

## Показатели иммунной системы у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19

Г.А.Кальгина<sup>1</sup>, Л.В.Курлаева<sup>1</sup>, К.Б. Степанова<sup>1,2</sup>, Т.Ф.Степанова<sup>1</sup>,  
С.А. Григорьева<sup>1</sup>, Ц.А. Панина<sup>1</sup>, О.Н.Сидоренко<sup>1</sup>, О.Н. Сияуткина<sup>2</sup>, Е.Н. Семенюк<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное бюджетное учреждение науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,  
г. Тюмень

<sup>2</sup>ГБУЗ ТО «Областная клиническая инфекционная больница», г. Тюмень

**Аннотация.** Проанализированы результаты основных иммунологических показателей у 39 больных с новой коронавирусной инфекцией **Covid-19**. Показаны изменения врожденного и приобретенного (адаптивного) иммунитета у пациентов с этим заболеванием.

**Ключевые слова:** врожденный иммунитет, ИЛ-8,миелопероксидаза, Т-цитотоксические клетки, В-лимфоциты,НК.

### Введение

Для развития инфекционного заболевания **необходим контакт организма** с определённым количеством возбудителя. Количество возбудителей ниже порогового значения не приводит к развитию инфекционного процесса из-за противодействия им факторов **врождённого** иммунитета. При участии макрофагов, других антигенпредставляющих клеток, Т-хелперов, клеток иммунологической памяти, Т-киллеров и антител **формируется приобретённый иммунитет** [4]. По мнению [2], вирусные инфекции, включая SARS-CoV-2, изменяют иммунные реакции инфицированного человека, нарушая ранее существовавший естественный или искусственный (прививочный) иммунитет. Сложный патогенез **COVID-19** включает потерю регуляторного контроля продукции провоспалительных цитокинов, как на локальном, так и на системном уровнях [1]. Некоторые данные показывают, что во время эпидемии коронавирусной инфекции COVID-19 серьезное ухудшение у некоторых пациентов было тесно связано с нарушением регуляции и избыточным выделением цитокинов. Воспаление, сопровождающееся образованием провоспалительных цитокинов, способствует ограничению распространения

локальной инфекции [4]. При развитии синдрома системной воспалительной реакции (SIRS) избыточное образование провоспалительных цитокинов и тромбообразование способны привести к гибели макроорганизма.

**Целью** нашего исследования явилось изучение реакции компонентов иммунной системы человека в ответ на вирусный патоген SARS-CoV-2.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.**

Проанализированы результаты основных иммунологических показателей у 39 больных с новой коронавирусной инфекцией (КВИ) в возрасте от 18 до 72 лет, находящихся на лечении в областной инфекционной клинической больнице г. Тюмени. Показатели представлены на начало этиотропного лечения. На момент обследования у всех пациентов была средняя степень тяжести течения заболевания. Диагноз новой коронавирусной инфекции COVID-19 подтвержден исследованием биоматериала методом ПЦР на выявление РНК SARS CoV-2. Контрольную группу составили здоровые люди г. Тюмени.

Иммунный статус исследовали с использованием современных методов, включающих количественное и функциональное состояние иммунитета. Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитометре (FC-500) с помощью моноклональных антител Beckman Coulter к маркерам: CD3 +, CD4 +, CD8 +, CD19+, NK+ и HLA-DR+[5].

Фагоцитарная активность нейтрофилов (ФАН) определялась по способности клеток поглощать частицы латекса с  $d=10\mu\text{м}$  (ООО «ДИАЭМ», Москва).

