

УДК 616-092

«Ковидная эндотелиотека» в проверке гипотезы индукции нестабильности генома вирусом SARS-CoV-2 в эндотелии у переболевших COVID-19

Лубинец Н.С.^{1,2}, Юсупов А.В.³, Кравцов В.Ю.^{1,4}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики». 191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, д. 9

³ Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации. 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования и науки «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет имени Ж.И. Алфёрова Российской академии наук» 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 8, корп. 3, литер А

Актуальность. Поскольку вирусы способны дестабилизировать геномы соматических клеток в инфицированных ими клеточных популяциях, нами была выдвинута гипотеза о возможной индукции нестабильности генома в эндотелии у переболевших COVID-19 и его прогностическом значении.

Целью исследования стала проверка гипотезы о том, что вирус SARS-CoV-2 проникает в эндотелиоциты и может индуцировать в них нестабильность генома, которая сохраняется у переболевших COVID-19.

Материалы и методы. Для проверки выдвинутой гипотезы было проведено исследование CROSS-SECTION в нескольких клиниках Санкт-Петербурга в период с 2021 по 2023 гг. За этот период нами был собран и сохранён банк биоптатов и цитологических препаратов с эндотелиоцитами от 51 пациента, перенёсших новую коронавирусную инфекцию (COVID+), и от 43 пациентов, не инфицированных SARS-CoV-2 (COVID-). Зафиксированный и сохранённый с информационным сопровождением материал за указанный период пандемии COVID-19 мы назвали «ковидной эндотелиотекой», которую мы используем для проверки гипотез патогенеза новой коронавирусной инфекции, проводя ретроспективно лабораторные (цитопатологические) исследования. В качестве показателя индукции нестабильности генома в эндотелии мы выбрали микроядра (МЯ) и межъядерные хромосомные мосты (ХМ) в интерфазных эндотелиоцитах в цитологических препаратах, полученных из удалённых геморроидальных узлов во время геморроидэктомии в период пандемии COVID-19.

Результаты. Свыше 70% клеток в цитограммах геморроидальных узлов были представлены CD31+ эндотелиоцитами. Исследование более 45 000 эндотелиоцитов, проведенное в группе «COVID+» пациентов, перенёсших коронавирусную инфекцию, и в группе «COVID-», не болевших COVID-19, не выявило ни одного случая обнаружения микроядра или межъядерного хромосомного моста. Таким образом, все 94 пациента имели показатели «МЯ-» и «ХМ-». Критерий χ -квадрат, рассчитанный нами для проверки гипотезы о связи показателя «COVID+» с показателями «МЯ+» и «ХМ+», оказался равным 0,68 ($df = 1, p = 0,409$).

Заключение. Выдвинутая гипотеза об индукции вирусом SARS-CoV-2 нестабильности генома в эндотелии у пациентов, переболевших COVID-19 не подтвердилась. По-видимому, ожидаемое влияние SARS-Cov-2 на системную эндотелиопатию (вне лёгких и сердца) при COVID-19 обратимо, и типовые патофизиологические реакции, обуславливающие «долгий ковид», переоцениваются.

Ключевые слова: эндотелий; эндотелиоциты; COVID-19; микроядра; хромосомные мосты; хромотрипсис; геморроидальные узлы.

Для цитирования: Лубинец Н.С., Юсупов А.В., Кравцов В.Ю. «Ковидная эндотелиотека» в проверке гипотезы индукции нестабильности генома вирусом SARS-CoV-2 в эндотелии у переболевших COVID-19. *Патогенез*. 2023; 21(4): 61–67

DOI: 10.25557/2310-0435.2023.04.61-67

Для корреспонденции: Лубинец Наталья Сергеевна, e-mail: nlubinets@icloud.com; Кравцов Вячеслав Юрьевич, e-mail: kvyspb@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 333 22-65-00022 «Исследование роли белка HNRNPA2B1 в метаболизме R- петель, геномной стабильности и радиорезистентности»

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы благодарят сотрудников кафедры патологической анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный Государственный Медицинский Университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, на базе которой выполнялись иммуноцитохимические исследования, Гладышева Никиту Сергеевича, Емелина Алексея Михайловича и Деева Романа Вадимовича за методическую помощь.

Поступила: 25.10.2023.

«COVID endothelioteca» in testing the hypothesis of induction of genome instability by the SARS-CoV-2 virus in the endothelium of patients who have recovered from COVID-19

Lubinets N.S.^{1,2}, Yusupov A.V.³, Kravtsov V.Yu.^{1,4}

¹ St. Petersburg State Pediatric Medical University,
Litovskaya str. 2, St. Petersburg 194100, Russian Federation

² ITMO University,
Lomonosova Str. 9, St. Petersburg 191002, Russian Federation

³ S.M. Kirov Military Medical Academy,
Akademika Lebedeva Str. 6, St. Petersburg 194044, Russian Federation

⁴ Zh.I. Alferov Saint Petersburg National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences,
Khlopina Str., 8 Bldg. 3 letter A, St. Petersburg 194021, Russian Federation

Background. Since viruses are capable of destabilizing the genomes of somatic cells in cell populations infected by them, we put forward a hypothesis about the possible induction of genome instability in the endothelium in patients who have recovered from COVID-19 and its prognostic significance.

