

УДК 616.155.34:[616.988:578.834.1]

DOI: 10.14427/jipai.2023.2.52

Показатели функциональной активности нейтрофилов как предикторы тяжести COVID-19

Л.А. Ащина¹, Н.И. Баранова¹, А.И. Болгова^{1,2}

¹ Пензенский институт усовершенствования врачей – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ, Пенза

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Пензенский областной клинический центр специализированных видов медицинской помощи», Пенза

Neutrophil functional activity indices as predictors of COVID-19 severity

L.A. Aschina¹, N.I. Baranova¹, A.I. Bolgova^{1,2}

¹ Penza Institute for Further Training of Physicians – Branch Campus of the Federal State Budgetary Educational Institution of Further Professional Education «Russian Medical Academy of Continuing Professional Education» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Penza, Russia

² State Budget Health Care Institution «Penza Regional Clinical Center of Specialized Types of Medical Care», Penza, Russia

Аннотация

COVID-19 – это респираторное заболевание, вызванное вирусом Sars-Cov-2, которое может прогрессировать до острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) и запускать иммунопатологические механизмы, приводящие к чрезмерному воспалению и дисфункции лейкоцитов. Нейтрофилы являются самыми ранними клетками врождённого иммунного ответа при инфекционном процессе, которые играют важную роль в патогенезе данного заболевания. Целью исследования явилось изучение функциональной активности нейтрофилов у больных COVID-19 в зависимости от степени тяжести. В исследование были включены 67 больных с COVID-19, которые были разделены по степени тяжести на три группы (с лёгким, среднетяжёлым, тяжёлым и крайне тяжёлым течением). В качестве контроля были использованы показатели 30 практически здоровых людей. Установлено изменение кинетики хемилюминесцентного ответа нейтрофилов у больных с COVID-19 вне зависимости от степени тяжести, заключающееся в снижении показателей спонтанной и индуцированной продукции активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами, времени выхода на максимум свечения по сравнению со здоровыми людьми, что свидетельствует о снижении фагоцитарной активности клеток. При анализе показателей функциональной активности нейтрофилов в группах больных с различными степенями тяжести было выявлено, что значения спонтанной и индуцированной продукции АФК клетками были наиболее низкими у больных с тяжёлым и крайне тяжёлым течением, что обуславливало нарастание иммунодефицитного состояния. Это может привести к развитию незавершённого фагоцитоза и прогрессированию патологического состояния при COVID-19. Значительное снижение по-

Summary

COVID-19 is a respiratory disease caused by Sars-Cov-2, which can progress to acute respiratory distress syndrome (ARDS) and trigger immunopathological mechanisms leading to excessive inflammation and leukocyte dysfunction. Neutrophils are the earliest cells of the innate immune response in the infectious process, which play an important role in the pathogenesis of this disease. The aim of the study was to investigate the functional activity of neutrophils in COVID-19 patients depending on the severity degree. The study included 67 patients with COVID-19 which were divided into three groups (with mild, moderate, severe and extremely severe course). The parameters of 30 practically healthy people were used as a control. We identified changes in the kinetics of chemiluminescent response of neutrophils in patients with COVID-19, regardless of severity, consisting in reduced rates of spontaneous and induced production of ROS neutrophils, time to the maximum glow compared with healthy people, indicating a decrease in phagocytic activity of cells. Analysis of parameters of functional activity of neutrophils in groups of patients with different degrees of severity revealed that the values of spontaneous and induced production of ROS by cells were the lowest in patients with severe and extremely severe course, which conditioned the increase of immunodeficiency state. This can lead to the development of incomplete phagocytosis and progression of the pathological state in COVID-19. Significant decrease in the indicators of neutrophil functional activity in patients with this disease can be used as a predictor of COVID-19 severity.

казателей функциональной активности нейтрофилов у больных с данным заболеванием можно использовать в качестве предикторов тяжести COVID-19.

Ключевые слова

COVID-19, нейтрофилы, хемилюминесцентный анализ.

