

Комплексная оценка и диагностическое значение показателей системы иммунитета, ассоциированные с чувствительностью и резистентностью к COVID-19

И.Н. Щурок, О.В. Ищенко, И.В. Семёнова, С.И. Генералов, О.И. Черноков

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

Comprehensive assessment and diagnostic value of the parameters of the immune system associated with susceptibility and resistance to COVID-19

I.N. Shchurok, O.V. Ishchenko, I.V. Semenova, S.I. Generalov, O.I. Chernokov

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Аннотация

Врождённый иммунитет как первая линия защиты системы иммунитета играет центральную роль в борьбе с коронавирусом Sars-CoV2. Изучение врождённого противовирусного иммунитета является основополагающим в прогнозировании развития инфекции, степени тяжести. Настоящее исследование направлено на изучение сходства и различий в уровне иммуноглобулинов, цитокинов (интерферонов альфа и гамма), антимикробных пептидов (дефензина альфа, дефензина бета), изменений при стимуляции нейтрофилов антигенами вируса у пациентов разных клинических фенотипов COVID-19. Целью исследования было выявить наиболее часто встречающиеся сочетания симптомов и выделить отдельные клинические фенотипы COVID-19, а также изучить иммуно-фенотипические особенности каждой клинической группы вне проявления самой инфекции. Наши исследования определили роль интерферона альфа, гамма, дефензина альфа и бета в защите от инфекции Sars-CoV2 и установили, что исходные показатели врождённого иммунитета вне контакта с инфекцией определяют исход заболевания и могут быть использованы для прогнозирования заболевания. Развитие течения заболевания и степень тяжести по-разному запрограммированы врождёнными клетками системы иммунитета при лёгком и тяжёлом течении заболевания, что также сопровождается аналогичными различиями в адаптивном иммунном ответе на SARS-CoV2.

Ключевые слова

Врождённый противовирусный иммунитет, интерфероны, дефензины, COVID-19, гиперчувствительность Sars-CoV2.

Summary

Innate immunity, as the first line of defense of the immune system, plays a key role in protection against the Sars-CoV2 coronavirus. The study of innate antiviral immunity is fundamental in prediction the severity and prognosis of the infectious disease. The present study is aimed at the evaluation of similarities and differences in the levels of immunoglobulins, cytokines (interferons alpha and gamma), antimicrobial peptides (defensin alfa, defensin beta), changes during stimulation of neutrophils with viral antigens in patients with different clinical phenotypes of COVID-19. The aim of the study was to identify the most common combinations of symptoms and identify individual clinical phenotypes of COVID-19, as well as to study the immunophenotypic features of each clinical group outside the manifestation of the infection itself. Our studies have determined the role of interferon alfa, gamma, defensin alfa, and beta in protection against Sars-CoV2 infection and established that baseline innate immunity parameters outside of contact with infection determine the outcome of the disease and can be used to predict the disease. The development of the course of the disease and the severity of the disease are differently programmed by the innate cells of the immune system in mild and severe cases of the disease, which is also accompanied by similar differences in the adaptive immune response to Sars-CoV2.

Keywords

Innate antiviral immunity, interferons, defensins, COVID-19, hypersensitivity to Sars-CoV2.

Введение

Развитие тяжёлого острого респираторного синдрома в результате инфицирования коронавирусом Sars-CoV2 с высокой степенью летальности представляет собой огромную медицинскую и экономическую проблему. COVID-19 был официально объявлен Всемирной организацией здравоохранения в 2019 году пандемией, которая охватила все страны и континенты [1].

В настоящее время весь научный мир занимается проблемой COVID-19 инфекции, опубликованность данного вопроса очень велика. Но внимание большинства исследователей направлено на изучение вторичного специфического иммунитета с синтезом специфических иммуноглобулинов [2]. Но без первой линии – врождённого иммунитета – антитела и клетки попросту не сформировались бы, так как от него зависит течение болезни.

Передача вируса происходит воздушно-капельным, а также контактным путём через попадание на поверхности и последующим занесением на слизистые оболочки глаз, носа, рта [3]. Клинические проявления при этом заболевании достаточно разнообразны [4]. Изучение показателей врождённого иммунитета обусловлена тем, что мукозальный иммунитет является крупнейшим компонентом всей системы иммунитета, эволюционировавшей для обеспечения защиты основных участков инфекционной угрозы: слизистых оболочек. Поскольку Sars-CoV2 первоначально поражает верхние дыхательные пути, его первые взаимодействия с системой иммунитета должны происходить преимущественно на поверхностях слизистой оболочки дыхательных путей как во время индуктивной, так и во время эффекторной фазы ответа.

Многие исследования COVID-19 сосредоточены на пациентах с тяжёлыми и критическими заболеваниями. Это связано с тем, что эта стадия прогрессирования заболевания может привести к быстрому ухудшению состояния, и как результат развитию цитокинового шторма, дыхательной недостаточности, полиорганной недостаточности и смерти [5]. Понимание характера передачи, тяжести, клинических особенностей и факторов риска для COVID-19 инфекции остаётся не до конца изученным, как среди населения в целом, так и для работников здравоохранения. Поэтому исследования эпидемиологии и клинических характеристик случаев в различных условиях имеют решающее значение для понимания патогенеза и клинических проявлений. Задачей исследования было выявить наиболее

часто встречающиеся сочетания симптомов и выделить отдельные клинические фенотипы COVID-19, а также изучить иммуно-фенотипические особенности каждой клинической группы вне проявления самой инфекции.

Течение заболевания варьирует от в основном бессимптомного и лёгкого течения до более тяжёлого и критического у 10-20 % пациентов со значительным риском летального [6]. Сам вирус, окружающая среда и система иммунитета могут способствовать такой гетерогенности заболевания. Многочисленные мутации, различные штаммы вируса способствуют быстрому распространению вируса и высокой контагиозности [7]. Можно предположить, что вирусное генетическое разнообразие, генетическая эволюция, варибельная инфекционность может способствовать заразности и летальности, но не образованию множественной гетерогенности заболевания, наблюдаемой при COVID-19 [8]. Не только вирус несёт основную ответственность за гетерогенность заболевания, а система иммунитета и окружающая среда остаются факторами, определяющими течение и исход заболевания.

Врождённый иммунитет как первая линия защиты нашей системы иммунитета играет центральную роль в борьбе с вирусами [9]. Изучение врождённого противовирусного иммунитета является основополагающим в развитии инфекции, ее степени тяжести. Оценка показателей врождённого иммунитета в комплексе исследований определяет возможность применения иммунотерапевтических препаратов. А также научное объяснение специфической клеточной реактивности и резистентности при контакте с вирусом Sars-CoV2. Разработка новых клеточно-опосредованных методов диагностики COVID-19 расширит возможности своевременной верификации диагноза с учётом участия клеточного и гуморального звена системы иммунитета.