The aim of the study was to test the hypothesis that the SARS-CoV-2 virus penetrates endothelial cells and can induce genomic instability in them, which persists in those who have recovered from COVID-19.

Materials and methods. To test the hypothesis, the CROSS-SECTION study was conducted in several clinics in St. Petersburg in the period from 2021-2023. During this period, we collected and stored a bank of biopsy specimens and cytological preparations with endothelial cells from 51 patients who had a new coronavirus infection (COVID+) and 43 patients not infected with SARS-CoV-2 (COVID-). We called the material recorded and stored with information support during the specified period of the COVID-19 pandemic "covid endotheliosis," which we use to test hypotheses of the pathogenesis of the new coronavirus infection, conducting retrospective laboratory (cytopathological) studies. As an indicator of the induction of genomic instability in the endothelium, we selected micronuclei (MN) and internuclear chromosomal bridges (CB) in interphase endotheliocytes in cytological preparations obtained from removed hemorrhoids during hemorrhoidectomy during the COVID-19 pandemic.

Results. Over 70% of cells in the cytograms of hemorrhoids were represented by CD31+ endothelial cells. A study of more than 45,000 endothelial cells conducted in the "COVID+" group of patients who had suffered a new coronavirus infection and in the "COVID-" group who did not have COVID-19 did not reveal a single case of detection of a micronucleus or internuclear chromosome bridge. Thus, all 94 patients had indicators "MY-" and "HM-".

The χ -square criterion, which we calculated to test the hypothesis about the relationship between the "COVID+" indicator and the "MY+" and "HM+" indicators, was equal to 0.68 ($df = 1, p = 0.409$).

Conclusion. The hypothesis put forward about the induction of genome instability in the endothelium by the SARS-CoV-2 virus in patients who have recovered from COVID-19 was not confirmed. Apparently, the expected effect of SARS-Cov-2 on systemic endotheliopathy (outside the lungs and heart) in COVID-19 is reversible and the typical pathophysiological reactions that cause "long Covid" are overestimated.

Key words: endothelium; endothelial cells; COVID-19; micronuclei; chromosomal bridges; chromothripsis; hemorrhoids.

For citation: Lubinets N.S., Yusupov A.V., Kravtsov V.Yu. ["Covid endothelioteca" in testing the hypothesis of induction of genome instability by the SARS-CoV-2 virus in the endothelium of patients who have recovered from COVID-19]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2023; 21(4): 61–67 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2023.04.61-67

For correspondence: Lubinets Natalia Sergeevna, e-mail: nlubinets@icloud.com; Kravtsov Viacheslav Yurievich, e-mail: kvyspb@mail.ru

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation grant № 333 22-65-00022 "Study of the role of the HNRNPA2B1 protein in the metabolism of R-loops, genomic stability and radioresistance".

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

Acknowledgments The authors thank the staff of the Department of Pathological Anatomy of I.I. Mechnikov North-western State Medical University (St. Petersburg), where immunocytochemical studies were carried out, Gladyshev Nikita Sergeevich, Emelin Alexey Mikhailovich and Deev Roman Vadimovich for methodological assistance.

Received: 25.10.2023.

Введение

Вирусы способны индуцировать микроядра и промотировать хромотрипсис в популяциях соматических клеток, которые они инфицируют [1, 2]. В связи с появлением в человеческой популяции SARS-CoV-2 неизбежно встал вопрос о влиянии нового коронавируса на геномы соматических клеток человека. В обзоре Grand R.J. (2023) рассмотрены недавние данные, указывающие на то, как SARS-CoV-2 вызывает нестабильность генома, а также последствия нестабильности генома для пациентов, страдающих длительным COVID [3].

Чтобы проверить реальность высказанных опасений мы решили проверить гипотезу о том, обладает ли новый вирус SARS-CoV-2 способностью индуцировать микроядра (и межъядерные хромосомные мосты) в эндотелии *in vivo*, у переболевших COVID-19. Вопрос о том оказывал ли влияние SARS-CoV-2 на системную эндотелиопатию и сохраняются ли геномные нарушения в эндотелии после перенесённого COVID-19 в клинических исследованиях ранее не рассматривался.

В период 2021–2023 гг. мы создавали банк биопсийных материалов эндотелия («ковидную эндотелиотеку») на базе нескольких клиник Санкт-Петербурга, хирурги-

ческие отделения которых во время пандемии работали в плановом порядке. В указанном временном срезе оказались COVID-позитивные и COVID-негативные пациенты, от которых и были получены биоптаты эндотелия. Получение биоптатов эндотелия и цитологическое исследование эндотелиоцитов в них мы проводили запатентованным нами в 2023 году методом «Способ получения эндотелиоцитов человека» [4]. В качестве показателей нестабильности генома были выбраны микроядра (МЯ) и межъядерные хромосомные мосты (ХМ), которые мы определяли в клеточных популяциях эндотелиоцитов (цитологических препаратах) геморроидальных узлов у пациентов с хроническим геморроем, переболевших и не болевших COVID-19, проходивших хирургическое лечение в период пандемии.

