

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ INFECTIOUS DISEASES

ОСОБЕННОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ПОРАЖЕНИЕМ ЛЁГКИХ ДО 30 % ПРИ COVID-19

Бородулина Е.А.¹,
Васнева Ж.П.²,
Вдоушкина Е.С.¹,
Бородулин Б.Е.¹,
Поваляева Л.В.¹

¹ ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России (443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89, Россия)

² АО «Самарский диагностический центр» (443099, г. Самара, ул. Мяги, 7А, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Бородулина Елена Александровна,
e-mail: borodulinbe@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Успех противодействия организма человека инфекциям в значительной мере зависит от иммунной системы. Механизмы реагирования клеточного иммунитета на вирус SARS-CoV-2 ещё точно не определены и изучаются.

Цель работы. Исследование особенностей показателей клеточного звена иммунитета у пациентов с поражением лёгких до 30 % при COVID-19.

Материал и методы. Обследовано 73 человека в период пандемии 2020–2021 гг. Группу изучения составил 31 пациент с поражением лёгких до 30 % при COVID-19, группу сравнения – 42 человека, не инфицированных SARS-CoV-2. Общий клинический анализ крови проводили с использованием гематологического анализатора Medonic M20 (Boule Medical, Швеция), уровень субпопуляций лимфоцитов определяли с использованием цитометра FACS Calibur (BD, США) и меченных ФИТЦ и фикоэритрином моноклональных антител (Сорбент, Россия). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. У пациентов с COVID-19 при поражении лёгких по данным компьютерной томографии (КТ) ≤ 30 % до начала лечения отмечается перестройка в соотношении субпопуляций лимфоцитов в 67,7 % случаев. Лимфопения ($< 1,1 \times 10^9$ кл./л) выявлена у 34,4 % пациентов: снижение абсолютного содержания CD3⁺-лимфоцитов – на 30,8 %, CD3⁺CD4⁺ – на 35 %, CD3⁺CD8⁺ – на 6,7 % ($p < 0,05$), CD16⁺CD56⁺ натуральных киллеров (НК) – на 29,4 % ($p = 0,009$). Уровень CD95⁺-лимфоцитов при COVID-19 в 3,2 раза выше, чем у здоровых лиц. Повышенные уровни HLA-DR⁺ (> 20 %) и CD3⁺ HLA-DR⁺-лимфоцитов (> 6 %) регистрируются у 60 % и 86,7 % пациентов соответственно. Повышенный уровень CD19⁺ В-лимфоцитов (> 17 %) при COVID-19 бывает в 2,6 раза чаще, чем у здоровых лиц. Выявлены корреляционные зависимости содержания НК-клеток с широким спектром субпопуляций Т-лимфоцитов.

Заключение. Показатели клеточного иммунитета при COVID-19 имеют ряд характерных особенностей, которые могут служить предиктором прогрессирования тяжести заболевания.

Ключевые слова: COVID-19, новая коронавирусная инфекция, иммунный статус, клеточный иммунитет, лимфоциты, SARS-CoV-2

Статья поступила: 30.08.2022

Статья принята: 17.02.2023

Статья опубликована: 28.09.2023

Для цитирования: Бородулина Е.А., Васнева Ж.П., Вдоушкина Е.С., Бородулин Б.Е., Поваляева Л.В. Особенности показателей клеточного иммунитета периферической крови у пациентов с поражением лёгких до 30 % при COVID-19. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(4): 101-108. doi: 10.29413/ABS.2023-8.4.11

FEATURES OF PERIPHERAL BLOOD CELLULAR IMMUNITY PARAMETERS IN PATIENTS WITH LUNG DAMAGE UP TO 30 % IN COVID-19

Borodulina E.A.¹,
Vasneva Zh.P.²,
Vdoushkina E.S.¹,
Borodulin B.E.¹,
Povalyaeva L.V.¹

¹ Samara State Medical University
(Chapaevskaya str. 89, Samara 443099,
Russian Federation)

² Samara Diagnostic Center
(Myagi str. 7A, Samara 443093,
Russian Federation)

Corresponding author:
Elena A. Borodulina,
e-mail: borodulinbe@yandex.ru

ABSTRACT

Background. The stability of human organism for different kind of infection, including SARS-CoV-2 is significantly defined by the immune system. The mechanisms of the cellular immunity to the SARS-CoV-2 are not exactly defined and are under study.

The aim. To study the features of cell immunity parameters in patients with lung damage up to 30 % in COVID-19.

