

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Ащина Л.А.¹, Баранова Н.И.¹, Лесина О. Н.¹, Болгова А.И.^{1,2}

ПОКАЗАТЕЛИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ COVID-19

¹Пензенский институт усовершенствования врачей - филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ, 440060, Пенза, Россия;

²ГБУЗ «Пензенский областной клинический центр специализированных видов медицинской помощи», 440052, Пенза, Россия

Вирусная инфекция COVID-19 оказалась серьезным вызовом для общественного здравоохранения. Показано, что важное значение в патогенезе данного заболевания имеют нейтрофилы, которые способны не только уничтожать патогены, но и регулировать иммунный ответ и воспаление, в том числе при вирусной инфекции. Целью исследования явилось изучение функциональной активности нейтрофилов у больных COVID-19 в зависимости от степени тяжести. Проведено обследование 85 пациентов с COVID-19, которые были разделены по степени тяжести на три группы: с легкой, со средней и с тяжелой и крайне тяжелой степенями тяжести. Контрольную группу составили 30 здоровых доноров. Хемилюминесцентным анализом определены показатели функциональной активности нейтрофилов. У больных COVID-19 с легкой степенью тяжести было выявлено снижение спонтанной и стимулированной продукции АФК нейтрофилами и времени выхода на максимум свечения, что свидетельствует о снижении функциональной активности клеток. В группе пациентов со средней степенью тяжести было показано снижение спонтанной продукции нейтрофилов, но более высокий показатель коэффициента активации по сравнению со здоровыми людьми. Больные с тяжелым и крайне тяжелым течением характеризовались пониженной спонтанной и стимулированной продукцией АФК нейтрофилами, временем выхода на максимум свечения, но повышенным коэффициентом активации, что свидетельствует о снижении функциональной активности нейтрофилов, но повышенной активации клеток в ответ на стимуляцию. Сравнительный анализ показателей 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. Корреляционный анализ выявил прямую зависимость коэффициента активации нейтрофилов от степени тяжести COVID-19, что позволит использовать данный показатель в качестве одного из предикторов тяжести заболевания.

Ключевые слова: COVID-19; тяжесть заболевания; нейтрофилы; хемилюминесцентный анализ.

Для цитирования: Ащина Л.А., Баранова Н.И., Лесина О.Н., Болгова А.И. Показатели хемилюминесцентного анализа нейтрофилов у больных COVID-19. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (6): 349-355 DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-6-349-355>.

Для корреспонденции: Ащина Людмила Андреевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаборатории; e-mail: pushino2008@yandex.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке государственного задания «Разработка персонализированных алгоритмов прогнозирования тяжелых форм COVID-19 на основе иммуногенетических биомаркеров с целью оптимизации патогенетической терапии и улучшения исходов заболевания» № 123021300244-8 от 13.02.2023 г.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.04.2023

Принята к печати 17.04.2023

Опубликовано 05.06.2023

Aschina L.A.¹, Baranova N.I.¹, Lesina O.N.¹, Bolgova A.I.^{1,2}

CHEMILUMINESCENT ANALYSIS OF NEUTROPHILS IN COVID-19 PATIENTS

¹Penza 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, 440060, Penza, Russia;

²State Budget Health Care Institution "Penza Regional Clinical Center of Specialized Types of Medical Care", 440052, Penza, Russia

COVID-19 viral infection has proven to be a major public health challenge. Neutrophils have been shown to be important in the pathogenesis of this disease, being capable not only of destroying pathogens, but also of regulating the immune response and inflammation, including viral infection. The aim of the study was to investigate the functional activity of neutrophils in COVID-19 patients depending on the severity degree. We examined 85 patients with COVID-19 which were divided into three groups depending on severity degree: mild, moderate, and severe and extremely severe. The control group consisted of 30 healthy donors. By chemiluminescence analysis we determined indices of neutrophil functional activity. In COVID-19 patients with mild degrees of severity we detected a decrease in spontaneous and stimulated production of ROS by neutrophils and in time to reach the maximum luminescence, which indicated the reduced functional activity of cells. The group of patients with moderate severity

showed a decrease in spontaneous production of neutrophils, but a higher activation factor compared to healthy individuals. Patients with severe and extremely severe disease were characterized by decreased spontaneous and stimulated production of ROS by neutrophils, time to maximum luminescence, but an increased activation factor, which indicates a decrease in the functional activity of neutrophils, but increased activation of cells in response to stimulation. A comparative analysis of indicators of neutrophil activity depending on the severity of the disease showed that the highest values of spontaneous and stimulated production of ROS by neutrophils were obtained in patients with a moderate degree of severity. Correlation analysis revealed a direct dependence of neutrophil activation factor on COVID-19 severity, which will allow to use this index as one of the predictors of disease severity.

Key words: COVID-19; disease severity; neutrophils; chemiluminescent analysis.

For citation: Aschina L.A., Baranova N.I., Lesina O.N., Bolgova A.I. Chemiluminescent analysis of neutrophils in COVID-19 patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (6): 349-355 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-6-349-355>

For correspondence: Aschina Lyudmila Andreevna, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of the Central Research Laboratory; e-mail: pushino2008@yandex.ru

Information about authors:

Aschina L.A., <https://orcid.org/0000-0002-4445-5619>;
Baranova N.I., <https://orcid.org/0000-0002-5930-846X>;
Lesina O.N., <https://orcid.org/0000-0003-0434-1972>;
Bolgova A.I., <https://orcid.org/0000-0003-4129-2815>.

Acknowledgment. The study was supported financially by the state task "Development of personalized algorithms for prognosis of severe forms of COVID-19 based on immunogenetic biomarkers to optimize pathogenetic therapy and improve disease outcomes" № 123021300244-8 dated February 13, 2023.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interests.

Received 10.04.2023

Accepted 17.04.2023

Published 05.06.2023

Введение. Коронавирусная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2, в 2020 году была официально объявлена пандемией. Показано, что данный вирус способен вызывать заболевания, варьирующие от обычной простуды до тяжелой пневмонии, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) и септического шока [1 - 3]. Несмотря на усилия по улучшению методов диагностики, вакцинации и лечению пациентов с COVID-19, до сих пор остаются пробелы в вопросе патогенеза данного заболевания, связанного с врожденным иммунитетом [4, 5]. Как следует из данных литературы, немаловажное значение в патогенезе COVID-19 имеют клеточные компоненты иммунной системы. Особое внимание уделяется нейтрофилам. Данные клетки способны не только уничтожать патогены, но и регулировать иммунный ответ и воспаление, в том числе и при вирусной инфекции [6, 7]. Кроме того, показано их влияние на адаптивный иммунный ответ путем презентации антигена и супрессорной модуляции ответа Т-клеток [8]. Реализация функций нейтрофилов при инфекционных заболеваниях происходит за счет фагоцитоза, образования активных форм кислорода (АФК), формирования нейтрофильных ловушек, а также способности синтезировать и секретировать цитокины, дефенсины и интерфероны [9, 10]. Исследования последних лет показали, что, с одной стороны, нейтрофилы способны осуществлять противовирусную защиту, с другой стороны - многие вирусы способны негативно влиять на функции нейтрофилов, за счет изменения их фенотипа [11]. Присутствие в периферической крови достаточного количества нейтрофилов и их наличие практически во всех органах обуславливает вероятность для этих клеток одними из первых взаимодействовать с вирусами [12]. При этом тяжесть течения

пневмонии и исход заболевания зависят не только от возбудителя, но и от состояния иммунной системы человека. Общий уровень нейтрофилов служит маркером острого инфекционного процесса [13]. Так, вскрытие пациентов, погибших от COVID-19, выявило выраженную инфильтрацию нейтрофилов в легочных капиллярах, их выход в альвеолярное пространство, острое воспаление капилляров с отложением фибрина, а также нейтрофильный мукозит [14]. Данные клетки имеют высокую реактивность и способны быстро функционально перестраиваться в ответ на сигналы об изменении условий внутренней среды, тем самым определяя процесс развития воспаления [15]. Вместе с тем, показатели продукции АФК у больных с COVID-19 остаются недостаточно изученными. Поэтому одним из перспективных направлений является изучение влияния активности основных ферментативных реакций на интенсивность «респираторного взрыва» нейтрофилов. Исследование особенностей хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных COVID-19 позволит в дальнейшем охарактеризовать механизмы воспалительного процесса, его регуляцию и разработать методы прогноза характера течения и исхода заболевания.

Целью настоящего исследования явилось изучение функциональной активности нейтрофилов у больных COVID-19 в зависимости от степени тяжести.

Материал и методы. Проанализированы результаты хемилюминесцентного анализа у 85 больных с COVID-19 в возрасте от 19 до 65 лет, находящихся на лечении в ГБУЗ «Пензенский областной клинический центр специализированных видов медицинской помощи». Средний возраст больных составил 42±21 года. Диагноз устанавливался на основании выявления РНК SARS-CoV-2 в мазках из носа и зева мето-

дом ПЦР. В контрольную группу вошли практически здоровые люди ($n=30$) аналогичного возрастного диапазона. Диагностический алгоритм обследования пациента амбулаторного центра диагностики и лечения новой коронавирусной инфекции COVID-19 включал: сбор анамнеза, физикальное обследование, методы общей лабораторной диагностики (общий (клинический) анализ крови, биохимический анализ крови, этиологическая лабораторная диагностика, пульсоксиметрия, КТ легких). Больные COVID-19 были разделены на 3 группы в зависимости от степени тяжести согласно действующим рекомендациям «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), версия № 9 от 26.10.2020 г., версия № 10 от 08.02.2021 г., версия № 11 от 07.05.2021 г. В 1-ю группу вошли пациенты с COVID-19 ($n=32$), которые характеризовались легким течением заболевания (КТ 1). Во 2-ю группу больных COVID-19 ($n=30$) вошли пациенты, которые характеризовались среднетяжелым течением. Изменения при КТ (рентгенографии), типичные для вирусного поражения (объем поражения минимальный или средний; КТ 1-2). В 3-ю группу вошли пациенты с COVID-19 ($n=23$) с тяжелым и крайне тяжелым течением. Тяжелое течение характеризовалось следующими признаками: изменения в легких при КТ, типичные для вирусного поражения (объем поражения значительный или субтотальный; КТ 3-4). При крайне тяжелом течении наблюдалась стойкая фебрильная лихорадка, ОРДС, острая дыхательная недостаточность (ОДН) с необходимостью респираторной поддержки (инвазивная вентиляция легких), септический шок, полиорганная недостаточность, изменения в легких (КТ 4).

Было проведено клиническое, открытое, проспективное, рандомизированное исследование. Критериями включения больных в исследование явились: диагноз COVID-19, возраст от 19 до 65 лет, информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения были: ОРВИ, вызванные другими респираторными вирусами, возраст пациентов до 18 лет, отказ пациента от участия в исследовании.

Изучение функциональной активности нейтрофилов у пациентов было проведено в Центральной научно-исследовательской лаборатории Пензенского института усовершенствования врачей – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России в период с января по сентябрь 2021 года. От всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на проводимые исследования.

Взятие крови для исследования у пациентов осуществляли утром, натощак, из кубитальной вены в объеме 5 мл в вакутейнеры с Li-гепарином. Функциональную активность нейтрофилов изучали с помощью хемилюминесцентного анализа по методике, предложенной И.В. Образцовым [16], которая заключается в последовательной стимуляции нейтрофилов двумя стимулами: форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) и N-формилметионил-лейцилфенилаланином (фМЛФ) с последующей регистрацией результатов хемилюминесценции (ХЛ) на аппарате Lum-1200 (ДИСофт, Россия) с программным обе-

спечением PowerGraph 3.0. Объектом исследования являлась цельная кровь, без выделения фагоцитов. В качестве активатора ХЛ использовали люминол (Sigma-Aldrich, США). ФМА (Sigma-Aldrich, США), используемый в качестве стимула, выполнял роль праймера, а фМЛФ (Sigma-Aldrich, США) являлся основным стимулом для люминол-зависимого хемилюминесцентного анализа.

В исследовании были определены следующие показатели: светосумма спонтанной и ФМА+фМЛФ-стимулированной продукции нейтрофилов (Спонт., Стим.), максимальная интенсивность свечения нейтрофилов (I_{max}), коэффициент активации (K_a), равный отношению показателя светосуммы ФМА+фМЛФ-стимулированных нейтрофилов к показателю светосуммы спонтанной продукции нейтрофилов и время выхода на максимум (T_{max}). Единицы измерения показателей светосуммы и максимальной интенсивности свечения выражали в РРс (количество импульсов света в секунду времени в пересчете на миллион нейтрофилов). Время выхода на максимум свечения выражали в секундах.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программ STATISTICA 12.0 (США). Описание полученных в исследовании результатов производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей ($Q_{0.25}$ и $Q_{0.75}$). Анализируемые показатели не имели нормального распределения (применяли критерий Шапиро-Уилка). Сравнительный анализ групп оценивали по критерию Манна-Уитни. Корреляционный анализ оценивали по критерию Спирмена. Достоверно значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Хемилюминесцентный анализ показателей нейтрофилов у больных COVID-19 с легкой степенью тяжести (1-я группа) выявил следующие особенности (см. таблицу 1).

Показатель спонтанной продукции нейтрофилов у пациентов был достоверно снижен в 2,3 раза по сравнению с группой контроля ($p=0,0003$). Уровень стимулированной продукции нейтрофилов по сравнению со здоровыми людьми также был более низким ($p=0,002$). Однако уровень максимальной интенсивности свечения нейтрофилов в данной группе больных достоверно не отличался от контрольных значений. Анализ времени выхода на максимум свечения клеток показал более низкое значение данного показателя у больных COVID-19 по сравнению со здоровыми людьми ($p=0,008$). Значение коэффициента активации нейтрофилов у пациентов с легкой степенью тяжести не имели достоверных отличий по сравнению с контрольной группой. При сравнительном анализе больных 1-й группы со 2-й (со средней степенью тяжести) и 3-й группой (тяжелое и крайне тяжелое течение) было выявлено, что значение спонтанной продукции АФК клетками у больных с легкой степенью тяжести была достоверно более высокой по сравнению с больными с тяжелым и крайне тяжелым течением ($p=0,04$). При этом показатель стимулированной продукции АФК клетками в 1-й группе был достоверно более низким, чем во 2-й и 3-й группах

Показатели хемилюминесцентного анализа у пациентов с COVID-19 с разной степенью тяжести [Mediana Q0.25–Q0.75]

Значения	Пациенты с COVID-19			Контрольная группа (n = 30)
	1-я группа (n = 32)	2-я группа (n = 30)	3-я группа (n = 23)	
S _{спонт.} , PPs	11,0 [6,7-19,0] p=0,003	16,0 [7,0-38,0] p=0,005 p2=0,03	7,0 [6,0-37,0] p=0,002 p3=0,04	25,3 [15,8-42,3]
S _{стим.} , PPs	164,0 [132,0-396,0] p=0,002 p1=0,004	382,5 [211,0-750,0] p2=0,02	240,0 [190,0-452,0] p=0,004 p3=0,002	410,8 [280,1-577,5]
I _{max} , PPs	0,7 [0,39-0,8]	0,6 [0,42-1,5]	0,56 [0,54-1,07]	0,48 [0,32-0,61]
T _{max} , с	2160 [2136-2364] p=0,008	2148 [2112-2460] p=0,01	2100 [1950-2280] p=0,006	2760 [2200-3350]
K _a	13,5 [7,6-22,5] p1=0,0025	22,6 [8,8-32,6] p=0,002 p2=0,03	35,6 [19,8-46,2] p=0,001 p3=0,004	15,7 [9,6-24,5]

Примечание. p - статистически значимые различия групп больных COVID-19 и контрольной группой; p1 - статистически значимые различия 1-й и 2-й групп больных COVID-19 (p<0,05); p2 - статистически значимые различия 2-й и 3-й групп больных COVID-19 (p<0,05). p3 - статистически значимые различия 1-й и 3-й групп больных COVID-19 (p<0,05).

больных (p=0,004; p=0,002 соответственно). Значение максимальной интенсивности свечения нейтрофилов и время выхода на максимум свечения достоверно не различалось между 1-й, 2-й и 3-й группами. Однако показатель коэффициента активации в группе с легкой степенью тяжести (1-я группа) был достоверно более низким по сравнению с группой со средней (2-я группа) и тяжелой и крайне тяжелой степенью тяжести (3-я группа) (p=0,0025; 0,004 соответственно).

Изучение показателей нейтрофилов в группе больных COVID-19 со средней степенью тяжести (2-я группа) выявило снижение показателя спонтанной продукции АФК клетками по сравнению с контрольными значениями (p=0,005). Уровень стимулированной продукции нейтрофилов и максимальной интенсивности свечения клеток достоверно не отличался от здоровых доноров. Однако показатель времени выхода на максимум у больных 2-й группы был достоверно более низким по сравнению с контрольными значениями (p=0,01). Коэффициент активации нейтрофилов, который показывает отношение стимулированной продукции нейтрофилов к спонтанной продукции, в данной группе больных был достоверно выше по сравнению со здоровыми людьми (p=0,002). Сравнительный анализ функциональной активности нейтрофилов во 2-й и 3-й группе показал, что спонтанная продукция нейтрофилов у больных со средней степенью тяжести (2-я группа) была достоверно более высокой, чем в группе больных с тяжелым и крайне тяжелым течением заболевания (p=0,03). Кроме того,

во 2-й группе пациентов был более высокий уровень стимулированной продукции нейтрофилов по сравнению с 3-й группой (p=0,02). Показатели максимальной интенсивности свечения клеток и время выхода на максимум достоверно не различались между сравниваемыми группами. Значение коэффициента активации в группе больных со средней степенью тяжести (2-я группа) был более низким по сравнению с группой с тяжелым и крайне тяжелым течением (3-я группа) (p=0,03).

Анализ показателей функциональной активности нейтрофилов в группе больных с тяжелой и крайне тяжелой степенью тяжести (3-я группа) показал снижение спонтанной продукции АФК клетками в 3,6 раза по сравнению с контрольными значениями (p=0,02). Индуцированная продукция нейтрофилов также была достоверно более низкой по сравнению со значениями у здоровых лиц (p=0,004). Значение максимальной интенсивности свечения не имело достоверных различий с группой контроля. Показатель времени выхода на максимум свечения клеток также, как и в 1-й и во 2-й группе больных, был достоверно более низким по сравнению со здоровыми людьми (p=0,006). Однако коэффициент активации нейтрофилов в данной группе больных был достоверно выше по сравнению со здоровыми людьми (p=0,001).

Таким образом, в результате проведенного хемилюминесцентного анализа было выявлено, что функциональная активность нейтрофилов у пациентов с легкой степенью тяжести COVID-19 (1-я группа) ха-

рактировалась сниженной спонтанной и стимулированной продукцией АФК клетками по сравнению со здоровыми людьми. В группе со средней степенью тяжести у пациентов (2-я группа) было выявлено снижение спонтанной продукции нейтрофилов и более высокий показатель коэффициента активации в сравнении с контрольными значениями. В группе с тяжелой и крайне тяжелой степенью тяжести (3-я группа) показатели спонтанной и стимулированной продукции АФК нейтрофильными гранулоцитами были более низкими по сравнению со значениями здоровых доноров, однако коэффициент активации клеток был более высоким. Сравнительный анализ показателей 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. Самые низкие значения показателя спонтанной продукции нейтрофилов наблюдали в группе с тяжелым и крайне тяжелым течением, а наиболее низкие значения стимулированной продукции нейтрофилов были в группе с легким течением заболевания. Коэффициент активации клеток был более высоким в группе больных с тяжелой и крайне тяжелой степенью тяжести и имел прямую корреляционную взаимосвязь со степенью тяжести заболевания ($p=0,022$).

Обсуждение. С момента распространения коронавирусной инфекции COVID-19, вызванной вирусом SARS-CoV-2, остаются неясными причины развития тяжелых форм COVID-19, которые проявляются нарушениями гемостаза, приводящие к острому респираторного дистресс-синдрому [17]. Доказано, что нейтрофильные гранулоциты играют важнейшую роль в первой линии клеточно-опосредованной защиты от микроорганизмов и вирусов. Основная функция нейтрофилов - очистка организма от патогенов, путем фагоцитоза, который осуществляется за счет слияния патогена с гранулами, содержащими протеазы, дефенсины, антимикробные пептиды и АФК. Однако до сих пор мало изученным остается роль популяции нейтрофильных гранулоцитов в развитии тяжелых форм заболевания при COVID-19 [18].

В работе были изучены показатели функциональной активности нейтрофилов у больных COVID-19 с различной степенью тяжести. Примененная методика регистрации ХЛ основана на применении двух стимулов – ФМА и фМЛФ, один из которых является праймером, а другой - основным стимулом продукции АФК клетками, а использование люминола позволило осуществлять регистрацию всего пула АФК нейтрофилами [19].

Хемилюминесцентный анализ позволил выявить, что уровни спонтанной (базовой) продукции АФК нейтрофилами у больных COVID-19 1-й группы (легкое течение), 2-й группы (среднетяжелое течение) и 3-й группы (тяжелое и крайне тяжелое течение) были ниже по сравнению с группой здоровых лиц. При этом наиболее низкие результаты данного показателя наблюдались в группе с тяжелым и крайне тяжелым течением заболевания. Было выявлено, что показате-

тель базовой продукции АФК нейтрофильными гранулоцитами у тяжелых больных был достоверно более низкий по сравнению с пациентами с легким и среднетяжелым течением заболевания. Полученные результаты сопоставимы с данными, полученными в работе А. Лазаревой и соавт. [20], которые изучали люминол- и люцигенин-зависимую хемилюминесценцию нейтрофильных гранулоцитов у больных с COVID-19. Так, было показано снижение спонтанной и индуцированной продукции АФК нейтрофилами, а также показателей максимальной интенсивности, времени выхода на максимум и индекса активации люминол-зависимого ответа относительно контрольных значений.

При исследовании стимулированной продукции нейтрофилов под действием двух стимулов – ФМА и фМЛФ, было выявлено, что в группах с легким и тяжелым и крайне тяжелым течением COVID-19 показатель светосуммы хемилюминесценции нейтрофилов (S стим.) был достоверно более низким по сравнению со здоровыми людьми. В группе больных со средней степенью тяжести данный показатель не различался с контрольными значениями. Наиболее низкое значение показателя стимулированной продукции нейтрофилов наблюдался в группе с легким течением заболевания. В проведенной зарубежной работе J. Schulte-Schrepping и соавт. [21] не было выявлено изменения способности к фагоцитозу нейтрофилов у пациентов с легкой и тяжелой формами COVID-19. Однако продукция АФК фагоцитами при стимуляции ФМА и культивировании с *Escherichia coli* была значительно снижена у пациентов с тяжелой формой заболевания по сравнению с пациентами с легкой формой COVID-19 или здоровыми людьми.

Исследование максимальной интенсивности свечения нейтрофилов у больных COVID-19 не показало достоверно значимых различий между группами пациентов с различными степенями тяжести и по сравнению с группой здоровых людей. Данный показатель характеризовал максимальную активность синтеза АФК клетками [22]. Несмотря на достаточно большое количество работ о роли нейтрофилов при COVID-19, данные о функциональной активности при данной патологии носят противоречивый характер. В работе J. Masso-Silva и соавт. [23] напротив, указывается, что нейтрофилы имели повышенный окислительный взрыв, нетоз и фагоцитоз по сравнению с контрольной группой, а нейтрофилы были выявлены в дыхательных путях и альвеолах в паренхиме легких у 40% инфицированных вирусом SARS-CoV-2 пациентов.

Изучение показателя времени выхода на максимум хемилюминесцентного свечения клеток показало достоверно более низкий его уровень у пациентов с COVID-19 во всех трех группах по сравнению с контрольными значениями. Однако различия между больными в зависимости от степени тяжести не были выявлены. Полученные результаты могут быть связаны с более быстрым ответом нейтрофильных гранулоцитов пациентов на стимулирующие агенты, в связи с чем продукция АФК клетками осуществляется за более короткий промежуток времени по сравнению со здоровыми донорами.

Анализ коэффициента активации, который был равен отношению стимулированной к спонтанной продукции АФК клетками, выявил следующие особенности. В группе с легким течением заболевания данный показатель не отличался от контрольных значений. Однако, у больных со средней степенью тяжести и тяжелым и крайне тяжелым течением заболевания, коэффициент активации нейтрофилов был достоверно выше по сравнению со здоровыми людьми. Значение данного показателя увеличивалось в зависимости от степени тяжести COVID-19. Наиболее низкое значение наблюдалось в группе с легким течением, а наиболее высокое в группе с тяжелым и крайне тяжелым течением заболевания. Данный показатель в дальнейшем можно использовать в качестве одного из предикторов тяжести болезни. В доступной научной литературе предполагается, что нейтрофилы могут усиливать патологическое повреждение у пациентов с тяжелой формой COVID-19 при дисфункции иммунного ответа и гипервоспалении, а также способны контролировать другие подмножества клеток в зависимости от особенностей инфекции [24]. Кроме того, показано, что у пациентов с тяжелой формой COVID-19 были выявлены повышенные уровни в сыворотке крови ферментов нейтрофилов – миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы [25]. Также исследователи связали тяжелое течение заболевания с циркулирующей нейтрофилией, а нейтрофилы пациентов с COVID-19 показали более высокую экспрессию маркеров активации, чем у здоровых людей из контрольной группы [26, 27].

Таким образом, роль нейтрофильных гранулоцитов в иммунопатологии COVID-19 представляет большой интерес. Доказано, что снижение абсолютного числа клеток или нарушение функциональной активности нейтрофилов может играть роль в развитии от легких до тяжелых клинических состояний COVID-19 [28]. Кроме того, соотношение нейтрофилов и лимфоцитов является одним из маркеров воспаления при COVID-19, а повышенные значения данного показателя свидетельствуют о плохом прогнозе заболевания [29, 30]. В проведенном исследовании было выявлено, что больные с COVID-19 с различной степенью тяжести от легкой до крайне тяжелой, характеризовались снижением функциональной активности нейтрофилов. Кроме того, больные со средней степенью тяжести и тяжелым и крайне тяжелым течением заболевания имели повышенный коэффициент активации фагоцитов к продукции АФК, что можно использовать в качестве маркера тяжести заболевания при данной патологии.

Выводы

У больных COVID-19 с легкой степенью тяжести выявлено снижение спонтанной и стимулированной продукции АФК, а также времени выхода на максимум свечения клеток, что свидетельствует о снижении функциональной активности нейтрофилов.

В группе со средней степенью тяжести пациентов выявлено снижение спонтанной продукции нейтрофилов, но более высокий показатель коэффициента активации в сравнении с контрольными значениями, что

указывает на повышенную активацию нейтрофилов.

Пациенты с тяжелым и крайне тяжелым течением COVID-19 характеризовались одновременно снижением спонтанной и стимулированной продукцией АФК нейтрофилами и повышением коэффициента активации.

Сравнительный анализ показателей 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. Коэффициент активации клеток был более высоким в группе больных с тяжелой и крайне тяжелой степенью тяжести.

Коэффициент активации нейтрофилов у больных COVID-19 повышался прямо пропорционально степени тяжести. Данный показатель можно использовать в качестве предиктора тяжести заболевания.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 4-7, 9-10, 12-15, 17, 18, 20, 21, 23-30 см. REFERENCES)

2. Никифоров В.В., Суранова Т.Г., Чернобровкина Т.Я., Янковская Я.Д., Бутова С.В. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): клинико-эпидемиологические аспекты. *Архив внутренней медицины*. 2020; 10(2):87-93. DOI: 10.20514/2226-6704-2020-10-2-87-933.
3. Бевова М.Р., Нетесов С.В., Аульченко Ю.С. Новая коронавирусная инфекция COVID-19. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2020; 38(2):51-8. DOI: 10.17116/mol-gen20203802151.
4. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А. и др. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 2. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8(1):7-18. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18.
5. Федорова Н.Д., Сумбатян Д.А., Стукова М.А., Иванов А.В., Семенова Е.В., Филатов М.В. и др. Вирусные инфекции влияют на функциональную активность нейтрофилов периферической крови. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2021; 6(1): 115-23.
6. 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 хемилуминесцентному анализу. *Российский иммунологический журнал*. 2015; 9(4): 418-25.
7. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е. В. Свободные радикалы и клеточная хемилуминесценция. *Успехи биологической химии*. 2009; 49: 341-88.
8. Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Борисов А.Г. Методы оценки и роль респираторного взрыва в патогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(4): 327-40. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-4-327-340.

REFERENCES

1. Kutti-Sridharan G., Vegunta R., Vegunta R., Mohan B. P., Rokkam V. R. P. SARS-CoV2 in different body fluids, risks of transmission, and preventing COVID-19: a comprehensive evidence-based review. *International Journal of Preventive Medicine*. 2020; 11:97. DOI: 10.4103/ijpvm.IJPVM_255_20.
2. Nikiforov V.V., Suranova T.G., Chernobrovkina T.Ya., Yankovskaya Ya.D., Burova S.V. New coronavirus infection (COVID-19): clinical and epidemiological aspects. *Arkhiv vnutrenney meditsiny*. 2020; 10(2):87-93. DOI: 10.20514/2226-6704-2020-10-2-87-93. (in Rus-

- sian)
3. Bevova M.R., Netesov S.V., Aul'chenko Yu.S. New coronavirus infection COVID-19. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2020; 38(2):51-8. DOI: 10.17116/molgen20203802151. (in Russian)
 4. Fernandes L.L., Pacheco V.B., Borges L., Athwal H.K., Eduardo F.P., Bezinelli L. et al. Saliva in the diagnosis of COVID-19: a review and new research directions. *Journal of Dental Research*. 2020; 99(13):1435–43. DOI: 10.1177/0022034520960070.
 5. Fernandes A.C.L., Vale A.J.M., Guzen F.P., Pinheiro F.I., Cobucci R.N., Azevedo E. P. Therapeutic options against the new coronavirus: updated clinical and laboratory evidences. *Frontiers in Medicine*. 2020; 7:546. DOI: 10.3389/fmed.2020.00546.
 6. Mayadas T.N., Cullere X., Lowell C.A. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu. Rev. Pathol.* 2014; 9:181–218. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023.
 7. Barr F.D., Ochsenbauer C., Wira C.R., RodriguezGarcia M. Neutrophil extracellular traps prevent HIV infection in the female genital tract. *Mucosal Immunology*. 2018; 11(5):1420–8. DOI: 10.1038/s41385-018-0045-0.
 8. Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevskiy A.A., Nguen T.Z.L. A new look at neutrophil granulocytes: rethinking old dogmas. Part 2. *Infektsiya i immunitet*. 8 (1):7–18. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18. (in Russian)
 9. Lamichhane P.P., Samarasinghe A.E. The role of innate leukocytes during influenza virus infection. *Journal of Immunology Research*. 2019; 2019:1-17. DOI: 10.1155/2019/8028725.
 10. Lagunas-Rangel F.A. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and lymphocyte-to-C-reactive protein ratio in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Journal of Medical Virology*. 2020; 92(10):1733-4. DOI: 10.1002/jmv.25819.
 11. Fedorova N.D., Sumbatyan D.A., Stukova M.A., Ivanov A.V., Semenova E.V., Filatov M.V., Varfolomeeva E.Yu. Viral infections affect the functional activity of peripheral blood neutrophils. *Aktual'nye voprosy biologicheskoy fiziki i khimii*. 2021; 1(6): 115-23. (in Russian)
 12. Rosales C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J. Leuk. Biol.* 2020; 108(1):377–96. DOI: 10.1002/JLB.4MIR0220-574RR.
 13. Sun S., Cai X., Wang H., He G., Lin Y., Lu B. et al. Abnormalities of peripheral blood system in patients with COVID-19 in Wenzhou, China. *Clin. Chim. Acta*. 2020; 507:174–80. DOI: 10.1016/j.cca.2020.04.024.
 14. Wang D., Hu B., Hu C., Zhu F., Liu H., Zhang J. et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020; 323(11): 1061–9. DOI:10.1001/jama.2020.1585.
 15. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front. Physiol.* 2018; 9: 1-17. DOI: https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113.
 16. Obratsov I.V., Godkov M.A., Polimova A.M., Demin E.M., Proskurnina E.V., Vladimirov Yu.A Assessment of the functional activity of whole blood neutrophils by two-stage stimulation: a new approach to chemiluminescence analysis. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal*. 2015; 9(4): 418–25. (in Russian)
 17. Thierry A., Roch B. Neutrophil Extracellular traps and byproducts play a key role in COVID-19: pathogenesis, risk factors, and therapy. *J. Clin. Med.* 2020; 9(9): 2942. DOI: 10.3390/jcm9092942.
 18. Morrissy S., Geller A.E., Hu X., Trier D., Ding C., Klaes C.K. et al. A specific low-density neutrophil population correlates with hypercoagulation and disease severity in hospitalized COVID-19 patients. *JCI Insight*. 2021; 6(9): 1-19. DOI: 10.1172/jci.insight.148435.
 19. Vladimirov Yu.A., Proskurnina E. V. Free radicals and cell chemiluminescence. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2009; 49: 341–88. (in Russian)
 20. Lazareva A., Kolenchukova O., Smirnova S., Melder V., Tereshchenko S. Hemiluminescent activity of blood phagocytes in patients with COVID-19. *European Respiratory Journal*. 2021; 58(65):3878. DOI: 10.1183/13993003.congress-2021.PA3878.
 21. Schulte-Schrepping J., Reusch N., Paclik D., Baßler K., Schlickeiser S., Zhang B. et al. Severe COVID-19 is marked by a dysregulated myeloid cell compartment. *Cell*. 2020; 182(6):1419–40. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.001.
 22. Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Borisov A.G. Methods of evaluation and the role of respiratory burst in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases. *Infektsiya i immunitet*. 2017; 7(4): 327–40. DOI:10.15789/2220-7619-2017-4-327-340. (in Russian)
 23. Masso-Silva J., Moshensky A., Lam M., Odish M., 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): 479-89. DOI: 10.1093/cid/ciab437.
 24. 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 Medicine*. 2020; 46(5):846–8. DOI: 10.1007/s00134-020-05991-x.
 25. Parackova Z., Zentsova I., Bloomfield M., Vrabcova P., Smetanova J., Klocperk A. et al. Disharmonic Inflammatory Signatures in COVID-19: Augmented Neutrophils but Impaired Monocytes and Dendritic Cells Responsiveness. *Cells*. 2020; 9(10):2206. DOI: 10.3390/cells9102206.
 26. Leppkes M., Knopf J., Naschberger E., Lindemann A., Singh J., Herrmann I. et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine*. 2020; 58:102925. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102925.
 27. Wang J., Li Q., Yin Y., Zhang Y., Cao Y., Lin X. et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps in COVID-19. *Frontiers Immunol.* 2020; 11:2063. DOI: 10.3389/fimmu.2020.02063.
 28. Reusch N., Domenico E.D., Bonaguro L., Schulte-Schrepping J., Baßler K., Schultze J. et al. Neutrophils in COVID-19. *Front Immunol.* 2021; 12:652470 DOI: 10.3389/fimmu.2021.652470.
 29. Jimeno S., Ventura P., Castellano J., Garcia-Adasme S., Miranda M. Touza P. Prognostic implications of neutrophil-lymphocyte ratio in COVID-19. *Clin. Invest.* 2021; 51(1): e13404. DOI: 10.1111/eci.13404.
 30. Barnes B. J., Adrover J. M., Baxter-Stoltzfus A., Borczuk A., Cools-Lartigue J., Crawford J.M. et al. Targeting potential drivers of COVID-19: neutrophil extracellular traps. *The Journal of Experimental Medicine*. 2020; 217(6): 1-7. DOI: 10.1084/jem.20200652.