Таким образом, в формате клинического исследования CROSS-SECTION нам удалось создать «ковидную эндотелиотеку», которую мы использовали для проверки выдвинутой гипотезы. **Целью исследования** стала проверка гипотезы о том, что вирус SARS-CoV-2 проникает в эндотелиоциты и может индуцировать нестабильность генома в эндотелии, которая сохраняется у переболевших COVID-19.

Материалы и методы исследования

Пациенты. Исследование проводилось в цитологических препаратах, полученных из биоптатов (геморроидальных узлов) во время геморроидэктомии в период пандемии COVID-19. Для проверки выдвинутой гипотезы методом CROSS-SECTION материал был получен в нескольких клиниках Санкт-Петербурга в период с 2021 по 2023 гг. Первый пациент, включенный в исследование, был прооперирован 22.10.2021 г, последний пациент, включенный в исследование, был прооперирован 01.05.2023 г. За этот период удалось получить и зафиксировать материал от 51 пациента, перенёсших новую коронавирусную инфекцию (COVID+) и 43 пациентов не инфицированных SARS-CoV-2 (COVID-). Все пациенты обратились в клинику для хирургического лечения геморроя. Участие в исследовании было основано на информированном согласии обследуемых лиц. Соответствие исследования международным этическим нормам, изложенным в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Рекомендации для врачей, занимающихся биомедицинскими исследованиями с участием людей» подтверждено решением Локального этического комитета при СПбГПМУ, протокол №20/03 от 22.12.2022 г.

Цитологические исследования. Геморроидальные узлы (ГУ) являются идеальным биопсийным материалом для цитологического исследования эндотелия, так как геморроидальная ткань образована множеством кавернозных полостей, высланных эндотелиоцитами.

Мы разработали способ получения эндотелиальных клеток человека, отличающийся тем, что в качестве биопсийного материала используют обогащенные

эндотелиальными клетками геморроидальные узлы [4]. Прямая световая микроскопия эндотелия позволяет выявлять микроядра и межъядерные хроматиновые мосты, указывающие на цитогенетические циклы «разрыв—слияние—мост».

Препараты для цитологического исследования эндотелия человека получали методом отпечатков (print-cytology). Для этого обрезанный край ГУ отпечатывается на предметных стеклах с адгезивом. Срезы ГУ разделяли скальпелем на фрагменты так, чтобы снять кожу, фиксировали пинцетом или зажимом типа «москит», и отпечатывали поверхность разреза на предметных стеклах. Важно отметить необходимость удаления участков кожи и распечатки «очищенной» биопсии ГУ с кожи, чтобы исключить попадание клеток многослойного плоского эпителия на предметное стекло. Затем полученные мазки-отпечатки подсушивали на воздухе в течение 10 мин и фиксировали 95% этиловым спиртом. Затем окрашивали азур2-эозином по Романовскому. Микроскопию проводили при увеличении $\times 200$, $\times 400$ и $\times 1000$. От каждого пациента просматривали в среднем по 500 эндотелиоцитов (3-4 предметных стекла — препарата).

Иммуноцитохимические исследования для выявления эндотелиоцитов (CD31+) проводили одновременно с цитопатологическими. Для визуализации фона, создаваемого антигеном CD31 в мазках, использовали моноклональные мышиные антитела производства Dako (Дания) против человеческого эндотелия CD31. После многократной фиксации и высушивания гидрофобным карандашом «ДакоПен» (DakoCytomation), круговым рисунком была ограничена ареола диаметром 1 см, внутри которой проводилось окрашивание. Все растворы антител и системы визуализации наносили на эту ограниченную ареолу в точно таких же объёмах, чтобы соблюдать одни и те же стандартные условия для последующего обнаружения эндотелиоцитов.

Эндогенную пероксидазу в мазках инактивировали 1% раствором азида натрия (Merck) в течение 10 мин, затем промывали в две смены бидистиллированной водой и оставляли на 5 мин в Трис-NaCl-буфере (pH 7,6). Еще раз подчеркнем, что растворы антител вводили микродозатором в объеме 50 мкл, только в информативную зону, обведенную гидрофобным карандашом, и распределяли тонким слоем по её поверхности. Концентрация рабочих растворов первых антител соответствовала 0,01 мг/мл. Инкубация с первыми моноклональными антителами мыши к CD31 продолжалась 30 мин при $+37^{\circ}\text{C}$. После мечения первыми антителами препараты проводили в две смены буфера по 5 мин каждая, и наносили лошадиные антимышинные/антикроличьи биотинилированные антитела (R.T.U. VECTASTAIN UNIVERSAL ABC RIT). Со вторыми антителами препараты инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Перед проявлением субстрата препараты промывали буфером PBS в течение 1 часа. Завершающим этапом иммуноцитохимического окрашивания на CD31 было нанесение на 3 мин при комнатной температуре системы

визуализации, состоящей из растворимого комплекса — авидина и биотинилированной пероксидазы хрена (VECTASTAIN UNIVERSAL ABC KIT, США). 3,3'-диаминобензидин (DAB) (DakoCytomation) использовали для проявления в течение 30 с. Препараты окрашивали гематоксилином Майера.

