

**ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ФРАГМЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК В
КРОВИ РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ
МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ**

Кравцов А. Л. ¹,

Клюева С. Н. ¹,

Кожевников В. А. ¹,

Бугоркова С. А. ¹

¹ ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт
«Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия.

**FLOW CYTOMETRY FOR ASSESSING BLOOD EXTRACELLULAR DNA
FRAGMENTS LEVEL IN WITH POST-COVID SYNDROME
CONVALESCENT SUBJECTS**

Kravtsov A. L. ^a,

Klyueva S. N. ^a,

Kozhevnikov V. A. ^a,

Bugorkova S. A. ^a

^a FKUN Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor, Saratov,
Russian Federation.

Резюме

Для пациентов с COVID-19 характерен существенно повышенный уровень содержания внеклеточной ДНК в периферической крови, а недавно нити ДНК нейтрофильных внеклеточных ловушек были обнаружены в плазме крови лиц с постковидным синдромом. *Цель исследования* – разработать методический подход (технология) детекции внеклеточной ДНК и оценить ее уровень в крови лиц с постковидным синдромом. *Материалы и методы.* В исследование включены: пациенты с постковидным синдромом, ранее перенесшие тяжёлую форму болезни (опытная группа, n=8, от 53 до 64 лет); больные с тяжёлой формой течения COVID-19 (I группа сравнения, n=5, от 48 до 67 лет); условно здоровые добровольцы разных возрастных групп: 18-30 лет (II группа сравнения, n=12) и старше 60 лет (III группа сравнения, n=10, более 60 лет), в крови которых отсутствовали специфические IgG антитела к вирусу SARS-CoV-2. Исследование проводили в микрообъемах цельной крови. *Результаты.* Для определения содержания в крови фрагментов внутриклеточной ДНК был разработан способ проточно-цитофлуориметрического анализа, основанный на добавлении в кровь раствора красителя йодистого пропидия вместе с маркером CD45-FITC, используемым при иммунофенотипировании лейкоцитов по Lyse/No-Wash протоколу для дифференцирования неповрежденных клеток от клеточного дебриса. У здоровых людей краситель после добавления в кровь лизирующего эритроциты и фиксирующего лейкоциты реагента проникает внутрь клеток и окрашивает только внутриклеточную ДНК неповрежденных диплоидных лейкоцитов. Доля слабых сигналов ДНК-флуоресценции от фрагментов внеклеточной ДНК в общем числе регистрируемых цитометром импульсов в этом случае не более 3,2 (2,0-5,6) %. С возрастом или на фоне болезни этот показатель повышается в среднем до 13,4 (10,1-18,6) %. У лиц с тяжёлой формой течения COVID-19 регистрировали очень высокие значения исследуемого показателя - на уровне 82 (68,0-88,6) %. У реконвалесцентов

после перенесенного COVID-19 в течение месяца сохранялись высокие показатели уровня внеклеточной ДНК, постепенно снижаясь к 3-му месяцу до 40,5 (27,4-52,0) %. *Заключение.* Согласно полученным данным определение внеклеточной ДНК по разработанной технологии позволяет характеризовать тяжесть течения COVID-19 и оценить компенсаторные возможности организма в постковидном периоде.

Ключевые слова: содержание внеклеточной ДНК в крови, активация нейтрофилов, нетоз, COVID-19, постковидный синдром, проточная цитометрия.

