

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ТРАНСПОРТА ВИРУСНОГО МАТЕРИАЛА SARS-CoV-2 В НЕЙРОНАХ НЕОКОРТЕКСА СИРИЙСКИХ ХОМЯКОВ



С.В. Чепур¹, Н.М. Парамонова^{1,2}, И.А. Мясникова¹, Н.Н. Плужников¹, М.А. Тюнин¹,
Б.А. Каневский¹, Н.С. Ильинский¹

¹ ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Введение. С учетом опыта пандемии новой коронавирусной инфекции COVID-19 в настоящее время значительно возросла актуальность исследований клеточных процессов сборки и транспорта вируса SARS-CoV-2 для обоснования выбора точек фармакологического воздействия. Прослеженная широкая распространенность вируса SARS-CoV-2 в организме и его способность проникать через гематоэнцефалический барьер, определяет возможность морфологической оценки процессов его жизненного цикла в нейронах неокортекса с использованием метода электронной микроскопии, что и стало целью настоящей работы. **Материалы и методы.** Вирус SARS-CoV-2 получали от больных, накапливали на культуре клеток Vero(B). Электронномикроскопическое исследование (ЭМИ) транспорта вирусных частиц проводили на самцах сирийских хомяков. Животным интраназально вводили по 26 мкл культуры вируса в количестве 4×10^4 ТЦД₅₀/мл. Эвтаназия животных проводилась на 3, 7 и 28 сутки после заражения. Извлеченный мозг подготавливали для ЭМИ согласно ранее описанным в литературе методикам. Результаты регистрировали с помощью электронного микроскопа FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN. **Результаты.** При ЭМИ прослежены морфологические эквиваленты вариантов транспорта вируса в нейронах неокортекса в динамике инфекционного процесса у сирийских хомяков. После синтеза белки вирусной мембраны включаются в транспортные везикулы в терминальных канальцах эндоплазматического ретикулума (ЭР) и поступают в промежуточный компартмент (ПК) — совокупность гладкостенных мембранных везикул между эндоплазматическим ретикуломом (ЭР) и аппаратом Гольджи (АГ). В первые 3-е суток после заражения вирусные копии включаются в АГ в транспортных везикулах, сформированных мембранами ПК. Из-за больших размеров вирусные частицы ограничены расширенными концами подвижных цистерн АГ. Морфологически выявлена деструкция мембран АГ на 7-е сутки инфекционного процесса, что свидетельствует о взаимодействии везикул ПК с сохранившимися мембранными элементами АГ или о реализации их самостоятельной транспортной функции по доставке вируса к периферии клетки и далее в межклеточное пространство. В отростках нейронов прослежен транспорт зрелых вирусных частиц, ассоциированных с элементами цитоскелета, что не выявляли в других локусах персистенции вируса. **Заключение.** По результатам полученных данных можно сформировать представление о накопительном значении для прогрессии и пер-

Адрес для переписки:

Мясникова Ирина Анатольевна
195043, Россия, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, 4,
Государственный научноисследовательский испытательный
институт военной медицины МО РФ.
Тел.: 8 (921) 788-41-75.
E-mail: ropsha.home@rambler.ru

Contacts:

Irina A. Myasnikova
195043, Russian Federation, St. Petersburg, Lesoparkovaya str., 4,
State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine
of Defense Ministry of the Russian Federation.
Phone: +7 (921) 788-41-75.
E-mail: ropsha.home@rambler.ru

Для цитирования:

Чепур С.В., Парамонова Н.М., Мясникова И.А., Плужников Н.Н.,
Тюнин М.А., Каневский Б.А., Ильинский Н.С. Исследование
особенностей транспорта вирусного материала SARS-CoV-2
в нейронах неокортекса сирийских хомяков // Инфекция и иммунитет.
2024. Т. 14, № 1. С. 24–34. doi: 10.15789/2220-7619-ISV-16270

Citation:

Chepur S.V., Paramonova N.M., Myasnikova I.A., Pluzhnikov N.N.,
Tyunin M.A., Kanevsky B.A., Ilyinsky N.S. Investigating SARS-CoV-2 virion
material trafficking in syrian hamster neocortical neurons // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1,
pp. 24–34. doi: 10.15789/2220-7619-ISV-16270

систирования SARS-CoV-2-инфекции в кортикальных нейронах. Ранние признаки заражения нейрона представлены характерными изменениями ядер, гипертрофией ЭР и формированием «вирусных фабрик» на основе ЭР, ПК и АГ. Внутри нейрона происходит формирование вирусной биомассы, выход вириона из клетки в большей степени сопровождается ее гибелью, нежели при включении вируса в лизосомно-эндосомную систему.

Ключевые слова: коронавирус, аппарат Гольджи, промежуточный компартмент, эндосомно-лизосомная система, эндоплазматический ретикулум, нейроны.

INVESTIGATING SARS-CoV-2 VIRION MATERIAL TRAFFICKING IN SYRIAN HAMSTER NEOCORTECAL NEURONS

Chepur S.V.^a, Paramonova N.M.^{a,b}, Myasnikova I.A.^a, Pluzhnikov N.N.^a, Tyunin M.A.^a, Kanevsky B.A.^a, Ilyinsky N.S.^a

^a State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

^b Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Introduction. Taking into account the experience on the new coronavirus infection COVID-19 pandemic, the relevance of studies assessing the cellular processes of SARS-CoV-2 virus assembly and transport to justify the choice of pharmacological action points has now markedly increased. The study was aimed at analyzing morphologically assessed events of SARS-CoV-2 life cycle in neocortical neurons using electron microscopy based on its traced wide prevalence in vivo and ability to penetrate the blood-brain barrier accounts. **Materials and methods.** Patient-derived SARS-CoV-2 virus was obtained and accumulated in Vero(B) cell culture. An electron microscopy study (EMR) of the viral particle transport was carried out in male Syrian hamsters. Animals were inoculated intranasally with 26 µl of virus culture in an amount of 4×10^4 TCID₅₀/ml. Animals were euthanized on day 3, 7, and 28 post-infection. The extracted brain was prepared for EMR according to methods previously described in the literature. The results were recorded using an FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN electron microscope. **Results.** Using EMR, the morphological equivalents of virus transport variants in neocortical neurons were traced dynamically during infectious process in Syrian hamsters. After synthesis, viral membrane proteins are included in transport vesicles in the endoplasmic reticulum (ER) terminal tubules and enter the intermediate compartment (IC), a collection of smooth-walled membrane vesicles between the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi apparatus (AG). In the first 3 days post-infection, viral copies are included in the Ag in PC membrane-formed transport vesicles. Due to the large size, viral particles are restricted to the expanded ends of the mobile AG tanks. Morphologically, destruction of AG membranes was revealed on day 7 post-infection, which indicates an interaction between PC vesicles and preserved AG membrane elements or the implementation of their independent transport function to deliver SARS-CoV-2 virus to the cell periphery and further into the intercellular space. In the neuronal processes, the transport of mature SARS-CoV-2 viral particles associated with cytoskeletal elements was observed, which was not detected in other loci of virus persistence. **Conclusion.** Based on data obtained, it is possible to hypothesize about a cumulative importance for progression and persistence of SARS-CoV-2 infection in cortical neurons. Early signs of neuron infection are represented by characteristic changes in the nuclei, ER hypertrophy and formation of “viral factories” based on the ER, PC and AG. The formation of viral biomass occurs inside neurons; virion exit from target cells is more accompanied by cell death rather than if a virus becomes incorporated in the lysosomal-endosomal system.