Material and methods. 73 people were examined during the 2020–2021 pandemic. The study group consisted of 31 patients with lung damage up to 30 % with COVID-19, the comparison group consisted of 42 people not infected with SARS-CoV-2. A complete clinical blood count was carried out using a Medonic M20 hematological analyzer (Boule Medical, Sweden), the level of lymphocyte subpopulations was determined using a FACS Calibur cytometer (BD, USA) and FITC- and phycoerythrin-labeled monoclonal antibodies (Sorbent, Russia). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results. Patients with COVID-19 with lung damage according to computed tomography (CT) $\leq 30\%$ before the treatment had a restructuring in the ratio of lymphocyte subpopulations in 67.7 % of cases. Lymphopenia ($< 1.1 \times 10^9$ cells/l) was detected in 34.4 % of patients: a decrease in the absolute count of CD3⁺ lymphocytes by 30.8 %, CD3⁺CD4⁺ – by 35 %, CD3⁺CD8⁺ – by 6.7 % ($p < 0.05$), CD16⁺CD56⁺ natural killer (NK) cells – by 29.4 % ($p = 0.009$). The level of CD95⁺ lymphocytes in COVID-19 is 3.2 times higher than in healthy individuals. Elevated levels of HLA-DR⁺ ($> 20\%$) and CD3⁺ HLA-DR⁺ lymphocytes ($> 6\%$) are recorded in 60 % and 86.7 % of patients, respectively. Elevated levels of CD19⁺ B lymphocytes ($> 17\%$) in COVID-19 are 2.6 times more common than in healthy individuals. Correlation dependences of the count of NK cells with a wide range of T lymphocyte subpopulations were revealed.

Conclusion. Cellular immunity indicators in COVID-19 have a number of features that can serve as predictors of the progression of the severity of the disease.

Key words: COVID-19, new coronavirus infection, immune state, cellular immunity, lymphocytes, SARS-CoV-2

Received: 30.08.2022

Accepted: 17.02.2023

Published: 28.09.2023

For citation: Borodulina E.A., Vasneva Zh.P., Vdoushkina E.S., Borodulin B.E., Povalyaeva L.V. Features of peripheral blood cellular immunity parameters in patients with lung damage up to 30 % in COVID-19. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(4): 101-108. doi: 10.29413/ABS.2023-8.4.11

ОБОСНОВАНИЕ

С начала пандемии COVID-19 было отмечено, что инфекция проявляется у людей по-разному: от простого инфицирования без клинических проявлений до тяжелого состояния с поражением различных органов. Прогрессирующее поражение лёгких чаще всего являлось причиной смерти пациентов. Наиболее подвержены тяжелому течению лица старше 65 лет и имеющие хронические заболевания [1]. Лимфоциты и их субпопуляционная структура играют важную роль в противовирусной иммунной защите [2]. Вирусные инфекции приводят к изменению численности и активности основных субпопуляций лимфоцитов (Т- и В-лимфоцитов) и натуральных киллеров (НК), вовлечённых в гуморальный и цитотоксический противовирусный иммунный ответ [3, 4]. Исследования, проведённые в течение 2020 г., показали, что SARS-CoV-2 обладает уникальным патологическим воздействием на иммунную систему по сравнению с другими коронавирусами [5, 6]. Типичными характеристиками SARS-CoV-2-инфекции являются резкое снижение уровня лимфоцитов, изменение соотношений субпопуляций Т-лимфоцитов, в том числе CD4⁺- и CD8⁺ Т-лимфоцитов [7]. Выраженность изменений Т-клеточного звена иммунитета определяет тяжесть заболевания [2]. Важно отметить, что успех противодействия организма человека SARS-CoV-2-инфекции, как и успех вакцинации, в значительной мере зависит от исходного состояния иммунной системы [8]. Изучение развития ответной реакции иммунной системы макроорганизма на инфицирование вирусом SARS-CoV-2 является важным фактором как для понимания патогенеза заболевания, так и для разработки терапевтических стратегий и предупреждения развития тяжёлых состояний, обусловленных COVID-19.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявить особенности показателей клеточного звена иммунитета у пациентов с поражением лёгких до 30 % при COVID-19.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования. Проанализированы результаты обследования 73 пациентов в период пандемии 2020–2021 гг., из них 31 человек на 5–7-й день с момента первых признаков инфицирования вирусом SARS-CoV-2 с поражением лёгких до 30 % (группа изучения) и 42 человека, не инфицированных SARS-CoV-2 (группа сравнения). Участникам исследования проводилось обследование, включающее оценку анамнеза, жалоб, анализа крови, компьютерную томографию (КТ) органов грудной клетки, тестирование методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на SARS-CoV-2-инфекцию. Данные обследования заносились в стандартизованную анкету.

Критерии соответствия. Пациенты группы изучения на момент поступления в стационар имели положи-

тельные результаты ПЦР-теста на SARS-CoV-2, изменения лёгких на КТ ≤ 30 %, сатурацию крови кислородом > 95 %, не принимали в процессе лечения антибактериальные и гормональные препараты. Группа сравнения имела соответствующую половозрастную структуру, включала практически здоровых лиц с отрицательными уровнями антител к вирусу SARS-CoV-2 на момент обследования.

Условия проведения. Всем пациентам проводили общеклиническое исследование крови с использованием гематологического анализатора Medonic M20 (Boule Medical, Швеция), в том числе определение абсолютного количества лейкоцитов, тромбоцитов, лимфоцитов, микроскопическое определение лейкоцитарной формулы. Определяли процентное и абсолютное содержание субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4⁺ Т-хелперов, цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, CD16⁺ Т-лимфоцитов-киллеров, HLA-DR⁺ Т-лимфоцитов активированных), субпопуляций НК-лимфоцитов (CD16⁺CD56⁺, CD3⁻CD8⁺), В-лимфоцитов (CD19⁺), уровень экспрессии маркеров HLA-DR⁺ и CD95⁺ в общей популяции лимфоцитов крови (ПК) методом проточной цитофлуориметрии с использованием цитометра FACS Calibur (BD, США) и меченных ФИТЦ и фикоэритрином моноклональных антител (Сорбент, Россия).

Индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ) по Н.И. Ябучинскому определяли по отношению количества гранулоцитов (нейтрофилов, эозинофилов и базофилов) к агранулоцитам (лимфоцитам и моноцитам). Лейко-Т-клеточный индекс (ЛТИ) по А.М. Земскову определяли по отношению абсолютного количества лейкоцитов к таковому CD3⁺ Т-лимфоцитов. Иммунорегуляторный индекс (ИРИ) определяли по отношению процентного содержания CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов к процентному содержанию CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов.

Диагноз COVID-19 верифицировался с помощью ПЦР-теста на SARS-CoV-2, проводили определение уровня IgG-антител (Ат) к рекомбинантному структурному белку S1-шипа вируса SARS-CoV-2 в сыворотке ПК с использованием полуколичественной иммуноферментной тест-системы (ИФТС) (Euroimmun AG, Германия), уровни IgM-Ат и IgG-Ат к рекомбинантному белку SARS-CoV-2 – с использованием качественных ИФТС (Вектор-Бест, Россия).

Все изученные возрастные, анамнестические и лабораторные данные оформлены в виде стандартизированной базы данных (свидетельство о государственной регистрации № 2022620741 от 5.04.2022) [9].

Этическая экспертиза. Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека в качестве испытуемого». Письменное информированное согласие было получено от каждого участника исследования перед выполнением процедур. Протокол исследования был одобрен комитетом по биоэтике ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 211 от 07.10.2020).

Статистическая обработка проводилась с использованием программы SPSS 22.0 (SPSS Inc., США). Использовали медиану (Me), 25-й (Q1-квартиль) и 75-й (Q3-квартиль) процентиля, ранговый критерий Манна – Уитни, критерий χ^2 Пирсона, коэффициент корреляции Спирмена (R). Уровень статистической значимости (p) принимали < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди обследованных 66 % лиц женского пола. Средний возраст – $50,8 \pm 15,4$ года. Сравнительный анализ численности белых клеток и тромбоцитов ПК показал, что у большинства пациентов медианы показателей не выходили за пределы референс-значений (табл. 1).

В группе пациентов с COVID-19 показатели процентного и абсолютного уровней лимфоцитов были соответственно на 23 % ($p = 0,003$) и 26,3 % ($p = 0,003$) ниже, чем в группе сравнения (табл. 1). Выраженная лимфопения ($< 1,1 \times 10^9$ кл./л) была выявлена у 34,4 % пациентов и не наблюдалась у здоровых лиц. Кроме того, при более высоком показателе уровня нейтрофилов (на 17,3 %; $p = 0,004$) отмечается и повышенный в 1,5 раза ИСЛ относительно группы сравнения ($p = 0,001$). У 21 (67,7 %) пациента отмечены выраженные перестройки в популяционной структуре белых клеток ПК, среди которых в 12 (57 %) случаях отмечается повышение значений ИСЛ за счёт лимфопении на фоне нейтрофилии (против 4 (10,7 %) здоровых лиц).

При микроскопическом исследовании мазков крови у пациентов с COVID-19 процент атипичных нейтрофилов варьировал от 1 до 16 % (в среднем 8 %), атипичных лимфоцитов – от 2 до 15 % (в среднем 4,1 %). В группе сравнения атипичных форм не наблюдалось.

При оценке клеточного звена иммунитета было получено, что в большинстве случаев содержание исследуемых субпопуляций Т- и В-лимфоцитов не выходит за пределы референсных значений (табл. 2).

На фоне снижения абсолютного содержания CD3⁺-лимфоцитов на 30,8 % ($p = 0,001$) у пациентов с COVID-19 относительно группы сравнения отмечается повышение ЛТИ на 20 % ($p = 0,002$), что может свидетельствовать о наличии дефицита Т-лимфоцитов (табл. 2).

Относительно показателей группы сравнения у пациентов с COVID-19 выявлены статистически значимо более низкие значения абсолютного содержания исследуемых субпопуляций Т- и НК-лимфоцитов (табл. 2). Несмотря на то, что показатели процентного содержания CD3⁺CD4⁺- и CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов у пациентов с COVID-19 и у здоровых лиц статистически значимо не различались, анализ индивидуальных иммуограмм свидетельствует о значительной вариабельности данных лимфоцитарных параметров. Так, в группе пациентов с COVID-19 в 1,5 раза чаще отмечались случаи пониженного содержания (< 35 %) CD4⁺ Т-лимфоцитов: 35,5 % ($n = 11$) против 26,2 % ($n = 11$) в группе сравнения (табл. 2).

При изучении особенностей распределения показателей процентного содержания CD19⁺ В-лимфоцитов было выявлено, что повышенные уровни (> 17 %) у пациентов с COVID-19 встречаются в 2,6 раза чаще относительно таковых группы сравнения.

При изучении системы НК-клеток было получено, что показатель абсолютного количества CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов на 29,4 % ($p = 0,009$) ниже такового группы сравнения (табл. 2). Показатели абсолютного содержания CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов у пациентов с COVID-19 в 50 % случаев ниже референсного значения – $0,13 \times 10^9$ кл./л (против 21,4 % группы сравнения).

