

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КУБГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ)

*На правах рукописи*

Матушкина Валерия Александровна

**ВАРИАТИВНОСТЬ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННЫХ  
ИММУНОДИСРЕГУЛЯТОРНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ НОВОЙ  
КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (COVID-19)  
И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ВЫРАЖЕННОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ**

3.1.22. Инфекционные болезни

3.2.7. Иммунология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата  
медицинских наук

Научные руководители:

Городин Владимир Николаевич,  
доктор медицинских наук, профессор;

Нестерова Ирина Вадимовна,  
доктор медицинских наук, профессор

Краснодар – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	17
1.1 Противовирусный иммунитет и стратегии уклонения от иммунитета SARS-CoV-2.....	17
1.2 Цитокиновый профиль при COVID-19 .....	22
1.3 Роль нейтрофильных гранулоцитов в противовирусном иммунитете и иммунопатогенезе COVID-19 .....	29
1.4 Терапевтические стратегии, направленные на дисфункции нейтрофильных гранулоцитов при COVID-19 .....	38
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	46
2.1 Объект исследования .....	46
2.2 Методы исследования.....	50
2.2.1 Оценка клинического статуса и тяжести течения заболевания .....	50
2.2.2 Лабораторные методы исследования .....	51
2.2.2.1 Общий анализ крови с определением содержания NETs и клеток в апоптозе.....	51
2.2.2.2 Биохимический анализ сыворотки крови.....	52
2.2.3 Иммунологические методы исследования .....	53
2.2.3.1 Определение концентрации иммуноглобулинов А, М, G .....	53
2.2.3.2 Определение концентрации системы интерферонов, про- и противовоспалительных цитокинов.....	53
2.2.3.3 Определение субпопуляций лимфоцитов в периферической крови .....	53
2.2.3.4 Фенотипирование субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов .....	54
2.2.3.5 Определение NADPH-оксидазной активности нейтрофильных гранулоцитов.....	56
2.2.4 Культуральные методы.....	58
2.2.5 Статистические методы.....	59

ГЛАВА 3 КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ СО СРЕДНЕТЯЖЁЛОЙ И ТЯЖЁЛОЙ ФОРМАМИ COVID-19 В ОСТРЫЙ ПЕРИОД БОЛЕЗНИ.....	60
3.1 Клиническая характеристика пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19 .....	60
3.2 Клинико-лабораторные показатели пациентов со среднетяжёлой .....	70
и тяжёлой формами COVID-19 в острый период заболевания .....	70
ГЛАВА 4 ВАРИАТИВНОСТЬ ДИСРЕГУЛЯТОРНЫХ НАРУШЕНИЙ ОСНОВНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19.....	77
4.1 Дисбаланс системы интерферонов и про- и противовоспалительных цитокинов у пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19.....	77
4.2 Дисфункции клеточного и гуморального иммунитета при среднетяжёлой и тяжёлой формах COVID-19, ассоциированные с блокадой системы интерферонов.....	84
4.3 Дисфункции системы нейтрофильных гранулоцитов при среднетяжёлой и тяжёлой формах COVID-19, индуцированные дисбалансом провоспалительных нейтрофил-ассоциированных цитокинов и дефицитом интерферона альфа.....	94
4.3.1 Содержание и фенотип субпопуляции $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ , $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ , $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$ нейтрофильных гранулоцитов при среднетяжёлой и тяжёлой формах COVID-19.....	96
4.3.2 Содержание и фенотип субпопуляции $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^-$ и $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^+$ нейтрофильных гранулоцитов при среднетяжёлой и тяжёлой формах COVID-19.....	101
4.4 Дефекты эффекторных функций нейтрофильных гранулоцитов при среднетяжёлой и тяжёлой формах COVID-19.....	107
ГЛАВА 5 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ФЕНОТИПОВ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ И ИММУНОКОРРЕКЦИЯ ИХ ЭФФЕКТОРНЫХ ФУНКЦИЙ В СИСТЕМЕ IN VITRO У ПАЦИЕНТОВ СО СРЕДНЕТЯЖЁЛОЙ ФОРМОЙ COVID-19.....	113

5.1	Эффекты влияния рекИФН $\alpha 2b$ на количество и фенотип функционально-значимых субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19 в системе <i>in vitro</i> .....	113
5.1.1	Эффекты влияния рекИФН $\alpha 2b$ на количество и фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов, экспрессирующих рецепторы к IFN I и II типов, CD16 при среднетяжёлой форме COVID-19 .....	113
5.1.2	Эффекты влияния рекИФН $\alpha 2b$ на количество и фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD16 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD63 <sup>-</sup> и CD16 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD63 <sup>+</sup> при среднетяжёлой форме COVID-19 .....	121
5.1.3	Влияние рекИФН $\alpha 2b$ на эффекторные функции нейтрофильных гранулоцитов при среднетяжёлой форме COVID-19 .....	126
5.2	Эффекты гексапептида - аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина на нейтрофильные гранулоциты при среднетяжёлом течении COVID-19 в системе <i>in vitro</i> .....	129
5.2.1	Эффекты влияния гексапептида на количество и фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов, экспрессирующих рецепторы к IFN I и II типов, CD16 при среднетяжёлой форме COVID-19 .....	130
5.2.2	Эффекты влияния гексапептида на количество и фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD16 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD63 <sup>-</sup> и CD16 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD63 <sup>+</sup> при среднетяжёлой форме COVID-19 .....	135
5.3	Влияние гексапептида на эффекторные функции нейтрофильных гранулоцитов при среднетяжёлой форме COVID-19 .....	139
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	144
	ВЫВОДЫ .....	156
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	158
	ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ .....	158
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	159
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	160

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Коронавирус (SARS-CoV-2), обладая широким тканевым тропизмом, тенденциями эволюционировать в варианты с высокой трансмиссивностью и способностью нарушать и использовать в своих целях иммунный ответ (ИО), обуславливает непредсказуемость исхода, представляя собой серьезную проблему, что, вероятно, увековечит пандемию COVID-19 [175, 188]. Поскольку инфекции, вызываемые вирусом SARS-CoV-2, продолжают все еще возникать, актуальным является не только углубленное изучение патофизиологии COVID-19, но и разработка новых терапевтических подходов к лечению этого сложного заболевания.

Многочисленными исследованиями доказано, что тяжесть и исходы COVID-19 связаны с иммунными реакциями организма, часто неуправляемыми и неконтролируемыми, что подчеркивает настоятельную необходимость дальнейшего изучения и понимания всего спектра иммунных дисрегуляторных нарушений, вызванных вирусом SARS-CoV-2 [58, 90, 95, 212, 296, 298, 363].

Известно, что основные механизмы противовирусной защиты после контакта с вирусным патогеном развивают ИО по классическому сценарию. Первой реагирует система интерферонов (IFN), затем включаются естественные киллерные клетки (ЕКК) и цитотоксические  $CD3^+CD8^+$ Т лимфоциты (ЦТЛ) [354]. ЕКК первыми вырабатывают провоспалительные цитокины (IFN $\gamma$ , хемокины MIP-1 $\alpha/\beta$ , RANTES), вовлекая в ИО моноциты/макрофаги, дендритные клетки (ДК) и нейтрофильные гранулоциты (НГ) [275]. Далее противовирусная активность усиливается эффекторными ЦТЛ, которые осуществляют цитолиз вирусинфицированных клеток и продуцируют цитокины, в первую очередь - регуляторный IFN $\gamma$  [40, 164, 298]. IFNs являются ключевыми

факторами, связывающими между собой механизмы реагирования врожденной и адаптивной иммунной системы. IFN I типа активируют противовирусную активность в инфицированных и неинфицированных клетках, ограничивая распространение инфекции, включая презентацию антигена и функции ЕКК, инициируют работу адаптивной ИС и формируют высокоспецифические Т- и В-клеточные ответы [342]. IFN $\gamma$ , обладая опосредованной противовирусной активностью, мобилизует многие клетки, осуществляющие противовирусную защиту: Т хелперы 1 (Тх), секретирующие провоспалительные цитокины, и Т регуляторные клетки (Трег) [338].

SARS-CoV-2 способен ингибировать передачу сигналов и индукцию IFN I типа, используя несколько механизмов [204]. Паралич ответа IFN I типа на SARS-CoV-2 признают как иммунную сигнатуру COVID-19, которая взаимосвязана с тяжестью заболевания [180, 253]. Показано, что при COVID-19 имеет место нарушение количества и функциональной активности ЕКК, Тх, Тцтл, Трег клеток. На этом фоне повышается репликативная активность SARS-CoV-2, и инфекция приобретает неконтролируемый характер. За счет гиперактивации макрофагов (МФ) имеет место усиление синтеза провоспалительных цитокинов, что в ряде случаев приводит к развитию «цитокинового шторма». Повышенные концентрации в сыворотке крови и тканях IL1 $\beta$ , IL6, G-CSF и TNF $\alpha$  способствуют развитию нейтрофилёза и гиперактивации НГ, которые вызывают тяжёлые осложнения у пациентов с COVID-19 [90, 119, 160, 204]. По мнению Mc.Kenna E. синтезируемые НГ *de novo* цитокины и хемокины также способствуют развитию осложнений COVID-19 [237].

При этом, следует подчеркнуть, что НГ обладают противовирусной активностью и проявляют интенсивный ответ на различные вирусы, реализуя эффекторные функции путем фагоцитоза вирионов и апоптотических телец, содержащих вирус [246], дегрануляции содержимого гранулярного аппарата, активных форм кислорода (АФК), активации NADPH-оксидаз, образования

нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (neutrophil extracellular traps - NETs) [8, 90, 92, 237].

НГ, являясь многофункциональными клетками, действуют не только как эффекторы врожденного иммунитета, но и как регуляторы адаптивных иммунных процессов, и их нормальное функционирование на микробные патогены способствует регрессии инфекционно-воспалительных процессов, в тоже время, дисфункции могут приводить к развитию различных иммунозависимых заболеваний [18, 22, 23, 36, 38]. Так, дефицит количества и нарушение функциональной активности НГ может приводить к формированию нетипично-протекающих заболеваний, с другой стороны, нейтрофилёз и гиперактивация НГ, повышенное образование NETs приводят к возникновению нетопатий, сопровождающихся тяжелым повреждением тканей различных органов, формированию иммунотромбозов мелких и крупных сосудов, развитию эндотелиита и васкулита [8, 18, 22, 23, 36, 38, 315]. При COVID-19 установлено, что нейтрофилёз и повышенное формирование NETs у пациентов коррелирует с развитием острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), тромбозов, мультисистемного воспаления [156, 231, 237]. Принимая во внимание транскрипционное и функциональное разнообразие НГ, наличие гетерогенных субпопуляций с разным функциональным потенциалом, углубленное изучение роли НГ позволит получить новые данные о механизмах иммунопатогенеза заболеваний, лежащих в основе разнообразных клинических проявлений COVID-19, и может явиться обоснованием для дальнейшей разработки таргетных терапевтических стратегий [18, 22, 23, 36, 38, 196, 217, 238, 310].

Выше изложенное позволяет предположить, что нацеленная иммунокоррекция дефектного функционирования НГ, их гиперактивации, обуславливающей гипервоспаление, и учитывая регуляторные функции НГ, позволит также восстановить баланс базисных противовирусных механизмов ИС.

## Степень разработанности темы исследования

Пандемия, вызванная вирусом SARS-CoV-2, послужила стимулом для изучения функционирования противовирусного иммунитета при различных клинических формах COVID-19. Показано, что при тяжелой форме COVID-19 обострение легочной и системной воспалительной реакции сопровождается повышенным уровнем СРБ, лактатдегидрогеназы, ферритина, D-димера, IL6 [87, 102], приводящих к гиперцитокинемии [159, 260]. Описаны профили про- и противовоспалительных цитокинов [81, 83, 90]. Выявлена лимфопения, обусловленная снижением Т-клеток, более выраженная при тяжелом течении [48, 80, 303]. Установлены механизмы уменьшения количества Т-клеток: прямое инфицирование SARS-CoV-2 через мембранный спайковый белок CD147(EMMPRIN) [78, 289]; некроз, апоптоз, пироптоз, индуцированные TNF $\alpha$ , IL6, IL1 $\beta$  [80, 274, 319, 334]; рециркуляция в участки инфекции, удержание в лимфоидных органах, прикрепление к эндотелию под влиянием TNF $\alpha$  и IFN I типа [255, 304]; уменьшение количества и нарушение функционирования Т лимфоцитов из-за снижения продукции IFN I типа [130, 131, 180, 274]. IFN I типа, иницируя синтез хемокинов (CCL2, CXCL10), способствуют включению в ИО моноцитов/МФ, Т-клеток, ЕКК, ДК, НГ, влияя на позитивный исход воспаления в ткани легких [55].

Показано, что COVID-19 характеризуется повышенным числом НГ, а соотношение НГ к лимфоцитам коррелирует с тяжестью заболевания, являясь предиктором неблагоприятного исхода [237]. Известно, что НГ выделяют цитокины и хемокины, которые способствуют поддержанию воспаления при COVID-19, а АФК и NETs участвуют в повреждении тканей [92, 182, 205]. Появились клинические отчеты терапевтического воздействия на НГ, нацеленные на цитокины - ингибиторы IL6 (олокизумаб), которые снижают выживаемость НГ, высвобождение НГ из костного мозга и демаргинацию легких [132, 228]. Спектр работ посвящен иммунопатогенезу гипервоспаления,



вызванного образованием NETs и гипотезам возможной терапии, нацеленной на снижение их образования [234, 293]. Выявлено, что патофизиология тяжелой формы COVID-19 характеризуется изменением количества, фенотипа и функциональности НГ [17, 182]. Эти результаты важны для понимания многих аспектов участия НГ в COVID-19 и требуют дальнейшего исследования.

Изучение молекулярных механизмов, связанных с дисрегуляцией ИО при COVID-19, и особенно функционирования НГ, является актуальным и представляет несомненный теоретический и практический интерес.

### **Цель исследования**

Оптимизация диагностики и иммунокоррекции новой коронавирусной инфекции (COVID-19) на основе клинко-экспериментального изучения вариантов иммунопатогенетических дисрегуляторных нарушений.

### **Задачи исследования**

1. Определить клинко-лабораторные особенности среднетяжёлой и тяжёлой форм COVID-19, характерные для острого периода болезни (7-10 сутки).
2. Провести сравнительный анализ наиболее значимых клинко - иммунологических показателей среднетяжёлой и тяжёлой форм COVID-19
3. Выявить ранние диагностические критерии тяжести течения острого инфекционного процесса при COVID-19.
4. Изучить состояние врожденного и адаптивного иммунитета, определить особенности противовирусной иммунной защиты для уточнения имеющихся дефектов иммунной системы при среднетяжёлой и тяжёлой формах COVID-19.
5. Оценить иммуномодулирующие эффекты иммуотропных субстанций рекомбинантного интерферона альфа 2b и синтетического тимического гексапептида при COVID-19 среднетяжелого течения в эксперименте *in vitro*.

### Научная новизна исследования

Детектированы новые ранние диагностические критерии COVID-19: для среднетяжелой формы - повышение количества нейтрофильных гранулоцитов, сформировавших NETs 3,5 (2,5-4,0)% и вступивших в апоптоз 3,0 (3,1-3,5)%, уровней IL17A в 2,4 раза, IL18 в 2 раза, IL8 в 2 раза и снижение интеграционного диагностического критерия (ИДК) до 11,6 (8,8 - 13,6); для тяжелой формы - увеличение доли нейтрофильных гранулоцитов, сформировавших NETs до 13,0 (9,0-16,0)% и вступивших в апоптоз до 12,0 (10,0; 16,5)%, уровней IL18 в 3 раза, IL17A в 8 раз и IL8 в 8 раз и снижение ИДК до 3,2 (2,5-7,5) относительно показателей условно-здоровых лиц.

Разработан *de novo* интеграционный диагностический критерий (ИДК) тяжести инфекционно-воспалительного процесса с учетом НГ, формирующих NETs, и НГ в состоянии патологического апоптоза в периферической крови, планируется регистрация в Федеральной службе по интеллектуальной собственности (ФИПС) в качестве программы для ЭВМ.

Выявлены индикаторные биомаркеры тяжести заболевания и развития осложнений: протромботического состояния, иммунотромбоза и эндотелиита сосудов - высокие уровни нейтрофил-ассоциированных цитокинов IL8, IL18, IL17A и VEGFA.

Впервые выявлены дефекты экспрессии функционально-значимых рецепторов лимфоцитов: CD16/CD56 (ЕКК), CD3 (Тл), CD4 (Тх), CD8 (Т<sub>цтл</sub>), CD19 (Вл) при COVID-19.

Получены новые данные о негативной трансформации фенотипов и изменения содержания субпопуляций НГ CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>, связанные со снижением фагоцитарной функции, гиперактивацией NADPH-оксидаз, индукцией формирования NETs.

Определены дополнительные диагностические критерии тяжести COVID-19: повышение содержания субпопуляций НГ с фенотипом

CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>bright</sup> с высокой цитотоксической активностью и повышенной способностью формирования NETs при среднетяжёлой форме до 12,0 - 20,3% и при тяжёлой форме до 26,4 - 42,2%; субпопуляции с фенотипом CD16<sup>dim</sup>CD62L<sup>dim</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup> и функцией супрессирования Т лимфоцитов при среднетяжёлой форме до 13,3-22,5% и при тяжёлой форме до 23,9-40,9%.

Впервые установлены выраженные модулирующие эффекты *in vitro* синтетического тимического гексапептида и рекомбинантного ИФН $\alpha$ 2b, способствующие восстановлению негативно измененного фенотипа функционально-значимых субпопуляций, устранению дефектов фагоцитарной и микробицидной активности НГ, ограничению процессов формирования NETs и апоптоза у пациентов со среднетяжёлой формой течения COVID-19.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Выявленный комплекс взаимосвязанных нарушений системы интерферонов, ЕКК клеток, Т-лимфоцитов и нейтрофил-ассоциированных цитокинов и НГ при COVID-19 расширяет представление о механизмах иммунопатогенеза заболевания, лежащих в основе разных клинических проявлений COVID-19, что является обоснованием для дальнейшей разработки таргетных терапевтических стратегий.

Полученные данные о снижении плотности экспрессируемых функционально значимых молекул на ЕКК - клетках, Т и В лимфоцитах у пациентов с COVID-19, более выраженное при тяжёлой форме заболевания, дополняют имеющиеся данные о причинах дисфункций лимфоцитарного звена, возникающих под влиянием SARS-CoV-2.

Выявленные нарушения эффекторных функций НГ, ассоциированные с изменением содержания и негативной трансформацией функционально - значимых субпопуляций углубляют представление об участии НГ в противовирусном иммунитете и ведущей роли в различных клинических проявлениях, наблюдаемых при COVID-19.

Практическую значимость представляют выявленные новые ранние диагностические критерии тяжести COVID-19: расчётный интеграционный диагностический критерий (ИДК) с учетом НГ, формирующих NETs, и НГ в состоянии патологического апоптоза в периферической крови; увеличение содержания НГ субпопуляций с фенотипом  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{bright}$  с повышенной способностью формирования NETs и с фенотипом  $CD16^{dim}CD62L^{dim}CD11b^{bright}CD63^{-}$  с функцией супрессирования Т лимфоцитов. А также индикаторные биомаркеры – нейтрофил-ассоциированные цитокины IL8, IL18, IL17A, VEGFA, высокие уровни которых свидетельствуют о прогрессировании COVID-19 и возможности осложнений в виде протромботического состояния, иммуотромбоза и эндотелиита сосудов.

Полученные в системе *in vitro* данные о позитивных иммуномодулирующих эффектах влияния рекомбинантного ИФН $\alpha$ 2b и гексапептида (ГП) аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина на негативно трансформированные фенотипы функционально-значимых субпопуляций НГ и функциональную активность НГ демонстрируют возможность их применения для направленной иммунокоррекции и дают обоснование для разработки в дальнейшем таргетной иммуномодулирующей терапии с использованием лекарственных препаратов на их основе при COVID-19.

### **Методология и методы исследования**

Методология выполненного исследования основана на анализе данных отечественной и зарубежной литературы в области инфекционных болезней, иммунологии по проблемам новой коронавирусной инфекции. Работа выполнена в дизайне проспективного когортного и экспериментального в системе *in vitro* исследований. Для достижения поставленной цели был использован комплекс общенаучных подходов, включающий: аналитический метод (теоретический анализ научной литературы), диагностические методы (общеклинические,

биохимические, иммунологические, культуральные); эмпирические методы (сбор лабораторных данных, сравнение, логический анализ); современные статистические методы обработки результатов. Полученные результаты отражены в главах собственных исследований, сформулированы выводы, представлены практические рекомендации.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Острый период среднетяжёлой и тяжёлой форм COVID-19 характеризуется сходной клинической симптоматикой, развитием в 88,4% случаев синдрома системного воспалительного ответа на фоне высокой коморбидности, повышением неспецифических маркеров воспаления (СРБ, ферритина, ЛДГ, лактата, D-димера), а также ассоциированным с тяжестью течения болезни снижением величины нового интеграционного диагностического критерия (ИДК), обусловленным увеличением доли нейтрофильных гранулоцитов, сформировавших NETs и вступивших в апоптоз.

2. При среднетяжёлой и тяжёлой формах COVID-19 на фоне блокады системы IFN и гиперпродукции провоспалительных цитокинов имеют место вариативные дисрегуляторные нарушения лимфоцитарных механизмов противовирусной защиты – количественные и функциональные дефекты естественных киллерных клеток, Т лимфоцитов и их субпопуляций, негативные изменения фенотипа субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов, ассоциированные с переориентацией их функций на цитотоксические реакции и образование NETs, что способствует прогрессированию болезни и усугублению клинических проявлений COVID-19.

3. В эксперименте *in vitro* иммуотропные субстанции рекИФН $\alpha$ 2b и ГП продемонстрировали различные иммуномодулирующие эффекты, способствующие восстановлению негативно измененного фенотипа функционально-значимых субпопуляций, устранению дефектов фагоцитарной и микробицидной активности НГ, ограничению процессов формирования NETs и

апоптоза у пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19, что открывает возможные перспективы для создания новых методов иммунотерапевтической коррекции при COVID-19.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Методы расширенной оценки фенотипа субпопуляций НГ для выявления дефектов функционирования НГ, маркеры тяжести инфекционного процесса при COVID-19 используются в научно-диагностической работе Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО КубГМУ, ГБУЗ «Инфекционная больница №2» министерства здравоохранения Краснодарского края, ГБУЗ Республики Адыгея «Центральной районной больницы» Майкопского района (программа для ЭВМ находится на регистрации в Федеральной службе по интеллектуальной собственности (ФИПС)).

Результаты исследования внедрены в учебный процесс: включены в лекционный материал для студентов, ординаторов, аспирантов, слушателей циклов повышения квалификации, практических занятий на кафедрах инфекционных болезней и эпидемиологии ФПК и ППС, клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО КубГМУ, инфекционных болезней, дерматовенерологии и фтизиатрии медицинского института Майкопского государственного технологического университета. Учебное пособие утверждено ЦМС ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (Протокол № 4 от 18.04.2024 г), ISBN:978-5-903252-68-8.

### **Личное участие соискателя**

Диссертант принимал личное участие на всех этапах исследования. Самостоятельно осуществлял выполнение клинической и экспериментальной части исследования - иммунологическое обследование пациентов, вошедших в исследование, анализ и статистическую обработку данных. Под руководством научных руководителей разработана методология исследования, дизайн

исследования. Подбор клинических групп проводился автором совместно с сотрудниками ГБУЗ «Специализированная клиническая инфекционная больница» МЗ Краснодарского края, ГБУЗ «Инфекционная больница №2» министерства здравоохранения Краснодарского края. Написание текста и оформление диссертационной работы проведены лично автором под контролем научных руководителей.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность полученных результатов определяется репрезентативным объемом выборки исследуемых пациентов и проанализированных клиничко-лабораторных и иммунологических данных, их статистическим анализом, применением современных методов исследования, соответствующих поставленной цели и задачам.

Материалы диссертации представлены на Международном медицинском форуме «Вузовская наука. Инновации» (7-8 февраля, 2020 г. Москва; 28 апреля, 2022 г., г. Москва.); на EAACI Congress 2020 ( 6-8 июня, 2020 г., Лондон.); EAACI Hybrid Congress 2021 (10-12 июля, 2021г., Мадрид-Краков); EAACI Congress 2022 (1-3 июля, 2022г., Чехия, Прага); VIII Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (26-29 октября 2021 г, г. Сочи.); IX Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (8-11 ноября, 2022 г, г. Сочи); X Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (7-10 ноября, 2023 г., г. Сочи).

Апробация диссертационной работы состоялась 13 мая 2024 года, протокол №6 на совместном заседании кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки

специалистов и кафедры клинической иммунологии, аллергологии и клинической лабораторной диагностики факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и рекомендована к защите.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертационная работа соответствует паспортам научных специальностей: 3.1.22. Инфекционные болезни и 3.2.7. Иммунология.

Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, пунктам 1, 2, 3 паспорта специальности Инфекционные болезни и пунктам 2, 3, 5, 6, 7 паспорта специальности Иммунология.

### **Публикации по теме диссертационной работы**

По теме диссертационной работы опубликовано 12 научных статей, из них 7 в журналах, рекомендованных ВАК, и в базах цитирования Scopus. Количество печатных страниц – 103. Подготовлено учебное пособие.

### **Структура и объём работы**

Диссертация имеет традиционную структуру изложения, состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературных источников (364 научных работ, включающих 39 работ отечественных и 325 зарубежных авторов). Диссертация представлена на 202 страницах машинописного текста, иллюстрирована 19 таблицами, 30 рисунками.



# ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Противовирусный иммунитет и стратегии уклонения от иммунитета SARS-CoV-2

Заболевание COVID-19 представляет собой спектр клинических фенотипов. Течение заболевания варьирует от бессимптомного и легкого до состояния средней тяжести, тяжелого и крайне тяжелого с вовлечением многих различных систем органов в различных комбинациях и с различными симптомами [65, 150, 352]. Следует подчеркнуть, что у 10-20% пациентов обычно в течение недели развивается тяжелое или крайне тяжелое – критичное состояние, требующее госпитализации [86, 142, 296, 356].

Многочисленные мутации, выявленные на настоящий момент 1000 вирусных последовательностей, регистрируемых в течение пандемии, предполагают, что вирусное генетическое разнообразие и быстрая эволюция, меняющаяся инфекционность или копатогенез, способствуют инфекционности и летальности, но не обуславливают различные по тяжести клинические формы заболевания, наблюдаемые при COVID-19 [72, 129, 324].

Многочисленные исследования показали, что тяжесть и исходы COVID-19 связаны с неконтролируемыми иммунными реакциями организма пациента, что подчеркивает настоятельную необходимость дальнейшего изучения и понимания всего спектра иммунных нарушений, вызванных вирусом SARS-CoV-2 [58, 90, 95, 104, 212, 296, 298, 363].

В предупреждение ранней прогрессирующей вирусной инфекции вносят существенный вклад, прежде всего, система интерферонов (IFNs) и естественные киллерные клетки (ЕКК) -  $CD3^+CD16^+CD56^+$ .

С иммунологической точки зрения IFN-I выполняет три основные функции: активирует противовирусное состояние в инфицированных и соседних клетках, ограничивая распространение инфекции; модулирует врожденный

иммунный ответ (ИО), включая презентацию антигена и функции ЕКК, ограничивая провоспалительные пути; активирует адаптивную ИС для развития высокоаффинных антиген-специфических Т- и В-клеточных ответов [198, 342].

В дополнение к прямой противовирусной роли IFN-I имеет решающее значение в иницировании воспалительных реакций в легких, вызывая активацию ИО, который необходимо держать под контролем. Известно, что IFN-I индуцирует продукцию хемокинов CCL2 и CXCL10, которые играют важную роль в рекрутировании моноцитов / макрофагов, Т-клеток, ЕКК и дендритных клеток (ДК), поэтому напрямую влияют на воспаление в легких [55].

После первого контакта с SARS-CoV-2 эпителиальные и ДК должны секретировать адекватное количество IFN I и III типа, что способствует элиминации вируса [180]. Однако, в качестве уклонения от иммунитета SARS-CoV-2 использует многоаспектную стратегию для противодействия системе IFNs с клиническими последствиями недостаточного ответа IFN типа I [49, 173, 197, 204]. Было идентифицировано как минимум десять белков SARS-CoV-2, которые противодействуют противовирусному действию IFNs. В частности, неструктурный белок NSP16 снижает распознавание вирусной РНК внутриклеточными рецепторами геликазы, NSP1 приводит к масштабному подавлению трансляции мРНК в результате связывания с рибосомной РНК 18S в канале входа мРНК, а NSP8 и NSP9 ограничивают доставку белка к клеточной мембране. Все три механизма независимо друг от друга приводят к снижению продукции IFN типа I пораженной клеткой [45, 287]. Функциональное тестирование также подтвердило противодействующую активность ORF3b, ORF6, NSP1 или NSP13 в отношении активации IFN I типа [50, 139, 348]. Недавно опубликованы новые данные о том, что сверхэкспрессия вирусом SARS-CoV-2 ORF10 (белок-открытой рамки считывания 10) заметно подавляет экспрессию генов IFN I типа и ISG [290].

Литературные данные указывают на то, что SARS-CoV-2 воздействует на систему IFN типа I на нескольких этапах, тем самым сильно нарушая хорошо

организованное взаимодействие между противовирусными и провоспалительными врожденными и адаптивными механизмами защиты ИС. Дальнейшее исследование дефектов, связанных с природой раннего или пролонгированного ответа IFNs на SARS-CoV-2, с разделением по тяжести заболевания, необходимы для понимания возможности восстановления хрупкого баланса и могут иметь решающее значение для разработки таргетных вариантов лечения для предотвращения развития иммунопатологии как основы тяжелого течения заболевания [207].

Взаимодействие ЕКК с клетками, инфицированными вирусами, вызывает лизис этих клеток за счет прямой или опосредованной антителами клеточной цитотоксичности [90, 354]. Кроме того, ЕКК первыми вырабатывают провоспалительные цитокины ( $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ), а также хемокины MIP-1 $\alpha/\beta$  и RANTES и, тем самым, вовлекают в ИО другие клетки ИС [275]. Далее противовирусная активность усиливается активацией адаптивной ИС.

Специфическая противовирусная активность осуществляется эффекторными цитотоксическими  $CD3^+CD8^+$ Т лимфоцитами, которые, используя различные механизмы, осуществляют цитолиз клеток, зараженных конкретным вирусом, и вырабатывают определенный спектр цитокинов, в первую очередь - регуляторный  $IFN\gamma$  [40, 164, 308, 358].

В тяжелых случаях COVID-19 выявлено уменьшение количества циркулирующих ЕКК, Т хелперов  $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов с функционально истощенным фенотипом, обладающих маркером запрограммированной гибели - PD-1 (для Т клеток PD1 и домен муцина - Tim-3) и повышенной экспрессией NKG2A рецептора на поверхностной мембране ЕКК, которые продуцируют более низкие уровни цитокинов [85, 144, 180, 274, 326].

Следует подчеркнуть, что Т-хелперы  $CD3^+CD4^+$  должны обеспечивать и поддерживать не только цитотоксические Т-клеточные, но и В-клеточные ответы, кульминацией которых является выработка вирус-специфических антител. В тоже время, многими исследователями сообщается о наличии

лимфопении при COVID-19, ассоциированной с тяжестью заболевания, развитием острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) и высокой смертностью, что предполагает центральную роль Т-клеточной лимфопении в иммунопатогенезе COVID-19 [135, 303]. Описано несколько механизмов, которые способствуют уменьшению количества Т-клеток в ПК, включая негативные эффекты влияний некоторых цитокинов. Показано, что лимфопения коррелирует с высокими уровнями сывороточных IL6, IL10 и TNF $\alpha$  [80, 274]. Избыточная передача сигналов провоспалительных цитокинов, особенно опосредованная TNF $\alpha$ , может привести к некрозу или апоптозу Т-клеток [219], пироптозу, индуцированному IL1 $\beta$  [334]. Некоторые авторы отметили восстановление количества Т-клеток на фоне снижения уровней провоспалительных цитокинов [41, 68, 110, 146, 214, 261, 277]. Получены данные, свидетельствующие о возможности прямого инфицирования Т-клеток SARS-CoV-2, который также может оказывать цитопатическое действие на инфицированные Т-клетки. Выявлено, что SARS-CoV-2 может заражать линии Т-клеток человека через спайковый белок CD147, известный как базигин или EMMPRIN, присутствующий на поверхности Т-лимфоцитов [78, 289]. Блокирование белка CD147 с помощью меплазумаба предотвращает спайковое связывание SARS-CoV-2, что может быть использовано при лечении COVID-19 [346]. Feng Z. и соавторы (2020) наблюдали значительную гибель лимфоцитов при COVID-19 и предположили, что это обусловлено их апоптозом посредством взаимодействия Fas-FasL, и указали, при этом, на потенциальную роль цитокина IL6 [329]. В поддержку гипотезы о негативном влиянии IL6 на количество лимфоцитов свидетельствуют данные о том, что при применении антагониста рецептора IL6 тоцилизумаба в ПК увеличивается количество циркулирующих лимфоцитов [95]. Такие цитокины, как IFN I типа и TNF $\alpha$ , могут вызывать рециркуляцию Т-клеток из крови и привлекать их в участки инфекции, способствовать удержанию в лимфоидных органах и прикреплению к эндотелию [79, 255, 304, 343].

С другой стороны, снижение количества Т-клеток также может быть причиной сниженной продукции IFN I типа, так как IFN I типа способствуют их активации, повышению функциональной активности, выживанию и формированию фолликулярных Т хелперов [274]. Кроме того, показано, что ранняя продукция IFN I типа способствует эффективному ответу Т-клеток, в то время, как отсроченный, замедленный синтез может, наоборот, ингибировать пролиферацию Т-клеток или их выход из лимфоидных органов и, таким образом, вызывать их функциональное истощение. Установлено, что вирус SARS-CoV-2 нарушает продукцию IFN I типа, что приводит к нарушению функционирования Т лимфоцитов [130, 131, 180].

Таким образом, негативное влияние вирусов SARS-CoV-2 на ИС пациентов с COVID-19 нарушает формирование противовирусного иммунного ответа, вызывает резкий дисбаланс работы базисных противовирусных механизмов ИС: от дефектного функционирования по типу иммунодефицита одних клеток с параллельной гиперактивацией других, приводящей к возникновению цитокинового шторма.

Уточнение иммунопатогенеза COVID-19, направленное на выявление всего комплекса взаимосвязанных нарушений иммунного гомеостаза, является актуальной задачей сегодняшнего дня и должно быть направлено на понимание сложных врожденных и адаптивных иммунных ответов, которые тесным образом сопряжены с особенностями различных клинических проявлений, вызванных инфекцией SARS-CoV-2.

Поскольку ЕКК клетки, Т-лимфоциты и система интерферонов играют центральную роль в борьбе с вирусными инфекциями, понимание нарушений их гомеостаза при COVID-19 может дать представление о механизмах иммунопатогенеза заболевания, лежащих в основе разнообразных клинических проявлений COVID-19, что может явиться важным шагом в дальнейшей разработке таргетных терапевтических стратегий.

## 1.2 Цитокиновый профиль при COVID-19

Цитокины (эндогенные полипептидные медиаторы межклеточного взаимодействия) участвуют в координации и обеспечении регуляторных сигналов, которые направляют, усиливают или разрешают ИО, необходимый для контроля различных инфекционных процессов [11]. В контексте воспаления различные иммунные и неиммунные клетки, такие как моноциты, МФ, Т-клетки и тромбоциты, а также эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки и фибробласты продуцируют различные цитокины. Короткий период полураспада цитокинов ограничивает их действие за пределами локальных участков воспаления, а при повышении уровня их синтеза могут оказывать системное действие и наносить вред жизненно важным органам [29, 33].

Многочисленными исследованиями установлено, что у пациентов с COVID-19 в результате нарушения регуляции ИО, наблюдается развитие вирусного гипервоспаления, ключевая роль в его запуске принадлежит гиперпродукции и дисбалансу цитокинов (цитокиновому шторму - ЦШ), приводящему к усугублению тяжести течения COVID-19 [130, 173, 181, 257, 291, 359].

Цитокиновый шторм определяется как перепроизводство цитокинов из-за неконтролируемой воспалительной реакции организма на различные триггеры: инфекции, повреждение тканей, злокачественные новообразования, ревматические заболевания и некоторые лекарства [98]. Существуют данные, которые в нескольких аспектах отличают ЦШ COVID-19 от ЦШ при различных состояниях, таких как гемофагоцитоз и лимфогистиоцитоз (ГЛГ), вызванный специфическими вирусными инфекциями [137], синдром активации макрофагов (MAS), возникающий после аутоиммунных нарушений [77]. Во-первых, при COVID-ЦШ задействовано больше воспалительных цитокинов, чем при других заболеваниях, что объясняет агрессивную природу COVID-19 [41, 106]. Во-вторых, у пациентов с COVID-ЦШ наблюдалась лимфопения, это предполагает,

что COVID-ЦШ может быть вызван в основном врожденными, а не адаптивными иммунными клетками [114, 143]. Наконец, по сравнению с ЦШ, вызванным бактериальной инфекцией (например, сепсис), лечение ЦШ при COVID-19 является более сложным, поскольку блокирование функций воспалительных цитокинов без эффективной поддержки противовирусными препаратами может усугубить инфекцию [143].

Избыточная продукция воспалительных цитокинов и чрезмерная активация иммунных клеток приводят к сложным клиническим синдромам от постоянной лихорадки, неспецифической боли в мышцах и гипотензии до синдрома утечки капилляров, ДВС-синдрома, ОРДС, ГЛГ, полиорганной недостаточности и к неблагоприятным исходам заболевания [68, 81, 82, 122].

Распознавание вирусов клетками через Toll- и RIG-I-подобные рецепторы запускает сигнальный каскадный путь, ведущий как к опосредованной IRF3 и IRF7 индукции IFN I и III типа, так и к NF-κB-опосредованной индукции провоспалительных цитокинов (например, IL1, IL6, TNFα). Инфекция SARS-CoV-2, подавляя ответы IFN I типа, вызывает усиление воспалительного ответа, индуцируя гены хемокинов и провоспалительных цитокинов [76, 173, 253]. Паралич SARS-CoV-2 ответа IFN I типа рассматривают как иммунную сигнатуру COVID-19, которая связана с тяжестью заболевания [76].

За короткое время с момента появления COVID-19 были описаны аномальные уровни широкого спектра цитокинов и хемокинов: интерлейкины (IL) - IL6, IL8, IL1β, IL2, IL4, IL10, IL12, IL17, IL18, фактор некроза опухоли-альфа (TNFα), макрофагальный и гранулоцитарный колониестимулирующие факторы (M-CSF, G-CSF), интерферон-γ-индуцированный белок 10 (IP-10), макрофагальный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1) и воспалительные белки (MIP), фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), характеризующих развитие ЦШ. Цитокиновый шторм представляет собой сложную сеть молекулярных событий, объединенных клиническим

фенотипом системного воспаления, полиорганной недостаточности [25, 37, 57, 117, 151, 288, 321].

Молекулярная сигнатура цитокинов при COVID-19 оценивалась с помощью различных методологий в острый период различных по тяжести течения форм заболевания для выяснения маркеров тяжести воспалительного процесса и возможных осложнений [25, 105, 171, 213, 215, 299, 331].

Среди множества цитокинов диагностически значимыми были установлены  $IFN\gamma$ ,  $IL1\beta$ ,  $IL6$ ,  $IL10$  и  $TNF\alpha$  [24, 93, 151, 213].

COVID-19 характеризуется уникальными признаками гипервоспаления во всех типах иммунных клеток, обусловленными  $TNF\alpha$ ,  $IL6$  и  $IL1$ , особенно выраженными при тяжёлом течении заболевания [90].

Повышение уровня  $TNF\alpha$  у пациентов с легкой и среднетяжёлой формой COVID-19 вызывало гриппоподобные симптомы [113, 312, 339]. В тяжёлых случаях COVID-19 высокие системные уровни  $TNF\alpha$  были связаны с более низкой выживаемостью, наряду с легочной дисфункцией (отек, белковый экссудат, десквамация пневмоцитов и ОРДС) [118, 145, 164, 172], а также с нарушением функции кроветворения, с ДВС, гиперлипидемией, повреждениями печени, хроническими заболеваниями почек, диабетом и гипертонией [57, 90, 99, 119, 301].

Клинические и лабораторные данные показали, что SARS-CoV-2 способствует активации  $IL1\beta$ , который в свою очередь, активирует другие провоспалительные цитокины, включая  $IL6$  и  $TNF\alpha$ . Кроме того, повышение концентрации  $IL1\beta$  приводит к активации Тхелперов (Тх1) [212, 321], синдрому активации МФ [83, 88, 95, 301, 333], лихорадке [119], ОРДС [119, 255, 301] и цитокиновому шторму [184, 288]. Следует отметить, что  $IL1\beta$  и  $TNF\alpha$  увеличивают выработку  $IL6$  [321].

$IL6$  является системным плейотропным цитокином, действующим как на иммунные, так и на неиммунные клетки во многих органах. Его продуцируют почти все стромальные клетки, В-лимфоциты, Т-лимфоциты, МФ, моноциты,



ДК, тучные клетки, НГ и другие нелимфоцитарные клетки, такие как фибробласты, эндотелиальные клетки, кератиноциты, гломерулярные мезангиальные клетки и опухолевые клетки [294]. На начальных этапах формирования воспаления ИЛ6 в печени индуцирует продукцию большого количества белков острой фазы: С-реактивный белок (СРБ), сывороточный амилоид А (SAA), фибриноген, гаптоглобин и  $\alpha$ 1-антитрипсин и, напротив, снижает выработку альбумина фибронектина и трансферрина [311]. ИЛ6 благодаря уникальной сигнальной системе, состоящей из ИЛ6-рецептора (ИЛ6R) и нисходящих сигнальных молекул, активируя по механизму положительной обратной связи Тх17-клетки, Тцтл и Тфх-клетки и другие иммунные клетки, вызывает гиперреакцию ИС при COVID-19 [16, 203, 307]. Также показано, что ИЛ6 может стимулировать созревание В-лимфоцитов в плазматические клетки способные продуцировать антигены цитруллинированного белка (АСРА), тем самым, косвенно способствуя образованию NETs [125]. Более того, ИЛ6 играет решающую роль в патологии COVID-19, поскольку он модулирует хемотаксис НГ, а также истощение и некроз лимфоцитов [116].

Установлено, что уровень ИЛ6, повышен как у легких, так и у тяжелых пациентов с COVID-19 и коррелирует с зоной инфильтрации легких у пациентов с ОРДС [130]. Сверхэкспрессия ИЛ6 активирует лектиновый путь комплемента, каскад системы свертывания крови, повышает проницаемость сосудов, тем самым способствуя быстрому распространению воспаления [48, 154, 163, 256, 312]. Также описано, что нарушение регуляции ИЛ6 способствует некрозу и апоптозу клеток [66, 336].

Доказано, что ИЛ6 играет ключевую роль в стимулировании гипервоспалительного ответа и является независимым предиктором выживаемости пациентов [80, 95, 179, 224].

Высокие уровни ИЛ6 в сыворотке коррелируют с шоком, дыхательной недостаточностью, ОРДС и полиорганной дисфункцией при тяжелом течении COVID-19 [96, 155, 345]. Сверхэкспрессия ИЛ6 может вызывать другие

осложнения, включая лихорадку, утечку из сосудов, анемию, кардиомиопатию, острое повреждение почек (ОПП), интерстициальный отек и дисфункцию миокарда [332, 345].

IL6 также индуцирует избыточную продукцию VEGF, который является основным сосудорасширяющим фактором и фактором проницаемости, участвует в ангиогенезе, проявляя про/антиангиогенное свойство за счет активации VEGFR [300].

VEGF может играть существенную роль в патогенезе COVID-19 по нескольким причинам: отек легких, снижение насыщения кислородом ( $sO_2$ ) и ремоделирование сосудов, частично из-за нарушения целостности альвеолярно-капиллярной мембраны, что приводит к отложению фибрина и развитию связанной с ОРДС фибропролиферативной фазы. Кроме того, VEGF может способствовать передаче вируса из легких в кровотоки посредством нарушения гликокаликса как периклеточного матрикса в лёгочной ткани [350]. Примечательно, что VEGF также может спровоцировать нейровоспаление в головном мозге пациентов с COVID-19 после индукции воспалительных реакций, повреждающих гематоэнцефалический барьер [349].

В более поздних научных работах было выявлено, что тяжелое течение и риск развития осложнений при COVID-19 обусловлены высокими уровнями миелоидных хемоаттрактантов, нейтрофил – ассоциированных цитокинов и гиперактивацией НГ с формированием NETs [215, 299, 331].

IL-8/CXCL8 – фактор хемотаксиса привлекает НГ к месту инфекции [57, 63, 194]. IL8 продуцируется МФ, эпителиальными клетками, гладкомышечными клетками дыхательных путей и эндотелиальными клетками [57, 214]. Повышенные уровни IL8 в сыворотке наблюдаются при многих заболеваниях, включая инфекции SARS-CoV и MERS-CoV [52, 266]. При заражении SARS-CoV-2 отмечались повышенные концентрации IL8, связанные с ОРДС [119] и тяжестью COVID-19 [57, 82, 84, 99, 157 214, 297]. Во многих работах отмечается, что повышенная экспрессия IL8 может быть прогностическими биомаркерами

тяжести и прогрессирования COVID-19 совместно с показателями соотношения НГ и лимфоцитов [57, 239, 282, 317, 330]. Однако, корреляция между уровнями IL8 и тяжестью заболевания остается спорной [57, 84, 112, 297, 330], поскольку в некоторых исследованиях не было зафиксировано существенных различий в уровнях IL8 в сыворотке крови [57].

IL18 - провоспалительный цитокин является членом семейства цитокинов IL1, которые играют важную роль как во врожденных, так и в адаптивных иммунных ответах, гемопоэзе и формировании фиброза [267]. IL18 синтезируется в неактивной форме (про-IL18) в эпителиальных и эндотелиальных клетках, МФ и ДК и высвобождается при активации инфламмосомы NLRP3 протеазой-3 НГ при гибели клеток и нетозе [267]. IL18 продуцируется на очень ранних стадиях вирусных инфекций и индуцирует выработку IL6 и IFN $\gamma$  [170, 267]. Он также стимулирует выработку цитокинов Th2 CD4<sup>+</sup>T- и ЕКК-клетками и регулирует ответы Th1 и Th2 [169]. Предполагается, что IL18 вместе с другими нейтрофил - ассоциированными цитокинами участвует в регуляции функций НГ [71]. Активированные IL18 НГ вызывали усиление воспалительной реакции путем образования NETs, что приводило к серьезному повреждению тканей [71, 267, 318]. В сравнении с показателями пациентов с лёгкими симптомами и здоровыми людьми у больных с тяжёлой формой COVID-19 определялись высокие концентрации IL18 в ПК [176, 267]. Высокие уровни IL18 наблюдались у пациентов с увеличением тяжести пневмонии, у пациентов, у которых развился синдром активации МФ, ОРДС или повреждение печени [119, 138, 176]. При вирусной инфекции высвобождение IL18 индуцирует повышение ферритина, что объясняет часто наблюдаемую гиперферритинемию при вирусных инфекциях [362], в том числе выявляемую при COVID-19.

IL17 продуцируется Th17, клетками врожденного иммунитета и другими клетками, включая CD8<sup>+</sup>T лимфоциты и  $\gamma\delta$ T-клетки, ЕКК-клетки и ILC3 [108, 218]. IL17 действует как нейтрофильный цитокин, способствующий воспалению,

образованию NETs и повреждению тканей при инфекции [143, 288]. Также IL17 участвует в патогенезе формирования тромбоза за счет усиления активации/агрегации тромбоцитов, инфильтрации тканей НГ и активации эндотелиальных клеток [293].

При заражении SARS-CoV-2 уровни IL17, а также других Th17-связанных провоспалительных цитокинов, таких как IL1, IL6, IL15, TNF и IFN $\gamma$ , повышаются, что имеет положительную корреляцию в зависимости от тяжести заболевания [248, 252]. Высокие концентрации IL17 были отмечены у пациентов с SARS-CoV и MERS [221], а также при высокой вирусной нагрузке SARS-CoV-2 и ОРДС [5, 90, 119, 210, 220]. Напротив, Wan S et al отмечают, что уровни IL17 существенно не различались между неинфицированными людьми и пациентами с COVID-19 с тяжелыми и легкими симптомами [80].

IFN $\gamma$  - IFN типа II, продуцируется широким спектром клеток: Th-CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клетками, Treg-, FoxP3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Т-клетками, В-клетками и ЕКК-клетками, моноцитами, МФ, ДК и НГ [120]. IFN $\gamma$  участвует в многочисленных иммунных и адаптивных иммунологических функциях, способствует активации МФ и презентации антигена, принимает активное участие в антибактериальном и антивирусном иммунитете, а также в передаче сигналов [208]. Под влиянием IFN $\gamma$  регулируется: созревание моноцитов (МОН) в эффекторные клетки МФ; активация НГ с повышением фагоцитарной и бактерицидной активности (за счёт повышения синтеза iNOS и цитозольных компонентов NADPH-оксидазы); синтез NRAMF-1 - макрофагального протеина, который повышает резистентность МФ к внутриклеточным микроорганизмам [167].

Кроме того, для IFN $\gamma$  характерны противовоспалительных эффекты: активация Трегуляторных клеток (Трег), подавление дифференциации Th2 и Th17, подавление миграции НГ, активация апоптоза клеток эффекторов. Дефекты функционирования IFN $\gamma$  могут манифестировать различными состояниями: от развития тяжело и длительно протекающих инфекций до различных аутоиммунных заболеваний [201, 355].

IFN $\gamma$  является участником ЦШ, вызванного инфекцией SARS-CoV-2. Выявлены повышенные уровни IFN $\gamma$  при высокой вирусной нагрузке и повреждение легких [248], наблюдаются клеточные транскрипты связанные со сверхэкспрессией гена IFN $\gamma$  при COVID-19 [168]. Повышенный уровень IFN $\gamma$  вызывает лихорадку, головные боли, озноб, утомляемость, недомогание, кардиомиопатию, утечку из сосудов, повреждение легких [113, 311].

В то же время, в других исследованиях, напротив, показано снижение уровня IFN $\gamma$ , которое коррелировало с тяжестью заболевания [147].

Появляются новые убедительные данные о вкладе в воспаление других взаимосвязанных цитокинов, а, следовательно, идентификация молекулярного профиля в отношении COVID-19 актуальна и нуждается в дальнейшем изучении.

### **1.3 Роль нейтрофильных гранулоцитов в противовирусном иммунитете и иммунопатогенезе COVID-19**

Глобальным, сначала малоизученным, а в настоящее время находящимся в зоне «особого внимания», остается вопрос о роли НГ в патогенезе COVID-19.

В настоящее время известно, что НГ являются первой популяцией иммунных клеток, попадающих в места инфицирования. НГ активируются с помощью широкого спектра стимулов, включая хемотаксические факторы и цитокины, играют важную роль во врожденном иммунитете, инициируют и регулируют развитие адаптивного иммунитета, демонстрируя удивительное транскрипционное и функциональное разнообразие, а также траектории развития, проявляя как защитные, так и патологические функции.

С начала пандемии COVID-19 накоплены убедительные доказательства того, что НГ играют важную роль в развитии, течении и исходе болезни и связаны с изменением их количества, фенотипа и функциональности [240].

В начале вирусной инфекции НГ быстро рекрутируются в места заражения из крови и мобилизуются для дифференцировки и миграции из красного костного мозга (КМ) [241]. Альвеолярные эпителиальные клетки,

инфицированные вирусом, секретируют IL8/CXCL8 и GM-CSF для привлечения и активации НГ [185]. НГ конститутивно экспрессируют на поверхностной мембране хемотаксический рецептор 1 (CXCR1) и рецептор комплемента 5a (C5a) анафилатоксина, которые специфически связываясь с хемокиновым CXС-мотивом, лигандом CXCL8 и C5a, опосредует инфильтрацию НГ в очаги инфекции [110, 111].

Степень нейтрофильной инфильтрации зависит от вирусной нагрузки, типа вирусного штамма и тяжести заболевания [216]. НГ могут подвергаться обратной трансэндотелиальной миграции (transendothelial migration - TEM) из тканей в кровообращение и даже обратно в красный костный мозг. У НГ, претерпевающих TEM, увеличивается продолжительность жизни за счет ингибирования апоптоза и цитотоксический потенциал за счет образования NETs и продукции активных форм кислорода (АФК) [209, 245, 327].

НГ обнаруживают вирусные белки и нуклеиновые кислоты через Toll-подобные рецепторы (TLR) [73]. Во внутриклеточном компартменте НГ расположены TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9 рецепторы. TLR3 распознает двухцепочечную РНК, TLR7 и TLR8 распознают одноцепочечную вирусную РНК, а TLR9 распознает метилированный CpG ДНК вируса, активируя сигнальный каскад ядерного фактора-кВ (NF-кВ), запуская воспаление [281, 323]. Также известно, что НГ человека способны напрямую связываться с вирусом через гликопротеины клеточной поверхности [284], TLR4 рецептор НГ способен распознавать слитые белки RSV РНК-вирусов [276].

НГ проявляют противовирусную активность посредством различных механизмов, включая прямое распознавание вируса, опосредованные антителами или комплементом цитотоксические реакции, а также фагоцитоз и секрецию цитокинов, миелопероксидазы (МПО), эластазы и дефензинов. Они также могут образовывать нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETs) и модулировать адаптивный противовирусный иммунитет [51, 140, 242].

НГ могут фагоцитировать вирионы и апоптотические тельца, содержащие вирус, тем самым способствуя выведению вируса, предотвращая его репликацию и инфицирование окружающих клеток [246, 269].

Фагоцитоз инициируется лигированием рецепторов, таких как Fcγ-рецепторы (CD64 (FcγRI), CD32 (FcγRII), CD16 (FcγRIII)), рецепторов комплемента CD11b (CR3, Mac-1, интегрин) и лектины С-типа [211]. НГ содержат гранулы (азурофильные, специфические, секреторные), в которых имеются заранее сформированные эффекторные молекулы, быстро высвобождающиеся в фагосомы при фагоцитозе или во внеклеточное пространство.

НГ используют никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADPH) оксидазу, чтобы катализировать выработку активных форм кислорода (АФК - супероксид-аниона, гидроксила и перекиси водорода) в качестве основной молекулы против вирусов посредством процесса, называемого «окислительный взрыв» [148, 272,273].

Кроме того, миелопероксидаза (МПО) превращает перекись водорода в хлорноватистую кислоту, которая является еще одним мощным окислителем. Эти свободные радикалы также закачиваются в фагосому, чтобы убить патогены [250, 265].

Также, вирусы стимулируют НГ к дегрануляции ферментов МПО и лактоферрина в местах инфекции, эластазы (NE) и катепсина G. Исследования показали, что лактоферрин (лактопротеин) может связываться с рецепторами SARS-CoV-2, предотвращая их проникновение клетку-хозяина [60, 202, 268; 270].

Для защиты от вирусов и запуска других иммунных клеток активированные НГ могут вырабатывать множество цитокинов и хемокинов (TNFα, IL6, IL8 и IFN и др.) и противомикробных веществ, чтобы рекрутировать и активировать еще больше НГ и ограничивать репликацию вируса и прогрессирование заболевания [148, 205].

Большинство противомикробных веществ НГ обладают антибактериальными свойствами, а некоторые из них, такие как матриксная металлопротеиназа-9 (ММР9), кателицидины и  $\alpha$ -дефензины, также обладают противовирусными свойствами [148]. ММР9 способствует проникновению НГ в легкие путем разрушения внеклеточного матрикса, что приводит к усилению воспаления в легких [216]. Дефензины и кателицидины в гранулах НГ представляют собой катионные антимикробные пептиды, которые могут не только нейтрализовать вирусы, но и ингибировать медиаторы воспаления индуцируя сигнальный путь IFN I типа в НГ, тем самым ограничивая репликацию вируса [56, 126, 205, 244]. NETs представляют собой сетчатые структуры ядерного хроматина, в которые вплетены антимикробные частицы и цитоплазматические белки, включая гистоны, нейтрофильную эластазу (NE), миелопероксидазу (МПО) и  $\alpha$ -дефензины [200, 360].

Существует несколько механизмов формирования NETs. Популярная гипотеза утверждает, что NETs образуются вследствие нетоза — процесса разрыва НГ, особой формы запрограммированной гибели НГ, при котором высвобождается хромосомная ДНК. Однако в исследованиях Yousefi и соавторов было показано, что кратковременная стимуляция TLR4 или C5a после праймирования GM-CSF может привести НГ к генерированию NETs, содержащую митохондриальную ДНК (вместо ядерной ДНК), связанную с гранулярными белками, которые не зависят от гибели клеток, и этот процесс зависел от АФК [295]. При вирусных инфекциях NETs захватывают вирусные частицы и уничтожают вирус посредством высоких локальных концентраций МПО и дефензинов или, по крайней мере, предотвращают распространение вируса из локальной области в другие ткани [74, 230]. Как вирусы, так и вирусные факторы оказывают сильное стимулирующее воздействие на производство NETs [295, 364].

Сигналы, влияющие на выбор между фагоцитозом и нетозом, еще недостаточно охарактеризованы. Некоторые факторы включают интенсивность



клеточной передачи сигналов в конкурирующих путях, а также метаболическое, адгезивное и активационное состояние фагоцита. Было также обнаружено, что дефектный фагоцитоз может привести к чрезмерному нетозу [328].

Гиперактивный ИО у пациентов с COVID-19 характеризуется аномальной активацией НГ [153]. Цитокиновый шторм, вызванный вирусом SARS-CoV-2, представленный повышенными концентрациями в плазме  $IL1\beta$ , G-CSF и  $TNF\alpha$ , способствует активации НГ и хемотаксису [90, 160].

Увеличение количества циркулирующих НГ у пациентов с COVID-19 предсказывает неблагоприятные исходы, а соотношение НГ к лимфоцитам считается независимым фактором риска тяжелого заболевания [42, 127, 226, 240]. Кроме того, при инфицировании SARS-CoV-2 повышенное количество НГ наблюдалось в эпителии носоглотки [104] и в более дистальных отделах респираторного тракта – в легких [304].

Показано, что воспалительные реакции, индуцированные SARS-CoV-2, приводят к aberrантной активации НГ и образованию избыточных NETs, что может способствовать повреждению органов и смертности при COVID-19 [317].

Клинические данные показали, что повышенное образование NETs коррелирует с развитием ОРДС у пациентов с COVID-19 и является потенциальным биомаркером прогрессирования заболевания [231]. Количество НГ и уровни NETs резко увеличиваются в крайне тяжелых случаях и у пациентов с плохим прогнозом [94, 115].

Образование NETs в легких может быть вызвано прямым контактом НГ с SARS-CoV-2 посредством передачи сигналов через TLR7 [293]. Другим механизмом является увеличение агрегатов тромбоцитов и НГ, которые способствуют повышению уровня образования NETs [231]. В свою очередь, активированные НГ и NETs запускают каскад системы комплемента и внутренний контактный путь свертывания крови, способствуя артериальному и венозному тромбозу и коагулопатии [320, 325]. Рекрутирование большого количества НГ в очаги воспаления, нетоз и последующий иммунотромбоз

являются типичными признаками тяжелого COVID-19 [320]. В патологоанатомических отчетах у пациентов с COVID-19 отмечают инфильтрацию НГ в легочных капиллярах, острый капиллярит с отложением фибрина, экстравазацию НГ в альвеолярное пространство и нейтрофильный мукозит [43].

Иммунотромбоз может приводить к окклюзии микрососудов в легких, вызывая гибель клеток в пораженных участках, способствуя ухудшению дыхательной функции органа. Риск иммунотромбоза дополнительно повышается из-за вазоконстрикции, вызванной синдромом высвобождения цитокинов, наблюдаемым при тяжелом течении COVID-19 [103], или гипоксической легочной вазоконстрикции [322], что еще больше способствует возникновению порочного круга реактивности НГ в поврежденной легочной ткани.

Повышенная способность к образованию NETs при COVID-19 может быть связана с различными субпопуляциями НГ и медиаторами воспаления [122].

Гетерогенные популяции НГ классифицируются на основе дискретных признаков: маркеров клеточной поверхности, зрелости, плотности, функции [283].

Известны субпопуляции ангиогенных НГ, которые имеют фенотип  $CD49d^+$ ,  $VEGFR1^{high}$ ,  $CXCR4^{high}$ . Эти НГ рекрутируются из кровотока в места гипоксии с помощью фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) через рецепторы VEGF-1 и рецептор VEGF-2, где они способствуют ангиогенезу посредством высвобождения MMP-9. Использование нейтрализующих антител показало возможность регуляции ангиогенеза: возможность блокировать эти НГ с помощью анти-CD49d-терапии и препятствовать реваскуляризации или активировать НГ действием цитокина VEGF на VEGFR1 рецептор [165].