Keywords

COVID-19, neutrophils, chemiluminescent analysis.

Введение

С момента появления коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, возникла острая необходимость изучения патогенеза заболевания с целью разработки эффективных методов лечения и вакцинации. Тяжёлыми формами болезни явились острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) и системное воспаление [1]. Иммунные нарушения при респираторных вирусных инфекциях включают повышенную активность естественных Т-киллеров, моноцитов, макрофагов и нейтрофилов [2]. Нейтрофилы являются самыми ранними клетками врождённого иммунного ответа при инфекционном процессе, которые осуществляют борьбу с патогенными агентами за счёт фагоцитоза, продукции активных форм кислорода (АФК) и высвобождения нейтрофильных внеклеточных ловушек. Кроме того, нейтрофилы способны выделять цитокины и хемокины, которые способствуют воспалению во время инфекции, а АФК и нейтрофильные ловушки участвуют в повреждении тканей [3]. Так, проведённые исследования выявили связь тяжёлого течения COVID-19 с нейтрофилией, а нейтрофилы пациентов показали более высокую экспрессию маркеров активации, чем у здоровых людей из контрольной группы. Также в сыворотке пациентов с COVID-19 были выявлены повышенные уровни компонентов нетоза, включая миелопероксидазу, цитруллинированный гистон H3 и ДНК [4]. Поэтому предполагают, что нейтрофилы играют значимую роль в остром повреждении лёгких и ОРДС, связанных с COVID-19, однако многофункциональная оценка нейтрофилов у данных больных не проводилась.

Целью данной работы явилось изучение функциональной активности нейтрофилов у пациентов с COVID-19 в зависимости от тяжести заболевания.

Материалы и методы

Проведён анализ показателей функциональной активности нейтрофилов у 67 больных с COVID-19 в возрасте от 19 до 65 лет, находящихся на лечении в ГБУЗ «Пензенский областной кли-

нический центр специализированных видов медицинской помощи». Средний возраст больных составил 40 ± 21 год. В контрольную группу были включены 30 практически здоровых людей, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой. Диагноз пациентам с COVID-19 устанавливался на основании выявления РНК SARS-CoV-2 в мазках из носа и зева методом ПЦР. Больные были разделены на 3 группы в зависимости от степени тяжести согласно действующим рекомендациям «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» (версия 11 от 7.05.2021). В 1-ую группу вошли пациенты с COVID-19 ($n=26$), которые характеризовались лёгким течением заболевания (КТ 1). Во 2-ую группу больных COVID-19 ($n=25$) вошли пациенты, которые характеризовались среднетяжёлым течением (КТ 1-2). В 3-ю группу – пациенты с COVID-19 ($n=16$) с тяжёлым и крайне тяжёлым течением. При этом объём поражения лёгких был значительный или субтотальный (КТ 3-4). При крайне тяжёлом течении наблюдалась стойкая фебрильная лихорадка, ОРДС, острая дыхательная недостаточность, септический шок, полиорганная недостаточность, изменения в лёгких (КТ 4). Изучение функциональной активности нейтрофилов проводили по методике Образцова И.В. из цельной венозной крови без выделения клеток [5]. В качестве стимулов нейтрофилов применяли форбол-12-миристан-13-ацетатом и N-формилметионил-лейцил-фенилаланином, в качестве активатора хемилюминесценции (ХЛ) – люминол, измерение показателей ХЛ проводили на хемилюминометре LUM-1200 (ДИСофт, Россия). В исследовании были определены следующие показатели: абсолютное количество нейтрофилов (10^9 клеток), нормированная светосумма спонтанной и стимулированной продукции нейтрофилов (Сспонт., Сстим.), нормированная максимальная интенсивность свечения нейтрофилов (Imax), коэффициент активации (Ka) клеток и время выхода на максимум свечения (Tmax). При помощи программы STATISTICA 12.0 производили статистическую обработку полученных результатов. Показатели представляли в виде ме-

