

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК КРОВИ У РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО COVID-19

Клюева С.Н., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб”», г. Саратов, Россия

Резюме. Сложность и многофакторность реализации патогенного потенциала SARS-CoV-2 в организме человека, раскрытие все новых механизмов, посредством которых вирус запускает каскад реакций в клетках макроорганизма, ведущих к формированию полиорганной недостаточности обусловили интерес к морфофункциональному состоянию клеток крови у реконвалесцентов после перенесенного COVID-19. Цель работы – охарактеризовать морфофункциональное состояние клеток крови в различный период реконвалесценции у пациентов в зависимости от степени тяжести перенесенного COVID-19. Обследовано 55 реконвалесцентов после перенесенного COVID-19: I группа – реконвалесценты через 30 дней после болезни (n = 39); II группа – через 60 дней (n = 16); III группа – клинически здоровые добровольцы в анамнезе у которых отсутствовал факт заболевания, обусловленного SARS-CoV-2 (n = 11). Оценку состояния клеток проводили с помощью микроскопа Olympus CX41 (Olympus, Япония) и цифровой камеры VZ-C31S (VideoZavt, Россия) в программе VideoZavt (версия 1.5). Состояние популяции нейтрофильных гранулоцитов оценивали на проточном цитофлуориметре BD Accuri C6 Plus (США) в образцах цельной крови при автоматическом дифференцировании клеток от лимфоцитов и моноцитов по степени гранулярности. Продукцию цитокинов определяли с помощью коммерческих наборов для выявления IFN γ , TNF α , IL-4, IL-8, IL-10 (АО «Вектор-Бест», Россия), IL-17A (eBioscience, Австрия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе LAZURIT (Dyplex Technologies, США). Среди реконвалесцентов, перенесших средне-тяжелую форму COVID-19 (45,5% и 50% случаев соответственно), на 30-е и 60-е сутки после клинического выздоровления отмечали достоверное увеличение доли трансформированных форм эритроцитов (эхиноциты, овалоциты, дакриоциты, кодоциты) относительно III группы (p = 0,00001 и p = 0,001 соответственно). Независимо от тяжести течения болезни, в среднем у 40,6% реконвалесцентов I и II групп регистрировали умеренное нарушение морфологии нейтрофильных гранулоцитов (цитоплазматическая вакуолизация, деконденсация хроматина на стадии преднетоза, трансформация клеток по типу нетоза), а в 27,4% случаев наблюдали участки нейтрофил-тромбоцитарной агрегации. В супернатантах крови реконвалесцентов выявлено достоверное снижение концентрации IFN γ (p = 0,02), TNF α (p = 0,03), IL-10 (p = 0,04) и IL-17A (p = 0,02). Выявленные морфофункциональные изменения клеток крови у лиц, перенесших COVID-19, свидетельствуют о длительности сохранения токсических повреждений эритроцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в течение восстановительного периода. Влияние установленных морфофункциональных нарушений клеток крови реконвалесцентов после перенесенного COVID-19, приводящих к повышению вязкости и микроциркуляции крови, формированию нейтро-

Адрес для переписки:

Клюева Светлана Николаевна
ФКУЗ «Российский научно-исследовательский
противочумный институт “Микроб”»
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46.
Тел.: 8 (452) 26-21-31.
Факс: 8 (452) 51-52-12.
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Address for correspondence:

Klyueva Svetlana N.
Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46.
Phone: 7 (452) 26-21-31.
Fax: 7 (452) 51-52-12.
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Образец цитирования:

С.Н. Клюева, А.Л. Кравцов, С.А. Бугоркова
«Морфофункциональная характеристика клеток
крови у реконвалесцентов после перенесенного
COVID-19» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24,
№ 4. С. 741-750.
doi: 10.15789/1563-0625-MCO-2507
© Клюева С.Н. и соавт., 2022

For citation:

S.N. Klyueva, A.L. Kravtsov, S.A. Bugorkova
“Morphofunctional characteristics of blood cells
in reconvalescents after suffering COVID-19”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 4, pp. 741-750.
doi: 10.15789/1563-0625-MCO-2507
DOI: 10.15789/1563-0625-MCO-2507

фил-тромбоцитарных агрегатов, вероятно, обуславливает риск развития тромботических осложнений в отдаленный период, снижение уровня регуляторных цитокинов, подтверждает медленное восстановление лимфоцитарного звена (Th1, Th2, Th17) иммунной системы.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, цитокины, нейтрофилы, нетоз, эритроциты, тромбоциты

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF BLOOD CELLS IN RECONVALESCENTS AFTER SUFFERING COVID-19

Klyueva S.N., Kravtsov A.L., Bugorkova S.A.