Основным способом рекрутирования НГ в ткани является прикрепление этих клеток интегринами CD11a/CD18 и CD11b/CD18, к белкам, экспрессируемым Р-селектина и Е-селектина, а также молекулами внутриклеточной адгезии ICAM-1 на эндотелиальных клетках с последующей

экстравазацией, зависящей от уровня экспрессии CD62L рецептора [107, 316]. Приток НГ во внесосудистые пространства приводит к изменению их фенотипа от низкого уровня ICAM-1<sup>dim</sup>, высокого уровня CXCR1<sup>bright</sup> до низкого уровня ICAM-1<sup>dim</sup>, низкого уровня CXCR1<sup>dim</sup> [166].

Увеличение количества НГ в циркуляции сопровождается не только количественным приростом, но и изменением экспрессии генов в этих клетках и приобретением характерного фенотипа НГ – маркеров, активированных у пациентов с тяжелым и легким COVID-19 [127]. Зрелые НГ подразделяются на три различных подгруппы: гомеостатические (преобладающие), старые НГ и связанные с ISG [305]. Попадая в кровоток, НГ либо патрулируют сосудистую сеть, либо мигрируют в другие органы [97]. При COVID-19 также наблюдается сильный сдвиг в сторону большего количества НГ, связанных с ISG, что коррелирует с тяжестью заболевания. В настоящее время известно, что НГ экспрессируют поверхностные мембранные рецепторы к IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$ , формируя субпопуляции с определенным фенотипом. Связываясь с этими рецепторами IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  способны проявлять свои регуляторные действия и модулировать функциональную активность НГ [10]. Сообщалось, что пациенты с COVID-19 имеют большее количество НГ, которые демонстрируют повышенную экспрессию генов, связанных с интерфероном, и повышенную индукцию IFN 1 типа по сравнению с НГ здоровых лиц. Лечение стероидом дексаметазоном уменьшало количество НГ, экспрессирующих IFN-стимулированные гены, и способствовало развитию иммуносупрессивных незрелых НГ [123, 124, 158].

Многие исследования подчеркивают появление аномальных субпопуляций НГ, вызванное инфекцией COVID-19. Выявлено, что у пациентов с тяжелой формой COVID-19 накапливаются незрелые НГ с иммуносупрессивными характеристиками (granulocyte myeloid-derived suppressor cells – G-MDSC), что указывает на экстренный миелопоэз [122, 134]. При вирусных инфекциях иммуносупрессия, опосредованная G-MDSC, приводит к персистенции вируса и прогрессированию заболевания [183]. G-MDSC ослабляют иммунные реакции

путем подавления функций Т-клеток [141] и являются биомаркерами тяжести инфекции COVID-19, развития ОРДС [292]. Терапию, нацеленную на такие НГ, можно рассматривать как часть индивидуального лечения пациентов с COVID-19 [134]. Центрифугирование периферической крови (ПК) в градиенте плотности позволяет отделить НГ нормальной плотности (normal density neutrophils -NDN), которые считаются типичными НГ, которые можно обнаружить у здоровых людей, и НГ низкой плотности (low density neutrophils - LDN), которые оказывают как провоспалительное, так и иммуносупрессивное действие, что позволяет предположить, что LDN могут быть связаны с заболеванием [229].

У пациентов на ранних стадиях инфекции COVID-19 были обнаружены высокие уровни НГ низкой плотности (LDN) [177]. Группа исследователей также обнаружила CD16<sup>+</sup>LDN в крови и жидкости бронхоальвеолярного лаважа пациентов с COVID-19, которые демонстрировали признаки провоспалительных генов и повышенную выработку цитокинов, и как предполагалось, были связаны, с активацией тромбоцитов, с коагулопатией, спонтанным образованием NETs, системным воспалением и ОРДС у этих пациентов [46, 217, 227].

При фенотипировании НГ- LDN пациентов с COVID-19 была определена субпопуляция НГ CD15<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD193<sup>-</sup>CD16<sup>bright/dim</sup>, их доля увеличивалась по мере прогрессирования тяжести заболевания как в зрелых (CD16<sup>+</sup>), так и незрелых (CD16<sup>dim</sup>) НГ. У пациентов с COVID-19 на НГ с высокой плотностью экспрессировались рецепторы CD66b, CD177, CD11b, CXCR4, CD147 и CD63 и с низкой плотностью - CXCR2. Пациенты с тяжелой формой COVID-19 имели более высокую долю незрелых НГ со сниженной экспрессией CD66b и CD11b по сравнению с НГ пациентов с легкой формой заболевания и здоровых лиц. Пациенты со средней формой COVID-19 имели более высокую долю зрелых НГ с более высокой экспрессией CD11b, CD66b и CD177, чем пациенты с тяжелым течением COVID-19 и контрольной группой [158].

У пациентов с тяжелой формой COVID-19 была определена субпопуляция незрелых НГ с фенотипом CD16<sup>Int</sup>CD44<sup>Low</sup>CD11b<sup>Int</sup>, отсутствующая у здоровых

лиц, которая характеризовалась повышенной секрецией TNF $\alpha$  и IL6 и способностью образовывать NETs. Установлено, что низкая плотность экспрессии CD44 способствует перемещению НГ в легкие, вызывая выраженную инфильтрацию, с последующим повреждением в легочной ткани. Появление субпопуляции CD16<sup>Int</sup>CD44<sup>Low</sup>CD11b<sup>Int</sup>НГ клинически коррелируют с высокими уровнями D-димера и ферритина в плазме крови у пациентов с тяжелой формой COVID-19. Показано, что резкое увеличение данной субпопуляции НГ от исходно определяемого уровня связано с интубацией или смертью пациентов, а снижение содержания CD16<sup>Int</sup>CD44<sup>Low</sup>CD11b<sup>Int</sup>НГ сопровождается положительным клиническим прогнозом с экстубацией и выпиской [46].

Характерной чертой транскриптомов крови в тяжёлых случаях течения COVID-19 являются сигнатуры активации НГ [42].

НГ экспрессируют сложный набор иммуноглобулиновых FcR и других рецепторов, молекул адгезии, включая воспалительные маркеры и цитокины, обеспечивающих их многофункциональность. Неконтролируемый кластерный анализ данных масс-цитометрии образцов ПК пациентов с COVID-19 подтвердил их специфические изменения: определены субпопуляции незрелых НГ по уровню экспрессии CD11b, CD16, CD24, CD34 и CD38; субпопуляции, демонстрирующие признаки активации, такие как усиление поверхностной экспрессии CD64, RANK и RANKL и снижение экспрессии CD62L (L-селектин) [42]. Методом проточной цитометрии по экспрессии CD10 и CD101 рецепторов подтверждено увеличение количества незрелых НГ у пациентов с тяжелой формой COVID-19 [127]. Определены признаки супрессивного фенотипа НГ: повышенная поверхностная экспрессия PD-L1 и снижение CD62L при тяжелом течении COVID-19 [122]. Так же выявлено, что в острую фазу COVID-19 циркулирующие НГ детей характеризуются активационным фенотипом, обусловленным наличием специфических маркеров (HLA-DR, CD64, PECAM-1), CD63 и увеличением ингибирующих рецепторов (LAIR-1, PDL1). Эта субпопуляция НГ экспрессирует меньше молекул адгезии, что снижает

способность активированных НГ достигать глубоких тканей, и по этим причинам можно было предположить, что инфильтрация легочной ткани, лежащая в основе повреждения легких у взрослых, не встречается у детей [69, 187, 239].

Таким образом, определение фенотипов и маркеров, которые более надежно определяют субпопуляции НГ, работающие или появляющиеся во время вирусных инфекций, позволит разработать новые стратегии воздействия на эти субпопуляции, модулируя их противовирусные и иммуноопосредованные функции, способствующие позитивному исходу заболевания.

Более глубокое понимание гетерогенности НГ и различных путей, используемых этими клетками для ответа на различные стимулы, может открыть новые терапевтические возможности для лечения вирусно-опосредованных заболеваний.

#### **1.4 Терапевтические стратегии, направленные на дисфункции нейтрофильных гранулоцитов при COVID-19**

Существуют три основные концепции, касающиеся терапевтических и профилактических стратегий при COVID-19: воздействие на вирус, его клеточный жизненный цикл с помощью противовирусных препаратов; создание вакцин, которые могут предотвращать или смягчать симптомы заболевания после заражения; воздействие на нарушенные функции иммунного ответа, чтобы избежать или смягчить тяжелый и фатальный исход болезни. Подход, ориентированный на врожденную ИС, может играть важную роль во всех трех направлениях [105, 262, 303].

В лечении COVID-19 используются противовирусные препараты прямого и непрямого действия, нацеленные на молекулы самого вируса или белков клетки-хозяина: паксловид (нирматрелвир/ритонавир) - ингибитор протеазы, усиленный ритонавиром, который является первым пероральным противовирусным препаратом, получившим разрешение FDA на EUA в 2021

году [280] и внесенным во временные методические рекомендации МЗ РФ; ремдесивир - синтетическая малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота (миРНК) ингибитор РНК-зависимой РНК-полимеразы, фермента, необходимого для репликации ряда РНК-вирусов [319]; молнупиравир - низкомолекулярное рибонуклеозидное пролекарство N-гидроксицитидина (NHC) [161, 271]; фавипиравир - подавляющий репликацию вируса путем ингибирования РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) [222, 263].

Другие не прямые противовирусные препараты, блокирующие проникновение вирусных клеток (например, воздействующие на протеазы, такие как TMPRSS2), были предложены в качестве потенциальных методов лечения. [306,314]. Картирование вирусных белков позволило определить дополнительные перспективные противовирусные препараты способные влиять на трансляцию; модулировать рецепторы партнеры по клеточному взаимодействию SARS-CoV-2 (сигма-1 и сигма-2), ингибировать NSP6 и ORF9c [319].

Многочисленными исследованиями доказывается целесообразность включения препаратов интерферона в схемы терапии COVID-19.

IFN играют центральную роль в обеспечении эффективной защиты от вирусных инфекций путем активации противовирусных или иммуномодулирующих свойств [191]. Продукция IFN типа I может быть быстро запущена, когда клетки распознают PAMP - вирусные нуклеиновые кислоты, индуцируя экспрессию IFN-стимулируемых генов (ISG<sub>s</sub>) в эпителиальных клетках, ингибируя репликацию вируса и косвенно стимулируя как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ [198, 321, 334].

Поскольку SARS-CoV-2 противостоит системе IFN I типа, препараты, укрепляющие эту систему клеточной защиты, могут значительно улучшать ранние врожденные иммунные реакции.

IFN человека классифицированы на три основных типа на основе сигнальных рецепторов: IFN типа I (IFN $\alpha$  и IFN $\beta$ ), IFN типа II (IFN  $\gamma$ ) и IFN типа III (IFN $\lambda$ 1) [351].

Рекомбинантные белки ИФН $\alpha$  и ИФН $\beta$  продемонстрировали большой потенциал в ингибировании репликации SARS-CoV-2 в системе *in vitro* [190].

Для оценки терапевтической эффективности в исследованиях в рамках REMAP-CAP и ВОЗ в качестве потенциальной терапии против COVID-19 применялся рекомбинантный ИФН $\beta$  (рек ИФН $\beta$ ) [61, 341]. Было показано, что комбинация ИФН $\beta$ 1 $\alpha$ , лопинавира/ритонавира и рибавирина способствует быстрому устранению вирусов из носоглотки [61, 199, 340]. Также выявлено, что ИФН $\beta$ 1 $\alpha$  в сочетании с лопинавиром/ритонавиром или атазанавиром/ритонавиром значительно снижали смертность на 28-й день в когорте пациентов из 42 тяжелых случаев COVID-19 [44].

Было также показано, что IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  и IFN $\lambda$ 1 могут блокировать вирусную инфекцию и ингибировать репликацию SARS-CoV-2a [192, 344].

Лечение пегилированным интерфероном лямбда (рек ИФН  $\lambda$ ) пациентов с высокой исходной вирусной нагрузкой показало ускоренный клиренс вируса к 7 дню заболевания. Аналогичные, но более выраженные эффекты наблюдались при терапии рекИФН $\alpha$ 2 $\beta$  [249]. Однако ИФН  $\lambda$  вызывает более слабый, но продолжительный противовирусный ответ [186, 342], поскольку воздействуют только на рецепторы эпителиальных клеток без более широких эффектов, которые характерны для IFN I типа [101].

Включение пегилированного интерферона альфа2 $\beta$  (рекИФН $\alpha$ 2 $\beta$ ) в стандарт медицинской помощи (SOC) позволил быстрее снизить вирусную нагрузку у пациентов со средней степенью тяжести COVID-19 [133].

Были представлены данные об эффективности лечения COVID-19 комбинацией препаратов ИФН $\alpha$ 2 $\beta$  и арбидолом и монотерапии ИФН $\alpha$ 2 $\beta$ , приводящие к ускоренной элиминации вируса на слизистых в верхних



дыхательных путей, снижению повышенных уровней в крови IL6 и С-реактивного белка, которые являются маркерами воспаления [193, 280].

Получены убедительные данные, подтверждающие клиническую эффективность и безопасность локальной и системной интерферонотерапии реИФН $\alpha$ 2b в комбинации с активными антиоксидантами в повышенной дозировке, включенной в комплексную стандартную терапию COVID-19 у детей [13, 30, 251]. Локальная и системная интерферонотерапия реИФН $\alpha$ 2b в комбинации с активными антиоксидантами способствовала более быстрой ликвидации клинических симптомов заболевания и элиминации вируса [251].

Проведенное сравнительное исследование противовирусного ACE2, индуцирующего свойства IFN (типы I, II и III) на клеточной линии легких и первичных эпителиальных клетках бронхов человека, показало, что противовирусные действия IFN уравнивают повышенную экспрессию ACE2 и ограничивают SARS-CoV-2 [59].

Время начала терапии IFN при COVID-19 является ключевым фактором, определяющим результат. Было показано, что лечение интерфероном когда большое количество клеток уже инфицировано вирусом, может не дать эффекта [286]. Существует мнение, что раннее использование IFN является защитным, тогда как его позднее введение может быть связано с замедленным выздоровлением [278]. Более 20 клинических испытаний (по состоянию на 2021 г.) были посвящены определению лучшего временного окна и преимущества по сравнению с рисками терапии IFN [54, 278].

Более поздние результаты, оценивающие эффективность и безопасность лечения IFN (системного или ингаляционного IFN $\alpha$ ,  $-\beta$  и  $-\lambda$ ) у взрослых пациентов с COVID-19, которые были определены путем мета-анализа, систематического поиска в электронных базах данных до января 2023 года (рандомизированные контролируемые исследования), доказали, что лечение IFN в поздней фазе или тяжелой стадии COVID-19 не было связано с усилением

воспалительной реакции при прогрессировании COVID-19 и плохими клиническими исходами [89, 189].

По второй стратегии были разработаны и одобрены ВОЗ на полное или экстренное использование 40 вакцин против COVID-19: Pfizer-BioNTech, Oxford-AstraZeneca, Sinopharm BIBP, Moderna, Janssen, CoronaVac, Covaxin, Novavax, Convidecia, Sinopharm WIBP, Abdala, Zifivax, Corbevax., COVIran Barekat и SCB-2019., Sputnik V. «Спутник V» представляет собой вирусную векторную вакцину, разработанная Российским НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Гамалеи. «Спутник Лайт» — вирусная векторная вакцина, состоит из первой дозы вакцины «Спутник V», созданной на основе вектора Ad26 (производство Российского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Гамалеи). ЭпиВакКорона – пептидная вакцина производства Российского государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор». КовиВак (CoviVac) – инактивированная вирусная вакцина, производимая Центром Чумакова РАН. Согласно данным ВОЗ по состоянию на 14 августа 2023 года было вакцинировано несколько миллионов человек, введено 13 498 570 620 доз вакцин, из них в России 186 692 479 доз.

Третья стратегия была направлена на коррекцию нарушенного при COVID-19 иммунного ответа.

Отправной точкой для многих терапевтических направлений было вызванное цитокиновым штормом и образованием NETs гипервоспаление, характеризующее тяжёлое течение заболевания [100, 116, 278].

Для контроля гипервоспалительной реакции были предложены и использованы терапевтические препараты, такие как анакинра (антагонист рецептора IL1) [53, 195], силтуксимаб (нейтрализующий IL6), сарилумаб (антагонист рецептора IL6) [280], тоцилизумаб (антагонист рецептора IL6) [178], секукинумаб (IL17 нейтрализация) [67], барицитиниб (ингибитор Jak) [64], экулизумаб (ингибирование активации комплемента) [62, 337], G/10 и CD24F (регуляция врожденного ответа) [174], моноклональное антитело против GM-

CSF [313] и NKG2D-ACE2 CAR-EКК-клетки [152], NuMax-IL8 - полностью человеческое МкАТ (ингибитор IL8) [315].

В свете ключевой роли НГ в патологии COVID-19, нацеливание на эффекторные функции или экстравазацию НГ в лёгкие представляет собой многообещающую возможность для фармакологического вмешательства.

Проходят клинические испытания для применения у пациентов с COVID-19 ингибиторы НГ и их функций, в том числе, способности образовывать NETs: низкомолекулярные антагонисты CXCR2 (данириксин и навариксин), ДНКазы I, нейтрофильной эластазы (NE), дипептидилпептидаза 1(DPP1); ингибитор респираторного взрыва N-ацетилцистеин (N-Acetylcysteine), гасдермина D (DGSDMD), гистонов (PDE4), металлопротеиназы внеклеточного матрикса MMP9;  $\beta$ -блокаторы, имеющие потенциальные возможности предотвратить прогрессирование ОРДС, вызванного SARS-CoV-2 [28, 309, 317, 347].

В настоящее время имеются данные о пептидах, которые способны ингибировать различные фазы жизненного цикла SARS-CoV-2, повышать активность иммунных клеток и нормализовать функции бронхолегочной системы при COVID-19 [259].

Пептиды - это инновационный вариант лечения инфекционного заболевания, вызываемого SARS-CoV-2. Короткие синтетические пептиды или полипептидные комплексы практически не оказывают побочного влияния и эффективны в низких концентрациях. Пептидные препараты практически не имеют противопоказаний и могут применяться у пациентов с множественными хроническими заболеваниями (сердечно-сосудистая и почечная патология, сахарный диабет, метаболический синдром, патология бронхолегочной системы), в том числе, у пациентов старших возрастных групп. Согласно мировой статистике, тяжелая форма COVID-19 и высокая смертность наблюдаются в вышеупомянутых группах пациентов [121, 254].

Во время пандемии COVID-19 в Китае в качестве одного из терапевтических средств использовался иммуномодулирующий пентапептид

тимопентин (Arg-Lys-Asp-Val-Tyr, RKDVY, TP5), который является активным центром гормона тимуса тимопоэтина [353]. Основная функция тимопентина заключается в нормализации иммунологических параметров в случаях иммунодефицита и аутоиммунных заболеваний, и вирусных заболеваний [335, 361].

В России зарегистрирован лекарственный иммуномодулирующий препарат рег.№: ЛС-002646 от 01.12.11 – гексапептид (ГП): Arginyl-alpha-Aspartyl-Lysyl-Valyl-Tyrosyl-Arginine, который также является синтетическим аналогом активного центра гормона тимуса - тимопоэтина, с биологической активностью нативного гормона тимуса [3, 4, 14].

Тимопоэтин взаимодействует с клетками через никотиновые ацетилхолиновые рецепторы нейронального типа (NACHRs, nicotinic acetylcholine receptors), представляющие собой пентамерные катионные каналы. NACHRs экспрессируются на Т-лимфоцитах, клетки нейронального типа, НГ, базофилах и эозинофилах [225, 247]. В экспериментах *in vivo*, было продемонстрировано модулирующее влияние через воздействие на NACHRs НГ мышей модулирование функциональной активности НГ [75].

При исследовании свойств пентапептида - TP5 было продемонстрировано прямое связывание флуоресцентно меченого TP5 с HLA-DR, также была подтверждена специфичность связывания ингибированием немеченого TP5. Дополнил это открытие молекулярный анализ выявивший изменения сайта связывания в бороздке HLA-DR с валином (Val), который играет роль якоря 1 типа, необходимого для связывания TP5 с HLA-DR [223].

Молекулярное сходство Гексапептида – Arginyl-alpha-Aspartyl-Lysyl-Valyl-Tyrosyl-Arginine и Тимопентина - Arginyl-Lysyl-Asptyl-Valyl-Tyrosil, содержащих в структуре своих молекул Valyl, свидетельствуют о существовании двух вариантов рецепторного взаимодействия ГП и НГ: через связывание с HLA-DR и с NACHR; а также опосредованного действия цитокинов, индуцированных воздействием данных пептидов на другие клетки ИС.

Фармакологическое действие препарата ГП основано на восстановлении функций ИС, окислительно-антиокислительной баланса организма. ГП оказывает иммунорегулирующее влияние на Т-клеточное звено, численность и активность НГ, моноцитов, усиливает фагоцитарные функции, снижает синтез цитокинов и других медиаторов воспаления, способствует более длительной циркуляции специфических антител, повышая резистентность организма к инфекциям. Кроме того известны его гепатопротекторные, антиоксидантные свойства, способность усиливать эффективность антибактериальной терапии и снижать множественную лекарственную устойчивость организма [12, 20, 35, 70, 206].

ГП позволяет снизить антигенную нагрузку на организм при вакцинации и исключить поствакцинальные осложнения [4, 12, 14, 70].

ГП хорошо зарекомендовал себя в комплексном лечении таких иммунозависимых заболеваний как туберкулез, гепатит, псориаз, дифтерия, хронический бруцеллез, оппортунистические инфекции, тяжелых гнойно-воспалительных заболеваний [26, 32, 206, 258]. При этом, действие ГП при COVID-19 не изучено и представляет с нашей точки зрения научный интерес.

Таким образом, одними из самых безопасных и эффективных классов веществ, подходящих для дальнейших исследований и применения при лечении коронавирусной инфекции, являются пептиды – иммуномодуляторы с точно нацеленным механизмом действия.

В связи с изложенным, изучение эффекторных клеток, в частности НГ, и уровней сывороточных нейтрофил-ассоциированных провоспалительных цитокинов, участвующих в патогенезе COVID-19, является важным и актуальным для уточнения иммунопатогенеза заболевания, для разработки новых диагностических методов мониторинга, контролирующей особенности прогрессирования и тяжесть болезни, для создания новых таргетных иммунотерапевтических подходов в лечении пациентов COVID-19, что должно способствовать предотвращению возникновения тяжёлых осложнений болезни.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Объект исследования

Исследование выполнено в период 2021-2023 гг. на кафедре инфекционных болезней и эпидемиологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России; ГБУЗ "Специализированная клиническая инфекционная больница" МЗ Краснодарского края, ГБУЗ «Инфекционная больница №2» министерства здравоохранения Краснодарского края, кафедре клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС; в отделе клиническо-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Для реализации поставленной цели и задач проведено исследование 116 человек: 30 условно-здоровых взрослых лиц, 86 пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формой течения COVID-19.

Набор клинического материала осуществлялся с мая 2021 по июль 2021 года на базе ГБУЗ «СКИБ» министерства здравоохранения Краснодарского края, ГБУЗ «Инфекционная больница №2» министерства здравоохранения Краснодарского края.

Вариант исследуемого штамма SARS-COV2 -B.1.617, «Дельта».

В качестве объекта исследования использовали истории болезни, протоколы лечения, периферическую кровь (ПК) пациентов с различными формами тяжести течения COVID-19 при поступлении в стационар.

Исследования проводились в соответствии с требованиями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) с правками от 2013 года и со статьями 20, 22, 23 ФЗ № 323 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 г. (ред. от 22.12.2020);

одобрены локальным независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России протокол № 130 от 29.02.2024.

У пациентов, включенных в исследование, было получено письменное информированное согласие на сбор анамнеза, забор ПК, лабораторные исследования, обработку полученных данных, публикацию результатов исследования.

Критерии включения пациентов в исследование:

- Возраст пациентов с 20 до 80 лет;
- Пациенты с подтвержденным ПЦР - тестом случаями заболевания COVID-19 в острый период заболевания на 7-10 сутки;
- Больные женского и мужского пола;
- Информированное согласие больного, а также условно-здоровых добровольцев на проведение забора и исследование периферической крови.

Критерии исключения пациентов из исследования:

- Возраст младше 20 лет и старше 80 лет;
- Пациенты со злокачественными онкозаболеваниями, получавшие активную химио- или лучевую терапию;
- Больные с аллергическими заболеваниями в стадии обострения (бронхиальная астма, поллиноз);
- Травмы;
- Беременные женщины, женщины в периоде лактации;
- Отказ пациента от проведения исследования.

Пациенты, включенные в исследование, были распределены на группы, отличающиеся, формой тяжести течения заболевания (Таблица 2.1.1)

Таблица 2.1.1 –Характеристика клинических групп и проведенных исследований

Группы	Характеристика клинических групп		Количество пациентов	Количество иммунологических исследований
Группа сравнения (ГС)	Условно-здоровые добровольцы 58 (57; 70) лет		30	579
Клинические группы	Клинико-инструментальные и лабораторные показатели			
Группа исследования 1 (ГИ1) пациенты со среднетяжёлой формой COVID-19 61 (57; 71) лет	температура тела –38,5 (38,0; 39,5); наличие одышки при физической нагрузке; ЧДД > 22/мин; дыхательная недостаточность (ДН) I; SpO <sub>2</sub> ,% - 93 (92; 93); типичные для вирусного поражения изменения легкихКТ 1-2 – 26 (10,0; 32,5); СРБ 62,0 (36,3; 91,2); Ферритин 240,0 (48,7; 445,5).		45	1035
Группа исследования 2 (ГИ2) пациенты с тяжёлой формой COVID-19 61 (57; 71) лет	температура тела - 39,5 (38,5; 39,9); ЧДД > 30/мин.; Дыхательная недостаточность (ДН) I-II; SpO <sub>2</sub> ,% - 86(78; 88); типичные для вирусного поражения изменения легких, КТ3-4 -56,5 (54,3; 65,8); оценка по шкале qSOFA > 2 баллов; индекс оксигенации PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ≤ 300 мм.рт.ст.; снижение уровня сознания, ажитация; нестабильная гемодинамика; СРБ 120,4 (72,1; 168,7); Ферритин 541,0 (368,0; 617,4).		41	1025
Экспериментальные группы в системе in vitro				
Группа исследования 1 (ГИ1) пациенты со среднетяжелой формой COVID-19 61 (57; 71) лет	ГИ1+рекИФН $\alpha$ 2b	Исследования НГ, проведенные до и после инкубации ПК с рекИФН $\alpha$ 2b	45	272
	ГИ1+гексапептид (ГП)	Исследования НГ, проведенные до и после инкубации ПК с гексапептидом (ГП)	45	272
Всего			116	3 183



Был разработан двухэтапный дизайн исследования:

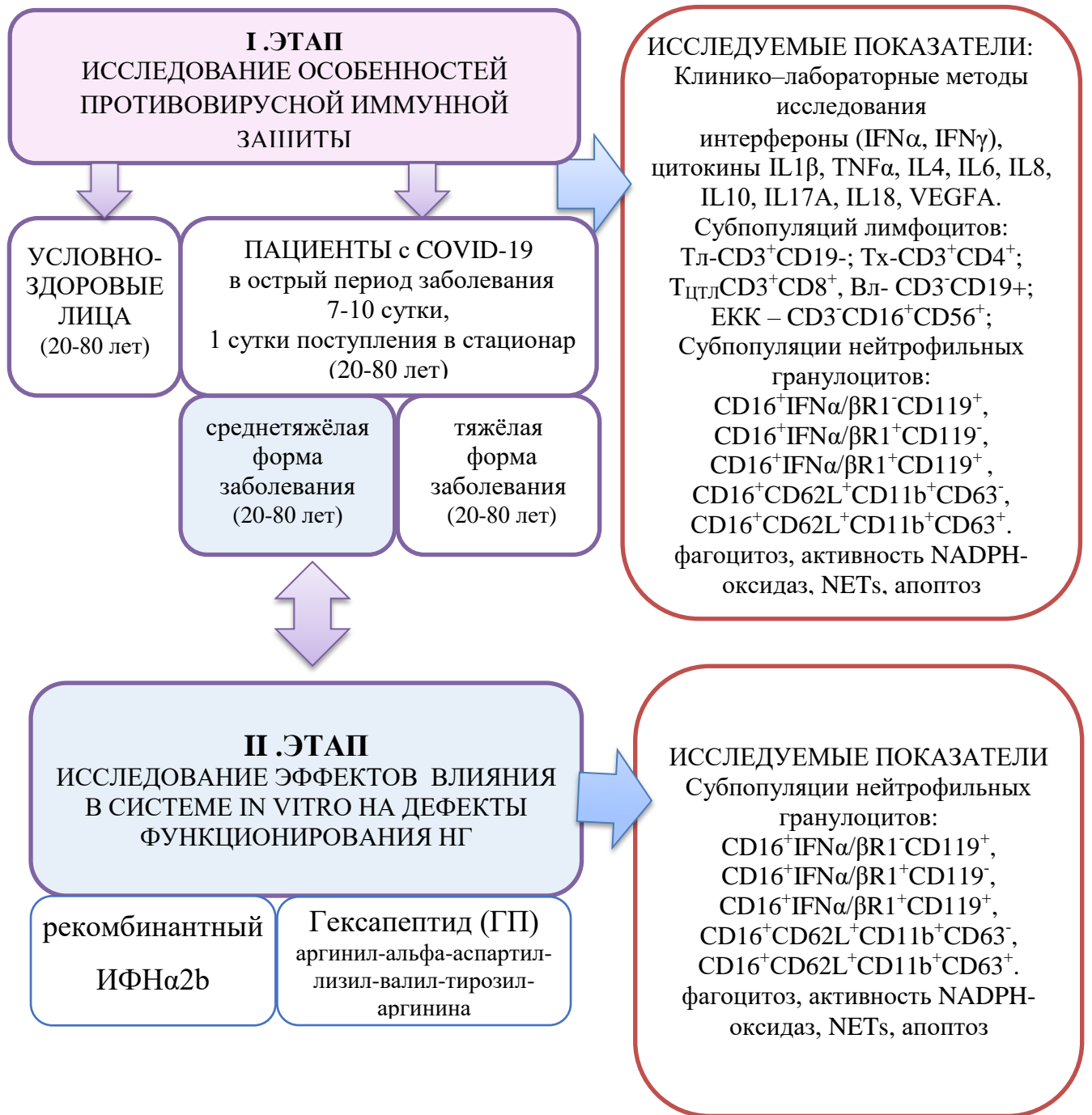


Рисунок 2.1.1 - Дизайн исследования

## 2.2 Методы исследования

### 2.2.1 Оценка клинического статуса и тяжести течения заболевания

Оценка клинического статуса, степени тяжести заболевания, инструментальная (лучевая), специфическая лабораторная диагностика и лечение больных проводились в соответствии с актуальной версией Временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 10» (утвержденная Минздравом России 08.02.2021) вместе с «Рекомендациями по описанию данных РГ И КТ ОГК», «Инструкцией по проведению диагностики COVID-19 с применением методов амплификации нуклеиновых кислот», «Инструкцией по проведению диагностики COVID-19 с применением иммунохимических методов», «Рекомендованными схемами лечения в условиях стационара» [6].

Для оценки клинического статуса проводился сбор жалоб, анамнеза заболевания путем опроса и анкетирования, термометрия, объективный осмотр, оценка объективного статуса (в том числе по шкале qSOFA) и клинического течения основного заболевания.

Также проводился мониторинг состояния кардио-респираторной системы. Регистрировали следующие параметры: ЭКГ, частоту сердечных сокращений, частоту дыханий, артериальное давление, определение сатурации — SpO<sub>2</sub>.

В соответствии с Временными методическими рекомендациями Министерства здравоохранения Российской Федерации (ВМР) проводилось тестирование на выделение РНК SARS-CoV-2 [6]. В качестве исследуемого материала использовались соскобы из носоглотки и ротоглотки. Вирус идентифицировали методом одноступенчатой ОТ-ПЦР в реальном времени (ПЦР) с гибридизационно - флуоресцентной детекцией (термоциклеры для амплификации нуклеиновых кислот CFX 96 (Bio-Rad, США), Rotor-Gene Qplex (Corbett Research, Австрия) с помощью набора реагентов для выявления РНК

коронавирусов SARS-CoV-2 «COVID -2019 Amp» (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера).

Оценка степени специфического поражения легких проводилась по данным мультиспиральной компьютерной томографии — МСКТ.

Тяжесть клинического течения основного заболевания оценивали в соответствии с ВМР. К среднетяжёлым формам течения болезни относили случаи со следующими клинико-инструментальными и лабораторными показателями: температура тела  $>38^{\circ}\text{C}$ , ЧДД  $> 22/\text{мин.}$ , наличие одышки при физической нагрузке, изменения при КТ, типичные для вирусного поражения (объем поражения минимальный или средний; КТ 1-2),  $\text{SpO}_2 < 95\%$ , СРБ сыворотки крови  $>10$  мг/л. Тяжёлое течение болезни диагностировали при наличии критериев: ЧДД  $> 30/\text{мин.}$ ,  $\text{SpO}_2 \leq 93\%$ ,  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$  мм.рт.ст., снижение уровня сознания, ажитация; нестабильная гемодинамика (систолическое АД менее 90 мм.рт.ст. или диастолическое АД менее 60 мм. рт.ст., диурез менее 20 мл/час; изменения в легких при КТ, типичные для вирусного поражения (объем поражения значительный или субтотальный; КТ 3-4), лактат артериальной крови  $> 2$  ммоль/л, оценка по шкале qSOFA  $> 2$  баллов.

## **2.2.2 Лабораторные методы исследования**

### **2.2.2.1 Общий анализ крови с определением содержания NETs и клеток в апоптозе**

Показатели общего анализа крови определяли с использованием автоматического гематологического анализатора Sysmex XN-1000 (Sysmex, Япония), реагенты производства Sysmex, Япония. Дополнительно микроскопией мазка ПК с окраской по Романовскому-Гимзе проводился подсчет лейкоцитарной формулы, параллельно осуществлялся учет количества образованных NETs и НГ, ушедших в патологический апоптоз на 100 НГ.

На основе полученных данных рассчитывался интеграционный диагностический критерий (ИДК) [9]:

$$\text{ИДК} = \frac{\% \text{ неизмененных НГ}}{\% \text{NETs} + \% \text{НГ в апоптозе}}$$

### 2.2.2.2 Биохимический анализ сыворотки крови

В соответствии с Методическими рекомендациями Минздрава РФ по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в сыворотке крови проводилось количественное определение: альбумина, глюкозы, лактата, аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), ферритина, С - реактивного белка (СРБ), D-димера на биохимическом анализаторе Beckman Coulter AU 480 (Beckman Coulter, США), реагенты производства BioSystems (Испания) [6].

Для оценки выраженности острой дыхательной недостаточности (ОДН) использовали следующие лабораторные показатели: изменение электролитного баланса, повышение СОЭ, увеличение активности АсАТ, АлАТ, ЛДГ, снижение уровня общего белка, а также увеличение уровня лактата в крови. Параметры КЩС и концентрация лактата определялись на анализаторе газов крови, электролитов и метаболитов GEM Premier 3500 с использованием оригинальных картриджей для анализатора «Инструментэйшн Лаборатори Ко.», США (нормальные значения в венозной цельной крови или плазме: 0,5-2,2 ммоль/л, в артериальной цельной крови или плазме: <1,8 ммоль/л). При этом, норму или увеличение лактата до 3 ммоль/л относили к умеренно выраженной ОДН, увеличение концентрации лактата до 4 ммоль/л – свидетельствовали о выраженной ОДН, для тяжелой ОДН характерно увеличение лактата до 5 ммоль/л [31].

## **2.2.3 Иммунологические методы исследования**

### **2.2.3.1 Определение концентрации иммуноглобулинов А, М, G**

Методом твердофазного иммуноферментного анализа ELISA (ИФА) определяли содержание иммуноглобулинов основных классов IgG, IgA, IgM на анализаторе ASCENT (Финляндия) с использованием соответствующих тест-систем (ЗАО ВЕКТОР–БЕСТ, Россия). Протокол постановки проводился согласно методикам, предложенным производителями тест-систем.

### **2.2.3.2 Определение концентрации системы интерферонов, про- и противовоспалительных цитокинов**

Концентрацию интерферонов IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL4, IL6, IL8, IL10 определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа ELISA (ИФА) на анализаторе ASCENT (Финляндия) с использованием соответствующих тест-системы (ЗАО ВЕКТОР-БЕСТ, Россия) и IL17A, IL18, VEGFA наборами тест-систем (Cloud-Clone Corp.(США)) согласно методикам производителя.

### **2.2.3.3 Определение субпопуляций лимфоцитов в периферической крови**

Оценку содержания субпопуляций лимфоцитов (ЛФ) и определение плотности экспрессии, маркерных рецепторов по показателю интенсивности флуоресценции (meaning fluorescence intensity - MFI) осуществляли на проточном цитометре Cytomics FC-500 («Beckman Coulter», США). Использовали соответствующие моноклональных антител («Beckman Coulter International S.A.», Франция). Тестировали показатели: Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), и В-лимфоцитов (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>), а также ЕКК-лимфоцитов (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) и ЕКТ-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>).

Окрашивание МКТ проводили в цельной крови. В лунки планшета помещали по 5 мкл соответствующих МКАТ маркеров лимфоцитов разных субпопуляций с флюорохромными красителями (FITC / PE) и 50 мкл ПК исследуемых образцов; инкубировали на шейкере 25 минут, RPM= 400g, T-24-25°C. По окончании инкубации в лунки планшета добавляли 250 мкл на 10 мин лизирующих реагентов OptiLyseC, (Beckman Coulter). Готовые образцы анализировали на проточном цитометре. Оценивали относительное количество различных субпопуляций ЛФ и уровень плотности экспрессируемых молекул по показателю интенсивности флуоресценции (MFI).

#### 2.2.3.4 Фенотипирование субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов

Методом проточной цитометрии определяли долю субпопуляций НГ (%), экспрессирующих поверхностные мембранные рецепторы IFN $\alpha$ / $\beta$ R1, CD119 (IFN $\gamma$ ), CD16, CD64, CD32, CD62L, CD63, CD11b: CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>НГ, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>НГ, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>НГ, CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>, а также плотность экспрессии изучаемых рецепторов (MFI).

Использовались конъюгаты моноклональных антител (МкАТ, «Beckman Coulter International S.A.», Франция) с флуоресцентными метками:

№	CD-FITC	CD-PE	CD-ECD	CD-PC5
1	CD63	CD16	CD62L	CD11b
2	IFN $\alpha$ / $\beta$	CD119 (IFN $\gamma$ )	CD16	
3	Neg.Ctrl - по трем каналам FITC, PE, ECD			IgG1 PC5

В лунки планшета помещали по 5 мкл соответствующих МкАТ и 50 мкл ПК исследуемых образцов; инкубировали на шейкере 25 минут, RPM= 400g, T-24-25°C; добавлением 250 мкл OptiLyse C проводили лизис эритроцитов и фиксацию лейкоцитов; образцы анализировали на цитометре, используя последовательное гейтирование.

Пример последовательного гейтирования для определения субпопуляций  $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^-$ ,  $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^+$ .

Для корректного анализа образца используются контроли: отрицательный контроль (неокрашенные клетки), изотипический контроль, по которым выставляют шкалы для каждого образца

На гистограмме – прямое/боковое светорассеяние (FSC/ SSC), выделяют гейт, в котором локализируются гранулоциты (GRA-NG)

1. Первый гейт GRA-NG, в котором расположены гранулоциты.

2. Из гейта GRA-NG на двухпараметрической гистограмме CD16-PE/CD62L-ECD определяют %НГ, которые одновременно экспрессируют CD16 и CD62L рецепторы ( $CD16^+CD62L^+$ ).

3. Из гейта  $CD16^+CD62L^+$ НГ на двухпараметрической гистограмме CD63-FITC/CD11b-PC5 определяют %НГ, которые оснащены CD11b и экспрессируют / или не экспрессируют CD63 рецептор, выявляя субпопуляции  $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^-$ ,  $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^+$ .

Помимо определения количества НГ, одновременно экспрессирующих рецепторы, регистрировали показатели плотности экспрессии (MFI) каждого рецептора.

Для визуализации статистически значимых изменений плотности экспрессии рецепторов, определяемых по величине показателя интенсивности флуоресценции (MFI), а, следовательно, изменение фенотипа изучаемых субпопуляций, были приняты обозначения bright-яркий, mid - средний, dim – низкий.

#### **2.2.4 Оценка фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов**

В соответствии с методическими рекомендациями [15] на предметном стекле готовился препарат-капля: 20 мкл ПК смешивали с 10 мкл гепарина (2 ед./100 мкл физиологического раствора), 10 мкл S.aureus (штамм № 209, разведение  $1 \times 10^6$  микробных тел) и 10 мкл мясопептонного бульона.

Во влажной камере инкубировали (Т 37°C, 120 минут). Удаляли эритроциты. Хорошо высушенные препараты фиксировали (5 минут, 96% этанол) и окрашивали (3-4 мин) по Романовскому.

С использованием микроскопа «PrimoStar» (Carl Zeiss, Германия) определяли долю активно фагоцитирующих клеток (%ФАН) на 100 НГ с учетом количества поглощённых бактерий (М), количества разрушенных ( $M_{уб}$ ) и живых ( $M_{жив}$ ) бактерий. По формулам рассчитывали дополнительные индексы.

Формулы расчета:	Показатели	Оцениваемая функция
%ФАН	доля активно фагоцитирующих НГ, посчитанная на 100 НГ	поглощительная функция, способность захвата бактериального антигена
$\Phi\text{Ч} = \frac{M}{\Phi\text{АН}}$	фагоцитарное число - среднее число микробов на 1 фагоцитирующий НГ	
$\Phi\text{И} = \frac{M}{100}$	фагоцитарный индекс - среднее число микробов на 100 НГ	
$\%П = \frac{M_{уб} * 100}{M}$	процент переваривания – процент убитых бактерий активно фагоцитирующими НГ	завершенность фагоцитарного акта, киллинговая и переваривающая способность
$\text{ИП} = \frac{M_{уб}}{100}$	индекс переваривания - среднее число убитых бактерий на 1 НГ.	

### 2.2.3.5 Определение NADPH-оксидазной активности нейтрофильных гранулоцитов

NADPH-оксидазную активность НГ определяли в NBT-тесте – спонтанном (NBT спонтанный) и индуцированном (NBT стимулированный) *S. aureus* (штамм № 209), позволяющим оценить функциональный эффекторный резерв НГ.



На 2-х предметных стеклах готовили препараты-капли:

1. NBTспонтанный (NBTсп): 10 мкл ПК смешивали с 10 мкл гепарина (2 ед./100 мкл физиологического раствора), 10 мкл физраствора, 10 мкл 0,1% раствора нитросинего тетразолия.

2. NBTстимулированный (NBTст): 10 мкл ПК смешивали с 10 мкл гепарина (2 ед./100 мкл физиологического раствора), 10 мкл *S.aureus* (штамм № 209, разведение  $1 \times 10^6$  микробных тел), 10 мкл 0,1% раствора нитросинего тетразолия.

Все компоненты смешивали круговыми движениями покачивая стекла.

Препараты инкубировали во влажной камере (Т 37°C, 15 минут), наклоном стекла удаляли эритроциты. Высушенные препараты, фиксировали в 96% этаноле 5 минут, окрашивали 0,5% раствором нейтрального красного 5 минут. Микроскопировали в световом микроскопе (10x100) «PrimoStar» (Carl Zeiss, Германия).

На 100 НГ определяли долю НГ с восстановленным в цитоплазме нерастворимым формазаном - индикатором NBT; по принципу Kaplow L.S. визуально оценивая содержание восстановленного формазана по степени заполнения цитоплазмы.

К формазан-позитивным НГ относили клетки в которых гранулы красителя занимали не менее 1/4 части цитоплазмы (1 степень), 1/2 -2 степень, 3/4 -3 степень, вся цитоплазма 4 степень.

Рассчитывали средний цитохимический индекс (СЦИ) в NBT спонтанном (СЦИсп) и стимулированном (СЦИст) тестах и, долю формазан позитивных клеток (%ФПК) в NBT спонтанном и стимулированном тестах (%ФПКсп и %ФПКст). Резервные возможности микробицидной активности НГ оценивали по коэффициенту мобилизации (КМ) по представленным в таблице формулам.

Показатель	Формула	
Средний цитохимический индекс (СЦИ)	$\text{СЦИ} = \frac{0a + 1b + 2c + 3d + 4e}{100}$	где a, b, c, d, e - количество НГ с восстановленным формазаном; 0, 1, 2, 3, 4 степень заполнения цитоплазмы НГ формазаном
Процент клеток, содержащих восстановленный формазан (%ФПК)	$\% \text{ФПК} = c + d + e$	где c, d, e - НГ 2, 3, 4 степени. заполнения цитоплазмы НГ формазаном
Коэффициент мобилизации (КМ)	$\text{КМ} = \frac{\% \text{ФПКст}}{\% \text{ФПКсп}}$	

#### 2.2.4 Культуральные методы

Для изучения влияния иммуностропных субстанций рекИФН $\alpha$ 2b и ГП на содержание, фенотипы исследуемых субпопуляций, а также на эффекторные функций НГ использовались культуральные методы в системе *in vitro*.

Использовали ламинарный шкаф Mars 1500, II класс защиты (Scanlaf, Дания), создающий непрерывный ламинарный поток воздуха для обеспечения стерильных условий работы, CO<sub>2</sub>-инкубатор «New Brunswick Scientific Galaxy 170S» (Великобритания).

В системе *in vitro* были исследованы образцы ПК 45 пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19 (ГИ1).

1. В эппендорф помещали 600 мкл цельной ПК, инкубировали с 60 мкл рекИФН $\alpha$ 2b (50 МЕ/мкл) 60 мин при температуре 37°C при постоянном перемешивании RPM=400g, на шейкере, помещённом в CO<sub>2</sub>-инкубатор.

2. В эппендорф помещали 600 мкл цельной ПК, инкубировали с 60 мкл ГП (10<sup>-6</sup> г/л) 60 мин при температуре 37°C при постоянном перемешивании RPM=400g, на шейкере, помещенном в CO<sub>2</sub>-инкубатор

Методом проточной цитометрии проводили иммунофенотипирование субпопуляций НГ с оценкой MFI, оценивали фагоцитарную функцию НГ, микробицидную активность НГ.

### 2.2.5 Статистические методы

Размер выборки исследуемых групп рассчитан с помощью online калькулятора мощности. При заданной мощности 90% и допустимом размере альфа-ошибки 5%, достоверные результаты до 75% в группе исследования возможно выявить, если количество пациентов в каждой группе будет не менее 32 человек (Sealed Envelope Ltd. 2012. Power calculator for binary outcome superiority trial. [Online] Available from: <https://www.sealedenvelope.com/power/binary-superiority/> [Accessed Mon Feb 17 2020]). Расчет отношения шансов с 95% доверительным интервалом (онлайн калькулятор) Медицинская статистика <https://medstatistic.ru/calculators/calccodds.html>.

Для математической обработки полученных результатов применялись программы Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2017. По критериям Шапиро–Уилка исследуемые параметры проверяли на нормальность распределения. По результатам были использованы методы непараметрической статистики и представлены в виде медианы (Me), содержащей центральные 50% наблюдения выборки, и квартильный интервал ( $Q_1$ ;  $Q_3$ ) между 25-м и 75-м перцентилями. По U-критерию Манна–Уитни определяли статистически значимые различия при  $p < 0,05$ .

### **ГЛАВА 3 КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ СО СРЕДНЕТЯЖЁЛОЙ И ТЯЖЁЛОЙ ФОРМАМИ COVID-19 В ОСТРЫЙ ПЕРИОД БОЛЕЗНИ**

Для оценки клинико-лабораторной характеристики пациентов с COVID-19 в исследование были включены 86 пациентов с COVID-19, госпитализированных в «ковидный госпиталь» - инфекционные отделения ГБУЗ «Специализированная клиническая инфекционная больница» МЗ Краснодарского края в период с декабря 2020 по март 2021 года.

#### **3.1 Клиническая характеристика пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19**

Лабораторно диагноз новой коронавирусной инфекции (COVID-19) был подтвержден у всех больных (100%) методом молекулярно-биологического анализа РНК SARS-CoV-2 в мазках из носо - и ротоглотки.

Средний возраст пациентов составлял 61 (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>: 57; 71) год, 58% мужчины, 42% женщины. Больные поступали в стационар в острый период с 5 по 12 дни от начала болезни. Медиана от дня начала болезни до момента госпитализации у пациентов составила 7 (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>: 5;10).

Превалирующими симптомами при поступлении в стационар были кашель (84%), высокая лихорадка (100%), утомляемость (100%) и одышка (81%), в 10 - 15% отмечалась миалгия и артралгия; более редкими проявлениями болезни были экзантема (6%) и диспепсический синдром (5%). Аносмия различной выраженности регистрировалась в 10% случаев (Рисунок 3.1.1).

Для определения особенностей клинической картины COVID-19 в исследуемых группах проведен сравнительный анализ течения заболевания в зависимости от степени тяжести. В соответствии клинико-лабораторными критериям тяжести течения заболевания, изложенными во ВМР (версия 10 (08.02.2021), были определены 2 клинические группы.

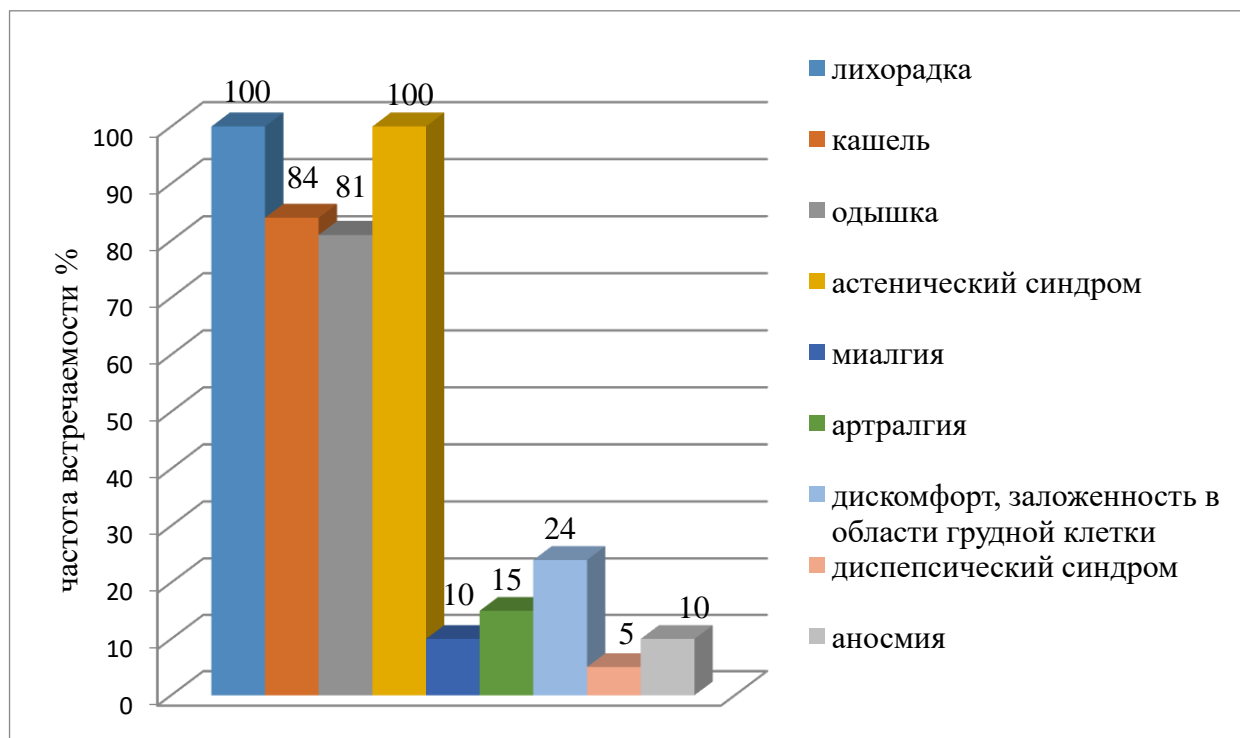


Рисунок 3.1.1 – Превалирующие симптомы острого периода болезни при поступлении в стационар

Группу исследования 1 (ГИ1) составили 45 человек (18 женщин, 27 мужчин) со среднетяжёлой формой COVID-19 с соответствующими критериями:  $T$  тела  $> 38^{\circ}\text{C}$ , ЧДД  $> 22/\text{мин}$ , одышка при физических нагрузках, изменения при КТ, типичные для вирусного поражения (объем поражения КТ 1-2),  $\text{SpO}_2 < 95\%$ ,  $\text{CRP} > 10 \text{ мг/л}$ .

В группу исследования 2 (ГИ2) были включены пациенты - 41 человек (18 женщин, 23 мужчины) с тяжёлой формой COVID-19, для которых были характерны следующие показатели:  $T$  тела  $> 38^{\circ}\text{C}$ , ЧДД  $> 30/\text{мин}$ , изменения в лёгких КТ 3-4,  $\text{SpO}_2 \leq 93\%$ .  $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 300 \text{ мм рт.ст.}$ , нестабильная гемодинамика (систолическое АД менее 90 мм рт.ст. или диастолическое АД менее 60 мм рт.ст., диурез менее 20 мл/час), лактат артериальной крови  $> 2 \text{ ммоль/л}$ ,  $\text{qSOFA} > 2$  балла); снижение уровня сознания, ажитация.

Изучена связь частоты представленности основных клинических симптомов в группах исследования 1 и 2 с тяжестью течения заболевания. Для количественного описания связи факторов (симптомов) применялся подсчет

отношения шансов (ОШ) с доверительным интервалом (ДИ) (Таблица 3.1.1, Рисунок 3.1.2 а и Рисунок 3.1.2 б).

Таблица 3.1.1 - Характеристика связи клинических симптомов с вероятностью среднетяжелого и тяжелого течения COVID-19 (n=86)

	ГИ 1 (n=45) средней степени тяжести		ГИ2 (n=41) тяжелое течение		p
	ОШ	(95% ДИ)	ОШ	(95% ДИ)	
Кашель	0,79	0,25-2,6	1,26	0,40-4,00	>0,05
Одышка	0,97	0,34-2,8	1,03	0,36-2,99	>0,05
Головная боль разной интенсивности, головокружение	1,70	0,46-6,3	0,59	0,16-2,17	>0,05
Дискомфорт/ заложенность в области грудной клетки	0,57	0,22-1,42	1,78	0,70-4,52	>0,05
Снижение/изменение уровня сознания	0,9	0,12-6,76	1,1	0,148-8,21	>0,05
Миалгия и артралгия	1,6	0,47-5,2	0,64	0,192-2,15	>0,05
Диспептический синдром	0,43	0,08-2,49	2,23	0,403-13,1	>0,05
Аносмия	2,43	0,45-13,3	0,41	0,075-2,24	>0,05

Как следует из таблицы 3.1.1 и рисунков 3.1.2 а и 3.1.2 б, ни один из зарегистрированных на момент поступления в стационар к 7 (5; 10) дню болезни симптомов статистически значимо не был ассоциирован с тяжестью дальнейшего течения COVID-19.

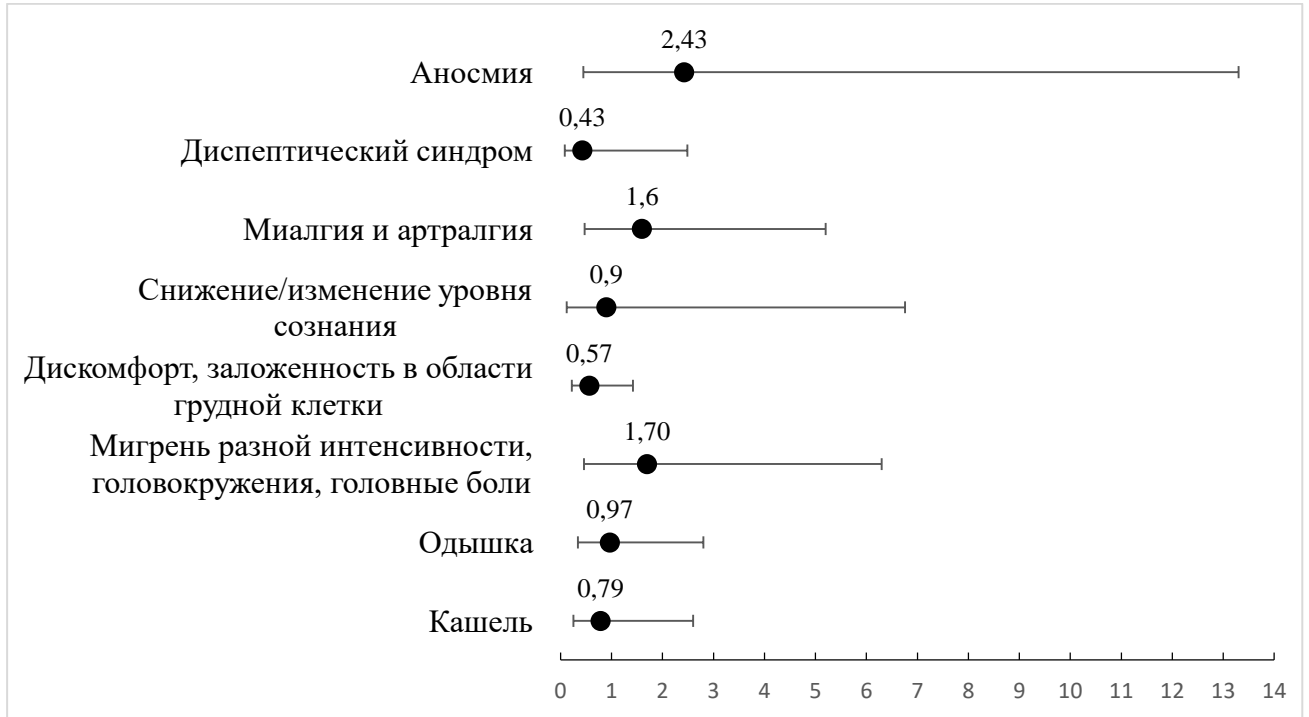


Рисунок 3.1.2 а – Влияние клинических симптомов острого периода на тяжесть течения заболевания (отношение шансов с ДИ) в группе больных со среднетяжелой формой болезни (ГИ1)

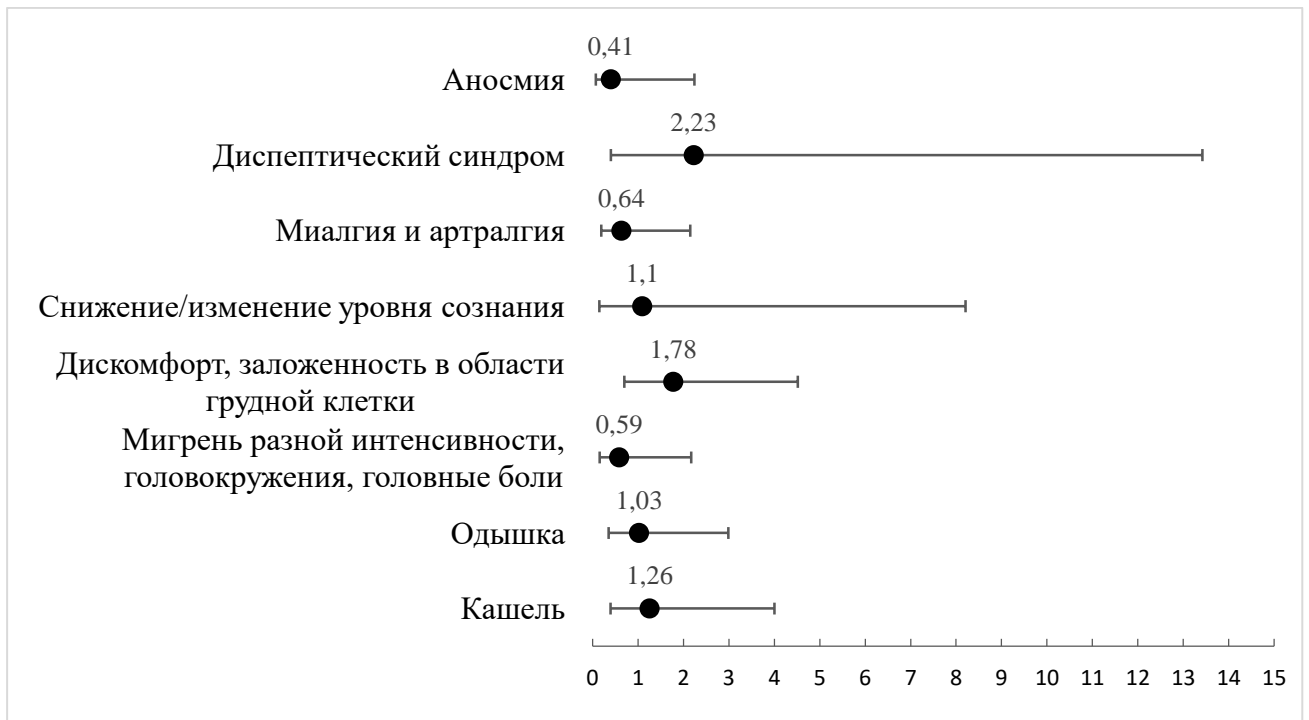


Рисунок 3.1.2 б – Влияние клинических симптомов острого периода на тяжесть течения заболевания (отношение шансов с ДИ) в группе больных с тяжелой формой болезни (ГИ2)

Клинические предикторы тяжести течения у пациентов в нашем исследовании выявить не удалось.

