

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ COVID-19

Свирищевская Е.В.^{1,2}, Коновалова М.В.¹, Садыков В.Ф.²,
Пырегов А.В.², Полтавцева Р.А.²

¹ ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук, Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии
имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Патогенез тяжелой коронавирусной инфекции COVID-19 ассоциирован с активацией иммунной системы, цитокиновым штормом, нарушением гемостаза крови, микрососудистым тромбозом, ишемией органов и синдромом полиорганной дисфункции. Роль различных субпопуляций при COVID-19 до сих пор дискутируется. Целью исследования являлся анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови больных COVID-19 по сравнению со здоровыми донорами.

В исследование включили 20 больных COVID-19 (11 мужчин и 9 женщин) и 26 здоровых доноров. Средний возраст больных составил 52 и 56 лет соответственно. Лимфоциты периферической крови выделяли на градиенте фиколла. Клетки окрашивали антителами к основным популяциям лимфоцитов, маркерам эндотелиальных клеток и апоптоза. Анализ проводили методом проточной цитометрии. Клинические данные получены стандартными лабораторными методами. Результаты показали, что у всех больных были повышены С-реактивный белок (в 14-35 раз), ферритин (в 1,2-13 раз), D-Димеры (в 1,2-90 раз). У 55% мужчин наблюдали снижение абсолютного числа лимфоцитов, у женщин этот показатель находился на нижней границе нормы. Цитометрический анализ показал, что среди лимфоцитов периферической крови доля функциональных клеток, экспрессирующих маркер CD45, у 70% больных составляла от 2 до 12% при 80-99% у всех доноров. Доля CD45⁺ лимфоцитов достоверно коррелировала с уровнем гемоглобина, но не с уровнями воспалительных биохимических маркеров. Среди функциональных лимфоцитов больных наблюдали снижение доли CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺T-клеток, увеличение доли натуральных киллеров CD56⁺ и уровня апоптотических клеток AnnexinV⁺, но не было изменения в доле В-клеток CD19 и HLA-DR⁺. Анализ субпопуляций ЛЦ, не экспрессирующих маркер CD45, показал наличие в этой фракции всех популяций лимфоцитов со сниженной экспрессией CD4, CD8, CD19, CD56 и других в крови больных и доноров. Отличием между больными и донорами был высокий процент эндотелиальных клеток, экспрессирующих маркер CD62P.

Адрес для переписки:

Свирищевская Елена Викторовна
ФГБУН «Институт биоорганической химии имени
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук
117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел.: 8 (910) 464-87-60.
E-mail: esvir@mail.ibch.ru

Address for correspondence:

Elena V. Svirshchetskaya
Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences
16/10 Miklukho-Maclay St
Moscow
117997 Russian Federation
Phone: +7 (910) 464-87-60.
E-mail: esvir@mail.ibch.ru

Образец цитирования:

Е.В. Свирищевская, М.В. Коновалова, В.Ф. Садыков,
А.В. Пырегов, Р.А. Полтавцева «Субпопуляционный
состав лимфоцитов периферической крови при
COVID-19» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25,
№ 1. С. 155-166. doi: 10.15789/1563-0625-SCO-2552

© Свирищевская Е.В. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.V. Svirshchetskaya, M.V. Konovalova, V.F. Sadykov,
A.V. Pyregov, R.A. Poltavtseva "Subpopulation composition
of peripheral blood lymphocytes in COVID-19", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023,
Vol. 25, no. 1, pp. 155-166.

doi: 10.15789/1563-0625-SCO-2552

© Svirshchetskaya E.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-SCO-2552

Определение лабораторными методами количества лимфоцитов в крови больных COVID-19 не отражает реальную картину тяжести заболевания и требует определения доли функциональных клеток, экспрессирующих CD45.

Ключевые слова: COVID-19, лимфоциты периферической крови, экспрессия CD45, проточная цитометрия, апоптоз, эндотелий

SUBPOPULATION COMPOSITION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN COVID-19

Svirshchevskaya E.V.^{a, b}, Konovalova M.V.^a, Sadykov V.F.^b,
Pyregov A.V.^b, Poltavtseva R.A.^b

^a Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The pathogenesis of severe coronavirus infection COVID-19 is associated with activation of immune system, cytokine storm, impaired blood clotting, microvascular thrombosis, organ ischemia and multiple organ dysfunction syndrome. The role of various lymphocyte subpopulations in COVID-19 is still debated. The aim of our study was to analyze the subpopulational profile of peripheral blood lymphocytes in COVID-19 patients as compared with healthy donors.

The study included 20 COVID-19 patients (11 males and 9 females,) and 26 healthy donors. Average age of the patients was 52 and 56 years, respectively. Clinical examinations were performed by standard laboratory methods. Peripheral blood lymphocytes were isolated in the Ficoll gradient. The cells were stained with antibodies to specific antigens of main lymphocyte populations, endothelial cells, and apoptotic cell markers. The analysis was performed by flow cytometry. The results showed that all patients had elevated C-reactive protein (14- to 35-fold), ferritin (1.2- to 13-fold), D-dimers (1.2- to 90-fold). 55% of men had a decrease in the absolute number of lymphocytes, in women this index was at the low normal limit. Cytometric analysis showed that, among peripheral blood lymphocytes, the proportion of functional cells expressing the CD45 marker ranged from 2 to 12% in 70% of patients, as compared with 80-99% among the donors. The proportion of CD45⁺ lymphocytes significantly correlated with the level of hemoglobin, but not with the levels of inflammatory biochemical markers. Among the functional lymphocytes of patients, there was a decrease in the proportion of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺T cells, increased proportion of natural killer CD56⁺ and the apoptotic (AnnexinV⁺) cell contents, but the proportion of CD19 and HLA-DR⁺B cells was not changed. Analysis of the lymphocyte (LC) subpopulations that did not express CD45 marker showed that this fraction contained different lymphocyte subsets with reduced expression of CD4, CD8, CD19, CD56 etc. in the blood of patients and donors. Higher percentage of endothelial cells expressing CD62P marker made the difference between patients and donors.

Laboratory determination of lymphocyte subsets in blood samples of COVID-19 patients does not reflect the real severity pattern of the disease, thus requiring studies of the CD45-expressing functional cell populations.

Keywords: COVID-19, lymphocyte subpopulations, CD45, flow cytometry, apoptosis, endothelium

Введение

Продолжающаяся вспышка коронавирусной инфекции COVID-19 требует детального понимания патогенеза заболевания. В настоящее время инфекции, вызванные COVID-19, классифицируются как тяжелые, легкие или бессимптомные, а также критические (острый респираторный дистресс-синдром, сепсис). Неблагоприятные

прогностические факторы включают изменения в легких по типу «матового стекла» при компьютерной томографии, лимфопению, бактериальную ко-инфекцию, значительное повышение маркеров воспаления (С-реактивный белок, ферритин, D-Димеры, прокальцитонин), коморбидные хронические заболевания, такие как гипертония и диабет, возраст старше 60 лет [2]. Снижение количества лимфоцитов (ЛЦ) в кро-

ви однозначно показывает, что иммунитет принимает непосредственное участие в патогенезе инфекции [2]. Однако с точки зрения клеточной иммунной функции не ясно, как провести различие между нетяжелыми и тяжелыми случаями. Различие между нетяжелыми и тяжелыми случаями пневмонии COVID-19 напрямую влияет на выживаемость пациентов и варианты лечения.

