

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИТОГИ ИЗУЧЕНИЯ ОСНОВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ COVID-19

Л.В. Курлаева¹, К.Б. Степанова^{1,2}, Т.Ф. Степанова¹, Г.А.Кальгина¹, С.А. Григорьева¹, Ц.А. Панина¹, О.Н.Сидоренко¹, О.Н. Сияюткина², Е.Н. Семенюк².

¹«Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, г. Тюмень

²ГБУЗ ТО «Областная клиническая инфекционная больница », г. Тюмень

Комплексная оценка основных показателей иммунной системы пациентов с новой коронавирусной инфекцией показала их разнонаправленные изменения. При индивидуальном анализе иммунологических показателей вирусных больных у 24% выявлена лейкопения, у 14 % абсолютная лимфопения, что является проявлением иммунодефицитного состояния. Высокие значения фагоцитарной активности нейтрофилов, уровня миелопероксидазы, концентрации интерлейкина-8 указывают на активацию врожденного иммунитета. Натуральные киллеры как представители неспецифического иммунитета изменяются в противоположном направлении: абсолютное количество НК снижается в 1,9 раза ($p > 0,05$). Это может ослабить иммунную защиту, которую осуществляют основные клетки противовирусного иммунитета.

ВВЕДЕНИЕ.

Важным моментом в обследовании инфекционного больного является определение общей иммунореактивности организма с целью прогнозирования заболевания, определения риска развития осложнений, а

также своевременного включения в комплекс лечебных мероприятий методов иммунотерапии [16]. Некоторые зарубежные авторы [14,15] отмечают тенденцию к резкому снижению количества В-клеток, Т-клеток и НК-клеток в крови пациентов с COVID-19. Это является тревожным фактором при вирусных инфекциях, так как снижение основных иммунологических показателей, указывает на более длительное и тяжелое течение инфекционного заболевания [5]. Проведен анализ различных данных по вопросам формирования иммунного ответа у больных COVID-19. Показано [1], что в целом иммунный ответ при COVID-19 развивается преимущественно по клеточному типу. Гуморальный иммунный ответ, связанный с продукцией вируснейтрализующих антител, обеспечивает защиту от инфекции в дальнейшем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

В работе приведены и проанализированы результаты основных иммунологических показателей у 25 больных с новой коронавирусной инфекцией в возрасте от 18 до 72 лет, находящихся на лечении в областной инфекционной клинической больнице г. Тюмени. На момент обследования у всех пациентов была средняя степень тяжести течения заболевания. Диагноз новой коронавирусной инфекции COVID -19 подтвержден исследованием биоматериала методом ПЦР на выявление РНК SARS COV-2.

Целью данного исследования явилось выявление закономерности иммунного ответа у пациентов с новой коронавирусной инфекцией.

Показатели представлены на начало этиотропного лечения. Контрольную группу составили здоровые люди г. Тюмени.

Иммунный статус исследовали с использованием современных методов. Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитометре (FC-500) с помощью моноклональных антител Beckman Coulter к маркерам: CD3 +, CD4 +, CD8 +, CD19+, NK+ и HLA-DR+[10]. Общий анализ крови пациентов с лейкоцитарной формулой. Фагоцитарная активность нейтрофилов (ФАН) определялась по способности клеток поглощать частицы латекса с $d=10\text{мкм}$ (ООО «ДИАЭМ», Москва).

Уровень миелопероксидазы нейтрофилов (МП) выявляли спектрофотометрическим методом. Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) определяли методом преципитации раствором ПЭГ-6000, с оценкой результата на спектрофотометре. Для изучения гуморального звена иммунитета исследовали концентрацию сывороточных иммуноглобулинов (Ig) классов G, M и A методом ИФА.

Изучали концентрацию основных цитокинов (интерлейкинов IL): IL-4, IL-8, IL-10 и интерферона - γ (INF- γ), а также уровень специфических иммуноглобулинов M и G к SARS-CoV-2.

Для определения концентрации цитокинов, иммуноглобулинов и специфических иммуноглобулинов к SARS-CoV-2 использовались тест-системы производства Вектор- Бест (г. Новосибирск).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Для оценки иммунного реагирования у пациентов с Covid-19 рассмотрено общее количество лейкоцитов. Усредненные данные не обнаружили статистически значимых различий у больных с показателями в группе сравнения. Однако, несмотря на то, что в исследуемой группе среднее значение

лейкоцитов составило 5157 ± 383 кл/мкл, что соответствует норме (4000 -10000 кл/мкл.), у 24% обследуемых выявлена лейкопения (от 3700 до 2000 кл/мкл.).