В среднем в группе пациентов с COVID-19 относительно группы сравнения не выявлено статистически значимых изменений процентного содержания как CD3⁺CD16⁺-, так и CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов (табл. 2). Сравнительный анализ особенностей распределения

ТАБЛИЦА 1
ПОКАЗАТЕЛИ ОБЩЕКЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ (ГРУППА ИЗУЧЕНИЯ) И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ (ГРУППА СРАВНЕНИЯ)

TABLE 1
INDICATORS OF GENERAL CLINICAL BLOOD TEST IN PATIENTS WITH NEW CORONAVIRUS INFECTION (STUDY GROUP) AND HEALTHY DONORS (COMPARISON GROUP)

Показатели [референсные значения]	Группа сравнения ($n = 42$)		Группа изучения ($n = 31$)		p
	Me	Q1–Q3	Me	Q1–Q3	
Лейкоциты, $\times 10^9$ кл./л [4–9]	6	[5–7]	6	[5–7,8]	0,5
Лимфоциты, % [20–50]	35,1	[28,1–43,6]	27	[12,5–34]	0,003*
Лимфоциты, $\times 10^9$ кл./л [1,13–2]	1,9	[1,6–2,4]	1,4	[0,9–1,9]	0,001*
Тромбоциты, $\times 10^9$ кл./л [180–320]	222	[165–248,2]	204	[173–298]	0,6
Нейтрофилы, % [48,5–84]	56	[49,2–65,2]	65,7	[58,3–81,4]	0,004
Моноциты, % [3–11]	7,7	[6,6–8,75]	7,2	[4,4–9]	0,3
ИСЛ, ед. [1,46–2,36]	1,26	[0,95–1,9]	1,9	[1,4–4]	0,001*

Примечание. p – уровень статистической значимости по критерию Манна – Уитни ($p < 0,05$).

ТАБЛИЦА 2
ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПАЦИЕНТОВ
С COVID-19 (ГРУППА ИЗУЧЕНИЯ) И ЗДОРОВЫХ
ДОНОРОВ (ГРУППА СРАВНЕНИЯ)

TABLE 2
CELLULAR IMMUNITY INDICATORS IN PATIENTS
WITH COVID-19 (STUDY GROUP) AND HEALTHY DONORS
(COMPARISON GROUP)

Показатели [референсные значения]	Группа сравнения (n = 42)		Группа изучения (n = 31)		P
	Me	Q1–Q3	Me	Q1–Q3	
CD3, % [6–85]	71	[64,5–75]	70	[60,5–76]	0,5
CD3, × 10 ⁹ кл./л [0,94–2,1]	1,3	[1,6–7]	0,9	[0,5–1,4]	0,001*
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , % [35–55]	40,9	[32,5–46,3]	39	[30,3–45,3]	0,4
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , × 10 ⁹ кл./л [0,58–1,3]	0,77	[0,56–0,9]	0,5	[0,3–0,9]	0,009*
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , % [19–35]	23,15	[17–34,1]	23,4	[17,3–31,2]	0,7
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , × 10 ⁹ кл./л [0,37–1]	0,375	[0,3–0,7]	0,35	[0,17–0,48]	0,02*
CD3 ⁻ CD8 ⁺ , %	4,2	[3–6,8]	5,75	[2,8–11,1]	0,14
CD3 ⁻ CD8 ⁺ , × 10 ⁹ кл./л	0,09	[0,06–0,14]	0,07	[0,03–0,1]	0,13
CD16 ⁺ CD56 ⁺ , % [10–23]	10,25	[7,4–14,25]	9,4	[5,1–14,4]	0,4
CD16 ⁺ CD56 ⁺ , × 10 ⁹ кл./л [0,13–0,5]	0,17	[0,14–0,24]	0,12	[0,06–0,19]	0,009*
CD3 ⁺ CD16 ⁺ , % [5–8]	3,2	[2–5]	3	[1,6–9,6]	0,8
CD19 ⁺ , % [7–17]	8	[6–11,3]	9	[6,2–13,6]	0,26
CD19 ⁺ , × 10 ⁹ кл./л [0,1–0,38]	0,15	[0,1–0,23]	0,13	[0,07–0,2]	0,12
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , % [1–6]	7	[5–11,3]	10	[7,4–14,8]	0,025*
HLA-DR ⁺ , % [7–20]	18,8	[15,35–22,3]	21,55	[17–27,2]	0,1
CD95 ⁺ , % [5–43]	9,3	[4,3–33,45]	29,6	[13–39,75]	0,05*
ЛТИ [4–7]	4,5	[3,3–5]	5,4	[4,2–14,1]	0,002*
ИРИ [1,5–2,6]	1,7	[1–2,6]	1,9	[0,9–2,5]	0,81

Примечание. p – уровень статистической значимости по критерию Манна – Уитни (p < 0,05).

этих субпопуляций лимфоцитов показал, что у пациентов с COVID-19 повышенные уровни CD3⁺CD16⁺- и CD3⁻CD8⁺-лимфоцитов (> 8 %) отмечаются в 2 раза чаще: соответственно 21,4 % (n = 3) против 9,4 % (n = 3) и 22,2 % (n = 6) против 9,1 % (n = 3) среди здоровых лиц.