Роль различных субпопуляций клеток крови активно изучается. Так, выявили увеличение в крови фибробластов, несущих маркеры CD45⁺/CD15⁺/CD34⁺/коллаген-1⁺ [6]. Однако доля таких клеток повышалась незначительно (3,6% против 2,1% в контроле). Секвенирование транскриптома отдельных клеток и Т-клеточного/В-клеточного рецептора в образцах ЛЦ периферической крови, собранных у бессимптомных, умеренных и тяжелых пациентов, а также здоровых доноров показало увеличение CD56⁺CD16⁺ естественных киллеров (NK), экспансию эффекторных CD4⁺Т-клеток, но не В-клеток у тяжелых больных по сравнению с пациентами средней тяжести [21]. Аналогичное исследование на клональном уровне показало увеличение доли дендритных клеток, CD14⁺ моноцитов и клеток-предшественников мегакариоцитов, уменьшение наивных CD4⁺Т-лимфоцитов, CD8⁺Т-лимфоцитов и естественных киллеров у пациентов с COVID-19 [10]. Анализ пула клеток показал уменьшение доли дендритных клеток, снижение экспрессии CD86, увеличение доли CD163⁺CD14⁺ клеток и повышение экспрессии лиганда программируемой смерти 1 в дендритных клетках и моноцитах [20].

Анализ бронхоальвеолярной лаважной жидкости у 88 пациентов с дыхательной недостаточностью, вызванной SARS-CoV-2, и у 211 пациентов с известной или предполагаемой пневмонией, вызванной другими патогенами, показал, что у большинства COVID-19 пациентов альвеолярное пространство постоянно обогащалось Т-клетками и моноцитами [7]. Авторы заключили, что SARS-CoV-2 вызывает медленно развивающийся пространственно ограниченный альвеолит, при котором альвеолярные макрофаги, содержащие SARS-CoV-2 и Т-клетки, вызывает стойкое альвеолярное воспаление. Накопление Т- и NK-клеток, но не нейтрофилов и макрофагов в легких больных показано на клеточном уровне и другими группами [3, 4].

Роль ЛЦ при COVID-19 связана с цитокиновым штормом. Показано, что повышение уровня цитокинов коррелирует с тяжестью заболевания, а также со снижением доли CD8 Т-клеток [19].

Снижение доли CD3, CD8 и CD45 Т-клеток и их функциональной активности, увеличение доли натуральных киллеров могут быть прогно-

стическими факторами тяжести заболевания [12, 14]. Таким образом, все основные субпопуляции ЛЦ периферической крови вовлечены в патогенез COVID-19. Однако для понимания, какие из этих изменений играют ключевую роль, требуется одновременный анализ все основных субпопуляций ЛЦ периферической крови.

Целью настоящего исследования являлся анализ изменения субпопуляционного состава ЛЦ периферической крови больных с тяжелым течением COVID-19 и сравнение изменений с клиническими параметрами. Результаты этого исследования помогут выявить иммунные изменения, вызванные инфекцией COVID-19, а также провести различие между тяжелыми и нетяжелыми случаями.

Материалы и методы

Выделение периферических мононуклеарных клеток

В исследование включили 20 больных COVID-19, госпитализированных в отделение реанимации ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, и 26 здоровых доноров. Все исследования с участием клеток человека проводились в соответствии с руководящими принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Протокол эксперимента был одобрен Институциональной этической комиссией Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии, протокол № 8 от 26.08.2021.

Мононуклеарные клетки периферической крови получали градиентным центрифугированием с использованием стандартного раствора Ficoll (PanEco, Россия), плотность 1,077.

Иммуноокрашивание и проточная цитометрия

Клетки окрашивали комбинацией моноклональных антител (МАВ) и анализировали, как описано ранее (39). Для окрашивания использовали следующие МАВ: CD3-PE-Cy7 (клон UCST1), CD56-APC (клон N901), CD56-PE (клон N901), CD45RO-PE (клон UCST1) (Beckman Coulter); CD56-Brilliant Violet 421 (клон HCD56), CD56-PE-Cy7 (клон 5.1H11), анти-HLA-DR-PE (клон L243), AnnexinV-FITC (Sony Biotechnology); CD45RA-PE (клон HI100), CCR7-PE (клон G043H7) (Biolegend); CD45RA-Brilliant Violet 421 (клон HI100), CD45RO-FITC (клон UCST1), CD3-APC (BD Biosciences, США, клон UCST1), CD4-FITC (Сорбент, РФ, клон 1), CD8-PerCP Cy5.5 (Immunotech, Франция, клон B9.11).

Многоцветный проточный цитометрический анализ проводили на проточном цитометре MACSQuant Tyro (Miltenyi, Германия). Поверх-

ностное флуоресцентное иммуноокрашивание проводили в течение 60 мин на льду в буфере для окрашивания (PBS, содержащий 0,5% BSA (бычий сывороточный альбумин) (Serva, Гейдельберг, Германия) и 0,01% азида натрия (AMRESCO, Inc. (VWR International, LLC), Aurora, CO, США). Регистровали по меньшей мере 30 000 событий в лимфоцитарном окне. Полученные данные анализировали с использованием программы FlowJo версия 10 (FlowJo LLC, Эшленд, Орегон, США).

Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения Excel, t-критерия Стьюдента и корреляции по Пирсону. Значения сравнения при $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

Результаты

Клиническая картина COVID-19 у мужчин и женщин

В исследование включили 20 больных с COVID-19, 11 мужчин и 9 женщин со средним возрастом 52 и 56 лет соответственно (табл. 1). Для сравнения провели анализ иммунного статуса 26 здоровых доноров, средний возраст 47 ± 17 , из них 13 человек со средним возрастом 28 ± 4 лет и 13 человек со средним возрастом 61 ± 4 . У всех мужчин с COVID-19 были повышены уровни С-реактивного белка (CRP), ферритина и D-димеров, у 45% был также повышен прокальцитонин. У всех женщин был повышен CRP, у 67% был повышен ферритин и прокальцитонин, у 89% – D-димер. У мужчин средние показатели по уровню ферритина и D-димерам были примерно в 1,5 раза выше, чем у женщин. Общее количество лейкоцитов было повышено у 27% мужчин и 44% женщин. При этом у 55% мужчин было снижено как абсолютное, так и относительное количество лимфоцитов. У всех женщин за исключением одного случая в повышенном количестве ЛЦ находились на нижней границе нормы. Соответственно, практически у всех больных было повышено относительное количество нейтрофилов. Количество тромбоцитов и моноцитов изменялось незначительно. Только у 18% мужчин снижался уровень гемоглобина, тогда как у 67% женщин наблюдали сниженный гемоглобин. Из 9 женщин с COVID-19 две умерли (22%).

