

Гистологические изменения легких и показатели инфекционного процесса у морских свинок при моделировании SARS-CoV-2-инфекции

А.В. Шиповалов¹, Г.А. Кудров¹, Е.К. Ивлева¹, В.В. Омигов¹, О.В. Пьянков¹,
А.В. Зайковская¹, С.А. Боднев¹, И.С. Шульгина¹, С.В. Савченко², В.А. Грицингер²,
О.С. Таранов¹, С.В. Айдагулова²

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово

² Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

Резюме

Лабораторные животные позволяют моделировать инфекционные заболевания для изучения патогенеза и проведения испытаний лекарственных средств. Создание животных моделей, наиболее точно воспроизводящих COVID-19, перспективно для оценки эффективности препаратов и вакцин в отношении вируса SARS-CoV-2. Цель работы – изучение гистологических изменений легких и других показателей инфекционного процесса при моделировании COVID-19 на морских свинках как виде лабораторных животных, восприимчивых к вирусу SARS-CoV-2. **Материал и методы.** В эксперименте использовали 12 морских свинок обоего пола, инфицированных геновариантом альфа SARS-CoV-2. Динамику вирусной нагрузки определяли в назальных смывах по ОТ-ПЦР; содержание антител к SARS-CoV-2 в сыворотке крови измеряли методом твердофазного ИФА; титр нейтрализующих антител оценивали в реакции нейтрализации на культуре клеток Vero E6. Для сравнения исследовано 12 аутопсий легких пациентов, инфицированных SARS-CoV-2 (подтверждено результатом ПЦР-анализа) и погибших в результате пневмонии. Структурные изменения легких аутопсийных и экспериментальных образцов изучали на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. **Результаты.** После интраназального заражения геновариантом альфа SARS-CoV-2 в дозе 4lg ТЦД₅₀ (доза, инфицирующая 50 % культуры клеток с цитопатическим действием в 50 % клеток монослоя) в носовой полости и легких морских свинок выявлен низкий уровень вирусной нагрузки с высокими темпами элиминации. На третьи и пятые сутки у самцов в образцах назальных смывов вирусная нагрузка была более высокой ($p < 0,05$), позже седьмых суток РНК вируса не определялась. В сыворотке крови морских свинок на 15-е сутки были обнаружены антитела к SARS-CoV-2. При титре нейтрализующих антител 1:100 для всех животных у самок показатели коэффициента позитивности были в 2 раза выше. У павших и выведенных на 15-е сутки из эксперимента животных регистрировали гистологически подтвержденную тяжелую вирусную пневмонию, аналогичную изменениям в аутопсийном материале пациентов с COVID-19. **Заключение.** Гистологические изменения легких морских свинок при моделировании SARS-CoV-2-инфекции свидетельствуют о восприимчивости данного вида животных к изучаемому возбудителю с воспроизведением заболевания у пациентов, что позволяет рассматривать их как перспективную животную модель COVID-19 для разработки средств профилактики и лечения заболевания.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, морская свинка, модельное животное, легкие, гистологические изменения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки. Айдагулова С.В., e-mail: asvetvlad@yandex.ru

Для цитирования. Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Ивлева Е.К., Омигов В.В., Пьянков О.В., Зайковская А.В., Боднев С.А., Шульгина И.С., Савченко С.В., Грицингер В.А., Таранов О.С., Айдагулова С.В. Гистологические изменения легких и показатели инфекционного процесса у морских свинок при моделировании SARS-CoV-2-инфекции. *Сиб. науч. мед. ж.* 2025;45(4):140–150. doi: 10.18699/SSMJ20250415

Histological changes in the lungs and viral load indicators of guinea pigs in a model of SARS-CoV-2 infection

A.V. Shipovalov¹, G.A. Kudrov¹, E.K. Ivleva¹, V.V. Omigov¹, O.V. Pyankov¹,
A.V. Zaykovskaya¹, S.A. Bodnev¹, I.S. Shulgina¹, S.V. Savchenko², V.A. Gritsinger²,
O.S. Taranov¹, S.V. Aidagulova²

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor
630559, Novosibirsk region, Koltsovo

² Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny ave., 52

Abstract

Laboratory animals allow modeling infectious diseases to study pathogenesis and conduct drug trials. The creation of animal models that most accurately reproduce COVID-19 is promising for assessing the effectiveness of drugs and vaccines against the SARS-CoV-2 virus. The aim is to study the histological changes in the lungs and the other indicators of the infectious process in modeling COVID-19 in guinea pigs as a type of laboratory animals susceptible to SARS-CoV-2 virus. **Material and methods.** The experiments were carried out on 12 guinea pigs of both sexes infected with SARS-CoV-2 alpha variant. The dynamics of the viral load was determined in nasal washes by RT-PCR; SARS-CoV-2 antibody content in the blood serum were measured by ELISA; titers of neutralizing antibodies were estimated in the neutralization reaction in Vero E6 cell culture. As controls, 12 lung autopsies of patients infected with SARS-CoV-2 (confirmed by PCR analysis) and those who died as a result of pneumonia were studied. Structural changes in the lungs of autopsy and experimental samples were studied on paraffin sections stained with haematoxylin and eosin. **Results.** After intranasal infection with SARS-CoV-2 alpha variant at a dose of 4 lg TCID₅₀ (the dose infecting 50 % of the cell culture and causing cytopathic effect in 50 % of the cell monolayer), a low level of viral load with high rates of elimination was detected in the nasal cavity and lungs of guinea pigs. On days 3 and 5, the viral load in nasal swab samples was significantly higher in males ($p < 0.05$). After 7 days, viral RNA was not detected in nasal swabs. Antibodies to SARS-CoV-2 were detected in the blood serum of guinea pigs on the 15th day. With a neutralizing antibody titer of 1:100 for all animals, the positivity rate in females was 2 times higher. Histologically confirmed severe viral pneumonia was recorded in dead animals and at the end of the experiment, similar to changes in the autopsy material of patients with COVID-19. **Conclusions.** Histological changes in the lungs of guinea pigs during modeling of SARS-CoV-2 infection indicate the susceptibility of this animal species to the studied pathogen with reproduction of the disease in patients, which allows us to consider guinea pigs as a promising animal model for the study and prevention of COVID-19.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, guinea pig, model animal, lungs, histological changes.