Уровень миелопероксидазы нейтрофилов (МП) выявляли спектрофотометрическим методом: лизат клеток при добавлении ортофенилендиамина и перекиси водорода дает цветную реакцию, фотометрия которой позволяет оценить «респираторный взрыв» фагоцитов. Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) определяли путем осаждения их полиэтиленгликолем (ПЭГ) с молекулярной массой 6000. Концентрацию цитокинов IL-4, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , а также иммуноглобулинов IgG, IgA и IgM определяли иммуноферментным методом (ИФА) на тест-системах фирмы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Результаты оценивали на иммуноферментном анализаторе «Multiscan». Также у пациентов проводился общий анализ крови с лейкоцитарной формулой.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Изучение показателей **общего анализа крови** у людей с коронавирусной инфекцией (КВИ) выявило свои особенности. Так, общее количество лейкоцитов у них достоверно снижено на 20% и составляет  $4781 \pm 267$  кл/мкл против  $5933 \pm 138$  кл/мкл у здоровых людей (З.Л.). Абсолютное содержание лимфоцитов у людей с КВИ также уменьшено до  $1481 \pm 101$  кл/мкл против  $2018 \pm 57$  кл/мкл у З.Л. (соответственно;  $p < 0.001$ ). Такая же зависимость наблюдается и относительно нейтрофилов: их абсолютное число достоверно ниже, чем в группе контроля. Таким образом, у людей с КВИ обнаружена недостаточность лейкоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов. Что касается моноцитов, то их абсолютное количество снижено у людей с вирусной инфекцией недостоверно (на 12%). Это можно расценить как умеренную недостаточность моноцитов. Абсолютное содержание эозинофилов в исследуемой группе также значительно уменьшено (на 29%), но разница статистически недостоверна. Относительное количество (%) указанных выше клеток достоверно не отличается от контрольных цифр. Необходимо отметить, что указанные изменения клеток не выходят за пределы общепринятых лабораторных норм.

**Фагоцитарная активность нейтрофилов. IL-8.** На фоне значительно сниженного абсолютного количества нейтрофилов у вирусных пациентов поглотительная способность (ФАН,%) достоверно увеличена и составляет  $82,0 \pm 1,7$  против  $72,5 \pm 1,7$  у З.Л. Также отмечается существенный рост бактерицидного фермента нейтрофилов миелопероксидазы до  $353,0 \pm 20,0$  у.е. в сравнении с контрольной группой ( $218,0 \pm 14,2$  у.е.;  $p < 0,001$ ). Это свидетельствует об увеличении кислородзависимой функции нейтрофилов, выполняющих в организме фагоцитарные функции. Наблюдается активация нейтрофилов у вирусных больных с усилением их функциональной активности. Это также подтверждает высокий уровень IL -8, почти в 20 раз превышающий нормальное значение ( $38,1 \pm 10,3$  пг/мл и  $2,0 \pm 0,2$  пг/мл у З.Л.). Таким образом, просматривается активация всех исследуемых компонентов врожденного иммунитета.

**Т-система иммунитета.** Процент общего содержания Т-лимфоцитов у пациентов с COVID-19 достоверно увеличен. Однако в пересчете на абсолютное число количество этих клеток достоверно уменьшено и составляет  $1162,4 \pm 83,9$  кл/мкл в сравнении со З.Л. ( $1486,9 \pm 45,1$  кл/мкл). Процент снижения составил 22,0. Умеренная недостаточность Т-лимфоцитов. Абсолютное количество Т-хелперов у людей исследуемой группы также снижено на 21% и составляет  $695,9 \pm 55,5$  кл/мкл против  $876,8 \pm 31,1$  кл/мкл в контрольной группе. Умеренная недостаточность Т-

хелперов. Абсолютное количество Т-цитотоксических клеток у пациентов с COVID-19 снижено в большей степени – на 25% ( $423,0 \pm 33,5$  кл/мкл и  $563,9 \pm 28,5$  кл/мкл у З.Л. соответственно). Недостаточность Т-цитотоксических клеток. Соотношение Тх/Тц не изменено и соответствует норме. Достоверно возрастает в исследуемой группе только процент Т-активных клеток ( $10,1 \pm 0,9$  против  $8,1 \pm 0,5$  у З.Л.). Это свидетельствует о наличии очага антигенного раздражения в организме вирусных пациентов. Абсолютное значение их достоверно не отличается от контроля. В целом наблюдается ослабление функции Т-системы иммунитета.