Все клинические показатели здоровых доноров находились в пределах нормы (данные не приводятся). При анализе иммунного статуса здоровых доноров групп 28 ($n = 13$) и 61 ($n = 13$) лет достоверных различий не было за исключением снижения доли $CD8^+$ Т-клеток с $30,7 \pm 6,4\%$ до $25,5 \pm 7,7\%$ ($p = 0,049$) и увеличения доли активированных Т-клеток $CD3^+HLA-DR^+$ с $1,1 \pm 0,4$

до $3,4 \pm 3,3$ ($p = 0,044$) у доноров старшей группы по сравнению с молодыми донорами.

Для понимания, какие клинические параметры наиболее значимы, мы провели корреляционный анализ по Пирсону уровней CRP, ферритина, D-димеров, прокальцитонина, гемоглобина и долей $CD45^+$ ЛЦ в крови. Ни в одной из комбинаций клинических данных биохимических маркеров воспаления достоверных корреляций не было. Две достоверные корреляции были выявлены между уровнями CRP и гемоглобина с долей $CD45^+$ ЛЦ у мужчин и только гемоглобина с долей $CD45^+$ ЛЦ у женщин (табл. 1, где r – коэффициент корреляции Пирсона). Корреляция с CRP была отрицательной, т. е. чем больше показатели CRP, тем меньше было $CD45^+$ ЛЦ.

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови больных COVID-19 и здоровых доноров

При анализе иммунного статуса мужчин и женщин с COVID-19 достоверные различия наблюдали только по доле В-клеток ($CD19^+HLA-DR^+$): у женщин доля В-клеток была в 2,5 раза ниже, чем у мужчин (6 ± 4 и 15 ± 10 соответственно, $p = 0,005$). Далее приведены усредненные данные по всем больным.

На рисунке 1 приведены репрезентативные данные проточной цитометрии. Для анализа выбирали пятно лимфоцитов (рис. 1А, Д), с помощью ядерного красителя DAPI отсекали все мертвые клетки и выбирали зону синглетных клеток (не показано), далее выделяли популяцию $CD45^+$ клеток (рис. 1Б, Е) и уже в этой популяции анализировали субпопуляции лимфоцитов. Первое и самое значительное отличие наблюдали в доле $CD45^+$ ЛЦ. У больных COVID-19 доля $CD45^+$ клеток была в 4 раза ниже, чем у доноров (рис. 2А, $p < 0,0001$).

Фермент тирозинфосфатаза $CD45$, известный как общий антиген лейкоцитов (LCA) или рецептор белковой тирозинфосфатазы типа С (PTPRC), экспрессируется на поверхности всех ядросодержащих клеток гемопоэтического происхождения. В Т-клетках она может составлять до 10% белков клеточной поверхности [5]. $CD45$ необходим для передачи сигнала Т-клеткам через Т-клеточный рецептор (TCR), в меньшей степени В-клеткам [8, 9, 16]. Потеря экспрессии $CD45$ означает потерю функциональной активности ЛЦ, как минимум активность Т-клеток, составляющих основную часть ЛЦ периферической крови.

При анализе субпопуляционного состава $CD45^+$ ЛЦ были выявлены все основные типы клеток: $CD3^+$ Т-клетки, $CD19^+HLA-DR^+$ В-клетки как у доноров (рис. 1В), так и у больных (рис. 1Ж); естественные киллеры (NK)

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БОЛЬНЫХ С ТЯЖЕЛОЙ ФОРМОЙ COVID-19

TABLE 1. CLINICAL INDICATORS OF PATIENTS WITH SEVERE COVID-19

№ No.	Возраст Age	Лейкоциты, абс. WBC, abs.	Лимфоциты, абс. Lymphocytes, abs.	Нейтрофилы, % PMN, %	Моноциты, % Monocytes, %	Тромбоциты Platelets	С-реактивный белок CRP	Ферритин Ferritin	D-димеры D-dimer	Прокальцитонин Procalcitonin	Гемоглобин Hemoglobin	CD45 ⁺
Норма Norm		3,8-9,7 × 10 ⁹ /л 3.8-9.7 × 10 ⁹ /L	1-4 × 10 ⁹ /л 1-4 × 10 ⁹ /L	42-75	2-11	150-400 × 10 ⁹ /л 150-400 × 10 ⁹ /L	0-5 мкг/мл 0-5 µg/mL	20-250 мкг/л 20-250 µg/L	< 450 нг/мл < 450ng/mL	0-0,5 нг/мл 0-0.5 ng/mL	117-160 г/л 117-160 g/L	> 70
Мужчины Males												
1	68	9,1	0,5↓*	88↑	4,8	234	176	806	6335	1,7	118	1
2	46	15↑**	1,5	79↑	6,9	303	94	3283	1045	11,0	111↓	6
3	46	7,2	0,5↓	83↑	7,8	269	206	2354	536	1,9	131	7
4	67	5,2	0,5↓	80↑	7,7	284	84	444	2805	1,5	119	8
5	55	13↑	1,1	83↑	6,1	357	145	270	2265	3,2	125	10
6	41	8,5	0,9↓	82↑	5,1	206	169	3011	1064	2,2	120	10
7	38	14↑	1,0	86↑	4,5	339	169	690	41276	0,4	94↓	12
8	58	9,1	0,5↓	86↑	6,4	226	113	1168	13754	0,3	135	75
9	66	10,6	1,2	79↑	8,7	332	116	1093	3433	0,3	143	77
10	36	11,8	0,8↓	88↑	4,6	573	111	1134	1298	0,2	144	79
11	72	6,8	1,0	71	12,5	171	70	292	653	0,3	149	80
Средний возраст Average age 52±12					r***		-0,54 p < 0,05				0,79 p < 0.005	
Женщины Females												
1	40	43↑	10↑	75	4,5	586	191	1381	7672	5,8	73↓	3
2	67	13↑	1,2	82↑	6,7	434	95	67	4839	0,1	79↓	2
3	34	16↑	1,2	85↑	6,6	300	129	217	10067	13,0	84↓	4
4	69	18↑	1,7	83↑	6,5	127	131	1518	11154	4,2	103↓	11
5	71	7,9	1,1	81↑	5,3	207	101	931	946	1,0	104	10
6	73	7,6	1,1	77↑	6,2	228	154	390	2078	1,1	82↓	8
7	48	5,7	1,2	70	8,6	334	56	175	736	0,1	105↓	11
8	47	9,5	1,2	82↑	5,0	349	142	749	279	4,7	133	82
9	56	9,7	1,6	72	11,2	626	125	339	741	0,0	126	56
Средний возраст Average age 56±16					r						0,92 p < 0,0005	

Примечание. * ↓ – достоверное снижение, отмечено жирным и полужирным шрифтом; ** ↑ – достоверное повышение, отмечено жирным шрифтом; *** – коэффициент корреляции Пирсона гемоглобин / доля CD45⁺ клеток.

