

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.

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научные руководители:**

**Городин Владимир Николаевич**, доктор медицинских наук, профессор;

**Нестерова Ирина Вадимовна**, доктор медицинских наук, профессор.

**Официальные оппоненты:**

**Балмасова Ирина Петровна** - доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, ведущий научный сотрудник лаборатории медико-биологических исследований Научно-исследовательского медицинского стоматологического института ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России.

**Бургасова Ольга Александровна** - доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры инфекционных болезней с курсом эпидемиологии и фтизиатрии Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы" (РУДН) Минобрнауки России

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России).

Защита диссертации состоится « 20 » сентября 2024 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 64.1.010.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и на сайте института [www.cgie.ru](http://www.cgie.ru).

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

Николаева Светлана Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования и степень её разработанности**

Коронавирус (SARS-CoV-2), обладая широким тканевым тропизмом, тенденциями эволюционировать в различные варианты, способностью нарушать и использовать в своих целях иммунный ответ (ИО), представляет серьёзную проблему, что, вероятно, увековечит пандемию COVID-19 (Ricci D. et al., 2021; Li Q. et al., 2022). Поэтому актуальным является не только углублённое изучение патофизиологии COVID-19, но и разработка новых терапевтических подходов к лечению этого сложного заболевания.

Доказано, что тяжесть и исходы COVID-19 связаны с иммунными реакциями организма, часто неуправляемыми и неконтролируемыми, что подчёркивает необходимость дальнейшего изучения всего спектра иммунных дисрегуляторных нарушений, вызванных SARS-CoV-2 (Schultze J. et al., 2021; Sette A. et al., 2021).

Выявлено, что SARS-CoV-2 ингибирует IFN I типа, нарушая механизмы реагирования иммунной системы (ИС) (Lagunas-Rangel F.A. et al., 2020). Показано, что на фоне снижения количества Т-лимфоцитов (Тл), естественных киллерных клеток (ЕКК) повышается репликативная активность SARS-CoV-2, и инфекция приобретает неконтролируемый характер. Гиперактивация макрофагов приводит к усилению синтеза цитокинов, которые способствуют нейтрофилёзу, синтезу нейтрофильными гранулоцитами (НГ) *de novo* цитокинов, хемокинов и гиперактивации НГ (Hu B. et al., 2021; McKenna E., 2022). НГ реализуют противовирусную активность путем фагоцитоза вирионов и апоптотических телец, содержащих вирус, дегрануляции, активации NADPH-оксидаз, активных форм кислорода (АФК), формирования нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NETs) (Долгушин И.И., 2019; Ruan Q. et al., 2020; McKenna E., 2022). Являясь клетками многофункциональными, НГ действуют как эффекторы врожденного иммунитета и регуляторы адаптивных иммунных процессов. Нарушения функций НГ, количественный дефицит приводят к формированию нетипично-протекающих заболеваний, а нейтрофилёз и гиперактивация НГ; повышенное образование NETs служат причиной нетопатий, сопровождающихся повреждением тканей различных органов, формированию иммунотромбозов мелких и крупных сосудов, развитию эндотелиита и васкулита (Нестерова И.В. и др., 2018, 2022; Долгушин И.И., 2019; Chiang C. et al., 2020). При COVID-19 установлено, что нейтрофилёз и повышенное формирование NETs у пациентов коррелирует с развитием ОРДС, тромбозов, мультисистемного воспаления (Middleton E. et al., 2020; Hidalgo A., 2020; Mc. Kenna E., 2022). Принимая во внимание транскрипционное и функциональное разнообразие НГ, наличие субпопуляций с разным функциональным потенциалом, углубленное изучение роли НГ позволит получить новые данные о механизмах иммунопатогенеза заболевания, лежащих в основе разнообразных клинических проявлений COVID-19, и может явиться обоснованием для дальнейшей разработки таргетных терапевтических стратегий (Нестерова И.В. и др., 2021-2023; Costa S. et al., 2019).

Возможно также предположить, что нацеленная иммунокоррекция дисфункций НГ, их гиперактивации, обуславливающей гипервоспаление, учитывая регуляторные функции НГ, позволит восстановить баланс базисных противовирусных механизмов ИС.

### **Степень разработанности темы**

Показано, что при COVID-19 обострение лёгочной и системной воспалительной реакции сопровождается повышением уровней СРБ, ферритина, D-димера, ИЛ6 (Guan W. et al., 2020; Mehta P. et al., 2020), гиперцитокинемией (Hirano T., Murakami M., 2020), описаны профили цитокинов (Huang C., et al. 2020; Wan S. et al., 2020). Выявлена лимфопения, обусловленная снижением Тл (Wan S. et al., 2020; Vabret N. et al., 2020). Установлены механизмы уменьшения количества Тл: прямое инфицирование SARS-CoV-2 через мембранный спайковый белок; некроз, апоптоз, пироптоз, индуцированные TNF $\alpha$ , ИЛ6, ИЛ1 $\beta$  (Wang X. et al., 2020; Diao B. et al., 2020); рециркуляция в участки инфекции, удержание в лимфоидных органах, прикрепление к эндотелию (Liao Y. et al., 2020; Xu Z. et al., 2020); нарушение функций Тл из-за снижения уровня IFN I типа (Qin C. et al., 2020; Wei L.L. et al., 2020). Выявлено, что для COVID-19 характерно повышение НГ, а соотношение НГ к ЛФ – предиктор тяжести и исхода заболевания (McKenna E. et al., 2022). Цитокины, продуцируемые НГ при COVID-19, поддерживают воспаление, а АФК и NETs участвуют в повреждении тканей (Ruan Q. et al., 2020; Lamichhane P. et al., 2022). Появились отчеты терапевтического воздействия на НГ, нацеленные на цитокины - ингибиторы ИЛ6 (тоцилизумаб, сарилумаб, клазакизумаб), которые снижают выживаемость НГ, выход НГ из КМ и демаргинацию лёгких (Sinha P. et al., 2020; Molloy E.J. et al., 2021). Спектр работ посвящён иммунопатогенезу гипервоспаления, вызванного NETs, и гипотезам возможной терапии, нацеленной на снижение их образования (Masso C. et al., 2022; Li C., 2022). Выявлено, что патофизиология тяжёлой формы COVID-19 характеризуется изменением количества, фенотипа и функций НГ (Кассина Д.В. и др., 2020; Masso-Silva J. et al., 2022). Эти результаты важны для понимания многих аспектов участия НГ в COVID-19 и требуют исследования.

### **Цель исследования**

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

### **Задачи исследования**

1. Определить клинико-лабораторные особенности среднетяжёлой и тяжёлой форм COVID-19, характерные для острого периода болезни (7-10 сутки).
2. Провести сравнительный анализ наиболее значимых клинико - 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 иммуностропных субстанций рекомбинантного интерферона альфа 2b и синтетического тимического гексапептида при COVID-19 среднетяжёлого течения в эксперименте *in vitro*.