**Натуральные киллеры (NK).** Содержание NK у людей с COVID-19 достоверно снижено как в процентном, так и в абсолютном значении ( $154,5 \pm 13,5$  кл/мкл против  $296,5 \pm 21,1$  кл/мкл у З.Л.). Количество NK уменьшено почти в 2 раза. Наблюдается выраженная недостаточность NK. Т-цитотоксические клетки и NK – основные клетки эффекторного звена клеточного иммунитета [6]. Достоверное снижение Т-ц клеток и NK у обследованных пациентов, по всей вероятности, связано с их активным участием в реализации цитотоксических функций. Активированные NK вырабатывают IFN- $\gamma$ , влияющий на функцию макрофагов. Основной активатор NK – IL-2, который синтезируют активированные Th1 типа. В случае с вирусной инфекцией COVID-19 мы выявили достоверно низкое содержание Т-h у обследованных пациентов. Можно предположить, что синтез IL-2 также будет уменьшен. При низкой концентрации IL-2 функциональная активность NK снизится, что несомненно отразится на снижении эффективности течения иммунного ответа у вирусных пациентов.

У людей исследуемой группы проведена оценка натуральных киллеров на Т-лимфоцитах (TNK). Процент этих клеток у вирусных пациентов не отличается от такового у З.Л. Абсолютное количество TNK снижено на 21% и составляет  $59,5 \pm 11,6$  кл/мл против  $75,3 \pm 9,5$  пг/мл у здоровых людей ( $p > 0,05$ ). Натуральные киллеры на Т-лимфоцитах у людей с COVID-19 также снижаются, хотя и в меньшей степени, чем NK.

**Цитокины.** Уровень IL -8 у людей с COVID-19 почти в 20 раз превышает нормальное значение и составляет  $38,1 \pm 10,3$  пг/мл против  $2,0 \pm 0,2$  пг/мл у здоровых людей. Это свидетельствует об активации макрофагов, в том числе и в отношении нейтрофилов. Хемокины, к группе которых относится IL -8, необходимы для привлечения лейкоцитов в места проникновения инфекции. IL-8 вызывает синтез молекул адгезии на нейтрофильных гранулоцитах и других клетках. Ответные механизмы врожденного иммунитета при COVID-19, вероятно,

обусловлены продукцией IL-8 эпителиоцитами легких и альвеолярными макрофагами, способствуют притоку в очаг воспаления нейтрофилов и Т-лимфоцитов. Именно с нейтрофилами, а конкретно, с их способностью образовывать внеклеточные ловушки (NET-neutrophil extracellular traps) связывают массивное повреждение тканей и высокую смертность при COVID-19 [8,9]. Не исключается роль IL-17 в рекрутировании нейтрофилов и моноцитов при респираторных вирусных инфекциях [10], подтверждаемая регистрацией у больных COVID-19 с тяжелой формой заболевания резкого увеличения клеток Th17, секретирующих IL-17 [10, 11]. Все эти механизмы организма направлены на формирование воспалительной среды для уничтожения SARS-CoV2, но чрезмерный характер ответной реакции обуславливает и ряд необратимых поражений тканей.

На низкую концентрацию IFN- $\gamma$  в группе больных с коронавирусной инфекцией указывает [3]:  $0,6 \pm 0,26$  пг/мл против  $2,0 \pm 0,2$  пг/мл ( $p < 0,001$ ) у здоровых лиц. Уровень этого провоспалительного цитокина в 3,3 раза ниже контрольных цифр. Возможно, вирус блокирует или снижает продукцию интерферонов (IFN) на этапе неконтролируемой вирусной репликации [2]. Увеличение числа пациентов в исследуемой группе до 39 выявило концентрацию IFN - $\gamma$  у вирусных пациентов, близкую к значению здоровых людей:  $1,8 \pm 0,6$  пг/мл и  $2,0 \pm 0,1$  пг/мл (соответственно). Содержание IFN- $\gamma$  уменьшено лишь на 11,0% ( $p > 0,05$ ). Это свидетельствует о сохранении функциональной активности Th1 типа и NK у людей с COVID-19.