Note. * ↓, significant decrease, marked in bold and italics; ** ↑, significant increase, marked in bold; ***, pearson correlation coefficient hemoglobin/proportion of CD45⁺ cells.

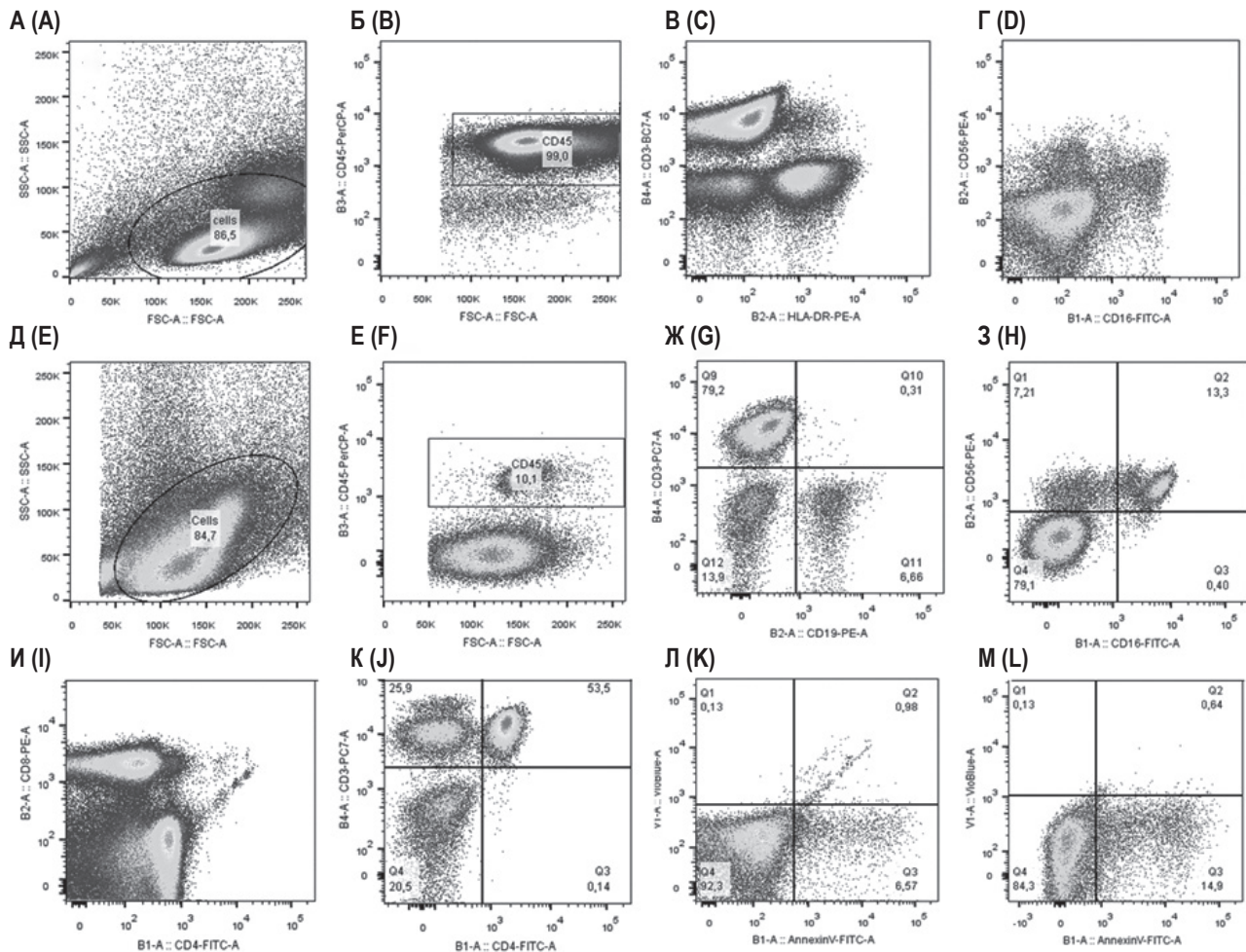


Рисунок 1. Анализ субпопуляций лимфоцитов в крови больных COVID-19 и здоровых доноров

Примечание. Анализ субпопуляций в регионе пятен лимфоцитов (А, Д, овалы) и CD45⁺ клеток (Б, Е, прямоугольники). Общий вид распределения по размеру и гранулярности (А, Д), экспрессии CD45 (Б, Е), CD3, HLA-DR, CD19 (В, Ж), CD16, CD56 (Г, З) клеток доноров (А-Г) и больных COVID-19 (Д-З). Распределение Т-клеток по экспрессии CD4, CD3, CD8 в клетках доноров (И) и больных (К). Уровень апоптоза по AnnexinV в клетках доноров (Л) и больных (М). Приведены репрезентативные данные.

Figure 1. Analysis of lymphocyte subpopulations in the blood of COVID-19 patients and healthy donors

Note. Analysis of subpopulations in the region of lymphocytes (A, E ovals) and CD45⁺ cells (B, F, rectangles). An overview of the distribution by size and granularity (A, F), expression of CD45 (B, F), CD3, HLA-DR, CD19 (C, G), CD16, CD56 (B, H) of donor cells (A-E) and COVID-19 patients (E-H). Distribution of T cells by the expression of CD4, CD3, CD8 in the donors' (I) and patients' (J) cells. The level of apoptosis according to AnnexinV staining in the donors' (K) and patients' (L) cells. Representative data are presented.

CD16⁺CD56⁺ (рис. 1Г, З). Из Т-клеток определялись CD4⁺Т-хелперы и CD8⁺ цитотоксические клетки (рис. 1И, К). Доля апоптотических клеток ЛЦ AnnexinV⁺ была выше у больных по сравнению с донорами (рис. 1Л, М). Суммарные данные по субпопуляциям в крови больных COVID-19 и доноров приведены на рисунке 2.

Среди различных субпопуляций достоверное снижение при COVID-19 выявили доли CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺Т-клеток (рис. 2А). При этом CD8⁺ клетки гибли больше, что привело к достоверному увеличению индекса CD4/CD8 (рис. 2Б). Не было достоверных различий в доли В-клеток

(рис. 2Е). Среди ЛЦ больных был повышен уровень апоптотических клеток (рис. 2Д).