Анализ процентного содержания лимфоцитов выявил среднее значение у пациентов ($31,90 \pm 2,67\%$), что не выходит за пределы общеустановленной нормы (20-40%), и не отличается от показателей в контрольной группе ($36,3 \pm 2,4\%$). При этом у 29% обследуемых людей установлено процентное снижение количества лимфоцитов в интервале от 19,0 до 10,0.

У 14% больных с новой коронавирусной инфекцией обнаружено снижение абсолютного количества лимфоцитов ниже 1000 кл/мкл (при норме от 1000 до 4000 кл/мкл). Подтверждают наши исследования зарубежные работы [14], указывающие на более тяжелое течение Covid-19 у людей с наличием лимфоцитопении.

При исследовании показателей, характеризующих состояние фагоцитарного звена иммунной системы, у больных с коронавирусной инфекцией обнаружено достоверное повышение поглотительной активности нейтрофилов $84 \pm 2,2\%$, против $75 \pm 1,0\%$ в группе сравнения ($p < 0,001$). Анализ концентрации миелопероксидазы у вирусных больных выявил повышение активности этого фермента до $351 \pm 29,4$ у.е. ($218 \pm 14,2$ у.е. у здоровых людей; $p < 0,05$).

У обследуемых больных уровень ЦИК остается в пределах нормы и составляет $43,52 \pm 3,98$ у.е., не отличаясь от цифрового значения в группе контроля ($40 \pm 4,2$ у.е.). Существует мнение [8], что при чрезмерном количестве антигена, избыточном формировании иммунных комплексов и их неэффективной

элиминации может возникнуть болезнь иммунных комплексов (гиперчувствительность III типа). В нашем случае нормальный уровень ЦИК при коронавирусной инфекции можно объяснить наличием функционально полноценных фагоцитов, в полной мере справляющихся со своей задачей.

Исследования популяционного состава лимфоцитов выявили изменения в Т-звене иммунной системы: наблюдается некоторое увеличение процентного количества Т-лимфоцитов (CD3+) $79 \pm 1,3\%$ по сравнению с группой контроля $72,9 \pm 2,6\%$, которое происходит за счет субпопуляции Т-хелперов (CD4 +). Это соответствует представлению об иммунном ответе в начале вирусного заболевания, т.к. Т-хелперные клетки являются одними из основных участников иммунного ответа при вирусных инфекциях. Содержание Т-хелперных клеток достигает $48,48 \pm 1,35\%$ у исследуемых больных по сравнению с указанным показателем в группе здоровых лиц $40,0 \pm 2,2\%$ ($p < 0,001$). Это можно расценить как благоприятный фактор в развитии иммунного ответа на новый вирусный патоген. Абсолютное число CD4 + в исследуемой группе достоверно не отличается от значения у здоровых людей.

При анализе маркера поздней активации клеток **HLA-DR+**, выявляется значительное повышение (в 2,5 раза) этого показателя в процентном отношении. В группе пациентов, инфицированных коронавирусом, значение HLA-DR+ достигает $10,28 \pm 1,22\%$ против $4,1 \pm 1,3\%$ в группе здоровых лиц ($p < 0,01$). Данное исследование свидетельствует об активации CD4+.

NK (CD16+56+) клетки являются одной из важных популяций иммунной системы, отвечающих за противовирусный иммунитет [14]. Основная функция натуральных киллеров — цитолиз клеток, несущих признаки трансформации, инфицирования или клеточного стресса [12]. Отмечается **значительное уменьшение CD16+56+** у лиц с коронавирусной инфекцией: процентное содержание NK снижено на 50,0%, а абсолютное количество - почти в 2 раза ($p > 0,05$). Эти изменения негативно отразятся на иммунном ответе больных людей.

В-лимфоциты (CD19+) - основные клетки иммунной системы, на поверхности которых находятся рецепторы для распознавания антигенов, являющиеся молекулами иммуноглобулинов. После взаимодействия рецептора с антигеном В-лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки, секретирующие иммуноглобулины — молекулы, способные связывать соответствующий антиген, т.е. являются антителами [12].

У обследуемых пациентов среднее значение CD19+ как в процентном ($10,04 \pm 1,12\%$), так и в абсолютном значении ($173,59 \pm 26,19$ кл/мкл.) достоверно не отличается от установленной нормы и показателей здоровых лиц - $12,6 \pm 1,9\%$ и $249,9 \pm 60,3$ кл/ мкл (соответственно). Однако у некоторых пациентов отмечается резкое снижение этих клеток. У 32% больных относительное содержание CD19+ снижается ниже 7% (при норме от 7% до 17%). В отдельном случае этот показатель составил 3%. У 28% пациентов абсолютное содержание CD19+ снижается ниже 111 кл/мкл (при норме 111-376 кл/мкл). Минимальное абсолютное значение составило 38 кл/мкл.