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

Correspondence author. Aidagulova S.V., e-mail: asvetvlad@yandex.ru

Citation. Shipovalov A.V., Kudrov G.A., Ivleva E.K., Omigov V.V., Pyankov O.V., Zaykovskaya A.V., Bodnev S.A., Shulgina I.S., Savchenko S.V., Gritsinger V.A., Taranov O.S., Aidagulova S.V. Histological changes in the lungs and viral load indicators of guinea pigs in a model of SARS-CoV-2 infection. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2025;45(4):140–150. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20250415

Введение

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) вызывает высокую заболеваемость населения, что обусловлено пластичностью РНК-генома SARS-CoV-2. Быстрое распространение новых генетических линий коронавируса сопровождается снижением связывающей активности нейтрализующих антител, приобретенных как после инфицирования более ранним вариантом SARS-CoV-2, так и после вакцинации [1], кроме того – уменьшением эффективности патогенетического

лечения [2]. Уклонение новых генетических вариантов коронавируса от иммунного ответа требует всестороннего изучения, в том числе и на лабораторных животных, которые должны быть не только восприимчивыми к исследуемому возбудителю, но и воспроизводить клиническое течение у пациентов [3].

В настоящее время применяют несколько животных моделей COVID-19 [4–9], которые обладают рядом недостатков, связанных как с небольшими размерами и малой продолжительностью жизни (мыши, хомячки), так и со сложностью

содержания (хорьки, приматы). При этом отсутствует модель, достаточно точно воспроизводящая структурные изменения легких у пациентов с COVID-19, с тяжелым течением и летальным исходом. В связи с этим особый интерес представляют морские свинки, используемые для моделирования многих инфекционных заболеваний. Также, в отличие от мышей или крыс, отмечено сходство иммунной регуляции у морских свинок и людей как клеточного, так и гуморального ответа на введение антигенов, что позволяет проводить широкий спектр исследований на данном виде животных [10].

Для диагностики восприимчивости лабораторного животного не менее важен патогенный агент, используемый в модели инфекционного заболевания. Генетический вариант альфа-вируса SARS-CoV-2 является одним из наиболее изученных, его S-белок обладает высокой аффинностью к ACE2-рецептору [11], несколько уступает генетическому варианту дельта в способности образовывать синцитии [12], но вызывает более тяжелые повреждения легких [6]. Цель работы – изучение гистологических изменений легких и показателей вирусной нагрузки при моделировании COVID-19 на морских свинках как виде лабораторных животных, восприимчивых к SARS-CoV-2.

Материал и методы

В работе использовали штамм hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020 генетического варианта альфа (B.1.1.7) вируса SARS-CoV-2, полученный из Государственной коллекции микроорганизмов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии (ГНЦ ВБ) «Вектор» Роспотребнадзора. Нуклеотидная последовательность вируса представлена в базе данных GISAID (EPI_ISL_6565012). Вирус культивировали в клетках Vero E6, аликвоты из одной наработки (стока) замораживали и хранили при -70°C . Инфекционный титр стоков составлял не менее 10^6 ТЦД₅₀/мл (ТЦД₅₀ – доза, инфицирующая 50 % культуры клеток с цитопатическим действием в 50 % клеток монослоя). В эксперименте использовали аликвоты из одного стока.

Культуры клеток Vero E6 получены из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, выращены в минимальной среде (MEM), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США), пенициллин (100 МЕ/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл (Gibco) при $+37^{\circ}\text{C}$ и 5 % CO_2 . После инфицирования клеток использовали аналогичную среду, только с 2 % сыворотки.

В эксперименте использовали 12 аутбредных морских свинок (6 самцов и 6 самок) массой тела 200–250 г, полученных из Питомника лабораторных животных ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Животным подкожно имплантировали транспондеры (чипы) IPITT-300 (BMDS, США) для бесконтактной идентификации ID и помещали парами в индивидуально вентилируемые клетки. Животные имели неограниченный доступ к пище и воде. Аклиматизация к условиям эксперимента была проведена в течение семи суток до заражения. Во время экспериментов в клетках поддерживалась температура $22\text{--}24^{\circ}\text{C}$, относительная влажность 40–55 %. Морских свинок взвешивали, измеряли температуру и оценивали на проявления заболевания ежедневно. Все манипуляции выполнены в полном соответствии со стандартами по использованию лабораторных животных, изложенными в «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен этическим комитетом ГНЦ ВБ «Вектор» (протокол № 3 от 15.06.2021).

Аутопсийный материал забран при проведении патолого-анатомического исследования в 12 случаях смерти пациентов с двусторонней вирусной полисегментарной пневмонией, обусловленной инфицированием SARS-CoV-2 с развитием тяжелых форм инфекции, находившихся на лечении в ГБУЗ НСО «Городская инфекционная клиническая больница №1». Среди пациентов были лица обоих полов в возрасте от 38 до 67 лет. Диагноз «COVID-19» подтвержден результатами ПЦР-анализа (прямым методом, использующим ПЦР). Для микроскопического исследования резецировали по 8–10 образцов из периферических и центральных отделов легких. Аутопсию проводили в соответствии с Временными методическими рекомендациями «Исследование умерших с подозрением на коронавирусную инфекцию (COVID-19)» [13].

Определение чувствительности морских свинок к вирусу SARS-CoV-2 проводили с помощью внутримышечного введения комплексного анестетика Zoletil 100 (Virbac, Франция), который вводили в объеме 50 мкл/голова из расчета 20 мг/кг. После этого морских свинок заражали интраназально инокуляцией вируса в дозе 4lg ТЦД₅₀ по 50 мкл в каждую ноздрю. Начиная со вторых суток после заражения получали смывы из полости носа с помощью модифицированного метода, используемого для получения вирусного материала со слизистой оболочки носовой полости лабораторных хорьков [14]. Для проведения манипуляций использовали среду Игла MEM комнатной температуры с добавлением двухкратной концен-

трации комплексного антибиотика-антимикотика (200 ЕД/мл Antibiotic-Antimycotic, Gibco, США). Общий объем жидкости для назального смыва на одного животного составлял 1 мл. Через 15 суток после заражения животных выводили из эксперимента введением сверхдозы (200 мг/кг) Zoletil 100 и последующим обескровливанием. В асептических условиях иссекали легкие. Фрагмент правой верхушечной доли отбирали для вирусологических исследований, остальное легкое фиксировали. Полученные с помощью механического гомогенизатора FastPrep-24 (MP Biomedicals, США) 10%-е гомогенаты тканей осветляли путем центрифугирования при 10 000 об/мин (Microfuge 16, Beckman Coulter, Великобритания). Аликвоты гомогенатов и назальных смывов использовали для определения количества РНК вируса. Сыворотку крови получали центрифугированием цельной крови при 3000 об/мин (СМ-6М, ELMI, Латвия).

