердца в стеклянные пробирки с добавлением в каждую гепарина из расчёта 5 ЕД/мл. Пробирки помещали в термостат под углом 45° при 37°C на 1 ч, после чего осторожно удаляли верхний слой плазмы, а лейкоцитарную плёнку отбирали, доводили до концентрации 2×10^6 клеток/мл питательной средой 199 («БиолоТ») и разносили по 100 мкл в лунки плоскодонного 96-луночного планшета («TFS»), который помещали в термостат (5% CO₂, 37°C) на 40 мин; затем среду с неадгезированными клетками удаляли и лунки трижды промывали 150 мкл среды 199.

Количество живых адгезированных клеток в лунке определяли с помощью инвертированного микроскопа «МИБ-Р» («ЛОМО»), оснащённого цифровой камерой MC-8.3 C («ЛОМО»). С помощью программы MCView («ЛОМО-Microsystems») площадь поля зрения, не включающего край лунки, выставляли равной 0,26 мм², подсчитывали в ней число (*n*) живых (прикреплённых с целостной внешней мембраной) клеток; пересекающие внешнюю границу клетки учитывали на левой/верхней гранях квадрата поля зрения и не учитывали на правой/нижней гранях. Поскольку общая площадь лунки равна 35 мм², то общее количество клеток в лунке (*N*) оценивали по формуле:

$$N = n \times \frac{35,00 \text{ мм}^2}{0,26 \text{ мм}^2} \approx 134,62 \times n. \quad (1)$$

Итоговую оценку количества живых клеток в каждой лунке производили по 10 случайно выбранным полям зрения.

Инфицирование первичной культуры адгезивных лейкоцитов сирийского хомячка *ex vivo* осуществляли путём внесения в лунки с монослоем клеток 100 мкл среды 199 с рабочим разведением супернатанта клеточной культуры Vero E6, инфицированной SARS-CoV-2 (в контрольные образцы — без вируссодержащего супернатанта) и последующей инкубацией 1 ч при 37°C, после чего прово-

дили трёхкратную промывку и заполнение лунок средой для культивирования, содержащей среду 199 с 15% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) и 0,004% гентамицина К («БиолоТ»). Были использованы две инфицирующие дозы: 3 lg (ТЦД₅₀/мл) и 2 lg (ТЦД₅₀/мл), где ТЦД₅₀ — это 50% тканевая цитопатическая доза для линии клеток почки африканской зелёной марышки (*Chlorocebus sabaeus*, ♀) (Vero E6).

Штамм SARS-CoV-2/Vladivostok/R-8726/2021 был получен из Коллекции патогенных микроорганизмов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова. Данный штамм относится к генотипу Delta (AY.121) (VGARus ID: prim000041; GenBank ID: OQ318430; GISAID ID: EPI_ISL_16643370) и был выделен из назофарингеального смыва больного COVID-19 в декабре 2021 г. на модели клеточной линии Vero E6 [2].

Индикацию РНК SARS-CoV-2 осуществляли с помощью метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) с использованием набора реагентов «ОТ-ПЦР-РВ-SARS-CoV-2» («Синтол»). РНК выделяли с использованием комплекса реагентов «М-Сорб-НК» («Синтол»). Все манипуляции осуществляли согласно протоколам производителя. Пороговый цикл (threshold cycle, C_T) ОТ-ПЦР-РВ рассматривали как полуколичественную характеристику содержания вирусных частиц в среде: чем выше их содержание, тем ниже C_T . Отсутствие вируса соответствовало $C_T \geq 36$.

Активность аденозинтрифосфатазы (АТФазы) и аденозинмонофосфатазы (АМФазы) определяли после двукратной отмывки адгезированных лейкоцитов ростовой средой без ЭТС путём внесения в лунки планшета 50 мкл субстрата для АТФазы (8 мг/мл аденозин-5'-трифосфата в 10-кратно разведённом трис-HCl-буфере, pH 7,8, содержащем 87 мг NaCl, 28,7 мг KCl, 5,2 мг $MgCl_2 \times 6 H_2O$) и для АМФазы (4 мг/мл аденозин-5'-монофосфата в таком же буферном растворе, содержащем 87 мг NaCl и 70 мг $MgCl_2$). Образцы оставляли при 37°C на 30 и 60 мин соответственно. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл смеси аскорбиновой и молибденовой кислот в соотношении 1 : 1. Через 20 мин поглощение растворов измеряли¹ при длине волны 620 нм [12].

Активность ЛДГ и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) определяли после двукратной отмывки адгезированных лейкоцитов ростовой средой без ЭТС путём внесения в лунки планшета 100 мкл раствора йодонитротетразолия («ICN») — для ЛДГ и бро-

мида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиума («ICN») — для СДГ 2 мг/мл в фосфатном буфере pH 7,2 с 0,4% $MnCl_2$ и инкубировали 30 мин при 37°C; затем среду удаляли и монослой клеток дважды отмывали раствором Хенкса pH 7,2. Внутриклеточные гранулы диформаза растворяли в 100 мкл изопропилового спирта, подкисленного 0,04 М HCl. Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм (для ЛДГ) и 540 нм (для СДГ) [12].

Активность МПО и цитохромоксидазы (ЦХО) определяли после двукратной отмывки адгезированных лейкоцитов ростовой средой без ЭТС путём внесения в лунки планшета 100 мкл раствора ортофенилендиамина («Merck») 0,4 мг/мл — для МПО и 3,3'-диаминобензидина («Merck») 2 мг/мл — для ЦХО в фосфатно-цитратном буфере pH 5,0 с 0,033% H_2O_2 и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 10% раствора серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм [12].

Вирусную нагрузку в динамике SARS-CoV-2-инфекции устанавливали полуколичественным методом на основе изменения порогового цикла в ОТ-ПЦР-РВ ($C_T(0)$), через 1 ч ($C_T(1)$) — в вирусосодержащей жидкости после контакта с клетками; 16 ч ($C_T(16)$), 24 ч ($C_T(24)$) и 48 ч ($C_T(48)$) — в ростовой среде инфицированных клеток.