Микроскопию окрашенных препаратов проводили при увеличении с использованием объектива ($\times 40$, Leica DM 4000 V).

Для статистической проверки выдвинутой гипотезы нами был использован критерий χ -квадрат.

Результаты исследования

На первом этапе исследования, приготовленные методом отпечатков (print-cytology) и зафиксированные цитологические препараты были окрашены иммуноцитохимическим методом с применением моноклональных антител к CD31 для оценки количества и состояния эндотелиоцитов ГУ. На (рис. 1 а, б, микрофотография) показано обзорное изображение препарата после иммуноцитохимического окрашивания с использованием моноклональных антител к CD31 в варианте визуализации авидин-биотин с проявлением мазка. Очевидно, что после такого окрашивания CD31 визуализировался только в эндотелиоцитах. Фон мазков почти всегда оставался чистым, что было достигнуто путем его удаления на этапах подготовки образца.

Очевидно, что коричневое ареольное окрашивание CD31 присутствует только на поверхности цитоплазматической мембраны. Иногда CD31 проявлялся в виде интенсивно окрашенных гранул (почти черных) ближе к периферии цитоплазмы, но чаще всего он обнаруживался равномерно по всей цитоплазматической мембране. CD31-позитивные клетки (эндотелиоциты) представляли основной пул клеток в исследованных на-

ми мазках-отпечатках ГУ (до 80%) и имели достаточно цитоплазмы для определения микроядер (в отличие от таковых в гистологических срезах).

Таким образом, используя иммуноцитохимическое исследование CD31, мы показали адекватность цитопатологического метода для тестирования МЯ и ХМ в популяциях клеток эндотелиоцитов. Плоский эпителий, гладкомышечные клетки и лейкоциты, которые неизбежно также переносятся из геморроидальных узлов на предметные стекла, мы не рассматривали.

Эндотелиоциты можно легко идентифицировать после окрашивания азур2-эозином. На фоне эритроцитов и лейкоцитов преобладают полигональные, реже овальные эндотелиоциты, расположенные раздельно и пластинчато в среднем в поле зрения при указанном увеличении в 5-15 плоских эндотелиоцитов. Эндотелиоциты ГУ (рис. 2) имели как правило размеры 15-30 мкм; полигональную реже округло-овальную формы с чётко различимыми ядрами с рыхлым сетчатым эухроматином и гиперхромным гетерохроматином. Митозы в ГУ встречены не были.

Таким образом, основной пул клеток в мазках-отпечатках геморроидальных узлов представлен эндотелиоцитами, в цитоплазме которых возможно выявление микроядер.

Однако оказалось, что несмотря на большой объём исследований, а именно 94 пациента (у 51 из которых была выявлена новая коронавирусная инфекция (COVID+), а у 43 коронавируса не было (COVID-)), и просмотренные у каждого в среднем по 500 эндотелиоцитов (3-4 предметных стекла — препарата), эндотелиоциты с микроядрами обнаружены не были. То есть среди 45 000 просмотренных эндотелиоцитов не встретилось ни одного микроядра.

Критерий χ -квадрат, рассчитанный нами для проверки гипотезы о взаимосвязи между показателем

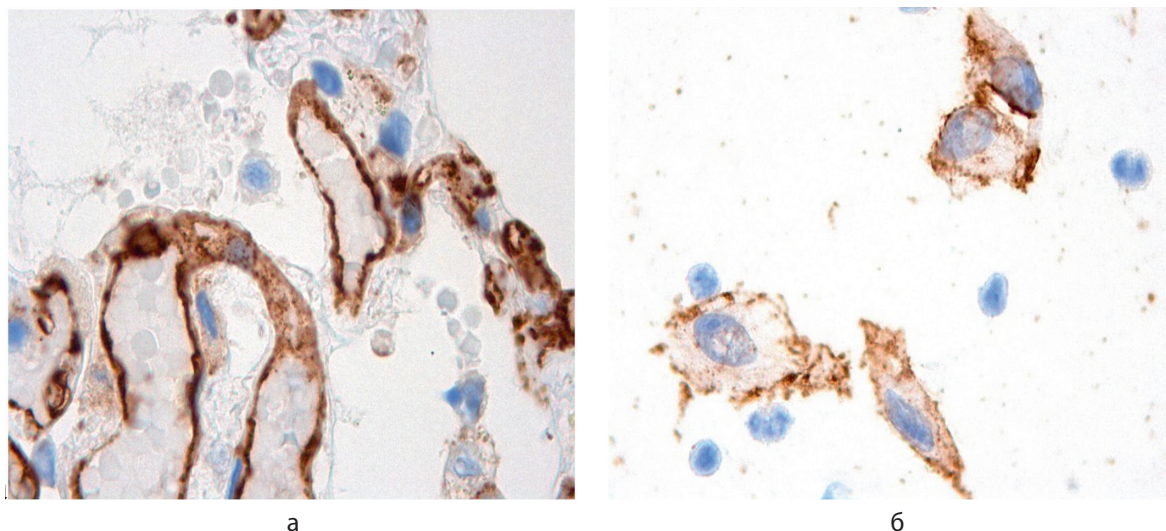


Рис. 1. Мазок-отпечаток геморроидального узла. Эндотелиоциты в слоях (а); отдельные эндотелиоциты (б). Иммуноцитохимическое окрашивание CD31. Увеличение $\times 400$.