Содержание РНК вируса SARS-CoV-2 в биологических образцах определяли набором «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия). Синтез кДНК из выделенной РНК проводили с использованием реагентов для реакции обратной транскрипции «Реверта-Л» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), амплификацию фрагментов кДНК вируса SARS-CoV-2, предварительно синтезированных на матрице РНК вируса SARS-CoV-2 в реакции обратной транскрипции, – тест-системой «Вектор-ПЦРрв-2019-нCoV-RG» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия). Количество РНК вируса SARS-CoV-2 в пробах определяли через суррогатный показатель Ct (cycle threshold, порог цикла) – количество циклов, необходимых для того, чтобы флуоресцентный сигнал пересек порог фонового уровня сигнала. Меньшее значение Ct соответствует большей вирусной нагрузке. Согласно инструкции производителя, достоверно положительным считали результат при $Ct \leq 35$. Подтвержденные двумя повторами значения Ct в интервале 35–37 принимали как граничные положительные, при значении $Ct \geq 37$ считали, что исследуемый образец достоверно не содержит вируса.

Инфекционный титр вируса определяли с использованием метода анализа 50%-й цитопатической дозы для культуры тканей. Клетки Vero E6 высевали за 24 ч до заражения в 96-луночные планшеты с посевной дозой $1,5 \times 10^4$ клеток/луночка. В день эксперимента готовили последовательные 10-кратные разведения вируса, каждым из разведений заражали шесть лунок 96-луночного планшета. После 72-часовой инкубации в атмосфере 5 % CO_2 при температуре 37 °С клетки фиксировали 4%-м раствором параформальдегида с последующим окрашиванием 0,1 % генциан-

виолетом. Специфическое поражение монослоя культуры клеток в лунке учитывали как цитопатическое действие. Расчет титра вируса проводили по формуле Рида – Менча и выражали в $lg TCID_{50}/мл$ [15].

Суммарное содержание антител к SARS-CoV-2 в сыворотке крови морских свинок определяли коммерческим набором «SARS-CoV-2-АТ суммарные-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», Россия). Результаты ИФА регистрировали с помощью микропланшетного фотометра Multiskan FC (ThermoFisher Scientific, Финляндия), измеряя оптическую плотность при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 620 нм. Количественные значения выражали в условных единицах коэффициента позитивности. Проведение ИФА и интерпретация результатов выполнены в соответствии с инструкцией производителя. Титры нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в образцах сыворотки крови морских свинок оценивали на монослое клеток Vero E6. Образцы сывороток инактивировали в течение 30 мин при 56 °С, затем готовили двухкратные разведения в поддерживающей среде для культивирования клеток, начиная с разведения 1:10. Постановку реакции и оценку результатов осуществляли по стандартной методике [16].

Забор органов у животных осуществляли через 15 суток после заражения или ранее в случае гибели животного в ходе эксперимента; секционный материал пациентов – при вскрытии. Образцы легких фиксировали в 10%-м растворе забуференного формалина («БиоВитрум», Россия) в течение 48 ч и после стандартной проводки заливали в гистомикс. Срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали с помощью микроскопа AxioImager Z1 с использованием программного пакета AxioVision 4.8.2 (Zeiss, ФРГ).

Статистическая обработка результатов проведена с использованием программы Statistica v13.0. Для парного сравнения экспериментальных и контрольной групп применяли U-критерий Манна – Уитни, для проверки различий между двумя выборками парных измерений массы тела животных – тест Вилкоксона, для сравнения кривых выживаемости животных в эксперименте – тест Манталя – Кокса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

К концу эксперимента масса тела животных снизилась на 7,9 %, у самцов – на 6,2 % ($p = 0,0313$, тест Вилкоксона), у самок – на 9,6 % ($p = 0,0313$, тест Вилкоксона). Температура тела в

группах с учетом пола изменялась незначительно и составляла 38,6–40,3 °С с небольшими среднесуточными колебаниями. Корреляции между увеличением температуры и снижением веса животного не выявлено. Гибель 7 из 12 морских свинок была зарегистрирована на 10-е, 13-е, 14-е (самки) и 11-е, 13-е, 14-е и 15-е (самцы) сутки после заражения. Позже семи суток после заражения РНК вируса SARS-CoV-2 в назальных смывах не определялась. В гомогенатах легких трех павших животных (гибель на 10-е, 11-е и 14-е сутки) обнаружена РНК вируса SARS-CoV-2. Однако у погибших и выведенных из эксперимента на 15-е сутки животных маркеров коронавируса не обнаружено. Зафиксировано статистически значимое различие ($p = 0,02$, тест Манна – Уитни) значений Ct назальных смывов между группами самок и самцов на третьи и пятые сутки. В носовой полости самцов регистрировали более высокие показатели вирусной нагрузки (таблица).

В сыворотке крови морских свинок, выведенных из эксперимента на 15-е сутки после заражения, обнаружены антитела к вирусу SARS-CoV-2. У самок показатели коэффициента позитивности в 2 раза превышали показатели самцов. При этом титр нейтрализующих антител, определенный на культуре клеток *Vero E6*, для сывороток крови всех животных составлял 1:100. На аутопсии наблюдали характерную картину острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС): легкие безвоздушные, плотной консистенции, с характерной для COVID-19 темно-красной «лаковой» поверхностью. В кровеносных сосудах, в том числе в легочных артериях и венах, отмечено большое количество обтурирующих тромбов, что указывает в том числе на развитие синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания. Во всех аутопсийных наблюдениях фиксировали тотальное или субтотальное поражение легких.

При гистологическом исследовании легких выявлен распространенный ателектаз с диффузным поражением паренхимы и сосудов, почти полностью аналогичными структурным изменениям в аутопсийном материале. На первый план выступали острые нарушения кровообращения: внутриальвеолярные кровоизлияния (рисунок, а, б), диффузное плазматическое пропитывание и значительный внутриальвеолярный отек (рисунок, в, г), в просветах кровеносных сосудов видны тотальная агрегация эритроцитов и тромбоз (рисунок, д, е). Поражение легочной паренхимы характеризовалось гипертрофией (вероятно, связанной с колликвационным некрозом) и массивной десквамацией альвеолоцитов, формированием синцитиев, а также выраженной диффузной

периваскулярной (рисунок, ж, з) и перибронхиальной воспалительно-клеточной инфильтрацией. Выявленные структурные изменения легких инфицированных геновариантом альфа SARS-CoV-2 морских свинок соответствовали проявлениям бронхопневмонии и имели сходство с патоморфологией легких пациентов, погибших от COVID-19 [17].