А такие симптомы как снижение/изменение уровня сознания, нестабильность гемодинамики, анурия, всегда ассоциированные с тяжелым течением COVID-19, к моменту госпитализации в стационар у наблюдавшихся нами больных не выявлялись.

Таким образом, жалобы на одышку, кашель, головную боль, дискомфорт в груди, лихорадку, боль в суставах и мышцах, рвоту, понос, аносмию не могут являться факторами риска тяжелого течения и характеризуют клиническую непредсказуемость новой коронавирусной инфекции.

В последние годы для характеристики тяжело протекающих инфекций достаточно часто используют впервые сформулированные в 1991 году на согласительной конференции Американского колледжа пульмонологов и Общества медицины критических состояний такие понятия и определения как синдром системного воспалительного ответа (ССВО), сепсис, тяжелый сепсис, септический шок.

На момент поступления в стационар оценивалась представленность критериев ССВО, характеризующегося наличием 2-х и более из следующих признаков: 1) тахипноэ  $>20$  в мин или  $PaCO_2 < 30$  мм. Нг, или больные на ИВЛ; 2) тахикардия  $\geq 90$  в мин; 3) лихорадка  $> 38,0^0$  С либо гипотермия  $< 36,0^0$  С; 4) лейкоцитоз  $> 12$  Г/л либо лейкопения  $< 4$  Г/л, либо незрелые формы нейтрофилов  $> 10\%$  (Таблица 3.1.2).

Произведена оценка взаимосвязи между выраженностью ССВО на момент поступления в стационар и тяжестью течения заболевания с развитием жизненных нарушений по методу четырех полей путем вычисления ОШ (ДИ).

В общей группе больных признаки ССВО выявлены у 76 человек (88,4%). В зависимости от количества признаков ССВО больные распределились следующим образом: один признак выявлен у 10 человек только при среднетяжелом течении (22,2%) (Таблица 3.1.2).



Таблица 3.1.2 - Представленность признаков синдрома системного воспалительного ответа в группах сравнения со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19

Количество признаков/параметров ССВО	ГИ 1 (n-45) степени тяжести	ГИ2 (n-41) тяжелое течение	ОШ (ДИ) для тяжелого течения
0-1	10	0	-
2	19	13	0,65 (0,26-1,54)
3	13	23	3,14 (1,29-7,68)
4	3	5	1,9 (0,43-8,7)

Два признака - у 32 больных (37,2%) общей группы, при среднетяжелом течении - у 19, при тяжелом течении - у 13 больных (42,2% и 37,7% соответствующих групп). Три признака ССВО выявлены у 36 больных общей группы (41,9%), 13 – при среднетяжелом и 23 при тяжелом течении болезни (28,8 и 56,1%, соответственно). Четыре признака ССВО установлено у 8 больных общей группы (9,3%), при среднетяжелой форме болезни - у 3 (6,7%) и при тяжелой - у 5 больных (12,2%).

Наличие 3-х (из 4-х) критериев ССВО статистически значимо является фактором риска тяжелого течения COVID-19.

Таким образом, острый период COVID-19 у 88,4% наблюдаемых больных характеризуется развитием синдрома системного воспалительного ответа (при среднетяжелом течении - в 77,8%, при тяжелом - в 100%). Одновременное сочетание 3-х критериев ССВО в 3,14 раз чаще встречается при тяжелом течении новой коронавирусной инфекции, чем при среднетяжелом. Это необходимо учитывать при прогнозе развития осложнений и исхода заболевания.

К утяжелению основного заболевания и ухудшению прогноза исхода болезни, как правило, приводит наличие сопутствующей патологии. Нами изучены анамнестические данные, полученные при поступлении в стационар, которые позволили оценить наличие и характер сопутствующих заболеваний (Таблица 3.1.3).

Таблица 3.1.3 – Анамнестические данные пациентов исследуемых групп (n=86)

Показатель	Значение
Возраст, лет	61 (57; 71)
Мужчины/женщины	50/36
Время от начала заболевания до поступления в стационар, сут.	7 (5–12)
Лабораторно ПЦР-подтвержденный SARS-CoV-2, n(%)	86 (100%)
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>	27,2 (26,8–34,3)
Ожирение, n (%)	24 (27,9%)
Сердечно-сосудистая патология, n (%):	52(60,4%)
-артериальная гипертензия, n (%)	36 (41,9%)
-ишемическая болезнь сердца, n (%)	11 (12,8%)
-хроническая сердечная недостаточность (функциональный класс заболевания (ФК 1 и 2), n (%)	15 (17,4%)
-миокардиодистрофия, n (%)	8 (9,3%)
Хроническая болезнь почек, n (%)	7 (8,1%)
Заболевания печени, n (%)	3 (4,3%)
Сахарный диабет, n (%)	18 (20,3%)
Заболевания легких, n (%)	4 (4,7)
Курение, n (%)	4 (4,7)

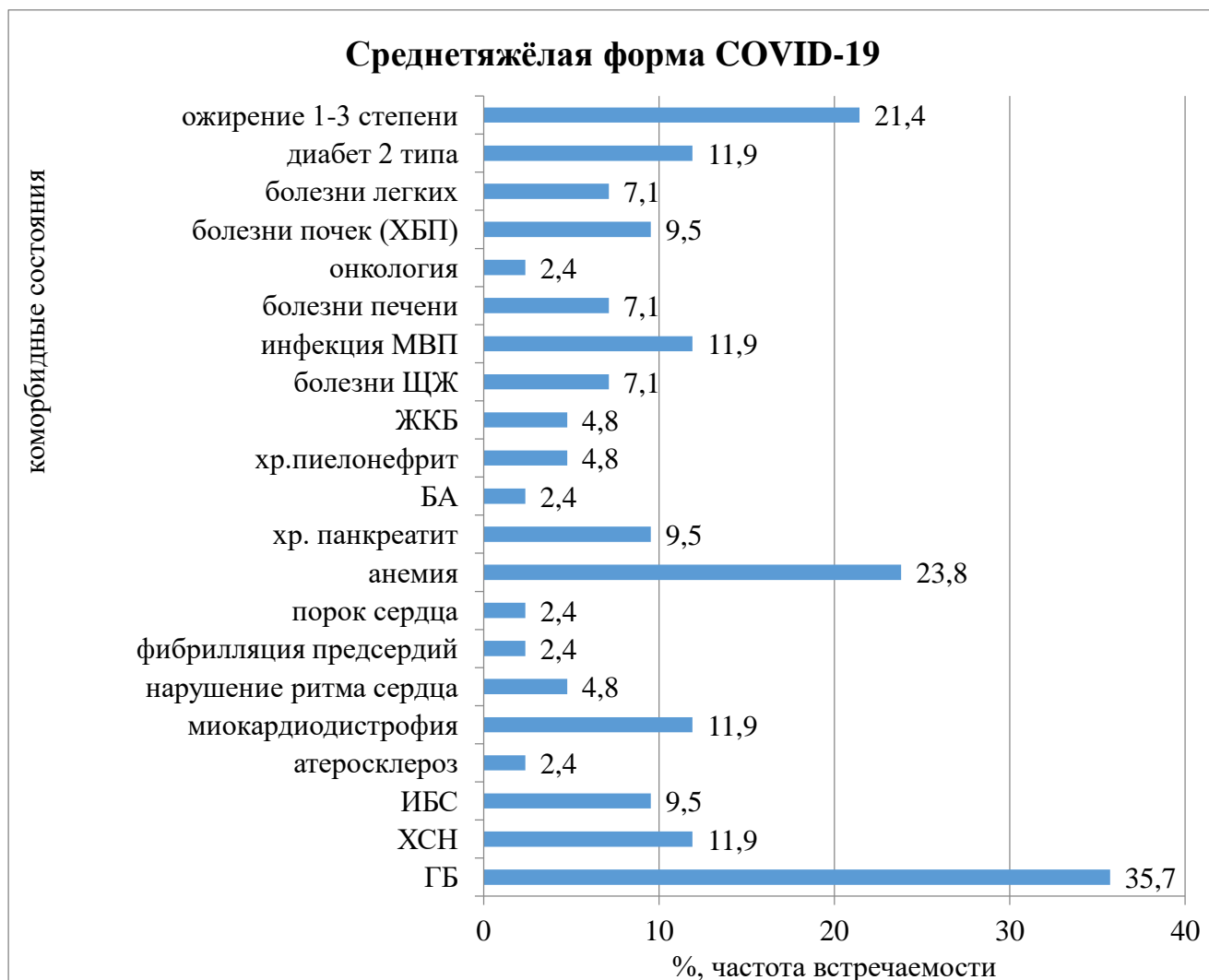
Кроме того, нами изучен индекс сопутствующей патологии (коморбидности) Чарльсона (Charlson Comorbidity Index, CCI), позволяющий оценить уровень сопутствующей патологии, принимая во внимание как количество, так и тяжесть 19-ти заранее определенных сопутствующих состояний. В общей группе наблюдавшихся больных количество сопутствующих

заболеваний колебалось от 1 до 11. Индекс коморбидности Чарльсона (CCI) составил в общей группе в среднем  $4,43 \pm 0,25$ .

Наиболее частыми сопутствующими заболеваниями у наблюдаемых больных были сердечно-сосудистая патология (60,4 %), среди которой 41,9 % приходилось на артериальную гипертензию, 12,8% - на ИБС и 13,9% - на хроническую сердечную недостаточность ФК 1 и 2 класса. У 20,3% пациентов отмечался сахарный диабет 2 типа и в 27,9% случаев - ожирение. Небольшую часть составляли пациенты с хроническим заболеванием почек, заболеваниями легких и печени (Таблица 3.1.3).

По результатам мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ) поражение легких у пациентов ( $n=86$ ), вошедших в исследование, соответствовало: 1-й степени (КТ-1)- в 9,3% ( $n=8$ ) случаев, 2-й степени (КТ-2) - в 43% ( $n=37$ ), 3-й степени (КТ-3) - в 44,2% ( $n=38$ ) случаев, 4-я степень (КТ-4) наблюдалась в 3,5% ( $n=3$ ) случаев.

У пациентов ГИ1 наиболее часто отмечались коморбидные заболевания сердечно-сосудистой системы: в 35,7% случаев - артериальная гипертензия (ГБ), в 11,9% - хроническая сердечная недостаточность (ХСН), в 9,5% - ишемическая болезнь сердца (ИБС) и в 11,9% - миокардиодистрофия. Доля пациентов, страдающих ожирением 1-3 степени и сахарным диабетом 2 типа, составила 21,4% и 11,9% случаев, соответственно. Также были выявлены данные о наличии у пациентов ГИ1 в 23,8 % случаев анемии. Отмечены и другие сопутствующие заболевания: в 9,5% случаев - хронические болезни почек (нефропатия, кисты почек), в 11,9% - инфекции мочевыводящих путей (МВП) и в 9,5% случаев - хронический панкреатит. В меньшем проценте случаев были выявлены болезни легких (7,1%) и щитовидной железы (7,1%) (Рисунок 3.1.3). Индекс коморбидности Чарльсона (CCI) в данной группе больных составил в среднем  $3,7 \pm 0,3$ .

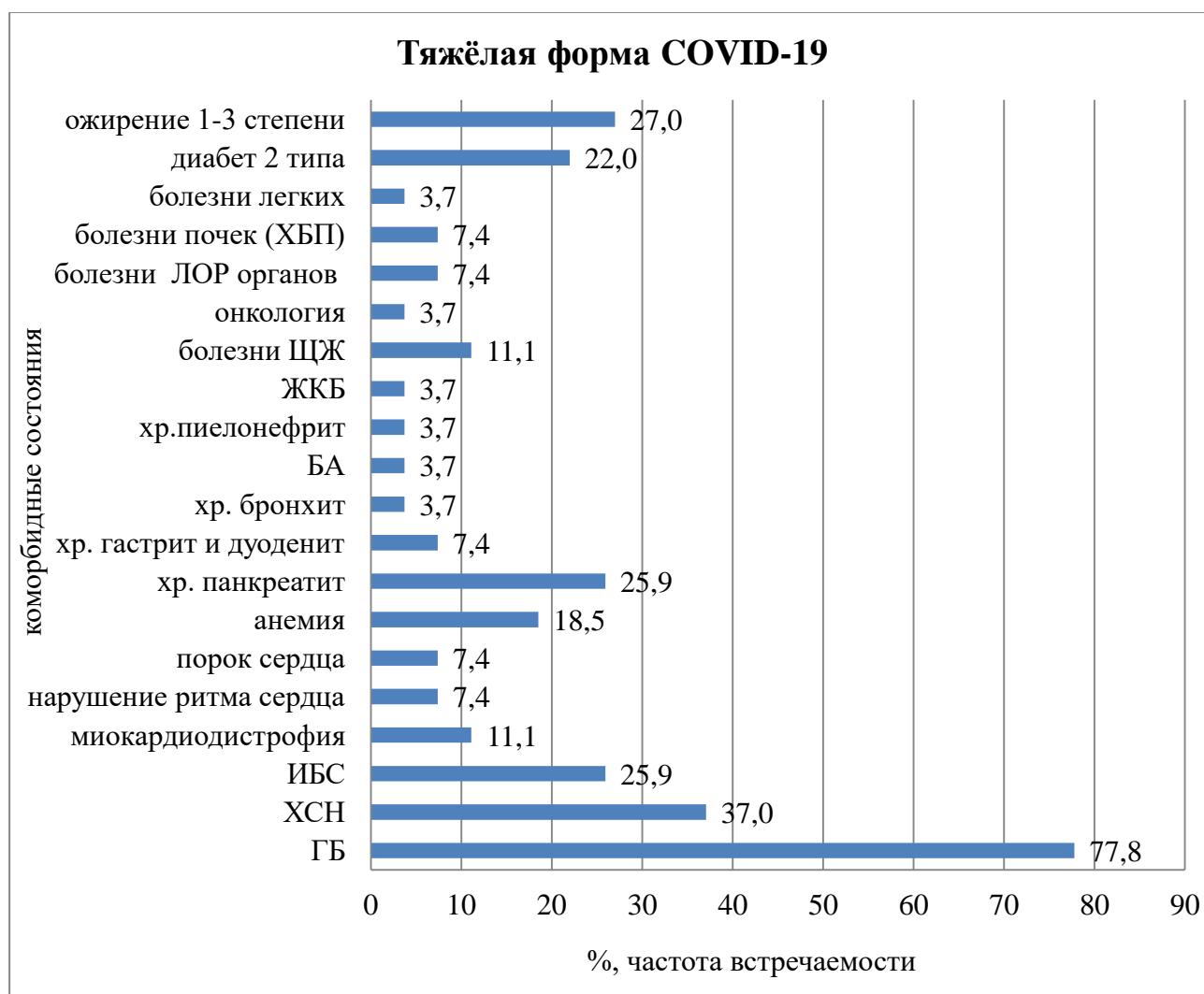


*Примечание: ГБ - гипертоническая болезнь, ХСН – хроническая сердечная недостаточность, ИБС - ишемическая болезнь сердца, БА - бронхиальная астма, ЖКБ - желчнокаменная болезнь, ЩЖ - болезни щитовидной железы, МВП - инфекции мочевыводящих путей, ХПБ - хронические болезни почек*

**Рисунок 3.1.3 - Коморбидные заболевания у пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19**

Доля пациентов с ожирением 1-3 степени составила 27%, а с сахарным диабетом 2 типа – 22,0% случаев. Также зафиксированы другие сопутствующие заболевания: в меньшем проценте случаев, в сравнении с ГИ1, - анемии (18,5 %), болезни легких (3,7%) и почек (7,4%); и в большем проценте случаев - хронический панкреатит (25,9%), заболевания ЩЖ (11,1%). В ГИ2 в 7,4 %

случаев были выявлены болезни ЛОР органов (синусит, фарингит, тонзиллит, отит, гайморит) (Рисунок 3.1.4).



*Примечание: ГБ - гипертоническая болезнь, ХСН – хроническая сердечная недостаточность, ИБС - ишемическая болезнь сердца, БА - бронхиальная астма, ЖКБ - желчнокаменная болезнь, ЩЖ - болезни щитовидной железы, МПВ - инфекции мочевыводящих путей, ХБП - хронические болезни почек*

Рисунок 3.1.4 – Коморбидные заболевания у пациентов с тяжёлой формой COVID-19

У пациентов с тяжёлым COVID-19 сопутствующая патология выявлялась статистически значимо чаще по сравнению с пациентами со среднетяжелой формой инфекции. Индекс коморбидности Чарльсона (CCI) в ГИ2 с тяжелым течением больных составил в среднем  $5,2 \pm 0,2$ , что достоверно отличалось от соответствующего показателя в ГИ1 ( $p < 0,05$ ).

### 3.2 Клинико-лабораторные показатели пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19 в острый период заболевания

У пациентов ГИ1 и ГИ2 также были исследованы основные показатели крови, включая лейкоцитарную формулу с учетом морфологических изменений НГ (формирование NETs и НГ в апоптозе), биохимические показатели, D-димер, а также основные маркеры воспаления, рекомендованные для исследования ВМР (Версия 10, МЗ РФ от 08.02.2021) (Таблица 3.2.1).

Таблица 3.2.1 - Клинико-лабораторные показатели пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19 в острый период (7-10 сутки) при поступлении в стационар (Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>))

Показатель	Значение		Референсные значения условно-здоровых лиц пожилого возраста
	ГИ1 среднетяжёлая форма COVID-19, n=45	ГИ2 тяжёлая форма COVID-19, n=41	
Температура, °C	38,5 (38,0; 39,5)	39,5 (38,5; 39,9)	36,6-37,0
КТ, %	26 (10,0; 32,5)	56,5 (54,3; 65,8)	-
SpO <sub>2</sub> , %	89 (89; 93)	86 (78; 88)	95-99
Лабораторные показатели			
Гемоглобин, г/л	117,0 (110,0; 134,0)	115,0 (110,0; 121,3)	120–160
Лейкоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	6,70 (5,80; 9,85)	11,50* (9,25; 15,25)	3,7-9,9
Лимфоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	1,81 (0,99; 2,00)	1,06* (0,74; 1,29)	1,6-4,8
Нейтрофилы, ×10 <sup>9</sup> /л	4,65 (3,91; 6,88)	8,27* (7,01; 10,42)	2,5 – 6,0
Тромбоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	237,0 (224,8, 247,3)	256,0 (226,0, 289,0)	180–320
D-димер, нг/мл	387 (384; 963)	620* (510; 1880)	250–500

Продолжение Таблицы 3.2.1.

Показатель	Значение		Референсные значения условно-здоровых лиц пожилого возраста
	ГИ1 среднетяжёлая форма COVID-19, n=45	ГИ2 тяжёлая форма COVID-19, n=41	
Глюкоза, ммоль/л	6,9 (5,4; 8,7)	7,5* (6,5; 8,7)	4,6–6,4
Альбумин, г/л	42,0 (39,0; 45,0)	39,0 (38,0; 42,0)	35–50
АСТ, Ед/л	32,12 (24,54; 36,12)	31,30 (24,35; 34,32)	5–31
АЛТ, Ед/л	34,56 (26,34; 42,34)	36,94 (30,01; 43,76)	7–31
ЛДГ, ЕД/л	287,7* (220,5; 373,2)	432,7*^ (411,1; 496,6)	130–220
Лактат, ммоль/л	1,5 (1,1; 2,0)	2,6*^ (2,5–3,9)	0,5–2,2
С-реактивный белок, мг/л	62,0* (36,3; 91,2)	120,4* (72,1; 168,7)	≤ 5
Ферритин, мкг/мл	240,0 (48,7; 445,5)	541,0* (368,0; 617,4)	15–200
<p><i>Примечание: *- различия показателей от референсных значений условно-здоровых лиц пожилого возраста <math>p &lt; 0,05</math>; критерий Манна-Уитни; ^- различия между показателями ГИ 1 и ГИ 2, <math>p &lt; 0,05</math>; критерий Манна-Уитни</i></p>			

Выявленная гипергликемия также является стимулом развития воспалительного ответа, увеличения выработки цитокинов, которые, в свою очередь, вызывают эндотелиальную дисфункцию и увеличивают прокоагулянтную активность [285]. Выявленные повышенные уровни D-димера сигнализируют о развитии гиперкоагуляционного синдрома [279].

При оценке показателей общеклинического анализа крови при среднетяжёлой форме COVID-19 в ГИ 1 выявлено повышение содержания НГ ( $p < 0,05$ ) и доли палочкоядерных форм (ПЯЛ) на фоне неизменяющегося ( $p > 0,05$ ) общего количества лейкоцитов и снижения содержания ЛФ ( $p_{1,2} < 0,05$ ).

В ГИ 2 с тяжёлой формой течения инфекционного процесса отмечался умеренный лейкоцитоз – 11,50 (9,25; 15,25)  $\times 10^9/\text{л}$ , нейтрофилёз - 8,27 (7,01; 10,42)  $\times 10^9/\text{л}$  со сдвигом влево – %ПЯЛ - 13,0 (12,0; 21,0), лимфопения - 1,06 (0,74; 1,29)  $\times 10^9/\text{л}$  (Таблица 3.1.5).

Таблица 3.2.2 – Количественные характеристики содержания лейкоцитов, нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов крови пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формой COVID-19 (Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>))

Показатель	ГИ 1 среднетяжёлая форма заболевания, n=45	ГИ 2 тяжёлая форма заболевания, n=41	ГС группа сравнения, n=30
L, $10^9/\text{л}$	6,70 (5,80; 9,85)	11,50*^ (9,25; 15,25)	6,25 (5,75; 6,75)
ЛФ, %	27,0* (18,0; 30,5)	11,0*^ (8,0; 17,0)	35,0 (31,0; 36,0)
ЛФ, $10^9/\text{л}$	1,81* (0,99; 2,00)	1,06* (0,74; 1,29)	2,39 (2,02; 2,68)
НГ, %	69,5* (67,5; 80,0)	77,5* (75,8; 86,5)	60,0 (56,0; 63,0)
НГ, $10^9/\text{л}$	4,65 (3,91; 6,88)	8,27*^ (7,01; 10,42)	3,75 (3,22; 4,25)
СЯЛ, %	61,5 (51,5; 71,5)	65,0 (50,5; 74,5)	55,5 (54,3; 59,8)
ПЯЛ, %	7,5* (6,0; 11,0)	13,0*^ (12,0; 21,0)	3,0 (1,0; 4,5)
МОН, %	7,0 (2,0; 8,8)	9,0* (8,0; 11,5)	5,0 (3,3; 6,8)
ЭОЗ, %	0	0	3,5 (3,0; 4,0)

*Примечание: \* - различия между показателями ГИ 1 (среднетяжёлая форма COVID-19), ГИ 2 (тяжёлая форма COVID-19) и показателями ГС; ^ - различия между показателями ГИ 1 и ГИ 2,  $p < 0,05$ ; критерий Манна-Уитни*

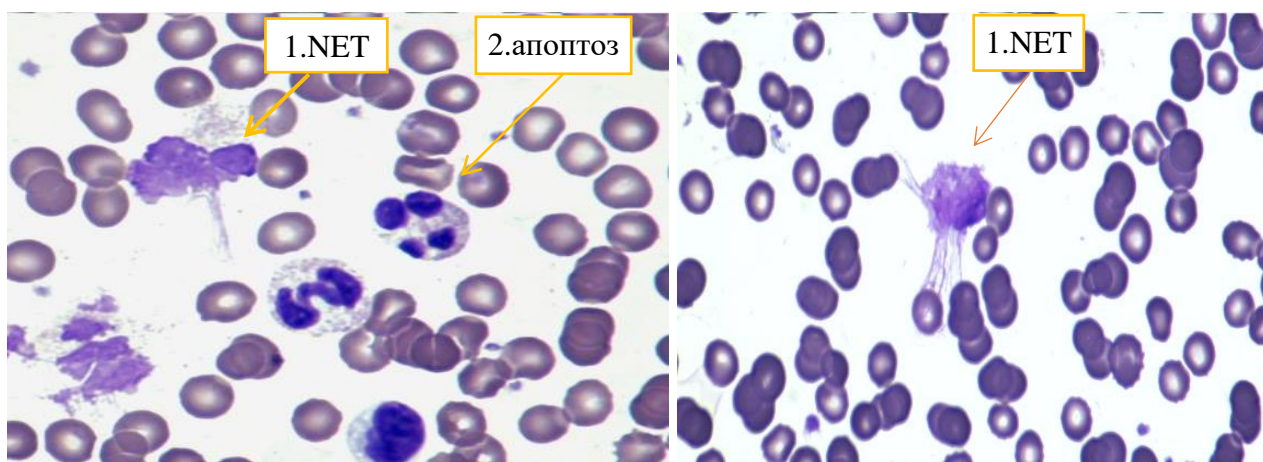
Показано значимое снижение содержания лимфоцитов на фоне повышения количества НГ, что приводит к повышению соотношения нейтрофилов к лимфоцитам в ГИ1 - 2,6 (2,0, 6,9), в ГИ2 7,8 (5,4, 14,0) и свидетельствует о значимом угнетении иммунного ответа, а в некоторых публикациях даже



расценивается как предиктор летального исхода в различных клинических ситуациях [1].

Параллельно с подсчетом лейкоцитарной формулы в мазках ПК с окраской по Романовскому-Гимза проводился учет количества образованных NETs и НГ, ушедших в патологический апоптоз, на 100 НГ.

Установлено, что в остром периоде COVID-19 у всех пациентов ГИ1 и ГИ2 отмечается появление в крови НГ, сформировавших NETs, и клеток с патологическим апоптозом (Рисунок 3.2.1).



*Примечание: Микрофотографии НГ периферической крови пациентов с COVID-19 (микроскоп Олутрис, световая микроскопия, 10x100): 1- НГ образующие NETs (окраска по Романовскому-Гимза); 2- НГ в апоптозе*

**Рисунок 3.2.1 - Патологически ускоренные процессы апоптоза и формирования NETs нейтрофильных гранулоцитов периферической крови у пациентов с COVID-19**

Так, в ГИ 1 на 100 просчитанных НГ выявлялось 3,5 (2,5; 4,0)% клеток, вошедших в NETos, и 3,0 (3,0; 3,5)% клеток в апоптозе (Таблица 3.2.3.).

В ГИ 2 при тяжелой форме заболевания выявлялось в 4 раза большее количество NETs и апоптических клеток - 13,0 (9,0;16,0)% и 12,0 (10,0; 16,5)%, соответственно. При этом, у ГС выявлялись только единичные клетки с физиологическим апоптозом 1,0 (1,0; 2,0)%. НГ, с одной стороны, участвуют в клиренсе вируса посредством NETs, но при гиперактивации могут оказывать пагубное воздействие, способствуя патогенезу SARS-CoV-2 и усугубляя

осложнения COVID-19, такие как ОРДС, тромбоз, развитие эндотелиита и васкулита.

Таблица 3.2.3 – Морфологические изменения показателей крови пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19 Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

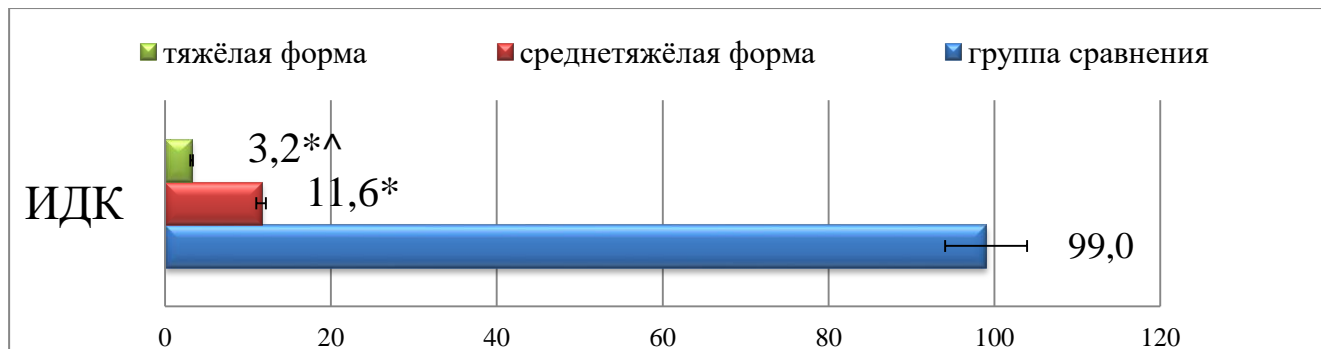
Показатель	ГИ 1 среднетяжёлая форма заболевания, n=45	ГИ 2 тяжёлая форма заболевания, n=41	ГС группа сравнения n=30
НГ, %	69,5* (67,5; 78,0)	77,5* (75,8; 86,5)	60,0 (56,0; 63,0)
NETs, %	3,5* (2,5;4,0)	13,0*^ (9,0;16,0)	0
НГ в апоптозе, %	3,0* (3,0; 3,5)	12,0*^ (10,0; 16,5)	1,0 (1,0; 2,0)
ИДК	11,6* (8,8; 13,6)	3,2*^ (2,5; 9,5)	99,0 (99,0; 99,0)
<i>Примечание: *- различия показателей пациентов с COVID-19 по отношению кс показателям группы сравнения; ^- различия показателей в группах пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19, p&lt;0,05, критерий Манна-Уитни</i>			

В ГИ 2 при тяжелой форме заболевания выявлялось в 4 раза большее количество NETs и апоптических клеток - 13,0 (9,0;16,0)% и 12,0 (10,0; 16,5)%, соответственно. При этом, у ГС выявлялись только единичные клетки с физиологическим апоптозом 1,0 (1,0; 2,0)%. НГ, с одной стороны, участвуют в клиренсе вируса посредством NETs, но при гиперактивации могут оказывать пагубное воздействие, способствуя патогенезу SARS-CoV-2 и усугубляя осложнения COVID-19, такие как ОРДС, тромбоз, развитие эндотелиита и васкулита.

На основе полученных данных, нами был разработан новый интеграционный диагностический критерий (ИДК) [9], характеризующий состояние системы НГ у пациентов в остром периоде COVID-19, который с учетом частоты встречаемости НГ, формирующих NETs в периферической крови и находящихся в состоянии патологического апоптоза, рассчитывается по формуле:

$$\text{ИДК} = \frac{\% \text{ неизменных НГ}}{\% \text{NETs} + \% \text{НГ в апоптозе}}$$

Расчетный ИДК у пациентов с COVID-19 отражает тяжесть течения заболевания. Данный интеграционный критерий в ГС составил 99,0 (99,0; 99,0), в ГИ1 - 11,6 (8,8; 13,6), что в 8,5 раз меньше, чем в ГС ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 3.2.2).



*Примечание: \* - различия показателей пациентов с COVID-19 от ГС сравнения; ^ - различия показателей в группах пациентов со среднетяжелой и тяжелой формами COVID-19,  $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни*

Рисунок 3.2.2 – Интеграционный диагностический критерий при среднетяжелой и тяжелой формах COVID-19

Наибольшее снижение ИДК до 3,2 (2,5; 9,5), что в 30 раз ( $p < 0,05$ ) ниже показателя ГС и в 3,6 раз ниже значений ГИ1 ( $p < 0,05$ ), отмечалось у пациентов, имеющих более тяжелое течение инфекции, сопровождающееся выраженными признаками нарушения гемодинамики с высоким процентом поражения легочной ткани на снимках КТ и более высоким риском развития имунотромбозов.

Таким образом, в результате исследования показано, что для острого периода среднетяжелой формы COVID-19 (7-10 сутки) на фоне неблагоприятного коморбидного фона характерно повышение неспецифических маркеров воспаления (СРБ, ферритин, ЛДГ). Кроме того, отмечается повышение количества НГ, сформировавших NETs 3,5 (2,5-4,0) % и вступивших в апоптоз 3,0 (3,1-3,5) %, и снижение в 8,5 раз ИДК до 11,6 (8,8 - 13,6) относительно показателей условно-здоровых лиц ( $p < 0,05$ ), что может быть использовано в качестве новых диагностических критериев в ранние сроки инфекционного процесса.

При тяжелой форме COVID-19 в остром периоде на фоне отягощенной коморбидности, сочетания трех и более заболеваний, установлено значительное повышение неспецифических маркеров воспаления (СРБ, ферритин, ЛДГ, лактат,

D-димер), а также новых ранних диагностических критериев: увеличение доли НГ, сформировавших NETs 13,0 (9,0-16,0)% и вступивших в апоптоз 12,0 (10,0; 16,5)%, снижение ИДК до 3,2 (2,5-7,5) в сравнении со значениями условно-здоровых лиц, что сопоставимо с тяжестью инфекционного процесса.

Таким образом, клинические признаки первой недели болезни до поступления в стационар не определяют дальнейшую тяжесть течения COVID-19. Жалобы на одышку (81%), кашель (84%), головную боль (?%), дискомфорт в груди (24%), лихорадку (100%), боль в суставах (15%) и мышцах (10%), рвоту (5%), диарею (5%), аносмию (10%) не могут являться факторами риска тяжелого течения и характеризуют клиническую непредсказуемость новой коронавирусной инфекции. Острый период COVID-19 у 88,4% госпитализированных больных характеризуется развитием синдрома системного воспалительного ответа (при среднетяжелом течении - в 77,8%, при тяжелом - в 100%). Одновременное сочетание 3-х критериев ССВО в 3,14 раз чаще встречается при тяжелом течении новой коронавирусной инфекции, чем при среднетяжелом. Для пациентов с тяжелым течением COVID-19 характерен индекс коморбидности Чарльсона  $\geq 5$ .

Лабораторными критериями дифференциации тяжести дальнейшего течения COVID-19 могут служить уровни СРБ, ЛДГ, лактата, более значимое повышение концентраций ферритина и D-димера, нейтрофильно-лимфоцитарное отношение и выявленные новые ранние диагностические критерии тяжести и прогрессирования инфекции: увеличение доли НГ, сформировавших NETs и вступивших в апоптоз, снижение ИДК.

Сравнительный анализ информационной эффективности ранних диагностических критериев продемонстрировал возможность дифференцирования степени тяжести COVID-19: при тяжелой форме, в отличие от среднетяжелой, количество NETs было выше в 4 раза, клеток, вошедших в апоптоз, - в 4 раза; наиболее значимым критерием определения тяжести процесса является снижение ИДК при тяжелой форме до 3,2 (2,5; 7,5), а при среднетяжелой форме до 11,6 (8,8; 13,6) против 99,9 (99,9; 99,0) в группе сравнения.

## **ГЛАВА 4 ВАРИАТИВНОСТЬ ДИСРЕГУЛЯТОРНЫХ НАРУШЕНИЙ ОСНОВНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19**

Уточнение иммунопатогенеза COVID-19, направленное на выявление всего комплекса взаимосвязанных нарушений иммунного гомеостаза, является актуальной задачей и направлено на понимание сложных врожденных и адаптивных иммунных ответов, которые тесным образом сопряжены с особенностями различных клинических проявлений, вызванных инфекцией SARS-CoV-2 [7].

Для уточнения нарушений функционирования ИС при вторжении вируса SARS-CoV-2 и выявления маркеров тяжести течения инфекционного процесса проводились иммунологические исследования в 1 день госпитализации пациентов в стационар до начала проведения терапии, при этом следует отметить, что пациенты ГИ1 среднетяжёлой формы обследовались на 7 (6; 10) день, а ГИ2 тяжёлой формы течения - на 7 (7- 10) день после начала заболевания и появления симптомов. Группа сравнения (ГС) была сформирована на основе показателей 30 условно-здоровых лиц в возрасте 58 (57; 70) лет (54% мужчины, 46% женщины).

### **4.1 Дисбаланс системы интерферонов и про- и противовоспалительных цитокинов у пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19**

Для уточнения дефектов системы интерферонов ( $IFN\alpha$ ,  $IFN\gamma$ ) и про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови 86 пациентов с COVID-19 группы исследования 1 (ГИ1, n=45) со среднетяжёлой формой и группы исследования 2 (ГИ2, n=41) с тяжёлой формой течения заболевания была проведена оценка уровней  $IFN\alpha$ ,  $IFN\gamma$  и цитокинов  $IL1\beta$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IL4$ ,  $IL6$ ,  $IL8$ ,  $IL10$ ,  $IL17A$ ,  $IL18$ ,  $VEGFA$ .

Анализ результатов исследований интерферонового статуса в острый период COVID-19 позволил выявить слабый противовирусный ответ, вызванный блокадой продукции IFN I и II типов (Рисунок 4.1.1).

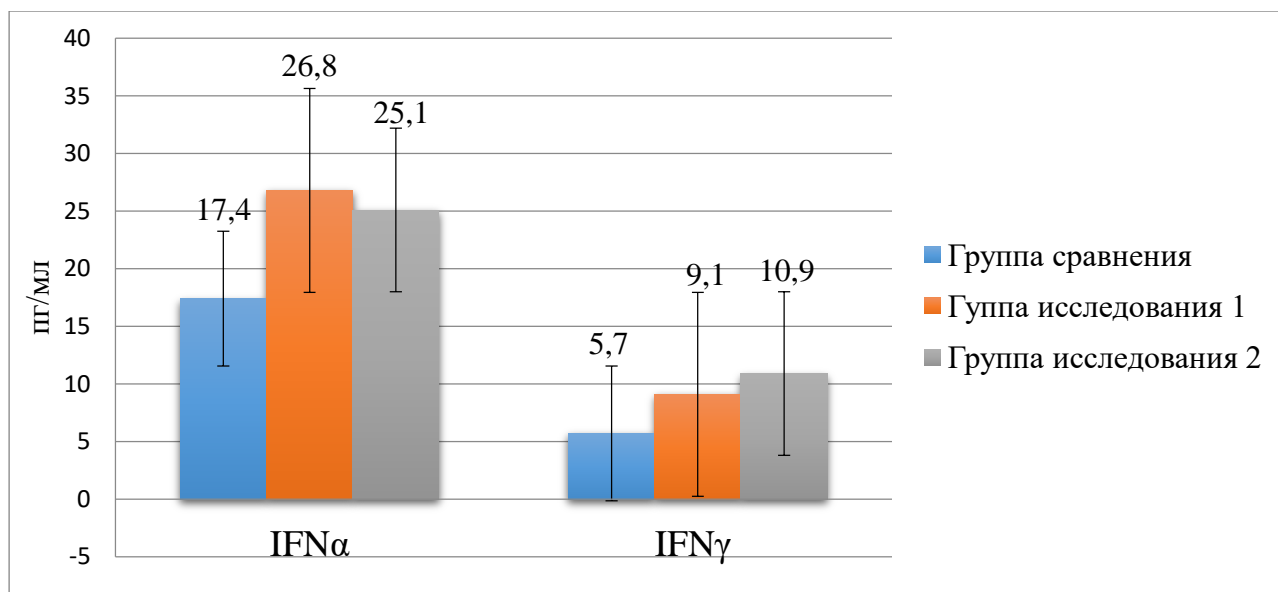


Рисунок 4.1.1 - Концентрации IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  у пациентов среднетяжёлой (группа исследования 1) и тяжёлой (группа исследования 2) формах COVID-19

Так показано, что уровень IFN $\alpha$  незначительно повышался до 26,8 (24,2; 33,1) пг/мл в ГИ1 пациентов со среднетяжёлой и до 25,1 (19,8; 27,34) пг/мл в ГИ 2 тяжёлой формами COVID-19 в пределах показателей ГС - 17,4 (16,2; 25,7) пг/мл ( $p_{1,2} > 0,05$ ) (Рисунок 4.1.1).

Аналогичные тенденции зарегистрированы в ГИ1 и ГИ2 и при анализе показателей уровня IFN $\gamma$  (Рисунок 4.1.1, Таблица 4.1.1).

Имеются данные, объясняющие снижение уровня IFN $\gamma$  у пациентов с тяжёлой формой COVID-19 уменьшением количества и функциональным истощением Т- лимфоцитов - основных продуцентов IFN $\gamma$  [83]. Неадекватный ответ системы IFNs, выявляемый во всех исследуемых группах, был ассоциирован с прогрессированием вирусной инфекции.

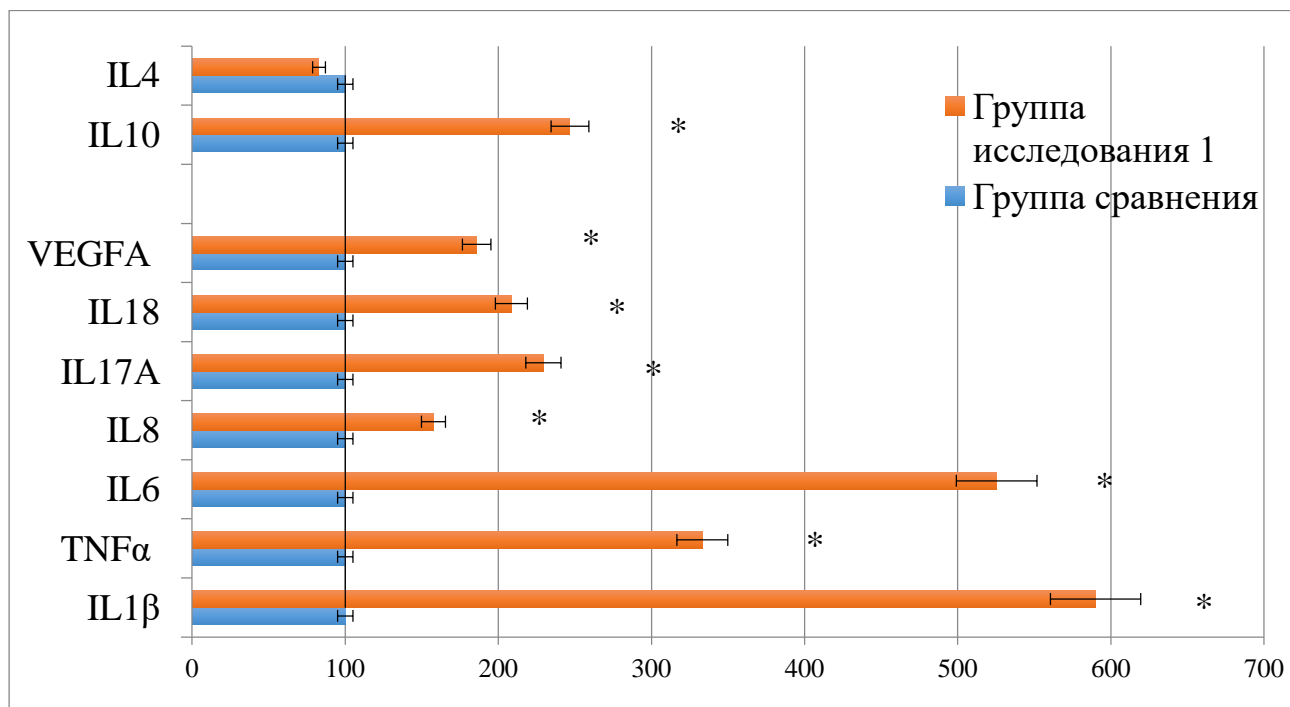
На фоне неадекватной реакции системы IFN отмечается значительная активация провоспалительных цитокинов (Таблица 4.1.1).

Таблица 4.1.1 – Цитокиновые профили пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19 (Me (Q1; Q3))

Показатель	Группа исследования со среднетяжёлой формой заболевания ГИ1, n=45	Группа исследования с тяжёлой формой заболевания ГИ2, n=41	Группа сравнения взрослые добровольцы ГС, n=50
IFN $\alpha$ пг/мл	26,8 (24,2; 33,1)	25,1 (19,8; 27,34)	17,4 (16,2; 25,7)
IFN $\gamma$ пг/мл	9,1 (8,0; 10,2)	10,9 (8,9; 15,7)	5,7 (5,3; 13,9)
IL1 $\beta$ пг/мл	5,9* (2,1; 6,5)	6,8* (4,1; 9,5)	0,1 (0,01; 0,1)
TNF $\alpha$ пг/мл	14,8* (12,8; 32,7)	13,4* (10,3; 20,1)	4,4 (2,6; 5,0)
IL6 пг/мл	64,9* (44,6; 105,2)	494,8* <sup>^</sup> (106,7; 586,7)	12,4 (1,9; 13,1)
IL8 пг/мл	9,6* (6,9; 14,9)	39,7* <sup>^</sup> (18,9; 59,0)	5,3 (3,5; 5,7)
IL18 пг/мл	672,5* (451,7; 740,1)	859,7* <sup>^</sup> (788,9; 1059,0)	322,5 (185,5; 388,7)
IL17A пг/мл	31,2* (26,7; 58,3)	113,8* <sup>^</sup> (69,2; 239,2)	13,6 (7,7; 21,8)
VEGFA пг/мл	1365,0* (1222,3; 1575,3)	1174,0* (1099,0; 1446,0)	734,1 (700,0; 739,3)
IL10 пг/мл	7,3* (3,3; 12,7)	15,4* <sup>^</sup> (13,4; 22,5)	3,0 (2,5; 3,3)
IL4 пг/мл	2,2 (1,9; 2,9)	3,7* <sup>^</sup> (3,1; 4,9)	2,7 (2,2; 2,9)
<i>Примечание: * - различия между показателями ГИ 1 (среднетяжёлая форма COVID-19), ГИ 2 (тяжёлая форма COVID-19) и показателями ГС; ^ - различия между показателями ГИ 1 и ГИ 2, p&lt;0,05, критерий Манна-Уитни</i>			

Выявлено, что у пациентов со среднетяжелой формой COVID-19 (ГИ1) в остром периоде, наблюдается значительное увеличение концентрации провоспалительных системных цитокинов, индуцирующих острофазный ответ:

IL1 $\beta$  в 59 раз до 5,9 (2,1; 6,5) пг/мл против 0,1 (0,01; 0,1) пг/мл ( $p < 0,05$ ); TNF $\alpha$  в 4 раза до 14,8 (12,8; 32,7) пг/мл против 4,4 (2,6; 4,9) пг/мл ( $p < 0,05$ ) и IL6 в 5 раз до 64,8 (44,6; 105,2) пг/мл против 12,3 (1,9; 13,1) пг/мл ( $p < 0,05$ ) в сравнении со значениями ГС (Рисунок 4.1.2).



*Примечание: \*- различия показателей пациентов с COVID-19 группы исследования 1 (ГИ1) от показателей группы сравнения (ГС) принятыми за 100%,  $p < 0,05$  (критерий Манна-Уитни)*

Рисунок 4.1.2 – Цитокиновый профиль пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19 в острый период заболевания

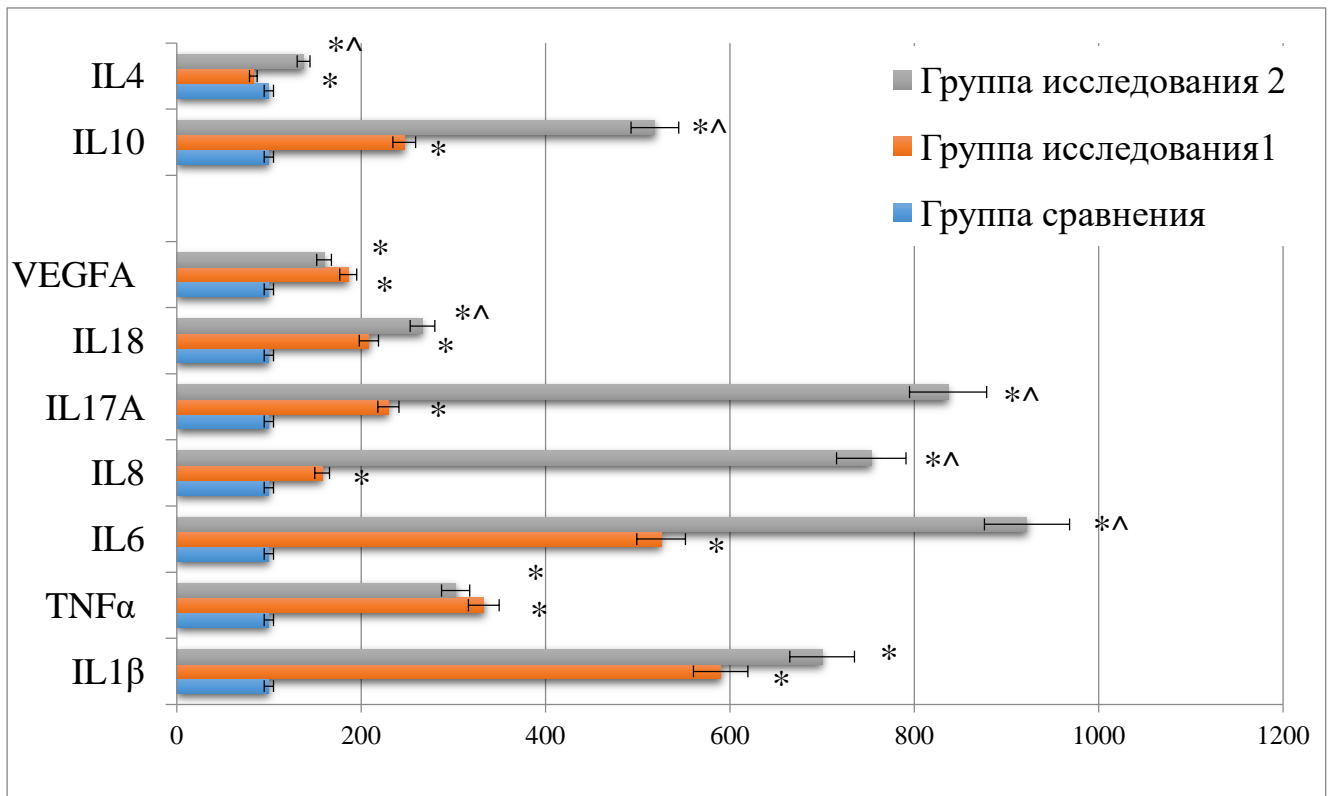
Также отмечено повышение уровней цитокинов, участвующих во включении в инфекционно-воспалительный процесс НГ: в 1,4 раза IL8 до 7,3 (6,9; 11,5) пг/мл против 5,3 (3,5; 5,7) пг/мл ( $p < 0,05$ ) и в 2 раза IL18 до 672,5 (451,7; 740,1) пг/мл против 322,5 (185,5; 388,) пг/мл ( $p < 0,05$ ), IL17A - 31,2 (16,7; 58,3) пг/мл против 13,6 (7,7; 21,8) пг/мл ( $p < 0,05$ ), VEGFA – 1365,0 (1222,3; 1575,3) пг/мл против 734,1 (700,0; 739,3) пг/мл ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 4.1.2).

Кроме того, в ГИ1 показано увеличение в 2,5 раза уровня противовоспалительного IL10 до 7,3 (3,3; 12,7) пг/мл против 3,0 (2,5; 3,3) пг/мл в



ГС ( $p < 0,05$ ), при этом, показатели IL4 не отличались от показателей ГС ( $p > 0,05$ ) (Рисунок 4.1.2, Таблица 4.1.1).

В ГИ2 тяжёлой формы COVID-19 выявлено повышение концентрации IL1 $\beta$  в 68 раз до 6,8 (4,1; 9,5) пг/мл ( $p < 0,05$ ) и TNF $\alpha$  в 3 раза до 13,4 (10,3; 20,1) пг/мл ( $p < 0,05$ ) относительно значений ГС. Определяемые показатели данных цитокинов не отличались от значений, регистрируемых в ГИ1 среднетяжёлой формы заболевания ( $p_{1,2} > 0,05$ ) (Таблица 4.1.1). При этом, установлено значимое увеличение в 40 раз уровня IL6 в ГИ2 по отношению к показателям ГС ( $p < 0,05$ ) и в 8 раз по отношению к значениям, определяемым в ГИ 1 ( $p < 0,05$ ) (Таблица 4.1.1, Рисунок 4.1.3).



Примечание: \* - различия показателей пациентов с COVID-19 группы исследования 1 (ГИ1) и группы исследования 2 (ГИ2) от показателей группы сравнения (ГС) принятыми за 100%,  $p < 0,05$  (критерий Манна-Уитни).

^ - различия показателей пациентов с COVID-19 группы исследования 1 (ГИ1) от значений группы исследования 2 (ГИ2),  $p < 0,05$  (критерий Манна-Уитни)

Рисунок 4.1.3 – Уровень цитокинов пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19 в острый период заболевания

Анализ показателей, характеризующих профилированные нейтрофил-ассоциированные цитокины, продемонстрировал повышение уровней хемокина IL8 в 7 раз в ГИ2 ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями ГС ( $p < 0,05$ ). При тяжёлой форме COVID-19 концентрация IL8 составила 39,7 (18,9; 59,0) пг/мл, что было в 4 раза выше, чем в ГИ1 ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 4.1.3).

В тоже время, в ГИ 2 отмечалось еще более значимое увеличение уровней IL18 - до 859,7 (788,9; 1059,0) пг/мл и IL17A до 113,8 (69,2; 239,2) пг/мл, т.е. в 3,6 раз по сравнению с показателями в ГИ1 ( $p_{1,2} < 0,05$ ) и, соответственно, в 2,7 раз и 8,3 раз, по сравнению ГС ( $p_{1,2} < 0,05$ ). Уровень VEGFA в ГИ2 был выше в 1,6 раз, чем в ГС и составил 1174,0 (1099,0; 1446,0) пг/мл ( $p < 0,05$ ), но при этом, значимо не отличался от значений в ГИ 1 ( $p > 0,05$ ) (Рисунок 4.1.3, Таблица 4.1.1).

Также в ГИ2 было установлено повышение уровня IL10 в 2 раза в сравнении с показателями ГИ1 ( $p < 0,05$ ) и в 5 раз - в сопоставлении с показателями ГС ( $p < 0,05$ ). При тяжёлой форме COVID-19 отмечается увеличение концентрации IL4 до 3,7 (3,1; 4,9) пг/мл против 2,7 (2,2; 2,9) пг/мл в ГС ( $p < 0,05$ ). Следует отметить, что несмотря на выявленное повышение противовоспалительных цитокинов IL4, IL10, уровень их недостаточен для компенсации и конкурирования со значительно повышенными концентрациями провоспалительных цитокинов (Рисунок 4.1.3, Таблица 4.1.1).

Таким образом, установлено, что при COVID-19 в исследуемых группах как при среднетяжёлой, так и тяжёлой формах течения заболевания, наблюдается выраженный дисбаланс в системе цитокинов.

С одной стороны, выявлена блокада ответа системы IFN, в первую очередь IFN I типа, на вирусную агрессию, уровень которых не менялся в зависимости от степени тяжести инфекционного заболевания, оставаясь на значениях, характерных для условно здоровых лиц. С другой стороны, имеет место «цитокиновый шторм», вызванный гиперпродукцией системных цитокинов IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6 и провоспалительных цитокинов IL8, IL17A, IL18, VEGFA,

участвующих в регуляции и активации эффекторных функций НГ, и недостаточный уровень продукции противовоспалительных IL10, IL4.

При этом, следует отметить, что при тяжёлой форме заболевания отмечается статистически значимое повышение концентраций четырех цитокинов - IL6, IL8, IL17A, IL18 в сравнении с показателями, определяемыми у пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19.

Известно, что IL17A, IL18, VEGFA усиливают агрегацию тромбоцитов, активацию эндотелиальных клеток, миграцию НГ и индуцируют образование NETs, что является причиной протромботического состояния, эндотелиита, тромбоза сосудов при COVID-19. Кроме того, известно, что IL6 и VEGFA, IL18 сопряжены с регуляцией нейроэндокринной системы, а их повышенная продукция коррелирует с когнитивными и эмоциональными нарушениями, депрессией.

Таким образом, полученные нами данные подтверждают тот факт, что SARS-CoV-2 нацелен на IFN I типа, вызывая блокаду их синтеза, нарушая их регуляторные свойства, и тем самым, препятствуя хорошо организованному взаимодействию между противовирусными и провоспалительными врожденными и адаптивными механизмами противоинфекционной защиты в иммунной системе.

Дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов и последующие нарушения регуляции между врожденным и адаптивным иммунным ответом напрямую связаны с неблагоприятным прогнозом течения COVID-19. Специфический иммунный профиль инфекции SARS-CoV-2 может привести к вторичным инфекциям и дисфункции различных органов.

Таким образом, у пациентов с инфекцией SARS-CoV-2 наблюдаются высокие уровни различных цитокинов, из которых IL6 и нейтрофил-ассоциированные цитокины IL8, IL17A, IL18, VEGFA можно идентифицировать как индикаторы прогрессирования заболевания.

Также показано, что для острого периода среднетяжёлой формы COVID-19, характерно возрастание уровня IL17A в 2,4 раза, IL18 в 2 раза, IL8 в 2 раза,

относительно показателей условно-здоровых лиц, что сопоставимо с тяжестью инфекционного процесса.

При тяжёлой форме COVID-19, в остром периоде, установлено значительное повышение IL18 в 3 раза, IL17A и IL8 в 8 раз в сравнении со значениями условно-здоровых лиц, что сопоставимо с тяжестью инфекционного процесса.

Сравнительный анализ уровня цитокинов продемонстрировал возможность дифференцирования степени тяжести COVID-19. Так установлено, что при тяжелой форме IL17A был выше в 4 раза, IL8 в 4 раза, IL8 в 1,5 раза, чем при среднетяжелой форме, что может быть использовано в качестве критериев тяжести инфекционного процесса вызванного вирусом SARS COV2.

#### **4.2 Дисфункции клеточного и гуморального иммунитета при среднетяжёлой и тяжёлой формах COVID-19, ассоциированные с блокадой системы интерферонов**

Для уточнения особенностей нарушения функционирования лимфоцитарного звена иммунитета на фоне дефицита интерферонов у пациентов со среднетяжёлой (ГИ1, n=45) и тяжёлой (ГИ2, n=41) формами COVID-19 проведено исследование содержания в ПК Т лимфоцитов ( $CD3^+CD19^-$ ), Т - хелперов ( $CD3^+CD4^+$ ), цитотоксических лимфоцитов  $T_{CTL}$  ( $CD3^+CD8^+$ ), естественных киллерных клеток (ЕКК) ( $CD3^-CD16^+CD56^+$ ), естественных киллерных Т- клеток (ЕКТ) ( $CD3^+CD16^+CD56^+$ ), В - лимфоцитов ( $CD3^-CD19^+$ ) - с учетом плотности экспрессии поверхностных маркерных рецепторов (MFI). Определение концентрации сывороточных иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG.

Анализ уровня лейкоцитов и морфологической картины крови у пациентов ГИ1 со среднетяжёлой формой течения COVID-19 выявил два варианта ответа на вторжение SARS-CoV-2 (Таблица 4.2.1).

Таблица 4.2.1 – Морфологические показатели крови пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19 (Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>))

Показатель	Группа исследования 1 среднетяжёлая форма ГИ 1, n=45		Группа исследования 2 тяжёлая форма ГИ 2, n=41			Группа сравнения - ГС, n=30
	ГИ 1а n=35	ГИ 1б n=10	ГИ 2а n=24	ГИ 2б n=15	ГИ 2в n=2	
L, 10 <sup>9</sup> /л	5,8 (4,6; 6,7)	14,8* <sup>^</sup> (10,6; 19,3)	11,0* (7,1; 16,1)	7,3 (5,8; 7,4)	21,9* <sup>◆◆</sup> (19,5; 24,3)	6,3 (4,3; 6,8)
ЛФ,%	20,5* (13,3; 29,8)	24,0* (16,0; 29,0)	9,0* (4,0; 12,0)	29,0* <sup>#</sup> (23,0; 43,0)	10,0* <sup>◆</sup> (9,0; 11,0)	35,5 (32,8; 36,9)
ЛФ, 10 <sup>9</sup> /л	1,1* (0,9; 1,8)	3,5 <sup>^</sup> (2,5; 3,7)	0,7* (0,6; 1,1)	1,8 <sup>#</sup> (1,5; 2,2)	2,1 <sup>●</sup> (2,0; 2,1)	2,4 (2,1; 2,7)
НГ,%	72,0* (62,0; 83,0)	70,0* (65,0; 79,0)	88,5* (82,5; 94,3)	57,0 <sup>#</sup> (52,5; 67,0)	86,5* <sup>◆</sup> (84,8; 88,3)	58,5 (55,8; 60,5)
НГ, 10 <sup>9</sup> /л	3,7 (3,0; 5,5)	11,4* <sup>^</sup> (6,9; 15,7)	10,3* (5,2; 14,4)	4,1 <sup>#</sup> (3,1; 4,9)	19,1* <sup>◆◆●</sup> (16,7; 21,6)	3,7 (2,9; 3,8)
СЯЛ,%	67,0 (50,8; 75,0)	64,0 (55,5; 66,0)	74,0* (66,5; 82,5)	50,0 <sup>#</sup> (37,5; 52,5)	57,0 <sup>●</sup> (49,0; 65,0)	55,5 (54,3; 59,8)
ПЯЛ,%	7,0 (4,0; 11,8)	7,0* (5,0; 13,0)	12,0* (11,0; 16,3)	10,0* (6,0; 17,0)	24,5* <sup>◆</sup> (23,3; 25,8)	3,0 (1,0; 4,5)
МОН,%	7,0 (2,0; 8,8)	6,0 (5,0; 7,0)	3,0 (1,0; 4,3)	9,0* <sup>#</sup> (8,0; 11,5)	3,0 <sup>◆</sup> (2,0; 4,0)	5,0 (3,3; 6,8)
МОН, 10 <sup>9</sup> /л	0,3 (0,1; 0,5)	0,9* <sup>^</sup> (0,7; 1,2)	0,2 (0,2; 0,4)	0,6 <sup>#</sup> (0,4; 0,9)	0,6 <sup>●</sup> (0,4; 0,7)	0,3 (0,2; 0,5)
ЭОЗ,%	0	0	0	0	0	3,5 (3,0; 4,0)

*Примечание: \* - различия показателей при среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19 от показателей группы сравнения, p<0,05; ^ - различия между показателями ГИ1а и ГИ1б пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19, p<0,05; # - различия между показателями ГИ2а и ГИ2б пациентов с тяжёлой формой COVID-19, p<0,05; ◆ - различия между показателями ГИ2б и ГИ2в пациентов с тяжёлой формой COVID-19, p<0,05; ● - различия между показателями ГИ2а и ГИ2в пациентов с тяжёлой формой COVID-19, p<0,05, критерий Манна–Уитни*

Так, у 77,7% пациентов (ГИ1а, n=35) выявлена тенденция снижения общего количества лейкоцитов до 5,8 (4,6; 6,7)х10<sup>9</sup>/л против 6,3 (4,3; 6,8) х10<sup>9</sup>/л в ГС (p>0,05) на фоне значимого снижения относительного (20,5 (13,3; 29,8)% против 35,5 (32,8; 36,9)% в ГС (p<0,05)) и абсолютного (1,1 (0,9; 1,8)х10<sup>9</sup>/л против 2,4

(2,0; 2,7) $\times 10^9$ /л в ГС ( $p < 0,05$ )) количества лимфоцитов (ЛФ) и повышения процентного (72,0 (62,0; 83,0)% против 58,5 (55,8; 60,5)% ( $p < 0,05$ ) в ГС) и неменяющегося абсолютного ( $p > 0,05$ ) содержания НГ с увеличением доли палочкоядерных форм (ПЯЛ) (Таблица 4.2.1).