### Научная новизна

Детектированы новые ранние диагностические критерии COVID-19: для среднетяжёлой 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 ИДК до 11,6 (8,8-13,6); для тяжёлой 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, сформировавших NETs, и НГ в состоянии патологического апоптоза в ПК, планируется регистрация в Федеральной службе по интеллектуальной собственности 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)<sup>-</sup>, CD4(Тх), CD8(ТцТл), 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 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 рекИФН $\alpha$ 2b, способствующие восстановлению негативно изменённого 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 работы**

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 ПК; увеличение содержания НГ субпопуляций с высокой цитотоксической активностью и способностью формирования NETs с фенотипом CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>bright</sup> и с фенотипом CD16<sup>dim</sup>CD62L<sup>dim</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>-</sup> с функцией супрессирования Тл. А также индикаторные биомаркеры – цитокины IL8, IL18, IL17A, VEGFA, высокие уровни которых свидетельствуют о прогрессировании COVID-19 и возможности осложнений в виде протромботического состояния, иммунотромбоза и эндотелиита сосудов.

Полученные в системе *in vitro* данные о позитивных иммуномодулирующих эффектах влияния рекИФН $\alpha$ 2b и гексапептида на негативно трансформированные фенотипы 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 исследования основана на анализе данных отечественной и зарубежной литературы в области инфекционных болезней, иммунологии по проблемам COVID-19. Работа выполнена в дизайне проспективного когортного и экспериментального *in vitro* исследований. Использован комплекс общенаучных подходов, включающий: аналитический метод – анализ научной литературы; диагностические методы (общеклинические, биохимические, иммунологические, культуральные); эмпирические

методы (сбор лабораторных данных, сравнение, логический анализ); современные статистические методы. 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 реИФН $\alpha$ 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.**

Методы расширенной оценки фенотипа субпопуляций НГ для выявления дефектов функционирования НГ, маркеры тяжести инфекционного процесса при COVID-19 используются в научно-диагностической работе ЦНИЛ ФГБОУ ВО КубГМУ, ГБУЗ «Инфекционная больница №2» МЗ КК, 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 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 МГТУ. Учебное пособие утверждено ЦМС ФГБОУ ВО КубГМУ МЗ РФ (Протокол № 4 от 18.04.2024 г), ISBN:978-5-903252-68-8.

#### **Личный вклад автора в получение результатов.**

Диссертант принимал личное участие на всех этапах работы: осуществлял выполнение экспериментальной лабораторной и клинической части исследования – комплексное иммунологическое исследование пациентов, анализ и статистическую обработку данных. Под руководством научных руководителей разработана методология исследования, дизайн исследования. Подбор клинических групп проводился совместно с сотрудниками ГБУЗ «Специализированная клиническая инфекционная больница», ГБУЗ «Инфекционная больница №2» МЗ Краснодарского края. Написание текста и оформление диссертационной работы проведены автором под контролем научных руководителей.

#### **Степень достоверности и апробация результатов.**

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

Материалы представлены на Международном медицинском форуме «Вузовская наука. Инновации» (7-8 февраля 2020 г., 28 апреля 2022 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, IX, XII Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (26-29 октября, 2021г., 8-11 ноября 2022г., 7-10 ноября, 2023г., г. Сочи.). Апробация работы проведена 13.05.2024г, протокол №6 на совместном заседании кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФПК и ППС и кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «КубГМУ» Минздрава России.

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

Диссертационная работа соответствует паспорту научных специальностей: 3.1.22. Инфекционные болезни: пунктам 1,2,3 и 3.2.7. Иммунология: пунктам 2,3,5,6,7.

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

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

**Структура и объём работы.** Диссертация имеет традиционную структуру, состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, 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.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Дизайн исследования

Исследование выполнено в период 2020-2023 гг. на кафедре инфекционных болезней и эпидемиологии ФПК и ППС, в отделе клиническо-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО КубГМУ МЗ РФ; ГБУЗ "Специализированная клиническая инфекционная больница", ГБУЗ «Инфекционная больница №2» МЗ КК.

Проведено исследование 116 человек: 86 пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формой COVID-19, 30 условно-здоровых взрослых лиц. Набор клинического материала осуществлялся с мая по июль 2021 года. Вариант штамма SARS-COV2 -B.1.617, «Дельта». В качестве объекта исследования использовали истории болезни, периферическую кровь (ПК) пациентов с COVID-19 при поступлении в стационар. Был разработан дизайн исследования (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Дизайн исследования

Исследования проводились в соответствии с требованиями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации с правками от 2013 года и статьями 20, 22, 23 ФЗ № 323 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 г. (ред. от 22.12.2020). У пациентов, включенных в исследование, было получено письменное

информированное согласие на сбор анамнеза, забор ПК, лабораторные исследования, обработку полученных данных, публикацию результатов исследования.

Пациенты, были разделены на группы, отличающиеся формой тяжести течения заболевания (Таблица 1).

Таблица 1 –Характеристика клинических групп и проведенных исследований

Группы	Характеристика клинических групп	Количество		
		человек	исследований	
Группа сравнения (ГС)	Условно-здоровые добровольцы 57 (54; 70)лет	30	579	
Клинические группы с COVID-19	Клинико-инструментальные и лабораторные показатели			
Группа исследования 1 (ГИ1) пациенты со среднетяжёлой формой 59 (54; 70) 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 легких КТ 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 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, КТ 3-4 -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				
ГИ1 пациенты со среднетяжёлой формой COVID-19 59 (54; 70) лет	ГИ1+рекИФН $\alpha$ 2b	Исследования НГ до и после инкубации ПК с рекИФН $\alpha$ 2b (50 Ме/мл, 60 мин, 37°C)	45	272
	ГИ1+ ГП (гексапептид)	Исследования НГ до и после инкубации ПК с гексапептидом (ГП)(10 <sup>-7</sup> мг/мл)	45	272
<b>Всего</b>		<b>116</b>	<b>3 183</b>	

Критерии включения пациентов в исследование:

- возраст пациентов с 20 до 80 лет;
- пациенты с подтвержденными ПЦР – тестом случаями заболевания COVID-19 в острый период заболевания на 7-10 сутки при поступлении в стационар;
- больные женского и мужского пола;
- информированное согласие больного, а также условно-здоровых добровольцев на проведение забора и исследование ПК.

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;

- беременные женщины, женщины в периоде лактации;
- отказ пациента от проведения исследования.

Оценка клинического статуса, степени тяжести заболевания, инструментальная (лучевая), лабораторная диагностика проводились в соответствии с актуальной версией Временных методических рекомендаций (ВМР) «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 10» (МЗ РФ от 08.02.2021).

Для оценки клинического статуса проводился сбор жалоб, анамнеза (опроса, анкетирование), термометрия, объективный осмотр, оценка объективного статуса (в т.ч. по шкале qSOFA) и клинического течения основного заболевания. Проводился мониторинг кардио-респираторной системы: ЭКГ, частота сердечных сокращений, частота дыханий, артериальное давление, показатель сатурации - SpO<sub>2</sub>. Степень специфического поражения лёгких оценивалась по данным мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ).

Общий анализ крови выполнялся на геманализаторе Sysmex XN-1000 (Япония). Дополнительно в мазке ПК с окраской по Романовскому-Гимза осуществлялся учёт количества НГ, сформировавших NETs и ушедших в апоптоз на 100 НГ, рассчитывался интеграционный диагностический критерий (ИДК) : 
$$\text{ИДК} = \frac{\% \text{ неизменных НГ}}{\% \text{NET} + \% \text{НГ в апоптозе}}$$

Для оценки выраженности ОДН проводилось определение: альбумина, глюкозы, АЛТ, АСТ, ЛДГ, ферритина, СРБ, D-димера (Beckman Coulter AU 480 (США), реагенты BioSystems (Испания); параметры КЩС, концентрация лактата на анализаторе GEM Premier 3500 (США).