Обсуждение

Активное выделение вируса из носоглотки в первые дни инфекции связано с чувствительностью эпителия верхних дыхательных путей и является эффективной стратегией SARS-CoV-2. Прогрессирование инфекции с репликацией вируса в нижних дыхательных путях и поражением клеток легких сопровождается клиническим ухудшением на 2-й неделе после начала заболевания [18]. У пациентов с тяжелым течением COVID-19 длительное воспаление приводит к нарушению коагуляции и развитию синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания. Повреждение эндотелия сосудов легких и периферических сосудов вследствие прямого воздействия вируса также является важным индуктором гиперкоагуляции, как и агрессивный иммунный ответ [19].

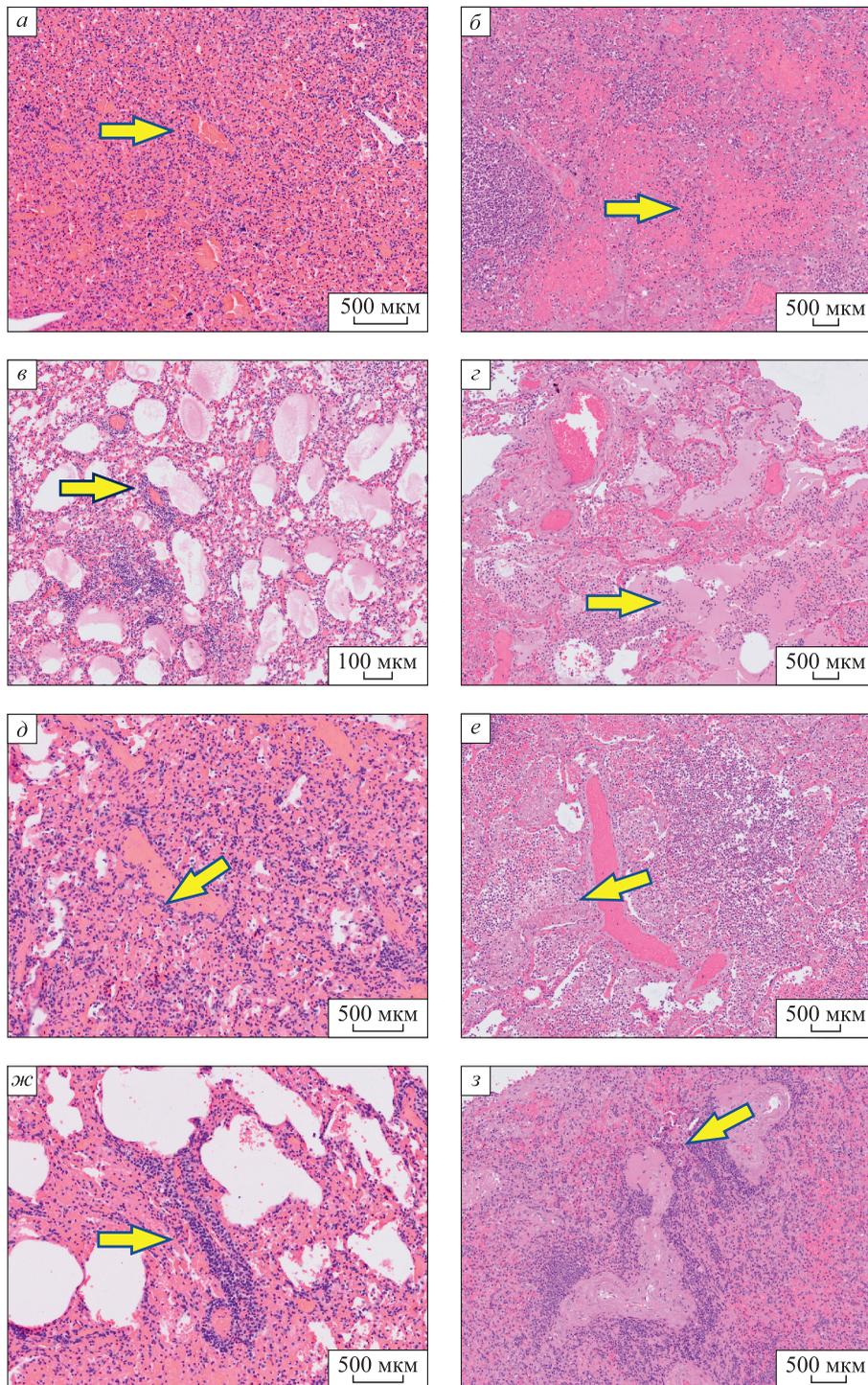
Однако, чтобы понять причины длительного течения COVID-19, необходимо рассмотреть механизмы, позволяющие коронавирусу длительно персистировать в клетках легких. Заражение клеток респираторного тракта SARS-CoV-2 инициируется связыванием поверхностного S-белка с рецептором ангиотензин-превращающего фермента 2-го типа (ACE2) и последующим слиянием вирусной оболочки и плазмалеммы. Кроме того, S-белок на поверхности инфицированной клетки может взаимодействовать с рецепторами соседних клеток, что приводит к формированию многоядерных клеток – синцитиев, которые способствуют уклонению от иммунитета, распространению вируса и пролонгации воспалительных реакций [20]. Как правило, ассоциированные с S-белком слияние мембран и образование синцитиев связаны с хроническим повреждением легких у пациентов с COVID-19 [21].