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. Complexity and multifactorial nature of potential pathogenic consequences of SARS-CoV-2 infection in human body, discovery of new virus-induced mechanisms triggering a cascade of pathological responses in the cells of host organism leading to development of multiple organ failure elicited increasing interest in morpho-functional state of blood cells in convalescent persons after COVID-19 infection. The aim of the present work is to characterize morphofunctional pattern of blood cells at different periods of recovery, depending on the severity of COVID-19. We examined 55 convalescents after bearing COVID-19 infection: Group I included the convalescents 30 days after the disease (n = 39); Group II consisted of the persons 60 days after recovery (n = 16); Group III included clinically healthy volunteers with no history of clinical SARS-CoV-2 infection (n = 11). The cells were examined by means of Olympus CX41 microscope (Olympus, Japan), and VZ-C31S digital videocamera (VideoZavr, Russia) using the VideoZavr software (version 1.5). Assessment of neutrophil populations in the whole blood samples was performed with BD Accuri C6 Plus flow cytometer (USA) with automatic differentiation of cells between lymphocytes and monocytes, according to the degree of granularity. Cytokine production was determined using commercial kits for detection of IFN γ , TNF α , IL-4, IL-8, IL-10 (JSC Vector-Best, Russia), IL-17A (eBioscience, Austria) was assayed with automatic enzyme immunoassay analyzer "LAZURIT" (Dynex Technologies, USA). Among the convalescents who suffered the moderate-degree COVID-19 (45.5% and 50% of cases, respectively) on days +30 and +60 after clinical recovery, a significantly increased ratio of morphologically altered forms of erythrocytes (echinocytes, ovalocytes, dacryocytes, codocytes) was noted as compared with group III (p = 0.00001 and p = 0.001, respectively). Regardless of clinical severity of the disease; a mean of 40.6% convalescents from groups I and II had moderate disturbances in the neutrophil morphology (cytoplasmic vacuolization, chromatin decondensation at the pre-netosis stage, transformation of cells by the netosis type), and, in 27.4% of cases, the areas of neutrophil-platelet aggregation were seen. In blood supernates from recovered patients, we have revealed a significantly decreased content of IFN γ (p = 0.02), TNF α (p = 0.03), IL-10 (p = 0.04) and IL-17A (p = 0.02). The revealed morphological and functional changes in blood cells in the persons who underwent COVID-19 infection suggest long-term maintenance of toxic damage to erythrocytes, neutrophils and lymphocytes over the recovery period. The effects of the detected morphological and functional disorders of blood cells following COVID-19 recovery leading to increase in blood viscosity and microcirculation, formation of neutrophil-platelet aggregates, may cause higher risks of thrombotic complications at the long-range period as well as decreased levels of regulatory cytokines, thus confirming slow recovery of the lymphocyte populations (Th1, Th2, Th17) of the immune system.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, cytokines, neutrophils, netosis, erythrocytes, platelets

Введение

Новая коронавирусная инфекция, обусловленная вирусом SARS-CoV-2, вызывает заболевание у людей COVID-19, клинический спектр проявлений которого варьирует от полного отсутствия симптомов до развития состояний выраженной дыхательной и полиорганной недостаточности [17]. Наиболее важные механизмы развития полиорганной дисфункции при COVID-19 об-

условлены, как прямым, так и косвенным воздействием вируса SARS-CoV-2 на клетки и ткани макроорганизма. Один из возможных механизмов запуска каскада реакций, ведущих к полиорганной недостаточности, рассматривается через повреждение эритроцитов [22]. Изменение структуры мембраны и метаболизма эритроцитов при различных патологических состояниях, проявляется нарастанием полиморфизма клеток в популяции и появлением трансформированных

форм [4]. Нарушение целостности мембраны эритроцитов может стать причиной внутрисосудистого гемолиза, выхода свободного гемоглобина в кровеносную систему, что значительно ухудшает внутрисосудистую биодоступность оксида азота и способствует вазоконстрикции, обуславливая эндотелиальную дисфункцию и активацию тромбоцитов [9]. У 20% всех пациентов с диагностированным COVID-19 имеются грубые нарушения гемостаза и часто встречаются тромботические осложнения [8, 15]. Если COVID-19 протекает в тяжелой форме, у 100% пациентов наблюдаются гемостатические нарушения, в результате которых повышается риск тромбоза.

Еще одной особенностью течения COVID-19 является агрегация тромбоцитов с нейтрофилами, моноцитами и Т-клетками [16]. В патогенезе COVID-19 играет роль и чрезмерная активация нейтрофилов, приводящая к трансформации клеток, а как следствие, к нетозу и массивному формированию нейтрофильных внеклеточных ДНК-ловушек (НВЛ), которые становятся каркасом для адгезии тромбоцитов и образования тромбов [8]. Повышение НВЛ в крови больных COVID-19 неблагоприятный прогностический критерий течения заболевания [5].

Более того, тяжелое (критическое) течение COVID-19 обусловлено нарушением регуляции и/или избыточным выделением цитокинов (так называемый «цитокиновый шторм») [18, 26], вследствие неконтролируемой активации нейтрофилов и лимфоцитов сопровождается гипервоспалительными реакциями, ведущими к полиорганной недостаточности [1, 20, 24, 27].

Сложность и многофакторность реализации патогенного потенциала SARS-CoV-2 в организме человека, раскрытие все новых механизмов, посредством которых вирус запускает каскад реакций в клетках макроорганизма, ведущих к формированию полиорганной недостаточности, обусловили интерес к изучению морфофункционального состояния клеток крови у реконвалесцентов после перенесенного COVID-19.

Цель работы – охарактеризовать морфофункциональное состояние клеток крови в различный период реконвалесценции у пациентов в зависимости от степени тяжести перенесенного COVID-19.

Материалы и методы

Было обследовано 55 реконвалесцентов в различные сроки после перенесенного COVID-19. У всех пациентов, вошедших в исследование, вирус был идентифицирован на основании положительного результата ПЦР по обнаружению РНК SARS-CoV-2. Общая характеристика участников исследования представлена в таблице 1.