Дефензины представляют собой катионные цистеин-содержащие многофункциональные антимикробные пептиды, которые содержатся в азурофильных гранулах нейтрофилов (альфа-дефензины) и на слизистых оболочках верхних дыхательных путей (бета-дефензины). Они принимают участие в противобактериальном, противовирусном и противоопухолевом иммунитете. На данный момент известно о двух механизмах противовирусного действия дефензинов. Во-первых, они оказывают прямое литическое действие, непосредственно взаимодействуя с липидной оболочкой вируса. Во-вторых, дефензины оказывают не прямое противовирусное действие,

взаимодействуя с мембранными гликопротеинами клеток человека, требуемые для репликации вируса. Дефензины играют ключевую роль во врожденных иммунных ответах хозяина на инфекцию и, помимо их классически описываемой роли антимикробных пептидов, также участвуют в иммунной модуляции, фертильности, развитии и заживлении ран. Увеличение количества нейтрофилов в крови при наличии хронической патологии может привести к повышению уровня дефензинов в слюне. Таким образом, дефензины в слюне могут способствовать поддержанию общего здоровья полости рта и могут играть роль непосредственно в первой линии защиты против инфекции. Соответственно осмотр полости рта на наличие кариозных зубов, как источника хронической инфекции на уровне верхних дыхательных путей, является обязательным компонентом для изучения.

Интерфероны играют центральную роль в противовирусном иммунитете. Они представляют собой семейство сигнальных белков, участвующих в врожденных и адаптивных иммунных ответах, играющих важную роль в ингибировании репликации вирусов через различные эффектор-ные белки. Существует три типа интерферонов: тип I (интерферон α β), тип II (интерферон γ) и тип III (интерферон λ). Хотя все три, вероятно, участвуют в защите от коронавирусной инфекции, интерферон типа I и II наиболее изучены. Распознавание вирусной РНК цитозольными рецепторами приводит к активации рецептора к интерферону и определяет начало транскрипции интерферона типа I, способствуя тем самым разрешению инфекции. Вирусное распознавание вызывает выработку интерферонов, что, в свою очередь, запускает транскрипцию IFN-стимулированных генов, которые участвуют в различных противовирусных функциях. Интерфероны альфа широко экспрессируются и могут приводить к иммунопатологии при вирусных инфекциях. Интерферон-гамма синтезируется Т-лимфоцитами и естественными киллерами, также оказывает противовирусное и противоопухолевое действие, но его главной функцией является иммуномодулирующая (регулирует весь комплекс реакций иммунного ответа в ответ на вторжение микроорганизма). При изучении роли интерферонов стоит учитывать роль нейтрализующих антител, которые не позволяют интерферону эффективно связываться с рецептором и/или активировать его, тем самым блокируя его биологические эффекты и ингибируя терапевтическую эффективность.

Изучение содержания интерферонов в ротовой жидкости и сыворотке крови при разных проявлениях вирусной инфекции вероятно позволит прогнозировать течение и исход заболевания.

Sars-CoV-2 вирус, вызывающий COVID-19 инфекцию, проникает в эпителиальные клетки, в том числе в клетки слизистой оболочки дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта, используя в качестве рецептора ангиотензин-превращающий фермент-2 (ACE2) [12]. Последующее воспаление может способствовать быстрой элиминации вируса, но тяжёлые случаи COVID-19 характеризуются неэффективным иммунным ответом, который не может устранить инфекцию. Вирусная инфекция, поражающая эпителиальные клетки, вызывает воспалительную реакцию. В то время как хорошо скоординированный иммунный ответ приводит к элиминации вируса, чрезмерные дисфункциональные реакции не способны излечить инфекцию и связаны с тяжёлыми симптомами COVID-19.

Факторы, ответственные за степень тяжести заболевания коронавирусом, а также генезис и характер защитного иммунитета против COVID-19 заложены именно во врождённом иммунитете. Первая линия защиты локализуется в слизистой оболочке дыхательных путей, являясь первым местом встречи с компонентами врождённого иммунитета. Ткани и жидкости ротовой полости играют существенную роль в процессах регуляции, в осуществлении защиты целостного организма за счёт образования и секреции иммуноглобулинов и других факторов защиты [13,14]. Состав ротовой и десневой жидкостей в полной мере отражает процессы, протекающие в организме, и может с успехом использоваться в лабораторной диагностике, дополняя или заменяя классические исследования крови. Ротовая жидкость обладает рядом неоспоримых достоинств перед кровью: неинвазивность и доступность её получения, что открывает широкие перспективы для саливадиагностики. Привлекают также простота забора проб, возможность повторного взятия биоматериала в физиологических условиях и полная безопасность при этом для здоровья пациента и медперсонала. В этом плане исследование ротовой жидкости является приоритетным направлением в медицине.

Цель исследования

Целью исследования было выявить маркёры местного врождённого иммунитета слизистых оболочек и специфического клеточного иммунитета, определяющие чувствительность и резистентность к COVID-19.

Материалы и методы исследования

Дизайн исследования: ретроспективно-проспективное сравнительное исследование в параллельных группах пациентов. Рандомно были выбраны обследуемые, которые перенесли инфекцию с различными клиническими проявлениями.

Испытания проведены с участием 63 добровольцев. Исследование проводилось на базе кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК на основании разрешения этического комитета Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета (протокол № 10 от 18.11.2021 г.).

Критерии включения в группу обследования:

1. Пациенты обоего пола в возрасте от 18 до 70 лет;
2. Пациенты, перенёвшие Covid-19 инфекцию, не вакцинированные против Sars-CoV2.
3. Получение письменного информированного согласия пациента на участие в исследовании.

Критерии невключения:

1. Возраст менее 18 и более 70 лет.
2. Острый или хронический синусит, медикаментозный ринит, полипы носа или воспалительные заболевания верхних дыхательных путей, которые, по мнению исследователя, могут исказить результаты исследования в связи с применением лекарственных средств топического действия.
3. Наличие в носоглотке корок, эрозий, изъязвлений, перфораций носовой перегородки, или любого вида закупорки носовых ходов при скрининге.
4. Бронхиальная астма, за исключением лёгкой интермиттирующей астмы, с применением ежедневной базисной терапии ингаляционными глюкокортикостероидами.
5. Конъюнктивит или любые другие глазные симптомы.
6. Инфекции дыхательных путей, потребовавшие проведения антибактериальной терапии за 4 недели до исследования.
7. Субъекты, перенёвшие инфекции верхних дыхательных путей за 14 дней до начала испытания.
8. Активная или неактивная туберкулёзные инфекция дыхательных путей, местные или системные грибковые, бактериальные, вирусные или паразитарные инфекции.
9. Начало заместительной гормональной терапии или иммунотерапии во время исследования.
10. Субъекты, принимающие лечение симптоматическими лекарственными средствами.