Уровни IgG, IgA, IgM; интерферонов IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , цитокинов TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL4, IL6, IL8, IL10, IL17A, IL18, VEGFA определяли ИФА, анализатор ASCENT (Финляндия), тест-системы (Cloud-Clone, США). Содержание субпопуляций лимфоцитов (ЛФ), НГ и плотность экспрессии рецепторов (MFI) - на Cytomics FC-500 («Beckman Coulter», США). Изменения показателя MFI были обозначены как bright-высокая, mid - средняя, dim – низкая. Фагоцитарная функция НГ тестировалась с учетом степени завершенности по отношению к *S.aureus*. Определяли долю активно-фагоцитирующих НГ (%ФАН); объем захвата – фагоцитарное число (ФЧ) и индекс (ФИ); процент (%П) и (ИП) индекс переваривания. NADPH-оксидазную активность оценивали в NBT тесте (спонтанном и стимулированном) по среднему цитохимическому индексу (СЦИ) и по доле формазан позитивных клеток (%ФПК).

Изучение влияния рекИФН $\alpha$ 2b и тимического ГП на субпопуляции и функции НГ проводилось культуральными методами в системе *in vitro* (ламинар Mars 1500 (Scanlaf, Дания), CO<sub>2</sub>-инкубатор «New Brunswick Scientific Galaxy 170S» (Великобритания).

Для анализа результатов применялись программы Microsoft Exel 2016 и StatPlus 2017. По критериям Шапиро–Уилка 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<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>) между 25-м и 75-м перцентилями. По U-критерию Манна–Уитни определяли статистически значимые различия при p<0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на быструю разработку и внедрение вакцин и перепрофилированных противовирусных препаратов с начала 2020 г. по 2024 год в Российской Федерации SARS-CoV-2 стал причиной более 23 983 769 подтвержденных случаев заражения и 402 773 смертей (ВОЗ). В Краснодарском крае, включая г. 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 этапы отбора, адаптируясь и повышая свои возможности ускользать от механизмов противовирусной иммунной защиты, одновременно вызывая нарушение функционирования ИС (Массо С. et al., 2022). В связи с этим, дальнейшее изучение дисфункций противовирусного иммунитета при COVID-19 остается актуальной проблемой.

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%), астенический синдром (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 (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Превалирующие симптомы острого периода болезни при поступлении в стационар

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 и характеризуют клиническую непредсказуемость COVID-19.

Анамнестические данные позволили выявить у пациентов исследуемых групп с COVID-19 коморбидные заболевания. Наиболее часто отмечались заболевания сердечно-сосудистой системы (60,4%), среди которой 41,9% приходилось на артериальную гипертензию (ГБ), 12,8% - на ишемическую болезнь сердца (ИБС) и 13,9% - на

хроническую сердечную недостаточность ФК 1 и 2 класса (ХСН). У 20,3% пациентов отмечался сахарный диабет 2 типа и в 27,9% случаев - ожирение. Также выявлялись хронические болезни почек, инфекции мочевыводящих путей (МВП), хронический панкреатит, болезни лёгких и щитовидной железы. Доля пациентов, имеющих 3 и более коморбидных патологий, составила 60,5% (Рисунок 3).

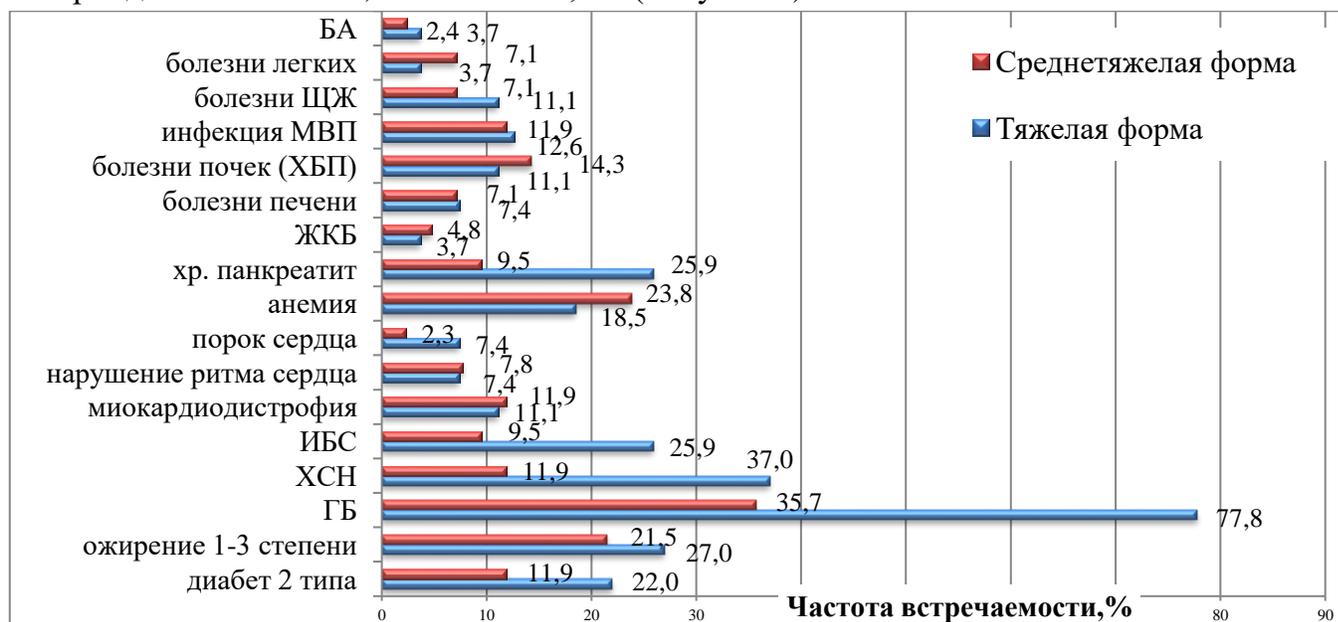


Рисунок 3 - Коморбидные заболевания у пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19

Нами был рассчитан индекс коморбидности Чарльсона (CCI), принимая во внимание как количество, так и тяжесть 19-ти выявленных сопутствующих состояний. Показано, что тяжесть течения инфекционного процесса при COVID-19 ассоциирована с отягощением коморбидности, о чем свидетельствует повышение индекса CCI: в ГИ1 –  $3,7 \pm 0,3$ , в ГИ2 –  $5,2 \pm 0,2$  ( $p_{1,2} < 0,05$ ).

На момент поступления в стационар у пациентов оценивалась представленность критериев синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) (Таблица 2).

Таблица 2 - Представленность признаков синдрома системного воспалительного ответа в группах сравнения со среднетяжёлым и тяжёлым течением COVID-19

Количество признаков/параметров ССВО	ГИ 1 (n-45) среднетяжёлая форма	ГИ2 (n-41) тяжёлая форма	ОШ (ДИ) для тяжёлого 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)

ССВО характеризовалось 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 НГ > 10%. Показано, что в острый период COVID-19 у 88,4% пациентов наблюдается развитие ССВО при среднетяжёлом течении в 77,8%, при тяжёлом в 100% случаев. Одновременное сочетание 3-х критериев ССВО в 3,14 раз чаще встречалось при тяжёлом течении COVID-19, чем при среднетяжёлом (Таблица 2).