Статистически значимых изменений содержания HLA-DR⁺-лимфоцитов в среднем по группе пациентов с COVID-19 относительно показателя группы сравнения не выявлено (p = 0,1). В анализе индивидуальных иммунограмм отмечено, что у пациентов с COVID-19 повышенное (> 20 %) содержание HLA-DR⁺-лимфоцитов отмечалось у 18 (60 %) пациентов (против 14 (33,3 %) пациентов группы сравнения; $\chi^2 = 5$; p = 0,03). Уровень CD3⁺HLA-DR⁺-лимфоцитов у пациентов с COVID-19 статистически значимо превышает таковой в группе сравнения (табл. 2). Повышенное (> 6 %) содержание CD3⁺HLA-DR⁺-лимфоцитов наблюдается у 36 (86,7 %) пациентов с COVID-19 (против 18 (58,3 %) лиц группы сравнения).

Отмечено трёхкратное повышение показателя уровня CD95⁺-лимфоцитов в среднем по группе пациентов с COVID-19 относительно группы сравнения (табл. 2).

Результаты корреляционного анализа показали, что процентный уровень CD3⁺CD16⁺-лимфоцитов демонстрирует зависимость с широким спектром других параметров клеточного иммунитета: обратную – с ИРИ (R = -0,62; p = 0,02), абсолютным содержанием CD3⁺-лимфоцитов (R = -0,6; p = 0,02), абсолютным содержанием CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов (R = -0,7; p = 0,005); прямую – с ЛТИ (R = 0,6; p = 0,02) и CD3⁺HLA-DR⁺-лимфоцитами (R = 0,63; p = 0,016). Наличие множественных отрицательных корреляционных взаимозависимостей содержания НК-клеток с субпопуляциями Т-лимфоцитов может свидетельствовать о повышенной цитотоксичности на фоне дефицита CD3⁺- и CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов.

При исследовании корреляционных связей обнаружено, что процентный уровень CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов демонстрирует обратную зависимость с процентным содержанием CD3⁺- и CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов (R = -0,7 и R = -0,34 соответственно; p < 0,05), прямую – с процентным и абсолютным уровнем CD3⁻CD8⁺-лимфоцитов (R = 0,8 и R = 0,5 соответственно; p < 0,05). Широкий спектр корреляционных связей между уровнями CD16⁺CD56⁺ НК-клеток и CD16⁺ Т-лимфоцитов с другими

субпопуляциями Т-лимфоцитов может свидетельствовать о сопряженности реагирования различных субпопуляций лимфоцитов в ответ на инфицирование вирусом SARS-CoV-2.

Уровень HLA-DR⁺-лимфоцитов у пациентов с COVID-19 показал обратную корреляционную зависимость с абсолютным содержанием CD3⁻CD8⁺-лимфоцитов ($R = -0,49; p = 0,007$) и прямую – с процентным уровнем CD3⁺CD16⁺-лимфоцитов ($R = 0,63; p = 0,016$). Выявлена обратная корреляционная зависимость показателя процентного уровня HLA-DR⁺-лимфоцитов с процентным уровнем CD3⁺-лимфоцитов ($R = -0,37; p = 0,05$).

Показатель уровня CD95⁺-лимфоцитов демонстрирует обратные корреляционные зависимости с процентным уровнем CD3⁻CD8⁺-лимфоцитов ($R = -0,48; p = 0,02$) и прямые – с CD3⁺CD4⁺-лимфоцитами ($R = 0,43; p = 0,037$).

ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам общего анализа крови у пациентов с COVID-19 средний по группе уровень лейкоцитов не выходит за пределы референсных значений [10], при этом у 67,7 % пациентов отмечаются выраженные перестройки процентного соотношения гранулоцитов и агранулоцитов в ПК, среди которых в 57 % случаев наблюдается лимфопения на фоне нейтрофилии. Подтверждением произошедших перестроек у пациентов с COVID-19 является как повышение среднегруппового значения ИСЛ в 1,5 раза, так и наличие противоположных корреляционных зависимостей уровня лимфоцитов ($R = -0,47; p = 0,07$) и нейтрофилов ($R = 0,45; p = 0,012$) при 30%-м поражении лёгких по КТ.

При микроскопическом исследовании мазков крови при COVID-19 численность атипичных нейтрофилов и лимфоцитов достигала 8 % и 4,1 % соответственно. На раннем этапе развития заболевания атипичные морфологические изменения нейтрофилов и лимфоцитов отметили также некоторые зарубежные исследователи [11].

Выраженная лимфопения ($< 1,1 \times 10^9$ кл./л) выявлена в 34,4 % случаев при COVID-19. Данную общую лимфопению может определять регистрируемое нами статистически значимое снижение показателей абсолютного содержания исследованных субпопуляций Т- и НК-клеток у пациентов с COVID-19, в том числе абсолютного содержания CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов (на 35 %; $p = 0,009$) и CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов (на 6,7 %; $p = 0,02$). Многие авторы характерным признаком COVID-19 считают снижение абсолютного содержания именно CD4⁺ Т-клеток и изменение их внутренней субпопуляционной структуры [5, 7, 12]. Однако при этом статистически значимых изменений показателей процентного содержания CD4⁺- и CD8⁺ Т-лимфоцитов и ИРИ не получено. Многие авторы считают определяющим участие Т-лимфоцитов в патогенезе заболевания [5].