Ферментативную активность клеток под действием SARS-CoV-2-инфекции определяли через 1, 16, 24, 48 ч после инокуляции вируса (п.и.в.) путём сравнения отношений удельных (в расчёте на 1 клетку) ферментативных активностей инфицированных и неинфицированных клеток: для каждого момента времени t вычисляли коэффициент изменения удельной ферментативной активности $\gamma(t)$ по формуле:

$$\gamma(t) = \frac{\tilde{D}(t)}{\tilde{z}(t)} \times \frac{z(t)}{D(t)}, \quad (2)$$

где учтены оптическая плотность и количество живых клеток для неинфицированного ($D(t)$ и $z(t)$) и инфицированного ($\tilde{D}(t)$ и $\tilde{z}(t)$) образцов соответственно [13, 14]. Разумеется, имеет место априорное равенство:

$$\gamma(t) = 1. \quad (3)$$

Статистическая обработка результатов основывалась на том, что в каждый момент времени t для каждого из 6 ферментов измерения осуществляли в 3 лунках с неинфицированными клетками и в 3 лунках с инфицированными клетками. Для этого в начале производили удаление поддерживающей среды, чтобы после промывки внести среды с соответствующими субстратами. Пронумеруем ферменты в произвольном порядке, используя индекс

¹ Здесь и далее фотометрические измерения осуществляли с использованием спектрофотометра «Multiscan RC» («LabSystems»). Бланкирование проводили по раствору равного количества среды без соответствующих субстратов и клеток.

$f = 1, 2, \dots, 6$. Тогда в каждый момент времени t имеется $6 \times 3 = 18$ образцов вирусосодержащей жидкости: $C_{Tf}(t), j = 1, 2, 3$. При этом $C_{Tf}(1)$ представляли собой вирусную нагрузку в образцах в результате накопления вируса в среде *de novo*: после того как исходная вирусосодержащая жидкость $C_{Tf}(0)$ в течение 1 ч находилась в контакте с клетками; $C_{Tf}(16)$, $C_{Tf}(24)$ и $C_{Tf}(48)$. Таким образом, для $t = 1, 16, 24, 48$ ч выборочное среднее $\langle C_T(t) \rangle$ и стандартное отклонение выборочного среднего m_{CT} определяются по стандартным формулам в следующей модификации:

$$\langle C_T(t) \rangle = \frac{1}{18} \times \sum_{f=1}^6 \sum_{j=1}^3 C_{Tf}(t); \quad (4)$$

$$m_{CT} = \frac{1}{3\sqrt{34}} \times \left(\sum_{f=1}^6 \sum_{j=1}^3 (C_{Tf}(t) - \langle C_T(t) \rangle)^2 \right)^{1/2}. \quad (5)$$

Исходный образец был в единственном экземпляре, и его вирусную нагрузку характеризовало единственное значение $C_T(0)$.

После проведения химических реакций, которые катализируются изучаемыми ферментами, измеряли оптическую плотность в 3 лунках с неинфицированными клетками ($D_i(t), i = 1, 2, 3$) и в 3 лунках с инфицированными ($\tilde{D}_j(t), j = 1, 2, 3$) клетками. Перед этим в каждой лунке измеряли количество живых клеток: $z_i(t) (i = 1, 2, 3)$ и $\tilde{z}_j(t) (j = 1, 2, 3)$. Оценку каждого значения $z_i(t)$ и $\tilde{z}_j(t)$ осуществляли по 10 полям зрения в соответствии с $(1)^2$: $z_{ik}(t), k = 1, 2, \dots, 10$ и $\tilde{z}_{jh}(t), h = 1, 2, \dots, 10$. При этом все измерения $D_i(t), z_{ik}(t), \tilde{D}_j(t), \tilde{z}_{jh}(t)$ при любых значениях коэффициентов независимы и равноправны. Существует 30 значений дроби $\tilde{D}_j(t)/\tilde{z}_{jh}(t)$, 30 значений дроби $z_{ik}(t)/D_i(t)$ и 900 вариантов их произведений вида (2), т. е. выборка состоит из 900 значений $\gamma(t)$. Поэтому выборочное среднее $\langle \gamma(t) \rangle$ и стандартное отклонение выборочного среднего $m_{\gamma(t)}$ рассчитывали по стандартным формулам, модифицированным для данного случая:

$$\langle \gamma(t) \rangle = \frac{1}{900} \times \sum_{j=1}^3 \sum_{k=1}^{10} \sum_{j=1}^3 \sum_{h=1}^{10} \frac{\tilde{D}_j(t)}{\tilde{z}_{jh}(t)} \frac{z_{ik}(t)}{D_i(t)}; \quad (6)$$

² Подсчёт жизнеспособных клеток в суспензионных культурах проще всего проводить в камере Горяева, извлекая небольшой объём ростовой среды с клеточной взвесью. Этот метод более удобен для однократного измерения (который не даёт достаточной статистической точности), но затруднителен в случае нескольких повторов; кроме того, достоверность результатов МТТ-тестов при работе с суспензионными клеточными культурами дополнительно снижается артефактным захватом клеток при промывке, что приходится компенсировать применением дозаторных наконечников специальной конструкции (S-tips) [15].

$$m_{\gamma(t)} = \frac{1}{30\sqrt{899}} \times \left(\sum_{j=1}^3 \sum_{k=1}^{10} \sum_{j=1}^3 \sum_{h=1}^{10} \left(\frac{\tilde{D}_j(t)}{\tilde{z}_{jh}(t)} \times \frac{z_{ik}(t)}{D_i(t)} - \langle \gamma(t) \rangle \right)^2 \right)^{1/2}; \quad (7)$$

Достоверность различий между выборками из 900 значений для значений времени — $\gamma(t_1)$ и $\gamma(t_2)$, а также между выборками из 18 значений для значений времени $C_T(t_1)$ и $C_T(t_2)$, где $t_1 = 1, 16, 24, 48$ ч, $t_2 = 1, 16, 24, 48$ ч, $t_1 \neq t_2$, оценивали с помощью критерия Манна–Уитни–Вилкоксона. Этот непараметрический критерий не требует априорных предположений о функции распределения случайных величин, реализацией которых являются значения $\gamma(t)$ и $C_T(t)$. Достоверной считалась оценка при вероятности реализации альтернативной гипотезы $p \leq 0,05$.