дианы (Me) и интерквартильного размаха ($Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$). Сравнительный анализ групп оценивали по критерию Манна-Уитни. Достоверно значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Результаты проведённого исследования (см. таблицу 1) свидетельствовали о наличии у больных 1 группы достоверно более низких показателей спонтанной и стимулированной продукции АФК клетками и времени выхода на максимум свечения по сравнению со здоровыми людьми. Во 2 группе было также выявлено снижение спонтанной и индуцированной продукции нейтрофилов, времени выхода на максимум свечения в сравнении с контрольными значениями. В 3 группе показатели спонтанной, стимулированной продукции АФК нейтрофилами и значение времени выхода на максимум были более низкими в сравнении со значениями здоровых доноров, однако коэффициент активации клеток был более высоким. Показатель абсолютного количества нейтрофилов в данной группе был достоверно более высоким по сравнению с контрольными значениями. Таким образом, во всех группах больных COVID-19 вне зависимости от степени тяжести заболевания были снижены показатели спонтанной и стимулированной продукции АФК нейтрофилами, что указывает на более низкую функциональную активность

клеток по сравнению со здоровыми людьми. Показатель времени выхода на максимум свечения, который характеризует длительность развития максимальной активности продукции АФК от момента антигенной индукции респираторного взрыва нейтрофилами, был более низким по сравнению с контрольными значениями. Считается, что его показатели уменьшаются при острых инфекционно-воспалительных заболеваниях, когда фагоциты находятся в активированном состоянии. Сравнительный анализ функциональной активности нейтрофилов в зависимости от степени тяжести заболевания показал, что наиболее высокие значения спонтанной и стимулированной продукции АФК нейтрофилами были получены у пациентов со средней степенью тяжести (2 группа). Показатели спонтанной и стимулированной продукции нейтрофилов в группе с тяжёлым и крайне тяжёлым течением (3 группа) были достоверно более низкими по сравнению с больными с лёгким (1 группа) и среднетяжёлым течением (2 группа). Напротив, значение коэффициента активации клеток в 3-ей группе пациентов было более высоким по сравнению с 1-ой и 2-ой группами больных. Данный показатель равен отношению светосуммы индуцированной ХЛ к светосумме спонтанной ХЛ и показывает наличие внутриклеточных метаболических резервов для реализации респираторного взрыва. Абсолютное

Таблица 1. Показатели функциональной активности нейтрофилов у больных COVID-19 с разной степенью тяжести

Значения	Пациенты с COVID-19			Контрольная группа (n=30) Mediana $Q_{0,25-Q0,75}$
	1 группа (n=32) Mediana $Q_{0,25-Q0,75}$	2 группа (n=30) Mediana $Q_{0,25-Q0,75}$	3 группа (n = 23) Mediana $Q_{0,25-Q0,75}$	
Абс. кол-во нейтрофилов, 10^9 клеток	3,0 [2,6-3,96] $p_1=0,004$	5,8 [3,3-7,7] $p_2=0,03$	9,4 [5,6-10,0] $p=0,002$ $p_3=0,04$	4,2 [2,7-6,2]
$S_{\text{спонт.}}$, PPs	2,71 [1,9-4,44] $p=0,002$	3,4 [1,6-4,9] $p=0,0006$ $p_2=0,03$	1,42 [0,6-6,2] $p=0,0002$ $p_3=0,04$	7,5 [4,2-13,1]
$S_{\text{стим.}}$, PPs	60,0 [46,9-121,5] $p=0,0003$ $p_1=0,004$	96,6 [26,8-353,0] $p=0,0009$ $p_2=0,02$	45,2 [25,6-46,6] $p=0,004$ $p_3=0,045$	180,6 [70,4-210,1]
I_{max} , PPs	0,19 [0,12-0,27]	0,2 [0,06-0,29] $p_2=0,04$	0,1 [0,05-0,11] $p_3=0,04$	0,13 [0,09-0,2]
T_{max} , с	2160 [2136-2364] $p=0,007$	2148 [2112-2460] $p=0,006$	2100 [1950-2280] $p=0,004$	2760 [2200-3350]
K_a	25,6 [14,1-35,1] $p_1=0,0025$	19,7 [13,7-77,6] $p_2=0,03$	35,1 [6,4-64,0] $p=0,00004$ $p_3=0,004$	15,7 [9,6-24,5]