У всех участников исследование забор крови проводили на основании должным образом оформленного добровольного информированного согласия. Кровь забирали из локтевой вены в утренние часы. Для характеристики морфологии клеток из 2 мкл венозной крови готовили мазки, фиксировали в 96% этаноле и окрашивали по Романовскому–Гимзе. Оценку состояния клеток проводили с помощью микроскопа Olympus CX41 (Olympus, Япония) и цифровой камеры VZ-C31S (VideoZavr, Россия) в программе VideoZavr (версия 1.5). Подсчитывали 200 клеточных структур, включая нативные неразрушенные нейтрофилы и трансформированные по типу нетоза (NETs) клетки. Подсчет эритроцитов с характеристикой морфологии проводили в 5 полях зрения, учитываемая не менее 600 клеток.

Иммунофенотипирование лейкоцитов в микрообъемах цельной венозной крови (с гепарином) проводили с использованием Lyse/No Wash процедуры пробоподготовки образцов для проточно-цитофлуориметрического анализа, основанной на использовании реагента FACS Lysing Solution, (BD Bioscience, США) [7, 25]. Популяцию гранулоцитов автоматически дифференцировали на проточном цитофлуориметре BD Accuri C6 Plus (США) от лимфоцитов и моноцитов по степени гранулярности, которую оценивали в условных единицах интенсивности бокового светорассеяния (Mean Side Scatter Intensity – MSSI) [20]. В гейте гранулоцитов крови с помощью реагента CD16 (Becton Dickinson, США) идентифицировали нейтрофилы (CD16⁺) и определяли долю нейтрофильных гранулоцитов в суммарной гранулоцитарной популяции [7]. Поврежденные лейкоциты идентифицировали и подсчитывали в крови как клеточный дебрис – объекты с низким уровнем экспрессии на клетку общего лейкоцитарного антигена CD45 (Becton Dickinson, США) [25].

Для определения продукции цитокинов венозную кровь с гепарином разводили в соотношении 1:5 средой RPMI 1640 (ПанЭко Россия), содержащей 100 мкг/мл гентамицина (ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко). Функциональный потенциал клеток оценивали по изменению уровня индуцированной продукции цитокинов [6]. В качестве индуктора использовали стандартный Т-клеточный митоген конканавалин А (КонА) (ПанЭко, Россия) в концентрации 15 мкг. Продукцию цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов для выявления IFN γ , TNF α , IL-4, IL-8, IL-10 (АО «Вектор-Бест», Россия), IL-17A (eBioscience, Австрия) на автоматическом иммунофермент-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА УЧАСТНИКОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF STUDY PARTICIPANTS

| Показатель Indicator | I группа Реконвалесценты через 30 дней после болезни Group I Convalescents 30 days after illness | II группа Реконвалесценты через 60 дней после болезни Group II Convalescents 60 days after illness | III группа Клинически здоровые добровольцы Group III Clinically healthy volunteers |
|--|--|--|---|
| Количество участников, n Number of participants, n | 39 | 16 | 11 |
| А. Реконвалесценты, перенесшие легкую форму COVID-19 (n) A. Convalescents with mild COVID-19 (n) | 28 | 10 | – |
| Б. Реконвалесценты, перенесшие средне-тяжелую форму COVID-19 (n) B. Convalescents who had a moderate form of COVID-19 (n) | 11 | 6 | – |
| Характеристика участников по полу (женщины : мужчины) Characteristics of participants by gender (women : men) | 30:9 | 7:9 | 8:3 |
| Средний возраст участника (M±m), годы Average age of the participant (M±m), years | 50,5±1,8 | 50,6±2,8 | 49,2±3,1 |
| Средняя длительность заболевания (M±m), дни Average duration of the disease (M±m), days | | | |
| Легкая форма Light form | | 21,5±1,3 | – |
| Средне-тяжелая форма Medium-severe form | | 30,0±3,7 | |

ном анализаторе LAZURIT (Dyplex Technologies, США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2016, Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2010). Для расчета межгрупповых ассоциаций использовали U-критерий Манна–Уитни.

Результаты

Из 55 реконвалесцентов, перенесших COVID-19 у 17 человек (31%) было средне-тяжелое течение заболевания, осложнившееся внебольничной пневмонией, остальные 38 добровольцев (69%) перенесли инфекцию в легкой форме с типичными клиническими признаками ОРВИ.

Микроскопическое исследование мазков крови показало, что у 14 реконвалесцентов I группы,

перенесших COVID-19 в легкой (32,1%) и средне-тяжелой (45,5%) формах, существенно увеличена доля (в среднем в 4 раза, $p = 0,00001$) морфологически измененных форм эритроцитов (эхиноциты, овалоциты, дакриоциты) по сравнению с аналогичными показателями у добровольцев из группы III (табл. 2; рис. 1, 2А, см. 3-ю стр. обложки). Во II группе также отмечали увеличение доли ($p = 0,001$) измененных форм эритроцитов у 50% добровольцев, перенесших средне-тяжелую форму COVID-19.