Одним из вопросов является анализ Т-клеток памяти, характеризующихся экспрессией маркеров CCR7, CD62L, CD45RA, CD45RO. В зависимости от функционального состояния Т-клетки экспрессируют различные сочетания этих маркеров. Наивные непримированные Т-клетки экспрессируют CD45, CD3, CCR7, CD62L, CD45RA (Т на ve); транзитные Т-клетки из наивных в эффекторы характеризуется экспрессией CD45, CD3, CCR7, CD62L, CD45RO, называемые центральными клетками памяти (Тcm);

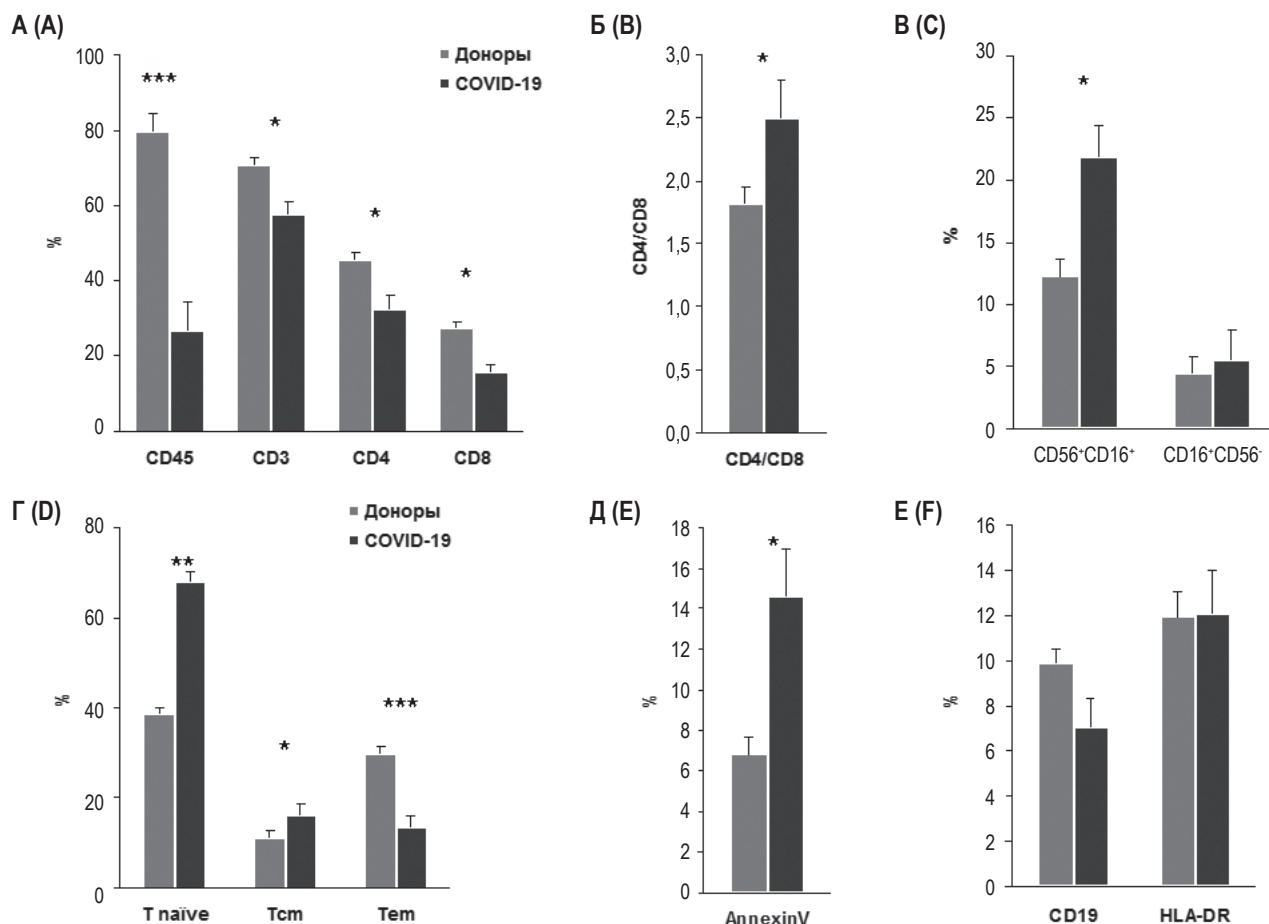


Рисунок 2. Усредненные данные по субпопуляционному составу лимфоцитов периферической крови доноров и больных COVID-19

Примечание. Доли функциональных лимфоцитов CD45⁺, CD3, CD4, CD8 (А); соотношение CD4/CD8 (Б); естественных киллеров CD16⁺CD56⁺ (В); CD19⁺HLA-DR⁺В-клеток (Е) в крови доноров (серые гистограммы) и больных (черные гистограммы). Доли наивных Т-клеток (T naïve, CCR7⁺CD62L⁺), Т-клеток центральной памяти (Tcm, CCR7⁺CD45RO⁺), Т-клеток эффекторов (Tem, CCR7⁺CD45RO⁺) проведены в окне CD3⁺ клеток (Г); дол апоптотических лимфоцитов (AnnexinV⁺, Д). Достоверные различия отмечены звездочками, где *, ** и *** обозначают уровни достоверности по t-критерию Стьюдента < 0,05; 0,01 и 0,001 соответственно.

Figure 2. Averaged data on the subpopulations of the peripheral blood lymphocytes from donors and COVID-19 patients
Note. The proportion of functional lymphocytes CD45⁺, CD3, CD4, CD8 (A); CD4/CD8 ratio (B); natural killer CD16⁺CD56⁺ (C); CD19⁺HLA-DR⁺B cells (F) in the blood of donors (gray histograms) and patients (black histograms). The shares of naïve T cells (T naïve, CCR7⁺CD62L⁺), central memory T cells (Tcm, CCR7⁺CD45RO⁺), effector T cells (Tem, CCR7⁺CD45RO⁺) were carried out in the CD3⁺ cell window (D); the shares of apoptotic lymphocytes (AnnexinV⁺, E). Significant differences are marked with asterisks, where *, ** and *** denote the levels of confidence according to the Student's t criterion < 0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

эффекторные терминальные Т-клетки памяти не экспрессируют маркеров наивных Т-клеток CCR7 и CD62L, но экспрессируют маркеры памяти CD45, CD3, CD45RO (Tem) [13, 18]. Анализ субпопуляций Т-клеток памяти проведен с окне CD3⁺ Т-клеток. При COVID-19 погибают в первую очередь эффекторные Т-клетки (Tem), замещающиеся наивными (Tnaïve) и транзитными (Tcm) Т-клетками (рис. 2Г).

Приведенные на рисунках 1 и 2 данные соответствуют процентам от общего количества ЛЦ

периферической крови. С учетом значительного снижения (в 2-10 раз) доли CD45⁺ клеток абсолютное количество каждой из субпопуляций значительно меньше, чем в крови здоровых доноров.