11. Иммунодефицитные болезни с клиникой тяжёлых инфекций.
12. Эндокринная патология в состоянии декомпенсации.
13. Кандидоз слизистых.
14. ВИЧ-инфекция в любой стадии.
15. Сепсис.
16. Лихорадка (с температурой более 38 °С).
17. Пациенты с сопутствующим заболеванием с плохим прогнозом (например, онкопатологией).
18. Большая хирургическая операция в течение предшествующих 3 месяцев.
19. Психические расстройства, в том числе в анамнезе.
20. Беременность и период лактации.
21. Установленный диагноз первичного иммунодефицита.

Для анкетирования респондентов использовали опросник COVID-19 CASE QUESTIONNAIRE – NSW Health для пациентов, перенёвших COVID-19 инфекцию, Австралийского научного общества, состоящий из 30 блоков, 53 вопросов [14]. Пациенты заполняли опросники самостоятельно в присутствии исследователя для возможности разъяснения непонятных вопросов. Для оценки по балльной системе каждый отрицательный ответ принимали за 0 баллов, положительный – за 1 балл. Данные анамнеза заболевания внесены в личные чек-опросники для каждого пациента отдельно с подписанием информированного согласия на проведение исследования. Объективный осмотр производился непосредственно исполнителями проекта.

Для определения показателей врождённого иммунитета у испытуемых производили забор ротовой жидкости и периферической крови. Проводили пробоподготовку образцов ротовой жидкости по собственной отработанной методике [15]. Учитывая большую вязкость слюны для выполнения спектрофотометрических измерений, предварительно проводили центрифугирование и фильтрование образцов ротовой жидкости.

Иммуноферментным методом в ротовой жидкости и сыворотке крови проводили определение: проводили цитокинов (интерферонов альфа и гамма), антимикробных пептидов (дефензина альфа, дефензина бета) с применением тест-систем Wuhan Fine Test Biotech Human DEFA1 (Defensin Alpha 1, Neutrophil) Elisa Kit; Wuhan Fine Test Biotech Human IFN γ (Interferon gamma) Elisa Kit, Elabscience Human IFN α (Interferon Alpha) Elisa Kit, Elabscience Human DEFB2 (Defensin Beta 2) Elisa Kit в соответствии с рекомендациями производителя.

Определение уровня специфических иммуноглобулинов класса М и класса G в сыворотке крови к коронавирусу проводили иммунофлуоресцентным методом для качественного определения антител к COVID-19 с помощью Ichroma Qualitative Test of COVID-19 Ab (IgG/IgM), производство Корея. Прибор для измерения тестов Ichroma ТМ автоматически рассчитывал результат с дополнительным значением, индексом cut-off (COI): отрицательный < 0,9, неопределенный 0,9-1,1, положительный $\geq 1,1$.

Для изучения реакции гранулоцитов (нейтрофилов) на антиген COVID-19 у пациентов выделяли нейтрофилы из венозной крови следующим способом: 5 мл периферической венозной крови забирали натошак из локтевой вены в стерильные пластиковые пробирки, содержащие 3,2 % раствор цитрата натрия. Методикой двойного градиента плотности «фиколл-верографин» выделяли жизнеспособные нейтрофилы. Затем проводили индукцию ловушкообразования антигеном COVID-19 с помощью метода определения нейтрофильных ловушек при помощи двойного окрашивания с микроскопией в светлом поле согласно инструкции «Метод определения нейтрофильных внеклеточных ловушек при помощи двойного окрашивания с микроскопией в светлом поле» № 182-1221 от 16.06.2022 г.

В качестве антигена использовали инактивированную вакцину против SARS-CoV-2 (клетки Vero) VeroCell, производства Китай, с содержанием в 0,5 мл вакцины 6,5 единиц инактивированного антигена SARS-CoV-2 и гидроксид алюминия в качестве адьюванта. Реакцию потенциального ловушкообразования нейтрофилами в ответ на антигены SARS-CoV-2 проводили в силиконовых камерах на предметном стекле с адгезивным покрытием Polyzine. Вносили 200 мкл суспензии гранулоцитов и 40 мкл инактивированной вакцины в разведении 1:10 на физиологическом растворе. Концентрация вносимого антигена была выбрана на основании инструкции по применению «Метод диагностики заболеваний и патологических состояний, обусловленных реакциями гиперчувствительности немедленного типа на лекарственные средства из группы противомикробных препаратов для системного применения» регистрационный № 093-1117 от 01.12.2017 г. Концентрация лекарственного средства, применяемого для теста активации базофилов, должна составлять 0,1-0,01 % от разовой минимальной терапевтической дозы лекарственного средства.

Инкубацию клеток проводили в течение 3 часов при 37 °С. Поиск и определение нейтро-

фильных внеклеточных ловушек осуществляли при помощи двойного окрашивания гексаазотированным фуксином и метиловым зелёным.

Для исключения ложноположительного результата аналогичным методом выполнялось определение ловушкообразования нейтрофилами в ответ на компонент вакцины – гидроксид алюминия в аналогичных соотношениях 200 мкл суспензии гранулоцитов и 40 мкл гидроксида алюминия в разведении 1:10 на физиологическом растворе. Поскольку препараты были окрашены гексаазотированным фуксином с образованием продукта ферментативной реакции красного цвета, который можно наблюдать также при помощи флуоресцентной микроскопии, в разработанном методе отсутствовала необходимость в дополнительном иммунофлуоресцентном окрашивании препаратов с использованием фермент-специфических антител.

Одни и те же участки просматривали как с использованием флуоресцентной, так и при помощи световой микроскопии. Морфологические элементы, определяемые в одних и тех же участках при помощи световой и флуоресцентной микроскопии, были идентичны, что также подтверждает эффективность разработанного метода и возможность ограничиться более простой световой микроскопией при определении нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Статистические исследования. Результаты исследования обрабатывались с помощью статистического пакета Statistica 10 с применением непараметрических методов, выражались в виде медианы (Me). Зависимые переменные сравнивали с помощью методом Неймана с последующим применением непараметрического дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса (KruskalWallis ANOVA), при $p < 0,05$ (P k-w) различия считали значимыми.

Результаты

Исследуемая группа из 63 пациентов была разделена на клинические группы в зависимости от результатов заполненных опросников. В зависимости от набранных баллов по указанным симптомам пациенты, перенесшие COVI-19, были отнесены в 5 основных клинических фенотипа коронавирусной инфекции:

- 1 – бессимптомный вариант течения заболевания или носительство (0-5 баллов);
- 2 – лёгкого течения с клиникой ОРВИ с поражением верхних дыхательных путей (5-14 баллов);
- 3 – пациенты с рентгенологически подтверждённой пневмонией без снижения сатурации и

отсутствием необходимости в оксигенотерапии (15-29 баллов);

4 – пациенты с рентгенологически подтверждённой пневмонией с потребностью в оксигенотерапии, длительным лихорадочным синдромом (30-39 баллов);

5 – пациенты с рентгенологически подтверждённой пневмонией, находившиеся на неинвазивной и инвазивной искусственной вентиляции лёгких (40-45 баллов).