При анализе клинико - лабораторных показателей было установлено, 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 (Таблица 3): 
$$\text{ИДК} = \frac{\% \text{ неизмененных НГ}}{\% \text{ NETs} + \% \text{ НГ в апоптозе}}$$

Таблица 3 – Интеграционный диагностический критерий тяжести COVID -19 (Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>))

Показатель	ГИ 1 (n=45) среднетяжёлая форма	ГИ 2 (n=41) тяжёлая форма	ГС (n=30) группа сравнения
НГ, %	69,5 (67,5; 78,0)*	77,5 (75,8; 86,5)*	60,0 (56,0; 63,0)
NET, %	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)

*Примечание: \*- отличия показателей ГИ1 и ГИ2 от ГС; ^- отличия показателей ГИ1 от ГИ2 p<0,05, критерий Манна-Уитни*

Показано, что для среднетяжёлой и тяжёлой форм COVID-19 в острый период характерно повышение как «классических» неспецифических маркеров воспаления (СРБ, ферритин, ЛДГ, D-димер, лактат), так и новых детектированных маркеров: появление НГ, сформировавших NETs и вступивших в апоптоз, снижение ИДК.

Сравнительный анализ информативности выявленных диагностических критериев продемонстрировал возможность дифференцирования степени тяжести COVID-19: при тяжёлой форме, в отличие от среднетяжёлой, количество NETs было выше в 4 раза, клеток, вошедших в апоптоз - в 4 раза; наиболее значимым критерием тяжести процесса являлось снижение ИДК в ГИ2 в 31 раз, а в ГИ1 в 8,5 раз по отношению к ГС.

Кроме того, в исследуемых группах был установлен дисбаланс цитокинов, вызванный гиперпродукцией как системных провоспалительных IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, так и 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 (Рисунок 4).

В ГИ1 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<sub>1-3</sub><0,05). В ГИ2 отмечалось выраженное повышение концентраций IL6 в 8 раз, IL8 в 4 раза, IL17A в 1,5 раза, IL18 в 4 раза (p<sub>1-4</sub><0,05) в сравнении с показателями ГИ1, что может быть

использовано для ранней дифференциальной диагностики степени тяжести острого инфекционного процесса (Рисунок 4).

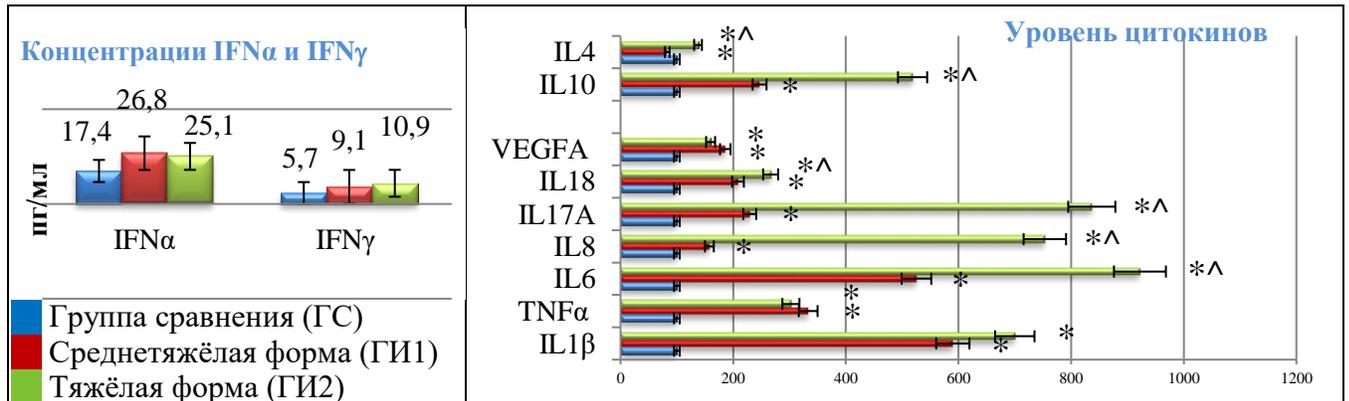


Рисунок 4 - Дисбаланс системы интерферонов и цитокинов у пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19 в острый период заболевания

Примечание: \* - отличия показателей ГИ1 и ГИ2 от показателей ГС, принятыми за 100%;  
 ^ - отличия показателей ГИ1 от значений ГИ2,  $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни

Следует также отметить, что уровни 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, иммунотромбоза 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 подтверждают тот факт, что SARS-CoV-2 нацелен на систему IFNs, нарушая их регуляторные свойства каскада клеточных и гуморальных ответов, препятствуя хорошо организованному взаимодействию между противовирусными и противовоспалительными врожденными и адаптивными механизмами защиты ИС. У пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19 в 77,7% (ГИ1а,  $n=35$ ) на фоне не отличающегося от ГС количества лейкоцитов и НГ ( $p_{1,2} > 0,05$ ) и снижения ЛФ ( $p < 0,05$ ) был определён количественный дефицит ЕКК, Тл, Тх, Тцтл и Вл ( $p_{1-4} < 0,05$ ). Тогда как у 22,3% (ГИ1б,  $n=10$ ) отмечалось повышение НГ ( $p < 0,05$ ) и компенсация количества ЛФ, ЕКК, Тл, Тх, Тцтл и Вл за счет лейкоцитоза, показатели которых не отличались от ГС ( $p_{1-2} < 0,05$ ), что способствовало менее агрессивному течению заболевания (Рисунок 5).

У пациентов с тяжёлой формой COVID-19 у 58,5% пациентов (ГИ2а,  $n=24$ ) наблюдался лейкоцитоз, повышение НГ ( $p < 0,05$ ) и глубокий количественный дефицит ЕКК и Тл и их субпопуляций, Вл ( $p_{1-4} < 0,05$ ); в 36,6% случаев (ГИ2б,  $n=15$ ) отмечался

неадекватный ответ на вирусную инфекцию: показатели лейкоцитов и лимфоцитарного звена не отличались от значений ГС ( $p>0,05$ ) (Рисунок 5).