Abstract

Patients with COVID-19 are characterized by markedly elevated levels of cell-free DNA in the peripheral blood, and recently neutrophil extracellular trap DNA strands were detected in the blood plasma of individuals with post-COVID syndrome. Purpose of the study – to develop a methodological approach (technology) for detecting cell-free DNA and to assess its level in the blood of individuals with post-COVID syndrome. *Materials and methods.* The study enrolled patients with post-COVID syndrome who had severe COVID-19 (experimental group, n = 8, aged 53 to 64 years); patients with severe COVID-19 (comparison group I, n = 5, aged 48 to 67 years); apparently healthy volunteers of different age groups: 18-30 years old (comparison group II, n = 12) and over 60 years old (comparison group III, n = 10, over 60 years old), in whose blood there were no specific IgG antibodies to the SARS-CoV-2 virus. The study was performed in microvolume whole blood samples. *Results.* To determine the content of intracellular DNA fragments in the blood, a flow cytofluorimetric analysis method was developed based on adding a propidium iodide dye solution to the blood together with the CD45-FITC marker used in leukocyte immunophenotyping according to the Lyse/No-Wash protocol to differentiate intact cells from cellular debris. In healthy subjects, after adding a reagent that lyses erythrocytes and fixes leukocytes to the blood, the dye penetrates into the cells and stains only the intracellular DNA in intact diploid leukocytes. The proportion of weak DNA fluorescence signals from extracellular DNA fragments in the total number of pulses recorded by the cytometer in this case not exceeds 3.2 (2.0-5.6) %. With age in case of the disease, this pattern increases to an average of 13.4 (10.1-18.6) %. In individuals with severe COVID-19, very high magnitude of the studied parameter was recorded - at the level of 82 (68.0-88.6) %. In COVID-19 convalescent patients, high levels of extracellular DNA remained for a month, gradually decreasing by the month 3 to 40.5 (27.4-52.0) %. *Conclusion.* According to the data obtained, the determination of extracellular DNA using the developed technology allows us to

characterize the severity of COVID-19 and assess the compensatory capabilities of the body in the post-COVID period.

Keywords: extracellular DNA content in blood, neutrophil activation, NETosis, COVID-19, post-COVID syndrome, flow cytometry.

1 Введение

2 Постковидный синдром (ПКС, альтернативно: post-COVID-19 syndrome,
3 chronic COVID syndrome, long COVID) — состояние постоянного или
4 перманентного наличия симптомов патологического процесса вслед за
5 перенесенной инфекцией, вызванной возбудителем SARS-CoV-2. Являясь
6 мультисистемным расстройством, ПКС ассоциируется с множеством
7 клинических проявлений, включая сердечную и дыхательную дисфункцию,
8 нейropsychиатрические нарушения и гиперкоагуляцию. Всемирная
9 организация здравоохранения характеризует его как «присутствие признаков
10 и симптомов, развивающихся вовремя или после инфекции COVID-19,
11 сохраняющихся более 4 недель и не имеющих объяснения наличием каких-
12 либо других диагнозов» [3,15].

13 Патофизиологические механизмы, лежащие в основе ПКС,
14 недостаточно изучены [15]. Опираясь на современные представления о
15 ключевой роли ДНК-сетей нейтрофильных внеклеточных ловушек (Neutrophil
16 Extracellular Traps – NETs) в патогенезе COVID-19 и развитии у людей
17 системных хронических аутоиммунных заболеваний [12], большинство
18 исследователей объясняет остаточные воспалительные симптомы и
19 осложнения, регистрируемые при ПКС, длительным сохранением дисбаланса
20 процессов образования и удаления NETs после перенесенного COVID-19
21 [13,15]. Такой дисбаланс, индуцируемый SARS-CoV-2 в острый период новой
22 коронавирусной инфекции, приводит к многократному повышению
23 концентрации в плазме крови фрагментов внеклеточной (вкДНК) [10],
24 которые, обладая выраженным провоспалительным потенциалом [8],
25 активируют коагуляцию и стимулируют образование тромбов в сосудистом
26 русле [12].

27 С помощью длительных и трудоемких методов детекции, базирующихся
28 на выделении вкДНК из плазмы и последующем количественном ПЦР-
29 анализе, в настоящее время установлено, что при нетозе и некрозе из

30 погибших клеток высвобождаются крупные фрагменты ДНК более 10 000 пар
31 нуклеотидов, которые в 100 раз больше фрагментов, секретлируемых в плазму
32 крови при апоптозе [7,14]. Было установлено, что содержание вкДНК в крови
33 пациентов с тяжелой формой течения COVID-19 в 7 раз превышает среднее
34 значение данного показателя у доноров без коронавирусной инфекции [8].
35 Однако пока не ясно, в какой степени и как долго эти различия сохраняются у
36 пациентов в период реконвалесценции. Такие исследования не проводились.
37 Возможно, по той причине, что все методы, основанные на экстракции
38 молекулы ДНК из плазмы, требуют большого количества крови для одного
39 анализа (не менее 2-5 мл), дают большой разброс результатов и, как следствие,
40 в клинической медицине пока широко не используются [7]. Выявление нитей
41 ДНК нейтрофильных ловушек, присутствующих в плазме крови пациентов с
42 ПКС, методом люминесцентной микроскопии [4] не обеспечивает
43 объективной оценки результатов.