COVID+ и показателем МЯ+, оказался равным 0,068. (χ -квадрат = 0,68085, $df = 1$, $p = 0,409$). Ровно такая же нулевая статистика получилась и по межъядерным хроматиновым мостам. Таким образом, гипотеза о том, что вирус SARS-CoV-2 индуцирует нестабильность генома в эндотелии у переболевших COVID-19 не подтвердилась. Вероятно, эндотелий обладает резистентностью к новому коронавирусу SARS-CoV-2. Возможные механизмы такого противовирусного иммунитета обсудим ниже.

Обсуждение

Сразу отметим, что микроядра (и мосты) в нашем исследовании мы рассматриваем отдельно от общепринятого классического микроядерного теста. Сегодня микроядра из пассивных индикаторов повреждения ДНК (в микроядерном тесте) превратились в активных участников формирования повреждений ДНК, обнаружив тем самым непредвиденную ранее роль микроядер в происхождении хромосомной нестабильности (геномного хаоса) [5-7]. Поэтому мы ограничили объёмы просчитываемых клеток для определения частоты встречаемости клеток с микроядрами до 500 клеток, хотя количество собранных нами препаратов «ковидной эндотелиотексти» позволяло выполнить большие объёмы цитологических исследований. Схожие эффекты вирус-индуцированных микроядер, которые мы про-

веряем в нашей гипотезе, исчисляются процентами начиная с 4% [1]. Мы ожидали увеличения частоты каринопатологических и цитогенетических эндотелиопатий (микроядра и межъядерные мосты) в группе пациентов с COVID-19. В выдвинутой и обоснованной нами гипотезе мы проверяли индукцию нестабильности генома с высокой частотой событий (микроядер и мостов). Однако мы получили прямо противоположный результат, свидетельствующий об отсутствии внелёточных эндотелиопатий. Полученный нами в клиническом исследовании результат не ставит новый коронавирус в один ряд с вирусами-индукторами хромотриписа: папилломавирусами [1], вирусом Эпштейна-Барр [2], цитомегаловирусами и другими вызывающими нестабильность генома вирусами [3]. Таким образом, полученный нами нулевой отрицательный результат для нового коронавируса можно рассматривать как очень позитивный для человеческой популяции.

Напомним, что в период пандемии, когда мы выполняли это исследование в условиях эпидемиологических ограничений, был возможен только предложенный формат CROSS-SECTION. Нам удалось отсортировать репрезентативные группы пациентов, проходивших лечение в нескольких клиниках Санкт-Петербурга в период 2021-2023 годов. Приём, регистрация, лечение и получение биоматериалов осуществлялись одним врачом. Лабораторные исследования также проводились при его непосредственном участии. Микроскопирование цито-