Резкое снижение массы тела (на 9,6 %) после заражения и более высокий уровень суммарных антител к SARS-CoV-2 позволяют говорить о более активном инфекционном процессе у самок морской свинки. Подобное различие в динамике изменения массы тела животных различного пола описано и для сирийских хомячков [22]. При этом титр нейтрализующих антител одинаков для всех животных, что может указывать на менее реак-

Параметры сравнения для каждой морской свинки, полученные в динамике эксперимента
 Comparison parameters obtained during the experiment for each guinea pig

Показатель	Самцы					Самки					Медиана [Q1; Q3]	Тест Манна-Уитни			
	Масса тела (г)														
0-е сутки пз	263	283	262	274	250	256	265 [250; 283]	281	280	285	278	257	263	274 [257; 285]	$p = 0,197$
3-и сутки пз	268	278	263	255	234	258	259 [234; 278]	279	280	273	263	267	262	271 [262; 280]	$p = 0,149$
4-е сутки пз	272	282	270	257	241	264	264 [241; 282]	281	285	276	258	268	268	273 [258; 285]	$p = 0,378$
5-е сутки пз	276	279	267	261	239	265	265 [239; 279]	278	278	272	250	273	273	271 [250; 278]	$p = 0,470$
6-е сутки пз	270	276	261	263	243	258	262 [243; 276]	276	268	265	246	270	278	267 [246; 278]	$p = 0,296$
7-е сутки пз	265	273	256	267	251	253	261 [251; 273]	272	267	261	238	263	283	264 [261; 283]	$p = 0,630$
15-е сутки пз (либо сутки гибели)	258	259	244	251	238	249	250 [238; 259]	240	253	268	232	251	242	248 [232; 268]	$p = 0,729$
Тест Вилкоксона, $p = 0,031$											Тест Вилкоксона, $p = 0,031$				
Вирусная нагрузка (Сг)															
Назальный смыв, 3-и сутки пз	19,97	26,43	24,57	26,39	26,38	25,86	26,12 [19,97; 26,43]	26,52	31,45	29,35	33,73	29,75	31,22	30,49 [26,52; 33,73]	$p = 0,002$
Назальный смыв, 5-е сутки пз	27,54	36,32	32,85	26,45	36,03	34,28	33,57 [26,45; 36,32]	33,60	35,00	35,94	31,55	огр	огр	34,30 [31,55; 35,94]	$p = 0,290$
Назальный смыв, 7-е сутки пз	≥ 37	≥ 37	≥ 37	≥ 37	≥ 37	≥ 37		≥ 37	≥ 37	≥ 37	≥ 37	≥ 37	≥ 37		
Гомогенаты легких	36,63	≥ 37		11,33	≥ 37	34,46	≥ 37	≥ 37	≥ 37						
Коэффициент позитивности	-	-	-	-	4,8	1,8	3,3	-	-	-	10,4	8,6	9,2	9,2 [8,6; 10,4]	
Титр нейтрализующих антител	-	-	-	-	1:100	1:100	1:100	-	-	-	1:100	1:100	1:100	1:100 [1:100; 1:100]	
Время гибели (сутки пз)	11	13	14	15	15	15	14,5 [11; 15]	10	13	14	15	15	15	14,5 [10; 15]	Тест Мантеля-Кокса, $p = 0,721$

Примечание. пз – после заражения.



Структурные изменения легких морских свинок, инфицированных генотипом альфа SARS-CoV-2 (а, в, д, ж), и аутопсий пациентов, погибших от бронхопневмонии в исходе COVID-19 (б, г, е, з): ателектаз легкого, массивные внутриальвеолярные кровоизлияния (а, б); диффузное плазматическое пропитывание и значительный внутриальвеолярный отек (в, г); агрегация эритроцитов (сладж) и тромбы в кровеносных сосудах (д, е); выраженная диффузная периваскулярная воспалительно-клеточная инфильтрация (ж, з). Парафиновые срезы, окраска гематоксилином и эозином

Structural changes in the lungs of guinea pigs infected with the SARS-CoV-2 alpha variant (a, в, д, ж) and autopsies of patients who died from bronchopneumonia as a result of COVID-19 (б, г, е, з): lung atelectasis, massive intra-alveolar hemorrhages (a, б); diffuse plasma impregnation and significant intra-alveolar edema (в, г); erythrocyte aggregation (sludge) and thrombi in blood vessels (д, е); pronounced diffuse perivascular inflammatory cellular infiltration (ж, з). Paraffin sections, stained with hematoxylin and eosin

тогенный иммунный ответ и большую чувствительность самцов морской свинки к изучаемому коронавирусу, что прежде всего связано с протективной функцией эстрогенов [10] и характерно для многих модельных животных [23]. Гендерные особенности клинических проявлений описаны как у пациентов с COVID-19 [24], так и у наиболее чувствительных животных, используемых для изучения SARS-CoV-2, – сирийских хомячков [25]. Это указывает на необходимость стратифицированной рандомизации при формировании экспериментальных групп с учетом пола используемых животных как основного признака, существенно влияющего на результаты исследования. Использование морских свинок одного пола позволит снизить разброс получаемых данных. В то же время результаты, полученные в группах, состоящих из самцов и самок, будут более достоверными, несмотря на наличие высокой дисперсии.

Отсутствие маркеров коронавируса или их незначительное количество в гомогенатах легких животных свидетельствует о том, что гибель вызвана не прямым цитопатическим эффектом, а развивающимися в динамике иммунными и воспалительными реакциями организма и, как следствие, системной воспалительной реакцией – ОРДС [26]. Для сравнения, у пациентов с тяжелым течением COVID-19 ухудшение состояния наступает через 7–14 суток после начала заболевания, и от появления первых симптомов до развития ОРДС проходит в среднем 8 суток [27].

В исследованиях вируса SARS-CoV-2 на морских свинках в носовых раковинах или легких ни одного из инфицированных животных на 3-й и 6-й день после заражения титрованием методом бляшек в культуре клеток VeroE6/TMPRSS2 вирус не обнаружен [28]. При этом ежедневные измерения с помощью системы плетизмографии «whole-body» выявили тенденцию увеличения частоты дыхания при уменьшении объема выдыхаемого воздуха. Гистологические исследования легких, к сожалению, не проводились. Изменение функции дыхания экспериментальных животных, по нашему мнению, может быть связано с цитотоксическим действием S-белка коронавируса на ткани легких.

Показано, что интраназальное введение S1-субъединицы поверхностного белка SARS-CoV-2 вызывало повреждения легких, такие как утолщение перегородки, инфильтрация нейтрофилов, отек и очаговое кровоизлияние у всех животных из трех протестированных мышинных линий [29]. S-белок может взаимодействовать с макрофагами и индуцировать рекрутирование и NETоз нейтрофилов [30]. Кроме того, отмечена лихорадка,

повышение содержания IL-6 в легких, аритмия и нарушение двигательной активности, т.е. были представлены некоторые из важных симптомов COVID-19 [31].