У людей с коронавирусной инфекцией выявлено увеличение концентрации всех исследуемых иммуноглобулинов: класс G, A и M. Содержание IgG в сыворотке крови вирусных пациентов составило $14,54 \pm 1,23$ ме/мл, что значительно выше показателя здоровых лиц ($10,6 \pm 1,2$ ме/мл; $p < 0,001$). Достоверно повышается концентрация IgA: $3,63 \pm 0,39$ ме/мл у пациентов с Covid-19 против $1,4 \pm 0,1$ ме/мл ($p < 0,001$) в контрольной группе. Уровень IgM у пациентов достигает $2,1 \pm 0,18$. Это существенное увеличение показателя в сравнении с таковым в группе контроля ($1,3 \pm 0,2$; $p < 0,01$).

Корреляция между образованием специфических антител к SARS-CoV-2 и количеством В-лимфоцитов.

Обнаружена положительная корреляция между образованием специфических антител к SARS-CoV-2 и количеством В-клеток. Корреляция между CD19+% и иммуноглобулином класса М к SARS-CoV-2 равна 0,34. Между CD19+абсолютное количество и иммуноглобулином класса М к SARS-CoV-2 корреляция не обнаружена. Корреляция между CD19+% и иммуноглобулином класса G к SARS-CoV-2 равна 0,34. Между CD19+абсолютное количество и иммуноглобулином класса G к SARS-CoV-2 корреляция равна 0,5. На основании вышеизложенного можно предположить, что у некоторых инфицированных новой коронавирусной инфекцией продукция специфических антител снижена или отсутствует из-за резкого снижения количества В-лимфоцитов как в относительном, так и в абсолютном значении.

Определение цитокинового статуса пациентов с COVID-19 выявило изменение концентрации провоспалительного

интерлейкина-8 в группе вирусных пациентов: значение ИЛ-8 в 10 раз превысило нормальное значение ($20,43 \pm 6,11$ пг/мл против $2,0 \pm 0,2$ пг/мл ($p < 0,001$)).

У инфицированных пациентов уровень ИЛ-4 увеличен в 5,2 раза в сравнении со здоровыми людьми ($p > 0,05$). Основная функция противовоспалительного цитокина ИЛ-4 — контроль пролиферации, дифференцировки и функций В-лимфоцитов, т.е. антительного ответа [6]. Интерлейкин-4 повышает выживаемость пре В-клеток: в отсутствие нормального уровня ИЛ-4 они подвергаются программированной гибели — апоптозу [8]. Возможно, одной из причин значительного снижения В-лимфоцитов у некоторых больных с коронавирусной инфекцией является недостаточная продукция ИЛ-4 при наличии вируса в организме.

Обращает на себя внимание низкая концентрация ИЛ-10: в группе больных с коронавирусной инфекцией он составляет $0,6 \pm 0,26$ пг/мл против $2,0 \pm 0,2$ пг/мл ($p < 0,001$) у здоровых лиц. Разница концентрации между группами составляет 3,3 раза. Возможно, вирус блокирует или снижает продукцию интерферонов (IFN) на этапе неконтролируемой вирусной репликации [1]. ИЛ-10 «придает» клеткам непермиссивность для репликации вируса, оказывает необратимое цитотоксическое действие на трансформированные клетки, тогда как его цитостатическое влияние на нормальные клетки обратимо [9]. Снижение концентрации этого интерлейкина является неблагоприятным фактором при борьбе с вирусным антигеном, особенно при осложненном течении заболевания. Уровень ИЛ-10 в исследуемой группе стабилен и не отличается от контрольного значения.

Заключение.

Комплексная оценка основных показателей иммунной системы пациентов с новой коронавирусной инфекцией показала их разнонаправленные изменения. При индивидуальном анализе иммунологических показателей вирусных больных у 24% выявлена лейкопения, у 14 % абсолютная лимфопения, что является проявлением иммунодефицитного состояния [4]. Высокие значения фагоцитарной активности нейтрофилов, уровня миелопероксидазы, концентрации интерлейкина-8 указывают на активацию врожденного иммунитета [3]. Натуральные киллеры как представители неспецифического иммунитета изменяются в противоположном направлении: абсолютное количество НК снижается в 1,9 раза ($p > 0,05$). Это может ослабить иммунную защиту, которую осуществляют основные клетки противовирусного иммунитета.