У 22,6% пациентов (ГИ16,  $n=10$ ) отмечался лейкоцитоз - 14,8 (10,6; 19,3) $\times 10^9$ /л ( $p < 0,05$ ), нейтрофилез - 11,4 (6,9; 15,7) $\times 10^9$ /л ( $p < 0,05$ ). Было выявлено значительное снижение процентного содержания ЛФ ( $p < 0,05$ ), но, при этом, за счет лейкоцитоза абсолютное содержание ЛФ сохранялось в пределах значений ГС ( $p > 0,05$ ) (Таблица 4.2.1).

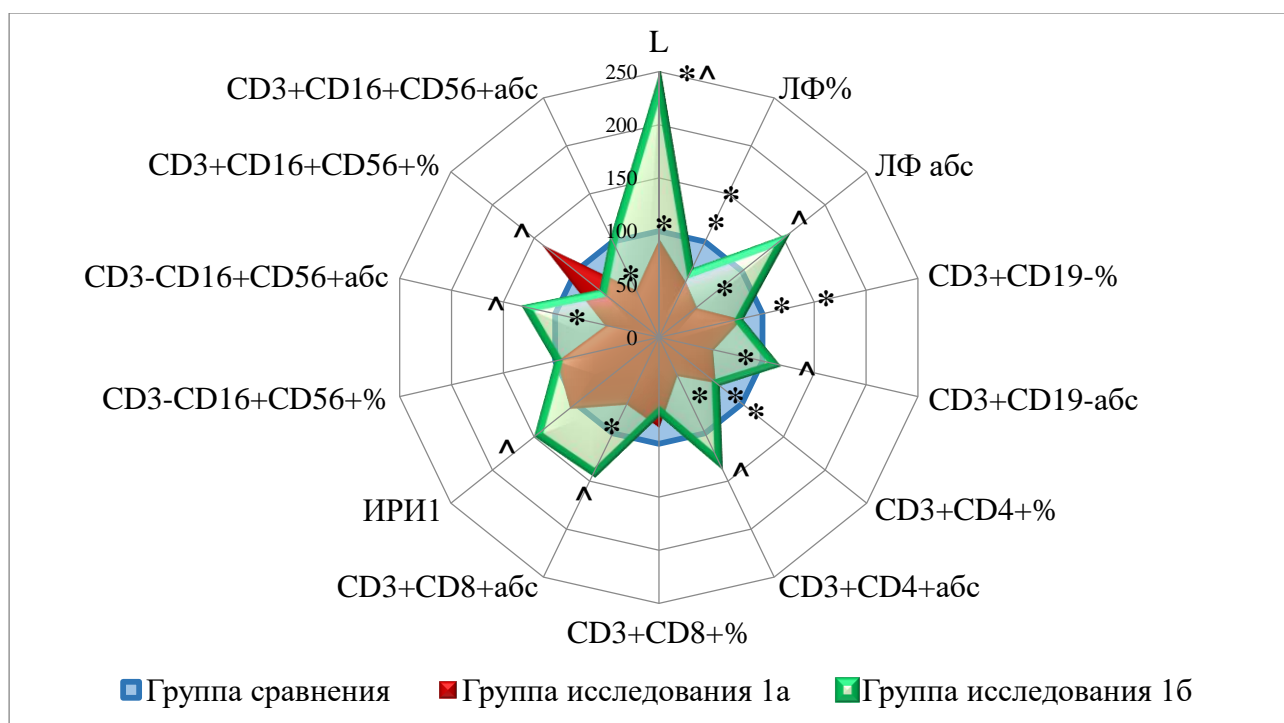
В ГИ 2 с тяжёлой формой инфекционного процесса выявлены три варианта изменения показателей лейкоцитов. Так, у 58,5% пациентов (ГИ 2а,  $n=24$ ) отмечался умеренный лейкоцитоз – 11,0 (7,1; 16,1)  $\times 10^9$ /л, нейтрофилёз - 10,3 (5,2; 14,4) $\times 10^9$ /л со сдвигом влево - ПЯЛ-12,0 (11,0; 16,3) %, лимфопения 0,7 (0,6; 1,1) $\times 10^9$ /л, анэозинофилия и снижение количества моноцитов (Таблица 4.2.1).

В 36,6% случаев (ГИ 2б,  $n=15$ ) отмечалась тенденция повышения общего количества лейкоцитов ( $p > 0,05$ ) на фоне снижения относительного и абсолютного содержания ЛФ ( $p_{1,2} < 0,05$ ). Общий уровень содержания НГ не отличался от значений ГС ( $p > 0,05$ ), но при этом, увеличивалась доля ПЯЛ. Для этой группы было характерно увеличение количества моноцитов, и также регистрировалась анэозинофилия (Таблица 4.2.1).

У 4,9% пациентов (группа 2в,  $n=2$ ) на момент поступления отмечался гиперлейкоцитоз - 21,9 (19,5; 24,3) $\times 10^9$ /л, нейтрофилёз -19,1 (16,7; 21,6)  $\times 10^9$ /л с резким сдвигом влево до ПЯЛ-24,5 (23,3; 25,8)% на фоне низкого процентного, но не отличающегося от показателей ГС абсолютного количества лимфоцитов. Кроме того, выявлялась анэозинофилия и снижение количества моноцитов (Таблица 4.2.1).

Следует подчеркнуть, что у пациентов этой группы было отмечено быстрое негативное прогрессирование болезни, приведшее к летальному исходу на 4 и 5 сутки пребывания в стационаре.

Анализ количественных показателей, характеризующих Т-клеточное звено в ГИ 1а среднетяжёлой формы течения, выявил снижение в 1,6 раз ( $p < 0,05$ ) содержания  $CD3^+CD19^-$  Т лимфоцитов -  $0,7 (0,4; 0,8) \times 10^9/\text{л}$  против  $1,3 (1,1; 1,6) \times 10^9/\text{л}$  в ГС, количества  $CD3^+CD4^+$  -Т хелперов до  $0,4 (0,2; 0,5) \times 10^9/\text{л}$  против  $0,9 (0,6; 1,0) \times 10^9/\text{л}$  в ГС ( $p_{1,2} < 0,05$ ). Одновременно имело место параллельное уменьшение количества цитотоксических  $CD3^+CD8^+$  Т<sub>CTL</sub>-лимфоцитов до  $0,3 (0,2; 0,4) \times 10^9/\text{л}$  против  $0,5 (0,4; 0,7) \times 10^9/\text{л}$ , о чем свидетельствовал иммунорегуляторный индекс ( $CD4/CD8$  -ИРИ1) -1,4 (0,9; 1,2), значение которого отмечалось на уровне параметров ГС - 1,3 (1,2; 2,0) (Рисунок 4.2.1).



Примечание: \* - различия показателей пациентов с COVID-19 от показателей группы сравнения, ^ - различия показателей пациентов ГИ 1а и ГИ 1б,  $p < 0,05$  (критерий Манна-Уитни)

Рисунок 4.2.1 – Изменения показателей субпопуляций лимфоцитов пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19

В исследуемой ГИ 1б на фоне лейкоцитоза абсолютное содержание Т-клеточных субпопуляций  $CD3^+CD19^-$ ,  $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$  сохраняется на уровне показателей ГС ( $p_{1-3} > 0,05$ ) (Таблица 4.2.2, Рисунок 4.2.1).

Таблица 4.2.2 – Показатели лимфоцитарного звена иммунитета пациентов среднетяжелой и тяжелой форм COVID-19 в острый период при поступлении в стационар (Me(Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>))

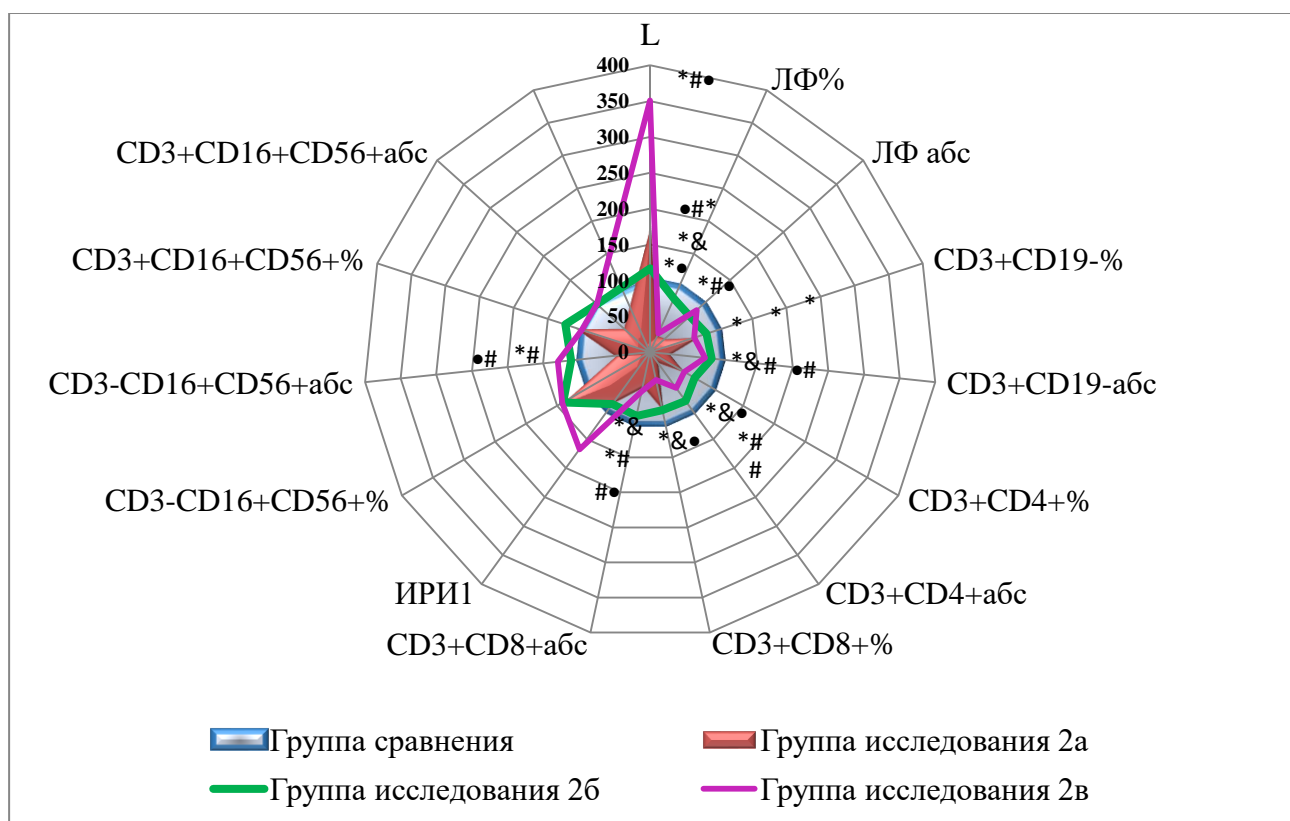
Показатель	Группа исследования со среднетяжелой формой заболевания ГИ1, n=45		Группа исследования с тяжелой формой заболевания ГИ2, n=41			Группа сравнения ГС, n=30
	ГИ1а n=35	ГИ1б n=10	ГИ2а n=24	ГИ2б n=15	ГИ2в n=2	
Т- лимфоциты CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> , %	58,1* (50,1; 65,2)	56,2* (48,6;63,3)	51,1* (46,7; 57,1)	60,9* (56,3;67,6)	47,53*♦ (44,2; 50,9)	73,7 (66,3; 77,4)
Т- лимфоциты CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> ,10 <sup>9</sup> /л	0,7* (0,4; 0,8)	1,4^ (1,3; 2,3)	0,4* (0,3; 0,6)	1,1# (0,9; 1,3)	1,0*● (0,9; 1,1)	1,3 (1,2; 1,6)
Т-хелперы CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ,%	32,2 (25,7; 40,5)	32,5 (30,5; 37,0)	25,7* (20,0; 36,1)	34,5 (33,3; 39,2)	26,5*♦ (21,7; 31,2)	48,1 (36,3;49,6)
Т-хелперы CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ,10 <sup>9</sup> /л	0,4* (0,2; 0,5)	1,1^ (0,9;1,4)	0,2* (0,1; 0,4)	0,8# (0,6; 0,8)	0,6*● (0,46;0,62)	0,89 (0,63;0,93)
ЦТЛ CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ,%	25,3 (20,0; 33,3)	20,6 (16,0; 25,3)	24,6 (13,8; 35,4)	24,9 (19,6; 31,8)	12,0*♦● (11,9; 12,2)	30,1 (26,0; 34,3)
ЦТЛ CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ,10 <sup>9</sup> /л	0,3* (0,2; 0,5)	0,6^ (0,5; 0,8)	0,2* (0,1; 0,3)	0,4# (0,3; 0,6)	0,3*♦ (0,2; 0,3)	0,5 (0,4; 0,7)
ИРИ1 CD4/CD8.	1,4 (0,9; 2,1)	1,9 (1,3; 2,2)	1,1 (0,6; 3,2)	1,2 (1,1; 2,1)	2,2 (1,8; 2,7)	1,3 (1,2; 2,0)
ЕКК,% CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	15,8 (11,7; 25,5)	15,8 (10,7; 23,0)	23,0 (15,7; 31,6)	22,8 (16,1; 24,9)	23,0 (18,4; 27,7)	16,3 (13,1; 20,2)
ЕКК, 10 <sup>9</sup> /л CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,18* (0,1; 0,2)	0,5^ (0,4; 0,7)	0,15* (0,1; 0,2)	0,4# (0,3; 0,6)	0,5● (0,4; 0,6)	0,4 (0,3; 0,5)
ЕКТ,% CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	3,7 (1,3; 7,9)	1,8 (1,4; 6,1)	2,9 (2,4; 4,3)	3,3 (1,5; 4,1)	2,7 (2,6; 2,7)	2,7 (1,3; 4,0)
ЕКТ, 10 <sup>9</sup> /л CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,03 (0,01;0,08)	0,06 (0,03; 0,16)	0,03 (0,02;0,05)	0,06 (0,03;0,07)	0,06 (0,05;0,06)	0,06 (0,03; 0,10)
В- лимфоциты CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> , %	14,1 (9,8; 17,8)	18,6* (13,3; 28,4)	10,7 (9,9; 16,1)	6,7* (5,0; 8,2)	17,1*♦ (13,6; 20,7)	10,6 (8,5; 12,5)
В- лимфоциты CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> х10 <sup>9</sup> /л	0,14 (0,09;0,19)	0,84*^ (0,57;1,00)	0,09 (0,04;0,18)	0,12* (0,12;0,15)	0,36*♦● (0,28;0,43)	0,18 (0,15;0,24)

*Примечание: \* - различия показателей пациентов со среднетяжёлой и тяжелой формами COVID-19 от показателей группы сравнения, p<0,05; ^ - различия между показателями ГИ1а и ГИ1б, p<0,05; # - различия между показателями ГИ2а и ГИ2б, p<0,05; ♦ - различия между показателями ГИ2б и ГИ2в с тяжелой формой, p<0,05; ● - различия между показателями ГИ2а и ГИ2в с тяжелой формой COVID-19, p<0,05, критерий Манна -Уитни*



У пациентов с тяжелым течением заболевания ГИ 2а было статистически значимо снижено в 3,7 раза абсолютное содержание количества  $CD3^+CD19^-$  лимфоцитов ( $p < 0,05$ ) за счет снижения в 5,9 раз уровня  $CD3^+CD4^+$  ( $p < 0,05$ ) и в 2 раза количества  $CD3^+CD8^+$ - клеток по сравнению с показателями ГС ( $p < 0,05$ ). ИРИ  $CD4/CD8$ , при этом, составил 1,13 (0,61; 3,16) и не отличался от параметров ГС (Таблица 4.2.2).

У пациентов ГИ 2б исследуемые количественные показатели Т - клеточных субпопуляций имели лишь тенденции к снижению и значимо не отличались от показателей ГС (Таблица 4.2.2, Рисунок 4.2.2).



Примечание: \* - различия показателей пациентов с COVID-19 от показателей группы сравнения,  $p < 0,05$ ; # - различия показателей пациентов группы исследования 2а и группы исследования 2б,  $p < 0,05$ ; & - различия показателей пациентов группы исследования 2а и группы исследования 2в,  $p < 0,05$ ; • - различия показателей пациентов группы исследования 2б и группы исследования 2в,  $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни

Рисунок 4.2.2 – Изменения показателей субпопуляций лимфоцитов у пациентов с тяжёлой формы COVID-19

Наиболее сильные негативные изменения Т-клеточного звена иммунитета выявлены у пациентов ГИ 2в. Так, несмотря на гиперлейкоцитоз, в этой группе зарегистрировано низкое содержание  $CD3^+CD19^-$  лимфоцитов до  $1,0 (0,9; 1,1) \times 10^9/\text{л}$  ( $p < 0,05$ ) за счет резкого уменьшения цитотоксических  $CD3^+CD8^+$  лимфоцитов до  $0,3 (0,2; 0,3) \times 10^9/\text{л}$  и  $CD3^+CD4^+$  лимфоцитов до  $0,6 (0,5; 0,6) \times 10^9/\text{л}$  ( $p_{1,2} < 0,05$ ) (Рисунок 4.2.2, Таблица 4.2.2). Очевидное снижение Т-лимфоцитов ПК может быть связано с прямым повреждением Т-лимфоцитов, вызванным SARS-CoV-2, усилением хемотаксиса иммунных клеток к месту воспаления под влиянием цитокинов.

Помимо количественного определения содержания субпопуляций лимфоцитов нами была оценена плотность экспрессии их поверхностных маркерных рецепторов по показателю MFI.

Анализ полученных результатов показал значительное снижение плотности экспрессируемых маркерных молекул у пациентов с COVID-19, особенно выраженное в группах с тяжелой формой заболевания (Таблица 4.2.3).

Так показано, что субпопуляция  $CD3^+CD19^-$  Т-лимфоцитов у пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами заболевания в 2 и более раз ниже оснащена CD3 молекулой, входящей в состав антиген распознающего рецептора TCR, в сравнении с показателями ГС ( $p < 0,05$ ). Т-хелперы  $CD3^+CD4^+$  также имеют низкий (в 2-3 раза) MFI CD4 рецептора ( $p < 0,05$ ) во всех изучаемых группах с COVID-19 (Таблица 4.2.3).

Аналогичные, еще более выраженные изменения плотности экспрессии выявлены в отношении CD8 молекул на цитотоксических Т лимфоцитах: выявлено снижение MFI CD8 в группе ГИ 1а - в 2,3 раза ( $p < 0,05$ ), в ГИ 1б - в 2,8 раза ( $p < 0,05$ ), в ГИ 2а - в 2,5 раз ( $p < 0,05$ ), в ГИ 2б и ГИ 2в - в 3 раза ( $p_{1,2} < 0,05$ ) по отношению к показателям ГС (Таблица 4.2.3).

Таблица 4.2.3 – Плотность экспрессии поверхностных маркерных рецепторов лимфоцитов (Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>))

Показатель	Группа исследования среднетяжёлая форма ГИ1, n=45		Группа исследования тяжёлая форма ГИ2, n=41			Группа сравнения ГС, n=30
	ГИ1а n=35	ГИ1б n=10	ГИ2а n=24	ГИ2б n=15	ГИ2в n=2	
CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> MFI CD3	6,4* (5,6; 7,9)	6,4* (5,0; 7,7)	6,2* (4,9; 7,1)	5,5* (5,2; 7,4)	4,0* (3,9; 4,2)	13,0 (8,7; 14,5)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> MFI CD4 <sup>+</sup>	2,5* (1,8; 2,8)	1,6* (1,5; 2,3)	2,1* (2,0; 2,9)	2,2* (2,1; 2,4)	2,0* (1,9; 2,0)	6,4 (3,7; 7,0)
MFI CD8	15,2* (10,6; 17,1)	12,6* (11,3; 19,4)	14,2* (11,0; 18,8)	11,1* (10,5; 15,8)	10,6* (10,2; 11,0)	34,9 (26,1; 40,0)
CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> MFI CD16/CD56	6,0* (4,8; 6,8)	4,8* (4,0; 5,5)	6,2 (4,5; 8,0)	4,1* (2,8; 6,2)	3,8* (3,5; 4,0)	8,3 (6,8; 9,8)
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> MFI CD3	6,2 (4,9; 8,0)	4,5 (3,9; 6,0)	6,5 (5,6; 7,1)	6,3 (5,3; 7,7)	4,9 (4,0; 5,8)	5,8 (5,2; 7,3)
MFI CD16/CD56	3,1 (2,5; 3,4)	2,9 (2,6; 3,6)	2,6 (1,9; 3,7)	2,1* (1,5; 2,7)	1,6* (1,6; 1,7)	3,3 (3,1; 4,1)
CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> MFI CD19	8,6* (3,6; 12,9)	12,3 (11,7; 15,2)	2,1* (1,8; 2,5)	2,4* (2,1; 6,9)	2,1* (2,1; 2,2)	20,1 (14,1; 18,2)

*Примечание: \* - различия показателей пациентов с COVID-19 от показателей группы сравнения, статистически обоснованы с ошибкой 1 рода  $p < 0,05$  (критерий Манна-Уитни)*

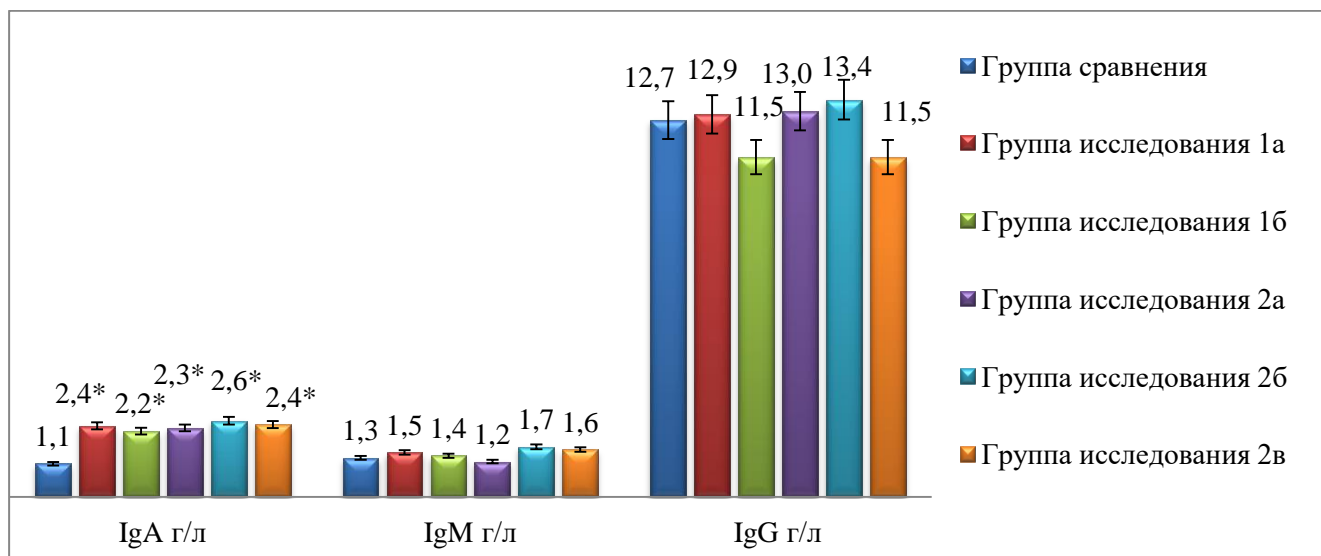
Уровень CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> - ЕКК клеток в ГИ 1а и ГИ 2а был снижен ( $p_{1,2} < 0,05$ ), а в группах ГИ 1б среднетяжёлой формы заболевания и ГИ 2б и ГИ 2в с тяжёлой формой течения определялся в пределах значений ГС ( $p_{1-3} > 0,05$ ), что можно расценить, как неадекватный ответ на вирусную инфекцию (Таблица 4.2.2). При этом, выявлено снижение MFI CD16/CD56 молекул на ЕКК клетках ( $p < 0,05$ ) во всех исследованных группах пациентов с COVID-19 с более низкими значениями в ГИ 2б и ГИ 2в, что отражает функциональные дефекты, снижение их цитотоксического потенциала (Таблица 4.2.3).

Абсолютное содержание ЕКТ -  $CD3^+CD16^+CD56^+$  не имело значимых различий от показателей ГС во всех исследуемых группах (Таблица 4.2.3). При этом, изменялось оснащение ЕКТ - клеток: отмечалась тенденция ( $p>0,05$ ) к усилению MFI CD3 в ГИ 1а, ГИ 2а, ГИ 2б и снижению в ГИ 1б и ГИ 2в ( $p_1>0,05$ ,  $p_2>0,05$ ), MFI CD16/CD56 молекул имела более низкие значения в группах с тяжёлой формой заболевания (Таблица 4.2.3).

При тестировании В - лимфоцитов выявлено повышение относительного (до 18,6 (13,3; 28,4)% против 10,6 (8,5; 12,5)% в ГС ( $p<0,05$ )) и абсолютного ( $0,84$  ( $0,57$ ;  $1,00$ ) $\times 10^9$ /л против  $0,18$  ( $0,15$ ;  $0,24$ ) $\times 10^9$ /л в ГС ( $p<0,05$ )) количества  $CD3^+CD19^+$  в ГИ1б пациентов со среднетяжёлой формой и в ГИ 2в тяжёлого течения до  $17,1$  ( $13,6$ ;  $20,7$ )%;  $0,36$  ( $0,28$ ;  $0,43$ ) $\times 10^9$ /л ( $p_{1,2}<0,05$ ).

У ГИ 2б с тяжёлой формой инфекционного процесса, напротив, наблюдалось снижение относительного и абсолютного количества  $CD3^+CD19^+$  лимфоцитов до  $6,7$  ( $5,0$ ;  $8,2$ )%,  $0,12$  ( $0,12$ ;  $0,15$ ) $\times 10^9$ /л против  $10,6$  ( $8,5$ ;  $12,5$ )%,  $0,36$  ( $0,28$ ;  $0,43$ ) $\times 10^9$ /л в ГС ( $p_{1,2}<0,05$ ). В исследуемых группах (ГИ1а, ГИ 2а) показатели статистически значимо не отличались от значений ГС. При этом, было зарегистрировано значительное снижение плотности экспрессии CD19 рецептора на В-лимфоцитах: в 9,4 раза в группах ГИ 2а и ГИ 2в ( $p_{1,2}<0,05$ ) и 8,3 раза в ГИ 2б ( $p<0,05$ ) с тяжёлой формой заболевания. При среднетяжёлой форме COVID-19 в ГИ 1а было выявлено снижение MFI CD19 в 2,3 раза ( $p<0,05$ ), в 1,6 раз в ГИ 1б относительно значений ГС ( $p_{1,2}>0,05$ ) (Таблица.4.2.3).

Основной функцией В - лимфоцитов является синтез антител для нейтрализации вирусов. Исследование концентрации сывороточных иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG позволило выявить значимое повышение концентрации IgA более, чем в 2 раза, во всех исследуемых группах ( $p<0,05$ ) (Рисунок 4.2.3).



Примечание: \*- различия показателей пациентов с COVID-19 от показателей группы сравнения,  $p < 0,05$  (критерий Манна-Уитни)

Рисунок 4.2.3 – Концентрация иммуноглобулинов у пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19

При этом, уровни IgM, IgG в группах исследования пациентов с COVID-19 как среднетяжёлой, так и тяжелой формах заболевания, не отличались от показателей ГС, что свидетельствует о недостаточном гуморальном ответе на SARS-CoV-2 в острый период заболевания (Рисунок 4.2.3).

Показано, что иммунный ответ пациентов как со среднетяжёлой, так и с тяжёлой формой течения COVID-19, отличается преимущественно супрессированной направленностью и низкой функциональной активностью механизмов противовирусной иммунной защиты, что не обеспечивает полноценную элиминацию вируса SARS-CoV-2, а, следовательно, адекватный ответ иммунной системы на инфекционно - воспалительный процесс.

Обобщая полученные данные, можно заключить, что при различных вариантах течения среднетяжёлой и тяжёлой форм COVID-19 отмечаются однонаправленные, но разной степени выраженности дефекты противовирусной иммунной защиты: уменьшение количества ЕКК-клеток и субпопуляций лимфоцитов  $CD3^+CD4^+$ Т-клеток,  $CD3^+CD8^+$ Т-клеток, недостаточный гуморальный ответ на фоне незначительного повышения В - лимфоцитов.

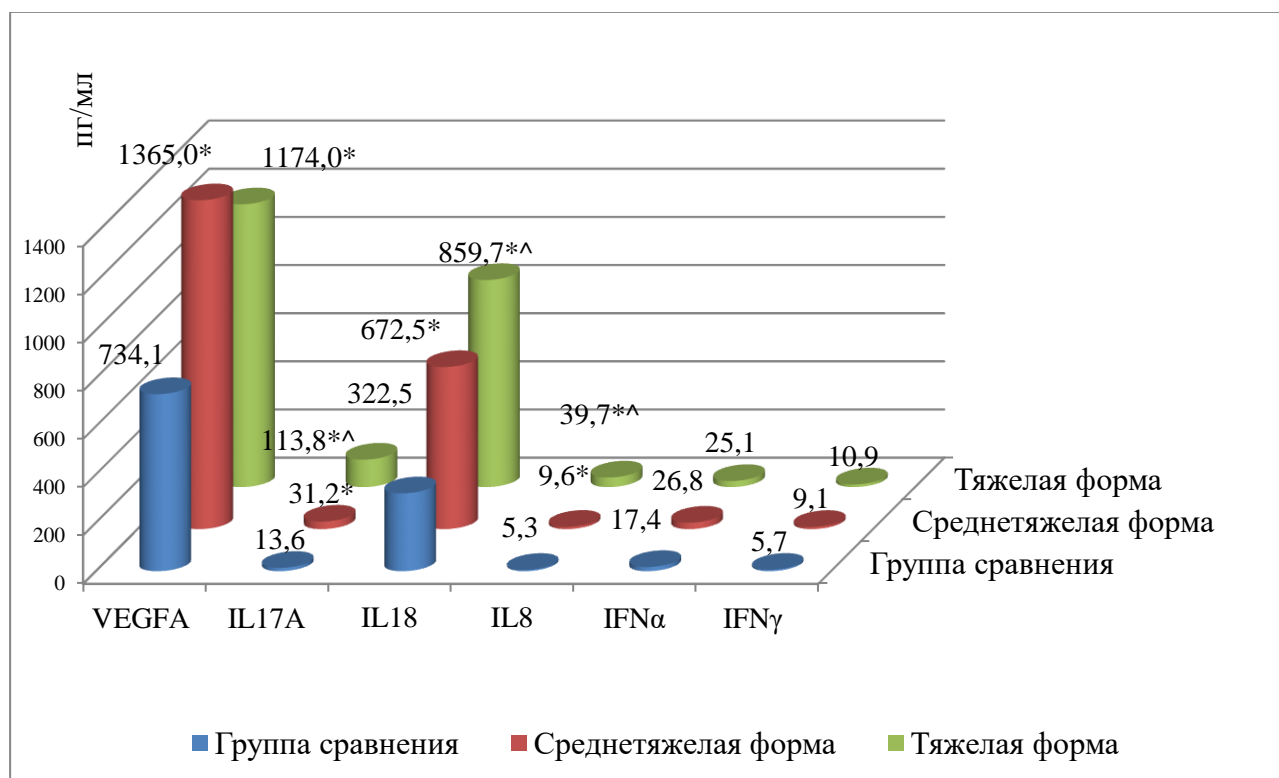
Таким образом, показано, что при среднетяжёлой и тяжёлой формах COVID-19 на фоне блокады продукции  $IFN\alpha$ , запускающего противовирусный иммунитет и регулирующего каскад клеточных и гуморальных ответов, наблюдается комбинированный иммунодефицит, сопряженный с количественными (уменьшение содержания) и функциональными (снижение уровня экспрессии функционально-значимых рецепторов) дефектами естественных киллерных клеток, Т лимфоцитов и их субпопуляций: регуляторных  $CD3^+CD4^+$ Т хелперов и цитотоксических лимфоцитов  $CD3^+CD8^+$ . Также подтверждено, что значительные нарушения базисных механизмов противовирусной защиты приводят к нарушению элиминации вируса, способствуют прогрессированию болезни и усугублению клинических проявлений COVID-19.

#### **4.3 Дисфункции системы нейтрофильных гранулоцитов при среднетяжёлой и тяжёлой формах COVID-19, индуцированные дисбалансом провоспалительных нейтрофил-ассоциированных цитокинов и дефицитом интерферона альфа**

В настоящее время известны гетерогенные субпопуляции НГ: воспалительные, противовоспалительные и супрессирующие, функциональный потенциал которых напрямую зависит от многих стимулов - хемоаттрактантов, медиаторов воспаления и, прежде всего, цитокинового фона [19, 23]. Цитокины представляют собой группу сигнальных молекул, ответственных за регулирование большого количества биологических процессов через рецепторы клеточной поверхности [91]. Цитокиновые сигналы, могут существенно и быстро изменять фенотип НГ и влиять на их функции [149].

Выявлено (глава 3.2), что среднетяжёлая и тяжёлая формы COVID-19 сопровождаются агрессивным воспалительным ответом, вызванным как гиперпродукцией ключевых провоспалительных цитокинов  $IL1\beta$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IL6$

( $p_{1-3} < 0,05$ ), так и нейтрофил-ассоциированных цитокинов (IL8, IL18, IL17A, VEGFA) ( $p_{1-4} < 0,05$ ), влияющих, с одной стороны, на включение НГ в воспалительный процесс и эффекторную активность НГ, с другой стороны – цитокины секретируются самими НГ под влиянием SARS-CoV-2 на фоне блокады системы IFN (Рисунок 4.3.1).



*Примечание: \*- различия между показателями ГИ 1 (среднетяжелая форма COVID-19), ГИ 2 (тяжелая форма COVID-19) и показателями ГС (условно-здоровые лица); ^- различия между показателями ГИ1 и ГИ2,  $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни.*

Рисунок 4.3.1 – Интерфероны и нейтрофил-ассоциированные цитокины при среднетяжелой и тяжелой формах COVID-19

Установлено, что повышенные уровни нейтрофил-ассоциированных цитокинов сопряжены с тяжестью течения инфекционного процесса.

В тоже время, субпопуляции НГ, их характеристики при COVID-19 практически не изучены.

Для уточнения роли НГ в иммунопатогенезе COVID-19 проведено исследование НГ ПК пациентов ГИ 1 ( $n = 45$ ) со среднетяжелой формой COVID-19

и ГИ 2 (n=41) с тяжелой формой заболевания. ГС составили 30 добровольцев, 58 (57; 70) лет.

Оценивалось содержание и фенотипические характеристики 5 функционально значимых субпопуляций  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+НГ$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-НГ$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+НГ$ ,  $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^-$  и  $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^+$ , а также особенности эффекторных функций (фагоцитарной функции, NADPH-оксидазной активности, способности формировать NETs) на фоне изменённого профиля сывороточных нейтрофил-ассоциированных провоспалительных цитокинов IL8, IL18, IL17A, VEGFA и дефицита  $IFN\alpha$ ,  $IFN\gamma$ .

#### **4.3.1 Содержание и фенотип субпопуляции $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ , $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ , $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$ нейтрофильных гранулоцитов при среднетяжёлой и тяжёлой формах COVID-19**

Поверхностные рецепторы к IFN I и II типа  $IFN-\alpha/\beta$  ( $IFNAR1$ ) и CD 119 ( $IFN-\gamma$  -  $IFNGR$ ) представлены на поверхности большинства клеток человека, регулируют врожденные противовирусные ответы, включая и систему НГ [180].

Установлено, что у взрослых лиц ГС в ПК циркулируют 3 субпопуляции НГ, экспрессирующие рецепторы к интерферонам I и II типов и CD16:  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+НГ$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-НГ$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+НГ$ .

Показано, что 93,7 (89,8; 96,5)% НГ представлены субпопуляцией  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+НГ$  с плотностью экспрессии молекул по MFI CD16 - 39,8 (20,4; 51,3) и MFI  $CD119^+(IFN\gamma)$  - 2,8 (2,5; 3,1) (Таблица 4.3.1.1).

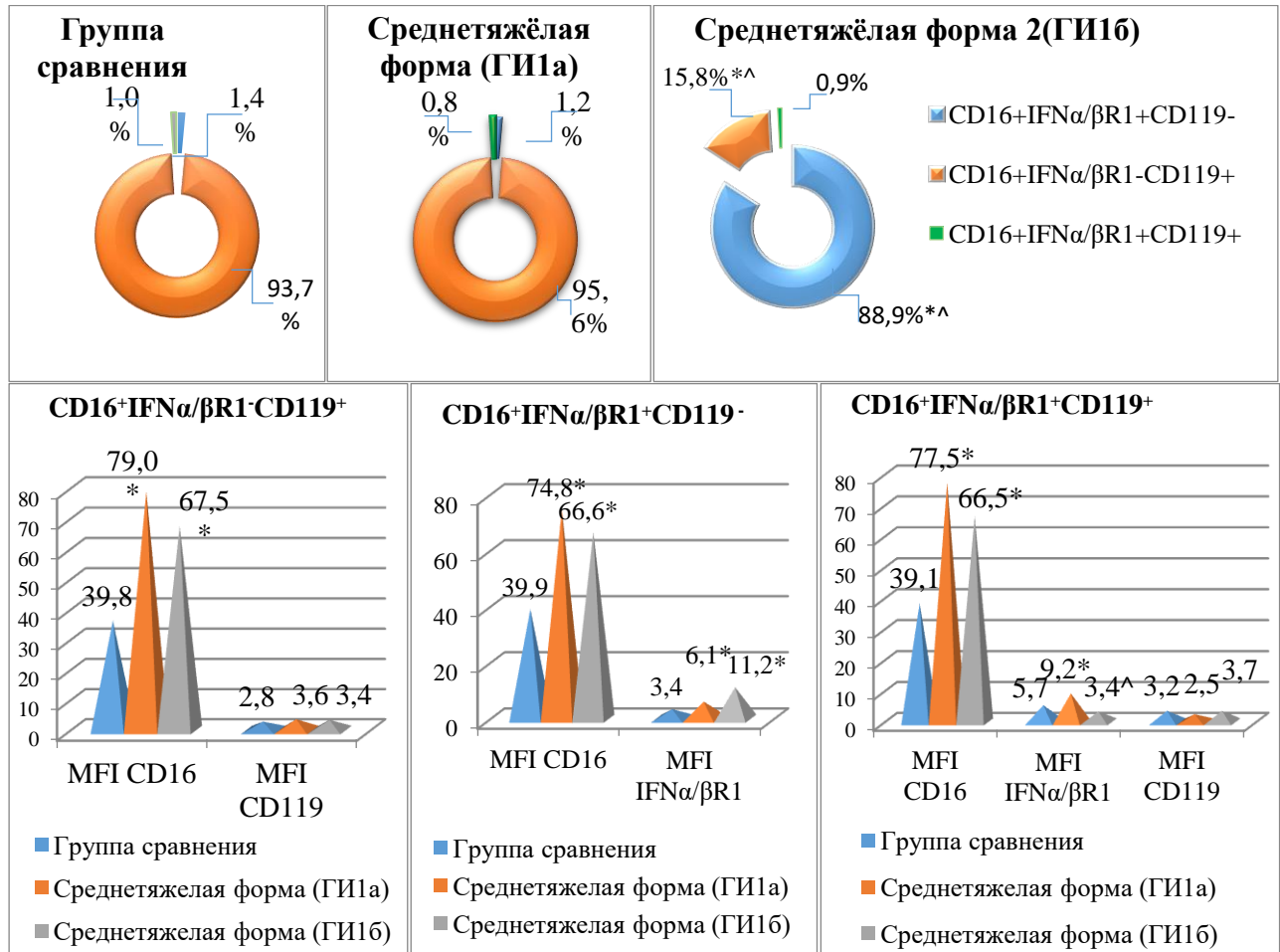
Субпопуляция НГ, не экспрессирующая рецептор к  $IFN\gamma$  –  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ , составляет всего 1,4 (0,5; 2,4)% НГ, не отличается по плотности экспрессии CD16 ( $p>0,05$ ), экспрессирует молекулу  $IFN\alpha/\beta R1$  с MFI - 3,4 (2,6; 5,7).



Таблица 4.3.1.1 – Содержание и фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов, экспрессирующих рецепторы к интерферонам I и II типов и активационный маркерный рецептор CD16 у пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19 (Me(Q<sub>1</sub>; Q<sub>2</sub>))

Показатели	Группа сравнения	Среднетяжёлая форма Группа исследования 1		Тяжёлая форма Группа исследования 2
		ГИ 1a n=34	ГИ 1б n=11	ГИ 2 n=41
<b>CD16<sup>+</sup>IFNα/βR1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>НГ</b>				
НГ, %	93,7 (89,8; 96,5)	95,6 (92,0; 98,2)	15,8* <sup>Λ</sup> (14,8; 16,5)	93,9 (92,2; 97,9)
MFI CD16	39,8 (20,4; 51,3)	79,0* (59,2; 91,4)	67,5* (53,2; 79,7)	69,8* (52,0; 91,7)
MFI 119	2,8 (2,5; 3,1)	3,6* (3,3; 4,3)	3,4* (3,2; 3,6)	3,3 (2,7; 3,7)
<b>CD16<sup>+</sup>IFNα/βR1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>НГ</b>				
НГ, %	1,4 (0,5; 2,4)	1,2 (0,6; 1,9)	88,9* <sup>Λ</sup> (81,7; 92,7)	2,2 (0,6; 3,1)
MFI CD16	39,9 (22,9; 54,5)	74,8* (59,6; 109,0)	66,5* (55,9; 79,6)	67,5* (58,2; 89,3)
MFI IFNα/β	3,4 (2,6; 5,7)	6,1* (5,9; 18,1)	11,2* <sup>Λ</sup> (7,7; 16,1)	4,3 (2,3; 7,5)
<b>CD16<sup>+</sup>IFNα/βR1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>НГ</b>				
НГ, %	1,0 (0,4; 1,8)	0,8 (0,5; 1,3)	0,9 (0,8; 2,3)	2,0 (0,4; 2,9)
MFI CD16	39,1 (26,6; 50,33)	77,5* (59,1; 109,0)	66,5* (51,9; 79,6)	72,0* (53,9; 89,0)
MFI IFNα/β	5,7 (4,1; 6,5)	9,2* (6,8; 12,0)	3,4* <sup>Λ</sup> (3,1; 3,6)	5,4# (4,5; 7,1)
MFI119	3,2 (1,9; 8,8)	2,5 (1,9; 9,0)	3,6 (2,5; 5,0)	2,3 (1,7; 3,3)
<p><i>Примечание:</i>  * - значимость отличий показателей от значений группы сравнения; p&lt;0,05;  Λ - значимость отличий показателей ГИ 1а от ГИ 1б; p&lt;0,05;  # - значимость отличий показателей ГИ 1 от ГИ 2; p&lt;0,05(критерий Манна-Уитни)</p>				

Субпопуляция, одновременно экспрессирующая рецепторы к  $IFN\alpha/\beta$  и  $IFN\gamma$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$  так же малочисленна и представлена на 1,0 (0,4; 1,8)% НГ, при этом имеет более высокие значения плотности экспрессии по MFI  $IFN\alpha/\beta R1$  ( $p < 0,05$ ) и MFI CD119 ( $p > 0,05$ ) (Рисунок 4.3.1.1).



Примечание: \*- значимость отличий показателей от значений группы сравнения;  $p < 0,05$ ;  
A - значимость отличий показателей ГИ 1а от ГИ 1б;  $p < 0,05$ , критерий Манна – Уитни.

Рисунок 4.3.1.1 – Содержание и фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ НГ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ НГ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$ НГ у пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19

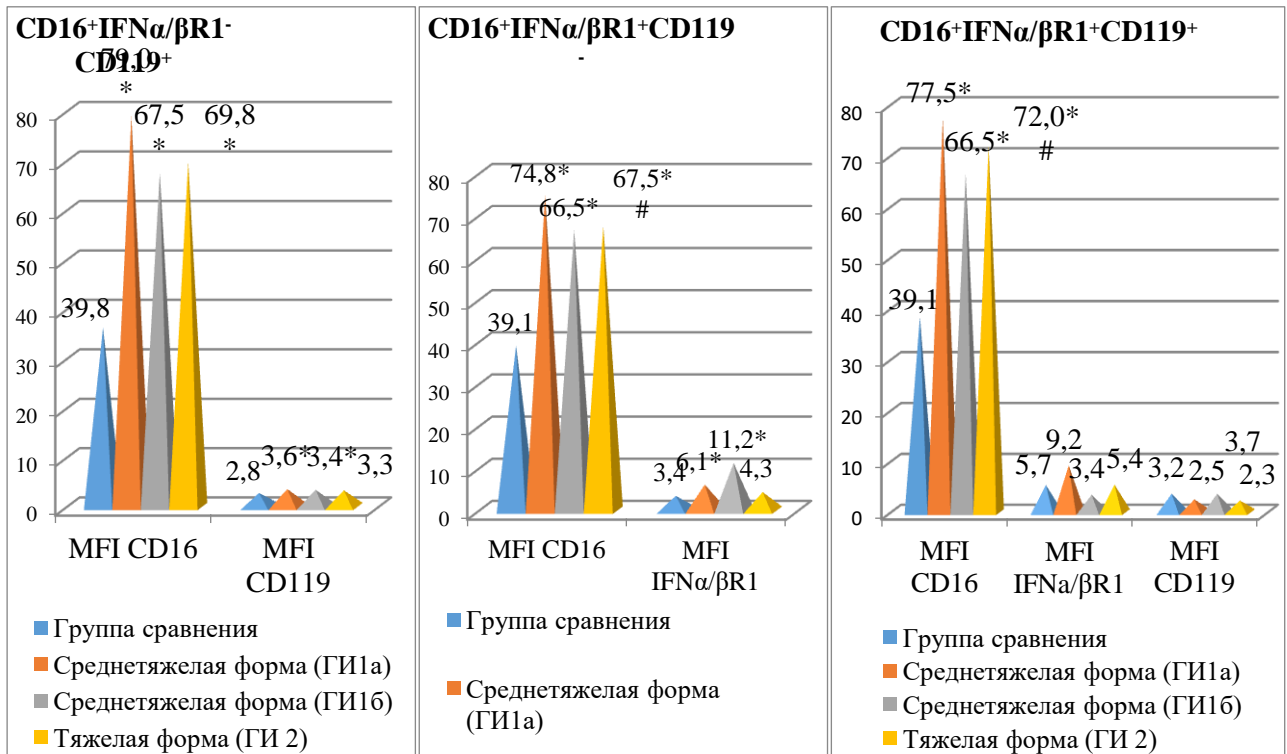
При анализе показателей ГИ 1 пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19 выявлено, что в 75,6% случаев (ГИ 1а,  $n=34$ ) содержание НГ изучаемых субпопуляций не меняется, но, при этом, отмечается изменение фенотипа: повышение в 2 раза MFI CD16 ( $p < 0,05$ ) во всех 3-х субпопуляциях, в 1,8 раз MFI  $IFN\alpha/\beta R1$  в 2-х субпопуляциях  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ НГ и

CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>НГ ( $p_{1,2}<0,05$ ), в 1,3 раза MFI CD119 ( $p<0,05$ ) в субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>НГ, и напротив, тенденция снижения MFI CD119 ( $p>0,05$ ) в субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>НГ (Рисунок 4.3.1.1).

Такие изменения фенотипа субпопуляций состава НГ регистрировались у группы пациентов с COVID-19, у которых отмечалось незначительное снижение общего количества лейкоцитов до 5,8 (4,6; 6,7) против 6,3 (4,3; 6,8) в ГС ( $p>0,05$ ) на фоне повышения содержания НГ (72,0 (62,0; 83,0)% против 58,5 (55,8; 60,5)% в ГС ( $p<0,05$ )) и доли палочкоядерных форм (ПЯЛ), и снижения количества ЛФ (20,5 (13,3; 29,8)% против 35,5 (32,8; 36,9)% в ГС ( $p_1<0,05$ ;  $p_2<0,05$ )).

У 24,4% ( $n=11$ ) ГИ 1б, напротив, отмечался лейкоцитоз - 14,8 (10,6; 19,3) $\times 10^9$ /л ( $p<0,05$ ), нейтрофилез - 11,4 (6,9; 15,7) $\times 10^9$ /л ( $p<0,05$ ), снижение процентного содержания ЛФ ( $p<0,05$ ). В этой группе отмечалось снижение в 6 раз доли основной субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$  R1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>НГ до 15,8 (14,8; 16,5) против 93,7(89,8; 96,5) в ГС, и резкое увеличение количества CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>НГ до 88,39 (81,7; 92,7)% против 1,4 (0,5; 2,4)% в ГС и 1,2 (0,6; 1,9)% в ГИ 1а ( $p_{1,2}<0,05$ ). Количество субпопуляции CD16<sup>+</sup>CDIFN $\alpha$ / $\beta$ <sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>НГ не отличалось от значений ГС и ГИ 1а, при этом, на НГ определялась более низкая плотность IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 (MFI IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 ( $p<0,05$ )) и не отличающийся показатель MFI CD119 рецепторов от значений ГИ 1а и ГС (Рисунок 4.3.1.2).

При тяжёлой форме COVID-19 (ГИ 2) соотношение и содержание НГ изучаемых субпопуляций CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>НГ, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>НГ, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>НГ не менялось в сравнении с показателями ГИ1а и ГС ( $p_{1,2}<0,05$ ). Во всех субпопуляциях ГИ 2 отмечалось повышение в 1,6 раза MFI CD16 по отношению к ГС( $p<0,05$ ), при этом MFI CD16 был ниже, чем в ГИ1а и не отличалась от показателей ГИ 1б ( $p_{1,2}>0,05$ ) со среднетяжёлой формой COVID-19 (Рисунок 4.3.1.2).



Примечание: \*- значимость отличий показателей от значений группы сравнения;  $p < 0,05$ ; λ - значимость отличий показателей ГИ 1а от ГИ 1б;  $p < 0,05$ ; # - значимость отличий показателей ГИ 1а от ГИ 2,  $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни.

Рисунок 4.3.1.2 – Плотность экспрессии рецепторов (MFI) субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD16<sup>+</sup>IFNα/βR1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>НГ, CD16<sup>+</sup>IFNα/βR1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>НГ, CD16<sup>+</sup>IFNα/βR1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>НГ у пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19

Регистрируется незначительная тенденция повышения до 4,3 (2,3; 7,5) против 3,4 (2,6; 7,7) в ГС ( $p > 0,05$ ) и снижения в сравнении с ГИ 1 - 6,1 (4,9; 18,1) ( $p > 0,05$ ) плотности экспрессии молекул IFNα/βR1<sup>+</sup> на субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFNα/βR1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>НГ. При этом, в ГИ 2 показатели MFI IFNα/βR1<sup>+</sup> и MFI CD119 на субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFNα/βR1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>НГ не отличались от значений ГС ( $p_{1,2} > 0,05$ ) и ГИ 1 ( $p_{1,2} > 0,05$ ).

Таким образом, у пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19 отмечается трансформация фенотипа субпопуляций НГ, несущих рецепторы к IFNα и IFNγ и активационный рецептор CD16, отвечающий, за цитотоксичность НГ по отношению к инфицированным вирусом клеткам.

В ГИ1б также выявлено перераспределение субпопуляций: увеличение доли в 60 раз  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$  НГ на фоне снижения в 6 раз основной субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$  НГ.

Выявлено изменение фенотипа субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$  НГ, определенного в ГС, -  $CD16^{mid}IFN\alpha/\beta R1^-CD119^{dim}$  НГ на фенотип  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^-CD119^{mid}$  НГ при среднетяжёлой (в ГИ 1а и ГИ1б) и  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^-CD119^{dim}$  НГ при тяжёлой (в ГИ 2) формах COVID-19.

Также отмечена трансформация фенотипа субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$  НГ, характерного для ГС, -  $CD16^{mid}IFN\alpha/\beta R1^{dim}CD119^-$  НГ, на фенотип:  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^{bright}CD119^-$  при среднетяжелой форме COVID-19 в ГИ1а и ГИ1б и  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^{dim}CD119^-$  НГ при тяжёлой форме COVID – 19.

Показана перестройка рецепторного оснащения субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$  НГ с фенотипа -  $CD16^{mid}IFN\alpha/\beta R1^{mid}CD119^{dim}$  НГ в ГС на фенотип  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^{bright}CD119^{dim}$  НГ в ГИ 1а, на фенотип  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^{dim}CD119^{dim}$  НГ в ГИ 1б и  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^{mid}CD119^{dim}$  НГ в ГИ2 с тяжёлой формой заболевания.

Выявленные трансформации фенотипа в исследуемых субпопуляциях  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$  свидетельствуют о готовности НГ воспринимать и отвечать на цитокиновые и интерфероновые сигналы, они активированы, а в случае ГИ1б гиперактивированы, и обладают высокой цитотоксической активностью как при среднетяжелой, так и тяжелой формах заболевания.

#### **4.3.2 Содержание и фенотип субпопуляции $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^-$ и $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^+$ нейтрофильных гранулоцитов при среднетяжёлой и тяжёлой формах COVID-19**

Рецепторы на НГ, через которые нейтрофил-ассоциированные цитокины воздействуют на клетку, обеспечивая и контролируя их рекрутирование,

активацию, экстравазацию, могут различаться по плотности экспрессии на поверхностной мембране, что в значительной степени определяет, куда НГ направляются и какие эффекторные функции будут выполнять. Перспектива возможности контролировать экспрессию рецепторов, может привести к механизмам управления локализацией НГ и функциональной гетерогенностью [232, 243].

Для понимания механизмов вовлечения НГ в воспалительную реакцию и процессы образования NETs особый интерес могут представлять субпопуляции НГ  $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^-$  и  $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^+$ , экспрессирующие CD62L (L-селектин) - рецептор адгезии и самонаведения НГ, отвечающий за роллинг и перемещение к очагу воспаления [27], и CD63 (ME491, тетраспанин), который экспрессируется на мембране лизосом, а повышенная плотность экспрессии которого на мембране клеток ассоциируется с их лизисом. Кроме того, CD63 выполняют регуляторную функцию в индукции активации и подвижности НГ, являясь белками-посредниками передачи и усиления сигналов. CD11b (Mac-1,  $\beta 2$ -интегрин) –  $\alpha$ -субъединица молекулы адгезии и рецептор CR3b для C3b компонента комплемента, являющийся маркером активированных НГ, и CD16 (Fc $\gamma$ RIIIb) — якорь, который, связываясь с Fc $\gamma$ RIIa с Fc $\gamma$ RIIIb, запускает сигнальные каскады, в результате которых реализуются разные эффекторные механизмы: антителозависимая клеточная цитотоксичность, фагоцитоз, дегрануляция, образование активных форм кислорода, пролиферация [18].

Результаты фенотипирования НГ показали, что у пациентов со среднетяжёлой (ГИ1) и тяжёлой (ГИ2) формами COVID-19, как и у ГС в ПК, регистрируются субпопуляции  $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^-$  НГ и  $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^+$  НГ с различными фенотипами, которые отличаются по плотности экспрессии (MFI) изучаемых рецепторов (Таблица 4.3.2.1).

Таблица 4.3.2.1 – Содержание и фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> при среднетяжёлой и тяжёлой форме COVID-19 (Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>2</sub>))

Показатель	ГС группа сравнения n=30	ГИ 1 среднетяжёлая форма, n=45	ГИ 2 тяжёлая форма, n=41
<b>CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ</b>			
CD16 <sup>bright</sup> CD62L <sup>bright</sup> CD11b <sup>bright</sup> CD63 <sup>-</sup>			
НГ,%	85,8 (81,0; 87,9)	71,3* (68,4; 78,9)	60,4*^ (46,8; 67,2)
MFI CD16	131,5 (110,2; 139,3)	137,0 (115,5; 162,8)	147,0 (120,0; 156,0)
MFI CD62L	9,1 (8,3; 9,6)	8,9 (7,4; 10,8)	10,5 (7,8; 11,4)
MFI CD11b	32,4 (24,8; 38,4)	22,9 (19,3; 25,7)	26,3 (19,2; 30,1)
CD16 <sup>dim</sup> CD62L <sup>dim</sup> CD11b <sup>bright</sup> CD63 <sup>-</sup>			
НГ,%	8,6 (7,6; 10,5)	19,8* (13,3; 22,5)	24,7*^ (23,9; 40,9)
MFI CD16	51,9 (48,7; 52,4)	62,8 (47,2; 75,0)	68,9 (56,3; 83,0)
MFI CD62L	5,0 (2,7; 5,8)	4,0 (2,9; 4,5)	2,9 (2,6; 3,3)
MFI CD11b	30,4 (23,5; 38,2)	27,3 (19,9; 31,1)	25,1 (22,2; 27,3)
<b>CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ</b>			
CD16 <sup>bright</sup> CD62L <sup>bright</sup> CD11b <sup>bright</sup> CD63 <sup>dim</sup>		CD16 <sup>bright</sup> CD62L <sup>bright</sup> CD11b <sup>bright</sup> CD63 <sup>bright</sup>	
НГ,%	6,8 (2,1; 10,7)	14,8* (12,0; 20,3)	26,6* (26,4; 42,2)
MFI CD16	104,0 (97,4; 112,5)	92,5 (75,7; 128,0)	116,0 (74,5; 118,0)
MFI CD62L	9,2 (7,6; 12,4)	7,5 (6,5; 9,1)	6,9 (6,6; 9,1)
MFI CD11b	31,1 (24,3; 36,4)	19,3 (16,1; 26,1)	26,8 (22,0; 28,6)
MFI CD63	3,0 (2,2; 3,2)	4,08* (3,9; 6,5)	6,0* (4,3; 6,8)
Примечание: *- различия между показателями ГИ1 и ГИ 2 и показателями ГС; ^ - различия между показателями ГИ1 и ГИ2, p<0,05, критерий Манна-Уитни.			