Результаты

Содержание SARS-CoV-2 в ростовой среде культуры адгезивных лейкоцитов показано на **рис. 1** (здесь и далее следует иметь в виду, что большему значению C_T соответствует меньшее содержание вируса в исследуемом образце). В течение 1-го часа п.и.в., когда имел место контакт вирусосодержащей жидкости с клетками, происходило их инфицирование. После удаления вирусосодержащей жидкости новые частицы в среде накапливались в результате репликации вируса в заражённых клетках. Учитывая тот факт, что это разные этапы инфекционного процесса, на динамических кривых рис. 1 сделан разрыв.

Через 1 ч п.и.в. (к окончанию процесса заражения) активность АТФазы адгезивных лейкоцитов под действием SARS-CoV-2-инфекции *ex vivo* дозозависимым образом снизилась относительно неинфицированного контроля ($\gamma(1) < 1$), но затем начала также дозозависимо повышаться: $\gamma(16) \sim 1$; $\gamma(24) \approx 1,2$; $\gamma(48) \approx 1,6$ (**рис. 2, а**). Возрастание АТФазной активности в период 16–48 ч было почти линейным при незначительном, но воспроизводимом превышении активности для дозы $3 \lg(\text{ТЦД}_{50})$ по сравнению с $2 \lg(\text{ТЦД}_{50})$.

Активность АМФазы в процессе инфекции (**рис. 2, б**) изменялась иначе, нежели активность АТФазы. В начальный период инфекции уровень 5'-нуклеотидазы быстро повысился по сравнению с неинфицированным контролем и держался на этом уровне по меньшей мере 16 ч п.и.в., затем снижался к 24 ч ($\gamma(24) \approx 0,8$ для обеих заражающих доз) и медленно возрастал в течение последующих 24 ч ($\gamma(48) \sim 1$).

Изменения активности ЛДГ (**рис. 2, в**) и СДГ (**рис. 2, г**) в процессе инфекции были аналогичны:

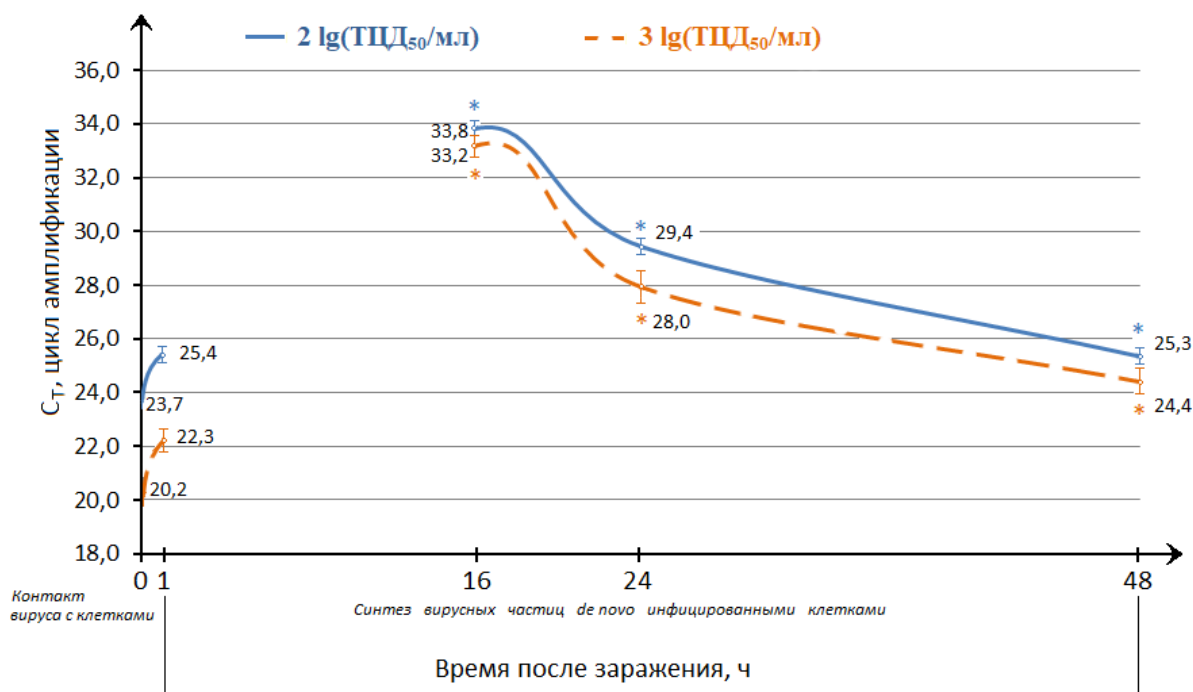


Рис. 1. Динамика вирусной нагрузки: меньшим значениям C_t соответствуют более высокие значения концентрации вирионов, и наоборот.

В течение 1-го часа после инокуляции вируса концентрация вирионов падает вследствие их проникновения в клетки-мишени. После этого происходит смена среды и начинается накопление *de novo* дочерних вирионов, продуцируемых инфицированными клетками.

* $p \leq 0,05$ по сравнению со значением C_t в предыдущий момент времени.

сначала небольшой резкий рост ($\gamma(1) \approx \gamma(16) \approx 1,2$), затем возвращение к значению активности неинфицированного контроля ($\gamma(24) \sim 1$) и возрастание в течение последующих 24 ч ($\gamma(48) \approx 1,8$). Снижение активности дегидрогеназ через 24 ч после инфицирования воспроизводится во всех случаях и, скорее всего, имеет дозозависимый характер (наиболее выраженный для СДГ).