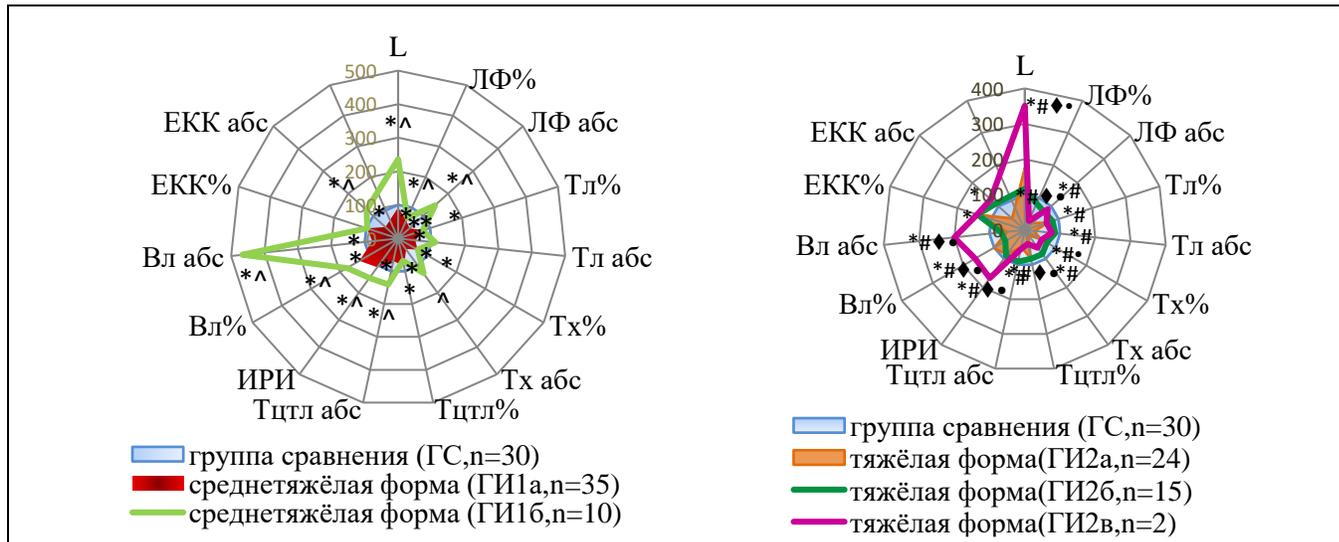


Рисунок 5 – Вариативные изменения показателей лимфоцитарного звена иммунитета у пациентов среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19 в острый период заболевания  
 Примечание: \* - отличия показателей ГИ1, ГИ2 от показателей ГС; ^ - отличия между показателями ГИ1а и ГИ1б; # - отличия между показателями ГИ2а и ГИ2б, ◆ - отличия между показателями ГИ2б и ГИ2в  $p<0,05$ ; • - отличия между показателями ГИ2а и ГИ2в,  $p<0,05$ , критерий Манна-Уитни

Наиболее сильные негативные изменения были определены в 4,9% случаев (ГИ2в, n=2): отмечался гиперлейкоцитоз, нейтрофилез, повышение ЕКК и Вл и наиболее выраженное снижение Тл, Тх, Тцтл ( $p_{1-4}<0,05$ ). Необходимо отметить, что у этих пациентов был снижен до следовых уровень  $IFN\gamma$ , а  $IFN\alpha$  не отличался от ГС. Оба пациента погибли на 5 и 6 сутки пребывания в стационаре от сепсиса.

Впервые показано, что при COVID-19 Тл в 2 раза ниже оснащены CD3 молекулой, входящей в состав TCR ( $p<0,05$ ), а субпопуляции имеют низкую MFI CD4 (Тх), MFI CD8 (Тцтл), MFI CD16/CD56 (ЕКК) в 2 раза ( $p_{1,2}<0,05$ ) в ГИ1 и ГИ2, что отражает функциональные дефекты и снижение их цитотоксического потенциала (Рисунок 6).

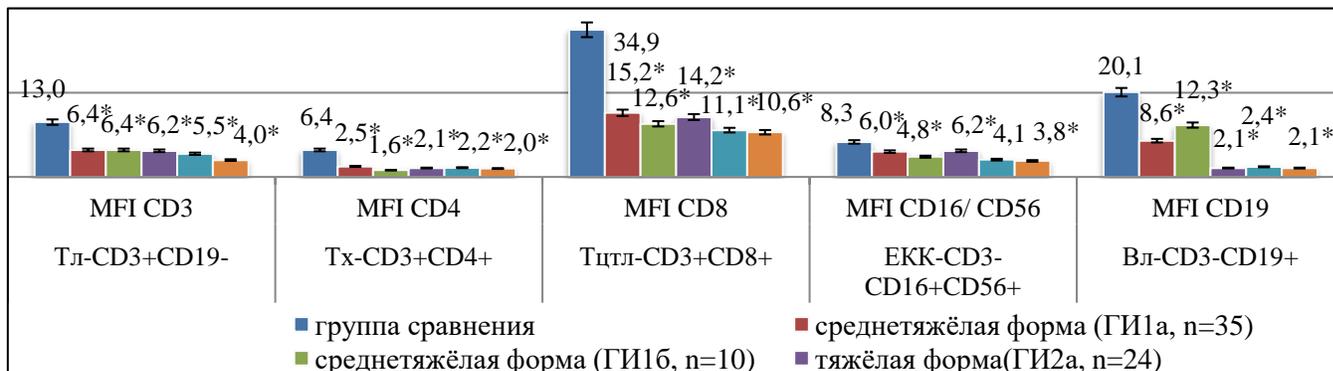


Рисунок 6 - Снижение плотности экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов у пациентов среднетяжёлой и тяжёлой формами COVID-19

Примечание: \* - различия показателей от ГС,  $p<0,05$ , критерий Манна-Уитни

В ГИ2 выявлено снижение в 9 раз CD19 ( $p < 0,05$ ) ко-рецепторных молекул, входящих в комплекс BCR (Рисунок 6).

Для уточнения дисфункций НГ проводились исследования содержания и фенотипа функционально-значимых субпопуляций.

Установлено, что у пациентов с COVID-19 в ПК циркулируют 3 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 отличалось от значений ГС ( $p_{1,2} < 0,05$ ). В 22,3% случаев в ГИ1б ( $n=10$ ) отмечалось 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 ( $p_{1,2} < 0,05$ ). При этом, было выявлено изменение фенотипа: в ГИ1а, ГИ1б из-за повышения в 2 раза MFI CD16 во всех 3-х субпопуляциях ( $p_{1-3} < 0,05$ ), 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; в ГИ2 увеличение MFI CD16 во всех субпопуляциях ( $p_{1-3} < 0,05$ ).

Выявленные трансформации фенотипов 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, 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  $CD16^{+}CD62L^{+}CD11b^{+}CD63^{-}$  НГ,  $CD16^{+}CD62L^{+}CD11b^{+}CD63^{+}$  НГ, экспрессирующих рецепторы, обеспечивающих миграцию и активацию эффекторных функций НГ (Рисунок 7).

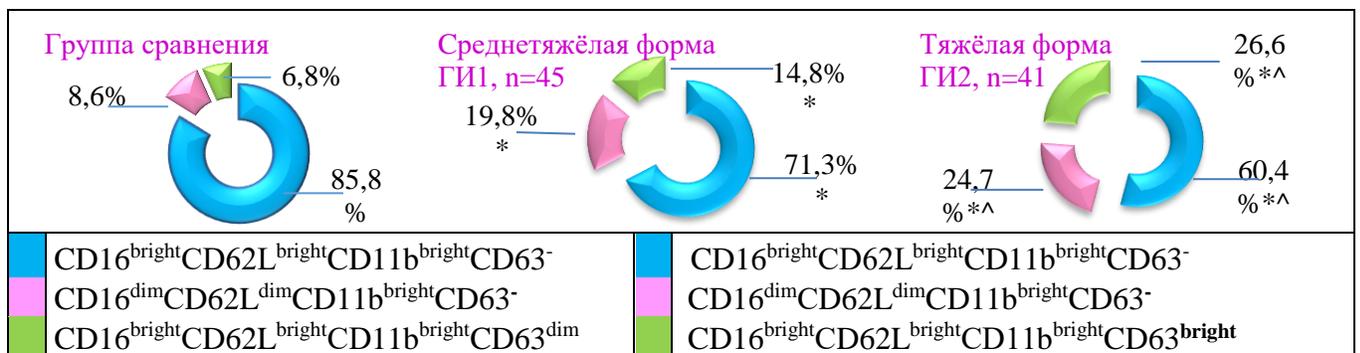


Рисунок 7 - Количественные и фенотипические характеристики субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов  $CD16^{+}CD62L^{+}CD11b^{+}CD63^{-}$ ,  $CD16^{+}CD62L^{+}CD11b^{+}CD63^{+}$  у пациентов с различными формами COVID-19