44 Целью настоящей работы была разработка метода (технологии)
45 детекции внеклеточной ДНК и оценка ее уровня содержания в крови лиц с
46 постковидным синдромом.

47 2 Материалы и методы

48 Оценку содержания фрагментов вкДНК и иммунофенотипирование
49 лейкоцитов в крови больных COVID-19, реконвалесцентов и условно
50 здоровых добровольцев проводили в период первой волны эпидемии COVID-
51 19 (август – октябрь 2020 г.) среди жителей г. Саратова и Саратовской области.
52 Клинический материал (кровь) поступал на анализ в пробирках с гепарином
53 из профильных учреждений г. Саратова и г. Энгельса в течение 3 ч после
54 забора. Исследование проводили на основании письменного согласия
55 пациентов в рамках плановой научной тематики учреждения, одобренной
56 локальным этическим комитетом ФКУН Российский противочумный
57 институт «Микроб».

58 Кровь реконвалесцентов, перенесших тяжелую форму COVID-19
59 (опытная группа, n=8, возраст от 53 до 64 лет), исследовали в период от 1 до 3
60 месяцев после завершения процесса лечения в стационаре. Наличие у
61 обследуемых ПКС устанавливали при опросе по жалобам на один или
62 несколько характерных симптомов этого синдрома [3], таких как слабость,
63 одышка, быстрая утомляемость, нарушение сна, обострение имеющихся
64 хронических заболеваний, появление головных, мышечных, суставных или
65 позвоночных болей. Положительным контролем (I группа сравнения, n=5,
66 возраст от 48 до 67 лет) высокого уровня содержания вкДНК служили
67 результаты анализа крови пациентов отделения реанимации с нарушениями
68 дыхательной функции легких и изменениями состояния сердечно-сосудистой
69 системы, соответствующими по общепринятой клинической классификации
70 тяжёлой форме течения COVID-19 [5]. В качестве отрицательного контроля
71 исследовали кровь лиц без перенесенной коронавирусной инфекции,
72 добровольно присоединившихся к исследованию после подписания
73 информированного согласия. Таких доноров делили по возрасту на две
74 группы: от 18 до 30 лет (II группа сравнения, n =12) и старше 60 лет (III группа
75 сравнения, n=10).

76 Иммунофенотипирование лейкоцитов проводили в микрообъёмах
77 цельной крови с помощью стандартной процедуры Lyse/No-Wash («BD
78 Bioscience»), исключающей потерю клеток и клеточного дебриса при окраске
79 образцов флуоресцирующими реагентами [16]. Для определения
80 относительного содержания в крови фрагментов вкДНК был разработан
81 способ проточно-цитофлуориметрического анализа, основанный на
82 добавлении к 50 мкл цельной крови 10 мкл раствора йодистого пропидия (IP)
83 с концентрацией 100 мкг/мл фосфатно-солевого буфера (pH 7,4) совместно с
84 10 мкл реагента CD45-FITC, используемого при иммунофенотипировании
85 лейкоцитов крови по Lyse/No-Wash протоколу для автоматического
86 дифференцирования неповрежденных клеток от клеточного дебриса [6].

87 Для измерения в потоке интенсивности светорассеяния,
88 иммунофлюоресценции и ДНК-флюоресценции больших статистических
89 выборок отдельных лейкоцитов и продуктов клеточного распада использовали
90 проточный цитофлуориметр «DakoCytomation» (Дания) с программным
91 обеспечением «Summit v.4.3 Built 2445».

92 Полученные данные статистически обрабатывали с использованием
93 стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016», «Statistica 10.0»
94 («StatSoft Inc.»), представляя их в виде медианы (Me) и квартильных
95 отклонений (Q25–Q75) с расчетом достоверности различий в исследуемых
96 группах с использованием U-критерия Манна–Уитни. Значение $p < 0,05$
97 считали статистически значимым.