Активность МПО в инфицированных клетках дозозависимым образом быстро снижалась по сравнению с неинфицированным контролем уже в течение 1 ч п.и.в. (рис. 2, *д*) и восстанавливалась к прежнему уровню через 24 ч ($\gamma(24) \sim 1$), после чего возрастала ($\gamma(48) \approx 1,4$).

Активность ЦХО сначала дозозависимо снижалась (рис. 2, *е*), но затем возвращалась к уровню неинфицированного контроля уже через 16 ч п.и.в. ($\gamma(16) \approx \gamma(24) \approx 1,0$), после чего возрастала до $\gamma(48) \approx 1,2$ для дозы $2 \lg(\text{TTC}_{50})$ и до $\gamma(48) \approx 1,4$ для дозы $3 \lg(\text{TTC}_{50})$.

Обсуждение

Сирийские хомячки (*Mesocricetus auratus*) являются удобной экспериментальной моделью для воспроизведения коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 [1, 16, 17]. В данной работе мы использовали инфицирование *ex vivo* культуры адгезивных лейкоцитов, которая содержит основную фракцию нейтрофилов, претерпевающих комплекс морфологических

изменений при контакте с инфекционными агентами [18]. Нейтрофилы — важное звено врожденного иммунитета, являются достаточно короткоживущими лейкоцитами, и уже через 48 ч их адгезивная популяция быстро истощается (это, в частности, определяет выбранную нами продолжительность эксперимента).

Известно, что АМФаза (5'-нуклеотидаза) и АТФаза активно вовлекаются в процесс пространственного преобразования плазматической мембраны нейтрофилов при хемотаксисе [18, 19]. В частности, 5'-нуклеотидаза является регулятором уровня циклического АМФ, который обеспечивает передачу сигналов от плазмалеммы внутрь клетки и регулирует образование внеклеточного аденозина, который через специфические рецепторы опосредует цитозащиту и разнообразные физиологические эффекты (подавление воспаления, вазодилатацию, ингибирование тромбоза, антиадренергию и др.) [20]. При повреждении клетки повышается содержание АМФ и понижается — АТФ [21, 22]. Соответственно, увеличение активности АМФазы и снижение активности АТФазы было зафиксировано в течение первых 16 ч п.и.в. Ранние этапы повреждения коронавирусами клеток-мишеней связаны с рецептор-опосредованным слиянием вирус-клеточных мембран и формированием в шероховатом эндоплазматическом ретикулеуме инфицированной клетки специальных цистерн, в которых

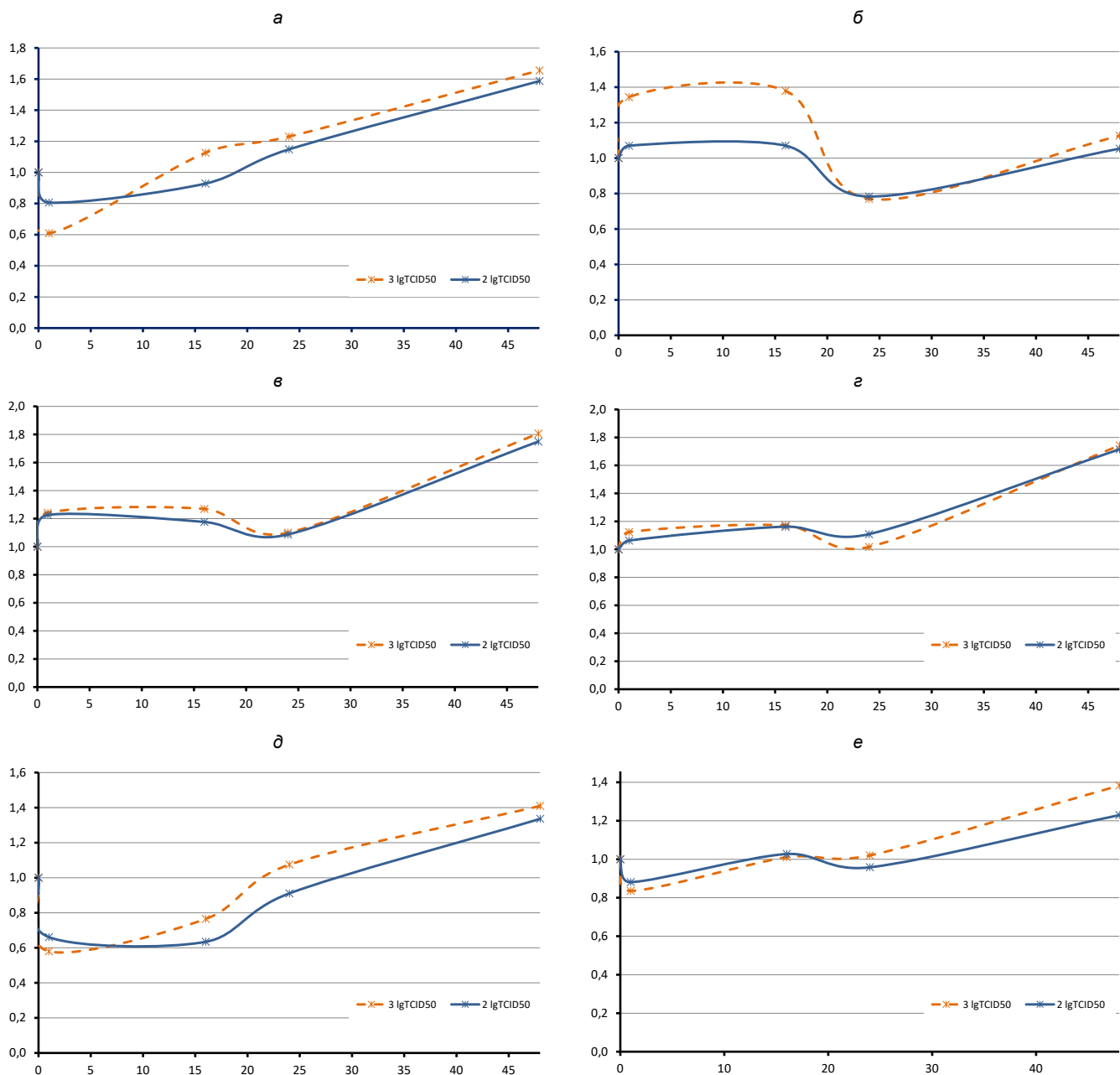


Рис. 2. Изменения активности ферментов в результате инфекции SARS-CoV-2: АТФазы (а); АМФазы или 5'-нуклеотидазы (б); ЛДГ (в); СДГ (г); МПО (д); ЦХО (е).