Примечание: \* - отличия показателей ГИ 1, ГИ 2 от ГС ; ^ - отличия показателей ГИ 1 и ГИ 2,  $p < 0,05$  критерий Манна-Уитни

Показано снижение доли НГ субпопуляции  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{-}$  с фенотипом, соответствующим зрелым функционально-активным клеткам, в ГИ1 и ГИ2

( $p_{1,2} < 0,05$ ); повышение количества субпопуляции НГ с иммуносупрессивным фенотипом  $CD16^{dim}CD62L^{dim}CD11b^{bright}CD63^{-}$ , подавляющим функциональную активность Тл, в 2,4 раза в ГИ1 и 3 раза в ГИ2 ( $p_{1,2} < 0,05$ ); и субпопуляции НГ с фенотипом  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{bright}$  с высокой цитотоксической активностью и способностью к образованию NETs в 2,4 раза в ГИ1 и более выраженное (в 4 раза) в ГИ2.

Изменение содержания и негативная трансформация фенотипов субпопуляций НГ приводили к нарушению эффекторных функций: снижение доли активно фагоцитирующих НГ, увеличение NADPH-оксидазной активности, повышенное образование NETs и увеличение НГ в патологическом апоптозе, зависящее от тяжести COVID-19 (Рисунок 8).

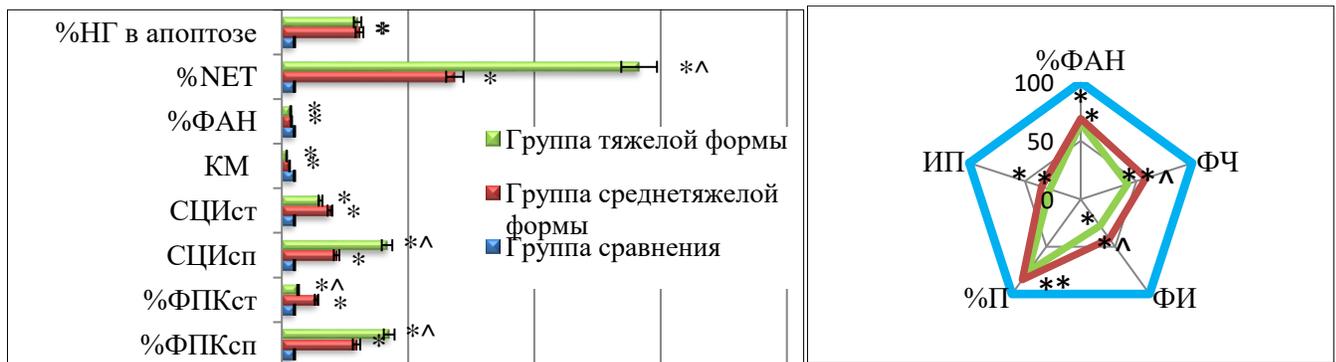


Рисунок 8 - Микробицидная активность нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с COVID-19  
Примечание: \* - отличия показателей ГИ1, ГИ2 от ГС; ^ - отличия показателей ГИ1 и ГИ2,  $p < 0,05$ ; критерий Манна-Уитни

Учитывая важную роль НГ в патогенезе COVID-19, возможность влияния на развитие, течение и исход болезни через восстановление негативных изменений фенотипа субпопуляций НГ и 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 реИФН $\alpha$ 2b и тимического гексапептида (ГП) на количественные и фенотипические характеристики изучаемых субпопуляций и эффекторные функции НГ пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19.

Продемонстрировано, что экспозиция с реИФН $\alpha$ 2b (50 МЕ/мкл, 60 мин, 37°C) оказывает разнонаправленное влияние на экспрессию рецепторов и 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 ГИ1б до значений в ГС ( $p_{1,2} < 0,05$ ) в субпопуляциях  $CD16^{+}IFN\alpha/\beta R1^{-}CD119^{-}$  и  $CD16^{+}IFN\alpha/\beta R1^{+}CD119^{+}$  за счет связывания субстанции реИФН $\alpha$ 2b со своим рецептором и увеличение MFI  $CD119$  в 2 раза в ГИ1a и ГИ1б в субпопуляции НГ  $CD16^{+}IFN\alpha/\beta R1^{+}CD119^{-}$ ,  $CD16^{+}IFN\alpha/\beta R1^{+}CD119^{+}$ , способных взаимодействовать с  $IFN\gamma$  ( $p_{1,2} < 0,05$ ). При этом, значения MFI  $CD16$  во всех 3-х субпопуляциях оставались повышенными. Позитивные эффекты реИФН $\alpha$ 2b были более выражены в ГИ1б, где, помимо изменений фенотипа, отмечалось увеличение в 2,2 раза

( $p < 0,05$ ) доли основной субпопуляции  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^{bright}CD119^{bright}$  НГ и снижение в 1,7 раз ( $p < 0,05$ ) доли  $CD16^{bright}IFN\alpha/\beta R1^{dim}CD119$ -НГ.

Выявлены эффекты влияния рекИФН $\alpha 2b$  *in vitro* на субпопуляции НГ, обеспечивающие включение клетки в воспалительный процесс  $CD16^{+}CD62L^{+}CD11b^{+}CD63^{-}$  и  $CD16^{+}CD62L^{+}CD11b^{+}CD63^{+}$ . Установлено повышение уровня основной субпопуляции НГ с фенотипом зрелых НГ, снижение доли субпопуляции НГ с супрессивными свойствами до показателей ГС ( $p_{1,2} < 0,05$ ) и изменение ее фенотипа – увеличение MFI CD62L ( $p < 0,05$ ). А также снижение агрессивного цитотоксического потенциала субпопуляции в ГИ1 за счёт снижения MFI CD11b и CD63 ( $p_{1,2} < 0,05$ ) молекул, способных запускать процессы дегрануляции НГ и NETоз и трансформации фенотипа на  $CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{mid}CD63^{dim}$  (Рисунок 9).



Рисунок 9 – Влияние рекИФН $\alpha 2b$  на субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов  $CD16^{+}CD62L^{+}CD11b^{+}CD63^{-}$ ,  $CD16^{+}CD62L^{+}CD11b^{+}CD63^{+}$  при среднетяжёлой форме COVID-19 *in vitro*  
 Примечание: \* - отличия от показателей ГС;  $p < 0,05$ ; ^ - отличия показателей ГИ 1 до и после инкубации с рекИФН $\alpha 2b$ ;  $p < 0,05$ ; критерий Манна-Уитни

Выявленное перераспределение плотности экспрессии рецепторов в функционально-значимых субпопуляциях под влиянием рекИФН $\alpha 2b$  в системе *in vitro* способствует усилению функциональной активности НГ для ответа на вирусную инфекцию (Рисунок 10).