Key words: coronavirus, Golgi apparatus, intermediate compartment, endosome-lysosome's system, endoplasmic reticulum, neuron.

Введение

Пандемическая сущность SARS-CoV-2 в значительной степени определила акценты исследования биологии вируса, сместив их в плоскость профилактики и терапии заболевания, разработку мер по прерыванию эпидемического процесса. Вместе с тем вирус SARS-CoV-2 кроме патологической сущности представляет инструмент для исследования функций клеточных органелл и транспортных систем клетки. Это подтверждает широкая распространенность вируса в организме, и его доказанная способность проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), вызывая повреждения нейронов [4].

Большинство вновь образованных вирусных частиц в нервных клетках движется по кон-

ститутивному секреторному пути через аппарат Гольджи (АГ) к плазматической мембране. Вместе с тем необратимые изменения структуры цистерн АГ определяют необходимость изучения путей секреции, альтернативных конститутивному. Некоторые вирусы проникают в просвет эндоплазматического ретикулума (ЭР), везикулы промежуточного компартмента (ПК) или остаются в АГ [17].

Считают, что сборка коронавирусов возможна в везикулах ПК [20], в большей степени в его везикулярно-трубчатых скоплениях — совокупности небольших везикул и канальцев, локализованных между ЭР и АГ [10]. В них происходит декорирование вирусных белков посредством О-гликозилирования, в частности N-ацетилгалактозамином [22]. В везикулах

ПК присутствуют и другие ферментные системы, в частности р58/ERGIC-53 [12] и ГТФазы Rab1 и Rab2 [13, 17]. Коронавирусы, использующие ПК для сборки вирионов, принадлежат к разным родам (α -, β - и γ -CoV) [12]. Это свойство описано и для возбудителей тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) и ближневосточного респираторного синдрома (MERS) [19].

Плеоморфные вирионы коронавируса имеют значительную размерную гетерогенность, от 100 до 160 нм в диаметре [17]. Одноцепочечная вирусная РНК комплексируется с несколькими копиями N-белка, после чего рибонуклеопротеин сворачивается, образуя спиральный нуклеокапсид [11]. S-белок представляет собой большой тримерный гликопротеин. Белок подвергается значительной терминальной модификации ферментами АГ с N-декорированием различными гликанами [9, 15]. М-белок считают основным белковым компонентом вирусной оболочки, придающим вириону его форму [5]. Он по-разному модифицируется N- или O-связанными сахарами. E-белки оболочки представлены небольшими однопрофильными интегральными мембранными протеинами, которые обычно модифицированы пальмитилированием. Они присутствуют в небольших количествах в вирусных частицах, но играют существенную роль в сборке вирионов [18], образуя пентамерический ионный канал (виropорин), необходимый для высвобождения вирусов. Учитывая компартиментализацию сборки коронавируса в везикулярно-трубчатых скоплениях ПК, именно E-белок обеспечивает полостное изменение pH [25] с саккулярным расширением везикул, необходимым для накопления вирусных частиц [23].

Саккулярные домены ПК, где происходит сборка вирионов, могут обособляться для переноса крупногабаритных вирусных частиц в центральную область АГ или в мегавезикулы [24], посредством которых возможен транспорт вируса по периферии пластинчатого комплекса, а также в элементы самостоятельных секреторных путей в обход АГ [8] при разрушении его цистерн. Элементы ПК, определяемые по соответствующей ферментативной активности, прослежены в перицентросомальной области и на периферии клетки [16], и они были пространственно связаны с рециркулируемыми эндосомами. Таким образом, при разрушении АГ высвобождение вирионов не зависит от классического секреторного пути и может происходить через эндосомно-лизосомную систему [6].

Сформированные теоретические представления важны для выбора точек фармакологического воздействия на узловы моменты вирусной

продукции и анализа морфологических наблюдений различной локализации вирусных частиц в нейронах неокортекса сирийских хомяков.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование проводили на 24 самцах сирийских хомяков в возрасте 4–6 недель массой тела 80–100 г, полученных из питомника ЗАО «НПО «Дом фармации» (Санкт-Петербург). Животных содержали в стандартных условиях вивария.

Выделение и накопление изолятов вируса. Образцы носоглоточных смывов, полученные от больных COVID-19, осветляли центрифугированием, фильтровали через шприцевую насадку Jet Biofil с диаметром пор 0,22 мкм (Biofil, Китай) и высевали на монослой культуры клеток Vero(B), выращенных в культуральных флаконах площадью поверхности 25 см². Инкубацию инфицированных культур клеток проводили при температуре 37°C в течение 5 суток или до появления цитопатического действия (ЦПД) вирусов, согласно ранее описанным в литературе методикам [21, 26]. Наличие вируса в культуральной жидкости подтверждали, используя набор реагентов Detection Kit For 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) RNA (PCR-Fluorescence Probing) (DAAN GENE LTD, Sun Yat-Sen University, Китай). На этой же клеточной линии определяли тканевую цитопатическую дозу вируса (ТЦД₅₀/мл) по методу Рида и Менча [14].

Для инфицирования животных использовали штамм hCoV-19/StPetersburg-SC-2-05/2022. Штамм был выделен сотрудниками ФГБУ ГНИИИ ВМ МО РФ в 2022 г. на территории Санкт-Петербурга от пациента больного COVID-19. Данный штамм депонирован в коллекцию вирусов ФГБУ ГНИИИ ВМ МО РФ.

Были сформированы контрольная и опытные группы животных. Массу животных регистрировали до заражения и ежедневно в течение последующих 28 суток. Перед заражением животных наркотизировали раствором «Золетил 100» в дозе 40 мг/кг внутривенно. Далее механическим дозатором интраназально каждому хомяку опытной группы вводили по 26 мкл культуры вируса, содержащей SARS-CoV-2 в количестве 4×10^4 ТЦД₅₀/мл [2]. Эвтаназию животных на 3, 7 или 28 сутки после заражения проводили передозировкой общего анестетика (растворы «Ксила» 20 мг/мл и «Золетил 100» 50 мг/мл, соотношение 1:1) в объеме 1 мл на 1 кг массы тела внутримышечно.

Выделение РНК вируса из образцов головного мозга сирийских хомяков. Ткань головного мозга гомогенизировали (FastPrep-24 5G, MP Biomedicals), в десятикратном объеме стериль-

ного PBS и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученную надосадочную жидкость использовали для выделения РНК. Выделение РНК из 10% суспензии образцов тканей головного мозга сирийских хомячков, проводили с помощью коммерческого набора «AllPrepDNA/RNA/miRNAUniversalKit» (Qiagen, Германия). Все этапы экстракции РНК выполняли согласно инструкции производителя.