S-белок при связывании с рецепторами ACE2 не только влияет на тканевые процессы, но и оказывает цитотоксическое действие на клетки за счет взаимодействия с генами-супрессорами рака BRCA и p53, повреждения митохондрий, коагулопатии вследствие прямого контакта с клеточными белками, а также нейротоксичности в результате накопления, распространения и реконфигурации прионных белков в их патологическую форму. Накопление S-белка в клетках может иметь токсические и апоптотические последствия [32]. Однако эти процессы не могут протекать без экспрессии растворимого S-белка инфицированными клетками и минимальной репликации вируса в альвеолоцитах 2 типа [33], что и было показано в нашем исследовании.

Высокая степень гомологии структурных изменений легких указывает на сходство инфекционного процесса у человека и морской свинки. В легких наблюдаются проявления альвеоларно-геморрагического синдрома, вызванные прямым цитопатическим действием вируса на альвеолоциты и эндотелий капилляров, что отмечено у пациентов с COVID-19 [34], при заражении сирийских хомячков высокими дозами вирусной нагрузки SARS-CoV-2 [6] и показано при моделировании многих респираторных инфекционных заболеваний [35]. Выявлены ярко выраженная консолидация легочной паренхимы, утолщение межальвеоларных перегородок за счет отека и воспалительной инфильтрации, что характерно и для пациентов с COVID-19 [34], и для других животных моделей. Так, подобные особенности инфекционного процесса, вызванного вирусом SARS-CoV-2, мы наблюдали в классической модели COVID-19 – у сирийских хомячков при низких дозах вирусной нагрузки [6]. Подобное влияние вирус-индуцированного воспаления на тяжесть инфекционного процесса показано, хотя и в меньшей степени, для вируса гриппа [36]. Кроме того, наличие синцитиев среди патоморфологических признаков повреждений легких указывает на хронизацию процесса [21] и позволяет объяснить высокую вирусную нагрузку в тканях легких одной из самок на 10-е сутки после инфицирования.

Таким образом, моделирование на морских свинках инфекционного процесса, вызванного SARS-CoV-2, с большой степенью гомологии соответствует выраженности структурных изменений паренхимы и сосудов легких пациентов с COVID-19.

Заключение

Исследованы гистологические изменения легких и ряд параметров инфекционного процесса, вызванного геновариантом альфа-вируса SARS-CoV-2, у морских свинок. Обнаружены гендерные особенности течения инфекционного процесса, что важно учитывать при формировании экспериментальных групп. На аутопсийном клиническом и экспериментальном материале показано сходство гистологических изменений легких, характерных для пациентов с COVID-19 при длительном течении, приводящих к тяжелым и летальным исходам, и морских свинок при коронавирусной инфекции, что позволяет рекомендовать данных животных как модель COVID-19 с целью разработки средств профилактики и лечения.

Список литературы / References

1. Li L., Shi K., Gu Y., Xu Z., Shu C., Li D., Sun J., Cong M., Li X., Zhao X., ... Gao G.F. Spike structures, receptor binding, and immune escape of recently circulating SARS-CoV-2 Omicron BA.2.86, JN.1, EG.5, EG.5.1, and HV.1 sub-variants. *Structure*. 2024;32(8):1055–1067.e6. doi: 10.1016/j.str.2024.06.012
2. Alam M.S. Insight into SARS-CoV-2 Omicron variant immune escape possibility and variant independent potential therapeutic opportunities. *Heliyon*. 2023;9(2):e13285. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e13285
3. Sutton T.C., Subbarao K. Development of animal models against emerging coronaviruses: From SARS to MERS coronavirus. *Virology*. 2015;479-480:247–258. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.030
4. Sun S.H., Chen Q., Gu H.J., Yang G., Wang Y.X., Huang X.Y., Liu S.S., Zhang N.N., Li X.F., Xiong R., ... Wang Y.C. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis. *Cell. Host. Microbe*. 2020;28(1):124–133.e4. doi: 10.1016/j.chom.2020.05.020
5. Dolskiy A.A., Gudymo A.S., Taranov O.S., Grishchenko I.V., Shitik E.M., Prokopov D.Y., Soldatov V.O., Sobolevskaya E.V., Bodnev S.A., Danilchenko N.V., ... Yudkin D.V. The tissue distribution of SARS-CoV-2 in transgenic mice with inducible ubiquitous expression of hACE2. *Front. Mol. Biosci*. 2022;8:821506. doi: 10.3389/fmolb.2021.821506
6. Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Томилов А.А., Боднев С.А., Болдырев Н.Д., Овчинникова А.С., Зайковская А.В., Таранов О.С., Ивлева Е.К., Пьянков О.В., Максютлов Р.А. Патогенность вызывающих беспокойство вариантов вируса SARS-CoV-2 для сирийского хомячка. *Пробл. особо опас. инфекций*. 2022;(3):164–169. doi:10.21055/0370-1069-2022-3-164-169
7. Shipovalov A.V., Kudrov G.A., Tomilov A.A., Bodnev S.A., Boldyrev N.D., Ovchinnikova A.S., Zaikovskaya A.V., Taranov O.S., Ivleva E.K., Pyanov O.V., Maksyutov R.A. Pathogenicity of the SARS-CoV-2 virus variants of concern for the syrian golden hamster. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2022;(3):164–169. [In Russian]. doi:10.21055/0370-1069-2022-3-164-169
8. Ciurkiewicz M., Armando F., Schreiner T., de Buhr N., Pilchová V., Krupp-Buzimikic V., Gabriel G., von Köckritz-Blickwede M., Baumgärtner W., Schulz C., Gerhauser I. Ferrets are valuable models for SARS-CoV-2 research. *Vet. Pathol*. 2022;59(4):661–672. doi: 10.1177/03009858211071012
9. Cross R.W., Agans K.N., Prasad A.N., Borisevich V., Woolsey C., Deer D.J., Dobias N.S., Geisbert J.B., Fenton K.A., Geisbert T.W. Intranasal exposure of African green monkeys to SARS-CoV-2 results in acute phase pneumonia with shedding and lung injury still present in the early convalescence phase. *Viol. J.* 2020;17(1):125. doi: 10.1186/s12985-020-01396-w
10. Williamson B.N., Feldmann F., Schwarz B., Meade-White K., Porter D.P., Schulz J., van Doremalen N., Leighton I., Yinda C.K., Pérez-Pérez L., ... de Wit E. Clinical benefit of remdesivir in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2. *Nature*. 2020;585(7824):273–276. doi: 10.1038/s41586-020-2423-5
11. Padilla-Carlin D.J., McMurray D.N., Hickey A.J. The guinea pig as a model of infectious diseases. *Comp. Med*. 2008;58(4):324–340.
12. Supasa P., Zhou D., Dejnirattisai W., Liu C., Mentzer A.J., Ginn H.M., Zhao Y., Duyvesteyn H.M.E., Nutalai R., Tuekprakhon A., ... Sreeratanavanich G. Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B.1.1.7 variant by convalescent and vaccine sera. *Cell*. 2021;184(8):2201–2211.e7. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.033
13. Saito A., Irie T., Suzuki R., Maemura T., Nasser H., Uriu K., Kosugi Y., Shirakawa K., Sadamasu K., Kimura I., ... Sato K. Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. *Nature*. 2022;602(7896):300–306. doi: 10.1038/s41586-021-04266-9
14. Ковалев А.В., Франк Г.А., Минаева П.В., Тучик Е.С. Исследование умерших с подозрением на коронавирусную инфекцию (COVID-19): Временные методические рекомендации. М., 2020. 85 с.
15. Kovalev A.V., Frank G.A., Minaeva P.V., Tuchik E.S. Investigation of deceased persons with suspected coronavirus infection (COVID-19): Interim guidelines. Moscow, 2020. 85 p. [In Russian].
16. Matchett C.A., Marr R., Berard F.M., Cawthon A.G., Swing S.P. The laboratory ferret. Laboratory animal pocket reference. New York: CRC Press, 2012. 128 p.
17. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg*.