Субпопуляционный состав CD45-лимфоцитов периферической крови больных COVID-19 и здоровых доноров

Большая доля клеток из пятна ЛЦ (рис. 1А, Д) не экспрессирует основной маркер CD45 (рис. 1Б, Е). Для анализа состава негативных по CD45 клеток выбирали регион CD45⁻ (рис. 3А, Д, пря-

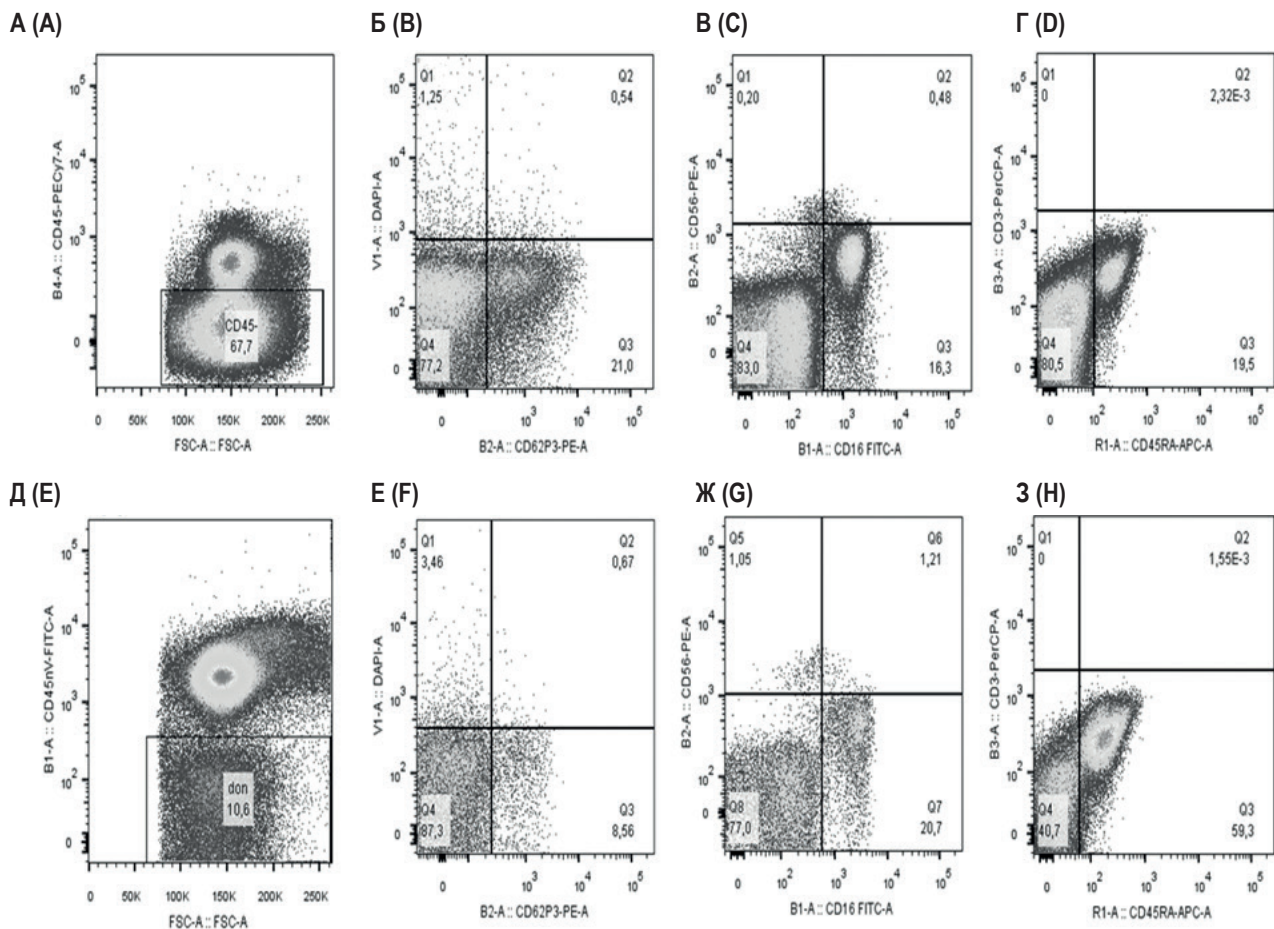


Рисунок 3. Анализ CD45-субпопуляций лимфоцитов в крови больных COVID-19 и здоровых доноров

Примечание. Анализ субпопуляций в регионе пятен лимфоцитов и CD45-клеток (А, Д, прямоугольники). Обзорный вид распределения по размеру и экспрессии CD45 (А, Д), экспрессии CD62P (Б, Е), CD16, CD56 (В, Ж), CD3, CD45RA (Г, З), клеток больных (А-Г) и доноров (Д-З). Приведены репрезентативные данные.

Figure 3. Analysis of CD45 lymphocyte subpopulations in the blood of COVID-19 patients and healthy donors

Note. Analysis of subpopulations in the region of lymphocytes and CD45 cells (A, E, rectangles). An overview of the size distribution and expression of CD45 (A, E), CD62L (B, F), CD16, CD56 (C, G), CD3, CD45RA (D, H), patient cells (A-D) and donors (E-H). Representative data are provided.

моугольник). У здоровых людей от 1 до 15% клеток находятся в этом окне, у больных COVID-19 в это окно попадает от 50 до 95%, на рисунке 3 68% морфологических ЛЦ находятся в этом окне (рис. 3А).

Цитометрический анализ показал, что клетки в этом окне экспрессируют различные маркеры лимфоцитов: натуральных киллеров CD16, CD56 (рис. 3В), Т-клеток CD3, CD45RA (рис. 3Г) и другие. Кроме маркеров ЛЦ данные клетки также экспрессируют маркер эндотелиальных клеток CD62P (рис. 3Б). Те же самые популяции выявляются и в крови здоровых доноров (рис. 3Д, Е, Ж, З). В крови доноров больше нефункциональных CD45-Т-клеток (рис. 3З) и меньше эндотелиальных (рис. 3Е), что показывает значительную ги-

бель не только лейкоцитов, но и сосудистых клеток при COVID-19.

Обсуждение

Одной из основных характеристик тяжести процесса при COVID-19, с нашей точки зрения, является циркуляция пула нефункциональных ЛЦ и эндотелиальных клеток в крови, а также, по-видимому, и нефункциональных нейтрофилов [1]. Анализ клинических данных показал, что только у 30% больных с тяжелой формой COVID-19 наблюдалось снижение абсолютного количества ЛЦ, причем преимущественно у мужчин (55%). У всех женщин количество ЛЦ находилось на нижней границе нормы, у одной больной абсолютное количество было значительно выше нормы (табл. 1, № 1), эта больная умерла.