Для определения вируса SARS-CoV-2 в тканях головного мозга зараженных животных использовали набор реагентов Detection Kit For 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) RNA (PCR-Fluorescence Probing) (DAAN GENE LTD, Sun Yat-Sen University, Китай).

Для электронно-микроскопических исследований (ЭМИ) извлеченный мозг рассекали на фронтальные срезы толщиной в 1–1,5 мм и префиксировали в охлажденной до 4°C смеси 4% параформальдегида и 0,5% глутарового альдегида, приготовленной на 0,1 М какодилатном буфере (рН 7,2–7,4). Выделенные кусоч-

ки сенсомоторного отдела неокортекса через 1,5–2 ч дофиксировали 1% раствором четырехоксида осмия (все реактивы — Sigma-Aldrich, Германия). Обезвоживали материал в растворах этилового спирта восходящей концентрации и абсолютного ацетона. В процессе дегидратации контрастировали ткань в кусочках 3,5% уранилацетатом на 70° этаноле. Пропитку и заливку с ориентацией кусочков под лупой проводили смесью аралдитов (Fluka, Швейцария). Полимеризацию осуществляли в термостате при 37°C и 60°C в течение трех суток [1].

Ультратонкие срезы 50–60 нм готовили на ультратоме LKB-III (LKB, Швеция). Регистрацию изменений структуры тканей осуществляли на электронном микроскопе FEI Tecnai G2 Spirtit BioTWIN (FEI Company, Нидерланды) при ускоряющем напряжении 80 кВ, предоставленном ЦКП ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН.

Сравнение проводили с аналогичными характеристиками животных группы виварного контроля.

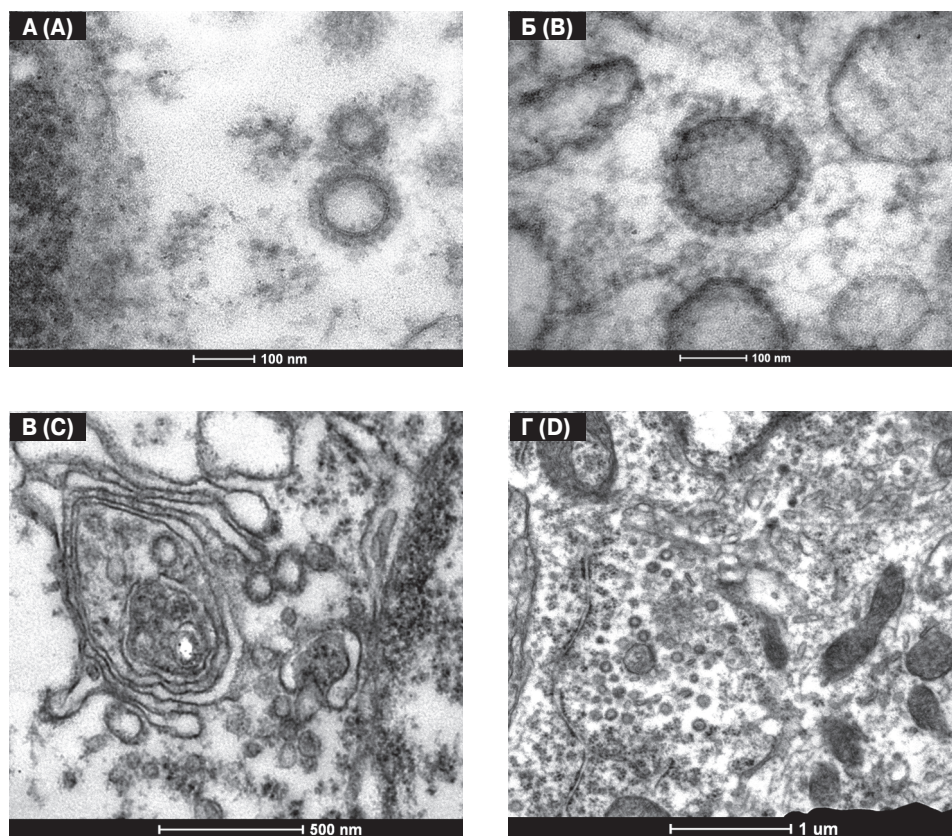


Рисунок 1. Свободные соразмерные коронавирусу (80–100 нм) опушенные белками везикулы в отростках (А, Б) и в перикарионах (В–Г) нейронов, часто вблизи измененных полостей ЭР или АГ, после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально). Электроннограммы. Увеличение: А — 105 000, Б — 135 000, В — 43 000, Г — 16 500

Figure 1. Free SARS-CoV-2-sized (80–100 nm) protein-pubescent vesicles in the processes (A, B) and neuronal perikarya (C–D), often near altered cavities of the ER or AG, after infection with SARS-CoV-2 4×10^4 TCD₅₀/ml (26 μ l/individual intranasally). Electronograms. Scale: A — 105 000, B — 135 000, C — 43 000, D — 16 500

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 Комитетом по этике биомедицинских исследований организации (Протокол № 21 от 23.11.2020).

Результаты

Бесспорно, самым противоречивым аспектом существующих теорий пролиферации SARS-CoV-2 в нейронах стало наличие в цитозоле перикариона и даже в отростках соразмерных вирусу везикул, заметно превышающих размеры клатриновых пузырьков (рис. 1). Свободные вирусоподобные везикулы выявлены в цитоплазме тел и отростков нейронов в ассоциации с элементами цитоскелета: нейрофиламентами и микротрубочками, ответственны-

ми за направление внутриклеточного транспорта, активное движение отростков, кинетику формы нейрона.

При анализе пути и способа проникновения вирусов в нейроны обращали внимание на процессы пиноцитоза. В этом случае вирусные частицы окружены мембранной оболочкой пиноцитозных везикул, на поверхности которых также отмечали преципитацию белка, однако более крупно-глыбчатую по сравнению со структурой вирусной «короны» (рис. 2).

Фигуры пиноцитоза, прослеженные в одном и том же волокне на протяжении, позволяют считать, что посредством пиноцитоза/экзоцитоза вирусы могут проходить транзитом через отросток, не вызывая изменений его структуры. Это утверждение справедливо и для ГЭБ (рис. 2В).