У 15 реконвалесцентов I группы (35,7% – легкая форма и 45,5% – средне-тяжелая) уровень нейтрофилов с дегенеративными изменениями различной степени выраженности (цитоплазматическая вакуолизация, деконденсация хроматина на стадии преднетоза, формирование NETs) значимо превосходил ($p = 0,02$) таковой среди здоровых добровольцев (табл. 2; рис. 1, 2, см. 3-ю

ТАБЛИЦА 2. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭРИТРОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ (M±m)

TABLE 2. MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ERYTHROCYTES AND NEUTROPHILS (M±m)

| Показатель Indicator | I группа Group I | | II группа Group II | | III группа Group III |
|---|---------------------|-----------|-----------------------|----------|-------------------------|
| | A | B | A | B | |
| Дискоциты, % Discocytes, % | 88,4±1,2* | 87,8±1,1* | 96,9±1,5 | 95,4±1,5 | 97,6±0,5 |
| Трансформированные формы эритроцитов, % Transformed forms of erythrocytes, % | 11,6±0,4* | 12,2±0,5* | 3,1±0,4 | 4,6±0,4* | 2,4±0,3 |
| Дегенеративные формы нейтрофилов, % Degenerative forms of neutrophils, % | 5,8±0,4* | 7,1±1,5* | 3,2±0,3 | 4,1±0,3 | 2,2±0,9 |

Примечание. * p < 0,05 различия с группой III.

Note. * p < 0.05 differences with group III.

ТАБЛИЦА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙТРОФИЛОВ ПО ДАННЫМ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. CHARACTERISTICS OF NEUTROPHILS ACCORDING TO CYTOFLUORIMETRY DATA, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

| Показатель Indicator | I группа Group I | | II группа Group II | | III группа Group III |
|--|----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|-------------------------|
| | A | B | A | B | |
| Содержание в крови гранулоцитов, % Granulocyte content in the blood, % | 56,9 (50,2-64,4) | 56,9 (52,2-65,0) | 58,3 (50,3-67,0) | 52,9 (52,8-56,5) | 55,3 (48,4-60,8) |
| Доля нейтрофилов в гранулоцитарной популяции, % Neutrophils in granulocyte population, % | 95,1 (92,9-95,7)* | 95,8 (94,9-96,7)* | 92,6 (92,2-93,3)* | 93,2 (90,0-96,6)* | 88,5 (86,7-91,0) |
| Гранулярность нейтрофилов (интенсивность бокового светорассеяния) Neutrophil granularity (MSSI) | 4545 (4333-4818)* | 4556 (4449-4888)* | 4442,5 (4320-5131)* | 4512 (4329-5553)* | 5100 (4980-5480) |
| Клеточный дебрис (лизис лейкоцитов крови), % Cell debris (blood leukocytolysis), % | 7,0 (5,8-10,1) | 8,8 (7,8-12,2)* | 5,6 (4,6-10,4) | 6,7 (5,0-10,6)* | 4,6 (4,0-7,2) |

Примечание. * p < 0,05 различия с группой III; MSSI – среднее значение интенсивности бокового светорассеяния отдельных клеток неоднородной клеточной популяции в условных единицах (каналах).

Note. * p < 0.05 differences with group III; MSSI, Mean Side Scatter Intensity of single cells of heterogeneous population in arbitrary units (channels).

стр. обложки). Во II группе лишь у 4 реконвалесцентов (20% – легкая, 33,3% – средне-тяжелая) обнаружено умеренное нарушение морфологии отдельных нейтрофилов. Однако доля дегенеративных форм в этой группе достоверно не отличались от показателей в группе III.

Кроме того, у 8 реконвалесцентов I группы (10,7% – легкая форма и 45,5% – средне-тяжелая) и 3 реконвалесцентов II группы (20% – легкая, 33,3% – средне-тяжелая) в мазках крови обнаружены участки нейтрофил-тромбоцитарной агрегации (рис. 2Б, см. 3-ю стр. обложки). Таких конгломератов в одном поле зрения микроскопа насчитывали от 2 до 10.

Методом проточной цитометрии установлено, что у всех реконвалесцентов доля нейтрофилов в суммарной популяции гранулоцитов крови была выше ($p = 0,04$), чем у добровольцев из группы III (табл. 3). При этом регистрировали снижение гранулярности клеток ($p = 0,04$), что, свидетель-

ствовало о развитии в клетках процесса дегрануляции [20]. Доля нейтрофилов в стадии нетоза у реконвалесцентов I и II группы достоверно превышала уровень у добровольцев из группы III ($p = 0,03$). Интересно, что доля нейтрофилов с дегенеративными изменениями, выявленных в мазках крови реконвалесцентов, была близка к фактической доле клеточного дебриса среди полиморфонуклеаров, определенного при цитофлуориметрическом анализе.

По данным иммуноферментного анализа была выявлена различная реакция в отношении продукции ряда цитокинов (IFN γ , TNF α , IL-4, IL-8, IL-10, IL-17A), как при митогенной стимуляции клеток крови, так и без стимуляции (спонтанная продукция).