Пациенты с рентгенологически подтверждённой пневмонией (группа 3 и 4 были объединены в одну для удобства интерпретации результатов). В исследуемой группе не было пациентов, нуждающихся в неинвазивной и инвазивной ИВЛ. Сформированы группы клинически разных вариантов течения болезни. Соответственно оценка показателей производилась в 3 основных группах и групп между собой.

Характеристика испытуемых

В исследовании участвовали 63 респондента в возрасте 18 лет и старше, клинико-демографическая характеристика пациентов приведена в таблице 1.

Из коморбидной патологии обследуемыми были отмечены заболевания сердца (артериальная гипертензия, ИБС и др.), хронические заболевания легких, сахарный диабет, заболевания печени, заболевания почек, ожирение, неврологические заболевания.

Первый фенотип пациентов, это люди с бессимптомным течением инфекции и/или носители, контакты первого уровня (n = 24).

Группа пациентов, которые являлись контактами первого уровня и не имели клинических

проявлений, что подтверждалось данными анамнеза, заполненными скрининг опросниками, данными объективного обследования. Обследуемые этой группы отмечали, что вероятный источник инфекции:

– контакт с больными родственниками дома в 66,6 % случаев;

– контакт с человеком с подтвержденным диагнозом на работе, в гостях, других местах – 33,4 %.

У 6 (24 %) обследуемых данной группы в анамнезе были положительные анализы на выявление SARS-CoV2 методом ПЦР (по данным опросника), 18 (75 %) имели отрицательные результаты ПЦР-тестирования. У пациентов этого фенотипа не обнаружены специфические антитела Ig G, IgM к вирусу COVID-19.

Данный клинический вариант достаточно тяжело выявить из-за отсутствия клинических признаков и нельзя с точностью сказать, насколько часто он встречается. В группе пациентов, которые являлись контактами первого уровня и не имели клинических проявлений, распределение по полу составило женщин 71 %, мужчин 29 %. Средний возраст составил 28 лет.

Стоит отметить молодой возраст пациентов этой группы (28 лет) и отсутствие сопутствующей хронической патологии согласно данным опросника.

Ко второму фенотипу отнесены пациенты с лёгким течением с клиникой ОРВИ с поражением верхних дыхательных путей (n = 22).

Данный клинический вариант характеризовался наличием лихорадочно-интоксикационного и/или катарального синдромов без признаков поражения внутренних органов. При этом рентгенограмма грудной клетки в норме и гипоксемии

Таблица 1. Клинико-демографическая характеристика

Критерии	Бессимптомное течение или носительство, n = 24	Лёгкое течение с клиникой ОРВИ с поражением верхних дыхательных путей, n = 22	Рентгенологически подтверждённая пневмония, длительным лихорадочным синдромом, n = 17
Возраст, лет	28 (25;29)	31 (27;36)	48 (44;56)
Пол, Ж/М %	71/29	68/32	41/69
ПЦР ТЕСТ (положительный / отрицательный, %)	25/75	95/5	62/38
Источник инфекции	Не известен	На работе – 28 %, больной родственник – 48 %	На работе – 26 %, больной родственник – 57 %
Коморбидные заболевания (есть/нет, %)	0/100	12/88	98/2

нет. Также выявлены такие типичные симптомы, как утомляемость (84 %), потеря обоняния (72 %), головная боль (56 %), лихорадка (48 %), кашель (44 %), миалгия (40 %), ринорея (36 %), боль в горле (36 %), одышка (32 %), артралгия (24 %), конъюнктивит (12 %), диарея (16 %) (рис. 1).

Процентное соотношение женщин/мужчин в данной группе составило 68/32 соответственно. Средний возраст составил 31 год. Данный вариант течения заболевания оказался наиболее распространённым и доброкачественным. В этой группе пациентов у 48 % источник заражения неизвестен, 28 % заболели после контакта с человеком с подтверждённым диагнозом на работе, в гостях, других местах, в 24 % случаев заражение после контакта с больными родственниками дома.

Пациенты третьего фенотипа характеризуются рентгенологически подтверждённой пневмонией с длительным лихорадочным синдромом ($n = 17$). На данную клиническую группу приходилось 80 % госпитализаций. Процентное соотношение женщин/мужчин в данной группе составило 41/69 соответственно, подтверждая факт, что мужчины чаще переносят COVID-19 с более тяжёлым клиническим течением. Средний возраст пациентов составил 48 лет, что статистически выше ($p < 0,05$) чем в группах первого и второго фенотипа. Эти результаты среди пациентов с опасным для жизни COVID-19 и увеличению риска с возрастом. Наиболее часто этот фенотип встречается у пациентов старшего возраста с наличием сопутствующей патологии. Основными клиническими симптомами были следующие: потеря обоняния (92 %), утомляемость (75 %), лихорадка (58 %), кашель (58 %), одышка (58 %), головная боль (50 %), миалгия

(42 %), диарея (33 %), артралгия (25 %), ринорея (17 %), конъюнктивит (8 %), боль в горле (8 %). При этом ОРДС наблюдался у 17 % исследуемых (по данным опросника) (рис. 2).

При определении уровня специфических антител Ig G, IgM к вирусу COVID-19 в разных клинических группах получены достоверные различия ($p > 0,05$) в уровне иммуноглобулина Ig G в зависимости от тяжести течения COVID-19. В группе пациентов с бессимптомным течением и/или контакты не было выявлено положительных результатов IgM и Ig G в сыворотке крови. В группе пациентов COVID-19 с легким течением у 36 % были выявлены специфические антитела Ig G к вирусу COVID-19 Me 9,8 (6,7; 22) COI. В 3 группе пациентов с пневмониями у 100 % были обнаружены специфические антитела Ig G к вирусу COVID-19 – Me 27 (13,2; 42,3) COI, что достоверно выше в сравнении с группой 1 ($p = 0,003$) и группой 2 ($p = 0,004$). Ни у одного пациента не обнаружены специфические антитела IgM к вирусу COVID-19, что подтверждает отсутствие антител острой фазы и соответствие критериям включения в группу, т.е. отсутствие острого воспаления.

Проведено сравнение уровней противомикробных дефензинов (альфа и бета) и интерферонов (альфа, гамма) в сыворотке крови и ротовой жидкости среди пациентов трёх основных клинических фенотипов.

При анализе результатов уровня дефензина альфа в сыворотке крови методом Неймана в трёх группах не получено достоверное различие (* p k-w $> 0,05$) (таблица 2).