С точки зрения репликации вируса заражение нейрона SARS-CoV-2 приводит к характерным изменениям структуры ядра, суть которых

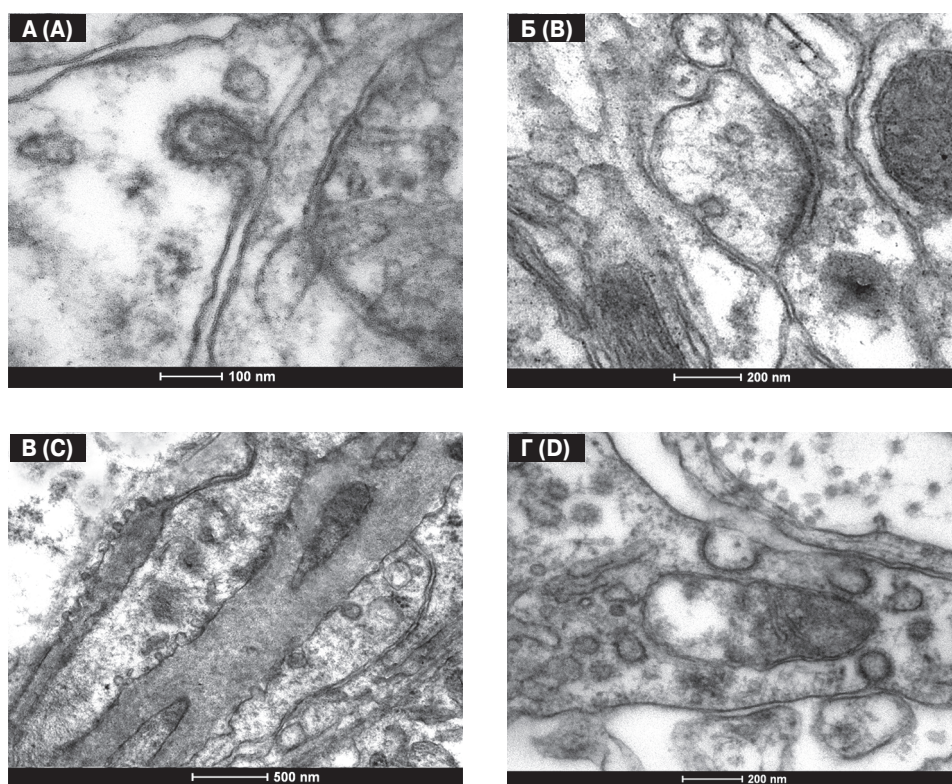


Рисунок 2. Варианты пиноцитоза соразмерных вирусам «опушенных» частиц в нейропиле неокортекса после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально). Формирование декорированных белком пиноцитозных везикул (А–Б), содержащих окруженный мембраной материал межклеточного пространства. Неспецифические процессы пиноцитоза и экзоцитоза в том числе вирусного материала структур сосудистых стенок (В) и поверхностных клеток мозга (Г). Электроннограммы. Увеличение: А – 105 000, Б – 60 000, В – 26 500, Г – 60 000

Figure 2. Pinocytosis variants for “pubescent” particles commensurate with viruses in neocortical neuropil after infection with SARS-CoV-2 4×10^4 TCD₅₀/ml (26 μ l/individual intranasally). Formation of protein-decorated pinocytotic vesicles (A–B), containing membrane-surrounded material of the intercellular space. Nonspecific processes of pinocytosis and exocytosis, including viral material of the structures of vascular walls (C) and cortical surface cells (D). Electronograms. Scale: A – 105 000, B – 60 000, C – 26 500, D – 60 000

сводится к увеличению удельной поверхности и накоплению рибонуклеопротеинов, формирующих множественные ядрышки (рис. 3). Начиная с 3 суток после заражения животных культурой клеток с накопленной вирусной массой, практически в каждом ядре прослеживали ядрышковый аппарат, поверхность нуклеолемы резко увеличивалась вследствие чего округлое в норме ядро нейрона приобретало лопастную форму со множеством узураций расширенного перинуклеарного пространства (рис. 3Б). Структура карио- и цитоплазмы в значительной степени была сохранена, что позволяло относить изменения ядер к реактивным, но сопряженным с процессом пролиферации вируса изменениям.

Вследствие насыщения рибосомами поверхность мембран ЭР приобретала подчеркнутую контрастность, неравномерно расширенные каналцы прослеживали на значительном протяжении, начиная с соустья с перинуклеар-

ным пространством (рис. 3Г). «Ампульные» расширения каналцев ЭР с преципитацией белка на их цитоплазматической поверхности по сути иллюстрируют отпочкование вирусных частиц определенной зрелости (рис. 4). Нарботанные компоненты вирусного генома поступают из ядра в каналцы шероховатого ЭР по коммуникациям, связывающим их с перинуклеарным пространством. Определяется нерегулярное слипание мембран расширенных участков ЭР и заполнение формирующихся везикул слабоконтрастным гомогенным содержимым (рис. 4А). Прослежено отшнуровывание «опушенных» везикул, соразмерных вирионам, на границах таких мембранных конгломератов и локализация свободных вирусных частиц вокруг них (рис. 4Б), то есть формирование вирусных «фабрик» на основе структурных и функциональных изменений ЭР.

Рассматривая варианты морфологических проявлений вирусной прогрессии, обращали

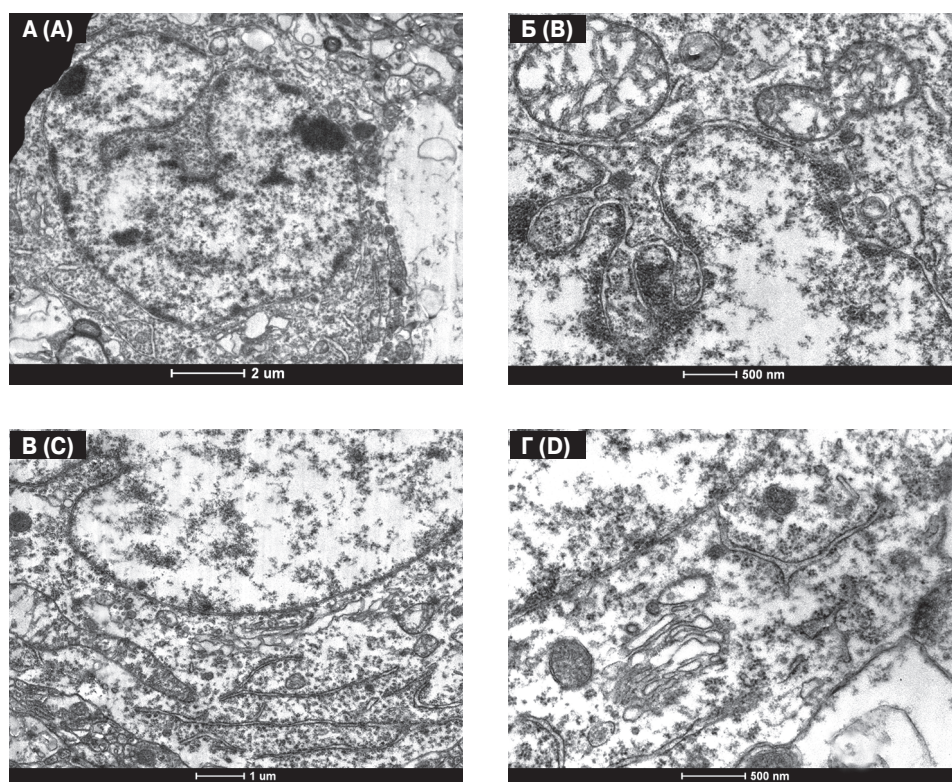


Рисунок 3. Ультраструктура нейронов после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально). В кариоплазме нейронов прослежены многочисленные ядрышки, локализующиеся примембранно; контур ядер часто изменен с округлого на лопастной (А–В) с расширением перинуклеарного пространства (Б) и скоплением рибосом в прилежащей к ядру цитолемме (А–В). Канальцы ЭР нередко соединены с ядерной мембраной, цистерны АГ набухшие и слипаются (Г). Электроннограммы. Увеличение: А – 6000, Б – 20 500, В – 9900, Г – 26 500