Из шести исследованных цитокинов в супернатантах крови переболевших COVID-19 обнаружен достоверно сниженный уровень четырех цитокинов (IFN γ , TNF α , IL-17A, IL-10) по срав-

ТАБЛИЦА 4. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 4. CHARACTERIZATION OF CYTOKINE PRODUCTION BY WHOLE BLOOD CELLS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

| Цитокин Cytokine | | I группа Group I | | II группа Group II | | III группа Group III |
|--|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | A | B | A | B | |
| IFN γ (пг/мл) IFN γ (pg/mL) | 1 | 0 (0,0-3,5) | 2,3 (0,0-8,7)* | 1,0 (0,0-1,8)** | 6,7 (3,8-9,7)* | 3,6 (0,8-14,7) |
| | 2 | 403,8 (213,6-1161,3) | 556,6 (409,5-1043,7) | 408,4 (235,3-992,9) | 357,4 (89,4-538,6) | 345,8 (174,2-1045,2) |
| TNF α (пг/мл) TNF α (pg/mL) | 1 | 0 (0,0-1,5) | 0 (0,0-1,4) | 0,9 (0,0-1,4) | 3,7 (0,0-3,8) | 0 (0-0) |
| | 2 | 262,9 (90,9-338,3)** | 274,5 (243,2-371,3)** | 227,4 (110,4-305,0)** | 241,5 (34,8-263,2)** | 382,6 (369,0-413,2) |
| IL-4 (пг/мл) IL-4 (pg/mL) | 1 | 0,2 (0,0-0,5) | 0,06 (0,0-0,3) | 0,4 (0,2-1,0) | 0,8 (0,0-1,7) | 0 (0,0-0,14) |
| | 2 | 2,4 (0,7-4,5) | 2,6 (1,9-4,9)** | 3,0 (2,5-6,4)*** | 1 (0,05-2,00) | 1,3 (0,1-2,4) |
| IL-8 (пг/мл) IL-8 (pg/mL) | 1 | 716,9 (374,2-1223,0) | 963,2 (695,4-2831,4)* | 604,1 (396,1-1389,0) | 333,8 (202,6-693,5) | 598,6 (112,0-947,8) |
| | 2 | 9160,8 (5557,6-10515,0) | 9234,4 (7854,6-10391,8) | 9933,7 (8115,7-11521,0) | 5896,8 (2824,4-8723,2) | 4597 (3011-10037) |
| IL-10 (пг/мл) IL-10 (pg/mL) | 1 | 2,7 (1,9-3,3)** | 14,7 (6,3-55,8)* | 2,8 (2,1-3,4)** | 22,9 (2,5-64,4)* | 17,9 (2,1-22,6) |
| | 2 | 11,5 (8,8-16,1)** | 66,1 (36,6-159,6)* | 37,2 (25,1-60,8) | 27,4 (12,4-74,3)** | 55,8 (40,9-94,5) |
| IL-17A (пг/мл) IL-17A (pg/mL) | 1 | 1,1 (1,0-1,2) | 1 (0,0-1,1) | 1,1 (1,0-1,2) | 1 (0,0-1,1) | 0,5 (0,0-1,2) |
| | 2 | 63,3 (31,5-77,2) | 40,5 (31,7-43,6) | 15,7 (3,9-39,9)** | 92,6 (48,4-181,6)* | 53,2 (30,7-66,2) |

Примечание. 1 – спонтанная продукция; 2 – индуцированная продукция; * $p < 0,05$ различия между подгруппами A и B; ** $p < 0,05$ различия с группой III.

Note. 1, spontaneous production; 2, induced production; *, $p < 0.05$ differences between subgroups A and B; ** $p < 0.05$ differences with group III.

нению со значениями этих показателей в группе III (табл. 4). Регистрировали снижение: в 3,6 раза ($p = 0,02$) уровня спонтанной продукции $IFN\gamma$ у реконвалесцентов II A группы (легкая форма); в 1,7 раза ($p = 0,03$) митоген-индуцированной продукции $TNF\alpha$ в I и II группах; в 3,4 раза ($p = 0,02$) митоген-индуцированной продукции $IL-17A$ во II A группе (легкая форма); в 6,4 раза ($p = 0,04$) спонтанной продукции $IL-10$ в I A и II A группах (легкая форма), в 4,2 раза ($p = 0,001$) митоген-индуцированной продукции $IL-10$ в I A группе (легкая форма) и в 2 раза ($p = 0,04$) во II B группе (средне-тяжелая форма).

Отмечено, что в I и II группах реконвалесцентов, переболевших в средне-тяжелой форме, уровни спонтанной продукции $IFN\gamma$ ($p = 0,03$, $p = 0,0002$ соответственно) и $IL-10$ ($p = 0,005$, $p = 0,034$ соответственно) достоверно превышали аналогичные показатели тех реконвалесцентов, у которых заболевание протекало в легкой форме.

Обсуждение

На эритроциты приходится до 98% объема клеточной популяции в кровяном русле [3], поэтому любые изменения морфологии этих клеток ведут к нарушениям реологии крови. Доказанным является факт накопления в крови пациентов с COVID-19 патологических форм эритроцитов (эхиноциты, сфероциты, овалоциты, шизоциты, акантоциты, дрепаноциты) [22]. Так, у пациентов с анемией на фоне тяжелого течения COVID-19, в 70% случаев в крови регистрировали трансформированные формы эритроцитов [12], образование которых было обусловлено структурными повреждениями мембраны эритроцитов [14].

По результатам нашего исследования, у 27% переболевших COVID-19, доля морфологически измененных эритроцитов (эхиноциты, овалоциты, дакриоциты) через 1-2 месяца после выздоровления составляла в среднем $9,5\pm 0,5\%$ и превышала аналогичный показатель у здоровых добровольцев в 4 раза. Эти данные согласуются с результатами других авторов, показавших, что процент эритроцитов с деформацией составляет в среднем 14,6% для выздоровевших пациентов и 32,4% – для госпитализированных пациентов с COVID-19 [14], в то время как у здоровых доноров количество дегенеративно измененных эритроцитов не превышает $2,0\pm 0,7\%$ [3].