По осям ординат — γ ; по осям абсцисс — время после заражения, ч. * $p \leq 0,05$ по сравнению со значением γ в предыдущий момент времени.

происходит сборка вирионов [23, 24]. Монотонное возрастание активности АТФазы, начиная примерно с 16 ч п.и.в., связано с активным синтезом вирусных белков (как структурных, так и регуляторных) и вирусспецифических РНК. Повторное возрастание активности АМФазы позже 24 ч п.и.в. (рис. 2, а, б), по-видимому, отражает процесс вторичного инфицирования лейкоцитов (в том числе в результате синцитиеобразования).

ЛДГ представляет собой цинксодежащий внутриклеточный фермент, который катализирует

окисление молочной кислоты в пируват, принимает участие в обмене глюкозы, содержится практически во всех клетках организма и высвобождается при их повреждении [25]. Поэтому уровень сывороточной ЛДГ надёжно маркирует уровень неблагоприятных последствий воспалительных реакций и других патологических процессов. В частности, выявлена информативность уровня сывороточной ЛДГ для оценки клинической тяжести и мониторинга ответа на лечение при пневмонии у пациентов с COVID-19 [26]. СДГ относится к кофермент-не-

зависимым флавипротеинам и входит в мембрано-связанную дыхательную цепь мембран. Флавиновая группа этого фермента содержит 4 атома железа и ковалентно связана с белком, а ферментативная активность СДГ зависит от SH-групп [25]. СДГ млекопитающих не только участвует в образовании энергии в митохондриях, но также играет роль в чувствительности клетки к кислороду [27]. Дегидрогеназная активность инфицированных клеток сначала возрастает вследствие стимуляции вирусом репликационных процессов, а затем снижается в результате вирусиндуцированной цитодеструкции: на модели вируса иммунодефицита человека 1-го типа (Ortervirales: Retroviridae, *Lentivirus*) и иммортализованных клеточных линий различного происхождения показано, что величина и скорость такого дегидрогеназного сдвига пропорциональны заражающей дозе и уровню патогенности конкретного штамма (при одинаковой заражающей дозе) [13, 14]. В условиях описанного в данной статье эксперимента дегидрогеназная активность SARS-CoV-2-инфицированной первичной культуры адгезивных лейкоцитов сирийского хомячка (рис. 2, в, з) имеет два максимума: на 1-е сутки, который связан со входом вируса в клетку, и позже 1-х суток — в связи с продукцией вируса *de novo* (рис. 1, 2). Ещё одно объяснение (связанное с предыдущим): первый пик дегидрогеназной активности связан с жизнедеятельностью нейтрофилов, а второй — с более долгоживущими моноцитами (но пик максимума не был достигнут в связи с тем, что целью эксперимента было изучение в первую очередь биохимии инфицированных нейтрофилов).

МПО — гемопротейн, присутствующий в азурофильных гранулах нейтрофилов, выходящий при активации клетки в фаголизосому [28]. Этот фермент принимает участие в преобразовании супероксидного анион-радикала в гипохлорную кислоту, осуществляя защиту клетки от избыточного количества реактивных посредников кислорода [29]. После активации фагоцитов происходит дегрануляция, и МПО секретируется внутрь фагосомы либо во внеклеточное пространство. МПО является важной составной частью антимикробной активности фагоцитов, обеспечивающей врождённый неспецифический иммунитет. В ситуации *in vivo* МПО высвобождается во внеклеточную жидкость (в частности, в кровь), в том случае если по какой-либо причине нейтрофил не может фагоцитировать патоген, при клеточном лизисе или когда нейтрофил подвергается воздействию различных растворимых факторов [28].

При использовании автоматизированных цитохимических счётчиков клеток крови у пациентов с диагнозом COVID-19 отмечалось снижение активности МПО [9]. Вместе с тем при образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек, формирующих одну из линий защиты от патогенов (включая

вирусы, в том числе — SARS-CoV-2), выявляется повышение активности МПО во внеклеточном пространстве [30–32]. Снижение содержания МПО в культуре адгезивных лейкоцитов в течение 1 сут п.и.в. (рис. 1, е) может объясняться тем, что под действием SARS-CoV-2-инфекции нейтрофилы экскретируют МПО во внеклеточное пространство и формируют подобные нейтрофильным внеклеточным ловушкам структуры *ex vivo*.

ЦХО локализуется главным образом на внутренней мембране митохондрий, где захватывает протоны из внутримитохондриального матрикса и, перенося электроны с цитохрома С на кислород, восстанавливает O_2 до H_2O . Этот фермент играет важную роль в функционировании аэробного звена дыхательной цепи и производстве энергии в клетках эукариот [25]. Поэтому снижение активности ЦХО коррелирует со снижением активности АТФазы в первые часы п.и.в. (см. рис. 2, а и е). Кроме того, в лейкоцитах активность ЦХО служит достоверным показателем уровня окислительного метаболизма, и при гибели клеток её активность повышается [25] — именно этот эффект наблюдается в культуре адгезивных лейкоцитов к концу 1-х суток п.и.в. (рис. 2, е).