Figure 3. Neuronal ultrastructure after infection with SARS-CoV-2 4×10^4 TCD₅₀/ml (26 µl/individual, intranasally inoculated). In neuronal karyoplasm, numerous nucleoli were traced, localized near the membrane; nuclear contour is often changed from round to lobed (A–C) with expanded perinuclear space (B) and accumulated ribosomes in the cytolemma adjacent to the nucleus (A–C). ER tubules are often connected to the nuclear membrane, AG cisterns are swollen and stick together (D). Electronograms. Scale: A – 6000, B – 20 500, C – 9900, D – 26 500

внимание на характерные изменения АГ во всех клеточных элементах неокортекса сирийских хомячков, прежде всего в нейронах (рис. 5). Число комплексов и площадь, занимаемая ими, в профиле нейронального среза вследствие их гиперплазии возрастали с течением инфекционного процесса. Если к 3 суткам после заражения в каждом 3–4 нейроне обнаруживали разрастание АГ и пролиферацию вируса, то к 7 суткам это явление носило тотальный характер. Практически в каждом сохранившемся нейроне на фоне гипертрофии цитоплазматических органелл преобладали измененные комплексы АГ. Нередко отдельные их элементы распространялись глубоко в отростки нервных клеток.

Деформации в большей степени подвержены пластинчатые цистерны АГ. Они нерегулярно расширялись в размерах, демонстрируя

пропульсивную активность, характерная цис-/транс-полярность АГ нивелировалась (рис. 5А, Б, В). Значительное количество краевых цистерн увеличено в размерах. Прослеживали слипание мембран пластинчатого комплекса и заполнение его матрикса гомогенным содержанием, которое с учетом вирус-пролиферативной активности измененных АГ, по-видимому, представляет собой вирусные белки (рис. 5Г, Д, Е). Регистрировали отшнурование от модифицированных АГ везикул, соразмерных вирусным частицам, декорированных осмиофильными белками (рис. 5А–Е). Несмотря на варианты функционирования АГ при формировании вирусосодержащих везикул [17], следует признать, что к 7 суткам после инфицирования практически во всех зараженных нейронах АГ утрачивает пластинчатую структуру и функционирует

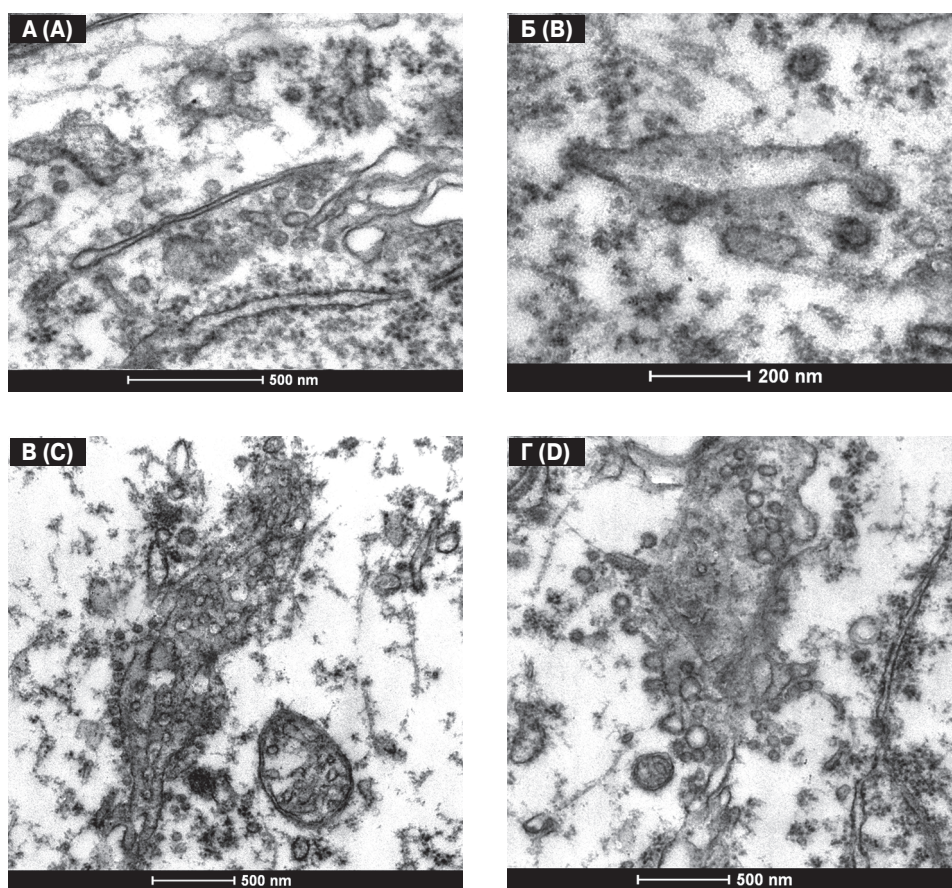


Рисунок 4. Формирование вирусных «фабрик» на основании деформационных изменений структур ЭР после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально). Расширение концевых участков тонких канальцев ЭР (А), с «опушением» вирусным белком на «ампульных» расширениях (Б). Гипертрофия и слипание расширенных канальцев ЭР (В). Слияние мембран ЭР с образованием вирусных «фабрик» и отпочкованием вирусных частиц (Г). Электроннограммы. Увеличение: А — 43 000, Б — 60 000, В и Г — 26 500

Figure 4. Formation of viral “factories” based on deformation changes in ER structures after infection with SARS-CoV-2 4×10^4 TCD₅₀/ml (26 μ l/individual intranasally). Expansion of the terminal sections of the ER thin tubules (A), with “pubescence” of the viral protein on the “ampullary” extensions (B). Hypertrophy and adhesion of dilated ER tubules (C). Fusion of ER membranes resulting in viral “factories” and viral particle budding (D). Electronograms. Scale: A — 43 000, B — 60 000, C and D — 26 500

как «вирусная фабрика». Причем в состав вириона включаются не только синтезированные вирусные белки, претерпевающие посттрансляционные модификации, но и экстрадированные фосфолипидные фрагменты мембран АГ, а также ЭР и ПК. Мембраны в измененном гиперадгезивном состоянии, по-видимому, служат матрицей для интегрирования белков вирусной частицы, обеспечивая за счет поверхностно-активных свойств их размер и коронавидное гликозилирование S-белка. Вирусные частицы, формируемые модифицированными АГ и ЭР, отшнуровываются в цитозоль, в связи с чем можно считать, что свободные формы вирусных частиц представляют вариант репродукции вируса с его накоплением в цитоплазме перикариона и отростков нервных клеток. Выход вирусов, соответственно, может произойти при гибели клетки по мере накопления критических патологических изменений.