В нашем исследовании статистически значимых изменений показателей уровня CD19⁺-лимфоцитов у пациентов с COVID-19 относительно группы сравнения не выявлено. Возможно, причиной этого может быть значи-

тельная вариабельность показателей как процентного, так и абсолютного содержания В-лимфоцитов у пациентов с COVID-19. В частности, у 35,5 % пациентов регистрируется пониженный (< 7 %) уровень В-лимфоцитов и у 13 % – повышенный (> 17 %). В работе F. Wang и соавт. (2020) выявлено повышение процента содержания CD19⁺ В-лимфоцитов у пациентов с COVID-19 [13].

Многие авторы в качестве характерного признака определяют изменения клеточного иммунитета [1, 14]. Типичной характеристикой инфекции COVID-19 является резкое снижение уровня лимфоцитов и, в частности, абсолютного количества CD3⁺, CD3⁺CD4⁺- и CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов [12, 15]. Одной из причин прогрессирующей лимфопении считают миграцию лимфоцитов из ПК в лёгкие [5, 16, 17]. Другой причиной лимфопении ряд авторов считают прямое цитотоксическое действие вируса SARS-CoV-2 на иммунные клетки. Вирусные частицы и геном SARS-CoV-2 не только обнаружили в моноцитах и лимфоцитах, но и доказали их способность внутриклеточно реплицироваться в системе *in vitro* [1, 18, 19]. Отмечена инфицированность Т-лимфоцитов и макрофагов/моноцитов, находящихся в лимфоузлах, лёгких и селезёнке, в образцах, полученных при аутопсии [1, 20, 21].

Есть работы, где авторы отмечают повышение содержания цитотоксических клеток и их функциональной активности у пациентов с COVID-19 [13, 14, 22]. В работах других авторов отмечено снижение содержания НК-клеток, коррелирующее с тяжестью заболевания при COVID-19 [4, 7]. В нашем исследовании выявлено снижение абсолютного содержания CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов на 29,4 % ($p = 0,09$) у пациентов с COVID-19 относительно группы сравнения. Что касается особенностей распределения показателей уровня CD3⁺CD16⁺- и CD3⁻CD8⁺-лимфоцитов, не выявлено статистически значимых изменений их процентного содержания в среднем по группе пациентов с COVID-19 относительно группы сравнения. Однако можно отметить высокую вариабельность показателей уровня данных субпопуляций, что может нивелировать среднегрупповые значения. Кроме того, наличие множественных отрицательных корреляционных взаимозависимостей содержания данных популяций НК-клеток с таковыми субпопуляций Т-лимфоцитов может свидетельствовать о повышении цитотоксической активности данных клеток на фоне дефицита CD3⁺- и CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов. Подтверждением этому может служить высокий коэффициент корреляции процентного уровня CD3⁺CD16⁺-лимфоцитов с ЛТИ ($R = 0,6; p = 0,02$).

Нарастание уровня экспрессии активационных маркеров при COVID-19, в том числе HLA-DR, отражено в ряде работ [12, 13, 23, 24]. Исследования показывают повышенную экспрессию целого ряда маркеров активации на Т-лимфоцитах, запускающих «цитокиновый шторм» у пациентов с COVID-19 [6, 18]. В качестве признака чрезмерной активации клеточного иммунитета показано резкое повышение уровня клеток, экспрессирующих HLA-DR, на фоне статистически значимого снижения уровней CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов и НК-клеток [17]. При отсутствии статистически значимых отличий процентного содержания HLA-DR⁺-лимфоцитов у пациентов

с COVID-19 относительно группы сравнения в анализе индивидуальных иммунограмм в 1,8 раза чаще имеется повышенное содержание HLA-DR⁺-лимфоцитов (> 20 %) ($\chi^2 = 5$; $p = 0,03$). Кроме того, у пациентов с COVID-19 отмечается статистически значимое повышение содержания CD3⁺HLA-DR⁺-лимфоцитов на 42,8 % ($p = 0,025$). Изменения показателей клеточного и гуморального звеньев иммунитета у реконвалесцентов COVID-19 через 1,5–2,0 месяца после перенесённой инфекции выявлены и в работах других авторов [25, 26].

Согласно нашему исследованию, в ответ на инфицирование организма SARS-CoV-2 происходит изменение количественных и функциональных показателей клеточного иммунитета, степень выраженности которых и направление динамики в значительной мере зависят от исходного состояния иммунной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у 67,7 % обследованных нами пациентов с COVID-19 с поражением лёгких по КТ ≤ 30 % до начала лечения отмечается перестройка в соотношении субпопуляций лимфоцитов, среди которых в 57 % случаев наблюдается лимфопения на фоне нейтрофилии, что выражается в повышении значений ИСЛ.

Выраженная лимфопения ($< 1,1 \times 10^9$ кл./л) наблюдается у 34,4 % пациентов с COVID-19; она обусловлена снижением абсолютного содержания основных субпопуляций как Т-лимфоцитов (CD3⁺ – на 30,8 %, CD3⁺CD4⁺ – на 35 %, CD3⁺CD8⁺ – на 6,7 %; $p < 0,05$), так и НК-клеток (CD16⁺CD56⁺ – на 29,4 %; $p = 0,009$), что сопровождается повышением ЛТИ на 20 % ($p = 0,002$).