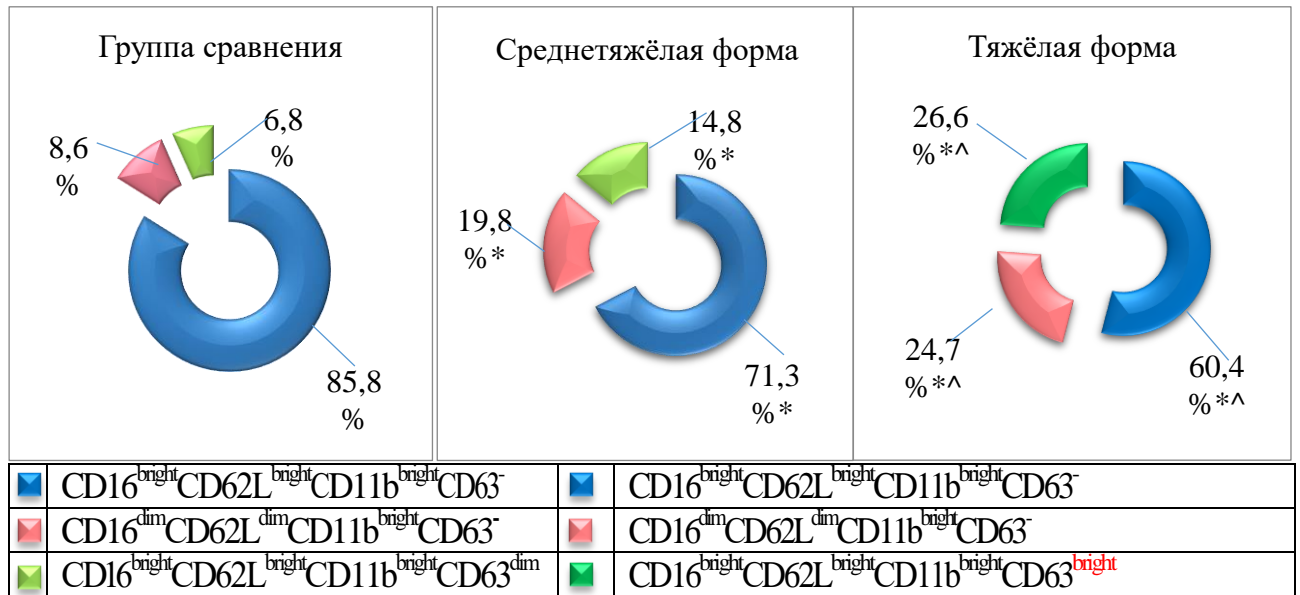
Выявлено, что в ГС НГ в 85,8 (81,0; 87,9)% случаев были представлены субпопуляцией с фенотипом  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{-}$  с высокой плотностью экспрессии рецепторов по MFI: CD16 - 131,5 (110,2; 139,3), CD62L - 9,1 (8,3; 9,6) и CD11b - 30,4 (23,5; 38,2) и не экспрессирующей на поверхностной мембране CD63 молекулы. В 8,6 (7,6; 10,5)% случаев определялась субпопуляция НГ, которая отличалась более низкими значениями плотности экспрессии рецепторов по MFI: CD16 (в 2,5 раза,  $p < 0,05$ ) и CD62L (в 1,8 раз,  $p < 0,05$ ) и имела фенотип  $CD16^{dim}CD62L^{dim}CD11b^{bright}CD63^{-}$  НГ. Доля субпопуляции -  $CD16^{+}CD62L^{+}CD11b^{+}CD63^{+}$ , дополнительно экспрессирующей на поверхностной мембране НГ рецептор CD63, составила 6,8 (2,1; 10,7)%. (Таблица 4.3.2.1).

Данная субпопуляция по плотности экспрессии рецепторов CD16, CD62L, CD11b не отличалась от преобладающей субпопуляции  $CD16^{+}CD62L^{+}CD11b^{+}CD63^{-}$  НГ и характеризовалась фенотипом  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{dim}$  (Таблица 4.3.2.1).

У пациентов с COVID-19 отмечалось перераспределение долей, выявленных субпопуляций  $CD16^{+}CD62L^{+}CD11b^{+}CD63^{-}$  НГ,  $CD16^{+}CD62L^{+}CD11b^{+}CD63^{+}$  НГ и, таким образом, изменялись их соотношения (Рисунок 4.3.2.1).

Так отмечалось уменьшение доли субпопуляции НГ с фенотипом  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{-}$  в 1,2 раза в ГИ1 и 1,4 раза ГИ2 ( $p_{1,2} < 0,05$ ) по отношению к значениям ГС. Параллельно в ГИ1 и ГИ2 наблюдалось увеличение субпопуляции НГ с фенотипом  $CD16^{dim}CD62L^{dim}CD11b^{bright}CD63^{-}$  НГ в 2,4 раза и 2,9 раз ( $p_{1,2} < 0,05$ ), соответственно, по отношению к значениям ГС. Кроме того, в обеих субпопуляциях как в ГИ1, так и в ГИ2, по значениям медиан прослеживалось сходство некоторых тенденций: увеличение плотности экспрессии по MFI CD16 и снижение уровня CD11b рецепторов ( $p_{1,2} > 0,05$ ) (Таблица 4.3.2.1, Рисунок 4.3.2.1).





Примечание: \* - различия между показателями ГИ 1 (среднетяжелая форма COVID-19), ГИ 2 (тяжелая форма COVID-19) и показателями ГС (группа сравнения); ^ - различия между показателями ГИ 1 и ГИ 2,  $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни.

Рисунок 4.3.2.1 – Соотношение субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов при среднетяжелой и тяжелой форме COVID-19

Также в исследованных группах пациентов со среднетяжелой и тяжелой формами COVID-19 выявлено не только значимое повышение содержания НГ агрессивной субпопуляции CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup>НГ в 2,2 раза в ГИ 1 ( $p < 0,05$ ) и 3,9 раза в ГИ 2 ( $p < 0,05$ ), но и изменение фенотипа на CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>bright</sup> за счет повышения плотности экспрессии молекулы CD63 на поверхностной мембране НГ (Таблица 4.3.2.1).

Таким образом, в результате исследования установлено, что повышенный уровень сывороточных нейтрофил-ассоциированных цитокинов сопряжён с количественными изменениями и трансформацией фенотипа субпопуляций НГ CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>bright</sup>, отвечающих за миграцию клеток в очаг воспаления. Эти субпопуляции у пациентов с COVID-19 приобретают определенные профили экспрессируемых мембранных рецепторов, что способствует активации НГ и образованию NETs.

Так, в ПК пациентов с COVID-19 выявлено перераспределение соотношения субпопуляций НГ с фенотипами  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{-}$ ,  $CD16^{dim}CD62L^{dim}CD11b^{bright}CD63^{-}$ ,  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{bright}$  в зависимости от формы течения заболевания.

Показано снижение количества НГ преобладающей субпопуляции с фенотипом  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{-}$ , который по данным литературы соответствует зрелым сегментоядерным НГ [162]. При этом, выявлено увеличение содержания субпопуляции НГ с фенотипом  $CD16^{dim}CD62L^{dim}CD11b^{bright}CD63^{-}$ , более выраженное при тяжелой форме COVID-19. Следует подчеркнуть, что субпопуляция НГ с характерным фенотипом  $CD16^{low/dim}CD62L^{low/dim}$  была описана ранее при тяжелой вирусной респираторной инфекции у детей, а также у взрослых пациентов, страдающих сепсисом [236]. Субпопуляцию  $CD16^{low/dim}CD62L^{low/dim}$  НГ считают членом гетерогенного семейства G-MDSCs (granulocyte myeloid-derived suppressor cells), к которым относятся гранулоциты, обладающие свойствами ингибирования пролиферации и супрессирования функций Т лимфоцитов. Группой других исследователей субпопуляция  $CD16^{low/dim}CD62L^{low/dim}$  была охарактеризована, как субпопуляция апоптических НГ [302]. Показано также, что при активации НГ цитокинами может происходить снижение уровня экспрессии CD62L, коррелирующее с быстрым вхождением НГ в апоптоз [47].

Особое значение в иммунопатогенезе различных форм течения COVID-19 имеет выявленное значимое увеличение доли субпопуляции  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{bright}$ , которая обладает высокой адгезивной способностью, а дополнительная экспрессия CD63 рецептора обеспечивает высокий микробицидный потенциал. Доказано, что появление молекулы CD63 на поверхностной мембране НГ связано с ее транслокацией из лизосом, при этом, параллельно происходит индукция превращения проэластаз в нейтрофильные эластазы (NE), что активно влияет на формирование NETs. Кроме того,

повышение уровня экспрессии CD63 может быть сопряжено с процессами дегрануляции НГ [128]. Показано, что дегрануляция первичных гранул, о чем свидетельствуют повышенные уровни CD63 на клеточной поверхности, является причиной повышения концентрации миелопероксидазы (MPO) и нейтрофильной эластазы (NE) в сыворотке крови пациентов с тяжелой формой COVID-19 [128]. CD11b (в присутствии субъединицы CD18) вместе с MPO индуцирует запуск каскада внутриклеточных сигнальных адаптерных структур, которые приводят к нерегулируемой дегрануляции НГ, повышению активности NADPH-оксидаз [235], а следовательно, к усилению образования NETs.

#### **4.4 Дефекты эффекторных функций нейтрофильных гранулоцитов при среднетяжёлой и тяжёлой формах COVID-19**

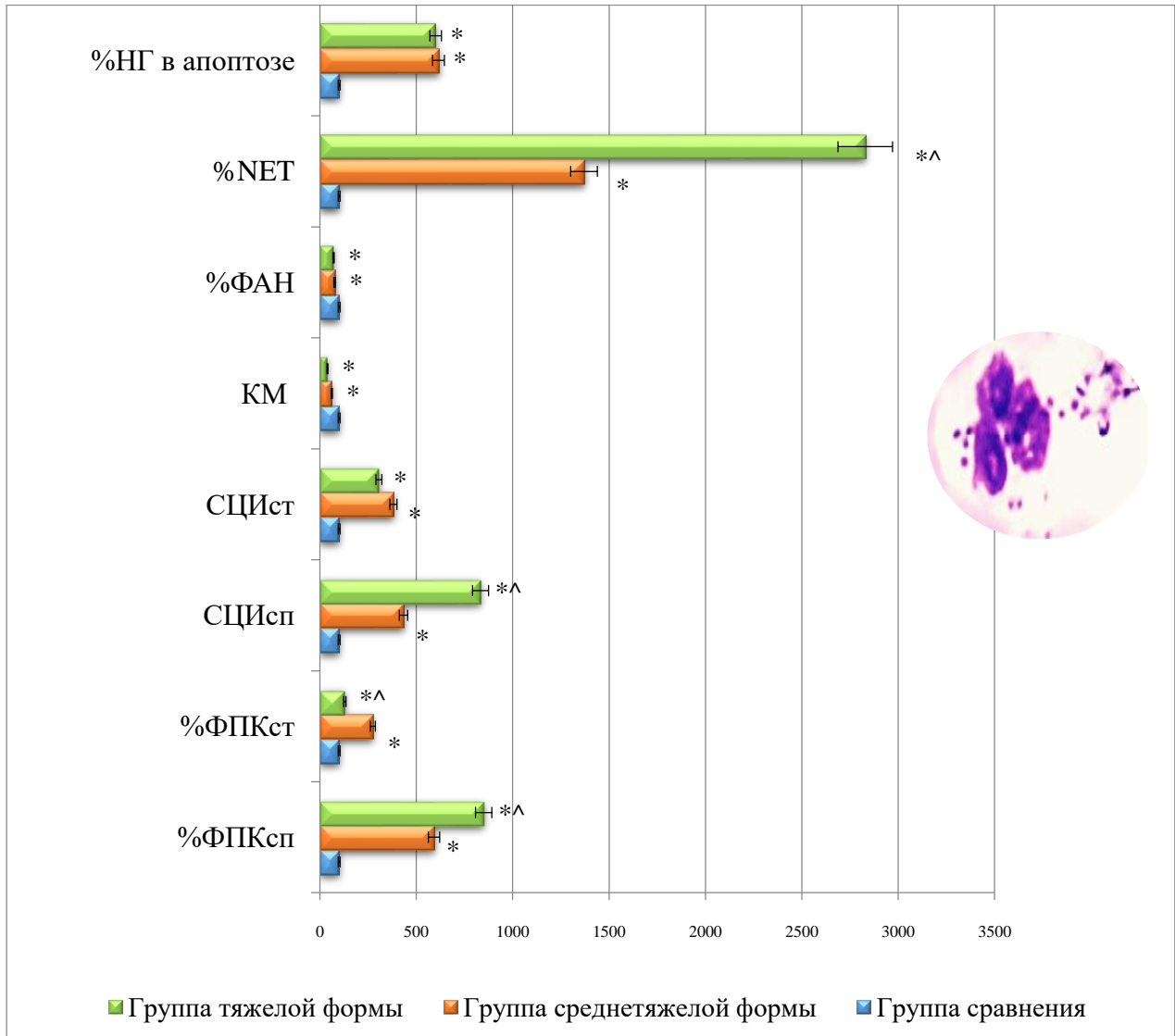
Анализ функционального потенциала НГ при среднетяжёлой (ГИ1) и тяжёлой (ГИ2) формах COVID-19 на фоне выявленных негативных трансформаций содержания и фенотипа функционально-значимых субпопуляций НГ выявил однонаправленные нарушения их эффекторных функций.

Так, при оценке фагоцитарной активности было выявлено: снижение доли активно фагоцитирующих НГ (%ФАН) на фоне увеличения содержания НГ, образующих NETs, и клеток в апоптозе, повышение NADPH-оксидазной активности, более выраженные в ГИ 2 ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 4.4.1).

Так, в ГИ 1 на 100 НГ было обнаружено снижение %ФАН до 50,4 (46,5; 55,1)% против 65,8 (60,9; 79,6)% в ГС ( $p < 0,05$ ), повышение %NETs до 13,7 (8,0; 16,7)% против 1,0 (0; 1,0)% в ГС и НГ в состоянии апоптоза до 12,3 (10,9; 19,1) против 2,0 (2,0; 4,0) в ГС ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 4.4.1).

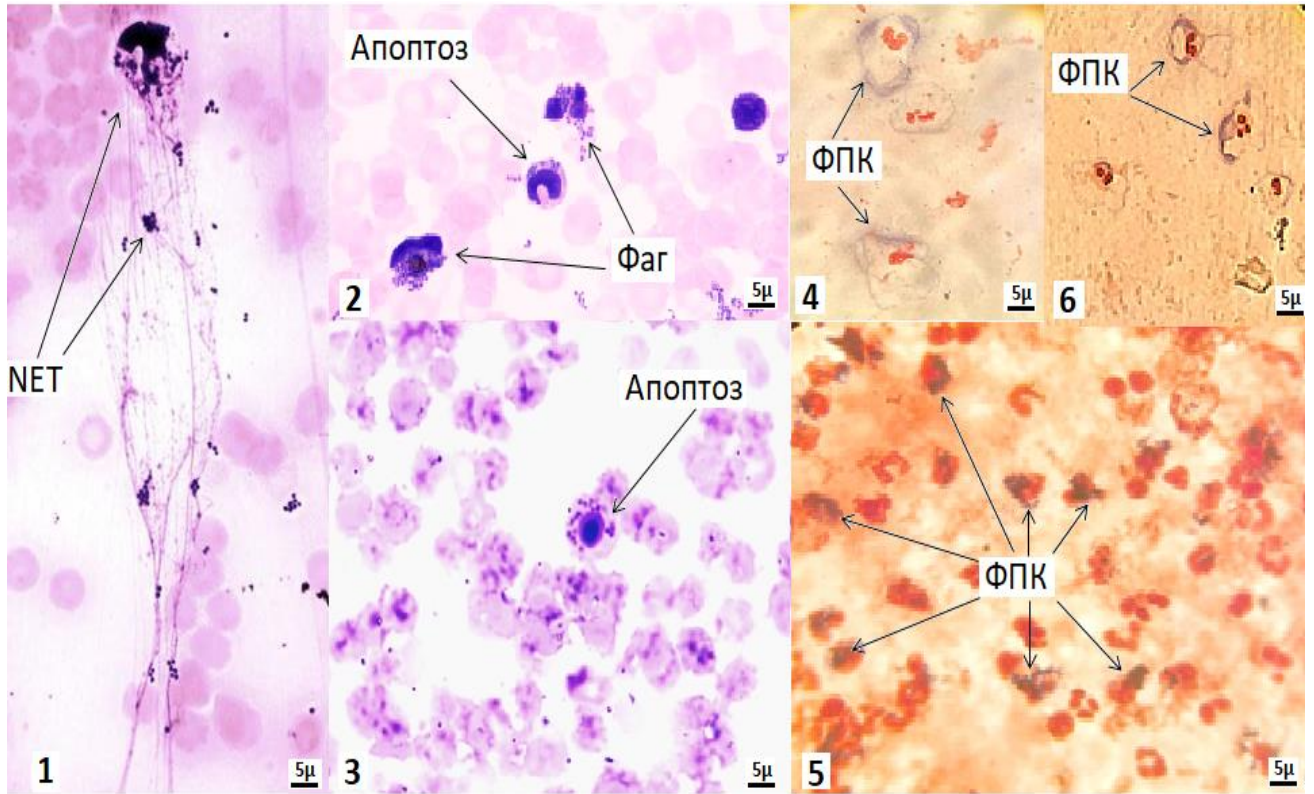
При этом, в этой группе пациентов отмечалось усиление спонтанной и стимулированной активности NADPH-оксидаз как по %ФПКсп - 14,0 (10,7; 19,9)% и ФПКст - 15,1 (9,3; 22,0)% против ФПКсп - 2,4 (2,3; 3,5) и ФПКст - 5,5 (2,8; 6,3) в ГС ( $p_{1-2} < 0,05$ ), так и по СЦИсп - 0,4 (0,2; 0,4), СЦИст - 0,6 (0,2; 0,7) против

СЦИсп- 0,09 (0,06; 0,1), СЦИст - 0,2 (0,08; 0,3) ( $p < 0,05$ ) с сохранением резервного микробицидного потенциала, о чем свидетельствуют КМ - 1,1 (1,0; 1,3) ( $p_{1,2} < 0,05$ ) (Рисунок 4.4.1, Рисунок 4.4.2).



*Примечание: \* - различия между показателями ГИ 1 (среднетяжёлая форма COVID-19), ГИ 2 (тяжёлая форма COVID-19) и показателями ГС (условно-здоровые лица); ^ - различия между показателями ГИ 1 и ГИ 2,  $p < 0,05$  критерий Манна-Уитни*

Рисунок 4.4.1 – Особенности функционального потенциала НГ у пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами течения COVID-19



1- НГ образующие NETs (окраска по Романовскому-Гимзе); 2- фагоцитирующий НГ и НГ в апоптозе; 3 - НГ в апоптозе (окраска по Романовскому-Гимза); 4, 6 –формазан позитивные НГ с текучестью мембран, характерные для НГ пациентов ГИ2 с тяжёлой формой течения COVID-19; 5 – формазан-позитивные НГ в спонтанном NBT- тесте (модифицированный метод Нестеровой И.В., 2018; препарат-капля на стекле, докраска ядер 0,05% р-ром сафранина O) (микроскоп Олупрус, световая микроскопия, увеличение 10x100)

Рисунок 4.4.2 – Микрофотографии нейтрофильных гранулоцитов периферической крови пациентов с тяжёлой формой COVID-19

В группе с тяжёлой формой заболевания (ГИ 2) отмечалось еще более выраженное снижение доли %ФАН до 46,5 (38,5; 49,7)% ( $p < 0,05$ ) и увеличение %NETs - до 28,3 (24,7; 29,0)% ( $p < 0,05$ ), при этом, доля клеток в апоптозе оставалось на уровне ГИ 1 ( $p > 0,05$ ). В спонтанном NBT-тесте отмечалась значительная напряженность NADPH-оксидаз по показателям СЦИсп – 0,8 (0,7; 1,3) и %ФПКст - 20,4 (12,1; 29,7)% в сравнении с ГИ 1 и ГС ( $p_{1,2} < 0,05$ ). При дополнительной нагрузке *S. aureus* в стимулированном NBT-тесте отмечалось снижение показателей СЦИст и %ФПК, что демонстрировало истощение оксидазного микробицидного потенциала: КМ-0,7 (0,67; 0,73).

Высвобождение нейтрофил-ассоциированных цитокинов и, как следствие, рекрутирование НГ с образованием NETs являются нормальным адекватным ответом организма на вирусную инфекцию [109]. Однако, отмечаемая при COVID-19 гиперпродукция цитокинов с доказанной способностью к индукции образования NETs и высокий нейтрофилез, а при тяжелых формах течения - нейтрофилез на фоне лейкоцитоза, приводят к усугублению осложнений и определяют возникновение ОРДС, тяжёлое и крайне тяжёлое течение и плохой прогноз COVID-19 [296].

В этом сценарии, исследуемые нами нейтрофил-ассоциированные цитокины, безусловно, вносят свой вклад в развитие гипервоспаления при COVID-19: IL-8 обеспечивают большой приток НГ в зону поражения, где имеется высокая концентрация вирусов SARS-CoV-2, а высокая концентрация IL-18, IL-17A и VEGF-A индуцируют формирование NETs в больших количествах, провоцируя активированные НГ, образующие NETs, и активированные тромбоциты формировать иммунотромбы. Следует подчеркнуть, что иммунотромбоз при этом может поражать сосуды малого, среднего и большого калибра, поражая таким образом многие ткани и органы.

Опираясь на полученные нами данные и принимая во внимание некоторые данные литературы, можно полагать, что нейтрофил-ассоциированные цитокины IL8, IL18, IL17A и VEGFA являются маркерами протромботического состояния с дальнейшим формированием иммунотромбоза, эндотелиита сосудов, и высокая концентрация этих провоспалительных цитокинов при тяжелой форме COVID-19 коррелирует с утяжелением процессов воспаления.

Изучая субпопуляции НГ и параллельно оценивая их эффекторные функции, мы смогли подтвердить в данном исследовании, что для НГ пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами течения COVID-19 на фоне снижения содержания активно фагоцитирующих НГ характерно увеличение NADPH-оксидазной активности и образования NETs. Классически формирование NETs инициируется зависимой от активных форм кислорода (АФК) активацией НГ.

NADPH-оксидаза генерирует продукцию АФК, что, в свою очередь, индуцирует миграцию МПО и NE из азурофильных гранул в ядро, где NE запускает деградацию гистонов и деконденсацию хроматина, дополнительно усиливаемую МРО [328]. Сигналы, влияющие на выбор между фагоцитозом и NETosis, еще недостаточно хорошо изучены и охарактеризованы. Однако выявлены некоторые факторы, включающие внутриклеточную передачу сигналов в конкурирующих путях, а также метаболическое, адгезивное и активационное состояние НГ. Также было обнаружено, что дефектный фагоцитоз может вызывать чрезмерный NETosis, что приводит к возникновению эндотелиита и васкулитов [328].

Результаты нашего исследования продемонстрировали, что у пациентов с COVID-19 на фоне неадекватного ответа системы IFNs на вирусную инфекцию, вызванную SARS-CoV2, - блокада продукции  $IFN\alpha$ ,  $IFN\gamma$ , параллельно детектируются повышенные уровни нейтрофил-ассоциированных цитокинов IL8, IL18, IL17A, VEGFA и наблюдается изменение содержания функционально-значимых субпопуляций НГ с трансформированными фенотипами.

Выявленные трансформации фенотипа в субпопуляциях  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$  свидетельствуют о готовности НГ воспринимать и отвечать на цитокиновые и интерфероновые сигналы, активированы, а в случае ГИ1б гиперактивированы, и обладают высокой цитотоксической активностью как при среднетяжёлой, так и тяжёлой формах COVID-19.

Показано снижение числа НГ субпопуляции  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^-$  с фенотипом, соответствующим зрелым функционально-активным клеткам, значительное повышение количества субпопуляции НГ с иммуносупрессивным фенотипом  $CD16^{dim}CD62L^{dim}CD11b^{bright}CD63^-$  и достоверное увеличение количества НГ субпопуляции  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{bright}$  с фенотипом, обладающим высокой цитотоксической активностью и повышенной способностью к образованию NETs.

Этим изменениям функционально - значимых субпопуляций соответствовало выявленное снижение содержания активно фагоцитирующих НГ, увеличение NADPH-оксидазной активности и повышенное образование NETs, зависящее от степени тяжести течения COVID-19.

Мы полагаем, что ключевым фактором, приводящим к формированию неуправляемого гипервоспаления, развитию ОРДС, иммунотромбозов, эндотелиитов, васкулитов и других осложнений при COVID-19 является значительное повреждение вирусом SARS-CoV-2 первой линии противовирусной иммунной защиты – системы IFNs, что, в свою очередь, приводит к срыву адекватного противовирусного иммунного ответа, обусловленного дефицитом IFN I типа и/или блокадой синтеза и секреции IFN I типа. На этом фоне не происходит достаточной элиминации вирусов SARS-CoV-2, вирусная нагрузка возрастает в геометрической прогрессии, страдает клеточное звено врожденной и адаптивной противовирусной защиты, и в геометрической прогрессии нарастают уровни провоспалительных нейтрофил-ассоциированных цитокинов, запуская порочный круг гипервоспаления, вызванный активированными НГ.

Дисфункции НГ при COVID-19 неоднозначны и напрямую связаны с нарушением рецепторных функций, ответственных за восприятие цитокинового и интерферонового сигнала, включения НГ в воспалительный процесс и за обеспечение элиминации вируса различными эффекторными механизмами. Они характеризуются как дефектной гиперактивацией, участвуя в возникновении ОРДС, так и супрессией основных функций, что может обуславливать возникновение гнойно-септических осложнений.



# ГЛАВА 5 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ФЕНОТИПОВ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ И ИММУНОКОРРЕКЦИЯ ИХ ЭФФЕКТОРНЫХ ФУНКЦИЙ В СИСТЕМЕ IN VITRO У ПАЦИЕНТОВ СО СРЕДНЕТЯЖЁЛОЙ ФОРМОЙ COVID-19

## 5.1 Эффекты влияния рекИФН $\alpha 2b$ на количество и фенотип функционально-значимых субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19 в системе *in vitro*

Изучение влияния *in vitro* рекомбинантного ИФН $\alpha 2b$  (рекИФН $\alpha 2b$ ) на НГ может стать многообещающим в поиске терапевтических стратегий, способных точно нацеливать НГ и их реактивность на восстановление и усиление врожденного иммунного ответа против SARS-CoV-2 путем регулирующего влияния на фенотип различных субпопуляций НГ.

В системе *in vitro* были исследованы образцы ПК 45 пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19 (ГИ1). Цельную ПК инкубировали с рекИФН $\alpha 2b$  (50 МЕ/мкл) 60 мин при температуре 37°C – группа исследования 1+рек рекИФН $\alpha 2b$  (ГИ1+ рекИФН $\alpha 2b$ ).

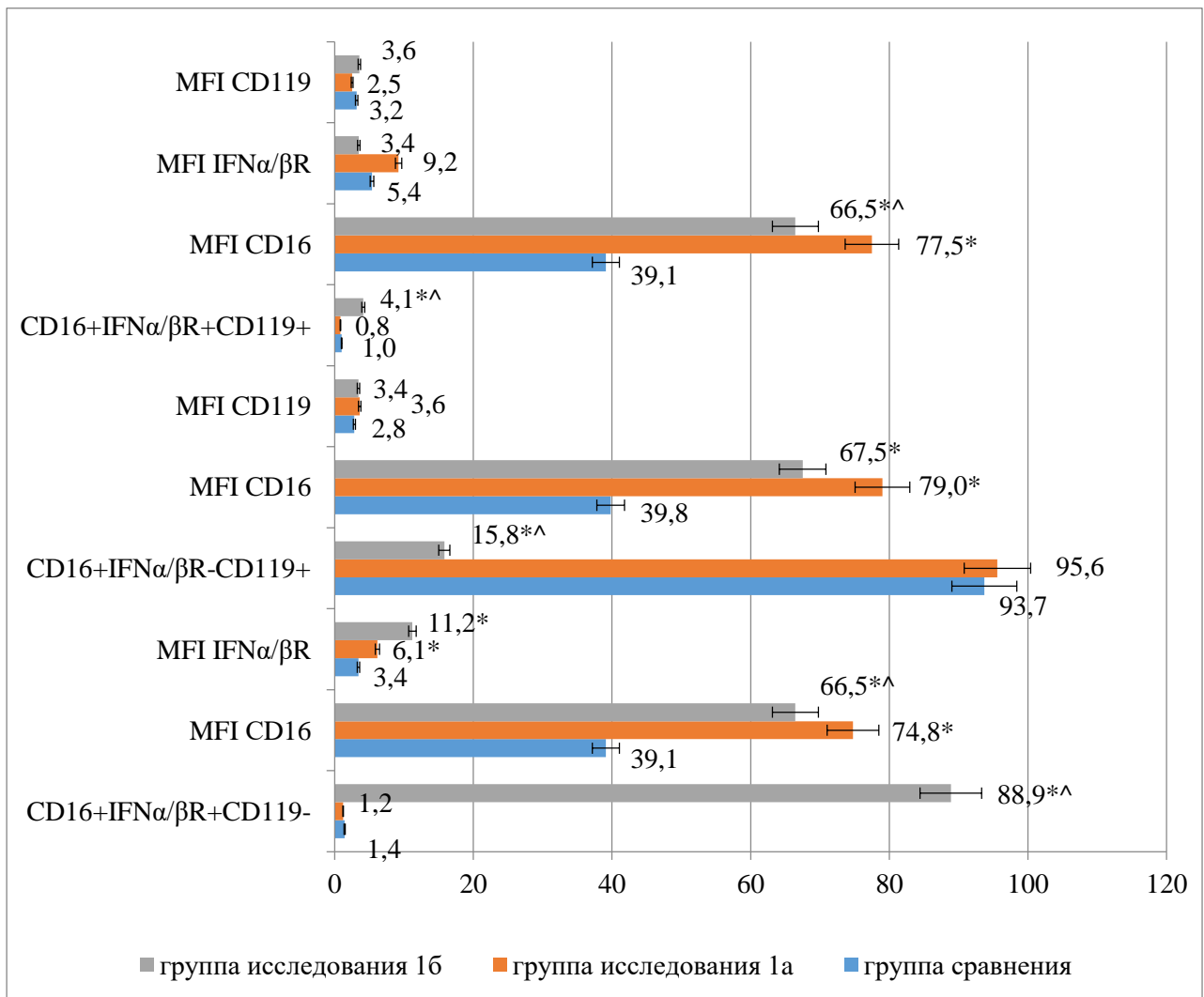
Оценивали количество НГ, % субпопуляций: CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha/\beta$ R1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>НГ, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha/\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>НГ, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha/\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>НГ, CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>, а также фагоцитарную функцию, NADPH-оксидазной активность, способность образовывать NETs до и после инкубации.

### 5.1.1 Эффекты влияния рекИФН $\alpha 2b$ на количество и фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов, экспрессирующих рецепторы к IFN I и II типов, CD16 при среднетяжёлой форме COVID-19

Изучение возможности восстановления молекулярных механизмов нарушений при COVID 19, связанных с продукцией IFNs, рецепторной функции

НГ –  $IFN\alpha/\beta R$ ,  $CD119$  ( $IFN\gamma$ ) на мембране НГ ПК, является актуальным и представляет несомненный интерес [39].

Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о том, что у взрослых лиц ГС в ПК циркулируют 3 субпопуляции НГ, экспрессирующие рецепторы к  $IFN$  I и II типов:  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ НГ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ НГ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$ НГ (Рисунок 5.1.1.1).



Примечание: \* - значимость отличий от показателей группы сравнения;  $p < 0,05$ ;  
 $\Lambda$  - значимость отличий показателей ГИ 1а от ГИ 1б;  $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни.

Рисунок 5.1.1.1 – Субпопуляции нейтрофильных гранулоцитов  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$  и особенности их фенотипа у пациентов со среднетяжёлым течением COVID-19

Показано, что в основном преобладает субпопуляция  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+НГ$  - 93,7 (89,8; 96,5)% с плотностью экспрессии молекул  $CD16$  – 39,8 (20,4; 51,5) и значительно меньшей плотностью экспрессии  $CD119(IFN\gamma)$  – 2,8 (2,5; 3,1).

Субпопуляция, не экспрессирующая рецептор к  $IFN\gamma$  –  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-НГ$ , составляет всего 1,4 %  $НГ$  и не отличается по плотности экспрессии  $CD16$  с MFI по  $IFN\alpha/\beta R1$  – 3,4 (2,62; 7,7).

Субпопуляция, одновременно оснащённая мембранными рецепторами к  $IFN\alpha/\beta$  и  $IFN\gamma$  –  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$ , малочисленна, и совокупность этих рецепторов представлена лишь 1,0%  $НГ$ , но при этом имеет место высокий уровень мембранной экспрессии по MFI рецепторов  $IFN\alpha/\beta R1$  и  $CD119$  (Рисунок 5.1.1.1).

При среднетяжёлой форме COVID-19 на фоне неадекватно низких по отношению к вирусной инфекции SARS-CoV-2 уровней  $IFN\alpha$  и  $IFN\gamma$  показано, что у 76% (ГИ 1а, n=34) пациентов  $НГ$  содержание 3-х изучаемых субпопуляций не отличались от уровней  $ГС$  ( $p_{1-3}>0,05$ ). При этом, отмечалось изменение фенотипа: повышение в 2 раза MFI  $CD16$  ( $p<0,05$ ) во всех 3-х субпопуляциях, в 1,8 раз MFI  $IFN\alpha/\beta R1$  в 2-х субпопуляциях  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-НГ$  и  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+НГ$  ( $p_{1,2}<0,05$ ), в 1,3 раза MFI  $CD119$  ( $p<0,05$ ) в субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+НГ$ , и напротив, наблюдалась тенденция снижения MFI  $CD119$  ( $p>0,05$ ) в субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+НГ$  (Рисунок 5.1.1.1).

В 24% случаев у пациентов ГИ1б (n=11) отмечалось снижение в 6 раз доли основной субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+НГ$  до 15,8 (14,8; 16,5) против 93,7(89,8; 96,5) в  $ГС$  и резкое увеличение количества  $НГ$  субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$  до 88,39 (81,7; 92,7)% против 1,4 (0,5; 2,4)% в  $ГС$  и 1,2 (0,6; 1,9)% в ГИ1а ( $p_{1,2}<0,05$ ). Количество субпопуляции  $CD16^+CDIFN\alpha/\beta^+CD119^+НГ$  не отличалось от значений  $ГС$  и ГИ 1а, но при этом, на  $НГ$  этой субпопуляции определялась более низкая плотность экспрессии по

MFI IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 ( $p < 0,05$ ) молекул, а MFI CD119 не отличался от значений в ГИ 1а и ГС (Рисунок 5.1.1.1).

При выяснении причины такого изменения в содержании изучаемых субпопуляций было выявлено, что у пациентов ГИ1б отмечался лейкоцитоз - 14,8 (10,6; 19,3) $\times 10^9$ /л ( $p < 0,05$ ), нейтрофилез - 11,4 (6,9; 15,7) $\times 10^9$ /л ( $p < 0,05$ ), снижение процентного содержания ЛФ ( $p < 0,05$ ). Тогда как для ГИ1а, напротив, была выявлена тенденция снижения общего количества лейкоцитов до 5,8 (4,6; 6,7) против 6,3 (4,3; 6,8) в ГС ( $p > 0,05$ ), повышение содержания НГ (72,0 (62,0; 83,0)% против 58,5 (55,8; 60,5)% в ГС ( $p < 0,05$ )) и доли палочкоядерных форм (ПЯЛ), снижение количества ЛФ (20,5 (13,3; 29,8)% против 35,5 (32,8; 36,9)% в ГС ( $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 < 0,05$ )).

Инкубация с рекИФН $\alpha$ 2 $\beta$  ПК пациентов с COVID-19 в системе *in vitro* позволила определить различные модулирующие эффекты влияния на содержание и фенотип субпопуляций НГ, экспрессирующих рецепторы к IFN I и II типа.

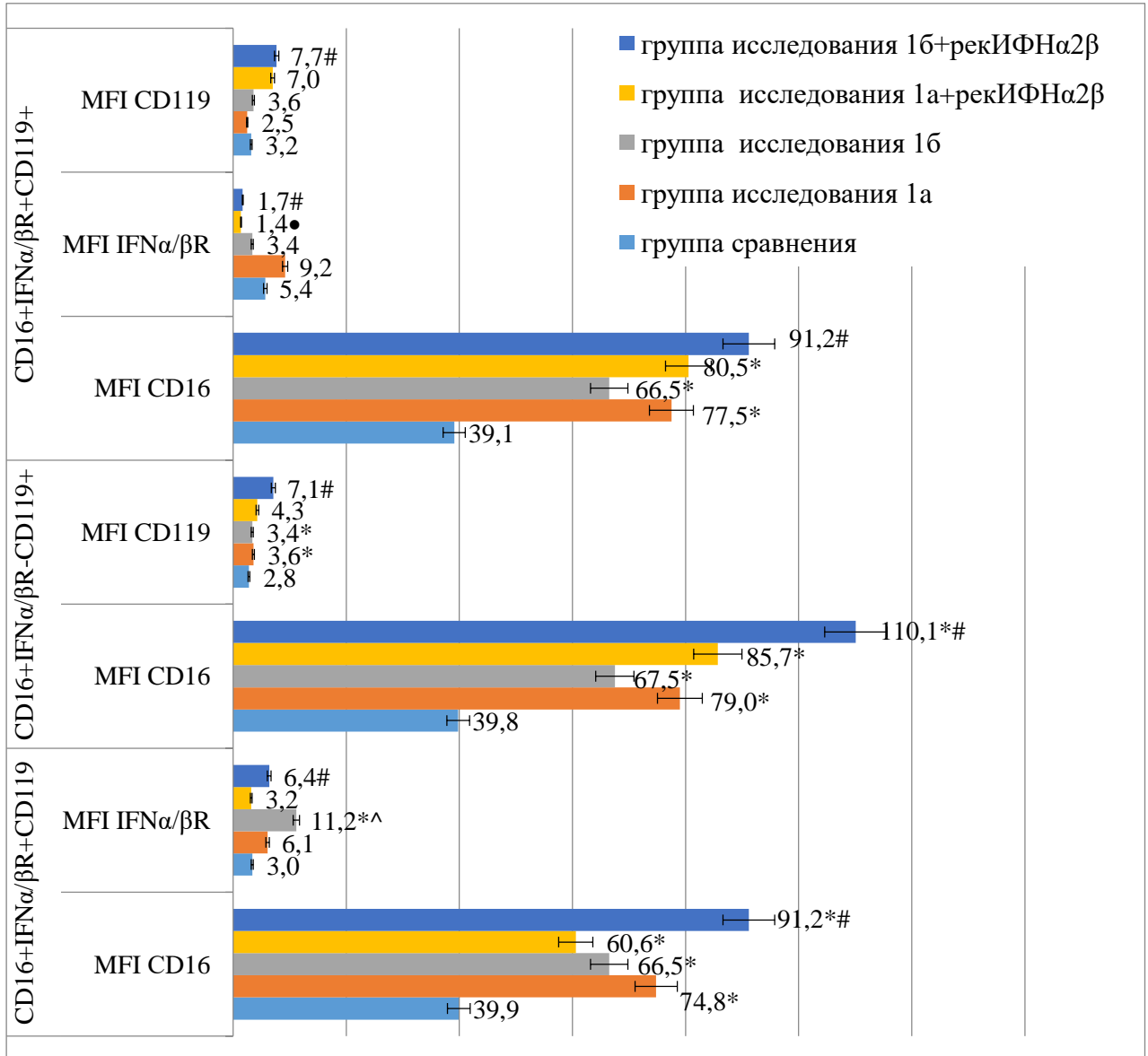
Так, в группе ГИ1а выявлены лишь тенденции повышения по медианам количества минорных субпопуляций: в 1,7 раз CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>НГ ( $p > 0,05$ ) и в 1,3 раза CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>НГ ( $p > 0,05$ ). Количество НГ субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup> оставалось на уровне значений до инкубации с рекИФН $\alpha$ 2 $\beta$  и не отличалось от показателей ГС (Таблица 5.1.1.1).

Под действием рекИФН $\alpha$ 2 $\beta$  в исследуемых субпопуляциях НГ в ГИ1а регистрировались изменения фенотипа. (Таблица 5.1.1.1.). Показано снижение MFI IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 в 1,9 раз в субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>НГ ( $p < 0,05$ ) и в 4 раза в CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>НГ ( $p < 0,05$ ). При этом, были выявлены тенденции повышения MFI CD119 в 1,2 раза в субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>НГ ( $p > 0,05$ ) и в 2,8 раз в субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>НГ ( $p > 0,05$ ).

Таблица 5.1.1.1 – Эффекты влияния рекИФН $\alpha$ 2b на количество и фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов, экспрессирующих рецепторы к IFN I и II типов, CD16 при среднетяжёлой форме COVID-19 (Me(Q<sub>1</sub>; Q<sub>2</sub>))

Показатели	Группа сравнения n=30	Среднетяжёлая форма COVID-19, ГИ 1			
		ГИ 1a, n=34	ГИ 1б, n=11	ГИ1a +рекИФН $\alpha$ 2b	ГИ 1б +рекИФН $\alpha$ 2b
CD16 <sup>+</sup> IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 <sup>-</sup> CD119 <sup>+</sup> НГ					
НГ,%	93,7 (89,8; 96,5)	95,6 (92,0; 98,2)	15,8* <sup>^</sup> (14,8; 16,5)	96,4 (95,1; 97,1)	34,3* <sup>#</sup> (33,4; 46,1)
MFI CD16	39,8 (20,4; 51,3)	79,0* (59,2; 91,4)	67,5* (53,2; 79,7)	85,7* (65,1; 88,3)	110,2* <sup>#</sup> (99,2; 121,1)
MFI CD119	2,8 (2,5; 3,1)	3,6* (3,2; 4,3)	3,4* (3,2; 3,6)	4,3 (3,6; 4,5)	7,1* <sup>#</sup> (5,7; 8,5)
CD16 <sup>+</sup> IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 <sup>+</sup> CD119 <sup>-</sup> НГ					
НГ,%	1,4 (0,5; 2,4)	1,2 (0,6; 1,9)	88,9 (81,7; 92,7)	2,1 (0,8; 3,0)	52,3* <sup>#</sup> (44,4; 60,1)
MFI CD16	39,9 (22,9; 54,5)	74,8* (59,6; 79,0)	66,5* (55,9; 79,6)	60,6* (43,73; 74,75)	91,2* <sup>#</sup> (90,8; 111,6)
MFI IFN $\alpha$ / $\beta$ R1	3,4 (2,6; 4,1)	6,1* (5,0; 18,1)	11,2* (7,7; 16,1)	3,2 <sup>•</sup> (2,7; 4,7)	6,4* <sup>#</sup> (5,9; 8,9)
CD16 <sup>+</sup> IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 <sup>+</sup> CD119 <sup>+</sup> НГ					
НГ,%	1,0 (0,4; 1,8)	0,8 (0,5; 1,3)	0,9 (0,8; 2,3)	1,3 (0,7; 2,7)	1,9 (1,7; 2,7)
MFI CD16	39,1 (26,6; 50,3)	77,5* (59,1; 109,0)	66,5* (51,9; 79,6)	80,3* (65,1; 88,3)	91,2* (63,8; 107,0)
MFI IFN $\alpha$ / $\beta$ R1	5,7 (4,1; 13,5)	9,2 (5,8; 12,0)	3,4 (3,1; 3,6)	1,4* <sup>•</sup> (1,3; 1,8)	1,7* <sup>#</sup> (1,6; 1,9)
MFI CD119	3,2 (1,9; 8,8)	2,5 (1,9; 9,0)	3,6 (2,5; 5,0)	7,0 (4,9; 8,1)	7,7* <sup>#</sup> (6,2; 9,1)
<p><i>Примечание:</i>  * - значимость отличий от показателей группы сравнения; <math>p &lt; 0,05</math>;  <sup>^</sup> - значимость отличий показателей ГИ 1a от ГИ 1б; <math>p &lt; 0,05</math>;  <sup>•</sup> - значимость отличий показателей ГИ 1a под влиянием рекИФН<math>\alpha</math>2b от ГИ 1a; <math>p &lt; 0,05</math>  <sup>#</sup> - значимость отличий показателей ГИ 1б под влиянием рекИФН<math>\alpha</math>2b от ГИ 1б; <math>p &lt; 0,05</math>  критерий Манна-Уитни.</p>					

Во всех 3-х субпопуляциях сохранялась высокая плотность экспрессии по MFI CD16 молекул, сопоставимая со значениями до инкубации (Рисунок 5.1.1.2).



Примечание: \* - значимость отличий от показателей группы сравнения;  $p < 0,05$ ;

Λ - значимость отличий показателей ГИ 1а от ГИ 1б;  $p < 0,05$ ;

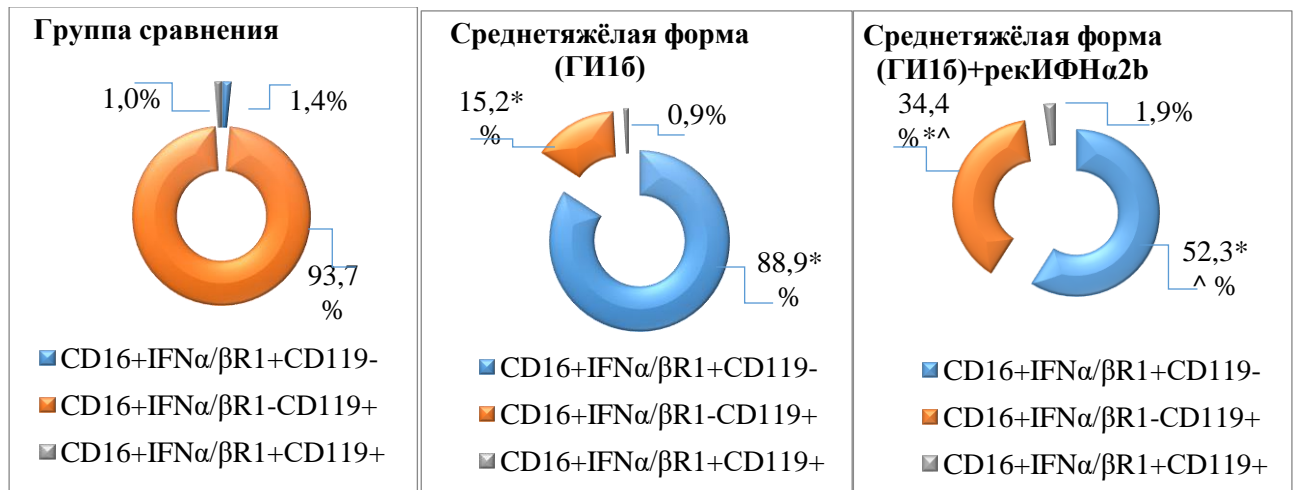
• - значимость отличий показателей ГИ 1а под влиянием рекИФНа2b от ГИ 1а;  $p < 0,05$ ;

# - значимость отличий показателей ГИ 1б под влиянием рекИФНа2b от ГИ 1б;  $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни.

Рисунок 5.1.1.2 – Влияния рекИФНа2b в системе in vitro на фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD16<sup>+</sup>IFNα/βR1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>IFNα/βR1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>IFNα/βR1<sup>+</sup>CD119 при среднетяжёлой форме COVID-19

Наиболее выраженные эффекты влияния рекИФНа2b были установлены в ГИ1б. Наблюдалось увеличение в 2,2 раза количества CD16<sup>+</sup>IFNα/βR1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>НГ ( $p < 0,05$ ), снижение в 1,7 раз доли CD16<sup>+</sup>IFNα/βR1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>НГ ( $p < 0,05$ ). Также

было выявлено увеличение плотности экспрессии CD16 молекул ( $p_{1-3}<0,05$ ) на НГ всех 3 субпопуляций, в 2 раза MFI CD119 на  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+НГ$  и  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+НГ$  ( $p_{1,2}<0,05$ ) (Таблица 5.1.1.1, Рисунок 5.1.1.3).



Примечание: \*- значимость отличий от показателей группы сравнения;  $p<0,05$ ; <sup>^</sup> - значимость отличий показателей ГИ 16 до и после инкубации с рекИФН $\alpha$ 2b;  $p<0,05$ ; критерий Манна-Уитни.

Рисунок 5.1.1.3 – Влияние рекИФН $\alpha$ 2b в системе *in vitro* на количество субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+НГ$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-НГ$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+НГ$  при среднетяжёлой форме COVID-19

Таким образом, проведенное экспериментальное исследование по оценке влияния рекИФН $\alpha$ 2b на фенотип регуляторных субпопуляций НГ  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$  выявило различные позитивные иммуномодулирующие эффекты.

Прежде всего, в системе *in vitro* показано перераспределение соотношения субпопуляций в ГИ16 с гиперактивированными фенотипами: увеличение в 2,2 раза количества  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+НГ$  ( $p<0,05$ ), снижение в 1,7 раз доли  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-НГ$  ( $p<0,05$ ).

Продемонстрировано, что экспозиция с рекИФН $\alpha$ 2b оказывает разнонаправленное влияние на экспрессию изучаемых рецепторов.

Выявлено снижение MFI  $IFN\alpha/\beta R1$ , вероятно, за счет связывания субстанции рекИФН $\alpha 2b$  со своим рецептором и, как следствие, возрастание плотности экспрессии CD119 (в 1,5 раза) молекул, способных воспринимать сигналы и взаимодействовать с  $IFN\gamma$ . При этом, оставались повышенными значения MFI CD16 рецепторов в сравнении с показателями ГС.

Под влиянием рекИФН $\alpha 2b$  выявлено изменение фенотипа субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+НГ$ , определенного до инкубации,  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^-CD119^{mid}НГ$  на фенотип  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^-CD119^{bright}НГ$  в ГИ1б со среднетяжёлой формой COVID-19. При этом, фенотип данной субпопуляции в ГИ1а не изменялся, оставаясь активированным -  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^-CD119^{mid}НГ$  в сравнении с фенотипом ГС  $CD16^{mid}IFN\alpha/\beta R1^-CD119^{dim}НГ$ .

Также, отмечены изменения фенотипа субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-НГ$ , представленного до инкубации с препаратом -  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^{bright}CD119^-НГ$  в ГИ1а и ГИ1б при среднетяжёлой форме COVID-19 на фенотип  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^{dim}CD119^-НГ$ . При этом, следует отметить, что плотность экспрессии  $IFN\alpha/\beta R1$  снижалась до значений, характерных для ГС, однако, уровень CD16 рецепторов оставался высоким и отличался от фенотипа ГС -  $CD16^{mid}IFN\alpha/\beta R1^{dim}CD119^-$ .

Показана перестройка рецепторного оснащения субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+НГ$  с фенотипа в ГИ1а до инкубации  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^{bright}CD119^{dim}НГ$  и в ГИ 1б и  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^{mid}CD119^{dim}НГ$  на фенотип  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^{dim}CD119^{bright}НГ$  против  $CD16^{mid}IFN\alpha/\beta R1^{mid}CD119^{dim}НГ$  в ГС.

Таким образом, полученные нами данные продемонстрировали позитивные эффекты ремодулирующих влияний рекИФН $\alpha 2b$  на количество и фенотип 3 субпопуляций  $НГ CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$  и  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$ , обеспечивающих восприятие и ответ клетки на цитокиновые и интерфероновые сигналы.



### 5.1.2 Эффекты влияния рекИФНа2b на количество и фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> при среднетяжёлой форме COVID-19

Иммунофенотипирование НГ в ПК условно-здоровых лиц ГС и пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19 позволило выявить две субпопуляции нейтрофильных гранулоцитов CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>, которые имеют различную плотность экспрессии (MFI) изучаемых поверхностных мембранных рецепторов, что определяет их фенотип (Таблица 5.1.2.1).

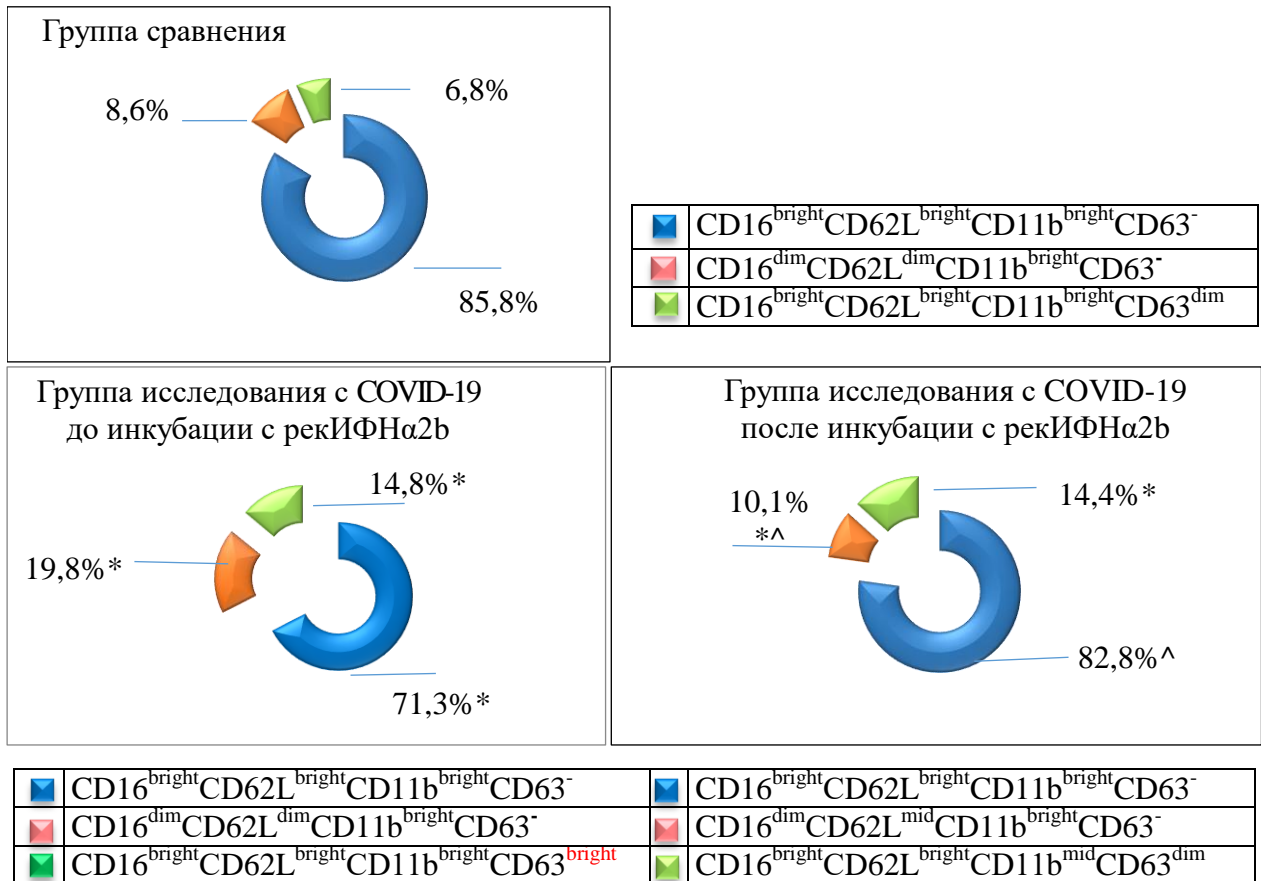
Показано, что в ГС в 85,8 (81,0; 87,9)% НГ представлены субпопуляцией фенотипом CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup> с высоким MFI: CD16 - 131,5 (110,2; 139,3), CD62L - 9,1 (8,3; 9,6) и CD11b - 30,4 (23,5; 38,2) и в 8,6 (7,6; 10,5)% субпопуляцией с фенотипом CD16<sup>mid</sup>CD62L<sup>dim</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup>НГ, которая отличалась более низкими значениями плотности экспрессии рецепторов по MFI: CD16 (в 2,5 раза, p<0,05) и CD62L (в 1,8 раз, p<0,05).

В 6,8 (2,1; 10,7)% случаев регистрировалась субпопуляция, дополнительно экспрессирующая на поверхностной мембране НГ рецептор CD63 – CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>. Данная субпопуляция по плотности экспрессии рецепторов CD16, CD62L, CD11b не отличалась от преобладающей субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ и характеризовалась фенотипом CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>dim</sup> (Таблица 5.1.2.1).

У пациентов с COVID-19 установлено изменение количественного соотношения выявленных субпопуляций CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ, по отношению к значениям ГС: уменьшение в 1,2 раза доли субпопуляции НГ с фенотипом CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup> (p<0,05) за счет увеличения в 2,4 раза субпопуляции НГ с фенотипом CD16<sup>dim</sup>CD62L<sup>dim</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup>НГ (p<0,05) (Рисунок 5.1.2.1).

Таблица 5.1.2.1 – Эффекты влияния реиФНа2b на количество и фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> при среднетяжёлой форме COVID-19 (Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>2</sub>))

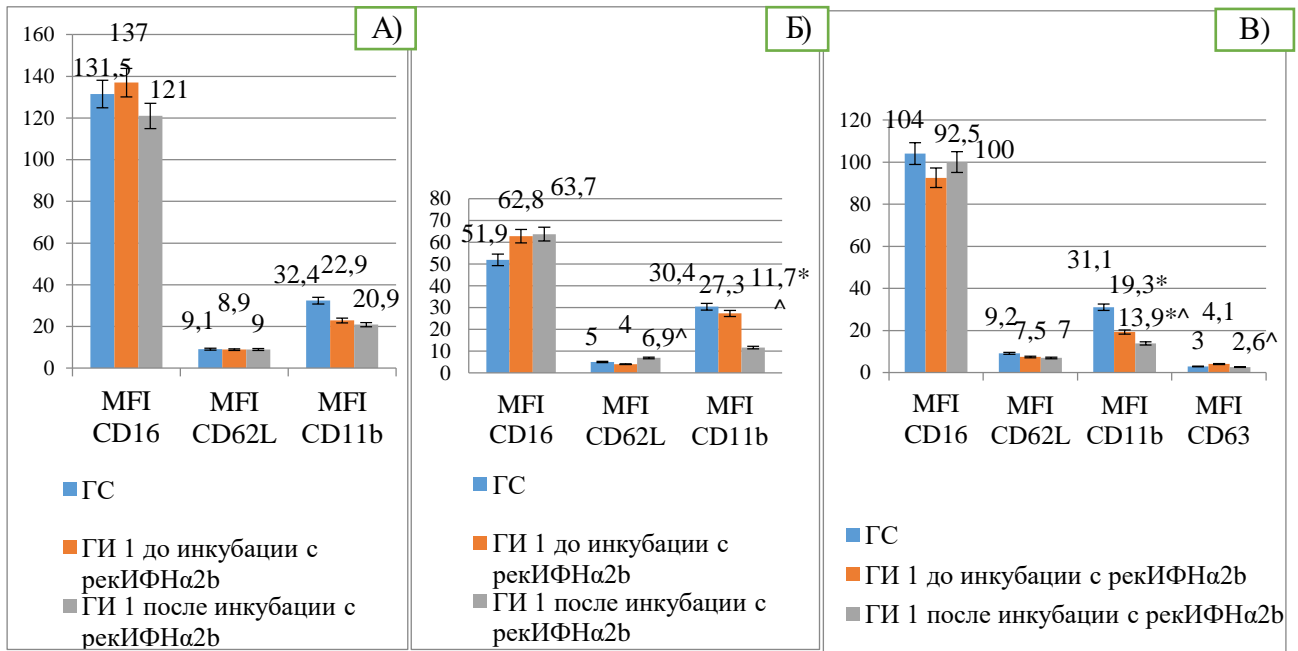
Показатель	ГИ 1 среднетяжёлая форма до инкубации с реиФНа2b, n=45	ГИ 1a среднетяжёлая форма после инкубации с реиФНа2b, n=45	ГС группа сравнения n=30
<b>CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ</b>			
CD16 <sup>bright</sup> CD62L <sup>bright</sup> CD11b <sup>bright</sup> CD63 <sup>-</sup>			
НГ, %	71,3* (68,4; 78,9)	82,8^ (79,8; 96,2)	85,8 (81,0; 87,9)
MFI CD16	137,0 (115,5; 162,8)	121,0 (106,0; 153,0)	131,5 (110,2; 139,3)
MFI CD62L	8,9 (7,4; 10,8)	9,0 (7,4; 12,1)	9,1 (8,3; 9,6)
MFI CD11b	22,9 (19,3; 25,7)	26,3 (20,2; 30,1)	32,4 (24,8; 38,4)
CD16 <sup>dim</sup> CD62L <sup>dim</sup> CD11b <sup>bright</sup> CD63 <sup>-</sup>			
НГ, %	19,8* (13,3; 22,5)	10,1^ (7,1; 11,9)	8,6 (7,6; 10,5)
MFI CD16	62,8 (47,2; 75,0)	63,7 (56,3; 83,0)	51,9 (48,7; 52,4)
MFI CD62L	4,0 (2,9; 4,5)	6,9^ (4,9; 7,1)	5,0 (2,7; 5,8)
MFI CD11b	27,3 (19,9; 31,1)	25,1 (22,2; 27,3)	30,4 (23,5; 38,2)
<b>CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ</b>			
CD16 <sup>bright</sup> CD62L <sup>bright</sup> CD11b <sup>bright</sup> CD63 <sup>dim</sup>			
НГ, %	14,8* (12,0; 20,3)	14,4* (18,4; 36,1)	6,8 (2,1; 10,7)
MFI CD16	92,5 (75,7; 128,0)	100 (75,5; 118,0)	104,0 (97,4; 112,5)
MFI CD62L	7,5 (6,5; 9,1)	7 (4,8; 10,0)	9,2 (7,6; 12,4)
MFI CD11b	19,3 (16,1; 26,1)	13,9*^ (11,4; 21,6)	31,1 (24,3; 36,4)
MFI CD63	4,08* (3,9; 6,5)	2,63^ (2,0; 7,0)	3,0 (2,2; 3,2)
<p>Примечание: *- различия между показателями ГИ1 (среднетяжёлая форма COVID-19 до инкубации с реиФНа2b), ГИ1a (среднетяжёлая форма COVID-19 после инкубации с реиФНа2b) и показателями ГС (группа сравнения); ^- различия между показателями ГИ1 и ГИ1a, p&lt;0,05, критерий Манна-Уитни.</p>			



Примечание: \*- отличия от показателей группы сравнения;  $p < 0,05$ ; ^ - значимость отличий показателей ГИ 1 до и после инкубации с рекИФН $\alpha$ 2b;  $p < 0,05$ ; критерий Манна-Уитни.