Примечание. p – статистически значимые различия групп больных COVID-19 и контрольной группы; p_1 – статистически значимые различия 1 и 2 группы больных COVID-19 ($p < 0,05$); p_2 – статистически значимые различия 2 и 3 группы больных COVID-19 ($p < 0,05$); p_3 – статистически значимые различия 1 и 3 группы больных COVID-19 ($p < 0,05$).

количество нейтрофилов увеличивалось в зависимости от степени тяжести и было наиболее высоким в 3-ей группе больных. Таким образом, у больных с тяжёлым и крайне тяжёлым течением COVID-19 наблюдались самые низкие показатели функциональной активности нейтрофилов, несмотря на повышенное содержание самих клеток.

Заключение

Фагоцитарная активность нейтрофилов у больных COVID-19 по сравнению со здоровыми людьми вне зависимости от степени тяжести характеризовалась снижением продукции АФК клетками как при спонтанном, так и при индуцированном процессе, что свидетельствует о снижении функционального состояния клеток.

Также уменьшался и показатель времени выхода на максимум свечения, что указывает на острый инфекционный процесс. При анализе показателей функциональной активности нейтрофилов в группах больных с различными степенями тяжести было выявлено, что значения спонтанной и индуцированной продукции АФК фагоцитарными клетками были наиболее низкими у больных с тяжёлым и крайне тяжёлым течением, что обуславливало нарастание иммунодефицитного состояния и влекло развитие незавершённого фагоцитоза и прогрессирование патологического состояния. Значительное снижение показателей функциональной активности нейтрофилов у больных COVID-19 можно использовать в качестве предикторов тяжести заболевания.

Литература

1. Pirofski L-A., Casadevall A. Pathogenesis of COVID-19 from the perspective of the damage-response framework. *mBio* 2020; 11: e01175-20. DOI: 10.1128/mBio.01175-20
2. Crane M.J., Lee K.M., FitzGerald E.S., Jamieson A.M. Surviving deadly lung infections: innate host tolerance mechanisms in the pulmonary system. *Front Immunol* 2018; 9:1421. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01421
3. Masso-Silva J.A., Moshensky A., Lam M.T.Y., Odish M.F., Patel A., Xu L., et al. Increased Peripheral Blood Neutrophil Activation Phenotypes and Neutrophil Extracellular Trap Formation in Critically Ill Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Patients: A Case Series and Review of the Literature. *Clin Infect Dis.* 2022; 74(3):479-489. DOI: 10.1093/cid/ciab437.
4. Leppkes M., Knopf J., Naschberger E., et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine* 2020; 58:102925. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102925
5. Образцов И.В., Годков М.А., Полимова А.М., Демин Е.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Оценка функциональной активности нейтрофилов цельной крови методом двухстадийной стимуляции: новый подход к хемилюминесцентному анализу. *Российский иммунологический журнал.* 2015; 9(4): 418-425.

Сведения об авторах

Ащина Людмила Андреевна – к.б.н., старший научный сотрудник ЦНИЛ Пензенского института усовершенствования врачей – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ, Пенза, Россия. E-mail: snil@piuv.ru.

Баранова Надежда Ивановна – д.б.н., профессор, заведующий Центральной научно-исследовательской лабораторией (ЦНИЛ) Пензенского института усовершенствования врачей – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ, Пенза, Россия. E-mail: snil@piuv.ru.

Болгова Александра Игоревна – аспирант кафедры инфекционных болезней, Пензенский институт усовершенствования врачей – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 440060, Пенза, Россия; заведующий инфекционным отделением, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Пензенский областной клинический центр специализированных видов медицинской помощи». 440052, г. Пенза ул. Куйбышева/Красная, 33а/23. E-mail: albolgova@mail.ru.

Поступила 11.05.2023.