Выявленное относительное увеличение Т-лимфоцитов, достоверное повышение Т-хелперов и Т-активных лимфоцитов указывает на течение иммунного ответа с преимущественным участием Th-1 типа на новый вирусный антиген [5,11]. Низкое содержание INF- γ обусловлено, по всей видимости, сниженным числом натуральных киллеров. Уменьшение уровня INF- γ в группе вирусных больных, а также недостаточное относительное и абсолютное количество лимфоцитов у некоторых пациентов, может неблагоприятно сказаться на образовании вируснейтрализующих антител и течение заболевания.

Содержание иммуноглобулинов служит основным показателем состояния гуморального иммунитета [7]. У пациентов с COVID-19 наблюдается его напряжение: повышение уровня IgM указывает на острый воспалительный инфекционный процесс. Увеличение концентрации IgA у

пациентов может свидетельствовать о поражении слизистых оболочек. Уровень IgG также увеличен значительно выше нормального значения. Высокая концентрация ИЛ-4 у вирусных больных свидетельствует и об умеренной активации Т-хелперов 2 типа. В результате концентрация иммуноглобулинов всех исследуемых классов значительно увеличивается, т.е. компоненты гуморального звена иммунной системы активно включаются в иммунный ответ. Проанализированные исследования [1] показывают, что SARS-CoV-2 особенно приспособлен для уклонения от иммунной системы хозяина и препятствует своевременному запуску механизмов защиты последним. Учитывая полученные результаты и литературные данные, возникает необходимость в индивидуальном анализе показателей иммунной системы у больных с Covid-19 для более эффективного лечения.

Список литературы.

- 1.Бугоркова С.А. 2020. Некоторые аспекты формирования иммунного ответа у пациентов с COVID-19. COVID-19 PREPRINTS. MICROBE.RU.<https://doi.org/10.21055/preprints-3111717>.
- 2.Земсков А.М. Дополнительные методы оценки иммунного статуса // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009 – № 3 – С. 34–35.
- 3.Земсков А.М. Клиническая иммунология: учебник / под ред. А.М. Земскова. -М.: ГЭОТАР - Медиа, 2008 - 432 с.
- 4.Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. -М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014 -760 с.
5. Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Мешкова Р. Я. Клиническая

иммунология и аллергология с основами общей иммунологии: учебник

-М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011 -640 с.

6. Козлов В.А. Некоторые аспекты проблемы цитокинов // Цитокины и

воспаление. 2002; 1(1). – С. 5—8.

7. Майоров Р.В., Нусинов Е.В. Методы оценки иммунного статуса //

Рекомендации для студентов. Тверь Т: ТГМА, 2012 — 15 с.

8. Назаренко Г. И., Кишкун А. Клиническая оценка результатов

лабораторных исследований. — М.: Медицина. —2000. — 533с.

9. Соколов Е.И. Клиническая иммунология: Руководство для врачей// под

ред. Е.И. Соколова. - М.: Медицина. 1998 - 327 с.

10.Стандартизация аналитических технологий лабораторной медицины.

Выпуск 2. Под ред. В.В. Меньшикова.-М.: Медицина.-2013.-с.8-39.

11. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. Норма и

патология. Учебник. -3-е изд., М., Медицина, 2010 -752 с.

12.Ярилин А. А. Иммунология – М.: ГЭОТАР - Медиа, 2010 – 752 с.

13 Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y., Xie C., Ma K., Shang K.,

Wang W., Tian D.S. Dysregulation of immune response in patients with

COVID-19 in Wuhan, China. ClinInfect Dis. 2020 Mar 12 pii: ciaa248. doi:

10.1093/cid/ciaa248.

14. Sheng Zhagn, Danping Li, Huazhong Chen, Dan Zheng, Yiping Zhou, Baoguo Chen, Weiwu Shi, Ronghai Lin. Dynamic Inflammatory Response in a Critically Ill COVID-19 Patient Treated With Corticosteroids. Case Reports.

2020; 25;49(2):220-226.

15. Xu B, Fan CY, Wang AL, Zou YL, Yu YH, He C, Xia WG, Zhang JX, Miao

Q. Suppressed T cell-mediated immunity in patients with COVID-19: A clinical retrospective study in Wuhan, China. *J Infect.* 2020 Jul;81(1):e51-e60. doi:10.1016/j.jinf.2020.04.012. Epub 2020 Apr 18

16. <https://immuninfo.ru/immunologiya/protivoinfekcionnyj-immunitet/immunodiagnostika-infekcionnyx-zabolevanij-i-zadachi-skrininga-immuniteta/>