Анализ экспрессии CD45 в окне ЛЦ показал, что у 64% мужчин и 78% женщин доля экспрессирующих CD45 ЛЦ составила от 2 до 12%. Соответственно все остальные клетки не являются функционально активными, не могут распознавать антиген и отвечать пролиферацией. Среди мужчин смертей не было, 2 из 9 женщин 40 и 69 лет умерли. Доля CD45⁺ ЛЦ у погибших женщин составила 3 и 11% соответственно. Несмотря на то, что все больные находились в реанимационном отделении и рассматривались как тяжелые, у 30% больных доля CD45⁺ ЛЦ была в норме или близко к норме (от 53 до 82% при норме 70-99%).

Субпопуляционный состав функциональных CD45⁺ ЛЦ больных COVID-19 в целом соответствовал норме: среди клеток присутствовали все основные популяции ЛЦ крови. Наблюдались минорные изменения в доли Т-клеток, в частности снижалась доля CD3 Т-клеток, увеличивалась доля наивных Т-клеток и натуральных киллеров; не было изменения доли В-клеток. При этом общее количество этих клеток снижалось в 10-50 раз у больных со сниженным количеством CD45⁺ ЛЦ.

Анализ фенотипа нефункциональных CD45⁺ ЛЦ показал, что ЛЦ теряют экспрессию CD45, но сохраняют некоторую сниженную экспрессию специфических маркеров. При этом эти клетки сохраняют жизнеспособность (не окрашиваются DAPI), хотя уровень апоптоза повышен в 2 раза. Аналогичные нефункциональные клетки определяются и в крови здоровых доноров. Различия между донорами и больными было в доле таких нефункциональных клетках. Среди доноров доля таких клеток колебалась в диапазоне 70-99%. Нельзя исключить, что у части доноров могла быть бессимптомная инфекция в легкой форме, поскольку кровь доноров собирали в период эпидемии.

Причина потери функциональной активности может быть связана с гемостазом сосудов. Ангиотензин-превращающий фермент (АСЕ) и его рецептор участвуют в регуляции артериального давления. Рецептор АСЕ экспрессируется на многих клетках, в том числе в большом количестве на клетках сосудистого эндотелия [17]. Попадание вируса с током воздуха в легкие приводит к связыванию вируса с клетками, экспрессирующими рецептор АСЕ, в том числе с клетками эндотелия.

В норме баланс сосудистого русла (гемостаз) поддерживается клетками эндотелия, белками плазмы крови, тромбоцитами и лейкоцитами, регулирующими про- и антикоагулянтные процессы, ведущие к накоплению тромбоцитов и фибрина в области очагового повреждения сосудов. Эндотелий синтезирует и экспрессирует молекулы, регулирующие гемостаз (фактор Вилле-

бранда, тканевой фактор, ингибитор активатора пламиногена 1-го типа и др.) [11]. Длительное воспаление во время тяжелой инфекции приводит к переходу гемостаза в протромботическое и антифибринолитическое состояние, что может привести к диссеминированному микрососудистому тромбозу, ишемии органов и синдрому полиорганной дисфункции, что часто наблюдается при тяжелых формах COVID-19 [15].

Связывание вируса с клетками эндотелия приводит к его активации и экспрессии молекул адгезии, к которым прикрепляются лейкоциты, позволяя им в конечном итоге проходить через сосудистую стенку в ткань – процесс, называемый диапедезом. На клетках эндотелия экспрессируются различные молекулы адгезии селектины (CD62E, CD62L и CD62P), интегрины (ICAM-1), молекула адгезии сосудистых клеток 1 (VCAM-1), обеспечивающие замедление тока клеток крови (тетеринг) и последующий диапедез лейкоцитов.

При активации эндотелия происходят два процесса: накопление прикрепленных лейкоцитов в местах экспрессии молекул адгезии и формирование микротромбов. При большом скоплении лейкоцитов и тромбоцитов (в первую очередь в капиллярах легких) часть клеток не может пройти в ткань, но уже находится в активированном состоянии, что неизбежно затем ведет к их постепенной элиминации в печени. Затемнение в легких по типу «матового стекла», отмеченное при COVID-19, наблюдается в таких зонах. Данный процесс происходит и в норме, удаляя нефункциональные клетки и замещая их наивными. При инфекции доля нефункциональных клеток резко возрастает, что сопровождается повышенным притоком наивных клеток, однако приток таких клеток ограничен заполненным кровеносным руслом живыми, но не функциональными ЛЦ. Можно предположить, что доля таких клеток пропорциональна вирусной нагрузке, наличию коморбидных заболеваний и состоянию печени, элиминирующей погибающие клетки.

Заключение

В данной работе показано, что клинический анализ крови не дает полную информацию по количеству функциональных Т-лимфоцитов, способных формировать противовирусный иммунитет. Дополнительный анализ доли CD45⁺ функционально иммунокомпетентных клеток позволяет выявить больных с тяжелой формой COVID-19, требующих особого внимания.