Рисунок 5.1.2.1 – Влияние рекИФН $\alpha$ 2b в системе *in vitro* на количество субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> при среднетяжёлой форме COVID-19

Кроме того, в обеих субпопуляциях регистрировались выраженные тенденции усиления плотности экспрессии по MFI CD16 и снижения уровня CD11b рецепторов ( $p_{1,2} > 0,05$ ). Также выявлено повышение в 2,2 раза содержания НГ субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ ( $p < 0,05$ ) с изменённым фенотипом CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>bright</sup> за счет повышения плотности экспрессии молекул CD63 на поверхностной мембране НГ (Таблица 5.1.2.1, Рисунок 5.1.2.2).



Примечание:

\*- значимость отличий от показателей ГС;  $p < 0,05$ ; критерий Манна-Уитни,  
 ^ - значимость отличий показателей GI 1 до и после инкубации с рекИФНа2b;  $p < 0,05$ ;  
 А- субпопуляция с фенотипом  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{-}$ , регистрируемая у исследуемой группы до и после инкубации с рекИФНа2b и группы сравнения,  
 Б- субпопуляция  $CD16^{dim}CD62L^{dim}CD11b^{bright}CD63^{-}$ , характерная для группы сравнения и группы исследования до инкубации с рекИФНа2b и  $CD16^{dim}CD62L^{mid}CD11b^{bright}CD63^{-}$ , после инкубации с рекИФНа2b,  
 В- субпопуляция  $CD16^{+}CD62L^{+}CD11b^{+}CD63^{+}$  с фенотипом  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{dim}$  у группы сравнения, с фенотипом  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{bright}$  до инкубации и  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{mid}CD63^{dim}$  после инкубации с рекИФНа2b.

Рисунок 5.1.2.2 – Изменение плотности экспрессии поверхностных мембранных рецепторов субпопуляций  $CD16^{+}CD62L^{+}CD11b^{+}CD63^{-}$ ,  $CD16^{+}CD62L^{+}CD11b^{+}CD63^{+}$  под влиянием рекИФНа2b в системе *in vitro* при среднетяжёлой форме COVID-19

Под влиянием рекИФНа2b наблюдалось увеличение количества НГ субпопуляции  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{-}$  с 71,3 (68,4; 78,9)% в GI1 (до инкубации) до 82,8 (79,8; 96,2) ( $p < 0,05$ ) и, практически, соответствовало показателям ГС 85,8 (81,0; 87,9) ( $p > 0,05$ ) (Рисунок 5.1.2.1). При этом, по значениям медиан выявлялись выраженные тенденции снижения MFI CD16 и повышения MFI CD11b рецепторов ( $p_{1,2} > 0,05$ ) (Таблица 5.1.2.1, Рисунок 5.1.2.2).

В тоже время, под влиянием рекИФН $\alpha$ 2b отмечалось не только снижение количества НГ субпопуляции CD16<sup>dim</sup>CD62L<sup>dim</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup> до показателей ГС ( $p > 0,05$ ), но и изменение ее фенотипа на CD16<sup>dim</sup>CD62L<sup>mid</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup> за счет статистически значимого увеличения плотности экспрессии CD62L рецептора в сравнении со значениями до инкубации с препаратом ( $p < 0,05$ ) (Таблица 5.1.2.1).

Количество НГ субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> под влиянием рекИФН $\alpha$ 2b не отличалось от значений до инкубации ( $p > 0,05$ ) и оставалось выше в 2 раза показателей ГС ( $p < 0,05$ ). Было отмечено уменьшение плотности экспрессии CD11b, CD63 рецепторов и изменение фенотипа субпопуляции на CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>mid</sup>CD63<sup>dim</sup> против CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>bright</sup>, регистрируемого до инкубации. Выявленное под влиянием рекИФН $\alpha$ 2b снижение уровня экспрессии CD63, вероятно, позволяет сохранить НГ от преждевременной спонтанной дегрануляции.

Таким образом, в эксперименте *in vitro* получены модулирующие эффекты влияния рекИФН $\alpha$ 2b на субпопуляции, обеспечивающие включение клетки в воспалительный процесс.

Установлено повышение уровня субпопуляции НГ с фенотипом CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>dim</sup> до показателей ГС ( $p > 0,05$ ) на фоне уменьшения доли субпопуляции НГ CD16<sup>dim</sup>CD62L<sup>mid</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup>, обладающих супрессивными свойствами, а также снижение агрессивного потенциала субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> за счет снижения плотности экспрессии CD11b и CD63 молекул, способных запускать процессы дегрануляции НГ и NETоз.

### 5.1.3 Влияние рекИФН $\alpha$ 2b на эффекторные функции нейтрофильных гранулоцитов при среднетяжёлой форме COVID-19

На фоне выявленных негативных трансформаций фенотипа и изменения содержания и функционально-значимых субпопуляций НГ при среднетяжёлой (ГИ1) форме COVID-19 были выявлены нарушения их эффекторных функций.

Так, при оценке фагоцитарной активности было показано снижение в 1,3 раза доли активно фагоцитирующих НГ (%ФАН,  $p < 0,05$ ), показателей, характеризующих функции захвата антигена, в 1,7 раз ФЧ и ФИ ( $p_{1,2} < 0,05$ ) и киллинговой способности НГ- в 1,4 раза %П ( $p < 0,05$ ) и 2,7 раз ИП ( $p < 0,05$ ) на фоне увеличения содержания НГ, образующих NETs, до 13,7 (8,0; 16,7)% против 1,0 (0; 1,0)% в ГС и НГ в состоянии апоптоза до 12,3 (10,9; 19,1) против 2,0 (2,0; 4,0) в ГС ( $p < 0,05$ ) (Таблица 5.1.4.1).

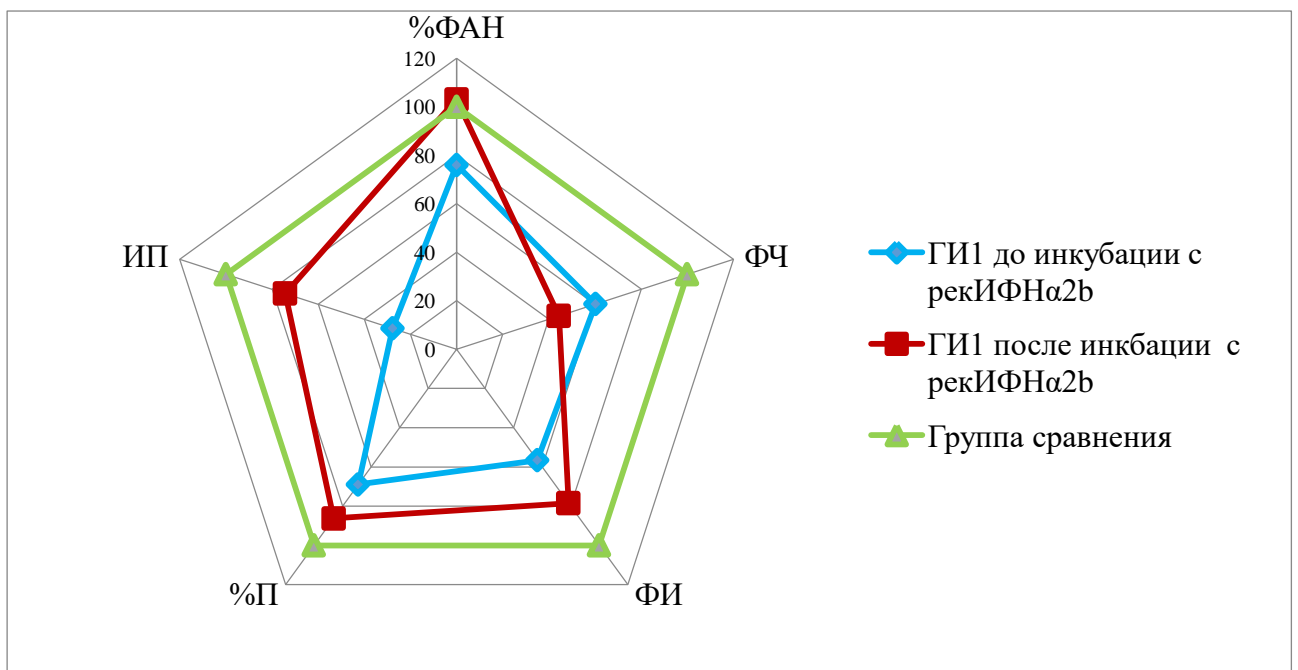
Таблица 5.1.4.1 – Эффекты влияния рекИФН $\alpha$ 2b на эффекторные функции нейтрофильных гранулоцитов при среднетяжёлой форме COVID-19 (Ме ( $Q_1$ ;  $Q_2$ ))

Показатели	Группа сравнения n=30	Среднетяжёлая форма течения COVID-19 n=45	
		ГИ 1 до инкубации с рекИФН $\alpha$ 2b	ГИ 1 после инкубации с рекИФН $\alpha$ 2b
%ФАН	65,8 (60,9; 79,6)	50,0 (46,5; 55,1)*	67,0 (58,5; 71,0)^
ФЧ	6,3 (4,6; 6,8)	3,8 (2,5; 3,9)*	2,8 (2,3; 3,8)*
ФИ	4,3 (3,9; 4,4)	2,5 (2,1; 3,4)*	3,41 (2,5; 3,7)*
%П	58,9 (51,3; 65,0)	40,9(40,5; 41,7)*	50,0(40,9;53,6)^
ИП	2,6 (2,1; 3,4)	0,7 (0,6; 0,7)*	1,9 (0, 9; 2,0)*^
НВТ-тест сп	СЦИсп	0,09 (0,06; 0,1)	0,4 (0,2; 0,4)*
	%ФПКсп	2,4 (2,3; 3,5)	14,0 (10,7; 19,9)*
НВТ-тест ст	СЦИст	0,2 (0,08; 0,3)	0,6 (0,2; 0,7)
	%ФПКст	5,5 (2,8; 6,3)	15,1 (9,3; 22,0)*
КМ(%ФПКст/%ФПКсп)	1,8 (1,3;1,9)	1,1 (1,0; 1,3)*	1,3 (1,2; 1,4)
NETs	1,0 (0; 1,0)	13,7 (8,0; 16,7)*	10,0 (8,0; 12,0)*
Клетки в апоптозе	2,0 (2,0; 4,0)	12,3 (10,9; 19,1)*	6,0 (4,0; 7,0)*^

*Примечание: различия от показателей группы сравнения; л - различия показателей ГИ1 до инкубации от ГИ1а, после инкубации с рекИФН $\alpha$ 2b;  $p < 0,05$ ; критерий Манна- Уитни*

Также в ГИ1 отмечалось усиление спонтанной и стимулированной активности NADPH-оксидаз как по % ФПКсп-14,0 (10,7; 19,9)% и % ФПКст-15,1 (9,3; 22,0)% против %ФПКсп - 2,4 (2,3; 3,5) и %ФПКст - 5,5(2,8; 6,3) в ГС ( $p_{1,2}<0,05$ ), так и по СЦИсп – 0,4 (0,2; 0,4), СЦИст- 0,6 (0,2; 0,7) против СЦИсп - 0,09 (0,06; 0,1), СЦИст - 0,2 (0,08; 0,3) ( $p<0,05$ ), с сохранением резервного микробицидного потенциала, о чем свидетельствует КМ-1,1 (1,0; 1,3) ( $p_{1,2}<0,05$ ) (Таблица 5.1.4.1).

Под влиянием реКИФН $\alpha$ 2b *in vitro* наблюдались выраженные тенденции восстановления фагоцитарной функции НГ. Выявлено значимое увеличение %ФАН и %П до показателей ГС ( $p_{1,2}<0,05$ ), повышение ФИ и ИП ( $p_{1,2}<0,05$ ) по отношению к значениям ГИ1 до инкубации, не достигающее показателей ГС (Таблица 5.1.4.1, Рисунок 5.1.4.1).

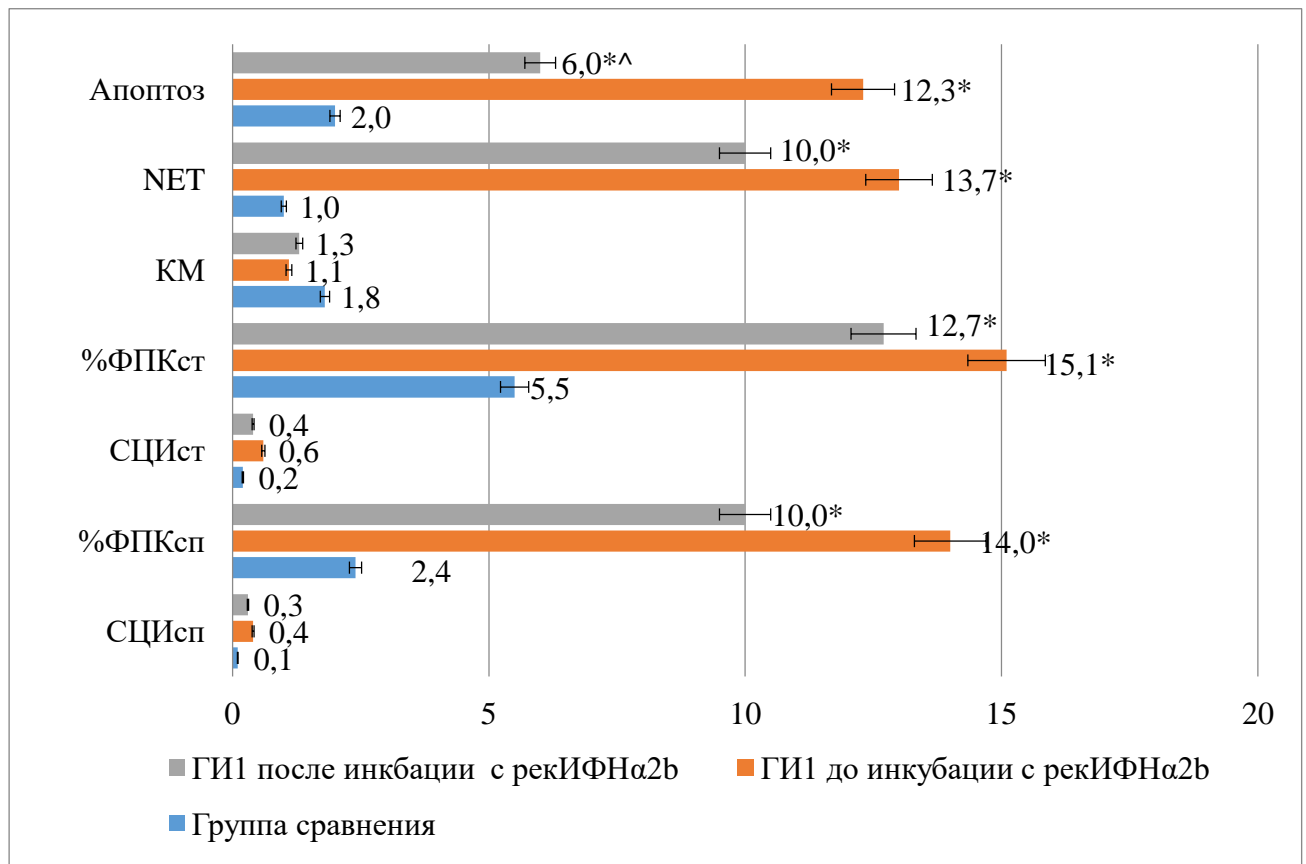


Примечание: \* - значимость отличий от показателей группы сравнения;  $p<0,05$ ;  
 л - значимость отличий показателей ГИ 1 до инкубации от ГИ 1, после инкубации с реКИФН $\alpha$ 2b;  $p<0,05$ , критерий Манна-Уитни

Рисунок 5.1.4.1 – Изменение показателей фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов пациентов с среднетяжелой формой COVID-19 под влиянием реКИФН $\alpha$ 2b в системе *in vitro*

При этом, NADPH-оксидазная активность сохранялась на высоком уровне (Рисунок 5.1.4.2). Было установлено незначительное снижение показателей %ФПК в спонтанном и стимулированном NBT- тесте по сравнению с данными до инкубации, что было выше значений ГС ( $p_1 < 0,05$  и  $p_2 < 0,05$ , соответственно).

Важно отметить, что инкубация с рекИФН $\alpha$ 2b не повлияла на количество НГ, образующих NETs, и не индуцировала апоптоз (Таблица 5.1.4.1, Рисунок 5.1.4.2).



Примечание: \*- значимость отличий от показателей группы сравнения;  $p < 0,05$ ;  
 ^ - значимость отличий показателей ГИ 1 до инкубации от ГИ 1, после инкубации с рекИФН $\alpha$ 2b;  $p < 0,05$ ; критерий Манна- Уитни.

Рисунок 5.1.4.2 – Иммуномодулирующие эффекты рекИФН $\alpha$ 2b на состояние микробицидной активности нейтрофильных гранулоцитов пациентов с COVID-19 в системе *in vitro*

Таким образом, при экспериментальном исследовании в системе *in vitro* установлены иммуномодулирующие эффекты рекИФН $\alpha$ 2b на негативно трансформированные фенотипы функционально-значимых субпопуляций НГ при



среднетяжёлой форме COVID-19, проявляющийся в переориентации НГ с их провоспалительных фенотипов в противовоспалительные, что способствует восстановлению функциональной активности НГ: %ФАН, функций переваривания и поддержания напряженности NADPH-оксидаз, необходимых для реализации ответа на инфекционный процесс, сдерживание спонтанной дегрануляции.

Полученные экспериментальные данные подтверждают факт позитивного влияния рекИФН $\alpha$ 2b на количественные и фенотипические характеристики субпопуляций НГ, их эффекторные функции, что обосновывает целесообразность его использования в лечении пациентов со среднетяжёлым течением COVID-19 и внедрения в клиническую практику.

## **5.2 Эффекты гексапептида - аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина на нейтрофильные гранулоциты при среднетяжёлом течении COVID-19 в системе *in vitro***

Синтетический аналог активного центра гормона тимуса тимопоэтина - Гексапептид (ГП), обладает всеми биологическими активностями нативного гормона тимуса [14].

ГП оказывает иммуномодулирующее действие на дефектно функционирующую ИС, восстанавливая численность и функциональную активность Т-лимфоцитов, усиливая фагоцитоз НГ и моноцитов, регулирует синтез цитокинов. Известны гепатопротекторные, антиоксидантные свойства ГП, а также способность усиливать эффективность антибактериальной терапии, ингибировать множественную лекарственную устойчивость организма [3, 4], при этом, его действие на НГ при COVID-19 остается не изученным.

Особый интерес представляет, с нашей точки зрения, оценка субпопуляций НГ, которые отвечают за запуск и регуляцию противовирусного

иммунитета, и субпопуляций, которые обеспечивают эффекторные фагоцитарные и микробицидные свойства НГ.

Для оценки эффектов влияния ГП на фенотип и содержание функционально-значимых субпопуляций НГ при среднетяжёлой форме COVID-19 в эксперименте *in vitro* проведено исследование образцов ПК больных со среднетяжёлой формой заболевания в остром периоде COVID-19.

В системе *in vitro* образцы ПК 45 пациентов (ГИ1) инкубировали с ГП ( $10^6$ г/л) 60 мин при температуре 37°C – группа исследования 1+ГП (ГИ1+ГП).

Оценивали количество НГ, % субпопуляций:  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$ ,  $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^-$ ,  $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^+$  и фенотип по плотности экспрессии (MFI) мембранных рецепторов с соответствующими МкАТ:  $IFN\alpha\beta R1$ -FITC, CD119-PE, CD16 - ECD, CD16 - PE, CD62L - FITC, CD63 - ECD, CD11b -PC5; фагоцитарную активность НГ по отношению к *S.aureus*, активность NADPH-оксидаз определяли в NBT-спонтанном и NBT-стимулированном *S.aureus* тесте. Определяли показатели до и после инкубации с ГП. Группа сравнения (ГС) сформирована из показателей 30 добровольцев 58(57; 70) лет, обследованных в доковидный период.

### **5.2.1 Эффекты влияния гексапептида на количество и фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов, экспрессирующих рецепторы к IFN I и II типов, CD16 при среднетяжёлой форме COVID-19**

В ПК ГС регистрируются субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ НГ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ НГ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$ НГ, экспрессирующие рецепторы к IFN I и II типов. Показано, что субпопуляция  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ НГ является преобладающей, доля ее составляет 93,7 (89,8; 96,5)% НГ с плотностью экспрессии по MFI CD16 – 39,8(20,4; 51,3) и  $CD119^+(IFN\gamma) - 2,8 (2,5; 3,1)$ , что определяет фенотип  $CD16^{mid}IFN\alpha/\beta R1^-CD119^{dim}$ .

Субпопуляция НГ  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$  представлена 1,4 (0,5; 2,3)% НГ с плотностью экспрессии по MFI  $IFN\alpha/\beta R1$  – 3,4 (2,6; 4,1) и MFI  $CD16$  – 39,9 (22,9; 54,5) с фенотипом  $CD16^{mid}IFN\alpha/\beta R1^{dim}CD119^-$  (Таблица 5.2.1.1).

Таблица 5.2.1.1 – Эффекты влияния гексапептида на содержание и фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов, экспрессирующих рецепторы к  $IFN$  I и II типов, у пациентов среднетяжёлой формы течения COVID-19 (Ме ( $Q_1$ ;  $Q_2$ ))

Показатели	Группа сравнения	Среднетяжёлая форма течения COVID-19			
		ГИ1 до инкубации с ГП		ГИ1 после инкубации с ГП	
		ГИ1а, n=36	ГИ1б, n=9	ГИ1а, n=36	ГИ1б, n=9
<b><math>CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+HG</math></b>					
НГ,%	93,7 (89,8; 96,5)	95,6 (92,0; 98,2)	15,8* <sup>^</sup> (14,8; 16,5)	94,9 (93,0; 97,0)	16,8* <sup>#</sup> (16,6; 17,0)
MFI $CD16$	39,8 (20,4; 51,3)	79,0* (59,2; 91,4)	67,5* (53,2; 79,7)	24,8 <sup>•</sup> (20,9; 32,1)	13,7 <sup>#</sup> (8,3; 17,4)
MFI $CD119$	2,8 (2,5; 3,1)	3,6* (3,3; 4,3)	3,4* (3,2; 3,6)	2,0 (2,3; 4,2)	6,6* <sup>#</sup> (5,9; 7,4)
<b><math>CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-HG</math></b>					
НГ,%	1,4 (0,5; 2,4)	1,2 (0,6; 1,9)	88,9* <sup>^</sup> (81,7; 92,7)	2,2 (1,4; 4,0)	82,1* (32,4; 90,1)
MFI $CD16$	39,9 (22,9; 54,5)	74,8* (59,6; 109,0)	66,5* (55,9; 79,6)	24,8 <sup>•</sup> (20,2; 32,1)	68,7* (52,5; 73,8)
MFI $IFN\alpha/\beta$	3,4 (2,6; 4,1)	6,1* (5,0; 18,1)	11,22* (7,7; 16,1)	3,7 <sup>•</sup> (2,6; 5,0)	3,8 <sup>#</sup> (2,3; 5,1)
<b><math>CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+HG</math></b>					
НГ,%	1,0 (0,4; 1,8)	2,8 (1,5; 3,0)	0,9 (0,8; 2,3)	0,4 <sup>•</sup> (0,2; 0,5)	2,6 (1,7; 7,6)
MFI $CD16$	39,1 (26,6; 50,3)	77,5* (59,1; 109,0)	66,5* (51,9; 79,6)	40,3 (35,0; 48,0)	80,5 (63,8; 107)
MFI $IFN\alpha/\beta$	5,7 (4,6; 6,5)	9,2* (7,8; 12,0)	3,4* <sup>^</sup> (3,1; 3,6)	13,7* (8,3; 17,4)	1,72* (1,58; 1,86)
MFI $CD119$	3,2 (2,9; 5,8)	2,5 (1,7; 9,0)	3,7 (2,5; 5,0)	6,6* (5,9; 7, 4)	7,7 <sup>#</sup> (6,1; 9,1)
<p>Примечание: * - значимость отличий от группы сравнения; <math>p &lt; 0,05</math>; критерий Манна – Уитни.  <sup>^</sup> - значимость отличий показателей ГИ 1а от ГИ 1б; <math>p &lt; 0,05</math>;  <sup>•</sup> - значимость отличий показателей ГИ 1а под влиянием ГП от ГИ 1а; <math>p &lt; 0,05</math>  <sup>#</sup> - значимость отличий показателей ГИ 1б под влиянием ГП от ГИ 1б; <math>p &lt; 0,05</math></p>					

Субпопуляция НГ, одновременно экспрессирующая рецепторы к  $IFN\alpha/\beta$  и  $IFN\gamma$  с высокой плотностью,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$  составила 0,9 (0,4; 1,8)% НГ и имела фенотип  $CD16^{mid}IFN\alpha/\beta R1^{mid}CD119^{mid}$  (Таблица 5.2.1.1).

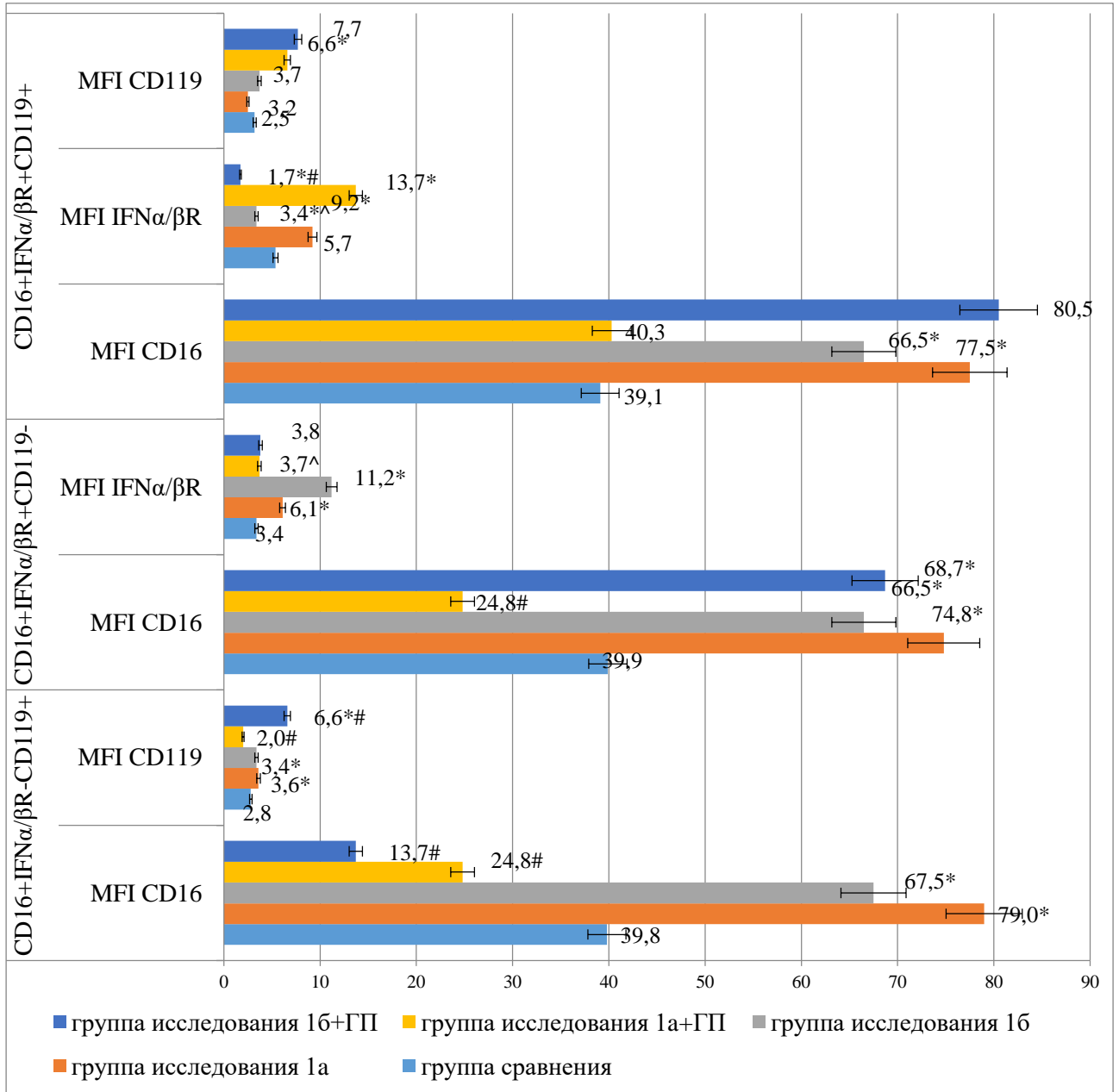
В ГИ1 со среднетяжелой формой течения COVID-19 в 76% случаев (ГИ1а, n=36) содержание НГ изучаемых субпопуляций значимо не отличалось от ГС ( $p>0,05$ ), при этом, установлено изменение их фенотипов.

Выявлено повышение MFI  $CD16$  в 2 раза во всех 3 субпопуляциях ( $p_{1-3}<0,05$ ), MFI  $CD119$  в 1,3 раза ( $p<0,05$ ) в субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$  НГ, MFI  $IFN\alpha/\beta R1$  в 1,8 раз в субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$  НГ ( $p<0,05$ ) и в 1,6 раз в субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$  НГ ( $p<0,05$ ) (Таблица 5.2.1.1).

Выявленные изменения характеризуются фенотипами  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^-CD119^{mid}$  НГ,  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^{mid}CD119^-$  НГ,  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^{bright}CD119^{mid}$  НГ.

При этом, в 24% случаев в ГИ1б (n=9) отмечалось увеличение в 63 раза содержания НГ субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$  до 88,95(81,73; 92,65)% против 1,4 (0,53; 2,35)% в ГС и 1,2 (0,6; 1,9)% в ГИ1а ( $p_{1,2}<0,05$ ) и снижение в 15 раз НГ субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$  - с трансформацией фенотипов в субпопуляции  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^-CD119^{mid}$  НГ, аналогичной наблюдаемой в ГИ1а, и  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^{bright}CD119^-$  НГ с повышенным в 3 раза ( $p<0,05$ ) MFI  $IFN\alpha/\beta R1$  (Рисунок 5.2.1.1).

Врожденные противовирусные ответы в значительной степени контролируются  $IFN$  I типа, передающими сигналы через  $IFNAR$ . Повышенные уровни экспрессии рецепторов к  $IFNs$  демонстрируют готовность НГ к восприятию цитокиновых сигналов и ответа на них. Однако, учитывая, что  $IFNs$  типа I усиливают NETosis [233], возможно предположить, что значительное повышение экспрессии рецепторов, отмечаемое в ГИ1б, может усугубить нейтрофильную инфильтрацию и нетоз.



Примечание: \*- значимость отличий от группы сравнения;  $p < 0,05$ ;

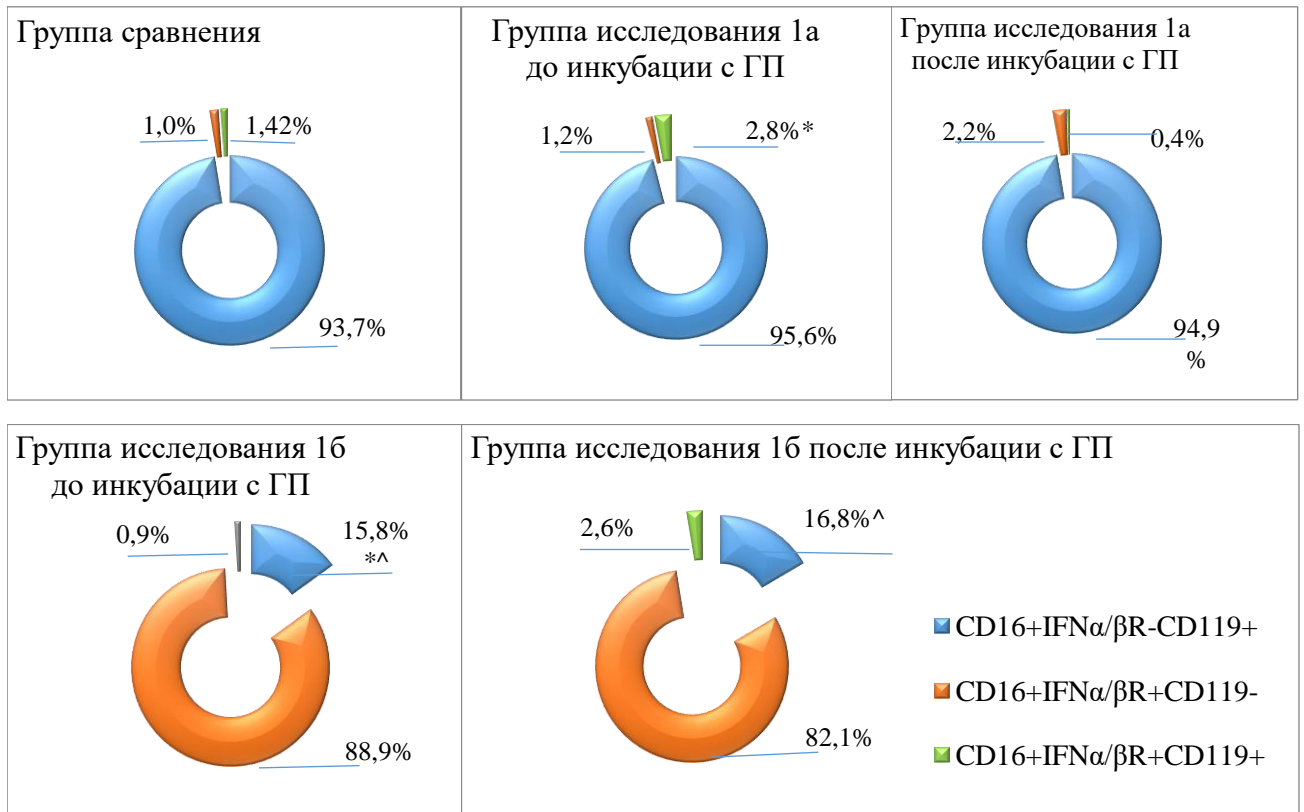
Δ - значимость отличий показателей ГИ 1a от ГИ 16;  $p < 0,05$ ;

• - значимость отличий показателей ГИ 1a под влиянием ГП от ГИ 1a;  $p < 0,05$

# - значимость отличий показателей ГИ 16 под влиянием ГП от ГИ 16;  $p < 0,05$ , критерий Манна- Уитни.

Рисунок 5.2.1.1 – Эффекты влияния гексапептида на фенотип субпопуляций  $CD16^+IFN\alpha/\beta R^+CD119^-$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R^+CD119^+$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R^-CD119^-$  нейтрофильных гранулоцитов пациентов среднетяжелой формы течения COVID-19

Инкубация *in vitro* НГ ПК пациентов с COVID-19 с ГП не влияла на количество НГ изучаемых субпопуляций (Рисунок 5.2.1.2).



Примечание:

\*- значимость отличий от показателей группы сравнения;  $p < 0,05$ ;

^ - значимость отличий показателей ГИ 1а от ГИ 1б;  $p < 0,05$ ;

• - значимость отличий показателей ГИ 1а под влиянием ГП от ГИ 1а;  $p < 0,05$

# - значимость отличий показателей ГИ 1б под влиянием ГП от ГИ 1б;  $p < 0,05$ , критерий Манна- Уитни.

Рисунок 5.2.1.2 – Эффекты влияния гексапептида на количество нейтрофильных гранулоцитов субпопуляций CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup> у пациентов среднетяжёлой формы течения COVID-19

При этом, были выявлены модулирующие эффекты в отношении их фенотипа как в ГИ1а, так и ГИ1б.

В ГИ1а установлено снижение в 3,2 раза плотности экспрессии по MFI CD16 ( $p < 0,05$ ) и в 1,8 раз MFI CD119 ( $p < 0,05$ ) до значений ГС ( $p > 0,05$ ) в субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>, что способствовало восстановлению фенотипа субпопуляций CD16<sup>mid</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R<sup>-</sup>CD119<sup>dim</sup>НГ. Уменьшение MFI CD16 ( $p < 0,05$ ) и MFI IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 ( $p < 0,05$ ) рецепторов на НГ субпопуляции

CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>НГ до значений ГС ( $p_{1,2}>0,05$ ) до фенотипа CD16<sup>mid</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>dim</sup>CD119<sup>-</sup>.

В ГИ1б на НГ субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup> наблюдалось снижение в 4,9 раз MFI CD16 ( $p<0,05$ ) и повышение в 2 раза MFI CD119 ( $p<0,05$ ), что способствовало изменению фенотипа на CD16<sup>mid</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>-</sup>CD119<sup>dim</sup>НГ. Также выявлено уменьшение в 3 раза плотности экспрессии MFI IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 ( $p<0,05$ ) на НГ субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup> НГ с фенотипом CD16<sup>mid</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>dim</sup>CD119<sup>-</sup>НГ (Таблица 5.2.1.1).

Эффекты влияния ГП в ГИ1а на фенотип субпопуляций CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>НГ заключались в снижении MFI CD16 ( $p<0,05$ ) и повышении MFI IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 и MFI CD119 ( $p_{1,2}<0,05$ ) - CD16<sup>mid</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>bright</sup>CD119<sup>bright</sup>. При этом, в ГИ1б выявлено снижение MFI IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 ( $p<0,05$ ), увеличение MFI CD119 ( $p>0,05$ ), а плотность экспрессии CD16 не отличалась от значений, регистрируемых в ГИ1а пациентов с COVID-19 ( $p>0,05$ ) - CD16<sup>bright</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>dim</sup>CD119<sup>mid</sup> (Таблица 5.2.1.1, Рисунок 5.2.1.2).

Таким образом, *in vitro* показано положительное влияние гексапептида на фенотипы функционально-значимых субпопуляций, активно участвующих в противовирусной защите, и функции НГ при COVID-19 среднетяжёлой формы течения: показаны модулирующие эффекты, которые способствовали восстановлению фенотипа регуляторных субпопуляций, экспрессирующих рецепторы к IFN I и II типов.

### **5.2.2 Эффекты влияния гексапептида на количество и фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> при среднетяжёлой форме COVID-19**

Сравнительное изучение образцов ПК условно-здоровых лиц ГС и пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19 (ГИ1) позволило выявить субпопуляции нейтрофильных гранулоцитов, с различной плотностью (MFI)

экспрессирующие поверхностные мембранные CD16, CD62L, CD11b, CD63 рецепторы: CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> (Таблица 5.2.2.1).

Так в ГС в 85,8 (81,0; 87,9)% случаев НГ были представлены субпопуляцией с высокой плотностью экспрессии рецепторов по MFI: CD16 - 131,5 (110,2; 139,3), CD62L - 9,1 (8,3; 9,6) и CD11b - 30,4 (23,5; 38,2) – с фенотипом CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup>, не экспрессирующей на поверхностной мембране CD63 молекулы (Таблица 5.2.2.1).

Также в 8,6 (7,6; 10,5)% случаев были определены НГ с фенотипом CD16<sup>dim</sup>CD62L<sup>dim</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup>НГ, отличающиеся более низкими значениями плотности экспрессии рецепторов по MFI: CD16 (в 2,5 раза, p<0,05) и CD62L (в 1,8 раз, p<0,05). Кроме того, в 6,8 (2,1; 10,7)% случаев была выявлена субпопуляция, экспрессирующая на поверхностной мембране НГ CD63 рецептор – с фенотипом CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>dim</sup>, по плотности экспрессии рецепторов CD16, CD62L, CD11b не отличающаяся от субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ (Таблица 5.2.2.1).

У пациентов ГИ1 со среднетяжёлой формой COVID-19 отмечалось уменьшение в 1,2 раза доли субпопуляции НГ с фенотипом CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup> (p<0,05) и увеличения в 2,4 раза субпопуляции НГ с фенотипом CD16<sup>mid</sup>CD62L<sup>dim</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup>НГ (p<0,05) по отношению к значениям ГС (Рисунок 5.2.2.1).

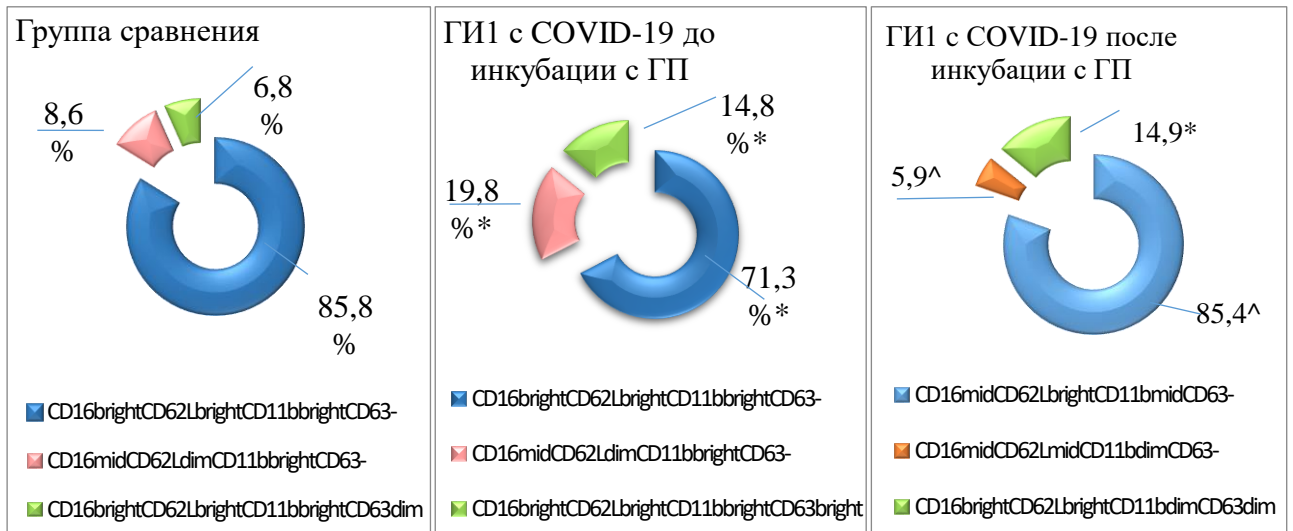
Обе субпопуляции отличались от выявленных в ГС более высокими уровнями плотности экспрессии по MFI CD16 и сниженными CD11b рецепторов (p<sub>1,2</sub>>0,05).

Также в ГИ1 было установлено повышение в 2,2 раза содержания НГ субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ (p<0,05) с изменённым фенотипом CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>bright</sup> с высокой плотностью экспрессии молекул CD63 на поверхностной мембране НГ (Таблица 5.2.2.1, Рисунок 5.2.2.1).



Таблица 5.2.2.1 – Эффекты влияния гексапептида на количество и фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> при среднетяжёлой форме COVID-19 (Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>2</sub>))

Показатель	ГС группа сравнения, n=30	ГИ 1 среднетяжёлая форма до инкубации с ГП, n=45	ГИ 1a среднетяжёлая форма после инкубации с ГП, n=45
<b>CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ</b>			
	CD16 <sup>bright</sup> CD62L <sup>bright</sup> CD11b <sup>bright</sup> CD63 <sup>-</sup>	CD16 <sup>mid</sup> CD62L <sup>bright</sup> CD11b <sup>mid</sup> CD63 <sup>-</sup>	
НГ,%	85,8 (81,0; 87,9)	71,3* (68,4; 78,9)	85,4^ (79,3; 95,5)
MFI CD16	131,5 (110,2; 139,3)	137 (115,5; 162,8)	104,0^ (73,3; 107,2)
MFI CD62L	9,1 (8,3; 9,6)	8,9 (7,4; 10,8)	10,7 (9,6; 11,9)
MFI CD11b	32,4 (24,8; 38,4)	22,9 (19,3; 25,7)	17,6^ (13,6; 20,5)
	CD16 <sup>dim</sup> CD62L <sup>dim</sup> CD11b <sup>bright</sup> CD63 <sup>-</sup>	CD16 <sup>dim</sup> CD62L <sup>mid</sup> CD11b <sup>dim</sup> CD63 <sup>-</sup>	
НГ,%	8,6 (7,6; 10,5)	19,8* (13,3; 22,5)	5,9^ (4,2; 7,3)
MFI CD16	51,9 (48,7; 52,4)	62,8 (47,2; 75,0)	63,7 (51,9; 74,9)
MFI CD62L	5,0 (2,7; 5,8)	4,0 (2,9; 4,5)	7,8^ (6,1; 8,3)
MFI CD11b	30,4 (23,5; 38,2)	27,3 (19,9; 31,1)	10,7^ (8,84; 15,3)
<b>CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ</b>			
	CD16 <sup>bright</sup> CD62L <sup>bright</sup> CD11b <sup>bright</sup> CD63 <sup>dim</sup>	CD16 <sup>bright</sup> CD62L <sup>bright</sup> CD11b <sup>bright</sup> CD63 <sup>bright</sup>	CD16 <sup>bright</sup> CD62L <sup>bright</sup> CD11b <sup>dim</sup> CD63 <sup>dim</sup>
НГ,%	6,8 (2,1; 10,7)	14,8* (12,0; 20,3)	14,9 (8,5; 28,3)
MFI CD16	104 (97,4; 112,5)	92,5 (75,7; 128,0)	86,6 (63,7; 100,7)
MFI CD62L	9,2 (7,6; 12,4)	7,5 (6,5; 9,1)	9,2 (5,2; 10,6)
MFI CD11b	31,1 (24,3; 36,4)	19,3 (16,1; 26,1)	11,7^ (10,4; 17,8)
MFI CD63	3 (2,2; 3,2)	4,08* (3,9; 6,5)	3,8 (2,3; 6,9)
<p>Примечание: *- различия между показателями ГИ1 (среднетяжелая форма COVID-19 до инкубации с ГП), ГИ 1a (среднетяжелая форма COVID-19 после инкубации с ГП) и показателями ГС (группа сравнения); ^- различия между показателями ГИ1 и ГИ1a, p&lt;0,05 критерий Манна- Уитни..</p>			



Примечание: \*- различия между показателями ГИ1 (среднетяжёлая форма COVID-19 до инкубации с ГП), ГИ 1a (среднетяжёлая форма COVID-19 после инкубации с ГП) и показателями ГС (группа сравнения); ^- различия между показателями ГИ1 и ГИ1a,  $p < 0,05$ , критерий Манна - Уитни

Рисунок 5.2.2.1 – Эффекты влияния гексапептида на количество и фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> при среднетяжёлой форме COVID-19

Под влиянием ГП наблюдалось изменение как количества, так и фенотипа 2 субпопуляций CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ. Выявлено увеличение в 1,2 раза количества НГ основной субпопуляции до 85,4 (79,3; 95,5) против 71,3 (68,4; 78,9)% в ГИ1 (до инкубации) ( $p < 0,05$ ), что не отличалось от показателей ГС ( $p > 0,05$ ). При этом, на фоне снижения в 1,3 раза MFI CD16 и CD11b рецепторов ( $p_{1,2} < 0,05$ ) менялся ее фенотип на CD16<sup>mid</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>mid</sup>CD63<sup>-</sup> (Рисунок 5.2.2.1). Параллельно отмечалось снижение в 3,4 раза количества НГ субпопуляции с фенотипом CD16<sup>mid</sup>CD62L<sup>mid</sup>CD11b<sup>dim</sup>CD63<sup>-</sup> с более высоким уровнем плотности экспрессии CD62L и низким MFI CD11b молекул (Таблица 5.2.2.1, Рисунок 5.2.2.2).

ГП в системе *in vitro* не оказывал влияния на количество НГ субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ ( $p > 0,05$ ). Однако, было выявлено изменение ее фенотипа - CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>dim</sup>CD63<sup>dim</sup> за счет снижения на НГ этой

субпопуляции плотности экспрессии CD11b и CD63 рецепторов относительно значений ГИ1 до инкубации с ГП.

Известно, что активированные НГ обладают высоким цитотоксическим и протеолитическим потенциалом, а также способностью повреждать ткани [18, 38].

Установлено, что эффекты влияния ГП в изучаемых субпопуляциях проявляются снижением плотности экспрессии молекул CD16 и CD11b, CD63 молекул, отвечающих за антителозависимую клеточную цитотоксичность, запуск каскада внутриклеточных сигнальных адаптерных структур, которые вызывают регулируемую дегрануляцию НГ, усиление активности NADPH-оксидаз [109, 264].

Таким образом, показано, что гексапептид в эксперименте *in vitro* модулирует фенотипы субпопуляций  $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^-$  НГ и  $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^+$  НГ различными механизмами, снижая их гиперактивированный цитотоксический функциональный потенциал, индуцированный SARS-CoV-2.

### **5.3 Влияние гексапептида на эффекторные функции нейтрофильных гранулоцитов при среднетяжёлой форме COVID-19**

Изменения содержания и фенотипа функционально-значимых субпопуляций НГ, которые обеспечивают полноценное осуществление клеткой эффекторных функций при среднетяжёлой (ГИ1) форме COVID-19, проявлялись дефектами фагоцитарной и микробицидных функций.

При оценке фагоцитарной активности в ГИ1 было выявлено снижение в 1,3 раза доли активно фагоцитирующих НГ (%ФАН,  $p < 0,05$ ), показателей, характеризующих функции захвата антигена, в 1,7 раз ФЧ и ФИ ( $p_{1,2} < 0,05$ ) и киллинговой и переваривающей способности НГ в 1,4 раза %П ( $p < 0,05$ ) и 2,7 раз ИП ( $p < 0,05$ ). (Таблица 5.3.1).

Таблица 5.3.1 – Эффекты влияния гексапептида на эффекторные функции нейтрофильных гранулоцитов при среднетяжёлой форме COVID-19 (Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>2</sub>))

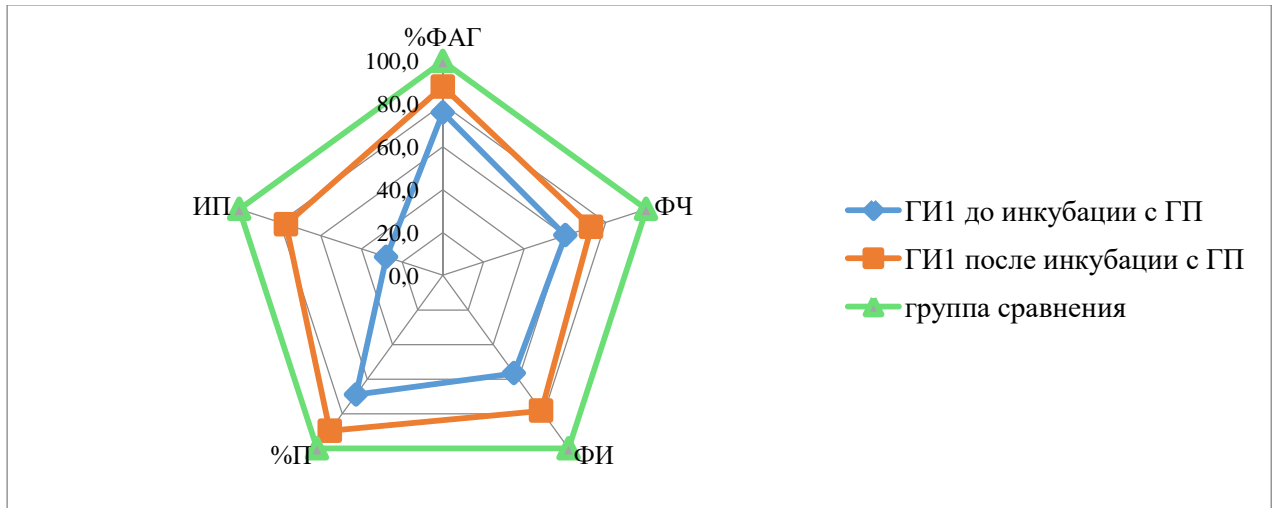
Показатели		Группа сравнения n=30	Среднетяжёлая форма течения COVID-19 n=45	
			ГИ 1 до инкубации с ГП	ГИ 1 после инкубации с ГП
%ФАН		65,8 (60,9; 79,6)	50,0 (46,5; 55,1)*	58,0 (56,7; 72,0)^
ФЧ		6,3 (4,6; 6,8)	3,8 (2,5; 3,9)*	4,6 (4,0; 5,1)*^
ФИ		4,3 (3,9; 4,4)	2,5 (2,1; 3,4)*	3,41 (2,5; 3,7)*
%П		58,9 (51,3; 65,0)	40,9(40,5; 41,7)*	52,1(48,3;55,0)^
ИП		2,6 (2,1; 3,4)	0,7 (0,6; 0,7)*	2,5 (2,0; 3,4)^
NBT-тест спонтанный	СЦИсп	0,09 (0,06; 0,1)	0,4 (0,2; 0,4)*	0,2 (0,2; 0,3)*
	%ФПКсп	2,4 (2,3; 3,5)	14,0 (10,7; 19,9)*	7,0 (5,6; 9,0)*^
NBT-тест стимулиро- ванный	СЦИст	0,2 (0,08; 0,3)	0,6 (0,2; 0,7)	0,4 (0,3; 0,6)
	%ФПКст	5,5 (2,8; 6,3)	15,1 (9,3; 22,0)*	10,2 (7,0; 11,4)*
KM (%ФПКст/%ФПКсп)		1,8 (1,3;1,9)	1,1 (1,0; 1,3)*	1,5 (1,3; 2,0)
NETs		1,0 (0; 1,0)	13,7 (8,0; 16,7)*	9,0 (8,0; 12,0)*
Клетки в апоптозе		2,0 (2,0; 4,0)	12,3 (10,9; 19,1)*	6,0 (4,0; 7,0)*^
<p>Примечание: *- значимость отличий от значений группы сравнения; <math>p &lt; 0,05</math>;  <math>\wedge</math> - значимость отличий показателей ГИ 1 до инкубации от ГИ 1, после инкубации с ГП;  <math>p &lt; 0,05</math>; критерий Манна – Уитни.</p>				

При этом, определялось повышение количества НГ, образующих NETs, до 13,7 (8,0; 16,7)% против 1,0 (0; 1,0)% в ГС, и НГ в состоянии апоптоза до 12,3 (10,9; 19,1) против 2,0 (2,0; 4,0) в ГС ( $p < 0,05$  (Таблица 5.3.1).

При оценке микробицидной активности в NBT – тесте в ГИ1 отмечалось усиление спонтанной и стимулированной активности NADPH-оксидаз как по %ФПКсп-14,0 (10,7; 19,9)% и %ФПКст-15,1 (9,3; 22,0)% против %ФПКсп - 2,4 (2,3; 3,5) и %ФПКст - 5,5(2,8; 6,3) в ГС ( $p_{1-2} < 0,05$ ), так и по СЦИсп – 0,4 (0,2; 0,4), СЦИст- 0,6 (0,2; 0,7) против СЦИсп - 0,09 (0,06; 0,1), СЦИст - 0,2 (0,08; 0,3) ( $p < 0,05$ ) с сохранением резервного микробицидного потенциала, о чем свидетельствовал KM-1,1 (1,0; 1,3) ( $p_{1,2} < 0,05$ ) (Таблица 5.3.1).

Под действием ГП в системе *in vitro* наблюдалось восстановление фагоцитарной функции НГ. Показано повышение в сравнении со значениями ГИ1

до инкубации с ГП в 1,2 раза %ФАН ( $p < 0,05$ ) и в 1,4 раза ФЧ и ФИ ( $p_1 < 0,05$ ,  $p_2 > 0,05$ ) до показателей ГС. И что более важно - усиление переваривающей способности НГ: увеличение в 1,3 раза %П ( $p < 0,05$ ) и в 3,4 раза ИП ( $p < 0,05$ ) по отношению к значениям ГИ1 до инкубации, достигающее показателей ГС (Таблица 5.3.1, Рисунок 5.3.1).

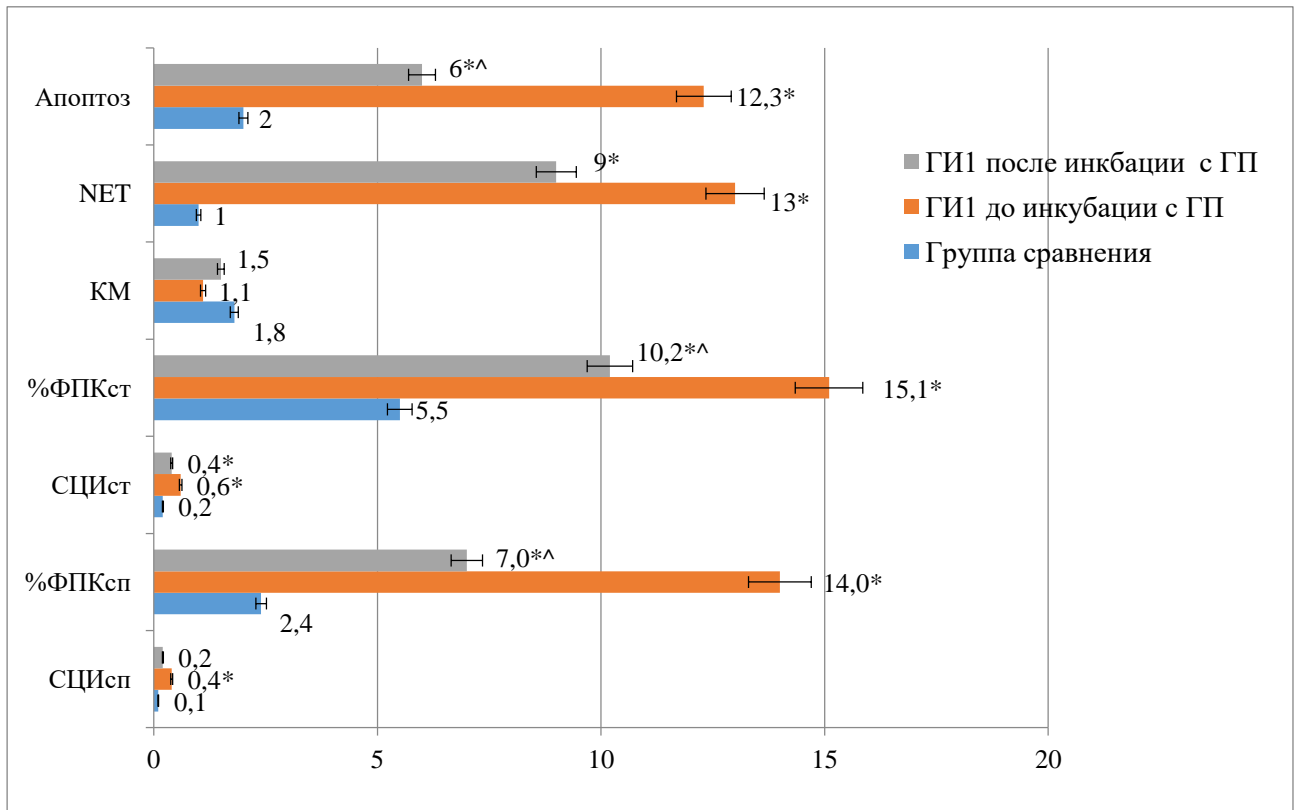


*Примечание: \* - значимость отличий от показателей группы сравнения;  $p < 0,05$ ; л - значимость отличий показателей ГИ 1 до инкубации от ГИ 1, после инкубации с ГП;  $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни.*

Рисунок 5.3.1 – Изменение показателей фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов пациентов со среднетяжелой формой COVID-19 под влиянием ГП в системе in vitro

При этом, эффекты влияния ГП на NADPH-оксидазную активность проявлялись снижением показателей СЦИ и %ФПК как в спонтанном, так и стимулированном NBT- тесте по сравнению со значениями, определяемыми в ГИ1 до инкубации с ГП (Рисунок 5.3.2).

Показано снижение показателей СЦИ и %ФПК в 2 раза в спонтанном ( $p_{1,2} < 0,05$ ) и в 1,5 раза стимулированном ( $p_{1,2} < 0,05$ ) NBT- тесте по сравнению с данными ГИ1 до инкубации с ГП с сохранением резервного микробицидного потенциала, о чем свидетельствовал КМ - 1,5 (1,3; 2,0). При этом, изучаемые показатели оставались на высоком уровне относительно значений ГС.