1938;27(3):493–497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408

16. Зайковская А.В., Евсеенко В.А., Олькин С.Е., Пьянков О.В. Изучение антигенных свойств штаммов коронавируса SARS-CoV-2, выделенных на территории РФ в 2020–2022 гг., в реакции нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток мышей. *Инфекция и иммунитет*. 2023;13(1):37–45. doi: 10.15789/2220-7619-IAF-1998

Zaykovskaya A.V., Evseenko V.A., Olkin S.E., Pyankov O.V. Investigating antigenic features of the SARS-CoV-2 isolated in Russian Federation in 2021–2022 by hyperimmune mouse serum neutralization. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2023;13(1):37–45. [In Russian]. doi: 10.15789/2220-7619-IAF-1998

17. Самсонова М.В., Михалева Л.М., Зайратьянц О.В., Варясин В.В., Быканова А.В., Мишнев О.Д., Березовский Ю.С., Тишкевич О.А., Гомзикова Е.А., Черняев А.Л., Хованская Т.Н. Патология легких при COVID-19 в Москве. *Арх. патол.* 2020;82(4):32–40. doi: 10.17116/patol20208204132

Samsonova M.V., Mikhaleva L.M., Zairatyants O.V., Varyasin V.V., Bykanova A.V., Mishnev O.D., Berezovsky Yu.S., Tishkevich O.A., Gomzikova E.A., Chernyaev A.L., Khovanskaya T.N. Lung pathology of COVID-19 in Moscow. *Arkhiv patologii = Archive of Pathology*. 2020;82(4):32–40. [In Russian]. doi: 10.17116/patol20208204132

18. Wölfel R., Corman V.M., Guggemos W., Seilmaier M., Zange S., Müller M.A., Niemeyer D., Jones T.C., Vollmar P., Rothe C., ... Wendtner C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020;581(7809):465–469. doi: 10.1038/s41586-020-2196-x

19. Zhang Y., Xiao M., Zhang S., Xia P., Cao W., Jiang W., Chen H., Ding X., Zhao H., Zhang H., ... Zhang S. Coagulopathy and antiphospholipid antibodies in patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;382(17):e38. doi: 10.1056/NEJMc2007575

20. Rajah M.M., Bernier A., Buchrieser J., Schwartz O. The mechanism and consequences of SARS-CoV-2 spike-mediated fusion and syncytia formation. *J. Mol. Biol.* 2022;434(6):167280. doi: 10.1016/j.jmb.2021.167280

21. Bussani R., Schneider E., Zentilin L., Collesi C., Ali H., Braga L., Volpe M.C., Colliva A., Zanconati F., Berlot G., ... Giacca M. Persistence of viral RNA, pneumocyte syncytia and thrombosis are hallmarks of advanced COVID-19 pathology. *EBioMedicine*. 2020;61:103104. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.103104

22. Dhakal S., Ruiz-Bedoya C.A., Zhou R., Creisher P.S., Villano J.S., Littlefield K., Ruelas Castillo J., Marinho P., Jedlicka A.E., ... Johns Hopkins COVID-19 Hamster Study Group. Sex differences in lung imaging and SARS-CoV-2 antibody responses in a COVID-19 golden syrian hamster model. *mBio*. 2021;12(4):e0097421. doi: 10.1128/mBio.00974-21

23. Elderman M., Hugenholtz F., Belzer C., Boeschoten M., van Beek A., de Haan B., Savelkoul H., de Vos P., Faas M. Sex and strain dependent differences in mucosal immunology and microbiota composition in mice. *Biol. Sex. Differ.* 2018;9(1):1–18. doi: 10.1186/s13293-018-0186-6

24. Marik P.E., DePerrior S.E., Ahmad Q., Dodani S. Gender-based disparities in COVID-19 patient outcomes. *J. Investig. Med.* 2021;jim-2020-001641. doi: 10.1136/jim-2020-001641

25. Michita R.T., Mysorekar I.U. Golden syrian hamsters as a model for revisiting the role of biological sex differences in SARS-CoV-2 infection. *mbio*. 2021;12(6):e0184821. doi: 10.1128/mBio.01848-21

26. Xu Z., Shi L., Wang Y., Zhang J., Huang L., Zhang C., Liu S., Zhao P., Liu H., Zhu L., ... Wang F.S. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* 2020;8(4):420–422. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X

27. Wang D., Hu B., Hu C., Zhu F., Liu X., Zhang J., Wang B., Xiang H., Cheng Z., Xiong Y., ... Peng Z. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020;323(11):1061–1069. doi: 10.1001/jama.2020.1585

28. Iwatsuki-Horimoto K., Kiso M., Ito M., Yamayoshi S., Kawaoka Y. Sensitivity of rodents to SARS-CoV-2: Gerbils are susceptible to SARS-CoV-2, but guinea pigs are not. *Npj Viruses*. 2024;2(1):59. doi: 10.1038/s44298-024-00068-8