Современные фундаментальные исследования убедительно свидетельствуют о том, что нейтрофильные гранулоциты являются ключевыми эффекторными и регуляторными клетками как врожденного, так и адаптивного иммунитета, и играют решающую роль в иммунопатогенезе широкого спектра заболеваний [10]. После активации подавляющее большинство нейтрофилов

обладает способностью формировать во внеклеточном пространстве сетеподобные структуры НВЛ – уникальный механизм противомикробной защиты. Осуществляя такого рода внеклеточный киллинг микроорганизмов, нейтрофилы погибают в результате нетоза. НВЛ представляют собой структуры, занимающие объем, в 10-15 раз превышающий объем нейтрофилов, и состоящие из нитей деконденсированного хроматина, на поверхности которых иммобилизованы многочисленные антимикробные пептиды и ферменты гранулоцитов [10]. Кроме того, известно, что под влиянием инфекционного или токсического агента наиболее часто встречаются такие изменения в нейтрофилах как тельца Деле и вакуолизация цитоплазмы [11], что мы наблюдали в отдельных случаях в мазках крови реконвалесцентов после перенесенного COVID-19.

По нашим данным, у 40,6% реконвалесцентов через 30 дней после выздоровления количество нейтрофилов с измененной морфологией составило в среднем $6,5\pm 0,9\%$, что существенно выше, чем в контроле. По данным литературы, высокий уровень НВЛ, в 3 раза превышающий показатели здоровых добровольцев и составляющий 14,5 (2,9-28,6)%, может свидетельствовать о сбое иммунных механизмов защиты и развитии неадекватного воспалительного ответа [5].

Известно, что тяжелое поражение SARS-CoV-2 приводит к острому респираторному дистресс-синдрому, при котором происходит активация нейтрофилов, запускается каскад реакций свертывания крови и образования агрегатов тромбоцитов с нейтрофилами [15, 19]. Активация нейтрофильных гранулоцитов и их дегрануляция способствуют привлечению иммунных клеток и формированию гетероагрегатов тромбоцитов и нейтрофилов, которые регистрировались у пациентов с COVID-19 [21]. По нашим данным, в среднем, у 27,4% переболевших COVID-19, через 1-2 месяца после выздоровления в мазках крови были обнаружены участки нейтрофил-тромбоцитарной агрегации, что, возможно, свидетельствует о длительном сохранении риска тромбоэмболических осложнений у таких лиц.

Формирование системного воспалительного ответа, индуцированного вирусной инфекцией, повреждением тканей и реализуемого в числе прочего посредством «цитокинового шторма», также может приводить к неблагоприятным последствиям и осложнениям в отсроченном и отдаленном периоде [13]. В частности, у большинства пациентов сохраняется стойкое, в течение нескольких недель, нарушение функционирования систем, как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа. Все это свидетельствует о необходимости контроля уровня цитокинов у пациентов, перенесших COVID-19.

В результате нашего исследования было показано, что в супернатантах крови реконвалесцентов через 1-2 месяца после выздоровления было выявлено существенное снижение концентрации ряда цитокинов (IFN γ , TNF α , IL-10 и IL-17A) относительно аналогичных показателей у здоровых добровольцев. Вероятно, это является следствием гиперактивации этих цитокинов в период болезни, когда вирус SARS-CoV-2 проникает в клетки дыхательных путей человека и стимулирует выраженную местную воспалительную реакцию, выражающуюся увеличением концентрации многих цитокинов [23]. Достоверное снижение концентрации ряда цитокинов, в том числе IFN γ , TNF α , IL-10 и IL-17A, в плазме крови реконвалесцентов спустя 30-100 дней после выздоровления от COVID-19 по сравнению с острым периодом болезни является установленным фактом [2].

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что фаза реконвалесценции характеризуется значительным увеличением числа морфологически измененных эритроцитов, нарастанием дегенеративных изменений в нейтрофилах

и формированием нейтрофил-тромбоцитарных агрегатов на фоне значительного снижения уровня продукции цитокинов IFN γ , TNF α , IL-10 и IL-17A, регулирующих лимфоцитарное звено (Th1, Th2, Th17) и имеющих важное значение для обеспечения механизмов врожденного и приобретенного иммунитета.

Выявленные морфофункциональные изменения клеток крови у лиц, перенесших COVID-19, свидетельствуют о длительности сохранения токсических повреждений эритроцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в течение восстановительного периода. Влияние установленных морфофункциональных изменений клеток крови реконвалесцентов после перенесенного COVID-19, приводящих к повышению ее вязкости и нарушению микроциркуляции, формированию нейтрофил-тромбоцитарных агрегатов, вероятно, обуславливает риск развития тромботических осложнений в отдаленный период, а снижение уровня регуляторных цитокинов, подтверждает медленное восстановление лимфоцитарного звена (Th1, Th2, Th17) иммунной системы.