А при анализе содержания бета-дефензина обнаружена достоверная разница уровней пептидов в сыворотке крови. В группе у пациен-

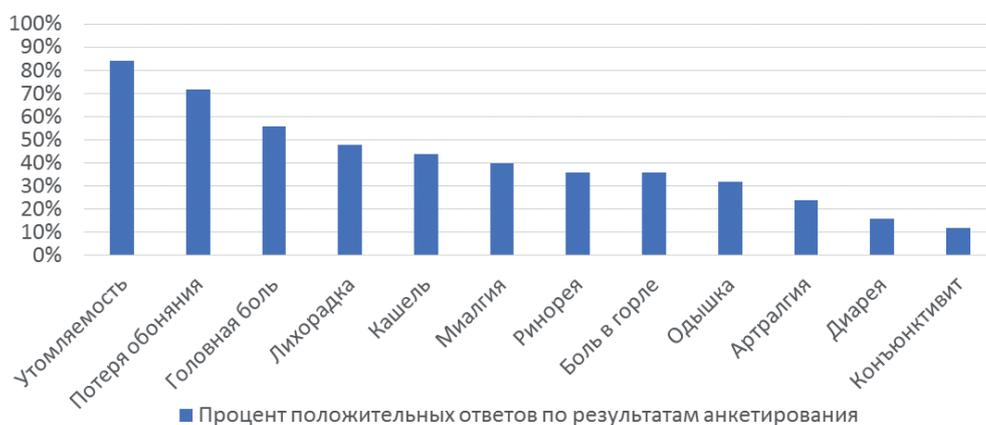


Рис. 1. Распространённость симптомов у пациентов с лёгким течением COVID-19 с клиникой ОРВИ с поражением верхних дыхательных путей

тов с клинической картиной пневмонии 610,7 (389,6;1103,7) пг/мл, P k-w = 0,023 (таблица 3).

Полученные данные можно интерпретировать с точки зрения того, что противовирусная ответная реакция системного действия запускается при внедрении вируса и поражении органов-мишеней. Активация нейтрофилов при инфекционных и воспалительных процессах приводит к быстрому высвобождению дефензинов альфа, которые затем обнаруживаются в плазме крови. Так как изучение цитокинового профиля сыворотки крови было проведено у пациентов, перенёвших COVID-19 инфекцию, в период выздоровления, т.е. минимум 4 недели после клинических проявлений, поэтому достоверных различий в содержании интерферона альфа и гамма, дефензина альфа не получено. Повышенный уровень бета-дефензина может являться следствием наличия сопутствующей коморбидной патологии, так как именно в группе пациентов с перенесённой пневмонией у 98 % пациентов наблюдалась сопутствующая патология, такая как артериальная гипертензия, ожирение, аутоиммунный тиреоидит, хронические заболевания легких и др. Поэтому это подтверждает факт того, что хронические неинфекционные заболевания часто обуславливаются нарушениями механизмов противоинфекционной защиты, когда механизм, призванный защитить человека, становится фактором развития заболевания.

При определении цитокинов врождённого иммунитета в ротовой жидкости получены интересные данные, отличающиеся от уровней тех же маркёров в сыворотке крови при условии определения одновременно и одними и теми же тест-системами для биологических жидкостей.

При определении уровня дефензина альфа при сравнении методом Неймана в группе 1 и группе 3 в ротовой жидкости получено достоверное различие (* P k-w = 0,048) (таблица 4).

Статистически значимые различия среди исследуемых показателей врождённого иммунитета получены в уровне дефензина бета в ротовой жидкости 438,6 (163,7;1070,729) пг/мл в 3 группе пациентов с пневмонией 1486,6 (391,8;2518,9) пг/мл по сравнению с 1 и 2 группами, P k-w = 0,037 (таблица 4).

Уровни дефензина альфа, бета в ротовой жидкости и в крови статистически не отличались у пациентов первой и второй группы ($p > 0,05$). У пациентов с клиникой пневмонии уровни дефензинов альфа (369,7 (98,9;730,4)) пг/мл и бета 1486,6 (391,8;2518,9) пг/мл на уровне слизистой оболочки статистически выше ($p < 0,05$) аналогичных показателей цитокинов в крови и по сравнению с первой и второй группой пациентов. Наиболее высокие показатели зарегистрированы у пациентов с тяжёлым течением коронавирусной инфекции именно в ротовой жидкости. Соответственно увеличенные исходно уровни дефензинов в ротовой полости свидетельствуют о возможном воспалении и предрасположенности к повышенной чувствительности к вирусной инфекции и возможности прогнозирования тяжёлого течения.

При изучении интерферонового профиля в сыворотке крови получены аналогичные результаты с уровнями дефензинов. Достоверных различий интерферона альфа (IFN α) и гамма (IFN γ) в сыворотке крови не получено, $p > 0,05$ (таблица 5).

При этом получены достоверные различия в содержании интерферона альфа в ротовой жидкости в группе с тяжёлым течением 15,4 (2,4;42,6) пг/мл

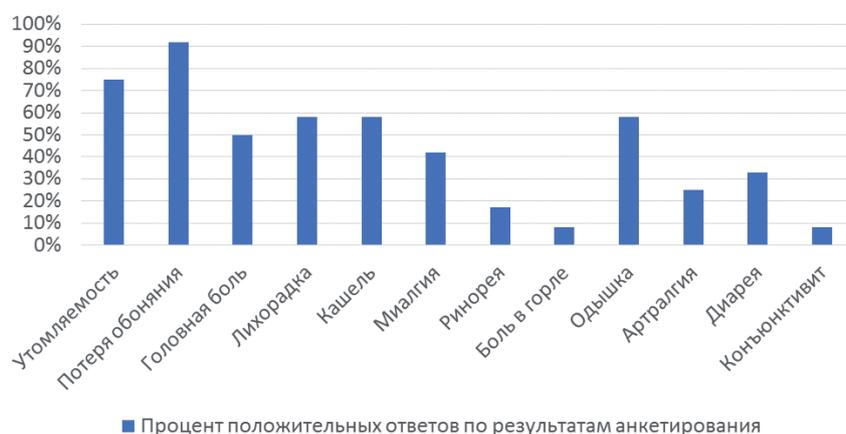


Рис. 2. Распространённость симптомов среди пациентов COVID 19 с рентгенологически подтверждённой пневмонией

по сравнению с группой бессимптомных форм 5,6 (2,7; 17,8) пг/мл, $p=0,032$ (таблица 6).