Выявленные у пациентов с COVID-19 такие особенности, как повышенная в 3,2 раза фракция CD95⁺-лимфоцитов (30 %), высокое (> 20 %) содержание HLA-DR⁺-лимфоцитов, регистрируемое у 60 % пациентов, и повышенное (> 6 %) содержание CD3⁺HLA-DR⁺-лимфоцитов, наблюдаемое у 86,7 % пациентов, могут являться характерными для клеточного звена иммунной системы при инфицировании SARS-CoV-2. Степень выраженности и динамика изменения количественных и функциональных показателей клеточного иммунитета при инфицировании SARS-CoV-2 определяются исходным типом реагирования иммунной системы.

Использование иммунологического обследования для определения уровней CD3⁺CD4⁺-, CD3⁺CD8⁺-, CD16⁺CD56⁺-, CD3⁺CD16⁺-, CD3⁺HLA-DR⁺-, CD19⁺-, CD95⁺-лимфоцитов позволяет оценить особенности иммунного реагирования на инфицирование SARS-CoV-2 и может быть рекомендовано в качестве дополнительного к общему клиническому анализу крови.

Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan. *China Intensive Care Med.* 2020; 46(6): 1294-1297. doi: 10.1007/s00134-020-05991-x
2. Baazim H, Schweiger M, Moschinger M, Xu H, Scherer T, Popa A, et al. CD8⁺ T cells induce cachexia during chronic viral infection. *Nat Immunol.* 2019; 20(6): 701-710. doi: 10.1038/s41590-019-0397-y
3. Zhao S, Lin Q, Ran J, Musa SS, Yang G, Wang W, et al. Preliminary estimation of the basic reproduction number of novel coronavirus (2019-nCoV) in China, from 2019 to 2020: A data-driven analysis in the early phase of the outbreak. *Int J Infect Dis.* 2020; 92: 214-217. doi: 10.1016/j.ijid.2020.01.050
4. Golovkin A, Kalinina O, Bezrukikh V, Aquino A, Zaikova E, Karonova T, et al. Imbalanced immune response of T-cell and B-cell subsets in patients with moderate and severe COVID-19. *Viruses.* 2021; 13: 1966. doi: 10.3390/v13101966
5. Zheng HY, Zhang M, Yang CX, Zhang N, Wang XC, Yang XP, et al. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020; 17(5): 541-543. doi: 10.1038/s41423-020-0401-3
6. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol.* 2020; 92(4): 424-432. doi: 10.1002/jmv.25685
7. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020; 71(15): 762-768. doi: 10.1093/cid/ciaa248
8. Li YX, Wu W, Yang T, Zhou W, Fu YM, Feng QM, et al. Characteristics of peripheral blood leukocyte differential counts in patients with COVID-19. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2020; 59(5): 372-374. doi: 10.3760/cma.j.cn112138-20200221-00114
9. Бородулина Е.А., Васнева Ж.П., Суханова А.Е. Мониторинг иммунологических показателей крови при тяжелом течении новой коронавирусной инфекции: Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022620741 от 5.04.2022. [Borodulina EA, Vasneva ZhP, Sukhanova AE. Monitoring of immunological blood parameters in severe cases of a new coronavirus infection: Certificate of state registration of the database No. 2022620741. 04.05.2022. (In Russ.)].
10. Бородулина Е.А., Васнева Ж.П., Вдощкина Е.С., Бородулин Б.Е., Поваляева Л.В. Гематологические и гемостазиологические показатели при коронавирусной инфекции COVID-19 и внебольничной пневмонии. *Acta biomedica scientifica.* 2021; 6(1): 40-47. [Borodulina EA, Vasneva ZhP, Vdoushkina ES, Borodulin BE, Povalyaeva LE. Features of hematological and hemostasiological parameters in coronavirus infection COVID-19 and community-acquired pneumonia. *Acta biomedica scientifica.* 2021; 6(1): 40-47. (In Russ.)]. doi: 10.29413/ABS.2021-6.1.6
11. Mitra A, Dwyre DM, Schivo M, Thompson GR, Cohen SH, Ku N, et al. Leukoerythroblastic reaction in a patient with COVID-19 infection. *Am J Hematol.* 2020; 95(8): 999-1000. doi: 10.1002/ajh.25793
12. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: A descriptive study. *Lancet.* 2020; 395(10223): 507-513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7