Интеграция в вирион компонентов клеточных мембран нервных клеток может способствовать формированию аутоиммунных конфликтов, свойственных клинике лонг-ковид.

Отдельный интерес представляли мультивезикулярные тельца (МВТ), так как эта форма мембранных структур была ранее описана применительно к внутриклеточному транспорту вирусных частиц [27]. Собственно, внимание привлекали не все МВТ, а только те, которые содержали соразмерные вирусам «опушенные» везикулы (рис. 6). Прослеженные МВТ могли представлять собой мультивезикулярную глобулу как транспортную форму, сформированную либо мембраной АГ, ЭР или ПК, либо фрагментом цистерн АГ или ПК, а также, с гораздо меньшей вероятностью, являться продуктом эндоцитоза. Следует отметить, что в нейронах неокортекса МВТ были сравнительно редкими, выявлялись в перикарионе и в иници-

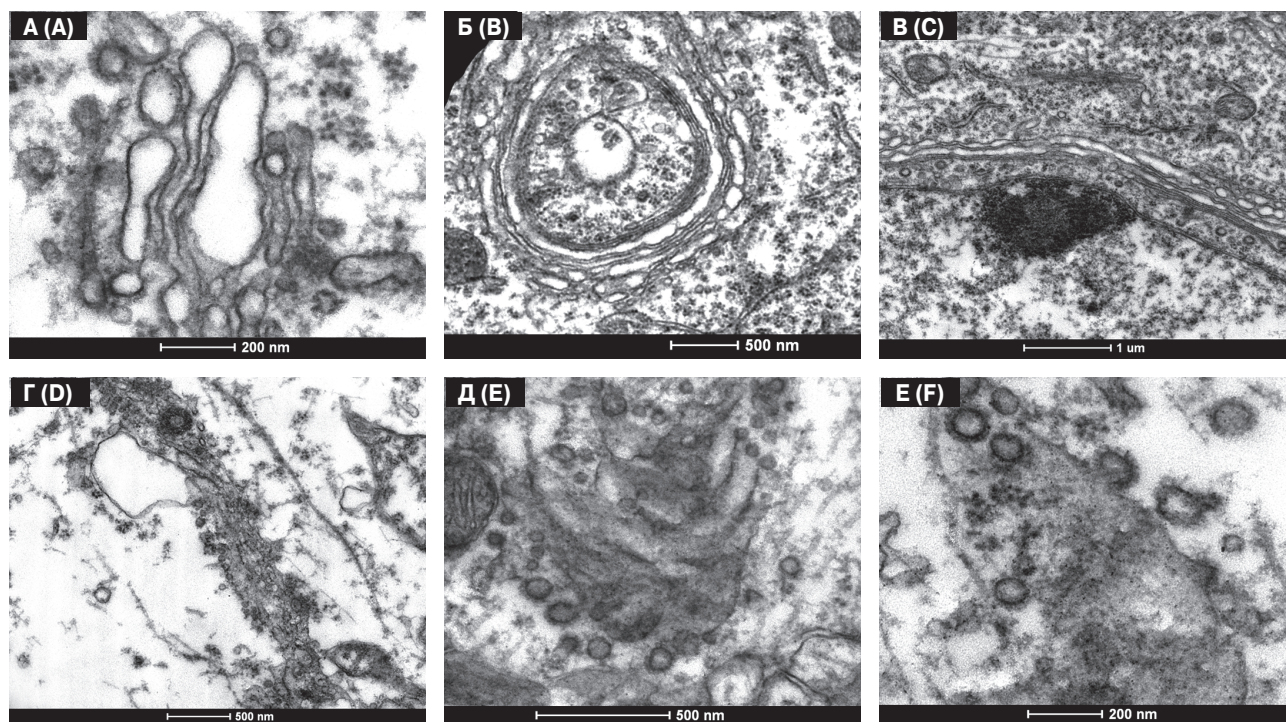


Рисунок 5. Изменения АГ после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально). Неравномерное набухание цистерн АГ (А), кольцеобразный АГ с потерей цис-/транс-полярности (Б); гипертрофия АГ в перикарионной области нейрона (В); модифицированный АГ простирается внутри дендрита на отдаленном расстоянии от сомы (Г); слипание разбухших цистерн АГ (Б), образовавшийся конгломерат вирусной фабрики (Е) тотальная пролиферация соразмерных вирусу CoV «опушенных» везикул на основе реорганизаций пластинчатого комплекса (А–Е). Электроннограммы. Увеличение: А – 60 000, Б – 20 500, В – 16 500, Г – 26 500, Д – 43 000, Е – 60 000

Figure 5. Changes in AG after infection with SARS-CoV-2 4×10^4 TCD₅₀/ml (26 μ l/individual intranasally). Uneven swelling of AG cisterns (A), ring-shaped AG with loss of cis/trans polarity (B); AG hypertrophy in neuronal perikarya (C); modified AG extends inside the dendrite distantly from the soma (D); adhesion of swollen AG tanks (B), the resulting conglomerate of the viral factory (F) total proliferation of “pubescent” vesicles commensurate with the CoV virus based on lamellar complex reorganizations (A–F). Electronograms. Scale: A – 60 000, B – 20 500, C – 16 500, D – 26 500, E – 43 000, F – 60 000

альных отростках клеток. Количество везикул, идентифицированных как вирусные частицы, в них заметно уступало свободным формам, отшнурованным от АГ или ЭР.

Обсуждение

Соразмерные вирусу везикулы в отростках и в телах нейронов расценены нами как вирусные частицы в силу отсутствия таковых у незараженных животных. Они располагались свободно, что вызвало ряд требующих уточнения вопросов. Почему вирусная частица в цитозоле нервной клетки не связывается с клеточными мишенями и может существовать в свободном, не компартментализированном мембраной состоянии? Что представляют собой выявленные частицы: элемент фазы заражения или стадию диссеминации вновь произведенных вирусных частиц? Каким образом происходит выход неограниченной мембраной вирусной частицы

через клеточную мембрану? Ответы на эти вопросы составили предмет проведенного морфологического анализа.

На самом деле, свободные вирусоподобные везикулы в цитозоле всегда связаны с элементами цитоскелета, детерминирующими направления их транспорта. Учитывая, что нейротубулы и нейрофиламенты определяют кинетику формы нейронов и их отростков посредством сборки/разборки полимерных структур, а также актин-миозиновых процессов контрактильности, можно предположить возможность вируса проявлять аффинитет к динамично открывающимся сайтам связывания и участвовать в данных процессах.