Обнаруженные изменения ферментативного спектра SARS-CoV-2-инфицированных лейкоцитов имеют дозозависимый характер (рис. 2): модуль таких изменений пропорционален заражающей дозе вируса. При анализе динамики ферментативной активности необходимо учитывать, что к концу 1-х суток п.и.в. клеточный состав культуры адгезивных лейкоцитов уменьшается за счёт короткоживущих нейтрофилов, но при этом в культуре остаются более долгоживущие клетки.

Разумеется, нельзя исключить, что инфицированные вирусом SARS-CoV-2 клетки Vero E6 продуцируют растворимые экзогенные факторы, способные повлиять на физиологию клеток при заражении, поскольку использовался вирусосодержащий супернатант клеточной культуры Vero E6. Однако известно, что клетки линии Vero и Vero E6 не продуцируют интерферон I типа за счёт потери кластера генов интерферона I типа [33, 34] и являются дефектными по продукции интерферонов- α -1/13, α -2, α -4, α -6, α -8, α -14, α -21, β -1 и ω -1 [33]. Что касается остальных вирусосодержащих растворимых факторов — они могут стать предметом дальнейших исследований.

Вывод

Обнаруженные изменения ферментативной активности в нейтрофилах, инфицированных SARS-CoV-2 *ex vivo*, свидетельствуют о снижении микробицидного потенциала этих клеток врождённого иммунитета, что является одной из причин дисфункции иммунной системы при COVID-19.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Щелканов М.Ю. Этиология COVID-19. В кн.: *COVID-19: от этиологии до вакцинопрофилактики. Руководство для врачей*. М.; 2023:11–53. Shchelkanov M.Yu. Etiology of COVID-19. In: *COVID-19: from Etiology to Vaccination. A Guide for Doctors*. Moscow; 2023:11–53. EDN: <https://elibrary.ru/itytdm>
- Попова А.Ю., Щелканов М.Ю., Крылова Н.В. и др. Генотипический портрет SARS-CoV-2 на территории Приморского края в период пандемии COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1):19–35. Popova A.Yu., Shchelkanov M.Y., Krylova N.V., et al. Genotypic portrait of SARS-CoV-2 in Primorsky krai during the COVID-19 pandemic. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2024;101(1):19–35. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-497> EDN: <https://elibrary.ru/pujffa>
- Rong N., Wei X., Liu J. The role of neutrophil in COVID-19: positive or negative. *J. Innate Immun*. 2024;16(1):80–95. DOI: <https://doi.org/10.1159/000535541>
- Zhu Y., Chen X., Liu X. NETosis and neutrophil extracellular traps in COVID-19: Immunothrombosis and beyond. *Front. Immunol*. 2022;13:838011. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.838011>
- Сомова Л.М., Коцюрбий Е.А., Дробот Е.И. и др. Клинико-морфологические проявления дисфункции иммунной системы при новой коронавирусной инфекции COVID-19. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2021;10(1):11–20. Somova L.M., Kotsyurbiy E.A., Drobot E.I., et al. Clinical and morphological manifestations of immune system dysfunction in new coronavirus infection (COVID-19). *Clinical and Experimental Morphology*. 2021;10(1):11–20. DOI: <https://doi.org/10.31088/CEM2021.10.1.11-20> EDN: <https://elibrary.ru/upppqm>
- Сомова Л.М., Дробот Е.И., Пустовалов Е.В. и др. Морфология лейкоцитов периферической крови у больных новой коронавирусной инфекцией COVID-19. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2023;12(3):41–9. Somova L.M., Drobot E.I., Pustovalov E.V., et al. Morphology of peripheral blood leucocytes in patients with new coronavirus infection (COVID-19). *Clinical and Experimental Morphology*. 2023;12(3):41–9. DOI: <https://doi.org/10.31088/CEM2023.12.3.41-49> EDN: <https://elibrary.ru/vcxery>
- Сомова Л.М., Абрамова С.А., Дробот Е.И. и др. Нейтрофильные синцитии в периферической крови пациентов с коронавирусной инфекцией (COVID-19). *Клиническая экспериментальная морфология*. 2024;13(3):26–33. Somova L.M., Abramova S.A., Drobot E.I., et al. Neutrophil syncytia in the peripheral blood of patients with coronavirus infection (COVID-19). *Clinical Experimental Morphology*. 2024;13(3):26–33. DOI: <https://doi.org/10.31088/CEM2024.13.3.26-33> EDN: <https://elibrary.ru/soelfa>
- Абрамова С.А., Дробот Е.И., Пустовалов Е.В. и др. Ультраструктурная патология клеток врожденного иммунитета при COVID-19. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2023;(45):109–11. Abramova S.A., Drobot E.I., Pustovalov E.V., et al. Ultrastructure pathology of innate immunity cells during COVID-19. *The Far Eastern Journal of Infectious Pathology*. 2023;(45):109–11. EDN: <https://elibrary.ru/jtwvjg>
- Han Y., Zhang H., Mu S., et al. Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: a retrospective and observational study. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(12):11245–58. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.103372>
- Poggiali E., Zaino D., Immovilli P., et al. Lactate dehydrogenase and C-reactive protein as predictors of respiratory failure in COVID-19 patients. *Clin. Chim. Acta*. 2020;509:135–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.012>
- Zini G., d'Onofrio G. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Focus on peripheral blood cell morphology. *Br. J. Haematol*. 2023;200(4):404–19. DOI: <https://doi.org/10.1111/bjh.18489>
- Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Кондрашова Н.М., Запорожец Т.С. Определение функциональной активности лейкоцитов периферической крови в качестве показателя неспецифической защиты организма: Методические рекомендации. Владивосток; 2005. Somova L.M., Plekhova N.G., Kondrashova N.M., Zaporozhets T.S. Determination of the functional activity of peripheral blood leukocytes as an indicator of nonspecific body protection: Methodological recommendations. Vladivostok; 2005.
- Щелканов М.Ю., Сахурия И.Б., Бурунова В.В. и др. Дегидрогеназная активность ВИЧ-инфицированных клеток при анализе результатов МТТ-теста. *Иммунология*. 1999;20(1):37–41. Shchelkanov M.Yu., Sakhuria I.B., Burunova V.V., et al. HIV-infected cell dehydrogenase activity in the evaluation of anti-HIV compound efficiency. *Immunologiya*. 1999;20(1):37–41. EDN: <https://elibrary.ru/lqohkg>
- Щелканов М.Ю., Ерёмин В.Ф., Сахурия И.Б. и др. Дегидрогеназная активность инфицированных клеток и биологические свойства различных вариантов ВИЧ-1. *Биохимия*. 1999;64(4):513–9. Shchelkanov M.Yu., Eremin V.F., Sakhuriya I.B., et al. Dehydrogenase activity of infected cells and biological properties of HIV-1 variants. *Biochemistry (Moscow)*. 1999;64(4):431–6. EDN: <https://elibrary.ru/lfiulj>
- Щелканов М.Ю., Сахурия И.Б., Полякова Е.Б. и др. Повышение качества МТТ-метода с помощью микродозаторных наконечников специальной конструкции. *Иммунология*. 1998;19(4):57–9. Shchelkanov M.Yu., Sakhuriya I.B., Polyakova E.B., et al. Improvement of the MTT-based assay by modification of pipette tips. *Immunology (Moscow)*. 1998;19(4):57–9. EDN: <https://elibrary.ru/mpawbj>
- Грачева А.В., Дроков А.О., Смирнова Д.И. и др. Вирулентность и тканевая специфичность разных эпидемически значимых вариантов SARS-CoV-2 для золотистых сирийских хомячков. *Журнал эпидемиологии, микробиологии и иммунобиологии*. 2024;101(4):470–82. Gracheva A.V., Drokov A.O., Smirnova D.I., et al. Virulence and tissue tropism of different epidemiologically significant SARS-CoV-2 variants for golden Syrian hamsters. *Journal of Epidemiology, Microbiology and Immunobiology*. 2024;101(4):470–82. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-528> EDN: <https://elibrary.ru/jukmca>
- Фоменко Е.П., Гапека А.В., Милованкин П.Г. и др. Эффективные животные модели для изучения SARS-CoV-2-инфекции. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2024;(47):36–8. Fomenko E.P., Gapeka A.V., Milovankin P.G., et al. Effective animal models for the study of SARS-CoV-2 infection. *The Far Eastern Journal of Infectious Pathology*. 2024;47(47):36–8. DOI: <https://doi.org/10.62963/2073-2899-2024-47-36-38> EDN: <https://elibrary.ru/rfdeaj>
- Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Слонова Р.А. и др. Метаболическая активность макрофагов, зараженных Hantaviruses — возбудителями геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Биохимия*. 2005;70(9):1198–208. Plekhova N.G., Somova L.M., Slonova R.A., et al. Metabolic activity of macrophages infected with hantavirus, an agent of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Biochemistry (Moscow)*. 2005;70(9):990–7. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0214-0> EDN: <https://elibrary.ru/ljdewp>
- Плехова Н.Г., Сомова Л.М. Роль моноцитов/макрофагов в патогенезе вирусных инфекций. *Тихоокеанский медицин-*