98 3 Результаты и обсуждение

99 Используемый в настоящей работе цитофлуориметрический способ
100 детекции вКДНК был разработан благодаря экспериментально установленной
101 нами способности лизирующего эритроциты реагента (BD FACS Lysing
102 Solution), содержащего 3 % диэтиленгликоль, 1 % формальдегид и 0,35 %
103 метанол, повышать проницаемость цитоплазматических мембран лейкоцитов
104 крови для молекул IP. При попадании в кровь IP окрашивал фрагменты вКДНК
105 в плазме, а после добавления в образец крови лизирующего эритроциты и
106 фиксирующего лейкоциты реагента проникал внутрь клеток, где окрашивал
107 ядерную ДНК. При высокой разрешающей способности процесса измерения
108 интенсивности ДНК-флюоресценции в логарифмическом режиме, метод
109 проточной цитометрии позволял получать информацию как о присутствии
110 (или отсутствии) в крови фрагментов вКДНК, так и об относительном
111 содержании в образце крови неповреждённых диплоидных лейкоцитов,
112 имеющих нормальное состояние ядерного хроматина. Поэтому мы учитывали
113 результат анализа в виде доли, которую более слабые импульсы ДНК-
114 флюоресценции, регистрируемые от фрагментов вКДНК, составляли от общего

115 числа поступающих на анализ сигналов ДНК-флуоресценции. Результат
116 выражали в процентах.

117 На рисунке представлены характерные ДНК-гистограммы (A1, B1, C1 и
118 D1), наглядно иллюстрирующие степень различий по относительному
119 содержанию фрагментов вкДНК в образцах крови лиц 4-х обследуемых нами
120 групп. Слева от ДНК-гистограмм на рисунке представлены соответствующие
121 им цитограммы (A, B, C и D), отражающие индивидуальный характер
122 распределения в образцах крови отдельных лейкоцитов и продуктов
123 клеточного распада по уровню экспрессии общего лейкоцитарного антигена
124 CD45 и интенсивности бокового светорассеяния (степени гранулярности, SS).
125 Цитограммы позволяли определять содержание в образцах крови клеточного
126 дебриса («мусора»), включающего высвобождаемые из погибших клеток
127 фрагменты вкДНК. Так, в образце сравнения - кровь пожилой женщины
128 (группа III, 63 года, результат анализа B, B1) содержание дебриса и
129 фрагментов вкДНК было более высоким, чем в крови молодой женщины
130 (группа II, 24 года, результат A, A1). Однако пожилой пациент с тяжелой
131 формой течения COVID-19 (группа I, 67 лет, C, C1) очень сильно отличался по
132 исследуемому параметру от доноров II и III групп. В его крови было в 5,3 раза
133 больше фрагментов вкДНК (68,8 %), чем в крови донора III группы (13 %). У
134 пациента с ПКС (опытная группа, 59 лет, D, D1) фрагментов вкДНК в крови
135 было вдвое меньше (34,3 %), чем у больного с острой формой инфекции (68,8
136 %), но в 2,6 раза больше, чем у условно здорового донора III группы (13 %).

137 В таблице приведены результаты статистической обработки
138 полученных в работе экспериментальных данных, которые согласуются с
139 зарубежными исследованиями, выполненными ранее с использованием
140 длительных традиционных методов детекции в крови вкДНК. Во-первых, они
141 подтверждают, что при отсутствии коронавирусной инфекции повышенная
142 концентрация циркулирующей в кровяном русле вкДНК является
143 биомаркером старения организма на клеточном уровне [11], связанным с

144 феноменом воспалительного старения («inflammaging») как основой возраст-
145 ассоциированной патологии [1]. Во-вторых, наши данные подтверждают
146 установленный факт многократного повышения концентрации вкДНК в крови
147 человека при угрожающих жизни критических состояниях (сепсисе,
148 обширных травмах, сосудистых катастрофах и др.) [7]. В данном случае, при
149 тяжелой форме течения COVID-19, при которой своевременное определение
150 чрезмерно высокого уровня содержания вкДНК в плазме позволяет
151 своевременно корректировать терапию, что способствует повышению
152 вероятности благоприятного исхода болезни [10]. Характеристика уровня
153 вкДНК крайне важна в аспекте испытания и применения новых современных
154 методов лечения COVID-19, основанных на удалении вкДНК из
155 периферической крови (терапевтический плазмообмен) [2] и на расщеплении
156 вкДНК-сетей NETs рекомбинантной нуклеазой (препаратом дорназа альфа)
157 [13,15].