29. Wei C., Datta P.K., Siegerist F., Li J., Yashwanth S., Koh K.H., Kriho N.W., Ismail A., Luo S., ... Reiser J. SuPAR mediates viral response proteinuria by rapidly changing podocyte function. *Nat. Commun.* 2023;14(1):4414. doi: 10.1038/s41467-023-40165-5

30. Park C., Hwang I.Y., Yan S.L., Vimontpatranon S., Wei D., Van Ryk D., Girard A., Cicala C., Arthos J., Kehrl J.H. Murine alveolar macrophages rapidly accumulate intranasally administered SARS-CoV-2 Spike protein leading to neutrophil recruitment and damage. *Elife*. 2024;12:RP86764. doi: 10.7554/eLife.86764

31. Paidi R.K., Jana M., Mishra R.K., Dutta D., Raha S., Pahan K. ACE-2-interacting domain of SARS-CoV-2 (AIDS) peptide suppresses inflammation to reduce fever and protect lungs and heart in mice: Implications for COVID-19 therapy. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2021;16(1):59–70. doi: 10.1007/s11481-020-09979-8

32. Seneff S., Kyriakopoulos A.M., Nigh G., McCullough P.A. A potential role of the spike protein in neurodegenerative diseases: A narrative review. *Cureus*. 2023;15(2):e34872. doi: 10.7759/cureus.34872

33. Grobbelaar L.M., Venter C., Vlok M., Ngoepe M., Laubscher G.J., Lourens P.J., Steenkamp J., Kell D.B., Pretorius E. SARS-CoV-2 spike protein S1 induces fibrin(ogen) resistant to fibrinolysis:

Implications for microclot formation in COVID-19. *Biosci. Rep.* 2021;41(8):BSR20210611. doi: 10.1042/BSR20210611

34. Тодоров С.С., Казьмин А.С., Дерибас В.Ю., Тодоров С.С. (мл.). Патологическая анатомия поражения сосудов легких при COVID-19. *Клин. и эксперим. морфол.* 2022;11(2):6–12. doi: 10.31088/CEM2022.11.2.6-12

Todorov S.S., Kazmin A.S., Deribas V.Yu., Todorov S.S. Pathological anatomy of lung vessels in COVID-19. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya = Clinical and Experimental Morphology.* 2022;11(2):6–12. [In Russian]. doi: 10.31088/CEM2022.11.2.6-12

35. Dietert K., Gutbier B., Wienhold S.M., Reppe K., Jiang X., Yao L., Chaput C., Naujoks J., Brack M., Kupke A., ... Gruber A.D. Spectrum of pathogen- and model-specific histopathologies in mouse models of acute pneumonia. *PLoS One.* 2017;12(11):e0188251. doi: 10.1371/journal.pone.0188251

36. Almansa R., Martínez-Orellana P., Rico L., Iglesias V., Ortega A., Vidaña B., Martínez J., Expósito A., Montoya M., Bermejo-Martin J.F. Pulmonary transcriptomic responses indicate a dual role of inflammation in pneumonia development and viral clearance during 2009 pandemic influenza infection. *PeerJ.* 2017;5:e3915. doi: 10.7717/peerj.3915

Сведения об авторах:

Шиповалов Андрей Владимирович, ORCID: 0000-0003-1201-8307, e-mail: shipovalov_av@mail.ru

Кудров Глеб Александрович, ORCID: 0000-0002-8251-7040, e-mail: kudrov_ga@vector.nsc.ru

Ивлева Елена Константиновна, ORCID: 0000-0003-1194-7219, e-mail: ivleva_ek@vector.nsc.ru

Омигов Владимир Вилорьевич, к.м.н., ORCID: 0000-0002-2028-6099, e-mail: omigov_vv@vector.nsc.ru

Пьянков Олег Викторович, к.б.н., ORCID: 0000-0003-3340-8750, e-mail: pyankov_ov@vector.nsc.ru

Зайковская Анна Владимировна, к.б.н., ORCID: 0000-0002-0450-5212, e-mail: zaykovskaya_av@vector.nsc.ru

Боднев Сергей Александрович, к.м.н., ORCID: 0000-0003-0599-3817, e-mail: bodnev_sa@vector.nsc.ru

Шульгина Ирина Сергеевна, ORCID: 0000-0002-6850-338X, e-mail: shulgina_is@vector.nsc.ru

Савченко Сергей Владимирович, д.м.н., ORCID: 0000-0002-8525-5883, e-mail: dr.serg62@yandex.ru

Грицингер Валентина Александровна, к.м.н., ORCID: 0000-0003-4119-3569, e-mail: v.gritcinger@mail.ru

Таранов Олег Святославович, ORCID: 0000-0002-6746-8092, e-mail: taranov_os@vector.nsc.ru

Айдагулова Светлана Владимировна, д.б.н., ORCID: 0000-0001-7124-1969, e-mail: asvetvlad@yandex.ru

Information about the authors:

Andrey V. Shipovalov, ORCID: 0000-0003-1201-8307, e-mail: shipovalov_av@mail.ru

Gleb A. Kudrov, ORCID: 0000-0002-8251-7040, e-mail: kudrov_ga@vector.nsc.ru

Elena K. Ivleva, ORCID: 0000-0003-1194-7219, e-mail: ivleva_ek@vector.nsc.ru

Vladimir V. Omigov, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-2028-6099, e-mail: omigov_vv@vector.nsc.ru

Oleg V. Pyankov, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0003-3340-8750, e-mail: pyankov_ov@vector.nsc.ru

Anna V. Zaykovskaya, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-0450-5212, e-mail: zaykovskaya_av@vector.nsc.ru

Sergey A. Bodnev, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-0599-3817, e-mail: bodnev_sa@vector.nsc.ru

Irina S. Shulgina, ORCID: 0000-0002-6850-338X, e-mail: shulgina_is@vector.nsc.ru

Sergey V. Savchenko, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-8525-5883, e-mail: dr.serg62@yandex.ru

Valentina A. Gritcinger, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-4119-3569, e-mail: v.gritcinger@mail.ru

Oleg S. Taranov, ORCID: 0000-0002-6746-8092, e-mail: taranov_os@vector.nsc.ru

Svetlana V. Aidagulova, doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0001-7124-1969, e-mail: asvetvlad@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.01.2025

После доработки 27.03.2025

После повторной доработки 03.06.2025

Принята к публикации 03.06.2025

Received 30.01.2025

Revision received 27.03.2025

Second revision received 03.06.2025

Accepted 03.06.2025