- ский журнал. 2010;(3):5–9. Plekhova N.G., Somova L.M. The role of monocytes/macrophages in pathogenesis of viral infections. *Pacific Medical Journal*. 2010;(3):5–9. EDN: <https://elibrary.ru/oiheqp>
20. Zukowska P., Kutryb-Zajac B., Toczek M., et al. The role of ecto-5'-nucleotidase in endothelial dysfunction and vascular pathologies. *Pharmacol. Rep.* 2015;67(4):675–81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.05.002> EDN: <https://elibrary.ru/xouavl>
21. Бра М., Квинан Б., Сузин С.А. Митохондрии в программированной гибели клетки: различные механизмы гибели (обзор). *Биохимия*. 2005;70(2):284–93. Bras M., Queenan B., Susin S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Moscow)*. 2005;70(2):231–9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0105-4> EDN: <https://elibrary.ru/mhrivj>
22. Осолок Л.Н., Порядин Г.В. Основные механизмы повреждения клеток. М.;2016. Oskolok L.N., Poryadin G.V. *The Main Mechanisms of Cell Damage*. Moscow;2016. EDN: <https://elibrary.ru/xglrxt>
23. Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Бургасова О.А. и др. COVID-19: этиология, клиника, лечение. *Инфекция и иммунитет*. 2020;10(3):421–45. Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Burgasova O.A., et al. COVID-19: Etiology, Clinical Picture, Treatment. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2020;10(3):421–45. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-CEC-1473> EDN: <https://elibrary.ru/imaadb>
24. Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г. и др. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae). *Инфекция и иммунитет*. 2020;10(2):221–46. Shchelkanov M.Yu., Popova A.Yu., Dedkov V.G., et al. History of investigation and current classification of coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae). *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2020;10(2):221–46. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-HOI-1412> EDN: <https://elibrary.ru/kziwrq>
25. Кольман Я., Рём К.Г. *Наглядная биохимия*. Пер. с нем. М.;2004. Koolman J., Röhm K.H. *Taschenatlas der Biochemie*. New York;1998. EDN: <https://elibrary.ru/qkmaqbj>
26. Wu M.Y., Yao L., Wang Y.I., et al. Clinical evaluation of potential usefulness of serum lactate dehydrogenase (LDH) in 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia. *Respir. Res.* 2020;21(1):171. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01427-8> EDN: <https://elibrary.ru/ojobmo>
27. Bardella C., Pollard P.J., Tomlinson I. SDH mutations in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011;1807(11):1432–43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2011.07.003> EDN: <https://elibrary.ru/phvbwv>
28. Klebanoff S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 2005;77(5):598–625. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.1204697> EDN: <https://elibrary.ru/mfbqgj>
29. Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha B., et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* 2000;80(5):617–53. DOI: <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780067>
30. Ashar H.K., Mueller N.C., Rudd J.M., et al. The role of extracellular histones in influenza virus pathogenesis. *Am. J. Pathol.* 2018;188(1):135–48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.09.014> EDN: <https://elibrary.ru/yfdncp>
31. Bader S.M., Cooney J.P., Pellegrini M., Doerflinger M. Programmed cell death: the pathways to severe COVID-19? *Biochem. J.* 2022;479(5):609–28. DOI: <https://doi.org/10.1042/bcj20210602> EDN: <https://elibrary.ru/kcewfq>
32. Kapoor S., Mihalovičová L., Pisareva E., et al. Association of vascular netosis with COVID-19 severity in asymptomatic and symptomatic patients. *iScience*. 2024;27(5):109573. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109573> EDN: <https://elibrary.ru/rvfnsn>
33. Osada N., Kohara A., Yamaji T., et al. The genome landscape of the African green monkey kidney-derived vero cell line. *DNA Res.* 2014;21(6):673–83. DOI: <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu029>
34. Konishi K., Yamaji T., Sakuma C., et al. Whole-genome sequencing of Vero E6 (Vero C1008) and comparative analysis of four Vero cell sublines. *Front. Genet.* 2022;13:801382. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.801382>