158 Учитывая важность оценки исследуемого в работе показателя с точки
159 зрения обоснования прогноза и своевременной персонализации лечения
160 коронавирусной инфекции [9,10,14], результаты применения быстрого
161 цитофлуориметрического способа детекции вкДНК в микрообъемах цельной
162 крови, равных объемам пальцевой крови пациентов, могут в перспективе
163 иметь определенный диагностический, прогностический и терапевтический
164 потенциал. В том числе, видимо, и при обследовании пациентов с ПКС, в
165 крови которых нами впервые было зарегистрировано методом проточной
166 цитофлуориметрии существенно повышенное в сравнении с показателями для
167 условно здоровых доноров содержание фрагментов вкДНК.

168 Дальнейшие исследования механизмов образования и выведения вкДНК
169 позволят найти ответ на вопросы: «Каким образом нетоз может запускать
170 развитие ПКС в организме выживших при COVID-19 пациентов» и «Как в
171 этом процессе участвуют аутоантитела (антинуклеарные, антигистоновые и
172 антинейтрофильные цитоплазматические антитела) к входящим в состав NETs

173 продуктам распада нейтрофилов, которые присутствуют в крови всех
174 реконвалесцентов, переболевших тяжёлой формой COVID-19» [13,15].
175 Разработанный нами метод (технология) может способствовать накоплению
176 достоверных данных по оценке уровня содержания вкДНК в крови при
177 различных патологических состояниях.

178 *Заключение:* согласно полученным данным, определение вкДНК по
179 разработанной методике (технологии) позволяет характеризовать тяжесть
180 течения COVID-19 и оценить компенсаторные возможности организма в
181 постковидном периоде.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Относительное содержание фрагментов внеклеточной ДНК в крови лиц четырех обследуемых групп.

Table 1. Relative content of extracellular DNA fragments in the blood of individuals in four examined groups.

Группы Groups	Содержание фрагментов ДНК, Me(Q25-Q75) в % DNA fragments content, Me(Q25-Q75), in %
Опытная /experimental	40,5 (27,4 – 52,0)
Сравнения/comparison I	82,4 (68,0 – 88,6)*
Сравнения/comparison II	3,2 (2,0 – 5,6)*
Сравнения/comparison III	13,4 (10,1 – 18,6)*

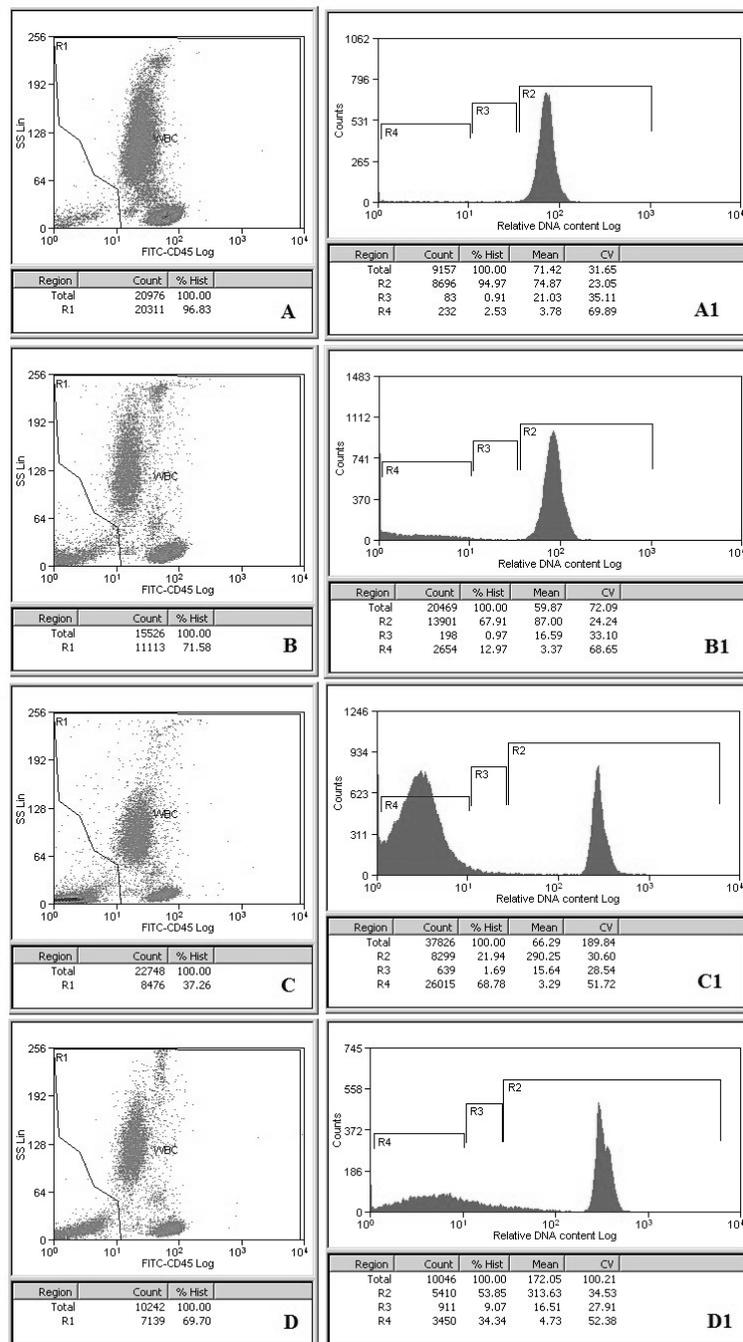
Примечание: * - достоверные различия с опытной группой ($p < 0,05$)