13. Wang F, Hou H, Luo Y, Tang G, Wu Sh, Huang M, et al. The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness. *JCI Insight*. 2020; 5(10): e137799. doi: 10.1172/jci.insight.137799
14. Fan BE, Chong VCL, Chan SSW, Lim GH, Lim KGE, Tan GB, et al. Hematologic parameters in patients with COVID-19 infection. *Am J Hematol*. 2020; 95(6): 131-134. doi: 10.1002/ajh.25774
15. Сизьякина Л.П., Закурская В.Я., Скрипкина Н.А., Антонова Е.А. Уровень ферритина как предиктор тяжелого течения COVID-19. *Иммунология*. 2021; 42(5): 518-525. [Sizyakina LP, Zakurskaya VYa, Skripkina NA, Antonova EA. Ferritin level as a predictor of COVID-19 severe course. *Immunologiya*. 2021; 42(5): 518-525. (In Russ.)]. doi: 10.33029/0206-4952-2021-42-4-518-525
16. Gong F, Dai Y, Zheng T, Cheng L, Zhao D, Wang H, et al. Peripheral CD4⁺ T cell subsets and antibody response in COVID-19 convalescent individuals. *J Clin Invest*. 2020; 130(12): 6588-6599. doi: 10.1172/JCI1141054
17. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: Causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol*. 2017; 39: 529-539. doi: 10.1007/s00281-017-0629-x
18. Marzi A, Gramberg T, Simmons G. DC-SIGN and DCSIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*. 2004; 78: 12090-12095. doi: 10.1128/JVI.78.21.12090-12095.2004
19. Li X, Geng M, Peng Y. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J Pharm Anal*. 2020; 10(2): 102-108. doi: 10.1016/j.jpha.2020.03.001
20. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 2020; 8(4): 420-422. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X
21. Jiang Y, Xu J, Zhou C, Wu Z, Zhong S, Liu J, et al. Characterization of cytokine/chemokine profiles of severe acute respiratory syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171: 850-857. doi: 10.1164/rccm.200407-857OC
22. Cossarizza A, Biasi S, Guaraldi G, Girardis M, Mussini C, Modena COVID-19 Working Group (MoCo19). SARS-CoV-2, the virus that causes COVID-19: Cytometry and the new challenge for global health. *Cytometry A*. 2020; 97(4): 340-343. doi: 10.1002/cyto.a.24002
23. Tang NLS, Chan PKS, Wong CK, To KF, Wu AKL, Sung YM, et al. Early enhanced expression of interferon-inducible protein-10 (CXCL-10) and other chemokines predicts adverse outcome in severe acute respiratory syndrome. *Clin Chem*. 2005; 51: 2333-2340. doi: 10.1373/clinchem.2005.054460
24. Amancha PK, Hong JJ, Ansari AA, Villinger F. Up-regulation of Tim-3 on T cells during acute simian immunodeficiency virus infection and on antigen specific responders. *AIDS*. 2015; 29(5): 531-536. doi: 10.1097/QAD.0000000000000589
25. Thevarajan I, Nguyen THO, Koutsakos M, Druce J, Caly L, van de Sandt CE, et al. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: A case report of non-severe COVID-19. *Nat Med*. 2020; 26(4): 453-455. doi: 10.1038/s41591-020-0819-2
26. Закурская В.Я., Сизьякина Л.П., Харитоновна М.В., Шлык С.В. Динамика специфического гуморального ответа у пациентов, перенесших COVID-19. *Иммунология*. 2022; 43(1): 71-77. [Zakurskaya VYa, Sizyakina LP, Kharitonova MV, Shlyk SV. Dynamics of specific humoral response in COVID-19 patients. *Immunologiya*. 2022; 43(1): 71-77. (In Russ.)]. doi: 10.33029/0206-4952-2022-43-1-71-77

Сведения об авторах

Бородулина Елена Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой фтизиатрии и пульмонологии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: borodulinbe@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3063-1538>

Васнева Жанна Петровна – кандидат биологических наук, врач-лаборант, АО «Самарский диагностический центр», e-mail: vasneva@list.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7024-7031>

Вдоушкина Елизавета Сергеевна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фтизиатрии и пульмонологии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: vdoushkina@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0039-6829>

Бородулин Борис Евгеньевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры фтизиатрии и пульмонологии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: borodulinbe@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8847-9831>

Поваляева Людмила Викторовна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фтизиатрии и пульмонологии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: povalyaeva8@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2546-1837>

Information about the authors

Elena A. Borodulina – Dr. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department of Phthiology and Pulmonology, Samara State Medical University, e-mail: borodulinbe@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3063-1538>

Zhanna P. Vasneva – Cand. Sc. (Biol.), Laboratory Assistant, Samara Diagnostic Center, e-mail: vasneva@list.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7024-7031>

Elizaveta S. Vdoushkina – Cand. Sc. (Med.), Associate Professor at the Department of Phthiology and Pulmonology, Samara State Medical University, e-mail: vdoushkina@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0039-6829>

Boris E. Borodulin – Dr. Sc. (Med.), Professor at the Department of Phthiology and Pulmonology, Samara State Medical University, e-mail: borodulinbe@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8847-9831>

Ljudmila V. Povalyaeva – Cand. Sc. (Med.), Associate Professor at the Department of Phthiology and Pulmonology, Samara State Medical University, e-mail: povalyaeva8@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2546-1837>

Вклад авторов

Бородулина Е.А. – разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, обсуждение результатов, написание текста рукописи.

Васнева Ж.П. – статистическая обработка, обсуждение результатов, написание текста рукописи.

Вдоушкина Е.С. – получение данных для исследования, обсуждение результатов, написание текста рукописи.

Бородулин Б.Е. – обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна исследования, обсуждение результатов.

Поваляева Л.В. – получение данных для исследования, анализ полученных данных, обсуждение результатов.