Список литературы / References

1. Borges L., Pithon-Curi T.C., Curi R., Hatanaka E. COVID-19 and neutrophils: the relationship between hyperinflammation and neutrophil extracellular traps. *Mediators Inflamm.*, 2020, Vol. 2020, 8829674. doi: 10.1155/2020/8829674.
2. Cao X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, pp. 269-270.
3. Chen H., Liu W., Wang Y., Liu D., Zhao L., Yu J. SARS-CoV-2 activates lung epithelial cell proinflammatory signaling and leads to immune dysregulation in COVID-19 patients. *EBioMedicine*, 2021, Vol. 70, 103500. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103500.
4. Chua R.L., Lukassen S., Trump S., Hennig B.P., Wendisch D., Pott F., Debnath O., Thürmann L., Kurth F., Völker M.T., Kazmierski J., Timmermann B., Twardziok S., Schneider S., Machleidt F., Müller-Redetzky H., Maier M., Krannich A., Schmidt S., Balzer F., Liebig J., Loske J., Suttorp N., Eils J., Ishaque N., Liebert U.G., von Kalle C., Hocke A., Witzentrath M., Goffinet C., Drosten C., Laudi S., Lehmann I., Conrad C., Sander L.E., Eils R. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat. Biotechnol.*, 2020, Vol. 38, no. 8, pp. 970-979.
5. Desai D.M., Sap J., Silvennoinen O., Schlessinger J., Weiss A. The catalytic activity of the CD45 membrane-proximal phosphatase domain is required for TCR signaling and regulation. *EMBO J.*, 1994, Vol. 13, no. 17, pp. 4002-4010.
6. Ghanem M., Homps-Legrand M., Garnier M., Morer L., Goletto T., Frijia-Masson J., Wicky P.H., Jaquet P., Bancal C., Hurtado-Nedelec M., de Chaisemartin L., Jaillet M., Mailleux A., Quesnel C., Poté N., Debray M.P., de Montmollin E., Neukirch C., Borie R., Taillé C., Crestani B.; French COVID Cohort Study Group. Blood fibrocytes are associated with severity and prognosis in COVID-19 pneumonia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2021, Vol. 321, no. 5, pp. L847-L858.
7. Grant R.A., Morales-Nebreda L., Markov N.S., Swaminathan S., Querrey M., Guzman E.R., Abbott D.A., Donnelly H.K., Donayre A., Goldberg I.A., Klug Z.M., Borkowski N., Lu Z., Kihshen H., Politanska Y., Sichizya L., Kang M., Shilatifard A., Qi C., Lomasney J.W., Argento A.C., Kruser J.M., Malsin E.S., Pickens C.O., Smith S.B., Walter J.M., Pawlowski A.E., Schneider D., Nannapaneni P., Abdala-Valencia H., Bharat A., Gottardi C.J., Budinger G.R.S., Misharin A.V., Singer B.D., Wunderink R.G.; NU SCRIPT Study Investigators. Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia. *Nature*, 2021, Vol. 590, no. 7847, pp. 635-641.
8. Hermiston M.L., Xu Z., Weiss A. CD45: A critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 21, pp. 107-137.
9. Hermiston M.L., Zikherman J., Zhu J.W. CD45, CD148, and Lyp/Pep: Critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells. *Immunol. Rev.*, 2009, Vol. 228, pp. 288-311.
10. Huang L., Shi Y., Gong B., Jiang L., Zhang Z., Liu X., Yang J., He Y., Jiang Z., Zhong L., Tang J., You C., Jiang Q., Long B., Zeng T., Luo M., Zeng F., Zeng F., Wang S., Yang X., Yang Z. Dynamic blood single-cell immune responses in patients with COVID-19. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2021, Vol. 6, no. 1, pp. 110. doi: 10.1038/s41392-021-00526-2.
11. Ince C., Mayeux P.R., Nguyen T., Gomez H., Kellum J.A., Ospina-Tascón G.A., Hernandez G., Murray P., de Backer D; ADQI XIV Workgroup. The endothelium in sepsis. *Shock*, 2016, Vol. 45, no. 3, pp. 259-270.
12. Jin M., Shi N., Wang M., Shi C., Lu S., Chang Q., Sha S., Lin Y., Chen Y., Zhou H., Liang K., Huang X., Shi Y., Huang G. CD45: a critical regulator in immune cells to predict severe and non-severe COVID-19 patients. *Aging (Albany NY)*, 2020, Vol. 12, no. 20, pp. 19867-19879.
13. Klebanoff C.A., Gattinoni L., Torabi-Parizi P., Kerstann K., Cardones A.R., Finkelstein S.E., Palmer D.C., Antony P.A., Hwang S.T., Rosenberg S.A., Waldmann T.A., Restifo N.P. Central memory self/tumor-reactive CD8⁺ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2005, Vol. 102, no. 27, pp. 9571-9576.
14. Kreutmair S., Unger S., Núñez N.G., Ingelfinger F., Alberti C., de Feo D., Krishnarajah S., Kauffmann M., Friebel E., Babaei S., Gaborit B., Lutz M., Jurado N.P., Malek N.P., Goepel S., Rosenberger P., Häberle H.A., Ayoub I., Al-Hajj S., Nilsson J., Claassen M., Liblau R., Martin-Blondel G., Bitzer M., Roquilly A., Becher B. Distinct immunological signatures discriminate severe COVID-19 from non-SARS-CoV-2-driven critical pneumonia. *Immunity*, 2021, Vol. 54, no. 7, pp. 1578-1593.e5.
15. Miesbach W., Makris M. COVID-19: coagulopathy, risk of thrombosis, and the rationale for anticoagulation. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2020, Vol. 26, 1076029620938149. doi: 10.1177/1076029620938149.
16. Palacios E.H., Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene*, 2004, Vol. 23, pp. 7990-8000.
17. Ryan U.S., Ryan J.W., Whitaker C., Chiu A. Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II). II. Immunocytochemistry and immunofluorescence. *Tissue Cell*, 1976, Vol. 8, no. 1, pp. 125-145.
18. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, pp. 745-763.
19. Vanderbeke L., van Mol P., van Herck Y., de Smet F., Humblet-Baron S., Martinod K., Antoranz A., Arijs I., Boeckx B., Bosisio F.M., Casaer M., Dauwe D., de Wever W., Dooms C., Dreesen E., Emmaneel A., Filtjens J., Gouw M., Gunst J., Hermans G., Jansen S., Lagrou K., Liston A., Lorent N., Meersseman P., Mercier T., Neyts J.,

Odent J., Panovska D., Penttila P.A., Pollet E., Proost P., Qian J., Quintelier K., Raes J., Rex S., Saeys Y., Sprooten J., Tejpar S., Testelmans D., Thevissen K., van Buyten T., Vandenhoute J., van Gassen S., Velásquez Pereira L.C., Vos R., Weynand B., Wilmer A., Yserbyt J., Garg A.D., Matthys P., Wouters C., Lambrechts D., Wauters E., Wauters J. Monocyte-driven atypical cytokine storm and aberrant neutrophil activation as key mediators of COVID-19 disease severity. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 4117. doi: 10.1038/s41467-021-24360-w.

20. Winheim E., Rinke L., Lutz K., Reischer A., Leutbecher A., Wolfram L., Rausch L., Kranich J., Wratil P.R., Huber J.E., Baumjohann D., Rothenfusser S., Schubert B., Hilgendorff A., Hellmuth J.C., Scherer C., Muenchhoff M., von Bergwelt-Baildon M., Stark K., Straub T., Brocker T., Keppler O.T., Subklewe M., Krug A.B. Impaired function and delayed regeneration of dendritic cells in COVID-19. *PLoS Pathog.*, 2021, Vol. 17, no. 10, e1009742. doi: 10.1371/journal.ppat.1009742.

21. Zhao X.N., You Y., Cui X.M., Gao H.X., Wang G.L., Zhang S.B., Yao L., Duan L.J., Zhu K.L., Wang Y.L., Li L., Lu J.H., Wang H.B., Fan J.F., Zheng H.W., Dai E.H., Tian L.Y., Ma M.J. Single-cell immune profiling reveals distinct immune response in asymptomatic COVID-19 patients. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2021, Vol. 6, no. 1, 342. doi: 10.1038/s41392-021-00753-7.

Авторы:

Свирицкая Е.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук; старший научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Коновалова М.В. — к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Svirshchetskaya E.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Konovalova M.V., PhD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Садиков В.Ф. — аспирант ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Пырегов А.В. — д.м.н., директор института анестезиологии-реаниматологии и трансфузиологии, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Полтавцева Р.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Sadykov V.F., Postgraduate Student, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Pyregov A.V., PhD, MD (Medicine), Director of the Institute of Anesthesiology-Resuscitation and Transfusiology, Head of the Department of Anesthesiology and Resuscitation, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Poltavtseva R.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Поступила 14.07.2022
Принята к печати 09.09.2022
Дата онлайн-публикации 18.11.2022

Received 14.07.2022
Accepted 09.09.2022
Date of publication online 18.11.2022