Note: * - significant differences with the experimental group ($p < 0.05$)

РИСУНКИ

Рисунок 1. Результат сравнительного анализа четырех образцов крови с различным содержанием клеточного дебриса и фрагментов внеклеточной ДНК в плазме.

Figure 1. Result of comparative analysis of four blood samples with different content of cellular debris and extracellular DNA fragments in plasma.



Примечание. ДНК-гистограммы A1, B1, C1 и D1 с цитограммами A, B, C и D соответствуют образцам крови из групп II, III, I и опытной группы. Три популяции клеток в регионе R1 на цитограммах – это неповрежденные лимфоциты, моноциты и гранулоциты. За пределами региона R1 учитывался клеточный дебрис, доля которого в пробах определялась как Total – R1 и равнялась для A, B, C и D соответственно 3,17 %, 28,5 %, 62,7% и 30,3 %. Сигналы ДНК-флуоресценции от фрагментов внеклеточной ДНК учитывались на ДНК-гистограммах в регионе R4. Значение показателя для групп I, II, III и опытной группы 68,8%, 2,5 %, 13 % и 34,3 % соответственно.

Note. DNA histograms A1, B1, C1 and D1 with cytograms A, B, C and D correspond to blood samples from groups II, III, I and the experimental group. Three cell populations in the R1 region on the cytograms are intact lymphocytes, monocytes and granulocytes. Outside the R1 region, cellular debris was taken into account, the proportion of which in the samples was defined as Total – R1 and was equal to 3.17%, 28.5%, 62.7% and 30.3% for A, B, C and D, respectively. DNA fluorescence signals from cell-free DNA fragments were taken into account on DNA histograms in the R4 region. The value of the indicator for groups I, II, III and the experimental group was 68.8%, 2.5%, 13% and 34.3%, respectively.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Клюева Светлана Николаевна – к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора;

адрес: 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46;

телефон: 8(987)830-50-75;

e-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru;

Klyueva S.N., PhD (Biology), Research Associate Department Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe";

address: 410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46;

telephone: +7(987)830-50-75;

e-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Блок 2. Информация об авторах

Кравцов Александр Леонидович – д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Kravtsov A.L., PhD, MD (Biology), Leading Research, Department Immunology Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Кожевников Виталий Александрович – младший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Kozhevnikov V.A., Junior Researcher, Department of Immunology Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russian Federation

Бугоркова Светлана Александровна – д.м.н., главный научный сотрудник
отдела иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Bugorkova S.A., PhD, MD (Medicine), Chief Researcher, Department of
Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian
Federation