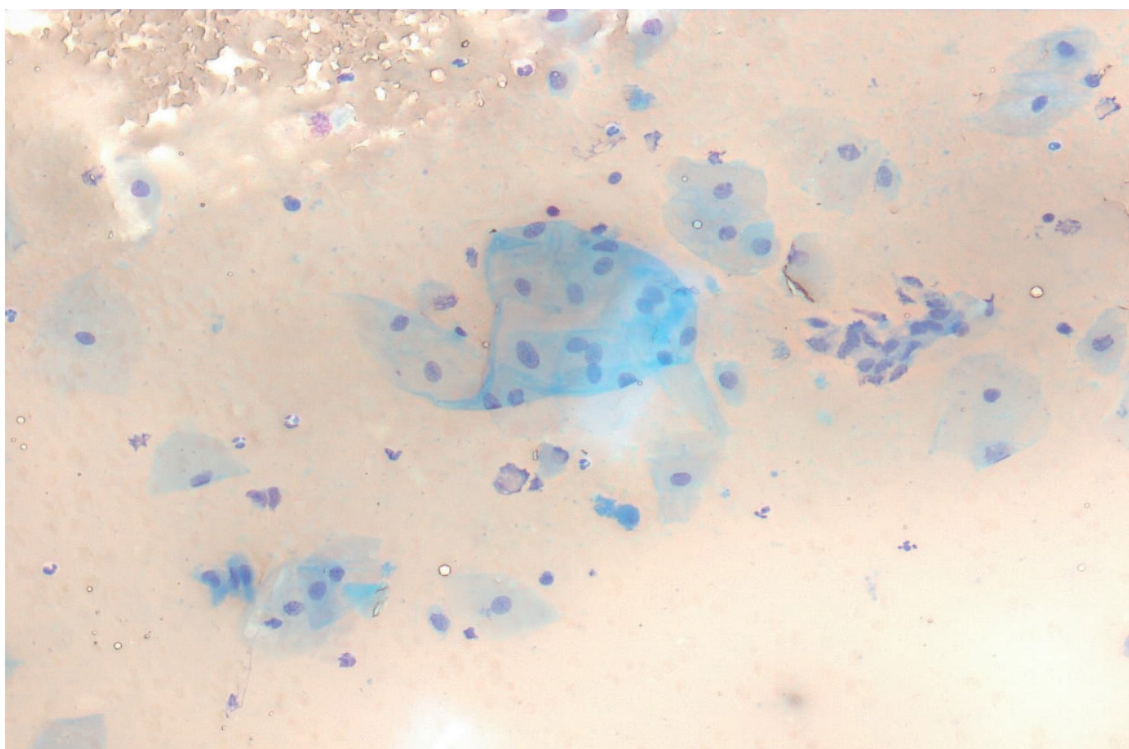


Рис. 2. Мазок-отпечаток геморроидального узла. Эндотелиоциты послойно разделены окрашиванием по Романовскому. Увеличение $\times 400$. Микроядер нет.

логических препаратов всегда сопровождалось фотографированием отдельно лежащих от основного ядра хроматиновых структур на цифровую камеру на увеличении $\times 1000$. Однако при пересмотре опытным цитологом этих автономных от ядра хроматиновых телец все спорные случаи были отнесены к артефактам.

В отличие от многочисленных экспериментальных исследований генотоксичности SARS-CoV-2, которые сообщают о негативном воздействии вируса SARS-CoV-2 на геномы соматических клеток человека [8–16], наши данные совершенно противоположны и оптимистичны.

Отдельно поставим акцент на том достижении, что в ходе выполнения проекта нам удалось собрать и зафиксировать банк биоматериалов, который мы назвали «ковидной эндотелиотеккой». Мы получили и сохранили для дальнейшего исследования более 1000 препаратов (фиксированные цитологические препараты и биоптаты в формалине). Сохраненные образцы применимы для геномных и протеомных исследований новой коронавирусной инфекции. Банк сопровождается собранной базой данных по каждому пациенту со всеми сопутствующими заболеваниями, датами начала заболевания, тяжестью, схемами лечения и вариантами штаммов SARS-CoV-2 и т.д.

Следующим проектом, в котором будет использована наша «ковидная эндотелиотекка», станет проверка гипотезы об экспрессии в эндотелии факторов врождённого противовирусного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2. Одним из ключевых интерактивных белков, участвующим во внутриклеточных молекулярных взаимодействиях с вирусом SARS-CoV-2, является гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A2B1 – hnRNPA2B1. Как выяснили Цзо и соавторы в 2023 году, активированный hnRNPA2B1 препятствует репликации SARS-CoV-2. Активированный hnRNPA2B1 перемещается в цитоплазму, где инициирует путь TBK1-IRF3, приводя к продукции интерферона с противовирусной активностью. Таким образом, становится очевидным, что у клеток есть свои внутренние ресурсы защиты от вируса (SARS-CoV-2 omicron) [17]. Результаты иммуноцитохимических исследований hnRNPA2B1 в эндотелиоцитах в серии цитологических препаратов и гистологических срезов в собранной нами и описанной в настоящей статье «ковидной эндотелиотекки» готовятся к публикации.

Заключение

Получен банк биоптатов в период пандемии – «ковидная эндотелиотекка», которую использовали для проверки гипотезы.

Выдвинутая гипотеза об индукции вирусом SARS-CoV-2 нестабильности генома в эндотелии у пациентов, переболевших COVID-19 не подтвердилась ($p > 0,05$). По-видимому, ожидаемое влияние SARS-CoV-2 на системную эндотелиопатию (вне лёгких и сердца) при

COVID-19 обратимо, и типовые патофизиологические реакции, обуславливающие «долгий ковид», переоцениваются.

Авторский вклад

Лубинец Н.С. – разработка методики, сбор и анализ данных, микрокопирование, написание текста статьи; Юсупов А.В. – микрокопирование; Кравцов В.Ю. – научное руководство, проверка результатов, редактирование текста статьи.