Концентрация противовоспалительного цитокина IL-4 у людей в исследуемой группе увеличена в 2 раза ( $p > 0,05$ ). Вероятно, в иммунный ответ включаются и Т-хелперы 2 типа, опосредующие гуморальный иммунитет с выработкой иммуноглобулинов различных классов.

Уровень IL-10 у людей с COVID-19 уменьшен и не достигает нормального значения ( $3,4 \pm 0,7$  пг/мл и  $5,0 \pm 0,2$  пг/мл соответственно). Ученые [12], изучающие IL-10 у людей, инфицированных вирусом гриппа А, установили, что его отсутствие во время первичной инфекции приводит к усилению локальной выработки антител, специфичных к вирусу. Таким образом повышается защита от этой инфекции. В то же время вирус гриппа А подрывает антивирусную защиту хозяина, опосредованную IFN- $\gamma$ , посредством воздействия на внутриклеточные сигнальные пути [13]. Не исключено, что механизм действия

РНК-вируса SARS-CoV-2 у инфицированных людей в отношении ИЛ-10 частично может быть аналогичным механизму действия вируса гриппа А.

Т.О., выявлены разнонаправленные изменения концентрации исследуемых цитокинов при COVID-19. Концентрация IFN -  $\gamma$  у инфицированных людей почти достигает нормального значения. Однако, для эффективного иммунного ответа необходимо более высокое его содержание. Возможно снижение числа активированных Th и NK **негативно влияет на синтез необходимого количества IFN - $\gamma$  в условиях вирусной нагрузки.**

**В-система иммунитета.** Абсолютное количество В-лимфоцитов у пациентов с COVID-19 достоверно снижено и составляет  $158,1 \pm 17,6$  кл/мкл против  $228,5 \pm 15,1$  кл/мкл у З.Л. Процент снижения составил 31. Недостаточность В-лимфоцитов. Уровень IgA и IgM достоверно увеличен в сравнении со З.Л.: IgA -  $3,3 \pm 0,2$  ме/мл и  $1,4 \pm 0,1$  ме/мл (соответственно); IgM-  $1,9 \pm 0,1$  ме/мл и  $1,3 \pm 0,2$  ме/мл (соответственно). Концентрация IgG также повышена, но в меньшей степени:  $12,6 \pm 1,0$  ме/мл и  $10,6 \pm 1,2$  ме/мл (соответственно;  $p > 0,05$ ). Наблюдается напряжение В-звена иммунной системы. Уровень циркулирующих иммунных комплексов у людей с COVID-19 не отличается от значения этого показателя у здоровых людей.

Основными факторами иммунного ответа, действующими в очаге воспаления, являются Тхелперы, Т-киллеры и антитела [7]. **В зависимости от презентуемых антигенов Т-хелперы формируют определённый тип иммунного ответа: клеточный или гуморальный.** При формировании иммунного ответа одного типа подавляется иммунный ответ другого типа. Так при формировании клеточного иммунного ответа с активацией Т-хелперами Т-киллеров подавляется гуморальный иммунный ответ. При формировании гуморального иммунного ответа с активацией Т-хелперами В-клеток, образующих антитела, подавляется клеточный иммунный ответ. **При вирусных заболеваниях** формируется преимущественно клеточный иммунный ответ с активацией Т-хелперами Т-киллеров, имеющих тканеспецифичные рецепторы к изменённым вирусными антигенами собственных клеток [4]. В меньшей степени при вирусных заболеваниях формируется гуморальный иммунный ответ с активацией Т-хелперами В-клеток, образующих антитела к антигенам самих вирусов. По этой причине не у всех переболевших коронавирусной инфекцией определяются антитела к коронавирусу. Гуморальный иммунный ответ, связанный с продукцией

вируснейтрализующих антител обеспечивает защиту от инфекции в дальнейшем [2].

### **Заключение**

Таким образом, анализ данных иммунологических показателей пациентов с новой коронавирусной инфекцией **COVID-19** показал их **разнонаправленные изменения**. Обнаружена недостаточность лейкоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов. Наблюдается активация всех исследуемых компонентов врожденного иммунитета: увеличена поглотительная способность и ферментативная активность нейтрофилов. Значительно повышен уровень хемокина IL-8. Т-система иммунитета ослаблена, что проявляется снижением общего количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток. Соотношение Тх/Тц не нарушено и соответствует нормальному значению. Обращает на себя внимание выраженная недостаточность **НК**. Напряженное функционирование В-звена иммунитета характеризуется недостаточностью В-лимфоцитов и достоверно высокой концентрацией IgA и IgM.

### **Список литературы**

1. Алешина Н. И., Понежева Ж. Б., Лазарева Е. Н., Астрина О. С., Малеев В. В., Плоскирева А. А. 2020. Цитокины - место и значение в патогенезе ОРВИ и COVID-19. COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. <https://doi.org/10.21055/preprints-3111772>
2. Бугоркова С. А. 2020. Некоторые аспекты формирования иммунного ответа у пациентов с COVID-19. COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. <https://doi.org/10.21055/preprints-3111717>
3. Курлаева Л. В., Степанова К. Б., Степанова Т. Ф., Кальгина Г. А., Григорьева С. А., Панина Ц. А., Сидоренко О. Н., Сяюткина О. Н., Семенюк Е. Н. 2020. Предварительные итоги изучения основных показателей иммунной системы у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19. COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. <https://doi.org/10.21055/preprints-3111792>
4. Печерский А.В. 2020. Особенности патогенеза и лечения новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV). COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. <https://doi.org/10.21055/preprints-3111746>.
5. Стандартизация аналитических технологий лабораторной медицины. Выпуск 2. Под ред. В.В. Меньшикова.- М.: Медицина.-2013.-С.8-39.

6. Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы / И.С. Фрейдлин, А.А. Тотолян // СПб.-2001.- Т.3,4.- С.108-112.

7. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Иммунология воспаления / В.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев // ж/л «Медицинская иммунология».- 2001.-Т.3.-С. 361-368.

8. Barnes B.J., Adrover J.M., Baxter-Stoltzfus A., Borczuk A., Cools-Lartigue J., Crawford J.M., Daßler-Plenker J., Guerci P., Huynh C., Knight J.S., Loda M., Looney M.R., McAllister F., Rayes R., Renaud S., Rousseau S., Salvatore S., Schwartz R.E., Spicer J.D., Yost C.C., Weber A., Zuo Yu., Egeblad M. Targeting potential drivers of COVID-19: neutrophil extracellular traps, *J. Exp. Med.* 2020; 217 (6): e20200652. DOI: 10.1084/jem.20200652.

9. Nathan C. Neutrophils and COVID-19: Nots, NETs, and knots. *J Exp Med.* 2020; Sep 7; 217(9): e20201439. doi: 10.1084/jem.20201439.

10. Casillo G.M., Mansour A.A., Raucci F., Saviano A., Mascolo N., Iqbal A. J., Maione F. Could IL-17 represent a new therapeutic target for the treatment and/or management of COVID-19- related respiratory syndrome? *Pharmacol. Res.* (2020) 104791. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104791>.

11. Yazdanpanah F., Hamblin M.R., Rezaei N. The immune system and COVID-19: Friend or foe? *Life Sciences.* 2020; 256 (1): 117900. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117900>.

12. A detrimental effect of interleukin-10 on protective pulmonary humoral immunity during primary influenza A virus infection. Sun K, Torres L, Metzger DW. *J Virol.* 2010 May; 84(10):5007-14. doi: 10.1128/JVI.02408-09.

13. Influenza A virus abrogates IFN-gamma response in respiratory epithelial cells by disruption of the Jak/Stat pathway. Uetani K, Hiroi M, Meguro T, Ogawa H, Kamisako T, Ohmori Y, Erzurum SC. *Eur J Immunol.* 2008 Jun; 38(6):1559-73. doi: 10.1002/eji.200737045.