Блок 3. Метаданные статьи

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ФРАГМЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК В КРОВИ РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

EVALUATION OF EXTRACELLULAR DNA FRAGMENTS CONTENT IN THE BLOOD OF CONVALESCENTS WITH POST-COVID SYNDROME USING FLOW CYTOMETRY

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ДЕТЕКЦИЯ ВКДНК В КРОВИ МЕТОДОМ ЦИТОМЕТРИИ

DETECTION OF CFDNA IN BLOOD BY CYTOMETRY

Ключевые слова: содержание внеклеточной ДНК в крови, активация нейтрофилов, нетоз, COVID-19, постковидный синдром, проточная цитометрия.

Keywords: extracellular DNA content in blood, neutrophil activation, NETosis, COVID-19, post-COVID syndrome, flow cytometry.

Краткие сообщения.

Количество страниц текста – 7,

количество таблиц – 1,

количество рисунков – 1.

04.12.2024.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
1.	Артемяева О.В., Ганковская Л.В. Воспалительное старение как основа возраст-ассоциированной патологии // Медицинская иммунология. 2020. Т. 22, № 3. С. 419-432.	[Artemyeva O.V., Gankovskaya L.V. Inflammaging as the basis of age-associated diseases. Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2020, vol. 22, no. 3, pp. 419-432. (In Russ.)]	doi: 10.15789/1563-0625-IAT-1938
2.	Бабаев М.А., Тухтаманова А.С., Маснева А.И. Новые направления научных исследований и клинической практики в области экстракорпоральной гемокоррекции у пациентов с полиорганной дисфункцией: обзор литературы //	[Babaev M.A., Tukhtamanova A.S., Masneva A.I. New directions of scientific research and clinical practice in the field of extracorporeal hemocorrection in patients with multiple organ dysfunction: a review.	doi: 10.21320/1818-474X-2024-1-135-147

	Вестник интенсивной терапии им. А.И. Салтанова. 2024. № 1. С. 135–147.	Vestnik intensivnoy terapii im. A.I. Saltanova = Annals of Critical Care, 2024, no. 1, pp. 135–147. (In Russ.)]	
3.	Бердюгина О.В. Постковидный синдром: к дискуссии о сроках наступления // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 476–482.	[Berdiugina O.V. Post-COVID-19 syndrome: a discussion of onset timing // Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 476–482. (In Russ.)]	doi: 10.15789/2220-7619-PCS-16766
4.	Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Ларина В.Н., Рыжих А.А. Постковидный синдром ассоциирован с повышением внеклеточных пуриновых оснований и нейтрофильных экстраклеточных ловушек в плазме крови // Бюллетень сибирской медицины. 2022. Т. 21, № 2. С. 41–47.	[Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I., Larina V.N., Ryzhikh A.A. Post-COVID syndrome is associated with increased extracellular purine bases and neutrophil extracellular traps in the blood plasma. Byulleten' sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian	doi: 10.20538/1682-0363-2022-2-41-47

		Medicine, 2022, vol. 21, no. 1, pp. 41–47. (In Russ.)]	
5.	Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Ключева С.Н., Гончарова А.Ю., Кожевников В.А., Чумачкова Е.А., Портенко С.А., Щербакова С.А. Оценка интенсивности дегрануляции и изменений фенотипа нейтрофилов по уровню экспрессии Fc _γ RIIb в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022. Т. 99, № 2. С. 172–184.	[Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., Goncharova A.Yu., Kozhevnikov V.A., Chumachkova E.A., Portenko S.A., Shcherbakova S.A. Assessment of neutrophil degranulation intensity and changes in neutrophil phenotype by FC _γ RIIb expression level in blood of patients with COVID-19 and convalescents. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2022, vol. 99, no. 2, pp. 172–184. (in Russ.)]	doi:10.36233/0372-9311-225
6.	Патент No 2815709 Российская Федерация, МПК G01N 33/50 (2006.01), G01N 33/577 (2006.01).	[Patent No. 2815709 Russian Federation, IPC G01N 33/50	