Примечание: \*- значимость отличий от показателей группы сравнения;  $p < 0,05$ ;  
 ^ - значимость отличий показателей GI 1 до инкубации от GI 1, после инкубации с ГП;  
 $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни

Рисунок 5.3.2 – Иммуномодулирующие эффекты гексапептида на микробицидную активность нейтрофильных гранулоцитов пациентов с COVID-19 в системе *in vitro*

Экспозиция НГ с ГП в системе *in vitro* не влияла на количество НГ, образующих NETs, наблюдалась тенденция снижения NETs, регистрируемая по показателям медиан. Кроме того, отмечалось снижение клеток в апоптозе, что безусловно расценивалось как позитивный эффект пептида (Таблица 5.3.1, Рисунок 5.3.2)

Таким образом, *in vitro* показано положительное влияние гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина на фенотипы функционально-значимых субпопуляций, активно участвующих в противовирусной защите, и функции НГ при COVID-19 среднетяжёлой формы течения. Выявлены модулирующие эффекты, которые способствовали восстановлению фенотипа регуляторных субпопуляций  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ ,

CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>, экспрессирующих рецепторы к IFN I II типов, до показателей группы сравнения. Отмечено ремоделирование фенотипов субпопуляций CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>, обеспечивающих полноценность эффекторных функций от гиперактивированных до нормальных, что подтвердилось восстановлением дефектной фагоцитарной активности НГ и сдерживанием эффекторных процессов, способствующих дегрануляции, образованию активных форм кислорода, образованию NETs, и как следствие, повреждению тканей.

Полученные данные открывают перспективы для создания новых методов иммуномодулирующей терапии для восстановления дисфункций НГ при COVID-19 с включением гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина, который является действующим активным веществом отечественного зарегистрированного лекарственного препарата.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на быструю разработку и внедрение вакцин и перепрофилированных противовирусных препаратов с начала 2020 года по 2024 год SARS-CoV-2 стал причиной более 772 миллионов подтвержденных случаев заболевания COVID-19 и почти 7 миллионов смертей, из них в Российской Федерации - 23 983 769 подтвержденных случаев заражения и 402 773 смертей [357]. В Краснодарском крае, включая Краснодар, COVID-19 был подтвержден у 382 230 человек, из них 11 274 погибли, при этом летальность была в 1,72 раза выше (29 человек на 1000 зараженных), чем в остальных регионах России (17 человек на 1000 зараженных) (<https://horosho-tam.ru/rossiya/krasnodarskiy-krai/coronavirus>).

Глобальное распространение вируса продолжается. SARS-CoV-2 проходит бесчисленные этапы отбора, адаптируясь и повышая свои возможности ускользать от влияния важнейших механизмов противовирусной иммунной защиты, одновременно вызывая нарушение функционирования ИС [21]. В связи с этим дальнейшее изучение дисфункций противовирусного иммунитета при COVID-19 продолжает оставаться актуальной проблемой.

Уточнение нарушения функционирования ИС должно позволить: выявить различные варианты нарушения, обосновать их связь с различными клиническими проявлениями заболевания, разработать методы выявления дисфункций, создать новые диагностические критерии - предикторы тяжести заболевания, исследовать влияние в системе *in vitro* таргетных иммуотропных субстанций с целью коррекции выявленных дефектов ИС, что позволит в дальнейшем разработать новые иммуотерапевтические стратегии.

Для определения особенностей клинической картины COVID-19 в исследуемых группах была изучена связь частоты представленности основных клинических симптомов с тяжестью течения заболевания.



Превалирующими симптомами при поступлении в стационар были кашель (84%), высокая лихорадка (100%), утомляемость (100%) и одышка (81%), в 10 - 15% отмечалась миалгия и артралгия; более редкими проявлениями болезни были экзантема (6%) и диспепсический синдром (5%), и аносмия - в 10% случаев. Для количественного описания связи факторов (симптомов) применялся подсчет отношения шансов (ОШ) с доверительным интервалом. Определение ОШ показало, что клинические доминирующие симптомы первой недели болезни не определяют дальнейшую тяжесть течения COVID-19 и характеризуют клиническую непредсказуемость новой коронавирусной инфекции.

Анамнестические данные, полученные при анализе медицинской документации, позволили выявить у пациентов исследуемых групп коморбидные заболевания, отягощающие течение COVID-19.

Наиболее часто отмечались заболевания сердечно-сосудистой системы: артериальная гипертензия в 35,7% (ГИ1) и 77,8% (ГИ2) случаев, хроническая сердечная недостаточность - в 11,9% (ГИ1), 37,0% (ГИ2) случаев, ишемическая болезнь сердца - в 9,5% (ГИ1) и 25,9% (ГИ2) случаев, миокардиодистрофия - в 11,9% (ГИ1) и 11,1% (ГИ2) случаев. Доля пациентов, страдающих ожирением 1-3 степени, составила 21,4% (ГИ1) и 27% (ГИ2) случаев, сахарным диабетом 2 типа - в 11,9% (ГИ1) и 22% случаев в ГИ2. Выявлено наличие анемии у пациентов ГИ1 (23,8 %) и ГИ2 (18,5%). В меньшем проценте случаев другие сопутствующие заболевания: хронические болезни почек (нефропатия, кисты почек), инфекции мочевыводящих путей (МВП), хронический панкреатит, болезни легких и щитовидной железы. Кроме того, нами был изучен индекс коморбидности Чарльсона (CCI) позволяющий оценить уровень сопутствующей патологии, принимая во внимание как количество, так и тяжесть 19-ти определенных сопутствующих состояний. Показано, что тяжесть течения инфекционного процесса при COVID-19 ассоциирована с отягощением коморбидности, о чем свидетельствует повышение индекса CCI: при среднетяжелой форме  $3,7 \pm 0,3$ , при тяжелой форме до  $5,2 \pm 0,2$  ( $p < 0,05$ ).

На момент поступления в стационар у пациентов оценивалась представленность критериев синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), характеризующегося наличием 2-х и более из следующих признаков: 1) тахипноэ  $>20$  в мин или  $PaCO_2 < 30$  mm. Hg, или больные на ИВЛ; 2) тахикардия  $\geq 90$  в мин; 3) лихорадка  $> 38,0^{\circ}C$  либо гипотермия  $< 36,0^{\circ}C$ ; 4) лейкоцитоз  $> 12$  Г/л либо лейкопения  $< 4$  Г/л, либо незрелые формы нейтрофилов  $> 10\%$ . Показано, что в острый период COVID-19 у 88,4% пациентов наблюдается развитие ССВО при среднетяжелом течении в 77,8%, при тяжелом в 100% случаев. Одновременное сочетание 3-х критериев ССВО в 3,14 раз чаще встречалось при тяжелом течении COVID-19, чем при среднетяжелом.

При анализе клинико – лабораторных показателей было установлено, что у больных COVID-19 с различными формами заболевания установлено: повышение уровня неспецифических маркеров воспаления: острофазных СРБ, ферритина, IL6, ЛДГ, лактата, D-димера. Также было выявлено, что в остром периоде COVID-19 у пациентов ГИ1 и ГИ2 отмечается повышение в ПК НГ, образующих NETs, и клеток в апоптозе. На основе подсчета их доли на 100 НГ нами был разработан новый интеграционный диагностический критерий (ИДК), снижение которого отражает тяжесть течения инфекционного процесса.

Показано, что для среднетяжёлой формы COVID-19 в острый период характерно повышение СРБ, ферритина, ЛДГ, IL6 ( $p_{1-4} < 0,05$ ), а также увеличение количества НГ, сформировавших NETs - 3,5 (2,5-4,0)% и вступивших в апоптоз - 3,0 (3,1-3,5) % ( $p_{1,2} < 0,05$ ), снижение ИДК до 11,6 (8,8 - 13,6) ( $p < 0,05$ ) по отношению к показателям ГС, что может быть использовано в качестве ранних диагностических критериев инфекционного процесса.

При тяжёлой форме COVID-19 в остром периоде отмечалось значительное повышение СРБ, ферритина, ЛДГ, IL6, лактата, D -димера, а также новых ранних диагностических критериев: увеличение доли НГ, сформировавших NETs - 13,0(9,0-16,0)% и вступивших в апоптоз - 12,0 (10,0; 16,5)% ( $p_{1,2} < 0,05$ ), снижение

ИДК до 3,2 (2,5-7,5) ( $p_{1,2}<0,05$ ) в сравнении со значениями условно-здоровых лиц, что сопоставимо с тяжестью инфекционного процесса.

Сравнительный анализ информативности выявленных ранних диагностических критериев, продемонстрировал возможность дифференцирования степени тяжести COVID-19: при тяжелой форме, в отличие от среднетяжелой, количество NETs было выше в 4 раза, клеток, вошедших в апоптоз, - в 4 раза; наиболее значимым критерием определения тяжести процесса является снижение ИДК при тяжелой форме в 31 раз, а при среднетяжелой форме в 8,5 раз по отношению к ГС.

Кроме того, во всех исследуемых группах был установлен дисбаланс цитокинов - вызванный гиперпродукцией как системных цитокинов IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, так и провоспалительных цитокинов IL8, IL17A, IL18, VEGFA, участвующих в рекрутировании НГ в места воспаления, регуляции и активации их эффекторных функций, в том числе, индукции формирования NETs, и недостаточным для противодействия повышением противовоспалительных цитокинов IL10, IL4.

Для среднетяжёлой формы COVID-19 в острый период было выявлено возрастание уровня IL6 в 5 раз ( $p<0,05$ ), IL17A в 2,4 раза, IL18 в 2 раза, IL8 в 2 раза по отношению к ГС ( $p_{1-3}<0,05$ ).

При тяжёлой форме COVID-19 в ранние сроки заболевания отмечалось более значимое повышение концентраций IL6 в 8 раз, IL8 в 4 раза, IL17A в 1,5 раза, IL18 в 4 раза ( $p_{1-4}<0,05$ ) в сравнении с показателями пациентов со среднетяжёлой формой, что может быть использовано для ранней дифференциальной диагностики степени тяжести острого инфекционного процесса.

Следует также отметить, что нейтрофил-ассоциированные цитокины IL17A, IL18, VEGFA значительно увеличиваются в зависимости от тяжести COVID -19 и усиливают агрегацию тромбоцитов, активацию эндотелиальных клеток, дополнительную миграцию НГ и индукцию образования NETs и могут служить индикаторами развития протромботического состояния, иммуотромбоза и

эндотелиита сосудов. Кроме того, IL6 и VEGFA, IL18 сопряжены с регуляцией нейроэндокринной системы, а их повышенная продукция коррелирует с когнитивными и эмоциональными нарушениями, депрессией.

Комплексная оценка ИС у пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19 позволила выявить вариативные иммунодисрегуляторные нарушения основных механизмов противовирусной иммунной защиты.

Полученные нами данные подтвердили тот факт, что SARS-CoV-2 нацелен на систему IFNs, и прежде всего IFN I типа, вызывая блокаду их синтеза, нарушая их регуляторное влияние на каскад клеточных и гуморальных ответов и, тем самым, препятствуя хорошо организованному взаимодействию между противовирусными и провоспалительными врожденными и адаптивными механизмами противоинфекционной защиты ИС.

В частности, были определены различные варианты ответа на вторжение вируса. У пациентов со среднетяжелой формой COVID-19 в 77,7 % случаев (ГИ 1а, n=35) на фоне не отличающегося от ГС количества лейкоцитов и НГ ( $p_{1,2}>0,05$ ) и снижения ЛФ ( $p<0,05$ ) был определен количественный дефицит ЕКК, Тл, Тх, Тцтл и Вл ( $p_{1-4}<0,05$ ). Тогда как у 22,3% (ГИ1б, n=10) отмечался лейкоцитоз, повышение НГ ( $p_{1-2}<0,05$ ) и компенсация количества ЛФ, Тл и их субпопуляций, ЕКК и Вл за счет повышения общего количества лейкоцитов, показатели которых не отличались от ГС ( $p_{1-2}<0,05$ ), что способствовало более благоприятному течению заболевания.

У пациентов с тяжелой формой заболевания у 58,5% пациентов (ГИ2а, n=24) наблюдался лейкоцитоз, повышение НГ ( $p<0,05$ ) и глубокий количественный дефицит ЕКК, Т и В лимфоцитов ( $p_{1-4}<0,05$ ), в 36,6% случаев (ГИ2б, n=15) отмечался неадекватный ответ на вирусную инфекцию, показатели лейкоцитов и лимфоцитарного звена не отличались от показателей ГС ( $p>0,05$ ). Наиболее сильные негативные изменения были определены у 2 пациентов (4,9% случаев, ГИ2в): отмечался гиперлейкоцитоз ( $p<0,05$ ), нейтрофилез, повышение ЕКК и Вл, и наиболее выраженное снижение Тл, Тх, резкое уменьшение Тцтл

( $p_{1-4} < 0,05$ ). Необходимо отметить, что у этих пациентов был снижен до следовых количеств  $IFN\gamma$ , уровень  $IFN\alpha$  не отличался от ГС. Оба пациента погибли на 5 и 6 сутки пребывания в стационаре от сепсиса.

В результате исследования было показано, что более значимое снижение содержания субпопуляций лимфоцитов  $CD3^+CD4^+$  Т-клеток,  $CD3^+CD8^+$  Т-клеток и ЕКК-клеток было связано с тяжёлым течением и плохим прогнозом болезни.

Также установлено, что у пациентов как со среднетяжёлой, так и тяжёлой формами COVID-19, снижается плотность экспрессии функционально-значимых рецепторов: Тл в 2 раза ниже оснащены CD3 молекулой, входящей в состав антиген распознающего рецептора TCR, а Тх, Тцтл, ЕКК имеют низкую MFI CD4, CD8, CD16/CD56 в 2 и 3 раза соответственно форме тяжести заболевания, что отражает функциональные дефекты и снижение их цитотоксического потенциала. Выявлено также снижение в 2 раза при среднетяжёлой и в 9 раз при тяжёлой форме COVID-19 ко-рецепторных молекул CD19, входящих в комплекс BCR.

При COVID-19 на фоне гиперпродукции нейтрофил-ассоциированных цитокинов (IL6, IL8, IL17A, IL18, VEGFA) были выявлены нарушения регуляции и функциональной активности НГ.

Установлено, что у пациентов с COVID-19 в ПК циркулируют три субпопуляции НГ:  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$ , экспрессирующие рецепторы к интерферонам I ( $IFN\alpha/\beta R1$ ) и II ( $CD119 - IFN\gamma$ ) типов и CD16, отвечающий за цитотоксичность НГ, содержание которых в 77,7% случаев (ГИ1а, n=35) и в 100% случаев ГИ2 (n=41) не отличаются от значений ГС ( $p_{1,2} < 0,05$ ). В 22,3% случаев в ГИ 1б (n=10) отмечается снижение в 6 раз доли основной субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$  НГ и увеличение (в 60 раз) содержания  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$  НГ, экспрессирующей рецепторы к  $IFN\alpha$  ( $p_{1,2} < 0,05$ ). При этом, при COVID-19 было выявлено изменение фенотипов субпопуляции НГ, определенных в ГС: *основной* с  $CD16^{mid}IFN\alpha/\beta R1^-CD119^{dim}$  на фенотип  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^-CD119^{mid}$  в ГИ1а и ГИ1б и  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^-CD119^{dim}$  НГ в ГИ 2; *1-минорной* с

CD16<sup>mid</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>dim</sup>CD119<sup>-</sup>НГ на фенотип CD16<sup>bright</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>bright</sup>CD119<sup>-</sup> при среднетяжёлой форме и CD16<sup>bright</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>dim</sup>CD119<sup>-</sup>НГ при тяжёлой форме; 2-минорной с CD16<sup>mid</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>mid</sup>CD119<sup>dim</sup>НГ в ГС на фенотип CD16<sup>bright</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>bright</sup>CD119<sup>dim</sup>НГ в ГИ1а, CD16<sup>bright</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>dim</sup>CD119<sup>dim</sup>НГ в ГИ1б и CD16<sup>bright</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>mid</sup>CD119<sup>dim</sup>НГ в ГИ2. Перестройка рецепторного оснащения в ГИ1а, ГИ1б отмечается из-за повышения в 2 раза MFI CD16 во всех 3-х субпопуляциях ( $p_{1,3}<0,05$ ), в 1,8 раза MFI IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 в 2-х субпопуляциях CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>НГ и CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>НГ ( $p_{1,2}<0,05$ ), в 1,3 раза MFI CD119 ( $p<0,05$ ) в субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>НГ; в ГИ2 - только за счет повышения в 1,6 раза MFI CD16 во всех субпопуляциях.

Выявленные трансформации фенотипов в субпопуляциях CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup> свидетельствуют о готовности НГ воспринимать и отвечать на цитокиновые и интерфероновые сигналы, они активированы, а в случае ГИ1б - гиперактивированы, и обладают высокой цитотоксической активностью как при среднетяжёлой, так и тяжёлой формах заболевания.

У пациентов с COVID-19 установлено перераспределение долей субпопуляций CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ, CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ, экспрессирующих рецепторы, обеспечивающих миграцию клеток в очаг воспаления и активацию НГ для осуществления эффекторных функций.

Показано снижение содержания НГ субпопуляций CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup> с фенотипом, соответствующим зрелым функционально-активным клеткам; значительное повышение количества субпопуляции НГ с иммуносупрессивным фенотипом CD16<sup>dim</sup>CD62L<sup>dim</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup>, подавляющим функциональную активность Т лимфоцитов, в 2,4 раза в ГИ1 и 3 раза в ГИ2 ( $p_{1,2}<0,05$ ); и субпопуляции НГ с фенотипом CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>bright</sup> с высокой цитотоксической активностью и способностью к образованию NETs - в 2,4 раза в ГИ1 и более выраженное (в 4 раза) в ГИ2 при тяжелой форме COVID-19.

Изменение содержания и негативная трансформация функционально-значимых субпопуляций НГ приводили к нарушению эффекторных функций. Было выявлено статистически значимое снижение содержания активно фагоцитирующих НГ, усиление NADPH-оксидазной активности, повышенное формирование NETs и увеличение клеток в патологическом апоптозе, зависящее от степени тяжести течения COVID-19.

Анализ полученных результатов исследования позволил определить дополнительные биомаркеры тяжести COVID-19: повышение содержания субпопуляций НГ с фенотипом  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{bright}$  с высокой цитотоксической активностью и способностью формирования NETs при среднетяжёлой форме до 12,0 - 20,3% и при тяжёлой форме до 26,4 - 42,2%; и субпопуляции с фенотипом  $CD16^{dim}CD62L^{dim}CD11b^{bright}CD63^{-}$ , обладающей функцией супрессирования Т лимфоцитов, при среднетяжёлой форме до 13,3-22,5% и при тяжёлой форме до 24,9-40,9%.

Учитывая важную роль НГ в патогенезе COVID-19, возможность влияния на развитие, течение и исход болезни через восстановление негативных изменений фенотипа субпопуляций НГ и регулирование их функций является перспективным направлением для поиска новых таргетных (нацеленных на действие через рецепторы) терапевтических подходов.

В этой связи в эксперименте *in vitro* были оценены эффекты влияния рекИФН $\alpha$ 2b и синтетического тимического гексапептида на количество и фенотип функционально-значимых субпопуляций и эффекторных функций НГ у пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19.

Продемонстрировано, что экспозиция с рекИФН $\alpha$ 2b (50 МЕ/мкл, 60 мин, 37°C) оказывает разнонаправленное влияние на экспрессию рецепторов, изменяя фенотип субпопуляций НГ  $CD16^{+}IFN\alpha/\beta R1^{-}CD119^{+}$ ,  $CD16^{+}IFN\alpha/\beta R1^{+}CD119^{-}$ ,  $CD16^{+}IFN\alpha/\beta R1^{+}CD119^{+}$ . Так, выявлено снижение MFI  $IFN\alpha/\beta R1$  в ГИ1a и ГИ1b до значений в ГС ( $p_{12} < 0,05$ ) в субпопуляциях  $CD16^{+}IFN\alpha/\beta R1^{+}CD119^{-}$  и  $CD16^{+}IFN\alpha/\beta R1^{+}CD119^{+}$ , вероятно, за счет связывания субстанции рекИФН $\alpha$ 2b со

своим рецептором, и увеличение MFI CD119 в субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+NG$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ , способных взаимодействовать с  $IFN\gamma$ , до значений в ГС ( $p_{1,2}<0,05$ ). При этом, значения MFI CD16 в данных субпопуляциях не менялись, оставаясь повышенными. Позитивные эффекты рекИФН $\alpha$ 2b были более выражены в ГИ1б, где помимо изменений фенотипа, отмечалось увеличение в 2,2 раза ( $p<0,05$ ) доли основной субпопуляции  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^-CD119^{bright}NG$  и снижение в 1,7 раза ( $p<0,05$ ) доли  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^{dim}CD119^-NG$ .

Получены модулирующие эффекты влияния рекИФН $\alpha$ 2b на субпопуляции НГ, обеспечивающие включение клетки в воспалительный процесс,  $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^-$  и  $CD16^+CD62L^+CD11b^+CD63^+$ .

Установлено повышение уровня субпопуляции НГ с фенотипом  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{dim}$  до показателей ГС ( $p>0,05$ ) на фоне не только снижения доли НГ субпопуляции  $CD16^{dim}CD62L^{dim}CD11b^{bright}CD63$ , обладающей супрессивными свойствами, до показателей ГС ( $p>0,05$ ), но и изменение ее фенотипа на  $CD16^{dim}CD62L^{mid}CD11b^{bright}CD63^-$  за счет значимого увеличения плотности экспрессии CD62L. А также наблюдалось снижение агрессивного потенциала субпопуляции с фенотипом  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{bright}$ , выявленного до инкубации, за счет снижения плотности экспрессии CD11b и CD63 молекул, способных запускать процессы дегрануляции НГ и NETоз, и отмечена трансформация фенотипа –  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{mid}CD63^{dim}$ .

Выявленное перераспределение плотности экспрессии рецепторов в функционально-значимых субпопуляциях под влиянием рекИФН $\alpha$ 2b в системе *in vitro* способствовало усилению функциональной активности НГ и адекватному ответу НГ на вирусную инфекцию. Под влиянием рекИФН $\alpha$ 2b наблюдалось значимое увеличение %ФАН и %П до показателей ГС ( $p_{1,2}<0,05$ ), повышение ФИ и ИП ( $p_{1,2}<0,05$ ) по отношению к значениям до инкубации, не достигающее показателей ГС. При этом, NADPH-оксидазная активность сохранялась на



высоком уровне. Было установлено незначительное снижение показателей %ФПК в спонтанном и стимулированном NBT- тесте по сравнению с данными до инкубации, что было выше значений ГС.

Важно отметить, что рекИФН $\alpha$ 2b ограничивает образование NETs и апоптоз.

Полученные экспериментальные данные подтвердили факт позитивного влияния рекИФН $\alpha$ 2b на количественные и фенотипические характеристики субпопуляций НГ, их эффекторные функции, что обосновало в дальнейшем целесообразность его использования в комплексном лечении пациентов со среднетяжёлым течением COVID-19.

В экспериментальном исследовании в системе *in vitro* установлена возможность реставрации трансформированных при COVID-19 фенотипов функционально-значимых субпопуляций НГ и их эффекторных функций под действием гексапептида.

Также установлено, что ГП в системе *in vitro* не влиял на количество НГ субпопуляций  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$ , но при этом способствовал восстановлению их фенотипов как в ГИ1а, так и ГИ1б.

В субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$  в ГИ1а под действием ГП наблюдалось снижение плотности экспрессии CD16 и CD119 рецепторов до значений ГС ( $p < 0,05$ ), что соответствовало фенотипу  $CD16^{mid}IFN\alpha/\beta R1^-CD119^{dim}$ . В ГИ1б также наблюдалось снижение MFI CD16 ( $p < 0,05$ ) и, напротив, повышение в 2 раза MFI CD119 ( $p_{1,2} < 0,05$ ), что способствовало изменению фенотипа на  $CD16^{mid}IFN\alpha/\beta R1^-CD119^{dim}$  НГ.

В субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$  НГ в ГИ1а и ГИ1б отмечалось уменьшение MFI CD16 и  $IFN\alpha/\beta R1$  до значений ГС ( $p_{1,2} < 0,05$ ) и изменение фенотипа на  $CD16^{mid}IFN\alpha/\beta R1^{dim}CD119^-$ .

Эффекты влияния ГП в ГИ1а на фенотип субпопуляций  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$  НГ заключались в снижении MFI CD16 и повышении MFI

IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 и MFI CD119( $p_{1-3}<0,05$ ) - CD16<sup>mid</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>bright</sup>CD119<sup>bright</sup>. При этом, в ГИ1б выявлено снижение MFI IFN $\alpha$ / $\beta$ R1( $p<0,05$ ), увеличение MFI CD119( $p>0,05$ ), а плотность экспрессии CD16 не отличалась от значений, регистрируемых до инкубации - CD16<sup>bright</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>dim</sup>CD119<sup>mid</sup>.

ГП в эксперименте *in vitro* модулировал фенотипы субпопуляций CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ, снижая их гиперактивированный цитотоксический функциональный потенциал, индуцированный SARS-CoV-2.

Под влиянием ГП наблюдалось изменение количества и фенотипа 2-х субпопуляций CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ. Выявлено увеличение количества НГ основной субпопуляции со снижением плотности экспрессии CD16 и CD11b ( $p_{1,2}<0,05$ ) рецепторов до показателей ГС с приобретением фенотипа CD16<sup>mid</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>mid</sup>CD63<sup>-</sup>. Параллельно отмечалось снижение количества НГ субпопуляции с фенотипом CD16<sup>mid</sup>CD62L<sup>mid</sup>CD11b<sup>dim</sup>CD63<sup>-</sup> с более высоким уровнем MFI CD62L и низким MFI CD11b молекул.

ГП не влиял на количество НГ субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ. Однако, было выявлено изменение ее фенотипа - CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>dim</sup>CD63<sup>dim</sup> за счет снижения плотности экспрессии CD11b и CD63 рецепторов относительно значений до инкубации с ГП.

Таким образом, под действием ГП в системе *in vitro* происходило ремоделирование фенотипов функционально-значимых субпопуляций, обеспечивающих полноценность эффекторных функций от гиперактивированных до нормальных, что подтверждается восстановлением дефектных эффекторных функций НГ. Отмечалось восстановление фагоцитарной функции НГ: повышение %ФАН, ФЧ и ФИ ( $p_{1-2}<0,05$ ), усиление переваривающей способности НГ (%П, ИП,  $p_{1,2}<0,05$ ) по отношению к значениям до инкубации, достигающее показатели ГС. При этом, эффекты влияния ГП на NADPH-оксидазную активность проявились снижением показателей СЦИ и %ФПК как в спонтанном, так и стимулированном NBT- тесте, по сравнению со значениями, определяемыми до

инкубации. Также было выявлено, что ГП в системе *in vitro* ограничивает образование NETs и апоптоз (наблюдалась тенденция снижения NETs, регистрируемая клеток в апоптозе по показателям медиан), что безусловно расценивалось как позитивный эффект гексапептида.

Полученные в системе *in vitro* данные о позитивных эффектах ГП открыли перспективы для разработки новых методов иммуномодулирующей терапии, направленной на восстановление дисфункций НГ при COVID-19 с включением синтетического тимического гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина, который является действующим активным веществом отечественного зарегистрированного лекарственного препарата.

Таким образом, в результате комплексной оценки установлено, что иммунный ответ пациентов как со среднетяжёлой, так и с тяжелой формой течения COVID-19, отличается преимущественно супрессированной направленностью - блокадой системы интерферонов и, как следствие, низкой функциональной активностью лимфоцитарных механизмов противовирусной иммунной защиты, что не обеспечивает полноценную элиминацию вируса SARS-CoV-2, и гиперактивацией нейтрофильных гранулоцитов с приобретением агрессивного цитолитического потенциала, обладающих повышенной способностью образовывать NETs под воздействием высоких концентраций нейтрофил-ассоциированных цитокинов, приводящей к повреждению тканей и осложнению течения заболевания.

В эксперименте *in vitro* показано, что рекИФНа2b и ГП продемонстрировали различные иммуномодулирующие эффекты, способствующие восстановлению негативно измененного фенотипа функционально-значимых субпопуляций, устранению дефектов фагоцитарной и микробицидной активности НГ, ограничению процессов формирования NETs и апоптоза пациентов со среднетяжёлой формой течения COVID-19, что открывает перспективы для создания новых методов направленной иммунокоррекции.

## ВЫВОДЫ

1. Определение отношения шансов показало, что клинические доминирующие симптомы первой недели болезни в виде лихорадки (100%), кашля (84%), одышки (81%), отмечаемые при поступлении пациентов в стационар, не определяют дальнейшую тяжесть течения COVID-19 и характеризуют клиническую непредсказуемость новой коронавирусной инфекции.

2. Тяжесть течения инфекционного процесса при COVID-19 ассоциирована с его отягощением коморбидной патологией, о чем свидетельствует повышение индекса коморбидности Чарльсона при среднетяжёлой форме до  $3,7 \pm 0,3$ , а при тяжёлой форме - до  $5,2 \pm 0,2$ .

3. В острый период COVID-19 у 88,4% пациентов наблюдается развитие синдрома системного воспалительного ответа, который при тяжёлом течении характеризуется одновременным сочетанием трех критериев воспалительной реакции.

4. При среднетяжёлой и тяжёлой форме COVID-19 установлено значительное повышение неспецифических маркеров воспаления – СРБ, ферритина, лактатдегидрогеназы, IL6, лактата, D-димера, а также сопоставимое с тяжестью течения болезни снижение величины нового интеграционного диагностического критерия (ИДК), обусловленное увеличением доли нейтрофильных гранулоцитов, сформировавших NETs и вступивших в апоптоз.

5. Сравнительный анализ информационной эффективности ранних диагностических критериев, продемонстрировал возможность дифференцирования степени тяжести COVID-19: при тяжёлой форме количество нейтрофильных гранулоцитов, сформировавших NETs и вошедших в апоптоз, а также содержание сывороточных IL17A и IL8 было в 4 раза, а IL18 в 1,5 раза выше, чем при среднетяжёлой форме заболевания.

6. Наиболее значимым ранним показателем тяжести процесса при COVID-19 является интеграционный диагностический критерий (ИДК), который при среднетяжёлой форме значительно снижен - до 11,6 (8,8 - 13,6), а при тяжёлой форме – критично низкий - 3,2 (2,5-7,5), тогда как у здоровых лиц составляет 99,0 (99,0; 99,0).

7. При среднетяжёлой и, особенно, при тяжёлой форме COVID-19, протекающих на фоне блокады системы интерферонов и гиперпродукции провоспалительных цитокинов, установлены вариативные дисрегуляторные нарушения естественных киллерных клеток, Т-лимфоцитов и их субпопуляций, а также негативные изменения фенотипа субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов с переориентацией их функций на цитотоксические и образование NETs, что способствует прогрессированию болезни и усугублению ее клинических проявлений.

8. В эксперименте *in vitro* иммуотропные субстанции рекомбинантный ИФН $\alpha$ 2b и синтетический тимический гексапептид продемонстрировали иммуномодулирующие эффекты, способствующие восстановлению негативно измененного фенотипа функционально-значимых субпопуляций, устранению дефектов фагоцитарной и микробицидной активности нейтрофильных гранулоцитов, ограничению процессов формирования NETs и апоптоза у пациентов со среднетяжёлой формой течения COVID-19, что открывает возможные перспективы для создания новых методов иммунотерапии при COVID-19.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. В созданный ранее алгоритм лабораторной диагностики пациентов с COVID-19 рекомендуется дополнительно включить ранние диагностические критерии с целью дифференциальной диагностики COVID-19 среднетяжелого и тяжелого течения: интеграционный диагностический критерий (ИДК), подсчет количества НГ, сформировавших NETs, и НГ в апоптозе в периферической крови, определение уровня цитокинов IL8, IL18, IL17A.

2. Рекомендовать в качестве перспективных индикаторных цитокинов - предикторов развития протромботического состояния, иммунотромбоза и эндотелиита сосудов, определение уровней сывороточных цитокинов IL8, IL18, IL17A и VEGFA.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

На основе полученных экспериментальных данных *in vitro* по позитивному влиянию рекомбинантного интерферона альфа 2b и тимического гексапептида на восстановление адекватного функционирования нейтрофильных гранулоцитов перспективным направлением для дальнейшей реализации темы является разработка программ таргетной иммуотропной терапии при новой коронавирусной инфекции (COVID-19) с использованием зарегистрированных отечественных препаратов, основой которых являются исследованные субстанции. Также перспективно дальнейшее проведение клинических исследований по изучению клинико-иммунологической эффективности разработанных программ таргетной иммуотропной терапии при новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НГ – нейтрофильные гранулоциты

ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром

ЦШ – цитокиновый шторм

IL – интерлейкин

VEGFA – фактор роста эндотелия сосудов

ISG<sub>s</sub> – IFN-стимулируемые гены

рекИФН $\alpha$ 2b - рекомбинантный интерферон  $\alpha$ 2b

ГП – Гексапептид

ЦТЛ – цитотоксические лимфоциты

%ФАН – процент активно фагоцитирующих нейтрофилов

ФИ – фагоцитарный индекс

ФЧ – фагоцитарное число

%П – процент переваривания

ИП – индекс переваривания

СЦИ – средний цитохимический индекс

ФПК – формазан позитивная клетка

КМ – коэффициент мобилизации

MFI – показатель интенсивности флуоресценции (meaning fluorescence intensity)

NETs – нейтрофильные экстрацеллюлярные сети (neutrophil extracellular traps)

АФК – активные формы кислорода (reactive oxygen species)

АГ – антиген

АЗКЦ – антителозависимая клеточная цитотоксичность

ЕКК – естественные киллерные клетки

ИС – иммунная система

МкАТ – моноклональные антитела

МПО – миелопероксидаза

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Бахчоян М. Р. Индекс соотношения нейтрофилов к лимфоцитам как предиктор неблагоприятного прогноза у пациентов с сердечной недостаточностью некоронарогенной этиологии / М. Р. Бахчоян, Е. Д. Космачева, А. А. Славинский // Клиническая практика. – 2017. – № 3. – С. 48–53.
2. Биологическая активность интерферонов при новой коронавирусной инфекции COVID-19 / Т. П. Оспельникова, Д. С. Левицкая, Л. В. Колодяжная // Вопросы вирусологии. – 2022. – Т. 67 (2). – С. 142-152. – DOI <https://doi.org/10.36233/0507-4088-99>.
3. Влияние гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина на экспериментально трансформированный в системе *in vitro* фенотип нейтрофильных гранулоцитов здоровых лиц / И. В. Нестерова, С. В. Хайдуков, Т. З. Л. Нгуен, А. Н. Ронжина // Российский иммунологический журнал. – 2017. – Т. 11 (20), № 2. – С. 176-179.
4. Влияние интраназального применения Имунофана на активность фагоцитов при комплексной терапии экссудативного среднего отита у детей / Е. Н. Кологривова, Р. И. Плешко, Н. В. Щербик [и др.] // Медицинская иммунология. – 2020. – Т. 22, № 4. – С. 741-750.
5. Возможность применения ингибиторов ИЛ-17 у пациентов с COVID-19: собственный опыт и обзор литературы / Е. А. Шатохина, А. С. Полонская, Е. А. Мершина [и др.] // Иммунология. – 2021. – Т. 42 (3). – С. 243-253. – DOI 10.33029/0206-4952-2021-42-3-243-253.
6. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 10. – Утверждены Минздравом РФ от 08.02.2021. – 2021. – 260 с.
7. Дефекты в системе интерферонов, ассоциированные с дефицитом естественных киллерных клеток и Т-лимфоцитов у пациентов с COVID-19 / И. В. Нестерова, В. Н. Городин, Г. А. Чудилова [и др.] // Инфекционные



- болезни. – 2022. – Т. 20, № 2. – С. 23-32. – DOI 10.20953/1729-9225-2022-2-23-32.
8. Долгушин И. И.. Нейтрофильные гранулоциты: новые лица старых знакомых / И. И. Долгушин // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18 (1). – С. 30-37.
  9. Интеграционный диагностический критерий, оценивающий тяжесть течения COVID-19 и риск возникновения постковидного синдрома / И. В. Нестерова, М. Г. Атажахова, В. А. Матушкина [и др.] // Медицинская иммунология. – URL: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-IDC-2594> (дата обращения 10.06.2023)
  10. Интерфероно- и иммунотерапия в лечении нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваний у детей и взрослых / И. В. Нестерова, В. В. Малиновская, С. В. Ковалева, Г. А. Чудилова. – USA, GB, Russia, Москва: Capricorn Publishing, 2020. – 366 с.
  11. Кетлинский С. А. Цитокины / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев. – Санкт-Петербург: ООО «Издательство Фолиант», 2008. – 552 с.
  12. Клинико-термографическая оценка эффективности периоперационной терапии раневого процесса у хирургических стоматологических больных с использованием препаратов Вобензим и Имунофан / С. Г. Безруков, А. Н. Балабанцева, Т. С. Григорьева, В. В. Яковенко // Таврический медико-биологический вестник. – 2017. – Vol. 20, № 4. – Р. 10-15.
  13. Ковалева С. В. Стратегия и тактика иммунотерапии у детей с нетипично протекающими инфекционно-воспалительными заболеваниями: специальность 14.03.09 «Клиническая иммунология, аллергология»: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Ковалева Светлана Валентиновна; Кубанский государственный медицинский университет. – Краснодар, 2022. – 493 с.
  14. Маркова Т. П. Имунофан в комплексном лечении детей с повторными респираторными заболеваниями и микоплазменной инфекцией / Т. П.

- Маркова, Д. Г. Чувиров // Эффективная фармакотерапия. – 2022. – Т. 18 (12). – С. 12–18.
15. Методы комплексной оценки функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии [методические рекомендации] / И. В. Нестерова, Г. А. Чудилова, С. В. Ковалева [и др.]. – Краснодар, 2017. – 52 с.
  16. Насонов Е. Л. Иммунопатология и иммунофармакотерапия коронавирусной болезни 2019 (COVID-19): фокус на интерлейкин 6 / Е. Л. Насонов // Научно-практическая ревматология. – 2020. – Т. 58, № 3. – С. 245–261
  17. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: значение для диагностики и прогноза COVID-19 / Д. В. Кассина, И. А. Василенко, А. С. Гурьев [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2020. – Т. 48 (Спецвыпуск 1). – С. S43–50. – DOI 10.18786/2072-0505-2020-48-029.
  18. Нейтрофильные гранулоциты: отражение в зеркале современных представлений / И. В. Нестерова, Г. А. Чудилова, С. В. Ковалева [и др.] / под редакцией И. В. Нестеровой, Г. А. Чудиловой. – Москва: Capricorn Publishing, UK, USA, 2018. – 345 с.
  19. Неоднозначная роль нейтрофильных гранулоцитов в иммунопатогенезе COVID-19: взаимосвязь с дисбалансом провоспалительных нейтрофил-ассоциированных цитокинов и дефицитом интерферона- $\alpha$  / И. В. Нестерова, В. Н. Городин, В. А. Матушкина [и др.] // Инфекционные болезни. – 2022. – Т. 20, № 4. – С. 12–24. – DOI 10.20953/1729-9225-2022-4-12-24.
  20. Нестерова И. В. Вторичные иммунодефициты и методы их коррекции в практике врача оториноларинголога / И. В. Нестерова // Иммуноterapia в практике ЛОР-врача и терапевта / под редакцией А. С. Симбирцева, Г. В. Лавреновой. – Санкт-Петербург: Диалог, 2018. – С. 32–97.
  21. Нестерова И. В. Клинико-иммунологическая эффективность интеграционной программы реабилитации иммунной системы у пациентов с атипичной хронической активной герпесвирусной коинфекцией до и во время COVID-19, а также в постковидном периоде / И. В. Нестерова, Е. О. Халтурина, В. В.

- Малиновская // Эффективная фармакотерапия. – 2022. – Т. 18, № 37. – С. 30-41. – DOI 10.33978/2307-3586-2022-18-37-30-41.
22. Нестерова И. В. Нейтрофильные гранулоциты - ключевые клетки иммунной системы / И. В. Нестерова, И. Н. Швыдченко, В. А. Роменская [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2008. – Т. 9, № 4. – С. 432-435.
23. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 2 / И. В. Нестерова, Н. В. Колесникова, Г. А. Чудилова [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8, № 1. – С. 7-18. – DOI 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18.
24. Последствия пандемии COVID-19: монография / Н. А. Беляков, С. Ф. Багненко, Т. Н. Трофимова [и др.] / под редакцией Н. А. Белякова, С. Ф. Багненко. – Санкт-Петербург: Балтийский медицинский образовательный центр, 2022. – 463 с.
25. Прогнозная значимость специфических цитокинов в отношении летального исхода COVID-19 / Н. А. Арсентьева, Н. Е. Любимова, О. К. Бацунов [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т. 12 (5). – Р. 859-868. – DOI 10.15789/2220-7619-PVO-2043.
26. Редькин Ю. В. Иммуномодулятор имунофан в лечении больных с герпетической микст-инфекцией / Ю. В. Редькин, Т. М. Любошенко // Здравоохранение Дальнего Востока. – 2011. – №. 3. – С. 38-41.
27. Роль молекул адгезии L-Selectin и ICAM 1 у детей с бронхиальной астмой / П. В. Бережанский, Н. С. Татаурщикова, Т. Г. Федоскова [и др.] // Медицинская иммунология. – 2022. – Т. 24 (2). – С. 593-600.
28. Роль нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NETs) в иммунопатогенезе тяжелого COVID-19: потенциальные иммунотерапевтические стратегии, регулирующие процесс формирования и активность NETs / И. В. Нестерова, М. Г. Атажахова, Ю. В. Тетерин [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2023. – Т. 13, № 1. – С. 9–28. – DOI 10.15789/2220-7619-TRO-2058.

29. Симбирцев А. С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека / А. С. Симбирцев. – Санкт-Петербург: ООО «Издательство Фолиант», 2018. – 512 с.
30. Современные возможности интерферонов в лечении детей с COVID-19 / А. И. Сафина, О. В. Шарипова, И. Я. Лутфуллин [и др.] // Медицинский Совет. – 2021. – Т. 1. – Р. 59–65. – DOI 10.21518/2079-701X-2021-1-59-65.
31. Соловьева И. В. Лактат в оценке тяжести критических состояний / И. В. Соловьева. – Пушино, Диакон, 2018. – 34 с.
32. Сравнительное изучение эффективности препаратов имунофан и тубосан у больных впервые выявленным туберкулезом легких / Б. М. Малиев, О. З. Басиева, С. Б. Хетагурова, Э. Т. Туаллагова // Туберкулез и болезни легких. – 2019. – Т. 97. – №. 6. – С. 63-64.
33. Трошина Е. А. Роль цитокинов в процессах адаптивной интеграции иммунных и нейроэндокринных реакций организма / Е. А. Трошина // Проблемы Эндокринологии. – 2021. – Т. 67 (2). – С. 4-9.
34. Факторы риска тяжелого течения и летального исхода COVID-19 / С. Г. Щербак, Т. А. Камилова, А. С. Голота, Д. А. Вологжанин // Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация. – 2022. – Т. 4 (1). – С. 14-36. – DOI 10.36425/rehab104997.
35. Фармакологическая иммунореабилитация в системе специфической иммунопрофилактики и вакцинотерапии: современные подходы и перспективы развития / В. В. Лебедев, А. В. Данилина, И. В. Сгибова [и др.] // International Journal on Immunorehabilitation. – 2000. – Т. 2 (1). – С. 48–53.
36. Фенотипические и функциональные характеристики нейтрофильных гранулоцитов в норме / И. В. Нестерова, И. Н. Швыдченко, Е. В. Фомичева [и др.] // Наука Кубани. – 2007. – № 4. – С. 38-43.
37. Цитокиновый шторм при COVID-19 / С. А. Костюк, В. В. Смирский, Ю. Л. Горбич [и др.] // Медицинские новости. – 2020. – № 10 (313). – Р. 4-8.

38. Чудилова Г. А. Мультивариантность фенотипической трансформации субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов при различных иммунозависимых заболеваниях: специальность 14.03.09 «Клиническая иммунология, аллергология»: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Чудилова Галина Анатольевна; Кубанский государственный медицинский университет. – Краснодар, 2020. – 375 с.
39. Эффекты влияния рекомбинантного интерферона  $\alpha 2b$  на фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов пациентов с COVID-19/ И. В. Нестерова, В. Н. Городин, Г. А. Чудилова [и др.] // Инфекционные болезни. – 2022. – Т. 20 (1). – С. 43–51. – DOI 10.20953/1729-9225-2022-1-43-51.
40. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19 / A. J. Wilk, A. Rustagi, N. Q. Zhao [et al.] // Nature Medicine. – 2020. – Vol. 26 (7). – P. 1070-1076. – DOI 10.1038/s41591-020-0944-y.
41. 2019-novel Coronavirus (2019-nCoV) Infections Trigger an Exaggerated Cytokine Response Aggravating Lung Injury. / Y. Liu, C. Zhang, F. Huang [et al.] // – 2020. – DOI 10.12074/202002.00018.
42. A neutrophil activation signature predicts critical illness and mortality in COVID-19 / M. L. Meizlish, A. B. Pine, J. D. Bishai [et al.] // Blood advances. – 2021. – Vol. 5 (5). – P. 1164–1177. – DOI 10.1182/bloodadvances.2020003568.
43. A pathological report of three COVID-19 cases by minimally invasive autopsies / X. H. Yao, T. Y. Li, Z. C. He [et al.] // Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. – 2020. – Vol. 49. – P. E009. – DOI 10.3760/cma.j.cn112151-20200312-00193.
44. A Randomized Clinical Trial of the Efficacy and Safety of Interferon Beta-1a in Treatment of Severe Covid-19 / E. Davoudi-Monfared, H. Rahmani, H. Khalili [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2020. – Vol. 64 (9). – P. e0106120–34. – DOI 10.1128/AAC.01061-20.
45. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing / D. E. Gordon, G. M. Jang, M. Bouhaddou [et al.] // Nature. – 2020. – Vol. 583. – P. 459-468

46. A specific low-density neutrophil population correlates with hypercoagulation and disease severity in hospitalized COVID-19 patients / S. M. Morrissey, A. E. Geller, X. Hu [et al.] // *JCI Insight*. – 2021. – Vol. 6. – P. e148435.
47. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1 / J. Pillay, V. M. Kamp, E. van Hoffen [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2012. – Vol. 122. – P. 327–336. – DOI 10.1172/JCI57990.
48. Aberrant pathogenic GM-CSF+ T cells and inflammatory CD14+CD16+ monocytes in severe pulmonary syndrome patients of a new coronavirus / Y. Zhou, B. Fu, X. Zheng [et al.] // *BioRxiv*. – 2020. – DOI 10.1101/2020.02.12.945576.2020.02.12.945576.
49. Acharya D. Dysregulation of type I interferon responses in COVID-19 / D. Acharya, G. Liu, M. U. Gack // *Nature Reviews Immunology*. – 2020. – Vol. 20. – P. 397-398.
50. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-Nat / X. Lei, X. Dong, R. Ma [et al.] // *Commun*. – 2020. – Vol. 11. – P. 3810.
51. Activation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 on human neutrophils by marburg and Ebola viruses / M. Mohamadzadeh, S. Coberley S., G. G. Olinger [et al.] // *Journal of Virology*. – 2006. – Vol. 80 (14). – P. 7235–7244. – DOI 10.1128/JVI.00543-06.
52. Active Replication of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus and Aberrant Induction of Inflammatory Cytokines and Chemokines in Human Macrophages: Implications for Pathogenesis / J. Zhou, H. Chu, C. Li [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 209 (9). – P. 1331–1342. – DOI 10.1093/infdis/jit504.
53. Acute Kidney Injury in Covid-19: Emerging Evidence of a Distinct Pathophysiology / D. Battle, M. J. Soler, M. A. Sparks [et al.] // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2020. – Vol. 31 (7). – P. 1380–1383. – DOI 10.1681/ASN.2020040419.

54. Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses / R. Zhou, K. K.-W. To, Y.-C. Wong [et al.] // *Immunity*. – 2020. – Vol. 53. – P. 864–877.e5.
55. Alpha/beta interferon receptor signaling amplifies early proinflammatory cytokine production in the lung during respiratory syncytial virus infection / Goritzka M., Durant L. R., Pereira C. [et al.] // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88. – P. 6128–636. – DOI 10.1128/JVI.00333-14.
56. alpha-Defensin inhibits influenza virus replication by cell-mediated mechanism(s) / M. Salvatore, A. Garcia-Sastre, P. Ruchala [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 196 (6). – P. 835-843.
57. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival / D. M. Del Valle, S. Kim-Schulze, H. H. Huang [et al.] // *Nature Medicine*. – 2020. – Vol. 26. – P. 1636–1643. – DOI 10.1038/s41591-020-1051-9.
58. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute Covid-19 and Associations With Age and Disease Severity / M.C. Rydyznski, S.I. Ramirez, J.M. Dan [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 183(4). – P. 996–1012.e19. – DOI 10.1016/j.cell.2020.09.038.
59. Antiviral Activity of Type I, II, and III Interferons Counterbalances ACE2 Inducibility and Restricts SARS-CoV-2 / I. Busnadiego, S. Fernbach, M. O. Pohl [et al.] // *MBio*. – 2020. 11 (5), e01928-20. doi:10.1128/mbio.01928-20
60. Antiviral properties of lactoferrin – a natural immunity molecule / F. Berlutti, F. Pantanella, T. Natalizi [et al.] // *Molecules*. – 2011. – Vol. 16 (8). – 6992-7018.
61. Are Type 1 Interferons Treatment in Multiple Sclerosis as a Potential Therapy Against Covid-19? / E. Gemcioglu, M. Davutoglu, E. E. Ozdemir, A. Erden // *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. – 2020. – Vol. 42. – P. 102196. – DOI 10.1016/j.msard.2020.102196.
62. Badary O. A. Pharmacogenomics and Covid-19: Clinical Implications of Human Genome Interactions With Repurposed Drugs / O. A. Badary // *The*

- pharmacogenomics journal. – 2021. – Vol. 21 (3). – P. 275–284. – DOI 10.1038/s41397-021-00209-9.
63. Baggiolini M. Neutrophil-Activating Peptide-1/Interleukin 8, a Novel Cytokine That Activates Neutrophils / M. Baggiolini, A. Walz, S. L. Kunkel // Journal of Clinical Investigation. – 1989. – Vol. 84 (4). – P. 1045–1049. – DOI 10.1172/JCI114265.
64. Baricitinib as Potential Treatment for 2019-Ncov Acute Respiratory Disease / P. Richardson, I. Griffin, C. Tucker [et al.] // Lancet. – 2020. – Vol. 395 (10223). – P. e30–1. – DOI 10.1016/S0140-6736(20)30304-4.
65. Berlin D. A. Severe Covid-19 / D. A. Berlin, R. M. Gulick, F. J. Martinez // The New England Journal of Medicine. – 2020. – Vol. 383. – P. 2451-2460.
66. Blockade of Interleukin 6 Trans Signaling Suppresses T-Cell Resistance Against Apoptosis in Chronic Intestinal Inflammation: Evidence in Crohn Disease and Experimental Colitis in Vivo / R. Atreya, J. Mudter, S. Finotto [et al.] // Nature Medicine. – 2000. – Vol. 6 (5). – P. 583–588. – DOI 10.1038/75068.
67. Blockade of Interleukin Seventeen (Il-17a) With Secukinumab in Hospitalized Covid-19 Patients – The Bishop Study / G. G. Resende, R. da Cruz Lage, S. Q. Lobê [et al.] // medRxiv. – 2021. – Vol. 7 (21). – P. 21260963. – DOI 10.1101/2021.07.21.21260963.
68. Blood molecular markers associated with COVID-19 immunopathology and multi-organ damage / Y. M. Chen, Y. Zheng, Y. Yu [et al.] // The EMBO Journal. – 2020. – Vol. 39 (24). – P. e105896. – DOI 10.15252/embj.2020105896.
69. Blood neutrophils from children with COVID-19 exhibit both inflammatory and anti-inflammatory markers / V. Seery, S. C. Raiden, S. C. Algeri [et al.] // EBioMedicine. – 2021. – Vol. 67. – P. 103357.
70. Bobrysheva I. V. Immunomodulator Imunofan affects cell profile of morphofunctional zones of rat thymus and delays its age-related involution / I. V. Bobrysheva // Bulletin of Russian State Medical University. – 2016. – Vol. 3. – P. 34-38



71. Borella R. Metabolic Reprogramming Shapes Neutrophil Functions in Severe Covid-19 / R. Borella // *European Journal of Immunology*. – 2022. – Vol. 52. (3). – P. 484–502. – DOI [10.1002/eji.202149481](https://doi.org/10.1002/eji.202149481).
72. Brazil-UK centre for arbovirus discovery, diagnosis, genomics and epidemiology (CADDE) genomic network evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil / D. S. Candido, I. M. Claro, J. G. de Jesus [et al.] // *Science*. – 2020. – Vol. 369. – P. 1255-1260.
73. Brennan K. Activation of host pattern recognition receptors by viruses / K. Brennan, A. G. Bowie // *Current Opinion in Microbiology*. – 2010. – Vol. 13 (4). – P. 503-507.
74. Brinkmann V. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs / V. Brinkmann, A. Zychlinsky // *Nature Reviews Microbiology*. – 2007. – Vol. 5 (8). – P. 577-582.
75. Calcium activity in response to nAChR ligands in murine bone marrow granulocytes with different Gr-1 expression / D. Serov, I. Tikhonova, V. Safronova, M. Astashev // *Cell Biology International*. – 2021. – Vol. 45 (7). – P. 1533-1545.
76. Calming the inflammatory storm in severe COVID-19 infections: Role of biologics- A narrative review / D. Banji, S. S. Alqahtani, O. J. F. Banji [et al.] // *Saudi Pharmaceutical Journal*. – 2021. – Vol. 29 (3). – P. 213–222. – DOI [10.1016/j.jsps.2021.01.005](https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.01.005).
77. Carter S. J. Macrophage activation syndrome in adults: recent advances in pathophysiology, diagnosis and treatment / S. J. Carter, R. S. Tattersall, A. V. Ramanan // *Rheumatology*. – 2019. – Vol. 58. – P. 5–17.
78. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells / K. Wang, W. Chen, Z. Zhang [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2020. – Vol. 5(1). – P. 283. – DOI [10.1038/s41392-020-00426-x](https://doi.org/10.1038/s41392-020-00426-x).

79. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs / L. R. Shiow, D. B. Rosen, N. Brdicková [et al.] // *Nature*. – 2006. – Vol. 440. – P. 540-544.
80. Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP) / S. Wan, Q. Yi, S. Fan [et al.] // *medRxiv*. – 2020. – DOI 10.1101/2020.02.10.20021832.
81. Characterization of neutralizing antibody with prophylactic and therapeutic efficacy against SARS-CoV-2 in rhesus monkeys / S. Wang, Y. Peng, R. Wang [et al.] // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11 (1). – P. 5752. – DOI 10.1038/s41467-020-19568-1.
82. Characterization of the Inflammatory Response to Severe COVID-19 Illness / O. J. Mc Elvaney, N. L. Mc Evoy, O. F. Mc Elvaney [et al.] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2020. – Vol. 202 (6). – P. 812-821. – DOI 10.1164/rccm.202005-1583OC.
83. Clinical and Immunological Features of Severe and Moderate Coronavirus Disease 2019 / G. Chen, D. Wu, W. Guo [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2020. – Vol. 130 (5). – P. 2620–2629. – DOI 10.1172/JCI137244.
84. Clinical and Pathological Investigation of Patients With Severe Covid-19 / S. Li, L. Jiang, X. Li [et al.] // *JCI Insight*. – 2020. – Vol. 5 (12). – P. e138070–83. – DOI 10.1172/jci.insight.138070.
85. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China / J. J. Zhang, X. Dong, Y. Y. Cao [et al.] // *Allergy*. – 2020. – Vol. 75 (7). – P. 1730-1741. – DOI 10.1111/all.14238.
86. Clinical course and outcomes of critically ill patients with sars-Cov-2 pneumonia in wuhan, China: A single-centered, retrospective, observational study / X. Yang, Y. Yu, J. Xu [et al.] // *The Lancet Respiratory Medicine*. – 2020. – Vol. 8 (5). – P. 475–481. – DOI 10.1016/S2213-2600(20)30079-5.

87. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China / W. Guan, Z. Ni, Y. Hu [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 382. – P. 1708-1720. – DOI 10.1016/j.jemermed.2020.04.004.
88. Clinical Course and Risk Factors for Mortality of Adult Inpatients With Covid-19 in Wuhan, China: A Retrospective Cohort Study / F. Zhou, T. Yu, R. Du [et al.] // *Lancet*. – 2020. – Vol. 395 (10229). – P. 1054–1062. – DOI 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
89. Clinical efficacy and safety of interferon (Type I and Type III) therapy in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / S. Ryoo, D.-H. Koh, S.-Y. Yu [et al.] // *PLoS ONE*. – 2023. – Vol. 18 (3). – P. e0272826. – DOI 10.1371/journal.pone.0272826.
90. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China / C. Huang, Y. Wang, X. Li [et al.] // *Lancet*. – 2020. – Vol. 395. – P. 497–506.
91. Clinical features of severe pediatric patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan: a single center’s observational study / D. Sun, H. Li, X.-X. Lu [et al.] // *World journal of pediatrics*. – 2020. – Vol. 16 (3). – P. 251-259. – DOI 10.1007/s12519-020-00354-4.
92. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China / Q. Ruan, K. Yang, W. Wang [et al.] // *Intensive Care Medicine*. – 2020. – Vol. 46 (5). – P. 846-848. – DOI 10.1007/s00134-020-05991-x.
93. Comparative replication and immune activation profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in human lungs: an ex vivo study with implications for the pathogenesis of COVID-19 / H. Chu, J.F.-W. Chan, Y. Wang [et al.] // *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. – 2020. – Vol. 71 (6). – P. 1400-1409. – DOI 10.1093/cid/ciaa410.
94. Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis / P. Skendros, A. Mitsios, A.

- Chrysanthopoulou [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2020. – Vol. 130 (11). – P. 6151-6157.
95. Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe Respiratory Failure / E. J. Giamarellos-Bourboulis, M. G. Netea, N. Rovina [et al.] // *Cell Host & Microbe*. – 2020. – Vol. 27(6). – P. 992–1000.e3. – DOI 10.1016/j.chom.2020.04.009.
96. Coomes E. A. Interleukin-6 in Covid-19: A Systematic Review and Meta-Analysis / E. A. Coomes, H. Haghbayan // *Reviews in Medical Virology*. – 2020. – Vol. 30 (6). – P. 1–9. – DOI 10.1002/rmv.2141.
97. Co-option of Neutrophil Fates by Tissue Environments / I. Ballesteros, A. Rubio-Ponce, M. Genua [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 183. – P. 1282-1297.e18. – DOI 10.1016/j.cell.2020.10.003.
98. Correction: The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19 / L. Yang, X. Xie, Z. Tu [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2021. – Vol. 6. – P. 326.
99. Correlation Analysis Between Disease Severity and Inflammation-Related Parameters in Patients With Covid-19: A Retrospective Study / J. Gong, H. Dong, Q. S. Xia [et al.] // *BMC Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 20 (1). – P. 963. – DOI 10.1186/s12879-020-05681-5.
100. Corticosteroid Therapy for Critically Ill Patients With Covid-19: A Structured Summary of a Study Protocol for a Prospective Meta-Analysis of Randomized Trials / J. A. C Sterne, J. Diaz, J. Villar [et al.] // *Trials*. – 2020. – Vol. 21 (1). – P. 734. – DOI 10.1186/s13063-020-04641-3.
101. COVID-19 and emerging viral infections: The case for interferon lambda / L. Prokunina-Olsson, N. Alphonse, R. E. Dickenson [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2020. – Vol. 217. – P. e20200653.
102. COVID-19: Consider cytokine storm syndromes and immunosuppression Mehta / P. Mehta, D. F. McAuley, M. Brown [et al.] // *Lancet*. – 2020. – Vol. 395 (10229). – P. 1033-1034.

103. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions / S. Montazersaheb, S. M. Hosseiniyan Khatibi, M. S. Hejazi [et al.] // *Virology Journal*. – 2022. – Vol. 19. – P. 92. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01814>.
104. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis / R. L. Chua, S. Lukassen, S. Trump [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2020. – Vol. 38(8). – P. 970–979. – DOI 10.1038/s41587-020-0602-4.
105. COVID-19, Cytokines, Inflammation, and Spices: How are They Related? / A. B. Kunnumakkara, V. Rana, D. Parama [et al.] // *Life Sciences*. – 2021. – Vol. 284. – P. 119-201. – DOI 10.1016/j.lfs.2021.119201.
106. COVID-19: more than a cytokine storm / G. Riva, V. Nasillo, E. Tagliafico [et al.] // *Critical Care Medicine*. – 2020. – Vol. 24. – P. 549
107. Critical role of mac-1 sialyl lewis x moieties in regulating neutrophil degranulation and transmigration / K. Zen, L. B. Cui, C. Y. Zhang, Y. Liu // *Journal of Molecular Biology*. – 2007. – Vol. 374. – P. 54–63.
108. Cua D. J. Innate Il-17-Producing Cells: The Sentinels of the Immune System / D. J. Cua, C. M. Tato // *Nature Reviews Immunology*. – 2010. – Vol. 10 (7). – P. 479–489. – DOI 10.1038/nri2800.
109. Cui S. N. Immunopathological Roles of Neutrophils in Virus Infection and COVID-19 / S. N. Cui, H. Y. Tan, G. C. Fan // *Shock*. – 2021. – Vol. 56 (3). – P. 345-351. – DOI 10.1097/SHK.0000000000001740.
110. CXCR1 and CXCR2 inhibition by ladarixin improves neutrophil-dependent airway inflammation in mice / M. S. Mattos, M. R. Ferrero, L. Kraemer [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 566953.
111. CXCR1/2 antagonism is protective during influenza and post-influenza pneumococcal infection / L. P. Tavares, C. C. Garcia, M. G. Machado [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1799.