Уровень интерферона гамма 23 (12,5; 45,4) пг/мл был достоверно выше в группе с бессимптомным течением по сравнению с группой пациентов с

пневмонией 11,4 (9,8; 12,6) пг/мл, $P_{k-w} = 0,038$ (таблица 7). Что вероятно объясняет, что интерферон гамма управляет клеточным иммунным ответом на инфекцию путём активации макрофагов, усиленной презентацией антигена и дифференцировкой

Таблица 2. Уровни дефензина альфа в сыворотке крови у пациентов COVID-19 разных клинических фенотипов

Пациенты	Дефензин альфа в сыворотке крови, пг/мл
Группа 1 (n = 24)	78 (44,8; 197,6)
Группа 2 (n = 22)	105,5 (64,9; 223,4)
Группа 3 (n = 17)	74,3 (43,5; 200,0)

Таблица 3. Уровни дефензина бета в сыворотке крови у пациентов COVID-19 разных клинических фенотипов

Пациенты	Дефензин бета в сыворотке крови, пг/мл
Группа 1 (n = 24)	178 (159,4; 205,231)
Группа 2 (n = 22)	344,1 (191,9; 912,1)
Группа 3 (n = 17)	610,7 (389,6; 1103,7)*

Примечание: * при сравнении методом Неймана в группе 1 и группе 3 в сыворотке крови получено достоверное различие ($P_{k-w} = 0,023$).

Таблица 4. Уровни дефензина альфа в ротовой жидкости у пациентов COVID-19 разных клинических групп

Пациенты	Дефензин альфа в ротовой жидкости, пг/мл	Дефензин бета в ротовой жидкости, пг/мл
Группа 1 (n = 24)	130,9 (99,2; 294,3)	248,8 (82,4; 808,6)
Группа 2 (n = 22)	198 (90,5; 379,6)	438,6 (163,7; 1070,729)***
Группа 3 (n = 17)	369,7 (98,9; 730,4)*	1486,6 (391,8; 2518,9)**

Примечания: * – при сравнении методом Неймана в группе 1 и группе 3 в ротовой жидкости получено достоверное различие ($*P_{k-w} = 0,048$); ** – при сравнении методом Неймана в группе 1 и группе 3 в ротовой жидкости получено достоверное различие ($*P_{k-w} = 0,016$); *** – при сравнении методом Неймана в группе 2 и группе 3 получена в ротовой жидкости получено достоверное различие ($*P_{k-w} = 0,037$).

Таблица 5. Уровни интерферона альфа и гамма в сыворотке крови у пациентов COVID-19 разных клинических фенотипов

Пациенты	Интерферон альфа в сыворотке крови, пг/мл	Интерферон гамма в сыворотке крови, пг/мл
Группа 1 (n = 24)	2,35 (2,3; 2,5)	13,2 (10,6; 33,8)
Группа 2 (n = 22)	2,39 (2,2; 2,7)	11,2 (9,3; 16,0)
Группа 3 (n = 17)	2,15 (1,86; 2,7)	13,4 (10,9; 43,4)

Примечание: * при сравнении методом Неймана в всех группах в сыворотке крови не получено достоверных различий ($P_{k-w} > 0,05$).

Таблица 6. Уровни интерферона альфа в ротовой жидкости у пациентов COVID-19 разных клинических фенотипов

Пациенты	Интерферон альфа в ротовой жидкости, пг/мл
Группа 1 (n = 24)	5,6 (2,7; 17,8)
Группа 2 (n = 22)	3,7 (2,7; 4,4)
Группа 3 (n = 17)	15,4 (2,4; 42,6)*

Примечание: при сравнении методом Неймана в группе 1 и группе 3 в ротовой жидкости получено достоверное различие ($P_{k-w} = 0,032$).

Таблица 7. Уровни интерферона гамма в ротовой жидкости у пациентов COVID-19 разных клинических групп

Пациенты	Интерферон гамма в ротовой жидкости, пг/мл
Группа 1 (n = 24)	23 (12,5; 45,4)*
Группа 2 (n = 22)	11,2 (9,6; 13,3)
Группа 3 (n = 17)	11,4 (9,8; 12,6)

Примечание: при сравнении методом Неймана в группе 1 и группе 3 в ротовой жидкости получено достоверное различие ($P_{k-w} = 0,038$).

Т-клеток, что способствует быстрой элиминации чужеродного антигена из организма. Одновременная активация IFN γ с более высокими уровнями IFN α , особенно у пациентов с лёгкой формой заболевания, является ещё одним отличительным признаком COVID-19. IFN α обеспечивают противовирусную защиту, не вызывая повреждающих провоспалительных реакций.

Следует отметить, что факторы врождённого иммунитета (дефензины альфа и бета, интерферона альфа в ротовой жидкости) были достоверно ниже ($p < 0,05$) у пациентов с бессимптомным течением, чем в группах пациентов с рентгенологически подтверждённой пневмонией. Но вот уровень интерферона гамма статистически выше в ротовой жидкости у пациентов с бессимптомным течением (рис. 3).

В группе с бессимптомной клинической картиной или носительством отмечается достоверно более низкий уровень дефензина альфа и бета (рис. 4).

В рамках исследования клеточных реакций гранулоцитов на антиген Sars-CoV2 было проведено изучение ловушкообразования нейтрофилов при стимуляции антигенами вируса. Реакции проводили у пациентов 3 группы ($n = 7$) с высокими уровнями дефензина бета в сыворотке крови. В свою очередь, материал из каждой пробы был разделен на две группы – цельная вакцина и компонент (гидроксид алюминия). Количество нейтрофильных внеклеточных ловушек определенных в активированных образцах нейтрофилов с антигеном вируса составило: 14,6 % (нижний и верхний квартиль 12,0; 15,6) в группе стимуляции антигеном COVID-19. Коэффициент вариации метода внутри одного определения составил 9,3 %, что превышает средние статистические по-

казатели спонтанного ловушкообразования [16]. При добавлении адъюванта ни в одном образце ловушкообразования не зарегистрировано.

Обсуждение

Настоящее исследование было направлено на изучение сходства и различий в уровне иммуноглобулинов, уровней цитокинов (ИФН альфа, гамма), антимикробных пептидов (дефензина альфа, дефензина бета), изменений при стимуляции нейтрофилов антигенами вируса у пациентов COVID-19 разных клинических фенотипов.

Мы предлагаем концептуальную основу для определения взаимодействия вируса-организм человека с акцентом на врождённую иммунную систему, выделяем важные данные о врождённой системе иммунитета при COVID-19. Мы рассматриваем доказательства того, что вариабельность компонентов врождённой системы иммунитета у людей является основным фактором гетерогенного течения заболевания, наблюдаемого при коронавирусной болезни. Лучшее понимание патофизиологических механизмов, определяющих реакции клеток и медиаторов, участвующих во врождённом иммунитете, является необходимым условием для разработки диагностических маркёров и терапевтических стратегий, нацеленных на COVID-19.

Полученные данные при изучении цитокинов и антимикробных пептидов в сыворотке крови и ротовой жидкости подтверждают важность определения факторов врождённого иммунитета на уровне слизистой оболочки, места первой встречи с чужеродными агентами.