Список литературы / References

1. Алексеева Е.И., Тепаев Р.Ф., Шилькрот И.Ю., Дворяковская Т.М., Сурков А.Г., Криулин И.А. COVID-19-индуцированный «цитокиновый шторм» – особая форма синдрома активации макрофагов // Вестник РАМН, 2021. Т. 76, № 1. С.51-66. [Alexeeva E.I., Tepaev R.F., Shilkrot I.Y. Dvoryakovskaya T.M., Surkov A.G., Kriulin I.A. COVID-19-induced “cytokine storm” – a unique form of macrophage activation syndrome. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2021, Vol. 76, no. 1, pp. 51-66. (In Russ.)]
2. Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Бацунов О.К., Коробова З.Р., Станевич О.В., Лебедева А.А., Воробьев Е.А., Воробьева С.В., Куликов А.Н., Лиознов Д.А., Шарапова М.А., Певцов Д.Э., Тотолян А.А. Цитокины в плазме крови больных COVID-19 в острой фазе заболевания и фазе полного выздоровления // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 311-326. [Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Lioznov D.A., Sharapova M.A., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Plasma cytokines in patients with COVID-19 during acute phase of the disease and following complete recovery. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 2, pp. 311-326. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PCI-2312.
3. Байбеков И.М., Мавлян-Ходжаев Р.Ш., Эрстекис А.Г., Москвин С.В. Эритроциты в норме, патологии и при лазерных воздействиях. Тверь: Триада, 2008. 256 с. [Baibekov I.M., Mavlyan-Khodzhaev R.Sh., Erstekis A.G., Moskvina S.V. Erythrocytes are normal, pathological and under laser exposure]. Tver: Triada, 2008. 256 p.
4. Бугоркова С.А., Клюева С.Н. Топографическая характеристика состояния мембран эритроцитов крови при экспериментальном вакцинном процессе // Морфологические ведомости, 2015. № 2. С. 21-27. [Bugorkova S.A., Klyueva S.N. Topographic characteristics of the state of erythrocyte membranes in the experimental vaccine process. *Morfologicheskie vedomosti = Morphological Statements*. 2015, no. 2, pp. 21-27. (In Russ.)]
5. Кассина Д.В., Василенко И.А., Гурьев А.С., Волков А.Ю., Метелин В.Б. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: значение для диагностики и прогноза COVID-19 // Альманах клинической медицины. 2020. № 48. С. 43-50. [Kassina D.V., Vasilenko I.A., Gur'ev A.S., Volkov A.Yu., Metelin V.B. Neutrophil extracellular traps: diagnostic and prognostic value in COVID-19. *Almanakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, 2020, no. 48, pp. 43-50. (In Russ.)]
6. Клюева С.Н., Шуковская Т.Н. Влияние адъювантов нового поколения *in vitro* на продукцию цитокинов клетками крови вакцинированных против чумы лиц // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9 (18), № 2. С. 201-208. [Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N. Influence of new generation adjuvants *in vitro* on cytokine production by blood cells of people vaccinated against plague. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 2, pp. 201-208. (In Russ.)]

7. Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Ключева С.Н., Кожевников В.А., Кудрявцева О.М. Определение экспрессии FcγRIIIb (CD16) на поверхности нейтрофилов крови привитых против чумы людей // Молекулярная медицина, 2020. Т. 18, № 2. С. 33-38. [Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., Kozhevnikov V.A., Kudryavtseva O.M. Determination of FcγRIIIb (CD16) expression on the surface blood neutrophils in anti-plague vaccinated people. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2020, Vol. 18, no. 2, pp. 33-38. (In Russ.)]
8. Макацария А.Д., Слуханчук Е.В., Бицадзе В.О., Хизроева Д.Х., Третьякова М.В., Цибизова В.И., Шкода А.С., Грандоне Э., Элалами И., Риццо Д., Грис Ж.-К.Р., Шульман С., Бреннер В. COVID-19, нарушения гемостаза и риск тромботических осложнений // Вестник РАМН, 2020. Т. 75, № 4. С. 306-317. [Makatsariya A.D., Slukhanchuk E.V., Bitsadze V.O., Khizroeva J.K.H., Tretyakova M.V., Tsibizova V.I., Shkoda A.S., Grandone E., Elalamy I., Rizzo G., Gris J.-C.R., Schulman S., Brenner B. COVID-19, hemostasis disorders and risk of thrombotic complications. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2020, Vol. 75, no. 4, pp. 306-317. (In Russ.)]
9. Мороз В.В., Черныш А.М., Козлова Е.К. Коронавирус SARS-CoV-2: гипотезы влияния на кровеносную систему, перспективы использования перфторуглеродной эмульсии, возможности биофизических методов исследования // Общая реаниматология, 2020. Т. 16, № 3. С. 4-13. [Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K. Coronavirus SARS-CoV-2: hypotheses of impact on the circulatory system, prospects for the use of perfluorocarbon emulsion, and feasibility of biophysical research methods. *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*, 2020, Vol. 16, no. 3, pp. 4-13. (In Russ.)]
10. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 // Инфекция и иммунитет, 2017. Т. 7, № 3. С. 219-230. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.D.L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 1. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, Vol. 7, no. 3, pp. 219-230. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230.
11. Николаева О.В., Кучерявченко М.А., Шутова Н.А., Шевченко А.Н., Литвиненко Е.Ю. Патопфизиология системы крови. Часть II. Нарушения в системе лейкоцитов. Харьков: Типография «Мадрид», 2016. 128 с. [Nikolaeva O.V., Kucheryavchenko M.A., Shutova N.A., Shevchenko A.N., Litvinenko E.Yu. Pathophysiology of the blood system. Part II. Disturbances in the leukocyte system]. Kharkiv: Typography "Madrid", 2016. 128 p.
12. Berzuini A., Bianco C., Migliorini A.C., Maggioni M., Valenti L., Prati D. Red blood cell morphology in patients with COVID-19-related anaemia. *Blood Transfus.*, 2021, Vol. 19, no. 1, pp. 34-36.
13. Costela-Ruiz V., Illescas-Montes R., Puerta-Puerta J., Ruiz C., Melguizo-Rodríguez L. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2020, no. 54, pp. 62-75.
14. Kubánková M., Hohberger B., Hoffmanns J., Fürst J., Herrmann M., Guck J., Kräter M. Physical phenotype of blood cells is altered in COVID-19. *Biophys. J.*, 2021, Vol. 120, no. 14, pp. 2838-2847.
15. Manne B.K., Denorme F., Middleton E.A., Portier I., Rowley J.W., Stubben C., Petrey A.C., Tolley N.D., Guo L., Cody M., Weyrich A.S., Yost C.C., Rondina M.T., Campbell R.A. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood*, 2020, Vol. 136, no. 11, pp. 1317-1329.
16. Mei H., Luo L., Hu Y. Thrombocytopenia and thrombosis in hospitalized patients with COVID-19. *J. Hematol. Oncol.*, 2020, Vol. 13, no. 1, 161. doi: 10.1186/s13045-020-01003-z.
17. Mokhtari T., Hassani F., Ghaffari N., Ebrahimi B., Yarahmadi A., Hassanzadeh G. COVID-19 and multiorgan failure: A narrative review on potential mechanisms. *J. Mol. Histol.*, 2020, Vol. 51, no. 6, pp. 613-628.
18. Moore J.B., June C.H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*, 2020, Vol. 368, no. 6490, pp. 473-474.
19. Nicolai L., Leunig A., Brambs S., Kaiser R., Weinberger T., Weigand M., Muenchhoff M., Hellmuth J.C., Ledderose S., Schulz H., Scherer C., Rudelius M., Zoller M., Höchter D., Keppler O., Teupser D., Zwißler B., von Bergwelt-Baildon M., Käb S., Massberg S., Pekayvaz K., Stark K. Immunothrombotic dysregulation in COVID-19 pneumonia is associated with respiratory failure and coagulopathy. *Circulation*, 2020, Vol. 142, no. 12, pp. 1176-1189.
20. Paraskova Z., Zentsova I., Bloomfield M., Vrabцова P., Smetanova J., Klocperk A., Mesežnikov G., Mendez L.F.C., Vymazal T., Sediva A. Disharmonic inflammatory signatures in COVID-19: augmented neutrophils, but impaired monocytes and dendritic cells, responsiveness. *Cell*, 2020, Vol. 9, no. 10, 2206. doi: 10.3390/cells9102206.
21. Rampotas A., Pavord S. Platelet aggregates, a marker of severe COVID-19 disease. *J. Clin. Pathol.*, 2020, jclinpath-2020-206933. doi: 10.1136/jclinpath-2020-206933.
22. Reva I., Yamamoto T., Rasskazova M., Lemeshko T., Usov V., Krasnikov Y., Fisenko A., Kotsyurbiy E., Tudakov V., Tsegolnik E., Oleksenko O., Korobkin A., Slabenko E., Shindina A., Gordzievskaya K., Furgal A., Reva G. Erythrocytes as a target of SARS COV-2 in pathogenesis of COVID-19. *Arch. Euromed.*, 2020, Vol. 10, no. 3, pp. 5-11.
23. Shibabaw T. Inflammatory cytokine: IL-17A signaling pathway in patients present with COVID-19 and current treatment strategy. *J. Inflamm. Res.*, 2020, no. 13, pp. 673-680.
24. Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., Ng L.F.P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, no. 6, pp. 363-374.

25. Vera E.J., Chew Y.V., Nicholson L., Burns H., Anderson P., Chen H.-T., Williams L., Keung K., Zanjani N.T., Dervish S., Patrick E., Wang X.M., Yi S., Hawthorne W., Alexander S., O'Connell P.J., Hu M. Standardization of flow cytometry for whole blood immunophenotyping of islet transplant and transplant clinical trial recipients. *PLoS One*, 2019, Vol. 22, no. 14 (5), e0217163. doi: 10.1371/journal.pone.0217163.
26. Wu D., Yang X.O. TH17 responses in cytokine storm of COVID-19: an emerging target of JAK2 inhibitor fedratinib. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2020, Vol. 53, no. 3, pp. 368-370.
27. Ye Q., Wang B., Mao J. The pathogenesis and treatment of the cytokine storm in COVID-19. *J. Infect.*, 2020, Vol. 80, no. 6, pp. 607-613.

Авторы:

Клюева С.Н. — к.б.н., научный сотрудник
отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-
исследовательский противочумный институт
«Микроб»», г. Саратов, Россия

Кравцов А.Л. — д.б.н., ведущий научный сотрудник
отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-
исследовательский противочумный институт
«Микроб»», г. Саратов, Россия

Бугоркова С.А. — д.м.н., и.о. заведующего
отделом иммунологии ФКУЗ «Российский научно-
исследовательский противочумный институт
«Микроб»», г. Саратов, Россия

Authors:

Klyueva S.N., PhD (Biology), Research Associate, Department
of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute
“Microbe”, Saratov, Russian Federation

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

Bugorkova S.A., PhD, MD (Medicine), Acting Chief,
Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague
Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Поступила 18.04.2022
Принята к печати 22.05.2022

Received 18.04.2022
Accepted 22.05.2022