	<p>Способ детекции внеклеточной ДНК в цельной периферической крови с использованием проточной цитофлуориметрии: No 2022133755; заявлено 21.12.2022: опубликовано 20.03.2024/ Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Ключева С.Н., Кожевников В.А., Гончарова А.Ю., Шмелькова Т.П. Патентообладатель: ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. 13с.</p>	<p>(2006.01), G01N 33/577 (2006.01). Method for detecting extracellular DNA in whole peripheral blood using flow cytometry: No. 2022133755; declared 21.12.2022: published 20.03.2024 / Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., Kozhevnikov V.A., Goncharova A.Yu., Shmelkova T.P. Patent holder: Federal State Institution of Science Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor. 13 p.]</p>	
7.	<p>Филев А.Д., Писарев В.М. Внеклеточная ДНК в медицине неотложных состояний // Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь». 2020. Т. 9, № 1. С. 96–107.</p>	<p>[Filev A.D., Pisarev V.M. Cell-free DNA in emergency medical care. Zhurnal im. N.V. Sklifosovskogo «Neotlozhnaya meditsinskaya pomoshch'» = Journal named after N.V. Sklifosovsky Emergency</p>	<p>doi:10.23934/2223-9022-2020-9-1-96-10</p>

		Medical Care. 2020; vol. 9, no. 1, pp. 96–107. (In Russ.)]	
8.	Heil M. Self-DNA driven inflammation in COVID-19 and after mRNA-based vaccination: lessons for non-COVID-19 pathologies. <i>Front. Immunol.</i> , 2024, no. 14:1259879.		doi: 10.3389/fimmu.2023.1259879
9.	Hovhannisyan G., Harutyunyan T., Leibr T. The diagnostic, prognostic, and therapeutic potential of cell-free DNA with a special focus on COVID-19 and other viral infections. <i>Int.J.Mol.Sci.</i> , 2023, vol. 24, no. 18:14163.		doi: 10.3390/ijms241814163
10.	Tanaka A., Wakayama K., Fukuda Y., Ohta S., Homma T., Ando K., Nishihara Y., Nakano R., Zhao J., Suzuki Y., Kyotani Y., Yano H., Kasahara K., Chung K-P., Sagara H., Yoshizumi M., Nakahira K. Increased levels of circulating cell-free DNA in COVID-19 patients with respiratory failure. <i>Sci. Rep.</i> , 2024, no. 14: 17399.		doi: 10.1038/s41598-024-68433-4

11.	Teo Y.V, Capri M, Morsiani C., Pizza G., Faria A.M.C., Franceschi C., Neretti N. Cell-free DNA as a biomarker of aging. <i>Aging Cell</i> . 2019, no.18:e12890.	doi: 10.1111/accel.12890
12.	Thierry A., Roch B. Neutrophil extracellular traps and by-products play a key role in COVID-19: pathogenesis, risk factors, and therapy. <i>J. Clin. Med.</i> , 2020, vol. 9, no. 9: 2942.	doi: 10.3390/jcm9092942
13	Sawadogo S.A, Dighero-Kemp B, Ouédraogo D.D, Hensley L, Sakandé J. How NETosis could drive "Post-COVID-19 syndrome" among survivors. <i>Immunol Lett</i> , 2020, vol.228, pp. 35–37.	doi: 10.1016/j.imlet.2020.09.005
14	Stawski R., Nowak D., Perdas E. Cell-Free DNA: potential application in COVID-19 diagnostics and management. <i>Viruses</i> , 2022, no. 14: 321.	doi: 10.3390/v14020321
15	Shafhat A., Omer M,H., Albalkhi I., Razzak G.A., Abdulkader H., Rab S.A., Sabbah B.N., Alkatan K., Yaqinuddin A. Neutrophil extracellular traps and long COVID. <i>Front. Immunol.</i> , 2023, no.14: 1254310.	doi: 10.3389/fimmu.2023.1254310

16	Vera E.J., Chew Y.V., Nicholson L., Bruns H., Anderson P., Chen H.T., Williams L., Keung K., Zanjani N.T., Dervish S., Patrick E., Wang X.M., Yi S., Hawthorne W., Alexander S., O'Connell P.J., Hu M. Standartization of flow cytometry for whole blood immunophenotyping of islet transplant and transplant clinical trial recipients. PLoS One, 2019, vol. 14, no. 5:e0217163.		doi: 10.1371/journal pone.0217163
----	---	--	---