Ангиотензиновая система мозга, как одна из медиаторных систем, широко распространена в корковых и подкорковых структурах. Соответственно, ангиотензинпревращающий фермент, являющийся мишенью SARS-CoV-2, иммуногистохимически выявлен как на по-

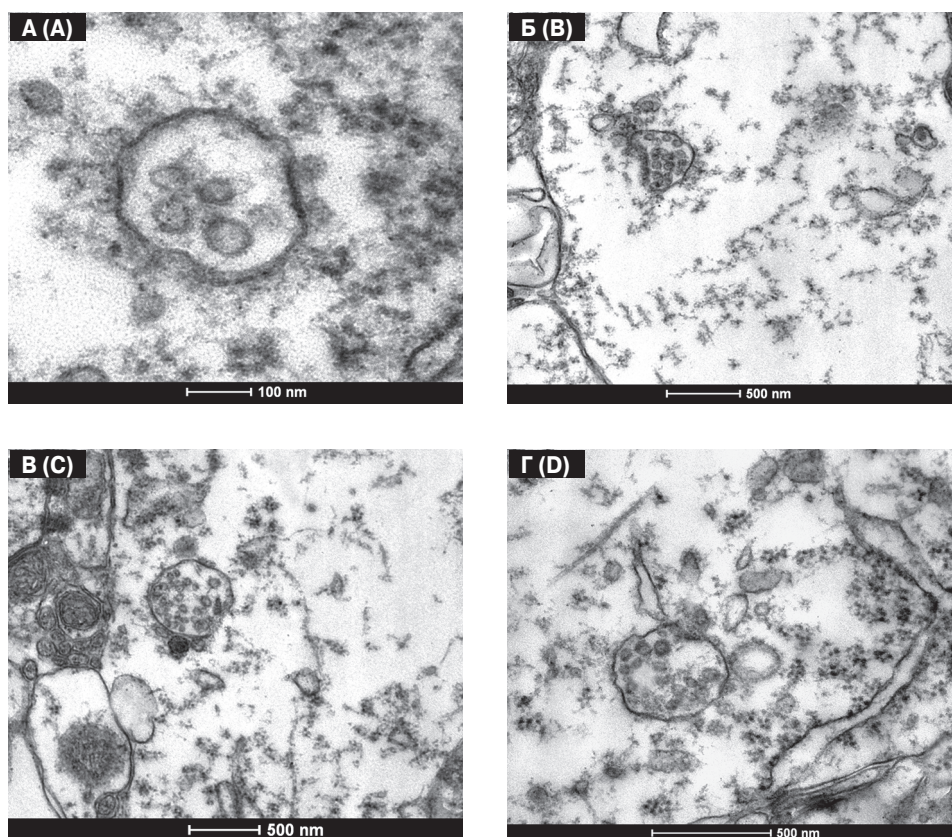


Рисунок 6. Мультивезикулярные тельца в нейронах неокортекса после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально). Комплексы мультивезикулярных телец с элементами цитоскелета (А, Г), их представительство в составе измененного АГ (Б) и в участках цитозоля с повышенной белоксинтетической активностью (В). Электроннограммы. Увеличение: А — 105 000, Б — 26 500, В — 20 500, Г — 43 000

Figure 6. Multivesicular bodies in neocortical neurons after infection with SARS-CoV-2 4×10^4 TCD₅₀/ml (26 μ l/individual intranasally). Complexes of multivesicular bodies with cytoskeletal elements (A, D), their representation within altered AG (B) and in cytosolic areas with enhanced protein synthetic activity (C). Electronograms. Scale: A — 105 000, B — 26 500, C — 20 500, D — 43 000

верхности, так и внутри нервных клеток, в том числе на мембране митохондрий и кариолемме [4]. Вместе с тем исследование процессов пиноцитоза в нейропиле белого вещества комиссуральных волокон позволило предположить, что проникновение вируса в клетку однозначно не означает ее поражение.

Применительно к кортикальным нейронам можно сформировать представление об их накопительном значении для прогрессии и персистенции SARS-CoV-2-инфекции в организме. К ранним признакам заражения нейрона вирусом следует отнести характерные изменения ядер,

свидетельствующие о высокой пластической активности, гипертрофию ЭР и формирование вирусных фабрик на основе ЭР, ПК и АГ, мембраны которых расходуются на формирование вирусных частиц, обеспечивая интеграцию синтезированных вирусных белков. Применительно к клеткам нервной системы нельзя судить о высокой активности АГ- или ПК-ассоциированных транспортных систем. Формирование вирусной биомассы происходит внутри нейрона, а выход вириона из клетки в большей степени происходит при ее гибели, чем при включении вируса в лизосомно-эндосомную систему.

Список литературы/References

1. Гайер Г. Электронная гистохимия. М.: Мир, 1974. 488 с. [Geyer G. Electronic histochemistry. Moscow: Mir, 1974. 488 p. (In Russ.)]
2. Макаренко И.Е., Авдеева О.И., Ванатиев Г.В., Рыбакова А.В., Ходько С.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Возможные пути и объемы введения лекарственных средств лабораторным животным // Международный вестник ветеринарии. 2013. № 3. С. 72–78. [Makarenko I.E., Avdeeva O.I., Vanati G.V., Rybakova A.V., Khodko S.V., Makarova M.N., Makarov V.G. Possible ways of administration and standard drugs in laboratory animals. *Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii = International Bulletin of Veterinary Medicine*, 2013, no. 3, pp. 72–78. (In Russ.)]
3. Матвеев Ю.А. Система ангиотензина II коры мозжечка и ее значение в нейрососудистой регуляции // Вестник новых медицинских технологий. 2020. № 1. С. 90–95. [Matveev Yu.A. Angiotensin II system in cerebellum cortex and its role in neuro-vascular regulation. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii = Journal of New Medical Technologies*, 2020, no. 1, pp. 90–95. (In Russ.)] doi: 10.24411/2075-4094-2020-16498
4. Чепур С.В., Тюнин М.А., Мясников В.А., Алексеева И.И., Владимирова О.О., Ильинский Н.С., Никишин А.С., Шевченко В.А., Смирнова А.В. Поражение органов и тканей SARS-CoV-2: биологическая модель на сирийских хомьяках *Mesocricetus auratus* для экспериментальных (доклинических) исследований // Клиническая и экспериментальная морфология. 2021. Т. 10, № 4. С. 25–34. [Chepur S.V., Tyunin M.A., Myasnikov V.A., Alekseeva I.I., Vladimirova O.O., Iljinskiy N.S., Nikishin A.S., Shevchenko V.A., Smirnova A.V. Damage to organs and tissues of SARS-CoV-2: a biological model on Syrian hamsters for experimental (preclinical) studies. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya = Clinical and Experimental Morphology*, 2021, vol. 10, no. 4, pp. 25–34. (In Russ.)] doi: 10.31088/CEM2021.10.4.25-34
5. Fehr A.R., Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol. Biol.*, 2015, vol. 1282, pp. 1–23. doi: 10.1007/978-1-4939-2438-7_1
6. Ghosh S., Dellibovi-Ragheb T.A., Kerviel A., Pak E., Qiu Q., Fisher M., Takvorian P.M., Bleck C., Hsu V.W., Fehr A.R., Perlman S., Achar S.R., Straus M.R., Whittaker G.R., de Haan C.A.M., Kehrl J., Altan-Bonnet G., Altan-Bonnet N. β -coronavirus use lysosomes for egress instead of the biosynthetic secretory pathway. *Cell*, 2020, vol. 183, no. 6, pp. 1520–1535. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.039
7. Griffiths G., Ericsson M., Krijnse-Locker J., Nilsson T., Goud B., Söling H.D., Tang B.L., Wong S.H., Hong W. Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *J. Cell. Biol.*, 1994, vol. 127, no. 6, pt. 1, pp. 1557–1574. doi: 10.1083/jcb.127.6.1557
8. Hanus C., Geptin H., Tushev G., Garg S., Alvarez-Castelao B., Sambandan S., Kochen L., Hafner A.S., Langer J.D., Schuman E.M. Unconventional secretory processing diversifies neuronal ion channel properties. *Elife*, 2016, vol. 5. doi: 10.7554/eLife.20609
9. Hartenian E., Nandakumar D., Lari A., Ly M., Tucker J.M., Glaunsinger B.A. The molecular virology of coronaviruses. *J. Biol. Chem.*, 2020, vol. 295, no. 37, pp. 12910–12934. doi: 10.1074/jbc.REV120.013930
10. Horstmann H., Ng C.P., Tang B.L., Hong W. Ultrastructural characterization of endoplasmic reticulum-Golgi transport containers (EGTC). *J. Cell. Sci.*, 2002, vol. 115, no. 22, pp. 4263–4273. doi: 10.1242/jcs.00115
11. Klein S., Cortese M., Winter S.L., Wachsmuth-Melm M., Neufeldt C.J., Cerikan B., Stanifer M.L., Boulant S., Bartenschlager R., Chlanda P. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat. Commun.*, 2020, vol. 11, no. 5885. doi: 10.1038/s41467-020-19619-7
12. Klumperman J., Locker J.K., Meijer A., Horzinek M.C., Geuze H.J., Rottier P.J. Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *J. Virol.*, 1994, vol. 68, no. 10, pp. 6523–6534. doi: 10.1128/jvi.68.10.6523-6534.1994
13. Plutner H., Cox A.D., Pind S., Khosravi-Far R., Bourne J.R., Schwaninger R., Der C.J., Balch W.E. Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments. *J. Cell. Biol.*, 1991, vol. 115, no. 1, pp. 31–43. doi: 10.1083/jcb.115.1.31
14. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Epidemiol.*, 1938, vol. 27, no. 3, pp. 493–497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
15. Ritchie G., Harvey D.J., Feldmann F., Stroehrer U., Feldmann H., Royle L., Dwek R.A., Rudd P.M. Identification of N-linked carbohydrates from severe acute respiratory syndrome (SARS) spike glycoprotein. *Virology*, 2010, vol. 399, no. 2, pp. 257–269. doi: 10.1016/j.virol.2009.12.020