Можно говорить, что наши исследования определили роль интерферона альфа, гамма, дефензина альфа и бета в защите от инфекции

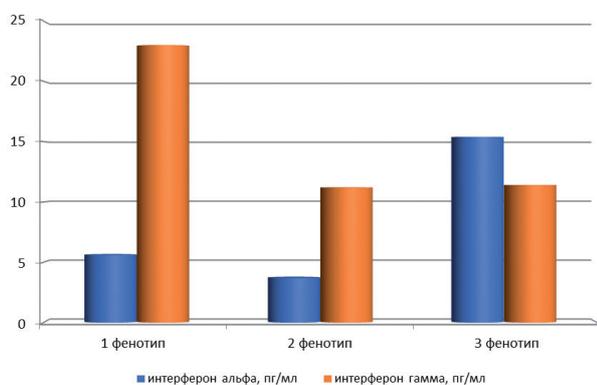


Рис. 3. Уровни интерферона альфа и гамма у 3 клинических фенотипов COVID-19

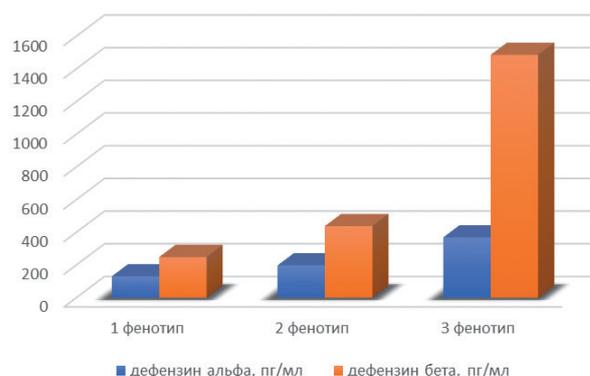


Рис. 4. Уровни дефензина альфа и бета у 3 клинических фенотипов COVID 19

Sars-CoV2 и установили, что показатели врождённого иммунитета вне контакта с инфекцией определяют исход заболевания и могут быть использованы для прогнозирования заболевания. Статистическая обработка полученных результатов показала достоверную разницу в уровне основных маркёров врождённого иммунитета именно на уровне слизистых оболочек.

Полученные нами данные указывают на причинно-следственную связь между фенотипом заболевания и подтверждают важную роль интерферонов в развитии течения Sars-CoV-2. У пациентов 3 группы с тяжёлым течением COVID-19 выявлен достоверно высокий уровень интерферона альфа в ротовой жидкости по сравнению с группой 1 и 2. По данным литературы, аутоантитела к ИФН I типа были зарегистрированы у групп пациентов с тяжёлым течением и необъясним оставался факт синтеза аутоантител в этой группе [17]. А при изучении исходных показателей можно сделать вывод, что исходно высокий уровень является предиктором запуска тяжёлого течения. Опубликованные исследования выявили генетические мутации в локусах TLR3- или TLR7-зависимых путей интерферона-I с синтезом нейтрализующие аутоантитела к интерферону альфа [18]. Исходно высокий уровень, вероятно, снижает чувствительность рецепторов к интерферону и в результате отсутствие противовирусного действия [19]. Проведённый анализ подтвердил нормальные показатели ИФН I типа при лёгкой и средней степени тяжести COVID-19, тогда как у пациентов, перенёсших COVID 19 в тяжёлой форме, уровень был повышен на уровне слизистых оболочек. Основываясь на выявлении большого количества дисфункциональных изменений, можно утверждать, что более высокая тяжесть у пожилых людей вызвана дисрегуляцией, а не нарушением врождённого иммунитета. Динамика интерферонов I типа у тяжёлых пациентов соответствует результатам, полученным в мышинной модели инфекции SARS-CoV-2, которые показывают, что интерфероны I типа не контролируют репликацию SARS-CoV-2 *in vivo*, но повышенный уровень является важными факторами патологических реакций с запуском гиперпродукции и инициации антител против интерферона альфа [20]. Понимание таких иммунных явлений позволит лучше стратифицировать пациентов и адаптировать терапевтические варианты лечения, а, вероятно, и применять данные как скрининг. Напротив, участие интерферона гамма в основном ограничивается поверхностями слизистых обо-

лочек и достоверно высокий уровень в ротовой жидкости в группе пациентов с бессимптомным течением подтверждает факт противовирусной активности интерферона гамма.

Интересным является факт преобладания мужчин с высоким уровнем интерферона альфа в 3 группе (69 %). Данный факт требует дальнейших исследований, прежде всего изучение генетической предрасположенности. Достоверная разница в возрасте между пациентами в группах с легким и тяжёлым течением объяснима с точки зрения функциональных особенностей работы иммунитета разных возрастных групп. Вероятно также влияние сопутствующей патологии ротовой полости, т.к. 55 % пациентов мужского пола отмечали наличие кариозного поражения зубов, а также возрастные изменения цитокинового профиля в целом. Эти результаты дают объяснение преобладанию мужчин среди пациентов с опасным для жизни COVID-19 и увеличению риска с возрастом.

Кроме исследования показателей врождённого иммунитета, крайне важным представляется изучение специфической клеточной реактивности к вирусу Sars-CoV2. Впервые выявили возможность индукции нетоза антигеном Sars CoV2 у пациентов, перенесших тяжелое течение COVID-19. Так как в процессе нетоза выделяется множество ферментов (миелопероксидаза, дефензины, эластаза и др.), вызывающих одновременно повреждение тканей и инактивацию чужеродных агентов (вирусов, бактерий). Это может быть одним из факторов, обуславливающих тяжелое течение COVID-19. Разработанные методики стимуляции нейтрофилов крови антигенами вируса для определения их гиперчувствительности к антигену COVID-19 также продемонстрировало возможность прогностически оценить чувствительность и резистентность к Sars-CoV2. Таким образом, чувствительность клеточных реакций при применении модифицированного теста повреждения нейтрофилов при добавлении антигена Sars-CoV2 составила 88,6 %, а специфичность 91,4 % ($\chi^2 = 8,73$, $p = 0,004$). Разработанная методика может быть применена для оценки ловушкообразования нейтрофилами, индуцированного антигенами вируса Sars-CoV2. Нейтрофилы у пациентов с тяжело-перенесённой COVID-19 инфекцией демонстрировали повышенный уровень антигенповреждения, связанный с активацией и образованием нейтрофильных внеклеточных ловушек. Эти результаты могут объяснить тромботические осложнения и коагулопатию, часто встречающуюся

при тяжёлом течении COVID-19 [21], поскольку образование ловушек может спровоцировать иммунотромбоз, обусловленный активацией тромбоцитов и нейтрофилов [22].