Список литературы

1. Dacus D., Stancic S., Pollina S.R., Rifrogiate E., Palinski R., Wallace N.A. Beta Human Papillomavirus 8E6 Induces Micronucleus Formation and Promotes Chromothripsis. *J. Virol.* 2022; 96(19): e0101522. DOI: 10.1128/jvi.01015-22
2. Li J.S.Z., Abbasi A., Kim D.H., Lippman S.M., Alexandrov L.B., Cleveland D.W. Chromosomal fragile site breakage by EBV-encoded EBNA1 at clustered repeats. *Nature.* 2023; 616(7957): 504–509. DOI: 10.1038/s41586-023-05923-x
3. Grand R.J. SARS-CoV-2 and the DNA damage response. *J. Gen. Virol.* 2023; 104(11). DOI: 10.1099/jgv.0.001918
4. Кравцов В.Ю., Лубинец Н.С., Протченко М.А., Коханенко Н.Ю. *Способ получения эндотелиальных клеток человека.* Патент RU 2022108179A. 28.09.2023. Бюл. №28.
5. Terradas M., Martín M., Genescà A. Impaired nuclear functions in micronuclei results in genome instability and chromothripsis. *Arch. Toxicol.* 2016; 90(11): 2657–2667. DOI: 10.1007/s00204-016-1818-4
6. Terradas M., Martín M., Genescà A. Detection of Impaired DNA Replication and Repair in Micronuclei as Indicators of Genomic Instability and Chromothripsis. *Methods Mol. Biol.* 2018; 1769: 197–208. DOI: 10.1007/978-1-4939-7780-2_13
7. Sommer S., Buraczewska I., Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(4): 1534. DOI: 10.3390/ijms21041534
8. Mekawy A.S., Alaswad Z., Ibrahim A.A., Mohamed A.A., AlOkda A., Elserafy M. The consequences of viral infection on host DNA damage response: a focus on SARS-CoVs. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2022; 20(1): 104. DOI: 10.1186/s43141-022-00388-3
9. Gonçalves S.O., Luz T.M.D., Silva A.M., de Souza S.S., Montalvão M.F., Guimarães A.T.B., Ahmed M.A.I., Araújo A.P.D.C., Karthi S., Malafaia G. Can spike fragments of SARS-CoV-2 induce genomic instability and DNA damage in the guppy, *Poecilia reticulata*? An unexpected effect of the COVID-19 pandemic. *Sci. Total Environ.* 2022; 825: 153988. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.153988
10. Jiang H., Mei YF. SARS-CoV-2 Spike Impairs DNA Damage Repair and Inhibits V(D)J Recombination *In Vitro.* *Viruses.* 2021; 13(10): 2056. DOI: 10.3390/v13102056 (Retraction published: *Viruses.* 2022; 14(5): 14(5): 1011. DOI: 10.3390/v14051011)
11. Lorente L., Martín M.M., González-Rivero A.F., Pérez-Cejas A., Cáceres J.J., Perez A., Ramos-Gómez L., Solé-Violán J., Marcos Y Ramos J.A., Ojeda N., Jiménez A. DNA and RNA Oxidative Damage and Mortality of Patients With COVID-19. *Am. J. Med. Sci.* 2021; 361(5): 585–590. DOI: 10.1016/j.amjms.2021.02.012
12. Mihaljevic O., Zivancevic-Simonovic S., Cupurdija V., Marinkovic M., Tubic Vukajlovic J., Markovic A., Stanojevic-Pirkovic M., Milesevic-Djordjevic O. DNA damage in peripheral blood lymphocytes of severely ill COVID-19 patients in relation to inflammatory markers and parameters of hemostasis. *Mutagenesis.* 2022; 37(3–4): 203–212. DOI: 10.1093/mutage/geac011
13. Pinto T.G., Alpire M.E.S., Ribeiro D.A. Cytogenetic Biomonitoring in Buccal Mucosa Cells of COVID-19 Patients: Preliminary Findings. *In Vivo.* 2021; 35(6): 3495–3499. DOI: 10.21873/invivo.12651
14. Ren H., Ma C., Peng H., Zhang B., Zhou L., Su Y., Gao X., Huang H. Micronucleus production, activation of DNA damage response and eGAS-STING signaling in syncytia induced by SARS-CoV-2 infection. *Biol. Direct.* 2021; 16(1): 20. DOI: 10.1186/s13062-021-00305-7
15. Victor J., Deutsch J., Whitaker A., Lamkin E.N., March A., Zhou P., Botten J. W., Chatterjee N. SARS-CoV-2 triggers DNA damage

- response in Vero E6 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021; 579: 141–145. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.09.024
16. Pánico P, Ostrosky-Wegman P, Salazar AM. The potential role of COVID-19 in the induction of DNA damage. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2022; 789: 108411. DOI: 10.1016/j.mrrrev.2022.108411
 17. Zuo D., Chen Y., Cai J.P., Yuan H.Y., Wu, J.Q., Yin Y., Xie J.W., Lin J.M., Luo J., Feng Y., Ge L.J., Zhou J., Quinn R.J., Zhao S.J., Tong, X., Jin D.Y., Yuan S., Dai S.X., Xu M. A hnRNPA2B1 agonist effectively inhibits HBV and SARS-CoV-2 omicron *in vivo*. *Protein Cell.* 2022; 14(1): 37–50. DOI:10.1093/procel/pwac027