Информация об авторах

Абрамова Светлана Алексеевна[✉] — аспирант, м. н. с. лаб. патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, svetochey99@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2428-3186>

Ляпун Ирина Николаевна — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, irina-lyapun@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>

Дробот Елена Игоревна — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, eidrobot@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7672-1582>

Крылова Наталья Владимировна — д-р биол. наук, в. н. с., зав. лаб. респираторных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия; доцент каф. эпидемиологии, микробиологии и паразитологии с Международным научно-образовательным Центром биологической безопасности Роспотребнадзора Школы наук о жизни и биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия, krylovanatalya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9048-6803>

Иунихина Ольга Викторовна — канд. мед. наук, зав. лаб. природно-очаговых инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия; доцент каф. эпидемиологии, микробиологии и паразитологии с Международным научно-образовательным Центром биологической безопасности Роспотребнадзора Школы наук о жизни и биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия, olga_iun@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6723-582X>

Information about the authors

Svetlana A. Abramova[✉] — junior researcher, Pathology laboratory, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, svetochey99@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2428-3186>

Irina N. Lyapun — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Pathology laboratory, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, irina-lyapun@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>

Elena I. Drobot — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Pathology laboratory, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, eidrobot@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7672-1582>

Natalia V. Krylova — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of respiratory infections, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; Assistant Professor, Department of epidemiology, microbiology and parasitology with the International scientific and educational center for biological safety of Rosпотребнадзор, School of Life Sciences and Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, krylovanatalya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9048-6803>

Olga V. Iunikhina — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory of natural focal infections, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; Assistant Professor, Department of epidemiology, microbiology and parasitology with the International scientific and educational center for biological safety of Rosпотребнадзор, School of Life Sciences and Biomedicine, Far Eastern Federal University, olga_iun@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6723-582X>

Лубова Валерия Александровна — н. с. лаб. природно-очаговых инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, valeri_priority@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4290-6164>

Мерлов Евгений Константинович — м. н. с. отд. экспериментальной биомедицины НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, zhenya.merlov.2000@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1515-3221>

Белов Юрий Александрович — м. н. с., зав. центром молекулярной диагностики НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия; ассистент каф. эпидемиологии, микробиологии и паразитологии с Международным научно-образовательным Центром биологической безопасности Роспотребнадзора Школы наук о жизни и биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия, bornley@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8313-5610>

Сомова Лариса Михайловна — д-р мед. наук, профессор, г. н. с., зав. лаб. патоморфологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, I_somova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2023-1503>

Щелканов Михаил Юрьевич — д-р биол. наук, директор НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия; зав. каф. эпидемиологии, микробиологии и паразитологии с Международным научно-образовательным Центром биологической безопасности Роспотребнадзора Школы наук о жизни и биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия, adorob@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

Участие авторов: *Абрамова С.А.* — концепция и дизайн исследования, обработка и анализ материала, написание текста; *Ляпун И.Н., Дробот Е.И., Крылова Н.В., Иунихина О.В., Лубова В.А., Мерлов Е.К., Белов Ю.А.* — обработка и анализ материала; *Сомова Л.М.* — концепция и дизайн исследования, обработка и анализ материала, написание текста, научное редактирование; *Щелканов М.Ю.* — написание текста, научное редактирование. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 10.02.2025;
принята к публикации 15.04.2025;
опубликована 28.04.2025

Valeria A. Lubova — researcher, Laboratory of natural focal infections, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, valeri_priority@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4290-6164>

Evgeniy K. Merlov — junior researcher, Department of experimental biomedicine, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, zhenya.merlov.2000@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1515-3221>

Iurii A. Belov — junior researcher, Head, Center of molecular diagnostics, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; assistant, Department of epidemiology, microbiology and parasitology with the International scientific and educational center for biological safety of Rospotrebnadzor, School of Life Sciences and Biomedicine, Far Eastern Federal University, bornley@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8313-5610>

Larisa M. Somova — Dr. Sci. (Med.), Professor, chief researcher, Head, Pathology laboratory, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, I_somova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2023-1503>

Mikhail Yu. Shchelkanov — D. Sci. (Biol.), Director, G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia; Head, Department of epidemiology, microbiology and parasitology with the International scientific and educational center for biological safety of Rospotrebnadzor, School of Life Sciences and Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, adorob@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

Authors' contribution: *Abramova S.A.* — conceived the study and designed the experiment, material processing and performed the analysis, writing the manuscript; *Lyapun I.N., Drobot E.I., Krylova N.V., Iunikhina O.V., Lubova V.A., Merlov E.K., Belov I.A.* — material processing and performed the analysis; *Somova L.M.* — conceived the study and designed the experiment, material processing and performed the analysis, writing the manuscript, science editing; *Shchelkanov M.Yu.* — writing the manuscript, science editing. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 10.02.2025;
accepted for publication 15.04.2025;
published 28.04.2025