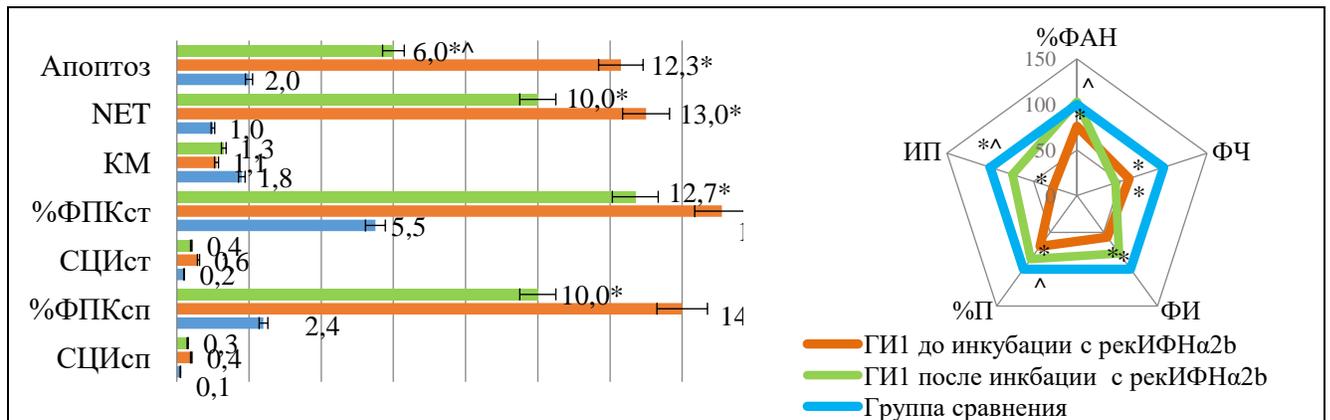


Рисунок 10 – Эффекты влияния рек ИФН $\alpha 2b$  на эффекторные функции НГ при COVID-19  
 Примечание: \* - отличия от показателей ГС;  $p < 0,05$ ; ^ - отличия показателей ГИ 1 до и после инкубации с рекИФН $\alpha 2b$ ;  $p < 0,05$ ; критерий Манна-Уитни

Под влиянием рекИФН $\alpha$ 2b наблюдалось увеличение %ФАН и %П до показателей ГС ( $p_{1,2}<0,05$ ), повышение ФИ и ИП ( $p_{1,2}<0,05$ ), не достигающее показателей ГС (Рисунок 10). При этом, NADPH-оксидазная активность сохранялась на высоком уровне ( $p>0,05$ ). Важно отметить, что рекИФН $\alpha$ 2b ограничивал образование NETs и апоптоз.

Также установлено, что ГП в системе *in vitro* не влиял на количество НГ субпопуляций 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>, но при этом, проявляя модулирующие эффекты, способствовал восстановлению их фенотипов как в ГИ1а, так и ГИ1б.

Наблюдалось снижение MFI CD16 в 3раза в ГИ1а и в 5 раз в ГИ1б ( $p_{1,2}<0,05$ ) и уменьшение в 2 раза MFI CD119 рецепторов в ГИ1а и ГИ1б ( $p_{1,2}<0,05$ ) основной субпопуляции до показателей ГС - фенотип CD16<sup>mid</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>-</sup>CD119<sup>dim</sup>; снижение MFI CD16 и IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 в 2 раза в обеих группах до значений ГС ( $p_{1,2}<0,05$ ) в 1 минорной субпопуляции - фенотип - CD16<sup>mid</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>dim</sup>CD119<sup>-</sup>НГ; уменьшение в MFI CD16 и повышение MFI IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 и MFI CD119 в ГИ1а во 2 минорной субпопуляции – фенотип CD16<sup>mid</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>bright</sup>CD119<sup>bright</sup> -НГ. 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 до инкубации – фенотип CD16<sup>bright</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>dim</sup>CD119<sup>mid</sup>.

ГП в эксперименте *in vitro* модулирует 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 потенциал, индуцированный SARS-CoV-2 (Рисунок 11).

Выявлено увеличение количества НГ субпопуляции CD16<sup>mid</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>mid</sup>CD63<sup>-</sup> со снижением MFI CD16 и CD11b рецепторов до показателей ГС, снижение количества НГ CD16<sup>mid</sup>CD62L<sup>mid</sup>CD11b<sup>dim</sup>CD63<sup>-</sup> НГ 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>. Однако, было выявлено изменение фенотипа на CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>dim</sup>CD63<sup>dim</sup> за счет снижения MFI CD11b и MFI CD63 рецепторов относительно значений до инкубации (Рисунок 11).

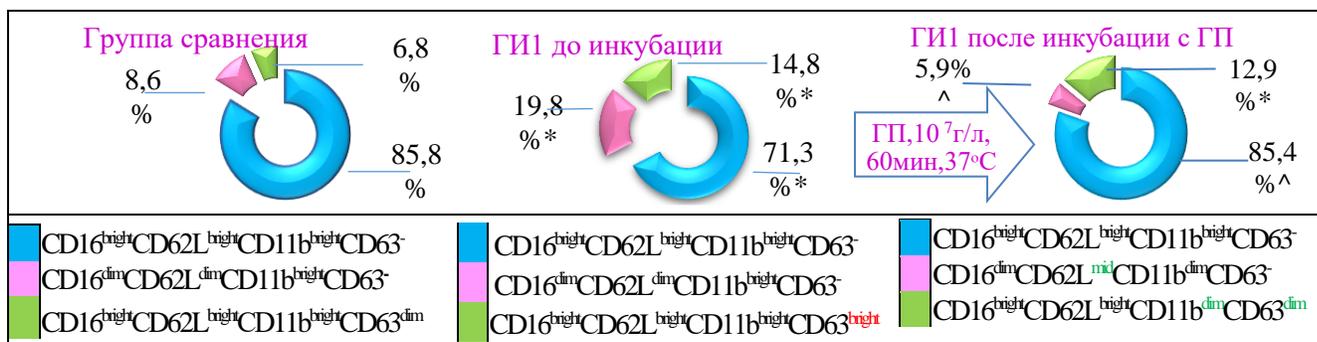


Рисунок 11 – Эффекты влияния гексапептида на субпопуляции нейтрофильных гранулоцитов CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> при COVID-19  
Примечание: \* - отличия между показателями ГИ1, ГИ1а после инкубации с ГП и показателями ГС; ^ - отличия между показателями ГИ1 и ГИ1а,  $p<0,05$ , критерий Манна – Уитни

Под действием ГП в системе *in vitro* происходит ремоделирование фенотипов субпопуляций, обеспечивающих полноценность эффекторных функций от гиперактивированных до нормальных, что подтверждается восстановлением дефектных эффекторных функций НГ (Рисунок 12).