112. Cytokine Profile in Plasma of Severe Covid-19 Does Not Differ From Ards and Sepsis / J. G. Wilson, L. J. Simpson, A. M. Ferreira [et al.] // *JCI Insight*. – 2020. – Vol. 5 (17). – P. e140289–95. – DOI 10.1172/jci.insight.140289.
113. Cytokine Release Syndrome / A. Shimabukuro-Vornhagen, P. Godel, M. Subklewe [et al.] // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. – 2018. – Vol. 6 (1). – P. 56. – DOI 10.1186/s40425-018-0343-9.
114. Cytokine Storm and Covid-19: A Chronicle of Pro-Inflammatory Cytokines / A. Fara, Z. Mitrev, R. A. Rosalia, B. M. Assas // *Open Biology*. – 2020. – Vol. 10 (9). – P. 200160. – DOI 10.1098/rsob.200160.
115. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts / J. Wang, M. Jiang, X. Chen, L. J. Montaner // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2020. – Vol. 108 (1). – P. 17-41.
116. Cytokine Storm in Covid-19: The Current Evidence and Treatment Strategies / Y. Tang, J. Liu, D. Zhang [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1708. – DOI 10.3389/fimmu.2020.01708.
117. Cytokine storm in severe COVID-19 pneumonia / B. Gürsoy, C. Sürmeli D., M. Alkan [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2021. – Vol. 93 (9). – P. 5474-5480. – DOI 10.1002/jmv.27068.
118. Cytokine Storm Induced by Sars-Cov-2 / P. Song, W. Li, J. Xie [et al.] // *Clinica Chimica Acta*. – 2020. – Vol. 509. – P. 280–287. – DOI 10.1016/j.cca.2020.06.017.
119. Cytokine Storm Intervention in the Early Stages of Covid-19 Pneumonia / X. Sun, T. Wang, D. Cai [et al.] // *Cytokine & growth factor reviews*. – 2020. – Vol. 53. – P. 38–42. – DOI 10.1016/j.cytogfr.2020.04.002.
120. Cytokines involved in interferon-gamma production by human macrophages / C. M. Robinson, D. O'Dee, T. Hamilton, G. J. Nau // *Journal of Innate Immunity*. – 2010. – Vol. 2 (1). – P. 56–65. – DOI 10.1159/000247156.

121. Das U. N. Metabolic Syndrome Pathophysiology. The Role of Essential Fatty Acids / U. N. Das. – USA: Wiley-Blackwell, 2010. – 268 p.
122. Deutsche COVID-19 OMICS Initiative (DeCOI). Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment / J. Schulte-Schrepping, N. Reusch, D. Paclik [et al.]. // Cell. – 2020. – Vol. 182 (6). – P. 1419-1440.e23. – DOI 10.1016/j.cell.2020.08.001.
123. Dexamethasone in Hospitalized Patients With Covid-19 / R. C. Group, P. Horby, W. S. Lim [et al.] // The New England Journal of Medicine. – 2021. – Vol. 384 (8). – P. 693–704. – DOI 10.1056/NEJMoa2021436.
124. Dexamethasone modulates immature neutrophils and interferon programming in severe COVID-19 / S. Sinha, N. L. Rosin, R. Arora [et al.] // Nature Medicine. – 2022. – Vol. 28. – P. 201–211.
125. Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity, atherosclerosis and therapeutic effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients / C. Pérez-Sánchez, P. Ruiz-Limón, M. A. Aguirre [et al.] // Journal of Autoimmunity. – 2017. – Vol. 82. – P. 31-40.
126. Differential ability of pandemic and seasonal H1N1 influenza A viruses to alter the function of human neutrophils / N. Malachowa, B. Freedman, D. E. Sturdevant [et al.] // mSphere. – 2018. – Vol. 3 (1). – P. e00567-17.
127. Disease severity-specific neutrophil signatures in blood transcriptomes stratify COVID-19 patients / A. C. Aschenbrenner, M. Mouktaroudi, B. Krämer [et al.] // Genome Med. – 2021. – Vol. 13. – P. 7. – DOI 10.1186/s13073-020-00823-5.
128. Disharmonic Inflammatory Signatures in COVID-19: Augmented Neutrophils' but Impaired Monocytes' and Dendritic Cells' Responsiveness / Z. Parackova, I. Zentsova, M. Bloomfield [et al.] // Cells. – 2020. – Vol. 9. – P. 2206. – DOI: 10.3390/cells9102206.
129. Dutch-Covid-19 response team Rapid SARS-CoV-2 whole-genome sequencing and analysis for informed public health decision-making in the Netherlands / B. B.

- Oude Munnink, D. F. Nieuwenhuijse, M. Stein [et al.] // *Nature Medicine*. – 2020. – Vol. 26. – P. 1405-1410.
130. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China / C. Qin, L. Zhou, Z. Hu [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 71. – P. 762–768. – DOI 10.1093/cid/ciaa248.
131. Dysregulation of the immune response affects the outcome of critical COVID-19 patients / L. L. Wei, W. J. Wang, D. X. Chen, B. Xu // *Journal of Medical Virology*. – 2020. – Vol. 92(11). – P. 2768–2776. – DOI 10.1002/jmv.26181.
132. Early Administration of Interleukin-6 Inhibitors for Patients With Severe COVID-19 Disease is Associated With Decreased Intubation, Reduced Mortality, and Increased Discharge / P. Sinha, A. Mostaghim, C. G. Bielick [et al.] // *International Journal of Infectious Disease*. – 2020. – Vol. 99. – P. 28–33. – DOI 10.1016/j.ijid.2020.07.023.
133. Efficacy and Safety of Pegylated Interferon Alfa-2b in Moderate Covid-19: A Phase Ii, Randomized, Controlled, Open-Label Study / A. Pandit, N. Bhalani, B. L. S. Bhushan [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 105. – P. 516–521. – DOI 10.1016/j.ijid.2021.03.015.
134. Elevated calprotectin and abnormal myeloid cell subsets discriminate severe from mild COVID-19 / A. Silvin, N. Chapuis, G. Dunsmore [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 182 (6). – P. 1401-1418.e18.
135. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study / N. Chen, M. Zhou, X. Dong [et al.] // *Lancet*. – 2020. – Vol. 395. – P. 507–513. – DOI 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
136. Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study / M. J. Cummings, M. R. Baldwin, D. Abrams [et al.] // *Lancet*. – 2020. – Vol. 395 (10239). – P. 1763-1770. – DOI 10.1016/S0140-6736(20)31189-2.



137. Esteban Y. M. An overview of hemophagocytic lymphohistiocytosis / Y. M. Esteban, J. L. O. de Jong, M. S. Teshler // *Pediatric Annals*. – 2017. – Vol. 46. – P. e309–e313.
138. Evaluation of Alpha Defensin, Il-1 Receptor Antagonist, and Il-18 Levels in Covid-19 Patients With Macrophage Activation Syndrome and Acute Respiratory Distress Syndrome / B. Kerget, F. Kerget, A. Aksakal [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2021. – Vol. 93 (4). – P. 2090–2098. – DOI 10.1002/jmv.26589.
139. Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2 / H. Xia, Z. Cao, X. Xie [et al.] // *Cell Reports*. – 2020. – Vol. 33. – P. 108234.
140. Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice / Hashimoto Y., Moki T., Takizawa T. [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2007. – Vol. 178 (4). – P. 2448–2457. – DOI 10.4049/jimmunol.178.4.2448.
141. Expansion of myeloid-derived suppressor cells in patients with severe coronavirus disease (COVID-19) / C. Agrati, A. Sacchi, V. Bordoni [et al.] // *Cell Death & Differentiation*. – 2020. – Vol. 27. – P. 3196–3207.
142. Extrapulmonary manifestations of COVID-19 / A. Gupta, M. V. Madhavan, K. Sehgal [et al.] // *Nature Medicine*. – 2020. – Vol. 26 (7). – P. 1017-1032.
143. Fajgenbaum D. C. Cytokine storm / D. C. Fajgenbaum, C. H. June // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383. – P. 2255–2273.
144. Fang L. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? / L. Fang, G. Karakiulakis, M. Roth // *The Lancet Respiratory Medicine*. – 2020. – Vol. 8. – P. e21.
145. Fu Y. Understanding Sars-Cov-2-Mediated Inflammatory Responses: From Mechanisms to Potential Therapeutic Tools / Y. Fu, Y. Cheng, Y. Wu // *Virologica Sinica*. – 2020. – Vol. 35 (3). – P. 266–271. – DOI 10.1007/s12250-020-00207-4.
146. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients / M. Zheng, Y. Gao, G. Wang [et al.] // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2020. – Vol. 17. – P. 533-535.

147. Functional Exhaustion of Type I and II Interferons Production in Severe Covid-19 Patients / C. Ruetsch, V. Brglez, M. Cremoni [et al.] // *Frontiers in Medicine (Lausanne)*. – 2020. – Vol. 7. – P. 603961. – DOI 10.3389/fmed.2020.603961.
148. Galani I. E. Neutrophils in viral infections: current concepts and caveats / I. E. Galani, E. Andreacos // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2015. – Vol. 98 (4). – P. 557-564.
149. Galli S. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils / S. Galli, N. Borregaard, T. Wynn // *Nature Immunology*. – 2011. – Vol. 12. – P. 1035–1044. – DOI 10.1038/ni.2109.
150. Gandhi R. T. Mild or Moderate Covid-19 / R. T. Gandhi, J. B. Lynch, C. Del Rio // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383. – P. 1757-1766.
151. García L. F. Immune response, inflammation, and the clinical spectrum of COVID-19 / L. F. García // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1441.
152. Ghasemzadeh M. Exhausted Nk Cells and Cytokine Storms in Covid-19: Whether Nk Cell Therapy Could Be a Therapeutic Choice / M. Ghasemzadeh, A. Ghasemzadeh, E. Hosseini // *Human Immunology*. – 2022. – Vol. 83 (1). – P. 86–98. – DOI 10.1016/j.humimm.2021.09.004.
153. GM-CSF-based treatments in COVID-19: reconciling opposing therapeutic approaches / F. M. Lang, M. C. Lee, J. R. Teijaro [et al.] // *Nature Reviews Immunology*. – 2020. – Vol. 20 (8). – P. 1-8.
154. Hashizume M. Outlook of IL-6 Signaling Blockade for Covid-19 Pneumonia / M. Hashizume // *Inflammation and Regeneration*. – 2020. – Vol. 40. – P. 24. DOI 10.1186/s41232-020-00134-7.
155. Hematologic, Biochemical and Immune Biomarker Abnormalities Associated With Severe Illness and Mortality in Coronavirus Disease 2019 (Covid-19): A Meta-Analysis / B. M. Henry, M. H. S. de Oliveira, S. Benoit [et al.] // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. – 2020. – Vol. 58 (7). – P. 1021–1028. – DOI 10.1515/cclm-2020-0369.

156. Hidalgo A. A. NET-thrombosis axis in COVID-19 / A. A. Hidalgo // *Blood*. – 2020. – Vol. 136 (10). – P. 1118-1119. – DOI 10.1182/blood.2020007951
157. High Levels of Circulating Il-8 and Soluble Il-2r Are Associated With Prolonged Illness in Patients With Severe Covid-19 / A. Ma, L. Zhang, X. Ye [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 626235. – DOI 10.3389/fimmu.2021.626235.
158. High-dimensional profiling reveals phenotypic heterogeneity and disease-specific alterations of granulocytes in COVID-19 / M. Lourda, M. Dzidic, L. Hertwig [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2021. – Vol. 118. – P. e2109123118.
159. Hirano T. COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome / T. Hirano, M. Murakami // *Immunity*. – 2020. – Vol. 52 (5). – P. 731-733. – DOI 10.1016/j.immuni.2020.04.003
160. Hu B. The cytokine storm and COVID-19 / B. Hu, S. Huang, L. Yin // *Journal of Medical Virology*. – 2021. – Vol. 93 (1). – P. 250-256.
161. Human Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Molnupiravir, a Novel Broad-Spectrum Oral Antiviral Agent With Activity Against Sars-Cov-2 / W. P. Painter, W. Holman, J. A. Bush [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2021. – Vol. 65 (5). – P. e02428–20. – DOI 10.1128/AAC.02428-20.
162. Human suppressive neutrophils CD16bright/CD62Ldim exhibit decreased adhesion / V. M. Kamp, J. Pillay, J. W. Lammers [et al.] // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2012. – Vol. 92 (5). – P. 1011-1020. – DOI 10.1189/jlb.0612273.
163. Hunter C. A. Il-6 as a Keystone Cytokine in Health and Disease / C. A. Hunter, S. A. Jones // *Nature Immunology*. – 2015. – Vol. 16 (5). – P. 448–457. – DOI 10.1038/ni.3153.
164. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection-a review of immune changes in patients with viral pneumonia / L. Lin, L. Lu, W. Cao, T. Li // *Emerging Microbes And Infections*. – 2020. – Vol. 9 (1). – P. 727–732.

165. Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans / S. Massena, G. Christoffersson, E. Vågesjö [et al.] // *Blood*. – 2015. – Vol. 126. – P. 2016–2026.
166. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration / C. D. Buckley, E. A. Ross, H. M. Mc Gettrick [et al.] // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2006. – Vol. 79. – P. 303–311.
167. IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo / B. Sawitzki, C. I. Kingsley, V. Oliveira [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2005. – Vol. 201 (12). – P. 1925-1935. – DOI 10.1084/jem.20050419.
168. IFN- $\gamma$  is an independent risk factor associated with mortality in patients with moderate and severe COVID-19 infection / A. C. Gadotti, D. M. de Castro, J. P. Telles [et al.] // *Virus Research*. – 2020. – Vol. 289. – P. 191. – DOI 10.1016/j.virusres.2020.198171.
169. Il-18 and Infections: Is There a Role for Targeted Therapies? / A. Vecchie, A. Bonaventura, S. Toldo [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. – 2021. – Vol. 236 (3). – P. 1638–1657. – DOI 10.1002/jcp.30008.
170. Il-1beta/Il-6/Crp and Il-18/Ferritin: Distinct Inflammatory Programs in Infections / J. Slaats, J. Ten Oever, F. L. van de Veerdonk, M. G. Netea // *PLOS Pathogens*. – 2016. – Vol. 12 (12). – P. e1005973. – DOI 10.1371/journal.ppat.1005973.
171. Il-33 Depletion in Covid-19 Lungs / R. Gaurav, D. R. Anderson, S. J. Radio [et al.] // *Chest*. – 2021. – Vol. 160 (5). – P. 1656–1659. – DOI 10.1016/j.chest.2021.06.058
172. Il-6: Relevance for Immunopathology of Sars-Cov-2 / E. O. Gubernatorova, E. A. Gorshkova, A. I. Polinova, M. S. Drutskaya // *Cytokine Growth Factor Rev*. – 2020. – Vol. 53. – P. 13–24. – DOI 10.1016/j.cytogfr.2020.05.009.

173. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19 / D. Blanco-Melo, B. E. Nilsson-Payant, W.-C. Liu [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 181. – P. 1036-1045.e9. – DOI 10.1016/j.cell.2020.04.026.
174. Immune Reactivity During Covid-19: Implications for Treatment / C. Napoli, G. Benincasa, C. Criscuolo [et al.] // *Immunology Letters*. – 2021. – Vol. 231. – P. 28–34. – DOI 10.1016/j.imlet.2021.01.001.
175. Immune response in COVID-19: what is next? / Q. Li, Y. Wang, Q. Sun [et al.] // *Cell death and differentiation*. – 202. – Vol. 29 (6). – P. 1107-1122. – DOI 10.1038/s41418-022-01015-x.
176. Immunophenotyping of Covid-19 and Influenza Highlights the Role of Type I Interferons in Development of Severe Covid-19 / J. S. Lee, S. Park, H. W. Jeong [et al.] // *Science Immunology*. – 2020. – Vol. 5 (49). – P. eabd1554–70. – DOI 10.1126/sciimmunol.abd1554.
177. Impact of SARS-CoV-2 infection on the recovery of peripheral blood mononuclear cells by density gradient / M. D. I. Manunta, G. Lamorte, F. Ferrari [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11 (1). – P. 4904.
178. Impact of Tocilizumab Administration on Mortality in Severe Covid-19 / A. Tsai, O. Diawara, R. G. Nahass, L. Brunetti // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10 (1). – P. 19131. – DOI 10.1038/s41598-020-76187-y.
179. Impaired Immune Cell Cytotoxicity in Severe COVID-19 is IL-6 Dependent / A. Mazzoni, L. Salvati, L. Maggi [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2020. – Vol. 130 (9). – P. 4694–4703. – DOI 10.1172/JCI138554.
180. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients / J. Hadjadj, B. Yatim, A. Corneau [et al.] // *Science*. – 2020. – Vol. 369. – P. 718-724. – DOI 10.1126/science.abc6027.
181. İnandıklioğlu N. Immune Responses to SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 / N. İnandıklioğlu, T. Akkoc // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2020. – Vol. 1288. – P. 5–12. – DOI 10.1007/5584\_2020\_549.

182. Increased peripheral blood neutrophil activation phenotypes and neutrophil extracellular trap formation in critically ill coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients: A case series and review of the literature / J. A. Masso-Silva, A. Moshensky, M. T. Y. Lam // *Clinical Infectious Diseases*. – 2022. – Vol. 74. – P. 479–489. – DOI 10.1093/cid/ciab437.
183. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: A mechanism of immunosuppression in cancer / B. Almand, J. I. Clark, E. Nikitina [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2001. – Vol. 166. – P. 678–689.
184. Induction of Pro-Inflammatory Cytokines (Il-1 and Il-6) and Lung Inflammation by Coronavirus-19 (Covi-19 or Sars-Cov-2): Anti-Inflammatory Strategies / P. Conti, G. Ronconi, A. Caraffa [et al.] // *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. – 2020. – Vol. 34 (2). – P. 327–331. – DOI 10.23812/CONTI-E.
185. Influenza induces IL-8 and GM-CSF secretion by human alveolar epithelial cells through HGF/c-Met and TGF- $\alpha$ /EGFR signaling / Y. Ito, K. Correll, R. L. Zemans [et al.] // *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2015. – Vol. 308 (11). – P. L1178-L1188.
186. Inhibition of SARS-CoV-2 by type I and type III interferons / U. Felgenhauer, A. Schoen, H. H. Gad [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2020. – Vol. 295 (41). – P. 13958–13964. – DOI 10.1074/jbc.AC120.013788.
187. Innate cell profiles during the acute and convalescent phase of SARS-CoV-2 infection in children / M. R. Neeland, S. Bannister, V. Clifford [et al.] // *Nature communications*. – 2021. – Vol. 12. – P. 1084.
188. Innate Immune Response to SARS-CoV-2 Infection: From Cells to Soluble Mediators / D. Ricci, M. P. Etna, F. Rizzo [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22 (13). – P. 7017. – DOI 10.3390/ijms22137017.

189. Interferon Treatments for SARS-CoV-2: Challenges and Opportunities / D. Jhuti, A. Rawat, C. M. Guo [et al.] // *Journal of Infectious Diseases & Therapy*. – 2022. – Vol. 11. – P. 953–972. – DOI 10.1007/s40121-022-00633-9.
190. Interferon-Beta-1a Inhibition of Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2 in Vitro When Administered After Virus Infection / N. Clementi, R. Ferrarese, E. Criscuolo [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 222 (5). – p. 722–725. – DOI 10.1093/infdis/jiaa350.
191. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion / F. Castro, A. P. Cardoso, R. M. Goncalves [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 847. – DOI 10.3389/fimmu.2018.
192. Interferon-Lambda Intranasal Protection and Differential Sex Pathology in a Murine Model of Sars-Cov-2 Infection / S. Y. Sohn, J. Hearing, J. Mugavero [et al.] // *mBio*. – 2021. – Vol. 12 (6). – P. e0275621. – DOI 10.1128/mBio.02756-21.
193. Interferon- $\alpha$ 2b Treatment for COVID-19 / Q. Zhou, V. Chen, C. P. Shannon [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 01061. – DOI 10.3389/fimmu.2020.01061.
194. Interleukin 8 (Il-8) - a Universal Biomarker? / A. Shahzad, M. Knapp, I. Lang, G. Kohler // *International Archives of Medicine*. – 2010. – Vol. 3. – P. 11. – DOI 10.1186/1755-7682-3-11.
195. Interleukin-1 Blockade With High-Dose Anakinra in Patients With Covid-19, Acute Respiratory Distress Syndrome, and Hyperinflammation: A Retrospective Cohort Study / G. Cavalli, G. De Luca, C. Campochiaro [et al.] // *The Lancet Rheumatology*. – 2020. – Vol. 2 (6). – P. e325–e31. – DOI 10.1016/S2665-9913(20)30127-2.
196. Interleukin-17 and Innate Immunity in Infections and Chronic Inflammation / N. Isailovic, K. Daigo, A. Mantovani, C. Selmi // *Journal of Autoimmunity*. – 2015. – Vol. 60. – P. 1–11. – DOI 10.1016/j.jaut.2015.04.006.

197. Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response / M. Sa Ribero, N. Jouvenet, M. Dreux, S. Nisole // *PLOS Pathogens*. – 2020. – Vol. 16. – P. e1008737
198. Ivashkiv L. B. Regulation of type I interferon responses / L. B. Ivashkiv, L. T. Donlin // *Nature Reviews Immunology*. – 2014. – Vol. 14. – P. 36-49. – DOI 10.1038/nri3581.
199. Jalkanen J. Interferon Beta-1a for Covid-19: Critical Importance of the Administration Route / J. Jalkanen, M. Hollmen., S. Jalkanen // *Critical Care*. – 2020. – Vol. 24 (1). – P. 335. – DOI 10.1186/s13054-020-03048-5.
200. Kaplan M. J. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity / M. J. Kaplan, M. Radic // *Journal of Immunology*. – 2012. – Vol. 189 (6). – P. 2689-2695.
201. Kelchtermans H. How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check / H. Kelchtermans, A. Billiau, P. Matthys // *Trends in Immunology*. – 2008. – Vol. 29, № 10. – P. 479–486
202. Kell D. B. The biology of lactoferrin, an iron-binding protein that can help defend against viruses and bacteria / D. B. Kell, E. L. Heyden, E. Pretorius // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1221.
203. Kimura A. Il-6: Regulator of Treg/Th17 Balance / A. Kimura, T. Kishimoto // *European Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 40 (7). – P. 1830–1835. – DOI 10.1002/eji.201040391.
204. Lagunas-Rangel F. A. High IL-6/IFN- $\gamma$  ratio could be associated with severe disease in COVID-19 patients / F. A. Lagunas-Rangel, V. Chávez-Valencia // *Journal of Medical Virology*. – 2020. – Vol. 92 (10). – P. 1789-1790. – DOI 10.1002/jmv.25900.
205. Lamichhane P. P. The role of innate leukocytes during influenza virus infection / P. P. Lamichhane, A. E. Samarasinghe // *Journal of Immunology Research*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 8028725.



206. Lebedev V. V. Hydrophilic hexapeptide imunofan as a hyperactive regulator of transport proteins for multiple drug resistance / V. V. Lebedev, S. A. Novikov // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2006. – Vol. 142, №. 6. – P. 693-695.
207. Lee J. S. The type I interferon response in COVID-19: implications for treatment / J. S. Lee, E.-C. Shin // *Nature Reviews Immunology*. – 2020. – Vol. 20. – P. 585-586.
208. Lees J. R. Interferon gamma in autoimmunity: a complicated player on a complex stage / J. R. Lees // *Cytokine*. – 2015. – Vol. 74. – P. 18–26. – DOI 10.1016/j.cyto.2014.10.014.
209. Leukotriene B4-neutrophil elastase axis drives neutrophil reverse transendothelial cell migration in vivo / B. Colom, J. V. Bodkin, M. Beyrau [et al.] // *Immunity*. – 2015. – Vol. 42. – P. 1075–1086.
210. Li L. Interleukin-33 in Systemic Sclerosis: Expression and Pathogenesis / L. Li, H. Zhu, X. Zuo // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 2663. – DOI 10.3389/fimmu.2018.02663.
211. Liew P. X., Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease / P. X. Liew, P. Kubes // *Physiological Reviews*. – 2019. – Vol. 99. – P. 1223–1248.
212. Longitudinal Analyses Reveal Immunological Misfiring in Severe COVID-19 / C. Lucas, P. Wong, J. Klein [et al.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 584(7821). – P. 463–469. – DOI 10.1038/s41586-020-2588-y.
213. Longitudinal Analysis Reveals That Delayed Bystander CD8+ T Cell Activation and Early Immune Pathology Distinguish Severe COVID-19 From Mild Disease / L. Bergamaschi, F. Mescia, L. Turner [et al.] // *Immunity*. – 2021. – Vol. 54. – P. 1257–1275. – DOI 10.1016/j.immuni.2021.05.010.
214. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients / J. Liu, S. Li, J. Liu [et al.] // *EBioMedicine*. – 2020. – Vol. 55. – P. 102763. – DOI 10.1016/j.ebiom.2020.102763.

215. Longitudinal Profiling of Respiratory and Systemic Immune Responses Reveals Myeloid Cell-Driven Lung Inflammation in Severe COVID-19 / P. A. Szabo, P. Dogra, J. I. Gray [et al.] // *Immunity*. – 2021. – Vol. 54. – P. 797–814. – DOI 10.1016/j.immuni.2021.03.005.
216. Matrix metalloprotease 9 mediates neutrophil migration into the airways in response to influenza virus-induced toll-like receptor signaling / L. M. Bradley, M. F. Douglass, D. Chatterjee [et al.] // *PLOS Pathogens*. – 2012. – Vol. 8 (4). – P. e1002641.
217. Mature CD10+ and immature CD10- neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells / O. Marini, S. Costa, D. Bevilacqua [et al.] // *Blood*. – 2017. – Vol. 129. – P. 1343–1356.
218. Mc Geachy M. J. The Il-17 Family of Cytokines in Health and Disease / M. J. Mc Geachy, D. J. Cua, S. L. Gaffen // *Immunity*. – 2019. – Vol. 50 (4). – P. 892–906. – DOI 10.1016/j.immuni.2019.03.021.
219. Mehta A. K. TNF activity and T cells / A. K. Mehta, D. T. Gracias, M. Croft // *Cytokine*. – 2018. – Vol. 101. – P. 14–18. – DOI 10.1016/j.cyto.2016.08.003.
220. Mendoza V. M. M. Interleukin-17: A Potential Therapeutic Target in Covid-19 / V. M. M. Mendoza // *Journal of Infection*. – 2020. – Vol. 81 (2). – P. e136–e8. – DOI 10.1016/j.jinf.2020.05.072.
221. Mers-Cov Infection in Humans Is Associated With a Pro-Inflammatory Th1 and Th17 Cytokine Profile / W. H. Mahallawi, O. F. Khabour, Q. Zhang [et al.] // *Cytokine*. – 2018. – Vol. 104. – P. 8–13. – DOI 10.1016/j.cyto.2018.01.025.
222. Mishra S. K. One Year Update on the Covid-19 Pandemic: Where Are We Now? / S. K. Mishra, T. Tripathi // *Acta Trop.* – 2021. – Vol. 214. – P. 105778. – DOI 10.1016/j.actatropica.2020.105778.
223. Molecular analysis of thymopentin binding to HLA-DR molecules / Z. Liu, X. Zheng, J. Wang, E. Wang // *PLoS One*. – 2007. – Vol. 2 (12). – P. e1348.

224. Moore J. B., June C. H. Cytokine Release Syndrome in Severe COVID-19 / J. B. Moore, C. H. June // *Science*. – 2020. – Vol. 368 (6490). – P. 473–474. – DOI 10.1126/science.abb8925.
225. Mulcahy M. J. Granulocytes as models for human protein maker identification following nicotine exposure / M. J. Mulcahy, H. A. Lester // *Journal of Neurochemistry*. – 2017. – Vol. 142 (2). – P. 151–161.
226. Nathan C. Neutrophils and COVID-19: Nots, NETs, and knots / C. Nathan // *Journal of Experimental Medicine*. – 2020. – Vol. 217 (9). – P. e20201439.
227. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus / E. Villanueva, S. Yalavarthi, C. C. Berthier [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 187. – P. 538–552.
228. Neonates in the COVID-19 Pandemic / E. J. Molloy, A. Lavizzari, C. Klingenberg [et al.] // *Pediatric Research*. – 2021. – Vol. 89. – P. 1038–1040. – DOI 10.1038/s41390-020-1096-y.
229. Neutrophil Diversity in Health and Disease / C. Silvestre-Roig, Z. G. Fridlender, M. Glogauer, P. Scapini // *Trends in Immunology*. – 2019. – Vol. 40. – P. 565–583.
230. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease / B. Cortjens, O. J. de Boer, R. de Jong [et al.] // *The Journal of Pathology*. – 2016. – Vol. 238 (3). – P. 401-411.
231. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome / E. A. Middleton, X. Y. He, F. Denorme [et al.] // *Blood*. – 2020. – Vol. 136 (10). – P. 1169-1179.
232. Neutrophil Functional Heterogeneity and Implications for Viral Infections and Treatments / L. Chan, S. Morovati, N. Karimi [et al.] // *Cells*. – 2022. – Vol. 11. – P. 1322. – DOI 10.3390/cells11081322.
233. Neutrophil extracellular traps (NETs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs): two potential targets for COVID-19 treatment / S. Cicco, G. Cicco, V.

- Racanelli, A. Vacca // *Mediators of inflammation*. – 2020. – T. 2020. – DOI 10.1155/2020/7527953.
234. Neutrophil Extracellular Traps Exacerbate Ischemic Brain Damage / C. Li, Y. Xing, Y. Zhang [et al.] // *Molecular Neurobiology*. – 2022. – Vol. 59. – P. 643–656. – DOI 10.1007/s12035-021-02635-z
235. Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species / H. Björnsdóttir, A. Welin, E. Michaëlsson [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2015. – Vol. 89. – P. 1024–1035. – DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.398.
236. Neutrophil subset responses in infants with severe viral respiratory infection / B. Cortjens, S. A. Ingelse, J. C. Calis [et al.] // *Clinical Immunology*. – 2017. – Vol. 176. – P. 100–106.
237. Neutrophils in COVID-19: Not Innocent Bystanders / E. McKenna, R. Wubben, J. M. Isaza-Correa [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 864387. – DOI 10.3389/fimmu.2022.864387.
238. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity/ A. Mantovani, M. A. Cassatella, C. Costantini, S. Jaillon // *Nature reviews. Immunology*. – 2011. – Vol. 11 (8). – P.519-31. – DOI 10.1038 / nri3024.
239. Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Drive Necroinflammation in Covid-19 / B. Tomar, H. J. Anders, J. Desai, S. R. Mulay // *Cells*. – 2020. – Vol. 9 (6). – P. 1383–1391. – DOI 10.3390/cells9061383.
240. Neutrophils in COVID-19 / N. Reusch, E. De Domenico, L. Bonaguro [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 652470. – DOI: 10.3389/fimmu.2021.652470.
241. Neutrophils in respiratory syncytial virus infection: a target for asthma prevention / R. J. Geerdink, J. Pillay, L. Meyaard, L. Bont [et al.] // *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2015. – Vol. 136 (4). – P. 838-847.

242. Neutrophils in viral infection / V. Naumenko, M. Turk, C. N. Jenne, S.-J. Kim [et al.] // *Cell and Tissue Research*. – 2018. – Vol. 371 (3). – P. 505–516. – DOI 10.1007/s00441-017-2763-0.
243. Neutrophils Induce a Novel Chemokine Receptors Repertoire During Influenza Pneumonia / J. M. Rudd, S. Pulavendran, H. K. Ashar [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2019. – Vol. 9. – P. 108.
244. Neutrophils infected with highly virulent influenza H3N2 virus exhibit augmented early cell death and rapid induction of type I interferon signaling pathways / F. X. Ivan, K. S. Tan, M. C. Phoon [et al.] // *Genomics*. – 2013. – Vol. 101 (2). – P. 101-112.
245. Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8+ T cells / D. Duffy, H. Perrin, V. Abadie [et al.] // *Immunity*. – 2012. – Vol. 37. – P. 917–929.
246. Newton A. H. The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology / A. H. Newton, A. Cardani, T. J. Braciale // *Seminars in Immunopathology*. – 2016. – Vol. 38 (4). – P. 471-482.
247. Nicotinic receptor involvement in regulation of functions of mouse neutrophils from inflammatory site / V. G. Safronova, C. A. Vulfius, I. V. Shelukhina [et. al.] // *Immunobiology*. – 2016. – Vol. 221, №. 7. – P. 761-772.
248. Novel Coronavirus (2019-Ncov) Infections Trigger an Exaggerated Cytokine Response Aggravating Lung Injury / Y. Liu, C. Zhang, F. Huang [et al.] // *ChinaXiv*. –2020. – DOI 10.12074/202002.00018.
249. O’Connell P. Systemic Innate and Adaptive Immune Responses to Sars-Cov-2 as It Relates to Other Coronaviruses / P. O’Connell, Y. A. Aldhamen // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2020. – Vol. 16 (12). – P. 1–12. – DOI 10.1080/21645515.2020.1802974.
250. Odobasic D., Kitching A. R., Holdsworth S. R. Neutrophil-Mediated Regulation of Innate and Adaptive Immunity: The Role of Myeloperoxidase / // *Journal of Immunology Research*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 2349817.

251. Optimizing antiviral therapy for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in children / G. P. Martynova, M. A. Stroganova, Ya. A. Bogvilene [et al.] // *Pediatrics* n.a. G.N. Speransky. – 2021. – Vol. 100 (3). – P. 208–218. – DOI 10.24110 /0031-403X-2021-100-3-208-218.
252. Pacha O. Covid-19: A Case for Inhibiting Il-17? / O. Pacha, M. A. Sallman, S. E. Evans // *Nature Reviews Immunology*. – 2020. – P. 20 (6). – P. 345–346. – DOI 10.1038/s41577-020-0328-z.
253. Park A. Type I and type III interferons – induction, signaling, evasion, and application to combat COVID-19 / A. Park, A. Iwasaki // *Cell Host & Microbe*. – 2020. – Vol. 27. – P. 870–878. – DOI 10.1016/j.chom.2020.05.008.
254. Park S. E. Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome -coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19) / S. E. Park // *Clinical and Experimental Pediatrics*. – 2020. – Vol. 63. – P. 119–124.
255. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome / Z. Xu, L. Shi, Y. Wang [et al.] // *The Lancet Respiratory Medicine*. – 2020. – Vol. 8. – P. 420-422.
256. Pathophysiological Characteristics and Therapeutic Approaches for Pulmonary Injury and Cardiovascular Complications of Coronavirus Disease 2019 / Y. J. Geng, Z. Y. Wei, H. Y. Qian [et al.] // *Cardiovascular Pathology*. – 2020. – Vol. 47. – P. 107228. – DOI 10.1016/j.carpath.2020.107228.
257. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (Covid-19): A review / W. J. Wiersinga, A. Rhodes, A. C. Cheng [et al.] // *Jama*. – 2020. – Vol. 324 (8). – P. 782–793. – DOI 10.1001/jama.2020.12839.
258. Pattern of local immune alterations in the patients with chronic adenoiditis, and an opportunity of their correction with imunofan / R. N. Kuznetsova, K. A. Syssoev, V. V. Lebedev [et al.] // *Medical Immunology*. – 2014. – Vol. 10, №. 6. – P. 551-562.

259. Peptides: Prospects for Use in the Treatment of COVID-19 / V. Khavinson, N. Linkova, A. Dyatlova [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – P. 4389. – DOI 10.3390/molecules25194389.
260. Pedersen S. F. SARS-CoV-2: a storm is raging / S. F. Pedersen, Y. C. Ho // *Journal of Clinical Investigation*. – 2020. – Vol. 130 (5). – P. 2202-2205. – DOI 10.1172/JCI137647.
261. Persistent SARS-CoV-2 presence is accompanied with defects in adaptive immune system in non-severe COVID-19 patients / B. Liu, J. Han, X. Cheng [et al.] // *medRxiv*. – 2020. – DOI 10.1101/2020.03.26.20044768.
262. Pharmaco-Immunomodulatory Therapy in Covid-19 / J. G. Rizk, K. Kalantar-Zadeh, M. R. Mehra [et al.] // *Drugs*. – 2020. – Vol. 80 (13). – P. 1267–1292. – DOI 10.1007/s40265-020-01367-z.
263. Pharmacological Treatment of Covid-19: An Opinion Paper / A. Garcia-Lledo, J. Gomez-Pavon, J. Gonzalez Del Castillo [et al.] // *Revista Española de Quimioterapia*. – 2022. – Vol. 35 (2). – P. 115–130. – DOI 10.37201/req/158.2021.
264. Pleiotropic immunomodulating effects of peptide arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine on various subsets of neutrophilic granulocytes and their phenotype in patients with COVID-19 in vitro / V. N. Gorodin, V. A. Matushkina, V.N. Chapurina [et al.] // *Medical Immunology*. – 2023. – Vol. 25, № 3. – P. 815-822. – DOI 10.15789/1563-0625-PIE-2755.
265. Priming of the neutrophil respiratory burst: Role in host defense and inflammation / J. El-Benna, M. Hurtado-Nedelec, V. Marzaioli [et al.] // *Immunological Reviews*. – 2016. – Vol. 273. – P.180–193.
266. Productive Replication of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Monocyte-Derived Dendritic Cells Modulates Innate Immune Response / H. Chu, J. Zhou, B. H. Wong [et al.] // *Virology*. – 2014. – Vol. 454-455. – P. 197–205. – DOI 10.1016/j.virol.2014.02.018.
267. Prognostic Value of Interleukin-18 and Its Association With Other Inflammatory Markers and Disease Severity in Covid-19 / H. Satis, H. S. Ozger, P. Aysert Yildiz

- [et al.] // *Cytokine*. – 2021. – Vol. 137. – P.155302. – DOI 10.1016/j.cyto.2020.155302.
268. Proteins associated with neutrophil degranulation are upregulated in nasopharyngeal swabs from SARS-CoV-2 patients / E. Akgun, M. B. Tuzuner, B. Sahin [et al.] // *PLoS One*. – 2020. – Vol. 15 (10). – P. e0240012.
269. Pulendran B. Innate immune sensing and response to influenza / B. Pulendran, M. S. Maddur // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2015. – Vol. 386. – P. 23-71
270. Rayner B. S. Comparative reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants with mammalian cells / B. S. Rayner, D. T. Love, C. L. Hawkins // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2014. – Vol. 71. – P. 240-255.
271. Rdrp Inhibitors and Covid-19: Is Molnupiravir a Good Option? / S. M. R. Hashemian, M. H. Pourhanifeh, M. R. Hamblin [et al.] // *BioMed Pharmacother*. – 2021. – Vol. 146. – P. 112517. – DOI 10.1016/j.biopha.2021.112517.
272. Reactive oxygen species drive herpes simplex virus (HSV)-1-induced proinflammatory cytokine production by murine microglia / S. Hu, W. S. Sheng, S. J. Schachtele, J. R. Lokensgard // *Journal of neuroinflammation*. – 2011. – Vol. 8. – P. 123. – DOI 10.1186/1742-2094-8-123.
273. Reactive oxygen species in the immune system / Y. Yang, A. V. Bazhin, J. Werner, S. Karakhanova // *International Reviews of Immunology*. – 2013. – Vol. 32 (3). – P. 249- 270.
274. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) / B. Diao, C. Wang, Y. Tan [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – DOI 10.3389/fimmu.2020.00827.
275. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition / C. Fauriat, E. O. Long, H. G. Ljunggren, Y. T. Bryceson // *Blood*. – 2010. – Vol. 115. – P. 2167-2176.



276. Respiratory syncytial virus fusion protein promotes TLR-4-dependent neutrophil extracellular trap formation by human neutrophils / G. A. Funchal, N. Jaeger, R. S. Czepielewski [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10 (4). – P. e0124082.
277. Restoration of leukomonocyte counts is associated with viral clearance in COVID-19 hospitalized patients / X. Chen, J. Ling, P. Mo [et al.] // *medRxiv*. – 2020. – DOI 10.1101/2020.03.03.20030437.
278. Retrospective Multicenter Cohort Study Shows Early Interferon Therapy Is Associated with Favorable Clinical Responses in COVID-19 Patients / N. Wang, Y. Zhan, L. Zhu [et al.] // *Cell Host & Microbe*. – 2020. – Vol. 28. – P. 455–464.e2. – DOI 10.1016/j.chom.2020.07.005.
279. Risk factors of critical & mortal COVID-19 cases: a systematic literature review and meta-analysis / Z. Zheng, F. Peng, B. Xu [et al.] // *Journal of Infection*. – 2020. – Vol. 81 (2). – P. e16-e25. – DOI 10.1016/j.jinf.2020.04.021.
280. Role of Il-6 Inhibitor in Treatment of Covid-19-Related Cytokine Release Syndrome / P. Du, J. Geng, F. Wang [et al.] // *International Journal of Medical Sciences*. – 2021. – Vol. 18 (6). – P. 1356–1362. – DOI 10.7150/ijms.53564.
281. Role of neutrophils in CVB3 infection and viral myocarditis / L. Rivadeneyra, N. Charó, D. Kviatcovsky [et al.] // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2018. – Vol. 125. – P. 149-161.
282. Role of the Immune Microenvironment in Sars-Cov-2 Infection / C. H. Ye, W. L. Hsu, G. R. Peng [et al.] // *Cell Transplant*. – 2021. – Vol. 30. – P. 9636897211010632. – DOI 10.1177/09636897211010632.
283. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? / C. Rosales // *Frontiers in Physiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 113.
284. Rothwell S. W. Characterization of influenza A virus binding sites on human neutrophils / S. W. Rothwell, D. G. Wright // *Journal of Immunology*. – 1994. – Vol. 152 (5). – P. 2358-2367.
285. Rybka J. Glycaemia control in critically ill patients is justified and effective / J. Rybka // *Vnitřní lékařství*. – 2010. – Vol. 56 (9). – P. 977-987.

286. SARS-CoV-2 desensitizes host cells to interferon through inhibition of the JAK-STAT pathway / D. Y. Chen, N. Khan, B. J. Close [et al.] // *bioRxiv*. – 2020. – Vol. 10 (27). – P. 358259. – DOI 10.1101/2020.10.27.358259.
287. SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses / A. K. Banerjee, M. R. Blanco, E. A. Bruce [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 183(5). – P.1325-1339.e21. – DOI 10.1016/j.cell.2020.10.004.
288. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease / V. J. Costela-Ruiz, R. Illescas-Montes, J. M. Puerta-Puerta [et al.] // *Cytokine Growth Factor Rev*. – 2020. – Vol. 54. – P. 62–75.
289. SARS-CoV-2 infects T lymphocytes through its spike protein-mediated membrane fusion / X. Wang, W. Xu, G. Hu [et al.] // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2020. – URL: <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0424-9> (accepted March 24, 2020).
290. SARS-CoV-2 ORF10 suppresses the antiviral innate immune response by degrading MAVS through mitophagy / X. Li, P. Hou, W. Ma [et al.] // *Cellular & molecular immunology*. – 2021. – P. 1–12. – DOI 10.1038/s41423-021-00807-4.
291. Sars-Cov-2 variants, vaccines, and host immunity / P. Mistry, F. Barmania, J. Mellet [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 809244. – DOI 10.3389/fimmu.2021.809244.
292. SARS-CoV-2-Induced ARDS Associates with MDSC Expansion, Lymphocyte Dysfunction, and Arginine Shortage / F. Reizine, M. Lesouhaitier, M. Gregoire [et al.] // *Journal of Clinical Immunology*. – 2021. – Vol. 41. – P. 515–525.
293. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology / F. P. Veras, M. C. Pontelli, C. M. Silva [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2020. – Vol. 217. – P. e20201129. DOI 10.1084/jem.20201129.
294. Scheller J. Interleukin-6 and Its Receptor: From Bench to Bedside / J. Scheller, S. Rose-John // *Medical Microbiology and Immunology*. – 2006. – Vol. 195 (4). – P. 173–183. – DOI 10.1007/s00430-006-0019-9.

295. Schönrich G. Neutrophil extracellular traps go viral / G. Schönrich, M. J. Raftery // *Frontiers in Immunology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 366.
296. Schultze J.L. COVID-19 and the human innate immune system / J.L. Schultze, A.C. Aschenbrenner // *Cell*. – 2021. – Vol. 184(7). – P. 1671-1692. – DOI 10.1016/j.cell.2021.02.029.
297. Serum Cytokine and Chemokine Profile in Relation to the Severity of Coronavirus Disease 2019 in China / Y. Chi, Y. Ge, B. Wu [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 222 (5). – P. 746–754. – DOI 10.1093/infdis/jiaa363.
298. Sette A. Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19 / A. Sette, S. Crotty // *Cell*. – 2021. – Vol. 184(4). – P. 861–880. – DOI 10.1016/j.cell.2021.01.007.
299. Severe COVID-19 Shares a Common Neutrophil Activation Signature With Other Acute Inflammatory States / L. F. Schimke, A. H. C. Marques, G. C. Baiocchi [et al.] // *Cells*. – 2022. – Vol. 11. – P. 847. – DOI 10.3390/cells11050847.
300. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases / M. Shibuya // *Journal of Biochemistry*. – 2013. – Vol. 153 (1). – P. 13–19.
301. Should We Stimulate or Suppress Immune Responses in Covid-19? Cytokine and Anti-Cytokine Interventions. / Y. Jamilloux, T. Henry, A. Belot [et al.] // *Autoimmunity Reviews*. – 2020. – Vol. 19 (7). – P. 102567. – DOI 10.1016/j.autrev.2020.102567.
302. Silver nanoparticles promote the emergence of heterogeneous human neutrophil subpopulations / J. A. Fraser, S. Kemp, L. Young [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8 (1). – P. 7506. – DOI 10.1038/s41598-018-25854-2.
303. Sinai Immunology Review Project Immunology of COVID-19: Current State of the Science / N. Vabret, G. J. Britton, C. Gruber [et al.] // *Immunity*. – 2020. – Vol. 52. – P. 910–941. – DOI 10.1016/j.immuni.2020.05.002.
304. Single-cell Landscape of Bronchoalveolar Immune Cells in Patients With COVID-19 / M. Liao, Y. Liu, J. Yuan [et al.] // *Nature Medicine*. – 2020. – Vol. 26 (6). – P. 842-844. – DOI 10.1038/s41591-020-0901-9.

305. Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection / X. Xie, Q. Shi, P. Wu [et al.] // *Nature Immunology*. – 2020. – Vol. 21. – P. 1119-1133. – DOI 10.1038/s41590-020-0736-z.
306. Structure-based Design of Antiviral Drug Candidates Targeting the SARS-CoV-2 Main Protease / W. Daio, B. Zhang, H. Su [et al.] // *Science*. – 2020. – DOI 10.1126/science.abb4489.
307. Su H. Interleukin-6 Signaling Pathway and Its Role in Kidney Disease: An Update / H. Su, C. T. Lei, C. Zhang // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 405. – DOI 10.3389/fimmu.2017.00405.
308. Systemic and mucosal antibody secretion specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19' / C. Cervia, J. Nilsson, Y. Zurbuchen [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2021. – Vol. 147 (2). – P. 545-557.e9.
309. Tan M. K. X. The Potential Use of Metformin, Dipyridamole, N-Acetylcysteine and Statins as Adjunctive Therapy for Systemic Lupus Erythematosus / M. K. X. Tan, T. Y. J. Heng, A. Mak // *Cells*. – 2019. – Vol. 8 (4). – P. 323.
310. Tamassia N. Fast and accurate quantitative analysis of cytokine gene expression in human neutrophils / N. Tamassia, M. A. Cassatella, F. Bazzoni // *Methods in molecular biology*. – 2014. – Vol. 1124. – P. 451– 67 – DOI 10.1007/978-1-62703-845-4 27.
311. Tanaka T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease / T. Tanaka, M. Narazaki, T. Kishimoto // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2014. – Vol. 6 (10). – P. a016295. – DOI 10.1101/cshperspect.a016295.
312. Tanaka T. Immunotherapeutic Implications of Il-6 Blockade for Cytokine Storm / T. Tanaka, M. Narazaki, T. Kishimoto // *Immunotherapy*. – 2016. – Vol. 8 (8). – P. 959–970. – DOI 10.2217/imt-2016-0020.
313. Targeting Gm-Csf in Covid-19 Pneumonia: Rationale and Strategies / A. Bonaventura, A. Vecchie, T. S. Wang [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P.1625. – DOI 10.3389/fimmu.2020.01625.

314. Targeting host cell proteases to prevent SARS-CoV-2 invasion / U. Kaur, S. S. Chakrabarti, B. Ojha [et al.] // *Current Cancer Drug Targets*. – 2021. – Vol. 22. – P. 192–201.
315. Targeting Neutrophils to Treat Acute Respiratory Distress Syndrome in Coronavirus Disease / C. C. Chiang, M. Korinek, W. J. Cheng, T. L. Hwang // *Frontiers in Pharmacology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 572009.
316. Targeting of Neutrophil Lewis X Blocks Transepithelial Migration and Increases Phagocytosis and Degranulation / J. C. Brazil, R. Sumagin, R. D. Cummings [et al.] // *The American Journal of Pathology*. – 2016. – Vol. 186. – P. 297–311.
317. Targeting Potential Drivers of Covid-19: Neutrophil Extracellular Traps / B. J. Barnes, J. M. Adrover, A. Baxter-Stoltzfus [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2020. – Vol. 217 (6). – P. e20200652–9. – DOI 10.1084/jem.20200652.
318. Th17 and Treg Cells Function in Sars-Cov2 Patients Compared With Healthy Controls / A. Sadeghi, S. Tahmasebi, A. Mahmood [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. – 2021. – Vol. 236 (4). – P. 2829–2839. – DOI 10.1002/jcp.30047.
319. The antiviral compound remdesivir potently inhibits RNA-dependent RNA polymerase from Middle East respiratory syndrome coronavirus. / C. J. Gordon, E. P. Tchesnokov, J. Y. Feng [et al.] // *The Journal Of Biological Chemistry*. – 2020. – Vol. 295 (15). – P. 4773—4779. – DOI 10.1074/jbc.AC120.013056.
320. The complement system in COVID-19: friend and foe? / A. Java, A. J. Apicelli, M. K. Liszewski [et al.] // *JCI Insight*. – 2020. – Vol. 5 (15). – P. e140711. – DOI 10.1172/jci.insight.140711.
321. The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system / F. Coperchini, L. Chiovato, L. Croce [et al.] // *Cytokine Growth Factor Rev*. – 2020. – Vol. 53. – P. 25–32.
322. The Emerging Role of Neutrophils in the Pathogenesis of Thrombosis in COVID-19 / V. Iliadi, I. Konstantinidou, K. Aftzoglou [et al.] // *International Journal of*

- Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22 (10). – P. 5368. – DOI 10.3390/ijms22105368.
323. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil / L. C. Parker, M. K. Whyte, S. K. Dower, I. Sabroe // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2005. – Vol. 77 (6). – P. 886-892.
324. The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity / Q. Li, J. Wu, J. Nie [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 182. – P. 1284-1294.e9.
325. The interplay between neutrophils, complement, and microthrombi in COVID-19 / Y. Zuo, Y. Kanthi, J. S. Knight, A. H. J. Kim // *Best Practice & Research: Clinical Rheumatology*. – 2021. – Vol. 35 (1). – P. 101661.
326. The characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia / F. Wang, J. Nie, H. Wang [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 221. – P. 1762–1769. – DOI 10.1093/infdis/.
327. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo / A. Woodfin, M.-B. Voisin, M. Beyrau [et al.] // *Nature Immunology*. – 2011. – Vol. 12. – P. 761–769.
328. The Neutrophil's Choice: Phagocytose vs. Make Neutrophil Extracellular Traps / A. A. Manfredi, G. A. Ramirez, P. Rovere-Querini, N. Maugeri // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 288.
329. The Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Directly Decimates Human Spleens and Lymph Nodes / Y. Chen, Z. Feng, B. Diao [et al.] // *medRxiv*. – 2020. – DOI 10.1101/2020.03.27.20045427.
330. The Prognostic Value of Il-8 for the Death of Severe or Critical Patients With Covid-19 / H. Li, J. Zhang, C. Fang [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. – 2021. – Vol. 100 (11). – P. e23656. – DOI 10.1097/MD.00000000000023656.
331. The Relationship Between Cytokine and Neutrophil Gene Network Distinguishes SARS-CoV-2-Infected Patients by Sex and Age / P. P. Freire, A. H. Marques, G. C. Baiocchi. [et al.] // *JCI Insight*. – 2021. – Vol. 6. – P. e147535. – DOI 10.1172/jci.insight.147535.

332. The Role of Cytokines and Chemokines in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infections / R.-J. Hsu, W.-C. Yu, G.-R. Peng [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 832394. – DOI 10.3389/fimmu.2022.832394.
333. The Role of Cytokines Including Interleukin-6 in Covid-19 Induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease / D. Mc Gonagle, K. Sharif, A. O'Regan, C. Bridgewood // *Autoimmunity Reviews*. – 2020. – Vol. 19 (6). – P. 102537. – DOI 10.1016/j.autrev.2020.102537.
334. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention / M. Z. Tay, C. M. Poh, L. Renia [et al.] // *Nature Reviews Immunology*. – 2020. – Vol. 20 (6). – P. 363-374. – DOI: 10.1038/s41577-020-0311-8.
335. Thymopentin and splenopentin as immunomodulators / V. K. Singh, S. Biswas, K. B. Mathur [et al.] // *Immunologic Research*. – 1998. – Vol. 17. – P. 345–368.
336. Tnf and Ros Crosstalk in Inflammation / H. Blaser, C. Dostert, T. W. Mak, D. Brenner // *Trends in Cell Biology*. – 2016. – Vol. 26 (4). – P. 249–261. – DOI 10.1016/j.tcb.2015.12.002.
337. Treatment of Refractory Hemophagocytic Lymphohistiocytosis With Emapalumab Despite Severe Concurrent Infections / D. T. Louder, Q. Bin, C. de Min, M. B. Jordan [et al.] // *Blood advances*. – 2019. – Vol. 3 (1). – P. 47–50. – DOI 10.1182/bloodadvances.2018025858.
338. Todorović-Raković N. Between immunomodulation and immunotolerance: The role of IFN $\gamma$  in SARS-CoV-2 disease / N. Todorović-Raković, J. R. Whitfield // *Cytokine*. – 2021. – Vol. 146. – P. 155637. – DOI 10.1016/j.cyto.2021.155637.
339. Trials of Anti-Tumour Necrosis Factor Therapy for Covid-19 Are Urgently Needed / M. Feldmann, R. N. Maini, J. N. Woody [et al.] // *Lancet*. – 2020. – Vol. 395(10234). – P. 1407–1409. – DOI 10.1016/S0140-6736(20)30858-8.
340. Triple Combination of Interferon Beta-1b, Lopinavir-Ritonavir, and Ribavirin in the Treatment of Patients Admitted to Hospital With Covid-19: An Open-Label, Randomised, Phase 2 Trial / I. F. Hung, K. C. Lung, E. Y. Tso [et al.] // *Lancet*. –

2020. – Vol. 395 (10238). – P. 1695–704. – DOI 10.1016/S0140-6736(20)31042-4.
341. Type 1 Interferons as a Potential Treatment Against Covid-19 / E. Sallard, F. X. Lescure, Y. Yazdanpanah [et al.] // *Antiviral Research*. – 2020. – Vol. 178. – P. 104791. – DOI 10.1016/j.antiviral.2020.104791.
342. Type I and Type III Interferons Restrict SARS-CoV-2 Infection of Human Airway Epithelial Cultures / A. Vanderheiden, P. Ralfs, T. Chirkova [et al.] // *Journal of virology*. – 2020. – Vol. 94(19). – P. e00985-20. – DOI 10.1128/JVI.00985-20.
343. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia / E. Kamphuis, T. Junt, Z. Waibler [et al.] // *Blood*. – 2006. – Vol. 108. – P. 3253-3261.
344. Type I, II, and III Interferon Signatures Correspond to Coronavirus Disease 2019 Severity / M. H. Kim, S. Salloum, J. Y. Wang [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 224 (5). – P. 777–782. – DOI 10.1093/infdis/jiab288.
345. Ulhaq Z. S. Interleukin-6 as a Potential Biomarker of Covid-19 Progression / Z. S. Ulhaq, G. V. Soraya // *Médecine et maladies infectieuses*. – 2020. – Vol. 50 (4). – P. 382–383. – DOI 10.1016/j.medmal.2020.04.002.
346. Ulrich H. CD147 as a target for COVID-19 treatment: suggested effects of azithromycin and stem cell engagement / H. Ulrich, M. M. Pillat // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2020. – Vol. 16 (3). – P. 434-440. – DOI 10.1007/s12015-020-09976-7.
347. Understanding the role of neutrophils in acute respiratory distress syndrome / S. C. Yang, Y. F. Tsai, Y. L. Pan, T. L. Hwang // *Biomedical journal*. – 2021. – Vol. 44 (4). – P. 439-446.
348. USFQ-COVID19 consortium SARS-CoV-2 ORF3b is a potent interferon antagonist whose activity is increased by a naturally occurring elongation variant / Y. Konno, I. Kimura, K. Uriu [et al.] // *Cell Reports*. – 2020. – Vol. 32. –P. 108-185.



349. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) as a Vital Target for Brain Inflammation during the COVID-19 Outbreak / X.-X. Yin, X.-R. Zheng, W. Peng [et al.] // ACS chemical neuroscience. – 2020. – Vol. 11 (12). – P. 1704-1705. – DOI 10.1021/acscchemneuro.0c00294.
350. VEGF-D: a novel biomarker for detection of COVID-19 progression / Y. Kong, J. Han, X. Wu [et al.] // Critical Care Medicine. – 2020. – Vol. 24 (1). – P. 1–4.
351. Viral Pathogen-Induced Mechanisms to Antagonize Mammalian Interferon (Ifn) Signaling Pathway / J. M. Rojas, A. Alejo, V. Martin, N. Sevilla // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2021. – Vol. 78 (4). – P. 1423–1444. – DOI 10.1007/s00018-020-03671-z.
352. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19 / Y. Jin, H. Yang, W. Ji [et al.] // Viruses. – 2020. – Vol. 12 (4). – P. 372. – DOI 10.3390/v12040372.
353. Virtual screening of approved clinic drugs with main protease (3CLpro) reveals potential inhibitory effects on SARS-CoV-2 / Q. Wang, Y. Zhao, X. Chen, A. Hong // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. – 2020. – P. 1–11.
354. Von Holle T. A. Influenza and antibody-dependent cellular cytotoxicity / T. A. Von Holle, M. A. Moody // Frontiers in Immunology. – 2019. – Vol. 10. – P. 1457.
355. Wood K. J. Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo / K. J. Wood, B. Sawitzki // Trends in Immunology. – 2006. – Vol. 27 (4). – P.183-187. – DOI 10.1016/j.it.2006.02.008.
356. Wu Z. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention / Z. Wu, J. M. McGoogan // JAMA. – 2020. – Vol. 323. – P. 1239-1242. – DOI 10.1001/jama.2020.2648pmid:320915332.
357. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, 2023. – URL: <https://covid19.who.int/> (Accessed 21/02/2023).

358. Xu X. Immunological responses against SARS-coronavirus infection in humans / X. Xu, X. Gao // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2004. – Vol. 1 (2). – P. 119–122.
359. Ye Q. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19 / Q. Ye, B. Wang, J. Mao // *Journal of Infection*. – 2020. – Vol. 80 (6). – P. 607–613. – DOI 10.1016/j.jinf.2020.03.037.
360. Yipp B. G. NETosis: how vital is it? / B. G. Yipp, P. Kubes // *Blood*. –2013. – Vol. 122 (16). – P. 2784-2794.
361. Zhang R.-L. Controlled clinical study on 49 patients of SARS treated by integrative Chinese and Western medicine / R.-L. Zhang, Q. Jiao, B.-G. Wang // *Chinese journal of integrated traditional and Western medicine*. – 2003. – Vol. 23. – P. 654–657.
362. Zhao C. NLRP3 inflammasome-a key player in antiviral responses / C. Zhao, W. Zhao // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 211.
363. Zhou X. Cellular Immune Response to COVID-19 and Potential Immune Modulators / X. Zhou, Q. Ye // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.646333> (accepted April 16, 2021).
364.  $\beta$ 2 integrin mediates hantavirus-induced release of neutrophil extracellular traps / M. J. Raftery, P. Lalwani, E. Krautkrämer [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2014. – Vol. 211 (7). – P. 1485-1497.