Индукция нетоза является маркером гиперчувствительности нейтрофилов к Sars-CoV2. Разработанная методика стимуляции нейтрофилов крови антигенами вируса для определения клеточных реакций гранулоцитов (нейтрофилов) на антиген COVID-19 может быть применима при стимуляции другими вирусами в зависимости от задач исследования.

Разнообразие клинической картины заболевания, вызванного одним видом микроорганизма, обусловлено разным видом иммунного ответа в ответ на патоген. Прогностические выводы возможны при комплексном изучении как факторов врождённого иммунитета, отвечающих за противовирусный ответ, так и специфической клеточной реактивности, основанной на гиперчувствительности при встрече с вирусом.

Литература

- Черников О.И., Щурок И.Н. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2021; № 3: 105-110.
- Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*. 2021 Feb 18;184(4):861-880. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.007. Epub 2021 Jan 12. PMID: 33497610; PMCID: PMC7803150.
- Lu X. et al. SARS-CoV-2 infection in children – Understanding the immune responses and controlling the pandemic. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2020; 31: 449–453. Режим доступа: <https://doi.org/10.1111/pai.13267>. Дата доступа: 12.09.2021.
- Rello J. et al. Clinical phenotypes of SARS-CoV-2: implications for clinicians and researchers. *Eur. Respir. J.* 2020; 55: 2001028. Режим доступа: <https://doi.org/10.1183/13993003.01028-2020>. Дата доступа: 12.09.2021.
- Lu Y, Sun K, Guo S, et al. Early Warning Indicators of Severe COVID-19: A Single-Center Study of Cases From Shanghai, China. *Front Med (Lausanne)*. 2020 Jul 17;7:432. doi: 10.3389/fmed.2020.00432. PMID: 32766268; PMCID: PMC7379420.
- Gupta A., Madhavan M.V., Sehgal K., et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat. Med.* 2020;26:1017–1032.
- Candido D.S., Claro I.M., de Jesus J.G., et al. Brazil-UK Centre for Arbovirus Discovery, Diagnosis, Genomics and Epidemiology (CADDE) Genomic Network Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. *Science*. 2020;369:1255–1260.
- Oude Munnink B.B., Nieuwenhuijse D.F., Stein M., et al. Dutch-Covid-19 response team Rapid SARS-CoV-2 whole-genome sequencing and analysis for informed public health decision-making in the Netherlands. *Nat. Med.* 2020;26:1405–1410.
- Schultze JL, Aschenbrenner AC. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell*. 2021 Apr 1;184(7):1671-1692. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.029. Epub 2021 Feb 16. PMID: 33743212; PMCID: PMC7885626.
- Xu C., Wang A., Marin M., et al. Human Defensins Inhibit SARS-CoV-2 Infection by Blocking Viral Entry. *Viruses* 2021; 13(7): 1246. <https://doi.org/10.3390/v13071246>.

Заключение

Подводя итог, можно констатировать, что развитие течения заболевания и степень тяжести по-разному запрограммированы врождёнными иммунными клетками системы иммунитета при лёгком и тяжёлом течении заболевания, что также сопровождается аналогичными различиями в адаптивном иммунном ответе на Sars-CoV2. После начальной встречи вируса и местного врождённого иммунного ответа развивается системный иммунный ответ, который и определяет исход заболевания. Определена взаимосвязь показателей системы иммунитета для разных клинических фенотипов COVID-19 с исследованием иммунологических механизмов различного клинического течения заболевания.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ, договор № М21КО-ВИД-019. № госрегистрации 20211161.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

- Walker F.C., Sridhar P.R., Baldrige M.T. Differential roles of interferons in innate responses to mucosal viral infections. *Trends in Immunology*. 2021; Vol. 42, Iss. 11: P1009-1023. DOI: 10.1016/j.it.2021.09.003.
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052. Epub 2020 Mar 5. PMID: 32142651; PMCID: PMC7102627.
- Heuberger J., Trimpert J., Vladimirova D., et al. Epithelial response to IFN- γ promotes SARS-CoV-2 infection. *EMBO Mol Med*. 2021;13:e13191. <https://doi.org/10.15252/emmm.202013191>.
- Novel Coronavirus 2019 (COVID-19) NSW Case Questionnaire. Last updated: 23 March 2020. Access mode: <https://fill.io/Novel-Coronavirus-2019-COVID-19-NSW-Case-Questionnaire>. Date mode: 30.09.2021.
- Щурок И.Н. Основные фенотипы и биомаркеры бронхиальной астмы. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2020; 2:50-57. DOI: 10.14427/jipai.2020.2.50.
- Генералов С.И., Ищенко О.В., Коневалова Н.Ю. и др. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2020; 3:21-29. DOI: 10.14427/jipai.2020.3.21.
- Zhang Q, Bastard P, Liu Z, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020 Oct 23;370(6515):eabd4570. doi: 10.1126/science.abd4570. Epub 2020 Sep 24. PMID: 32972995; PMCID: PMC7857407.
- Bastard P, Gervais A, Le Voyer T, et al. Autoantibodies neutralizing type I IFNs are present in ~4% of uninfected individuals over 70 years old and account for ~20% of COVID-19 deaths. *Sci Immunol*. 2021 Aug 19;6(62):eabl4340. doi: 10.1126/sciimmunol.abl4340. PMID: 34413139; PMCID: PMC8521484.
- Smith N, Possémé C, Bondet V, et al. Defective activation and regulation of type I interferon immunity is associated with increasing COVID-19 severity. *Nat Commun*. 2022 Nov 25;13(1):7254. doi: 10.1038/s41467-022-34895-1. PMID: 36434007; PMCID: PMC9700809.

20. Israelow B., Song E., Mao T., et al. Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. *J Exp Med*; 217(12)2020; 12: 07.

21. Middleton EA, He XY, Denorme F, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood*. 2020 Sep 3;136(10):1169-1179. doi: 10.1182/

blood.2020007008. PMID: 32597954; PMCID: PMC7472714.

22. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, Arbous MS, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res*. 2020 Jul;191:145-147. doi: 10.1016/j.thromres.2020.04.013. Epub 2020 Apr 10. PMID: 32291094; PMCID: PMC7146714.

Сведения об авторах

Щурок Ирина Николаевна – к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета. 210009 Витебск, пр. Фрунзе, 27. E-mail: shchurok.irina@mail.ru.

Ищенко Оксана Владимировна – д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета. E-mail: oksana_is200272@mail.ru.

Семёнова Ирина Валентиновна – к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета. E-mail: semenovairyn@gmail.com.

Генералов Сергей Игоревич – ассистент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета. E-mail: sig752@mail.ru.

Черноков Олег Игоревич – врач-интерн Витебской городской клинической больницы скорой медицинской помощи. E-mail: chernokov97@gmail.com.

Поступила 13.12.2022 г.