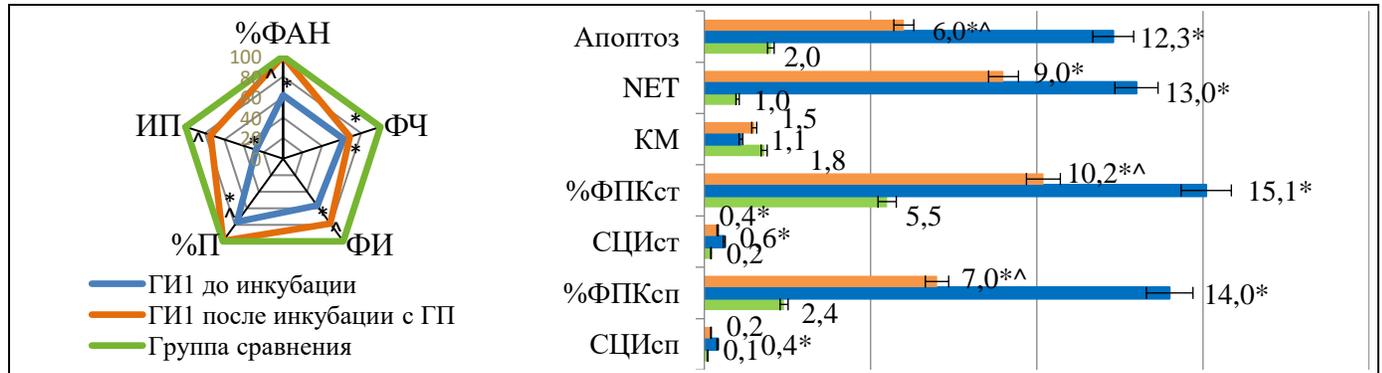


Рисунок 12 – Иммуномодулирующие эффекты гексапептида на эффекторные функции нейтрофильных гранулоцитов пациентов с COVID-19 в системе *in vitro*  
 Примечание: \*- отличия от показателей ГС;  $p < 0,05$ ; ^ - отличия показателей GI 1 от GI 1, после инкубации с ГП;  $p < 0,0$ , критерий Манна –Уитни

Отмечалось восстановление фагоцитарной функции НГ: повышение %ФАН, ФЧ и ФИ, усиление переваривающей способности НГ (%П, ИП) до показателей ГС. Эффекты влияния ГП на NADPH-оксидазную активность проявлялись снижением показателей СЦИ и %ФПК в спонтанном и стимулированном NBT- тесте. Выявлено, что ГП в системе *in vitro* ограничивает образование НГ NETs, также отмечалось снижение клеток в апоптозе, что безусловно расценивается как позитивный эффект ГП (Рисунок 12).

Таким образом, в результате комплексной оценки установлено, что ИО пациентов со среднетяжёлой и тяжёлой формой COVID-19 отличается преимущественно супрессированной направленностью - блокадой системы IFNs и, как следствие, низкой функциональной активностью лимфоцитарных механизмов противовирусной иммунной защиты, что не обеспечивает элиминацию SARS-CoV-2, и гиперактивацией НГ с приобретением агрессивного цитолитического потенциала, повышенной способностью образовывать NETs под воздействием высоких уровней нейтрофил-ассоциированных цитокинов, приводящей к повреждению тканей и осложнению течения заболевания.

В эксперименте *in vitro* показано, что рекИФН $\alpha$ 2b и ГП продемонстрировали различные иммуномодулирующие эффекты, способствующие восстановлению негативно измененного фенотипа функционально-значимых субпопуляций, устранению дефектов эффекторных свойств НГ 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 среднетяжёлого и тяжёлого течения: интеграционный диагностический критерий (ИДК), количество НГ, сформировавших NETs, и НГ в апоптозе в ПК, цитокины 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 иммунотропной 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 клинко-иммунологической эффективности разработанных программ таргетной иммунотропной терапии при новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НГ – нейтрофильные гранулоциты	%П – процент переваривания
ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром	ИП – индекс переваривания
ЦШ – цитокиновый шторм	СЦИ – средний цитохимический индекс
IL – интерлейкин	ФПК – формазан позитивная клетка
VEGFA – фактор роста эндотелия сосудов	КМ – коэффициент мобилизации
ISGs – IFN-стимулируемые гены	MFI – показатель индекса флюоресценции (middle index of fluorescence)
реИФН $\alpha$ 2b - рекомбинантный интерферон $\alpha$ 2b	АФК – активные формы кислорода
ГП – Гексапептид	АЗКЦ – антителозависимая клеточная цитотоксичность
ЦТЛ – цитотоксические лимфоциты	ЕКК – естественные киллерные клетки
%ФАН – процент активно фагоцитирующих нейтрофилов	МкАТ – моноклональные антитела
ФИ, ФЧ – фагоцитарный индекс / число	МПО – миелопероксидаза
NETs – нейтрофильные экстрацеллюлярные сети (neutrophil extracellular traps)	

### Список научных публикаций по теме диссертации

1. Фенотипические особенности субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов при среднетяжёлом и тяжёлом течении COVID-19 / И. В. Нестерова, Г. А. Чудилова, В. Н. Городин, В. Н. Чапурина, В. А. Матушкина, Р. Ю. Габдрахманова // Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания: Материалы VIII Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием, Сочи, 26–29 октября 2021 года. – Сочи: Издательство "Новация", 2021. – С. 143-144.
2. Эффекты влияния рекомбинантного интерферона  $\alpha$ -2b на фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов пациентов с COVID-19 / И. В. Нестерова, В. Н. Городин, Г. А. Чудилова, В. Н. Чапурина, В. А. Матушкина [и др.] // Инфекционные болезни. – 2022. – Т. 20, № 1. – С. 43-51.
3. 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, В. Н. Чапурина, В. А. Матушкина [и др.] // Инфекционные болезни. – 2022. – Т. 20, № 2. – С. 23-32.
4. 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.
5. 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, В. А. Матушкина [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2023. – Т. 13, № 1. – С. 9-28.
6. 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 (Russia). – 2023. – Vol. 25, No. 4. – P. 815-822.
7. Количественная и фенотипическая трансформация субпопуляций  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$  и  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$  нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с постковидным синдромом / И. В. Нестерова, Г. А. Чудилова, М. Г. Атажахова, В. А. Матушкина [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2023. – Т. 26, № 3. – С. 363-372.
8. Позитивные эффекты рекомбинантного интерферона  $\alpha$ 2b на фенотип субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$  нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с постковидным синдромом и герпесвирусными инфекциями / М. Г. Атажахова, И. В. Нестерова, Г. А. Чудилова, В. А. Матушкина [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2023. – Т. 26, № 4. – С. 647-656.
9. Модулирующие эффекты гексапептида на субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$  и  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$  нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с постковидным синдромом / И. В. Нестерова, Г. А. Чудилова, М. Г. Атажахова, В. А. Матушкина [и др.] // Эффективная фармакотерапия. – 2023. – Т. 19, № 28. – С. 16-23.
10. Экспериментальная иммунокоррекция *in vitro* дисфункций нейтрофильных гранулоцитов гексапептидом аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина у пациентов с COVID-19 / В. А. Матушкина, В. Н. Городин, И. В. Нестерова, Г. А. Чудилова // Социально значимые и особо опасные инфекционные заболевания: Материалы X Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием, Сочи, 07–10 ноября 2023 года. – Сочи: Издательство "Новация", 2023. – С. 153-155.
11. Высокие уровни цитокинов IL-17A, IL-18, VEGF-A в периоде реконвалесценции COVID-19 – биомаркеры незавершенности иммунного воспалительного процесса, сигнализирующие об опасности развития постковидного синдрома / В. Н. Городин, И. В. Нестерова, В. А. Матушкина [и др.] // Инфекционные болезни. – 2023. – Т. 21(4). – С. 12–20.
12. 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. – 2024.-Т.26, №3.-С. 1383-1392.