References

1. Dacus D., Stancic S., Pollina S.R., Rifrogiate E., Palinski R., Wallace N.A. Beta Human Papillomavirus 8E6 Induces Micronucleus Formation and Promotes Chromothripsis. *J. Virol.* 2022; 96(19): e0101522. DOI: 10.1128/jvi.01015-22
2. Li J.S.Z., Abbasi A., Kim D.H., Lippman S.M., Alexandrov L.B., Cleveland D.W. Chromosomal fragile site breakage by EBV-encoded EBNA1 at clustered repeats. *Nature.* 2023; 616(7957): 504–509. DOI: 10.1038/s41586-023-05923-x
3. Grand R.J. SARS-CoV-2 and the DNA damage response. *J. Gen. Virol.* 2023 104(11). DOI: 10.1099/jgv.0.001918
4. Kravtsov V.Yu., Lubinets N.S., Protchenkov M.A., Kokhanenko N.Yu. [Method for obtaining human endothelial cells]. Patent 2022108179A. 28.09.2023. (in Russian)
5. Terradas M., Martín M., Genescà A. Impaired nuclear functions in micronuclei results in genome instability and chromothripsis. *Arch. Toxicol.* 2016; 90(11): 2657–2667. DOI: 10.1007/s00204-016-1818-4
6. Terradas M., Martín M., Genescà A. Detection of Impaired DNA Replication and Repair in Micronuclei as Indicators of Genomic Instability and Chromothripsis. *Methods Mol. Biol.* 2018; 1769: 197–208. DOI: 10.1007/978-1-4939-7780-2_13
7. Sommer S., Buraczewska I., Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(4): 1534. DOI: 10.3390/ijms21041534
8. Mekawy A.S., Alaswad Z., Ibrahim A.A., Mohamed A.A., AlOkda A., Elserafy M. The consequences of viral infection on host DNA damage response: a focus on SARS-CoVs. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2022; 20(1): 104. DOI: 10.1186/s43141-022-00388-3
9. Gonçalves S.O., Luz T.M.D., Silva A.M., de Souza S.S., Montalvão M.F., Guimarães A.T.B., Ahmed M.A.I., Araújo A.P.D.C., Karthi S., Malafaia G. Can spike fragments of SARS-CoV-2 induce genomic instability and DNA damage in the guppy, *Poecilia reticulata*? An unexpected effect of the COVID-19 pandemic. *Sci. Total Environ.* 2022; 825: 153988. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.153988
10. Jiang H, Mei YF. SARS-CoV-2 Spike Impairs DNA Damage Repair and Inhibits V(D)J Recombination *In Vitro*. *Viruses.* 2021; 13(10): 2056. DOI: 10.3390/v13102056 (Retraction published: *Viruses.* 2022; 14(5): 14(5): 1011. DOI: 10.3390/v14051011)
11. Lorente L., Martín M.M., González-Rivero A.F., Pérez-Cejas A., Cáceres J.J., Perez A., Ramos-Gómez L., Solé-Violán J., Marcos Y Ramos J.A., Ojeda N., Jiménez A. DNA and RNA Oxidative Damage and Mortality of Patients With COVID-19. *Am. J. Med. Sci.* 2021; 361(5): 585–590. DOI: 10.1016/j.amjms.2021.02.012
12. Mihaljevic O., Zivancevic-Simonovic S., Cupurdija V., Marinkovic M., Tubic Vukajlovic J., Markovic A., Stanojevic-Pirkovic M., Milesevic-Djordjevic O. DNA damage in peripheral blood lymphocytes of severely ill COVID-19 patients in relation to inflammatory markers and parameters of hemostasis. *Mutagenesis.* 2022; 37(3–4): 203–212. DOI: 10.1093/mutage/geac011
13. Pinto T.G., Alpire M.E.S., Ribeiro D.A. Cytogenetic Biomonitoring in Buccal Mucosa Cells of COVID-19 Patients: Preliminary Findings. *In Vivo.* 2021; 35(6): 3495–3499. DOI: 10.21873/invivo.12651
14. Ren H., Ma C., Peng H., Zhang B., Zhou L., Su Y., Gao X., Huang, H. Micronucleus production, activation of DNA damage response and cGAS-STING signaling in syncytia induced by SARS-CoV-2 infection. *Biol. Direct.* 2021; 16(1): 20. DOI: 10.1186/s13062-021-00305-7
15. Victor J., Deutsch J., Whitaker A., Lamkin E.N., March A., Zhou P., Botten J. W., Chatterjee N. SARS-CoV-2 triggers DNA damage response in Vero E6 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021; 579: 141–145. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.09.024
16. Pánico P, Ostrosky-Wegman P, Salazar AM. The potential role of COVID-19 in the induction of DNA damage. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2022; 789: 108411. DOI: 10.1016/j.mrrrev.2022.108411
17. Zuo D., Chen Y., Cai J.P., Yuan H.Y., Wu, J.Q., Yin Y., Xie J.W., Lin J.M., Luo J., Feng Y., Ge L.J., Zhou J., Quinn R.J., Zhao S.J., Tong, X., Jin D.Y., Yuan S., Dai S.X., Xu M. A hnRNPA2B1 agonist effectively inhibits HBV and SARS-CoV-2 omicron *in vivo*. *Protein Cell.* 2022; 14(1): 37–50. DOI:10.1093/procel/pwac027

Сведения об авторах:

Лубинец Наталья Сергеевна — аспирант кафедры факультетской хирургии имени профессора А.А. Русанова Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; младший научный сотрудник научно-образовательного центра инфохимии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики»; <https://orcid.org/0009-0002-2179-3436>

Юсупов Алексей Владиславович — курсант Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации; <https://orcid.org/0009-0006-0764-8725>

Кравцов Вячеслав Юрьевич — профессор, доктор биологических наук, ординарный профессор научно-образовательного центра инфохимии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики»; профессор кафедры нанобиотехнологий Санкт-Петербургского национально-исследовательского академического университета имени Ж.И. Алфёрова Российской академии наук; <https://orcid.org/0000-0003-3910-5160>