16. Sannerud R., Marie M., Nizak C., Dale H.A., Pernet-Gallay K., Perez F., Goud B., Saraste J. Rab1 defines a novel pathway connecting the pre-Golgi intermediate compartment with the cell periphery. *Mol. Biol. Cell*, 2006, vol. 17, no. 4, pp. 1514–1526. doi: 10.1091/mbc.E05-08-0792
17. Saraste J., Prydz K. Assembly and cellular exit of Coronaviruses: hijacking an unconventional secretory pathway from the pre-golgi intermediate compartment via the Golgi ribbon to the extracellular space. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 3: 503. doi: 10.3390/cells10030503
18. Schoeman D., Fielding B.C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Viol. J.*, 2019, vol. 16, no. 1: 69. doi: 10.1186/s12985-019-1182-0
19. Stertz S., Reichelt M., Spiegel M., Kuri T., Martinez-Sobrido L., Garcia-Sastre A., Weber F., Kochs G. The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology*, 2007, vol. 361, no. 2, pp. 304–315. doi: 10.1016/j.virol.2006.11.027
20. Sturman L.S., Holmes K.V. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.*, 1983, vol. 28, pp. 35–112. doi: 10.1016/S0065-3527(08)60721-6
21. Taştan C., Yurtsever B., Sir Karakuş G., Dilek Kançaği D., Demir S., Abanuz S., Seyis U., Yildirim M., Kuzay R., Elibol Ö., Arbak S., Aşikel E., Birdoğan S., Sezerman U.O., Kocagöz A.S., Yalçın K., Ovali E. SARS-CoV-2 isolation and propagation from Turkish COVID-19 patients. *Turk. J. Biol.*, 2020, vol. 44, no. 3, pp. 192–202. doi: 10.3906/biy-2004-113
22. Tooze S.A., Tooze J., Warren G. Site of addition of N-acetyl-galactosamine to the E1 glycoprotein of mouse hepatitis virus-A59. *J. Cell. Biol.*, 1988, vol. 106, no. 5, pp. 1475–1487. doi: 10.1083/jcb.106.5.1475
23. Ulasli M., Verheije M.H., de Haan C.A., Reggiori F. Qualitative and quantitative ultrastructural analysis of the membrane rearrangements induced by coronavirus. *Cell. Microbiol.*, 2010, vol. 12, no. 6, pp. 844–861. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01437.x
24. Volchuk A., Amherdt M., Ravazzola M., Brugger B., Rivera V.M., Clackson T., Perrelet A., Söllner T., Rothman J.E., Orci L. Megavesicles implicated in the rapid transport of intracisternal aggregates across the Golgi stack. *Cell*, 2000, vol. 102, no. 3, pp. 335–348. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00039-8
25. Westerbeck J.W., Machamer C.E. The infectious bronchitis coronavirus envelope protein alters Golgi pH to protect the spike protein and promote the release of infectious virus. *J. Virol.*, 2019, vol. 93, no. 11: e00015-19. doi: 10.1128/JVI.00015-19
26. Yao P., Zhang Y., Sun Y., Gu Y., Xu F., Su B., Chen C., Lu H., Wang D., Yang Z., Niu B., Chen J., Xie L., Chen L., Zhang Y., Wang H., Zhao Y., Guo Y., Ruan J., Zhu Z., Fu Z., Tian D., An Q., Jiang J., Zhu H. Isolation and growth characteristics of SARS-CoV-2 in Vero cell. *Virol. Sin.*, 2020, vol. 35, no. 3, pp. 348–350. doi: 10.1007/s12250-020-00241-2

Авторы:

Чепур С.В., д.м.н., профессор, начальник ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Парамонова Н.М., старший научный сотрудник ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия; научный сотрудник ФГУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Мясникова И.А., к.б.н., старший научный сотрудник научно-исследовательского испытательного центра ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Плужников Н.Н., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Тюнин М.А., к.м.н., зам. начальника научно-исследовательского испытательного центра ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Каневский Б.А., зам. начальника научно-исследовательского отдела ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Ильинский Н.С., зам. начальника научно-исследовательского отдела ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Chepur S.V., DSc (Medicine), Professor, Head of State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation;

Paramonova N.M., Senior Researcher, State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation; Researcher, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation;

Myasnikova I.A., PhD (Biology), Senior Researcher, State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation;

Pluzhnikov N.N., DSc (Medicine), Professor, Head Researcher, State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation;

Tyunin M.A., PhD (Medicine), Deputy Head, Research and Development Test Centre, State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation;

Kanevsky B.A., Deputy Head, State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation;

Ilyinsky N.S., Deputy Head, Scientific-Research Department, State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation.