

ИНТЕГРАЦИОННЫЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ, ОЦЕНИВАЮЩИЙ ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ COVID-19 И РИСК ВОЗНИКНОВЕНИЯ ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА

Нестерова И.В.^{1,2}, Атажахова М.Г.¹, Матушкина В.А.¹,
Тетерин Ю.В.¹, Городин В.Н.¹, Чудилова Г.А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Краснодар, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Резюме. Патолофизиология тяжелой формы COVID-19 характеризуется изменением количества, фенотипа и функций нейтрофильных гранулоцитов (НГ). Среди эффекторных противовирусных механизмов НГ одними из наиболее важных являются нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETs), но чрезмерное их образование усугубляет воспаление при остром респираторном дистресс-синдроме и способствует тромбозу микрососудов. Их обнаружение и количественная оценка могут иметь важное значение при различных формах течения COVID-19 для определения корреляции с исходом заболевания, оценки риска развития постковидного синдрома и, возможно, мониторинга будущей целевой терапии.

Цель исследования — разработать новый диагностический интеграционный критерий, позволяющий оценить тяжесть течения COVID-19 и риск развития осложнений в постковидном периоде, в том числе постковидного синдрома в периферической крови.

Исследованы образцы периферической крови (ПК) 31 пациента с острым течением COVID-19 (среднетяжелого течения (n = 15) и тяжелого течения (n = 16)), 52 пациентов, выписанных из стационара после лечения COVID-19 тяжелой степени тяжести, в сроки от 30 до 60 дней, имеющие постковидный синдром (ПКС) и 100 условно здоровых добровольцев. Оценивались показатели общеклинического анализа крови (MicroCC-20Plus), в мазках ПК проводился подсчет лейкоцитарной формулы с учетом количества образованных NET и НГ, ушедших в патологический апоптоз. На основе полученных результатов рассчитывался интеграционный диагностический критерий по формуле:

$$\text{ИДК} = \frac{\% \text{ неизменных НГ}}{\% \text{ NET} + \% \text{ НГ в апоптозе}}$$

Показано снижение ИДК при среднетяжелом течении заболевания в 8,5 раза ($p < 0,05$), а при тяжелом течении — в 30 раз ($p < 0,05$), по сравнению со значениями в группе условно здоровых лиц. Также установлено, что у 88,5% пациентов с ПКС, перенесших SARS-CoV-2, в ПК не выявлено морфологически патологических измененных НГ. В то же время у 11,5% пациентов с ПКС отмечено по-

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов
имени Патриса Лумумбы»
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123, кв. 1.
Тел.: 8 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Address for correspondence:

Irina V. Nesterova
P. Lumumba Peoples' Friendship University
123 Leninsky Ave, Apt 1
Moscow
117513 Russian Federation
Phone: +7 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Нестерова, М.Г. Атажахова, В.А. Матушкина,
Ю.В. Тетерин, В.Н. Городин, Г.А. Чудилова
«Интеграционный диагностический критерий,
оценивающий тяжесть течения COVID-19
и риск возникновения постковидного синдрома»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3.
С. 545-554. doi: 10.15789/1563-0625-IDC-2594

© Нестерова И.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.V. Nesterova, M.G. Atazhakhova, V.A. Matushkina,
Yu.V. Teterin, V.N. Gorodina, G.A. Chudilova "Integrative
diagnostic criterion for evaluation of COVID-19 severity and
the risk of post-COVID syndrome", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3,
pp. 545-554.
doi: 10.15789/1563-0625-IDC-2594

© Nesterova I.V. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-IDC-2594

явление NETs и клеток с патологическим апоптозом, при этом ИДК НГ-ПКС был в 8 раз меньше ($p < 0,05$), чем в группе сравнения и не отличался от показателей пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 ($p > 0,05$), что диктует необходимость дальнейшего диспансерного наблюдения таких пациентов.

Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о том, что разработанный интегративный диагностический критерий позволяет оценить как тяжесть течения COVID-19 в острый период, так и риск возникновения постковидного синдрома. Следует подчеркнуть, что выявленные при COVID-19 характерные изменения НГ можно легко идентифицировать в ПК и последовательно отслеживать по расчетному интегральному диагностическому критерию. Значительное снижение ИДК свидетельствует о сохраняющейся гиперактивации НГ и необходимости проведения таргетной иммунотерапии, направленной на модулирование дисфункций НГ.

Ключевые слова: COVID-19, постковидный синдром, интегральный диагностический критерий, нейтрофильные гранулоциты, NET, апоптоз

INTEGRATIVE DIAGNOSTIC CRITERION FOR EVALUATION OF COVID-19 SEVERITY AND THE RISK OF POST-COVID SYNDROME

Nesterova I.V.^{a,b}, Atazhakhova M.G.^a, Matushkina V.A.^a, Teterin Yu.V.^a, Gorodina V.N.^a, Chudilova G.A.^a

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^b P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Pathophysiology of severe COVID-19 is characterized by changes in the number, phenotype, and function of neutrophil granulocytes (NG). Among the effector antiviral mechanisms of NG, the neutrophil extracellular traps (NETs) are among the most important features. However, their excessive formation exacerbates inflammation in acute respiratory distress syndrome and contributes to microvascular thrombosis. Their detection and counting may be important in severity grading of COVID-19, for determining correlations with clinical outcome, assessing the risk of developing post-COVID syndrome, and, possibly, for monitoring future targeted therapy. Purpose of our study was to develop a new diagnostic integrative criterion to assess the severity of COVID-19 and the risk of complications in the post-COVID period, including post-COVID signs in peripheral blood.

Peripheral blood (PB) samples were studied from 31 patients with acute COVID-19 of moderate ($n = 15$) and severe degrees ($n = 16$). Moreover, we observed 52 patients discharged from the hospital after severe COVID-19, with diagnosed post-COVID syndrome (PCS) over the period of 30 to 60 days, and 100 healthy volunteers. The parameters of routine blood counts (MicroCC-20Plus) were evaluated, the leukocyte formula was calculated in PC smears, taking into account the number of formed NETs, and NGs entering pathological apoptosis. Based on the obtained results, an integral diagnostic criterion was calculated using the formula:

$$\text{IDK} = \frac{\% \text{ unchanged NG}}{\% \text{ NET} + \% \text{ NG in apoptosis}}$$

A 8.5-fold decrease in IDK index ($p < 0.05$) was shown in the cases of moderate-severity course of the disease, and a 30-fold drop was seen in severe cases ($p < 0.05$) compared with appropriate values in the group of healthy individuals. It was also found that, in 88.5% of patients with PCS after the SARS-CoV-2 infection, no morphologically altered NG were detectable in PB samples. At the same time, in 11.5% of patients with PCS, we found NETs and cells with pathological apoptosis, whereas IDC of NG-PCS was 8 times less than in the comparison group, and did not differ from the parameters of patients with moderate COVID-19 ($p > 0.05$) thus requiring further dispensary observation of such patients.

The data obtained in this study indicate that the developed integrative diagnostic criterion allows us to assess both the severity of COVID-19 over acute period, and the risk of post-COVID syndrome. It should be emphasized that the characteristic changes in NG detected in COVID-19 may be readily identified in PB and consistently monitored by the proposed integral diagnostic criterion. A significant decrease in IDC indicates the persisting hyper-activation of NG and a need for targeted immunotherapy aimed at modulating the NG dysfunction.

Keywords: COVID-19, post-COVID syndrome, integral diagnostic criterion, neutrophil granulocytes, NET, apoptosis

Введение

Иммунологический фенотип COVID-19 характеризуется истощением лимфоцитов и повышенным числом нейтрофильных гранулоцитов (НГ), что необычно для вирусной инфекции [19]. При этом установлено, что соотношение НГ к лимфоцитам в периферической крови (ПК) пациентов с COVID-19 коррелирует с тяжестью заболевания и высокой экспрессией связанных с НГ цитокинов IL-8 и IL-6 в сыворотке крови, а нейтрофилия была описана как показатель тяжести респираторных симптомов и предиктор неблагоприятного исхода [11]. Патофизиология тяжелой формы COVID-19 характеризуется изменением количества морфологического фенотипа и функциональности НГ [18].

Наиболее важным среди эффекторных механизмов НГ при вирусных заболеваниях являются нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET) [4, 8]. NET представляют собой сети внеклеточных волокон, состоящих из деконденсированного хроматина ядер НГ, содержащих в себе гистоны, белки цитоскелета, ферменты гранулярного происхождения: эластазу, миелопероксидазу (МПО), кателицидины, кальпротектин и α -дефенсин [15, 29]. Процесс образования NET НГ, называемый NETosis, широко изучен. Первым этапом NETosis при вирусных инфекциях является клеточная активация через Toll-подобные рецепторы TLR4, TLR7 и TLR8 [22, 29]. Впоследствии образуются активные формы кислорода (ROS), что приводит к активации протеинаргиназы деиминазы-4 (PAD4), которая отвечает за деконденсацию хроматина [13]. Эластаза НГ (NE), белок гранул, вызывает разрушение ядерной мембраны НГ, в то время как белок гранулы гасдермин D способствует образованию пор в клеточной мембране и опосредует высвобождение NET во внеклеточное пространство [5].

NET действительно играют существенную роль в элиминации вируса, но чрезмерная продукция NET усугубляет воспаление при остром респираторном дистресс-синдроме (ОРДС) и способствует тромбозу микрососудов [10]. Это потенциально связано с чрезмерной активацией пути стимулятора генов интерферона (STING) через циклическую GMP-AMP-синтазу (сGAS) в фагосомах и с самой инфекцией SARS-CoV-2 через ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) [4, 6]. За период пандемии короновирусной инфекции было убедительно продемонстрировано, что усиленное образование NET коррелирует с тяжестью протекания воспалительного процесса [6, 37].

Широкое распространение ACE2 рецепторов и прежде всего на альвеолоцитах II типа, эндотелиоцитах сосудов и клетках проксимальных канальцев почек [37] объясняет системность поражения организма вирусом SARS-CoV-2 [4]. Цитопатическое действие SARS-CoV-2 на данные клетки приводит к их повреждению с высвобождением паракринных факторов с последующим привлечением в места деструкции тканей макрофагов и НГ. Образующиеся в этих местах NET, благодаря своему богатому арсеналу катионных белков и ферментов, вызывают повреждение соседних клеток [25] с еще большим привлечением в очаг воспаления НГ. Действуя на эндотелиоциты, SARS-CoV-2 приводит к развитию эндотелиальной дисфункции и провоцирует активацию коагуляционного гемостаза с развитием имунотромбозов и ДВС синдрома [1, 2, 17, 21]. Дисфункцию эндотелия и развитие имунотромбозов усиливает SARS-CoV-2-индуцированный цитокиновый шторм [24, 28]. Подобная цепь событий приводит к развитию острого респираторного дистресс-синдрома [7].

Избыточное образование NET подтверждается данными аутопсии, которая демонстрирует усиленную инфильтрацию легочной ткани НГ и конгломератами, состоящими из NET и фибрина [3, 9, 32]. Было также отмечено, по данным компьютерной томографии, что нейтрофильный лейкоцитоз и усиленное образование NET коррелируют с высоким процентом поражения ткани легкого [33]. Важно отметить, что SARS-CoV-2 может напрямую индуцировать высвобождение NET «здоровыми» НГ и, что зависит от оси ACE2-сериновая протеаза, репликации вируса и передачи сигналов PAD-4. Наконец NET высвобождаемые активированными SARS-CoV-2 НГ, способствуют апоптозу эпителия легких. Эти результаты описывают новые клеточные и молекулярные механизмы, участвующие в образовании сетей при инфекции SARS-CoV-2, и их пагубную роль в патофизиологии COVID-19 [30].

В условиях тяжелого течения COVID-19, когда считается, что активность тканевых НГ чрезвычайно высока, вполне вероятно, что активированные НГ постоянно циркулируют в ПК [11]. Их обнаружение и количественная оценка могут иметь важное значение при COVID-19 для определения корреляции с исходом заболевания, улучшения нашего понимания патофизиологии заболевания и, возможно, мониторинга будущей целевой терапии.

Описан метод обнаружения активированных НГ в ПК и подтверждена его клинико-диагностическая ценность с использованием флуоресцентной проточной цитометрии на гематологи-

ческом анализаторе Sysmex™ XN-9100 (Япония). Эта сложная технология предлагает в дополнение к оценке общего анализа крови, ядерных эритроцитов и незрелых гранулоцитов набор гематологических параметров воспаления, которые обеспечивают улучшенную дифференциацию подгрупп НГ на основе прямого и бокового светорассеяния, а также содержания РНК, оценить статус активации НГ [35].

Учитывая вышесказанное, существует необходимость в новых и доступных методах определения и оценки активации НГ у пациентов с COVID-19.

Цель исследования — разработать новый диагностический интеграционный критерий, позволяющий оценить тяжесть течения COVID-19 и риск развития осложнений в постковидном периоде, в том числе постковидного синдрома в периферической крови.

Материалы и методы

В исследование были включены: пациенты, поступившие в стационар с острым течением COVID-19 ($n = 31$) на 9-й (6; 14) день от начала заболевания и появления симптомов коронавирусной инфекции, в возрасте 61 (57; 71) года, обоего пола (58% мужчины, 42% женщины): группа 1 — 15 пациентов со среднетяжелым течением заболевания, группа исследования 2 — 16 пациентов с тяжелым течением заболевания; 52 пациента, выписанных из стационара после лечения COVID-19 тяжелой степени тяжести, в сроки от 30 до 60 дней, имеющие постковидный синдром (ПКС) с широким спектром клинических проявлений — группа исследования 3. Группу сравнения составили 100 условно здоровых добровольцев соответствующего возраста и пола. Исследовано 183 образца периферической крови (ПК), оценивались показатели общеклинического анализа крови на гематологическом анализаторе MicroCC-20Plus. Параллельно приготавливались мазки ПК, с последующей фиксацией и окраской по Романовскому—Гимзе. Окрашенные мазки крови оценивались с помощью световой микроскопии при увеличении 100×10 (масляная иммерсия). Проводился подсчет относительного количества популяций лейкоцитов (лейкоцитарная формула) с учетом количества образованных NET и НГ, ушедших в патологический апоптоз на 100 НГ. На основе полученных результатов рассчитывался интеграционный диагностический критерий по формуле:

$$\text{ИДК} = \frac{\% \text{ неизменных НГ}}{\% \text{ NET} + \% \text{ НГ в апоптозе}}$$

Статистическую обработку данных проводили в StatSoft Statistica 10.0. Проверку нормального распределения производили методом Колмогорова—Смирнова. Результаты описаны с использованием медиан (Me) с межквартильными диапазонами ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Для сравнения групп по количественным признакам использовали непараметрический критерий: U-критерий Манна—Уитни. Различие показателей исследуемых групп полагали статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ уровня лейкоцитов и морфологической картины крови у пациентов группы 1 выявил изменения показателей при среднетяжелом течении COVID-19. Так, у пациентов на фоне тенденции снижения общего количества лейкоцитов до $5,8 (4,6-6,0) \times 10^9/\text{л}$ против $6,25 (4,25-6,75)$ в группе сравнения ($p > 0,05$), отмечено снижение относительного количества лимфоцитов $27,0 (17,0-30,5) \%$ против $34,0 (31,0-36,0) \%$ в группе сравнения, $p < 0,05$ и повышение содержания НГ $69,5 (67,5-78,0)$ против $60,0 (56,0-63,0) \%$ в группе сравнения, $p < 0,05$ и доли палочкоядерных форм (ПЯЛ) (табл. 1).

Обращают внимание на еще более выраженные сдвиги в общеклиническом анализе крови, выявленные при анализе показателей в группе 2 тяжелого течения COVID-19. Был обнаружен лейкоцитоз, значимое повышение содержания НГ, сдвиг нейтрофильного ростка в сторону молодых форм $15,0 (10,0-24,0)$, при этом у 100% пациентов отмечалась относительная лимфопения $11,0 (8,0-17,0) \%$ против $34,0 (31,0-36,0) \%$ в группе сравнения.

Нами дополнительно было проведено расширенное морфологическое исследование системы НГ и выявлено, что в ПК пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19 содержатся НГ, сформировавшие NET, и клетки в апоптозе (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки).

Так, в группе 1 на 100 просчитанных НГ выявлялось $3,5 (2,5-4,0) \%$ клеток, вошедших в NETos и $3,0 (3,0-3,5) \%$ клеток в апоптозе. В группе 2 при тяжелом течении заболевания выявлялось в 4 раза большее количество NET и апоптотических клеток — $13,0 (9,0-16,0) \%$ и $12,0 (10,0-16,5) \%$ соответственно. При этом у пациентов группы сравнения выявлялись только единичные клетки с физиологическим апоптозом $1,0 (1,0-2,0) \%$. Принимая во внимание полученные данные, нами был разработан новый интеграционный диагностический критерий (ИДК), характери-

ТАБЛИЦА 1. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ СО СРЕДНЕТЯЖЕЛЫМ И ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ COVID-19 И ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. BLOOD MORPHOLOGICAL PARAMETERS OF PATIENTS WITH MODERATE AND SEVERE COVID-19 AND PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Index	Группа со среднетяжелым течением заболевания Group with moderate course diseases (n = 15)	Группа с тяжелым течением заболевания Severe group diseases (n = 16)	Группа с постковидным синдромом Group with post- COVID syndrome (n = 52)	Группа сравнения Условно здоровые добровольцы Group comparisons Healthy volunteers (n = 100)
WBC, $\times 10^9/\text{л}$ WBC, $\times 10^9/\text{L}$	5,8 (4,6-6,0)	11,95* [^] (10,2-16,1)	6,75 (5,75-6,75)	6,25 (4,75-6,75)
ЛФ, % LY, %	27,0* (17,0-30,5)	11,0* (8,0-17,0)	18,0* (15,0-21,0)	34,0 (31,0-36,0)
НГ, % NG, %	69,5* (67,5-78,0)	77,5* (75,8-86,5)	78,0* (76,0-81,0)	60,0 (56,0-63,0)
СЯЛ, % Segmented NG, %	61,5 (51,5-71,5)	57,0 (47,0-73,8)	75,0* (73,0-78,7)	55,5 (54,25-59,75)
ПЯЛ, % Banded NG, %	7,0* (6,0-8,5)	15,0* [^] (10,0-24,0)	2,0 (1,0-2,5)	3,0 (1,0-4,5)
NET, %	3,5* (2,5-4,0)	13,0* [^] (9,0-16,0)	5,5* (5,0-6,0)	0
НГ в апоптозе, % NG in apoptosis, %	3,0* (3,0-3,5)	12,0* [^] (10,0-16,5)	2,0 (1,25-2,75)	1,0 (1,0-2,0)
ИДК IDC	11,6* (8,8-13,6)	3,2* [^] (2,5-9,5)	12,4 * (10,5-15,0)	99,0 (99,0-99,0)

Примечание. * – различия показателей пациентов с COVID-19 и постковидным синдромом по сравнению с показателями условно здоровых лиц; [^] – различия показателей в группах пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19, статистически обоснованы с ошибкой 1 рода $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

Note. *, differences in the indicators of patients with COVID-19 and post-covid syndrome compared with those of healthy individuals; [^], differences in indicators in groups of patients with moderate and severe COVID-19, statistically substantiated by type 1 error $p < 0.05$ (Mann-Whitney test).

зующий состояние системы НГ у пациентов в остром периоде коронавирусной инфекции, который с учетом частоты встречаемости НГ, формирующих NET в периферической крови и находящихся в состоянии патологического апоптоза, рассчитывается по формуле, представленной в материалах и методах.

Данный интеграционный критерий в группе сравнения составил 99,0 (99,0-99,0), в группе 1 он составил 11,6 (8,8-13,6), что в 8,5 раза меньше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$) (рис. 2). Стоит отметить, что наибольшее снижение данного интеграционного диагностического критерия отмечалось у пациентов, имеющих более тяжелое течение коронавирусной инфекции, сопровождающееся более выраженными признаками

нарушения гемодинамики, с высоким процентом поражения легочной ткани на снимках компьютерной томографии и более высоким риском развития имунотромбозов у которых ИДК составил 3,2 (2,5-9,5), что в 30 раз ($p < 0,05$) ниже показателя группы сравнения и в 3,6 раза ниже значений группы 1 ($p < 0,05$).

Для оценки регрессии изменений, наблюдаемых в нейтрофильном гранулоцитарном компартменте во время острого COVID-19, были исследованы образцы ПК пациентов, перенесших COVID-19 тяжелой степени через 3-6 месяцев после выписки из стационара. Исследованные образцы продемонстрировали нормализацию общего количества лейкоцитов ($p > 0,05$), но при этом в группе 3 отмечалось достоверное повы-

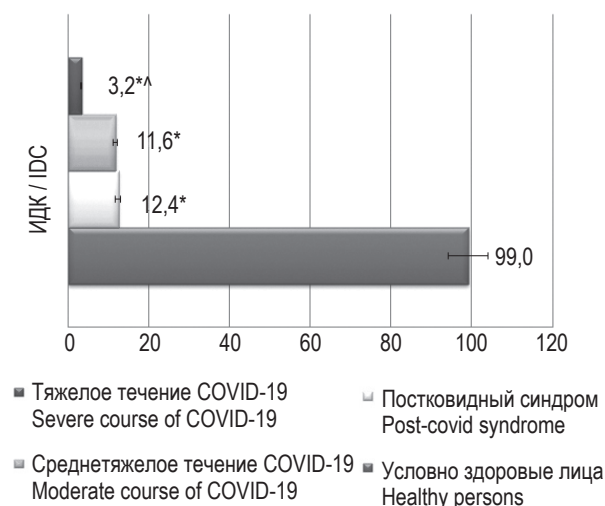


Рисунок 2. Интеграционный диагностический критерий у пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19 и пациентов с постковидным синдромом

Примечание. * – различия показателей пациентов с COVID-19 и постковидным синдромом по сравнению с показателями условно здоровых лиц; ^ – различия показателей в группах пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19, статистически обоснованы с ошибкой 1 рода $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

Figure 2. Integration diagnostic criterion in patients with moderate to severe COVID-19 and patients with post-COVID syndrome

Note. *, differences in the indicators of patients with COVID-19 and post-covid syndrome compared with those of healthy individuals; ^, differences in indicators in groups of patients with moderate and severe COVID-19, statistically substantiated by type 1 error $p < 0,05$ (Mann–Whitney test).

шение уровней НГ до 78,0 (76,0–81,0) %, против 60,0 (56,0–63,0) % в группе сравнения ($p < 0,05$), на фоне сохраняющейся относительной лимфопении – 18,0 (15,0–21,0) % против – 34,0 (31,0–36,0) ($p < 0,05$).

При морфологической оценке НГ в группе 3 с ПКС у 6 пациентов из 52 человек (11,5% случаев) были выявлены NETs – 5,5 (5,0–6,0) % и НГ в состоянии апоптоза – 2,0 (1,25–2,75) %, неизмененные НГ составили 92,5 (91,25–93,75) % (табл. 1).

При расчете интеграционного критерия НГ в группе 3 ИДК составил 12,4 (10,5–15,0), что в 8 раз меньше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$). При этом выявлено, что снижение ИДК наиболее выражено у лиц с большим количеством клинических проявлений ПКС, основными жалобами которых являлись: сохраняющийся кашель и одышка, снижение работоспособности, утомляемость, головная боль, головокружение, ощущение тумана в голове, возникшие проблемы с памятью, усвоение новой информации, нарушение внимания, понимания, проблемы в общении с окружающими, а также нарушения засыпания и

сна. Оценка степени выраженности хронической усталости и симптомов когнитивных расстройств (в баллах) проводилась с использованием Шкалы, разработанной Нестеровой И.В. и соавт. (2021): 0 – отсутствие симптомов; 1 – минимальные симптомы; 2 – средняя тяжесть симптомов; 3 – тяжелая степень симптомов; 4 – очень тяжелая степень [23] (табл. 2).

Необходимо отметить, что исследуемые показатели НГ, лимфоцитов, а также содержание NETs и клеток в апоптозе в образцах ПК пациентов с постковидным синдромом значимо не отличаются от показателей группы 1 пациентов с острой вирусной инфекцией среднетяжелого течения (табл. 1). Наиболее показательным явился предложенный расчетный интеграционный диагностический критерий, низкие значения которого могут служить фактором риска развития осложнений, таких как системный васкулит и коагулопатии, учитывая роль NET в патогенезе этих заболеваний.

Обсуждение

Полученные нами в стандартных лабораторных тестах данные соответствуют описанному в научной литературе, в которых констатируется, что клинические синдромы COVID-19 имеют несколько уникальных особенностей, в том числе, повышение уровня НГ и снижение содержания лимфоцитов, а отношение НГ к лимфоцитам являются предикторами критических случаев COVID-19 [12, 14, 16, 26, 31, 34].

При COVID-19 выявлены характерные изменения лейкоцитов, которые можно легко идентифицировать в периферической крови и которые можно легко и последовательно отслеживать, что может помочь в диагностике, прогнозировании и протоколах лечения. Сообщалось об атипичных лимфоцитах, циркулирующих в крови у пациентов с COVID-19 [20, 27]. Предполагалось, что их присутствие отражает повышенное образование специфичных к вирусу Т-клеток, что объясняет лучший исход у пациентов, у которых эти клетки циркулируют в крови [20, 29]. Были замечены активированные моноциты, которые демонстрировали выраженный анизоцитоз с заметной вакуолизацией цитоплазмы и небольшим количеством гранул, связанные с воспалением, тяжесть которых коррелирует с исходом пациента с COVID-19 [36]. В то же время при морфологической оценке НГ описано только повышение конденсированного хроматина ядра, токсические гранулы и вакуоли в цитоплазме [34].

В настоящем исследовании установлено, что в остром периоде среднетяжелой и тяжелой ко-

ТАБЛИЦА 2. ВЫРАЖЕННОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА В РАННЕМ ПОСТКОВИДНОМ ПЕРИОДЕ (30-60 ДНЕЙ) У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ (В БАЛЛАХ)

TABLE 2. SEVERITY OF CLINICAL MANIFESTATIONS OF POST-COVID SYNDROME IN THE EARLY POST-COVID PERIOD (30-60 DAYS) IN PATIENTS WITH SEVERE COVID-19 (IN POINTS)

Симптомы Symptoms	Группа сравнения Comparison group	Группа исследования 3 Study group 3
Синдром хронической усталости, непереносимость физической нагрузки, снижение работоспособности, повышенная утомляемость Chronic fatigue syndrome, exercise intolerance, decreased performance, increased fatigue	0,5 (0,1-1,0)	3,0 (3,0-3,0)
Головная боль, головокружение, мигрень Headache, dizziness, migraine	0,5 (0,1-1,0)	2,5 (2,00-3,75)
Боли в суставах, миалгии Joint pain, myalgia	0	2,0 (1,25-2,00)
Снижение процессов запоминания, трудности с концентрацией внимания, ощущение тумана в голове Decreased memory processes, difficulty concentrating, feeling of fog in the head	0	3,0 (3,00-3,75)
Панические атаки, расстройства настроения, эмоциональная лабильность, психогенная депрессия Panic attacks, mood disorders, emotional lability, psychogenic depression	0	2,0 (2,00-2,75)
Нарушения засыпания и сна Sleep and sleep disturbances	0	2,0 (1,25-2,00)
Повышенная потливость, субфебрилитет Increased sweating, subfebrile condition	0	1,5 (1,0-2,0)
Кашель и одышка Cough and shortness of breath	0	1,5 (1,0-2,0)
Общее количество баллов Total points	1,0 (0,5-2,0)	13,0 (10,75-17,25)

роновирусной инфекции у всех пациентов, отмечается появление в крови NET и клеток с патологическим апоптозом. НГ с одной стороны участвуют в клиренсе вируса посредством NETs, но при гиперактивации могут оказывать пагубное воздействие, способствуя патогенезу SARS-CoV-2 и усугубляя осложнения COVID-19, такие как ОРДС, тромбоз, развитие эндотелиита и васкулита. Расчет диагностического интеграционного критерия у пациентов с COVID-19 с учетом частоты встречаемости НГ, формирующих NET в периферической крови и находящихся в состоянии патологического апоптоза позволяет оценить тяжесть течения заболевания: при среднетяжелом течении ИПК снижается в 8,5 раза ($p < 0,05$), а при тяжелом течении в 30 раз ($p < 0,05$) по сравнению с группой условно здоровых лиц. Кроме того, установлено, что у 88,5% пациентов с ПКС, перенесших SARS-CoV-2, в ПК не выявлено патологически измененных НГ. В то же время у 11,5% пациентов с ПКС отмечено появление NETs и НГ находящихся в апоптозе,

при этом интеграционный критерий НГ-ПКС был в 8 раз меньше ($p < 0,05$), чем в группе сравнения, и не отличался от показателей пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 ($p > 0,05$), что диктует необходимость дальнейшего диспансерного наблюдения таких пациентов.

Заключение

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о том, что разработанный интеграционный диагностический критерий позволяет оценить как тяжесть течения COVID-19, так и риск возникновения постковидного синдрома. Следует подчеркнуть, что выявленные при COVID-19 характерные изменения НГ можно легко идентифицировать в ПК и последовательно отслеживать по расчетному интегральному диагностическому критерию. Значительное снижение ИДК свидетельствует о сохраняющейся гиперактивации НГ и необходимости проведения таргетной иммунотерапии, направленной на модулирование дисфункций НГ.

Список литературы / References

1. Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I., Abdullah S.M., Cruz-Martins N., Batiha G.E. Case report: hyperbilirubinemia in gilbert syndrome attenuates Covid-19-Induced metabolic disturbances. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2021, Vol.8, 642181. doi: 10.3389/fcvm.2021.642181.
2. Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I., Qusti S., Alshammari E.M., Atanu F.O., Batiha G.E. Arginine vasopressin and pathophysiology of COVID-19: An innovative perspective. *Biomed. Pharmacother.*, 2021, Vol. 143, 112193. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112193.
3. Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I., Qusti N., Cruz-Martins N., El-Saber Batiha G. Sequential doxycycline and colchicine combination therapy in Covid-19: The salutary effects. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2021, Vol. 67, 102008. doi: 10.1016/j.pupt.2021.102008.
4. Apel F., Andreeva L., Knackstedt L., Streeck R., Frese C., Goosmann C., Zychlinsky A. The cytosolic DNA sensor cGAS recognizes neutrophil extracellular traps. *Sci. Signal.*, 2021, Vol. 14, 7942. doi: 10.1126/scisignal.aax7942.
5. 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 Y., Egeblad M. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 6, 20200652. doi: 10.1084/jem.20200652.
6. Berthelot J., Drouet L., Lioté F., Kawasaki-like diseases and thrombotic coagulopathy in COVID-19: Delayed over-activation of the STING pathway? *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, no. 9, pp. 1514-1522.
7. Bonow R.O., Fonarow G.C., O'Gara P.T., Yancy C.W. Association of coronavirus disease 2019 (COVID-19) with myocardial injury and mortality. *JAMA Cardiol.*, 2020, Vol. 5, no. 7, pp. 751-753.
8. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, Vol. 303, pp. 1532-1535.
9. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., Qiu Y., Wang J., Liu Y., Wei Y., Xia J., Yu T., Zhang X., Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 2020, Vol. 395, no. 10223, pp. 507-513.
10. Darcy C., Minigo G., Piera K., Davis J., McNeil Y., Chen Y., Volkheimer A.D., Weinberg J.B., Anstey N.M., Woodberry T. Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T Cell function in septic shock patients. *Crit. Care*, 2014, Vol. 18, 163. doi: 10.1186/cc14003.
11. Dennison D., Al Khabori M., Al Mamari S., Aurelio A., Al Hinai H., Al Maamari K., Alshekaili J., Al Khadouri G. Circulating activated neutrophils in COVID-19: An independent predictor for mechanical ventilation and death. *Int. J. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 106, pp. 155-159.
12. Fois A.G., Paliogiannis P., Scano V., Cau S., Babudieri S., Perra R., Ruzzittu G., Zinellu E., Pirina P., Carru C., Arru L.B., Fancellu A., Mondoni M., Mangoni A. A., Zinellu A. The systemic inflammation index on admission predicts in-hospital mortality in COVID-19 patients. *Molecules*, 2020, Vol. 25, 5725. doi: 10.3390/molecules25235725.
13. Hiroki C., Toller-Kawahisa J., Fumagalli M., Colon D., Figueiredo L., Fonseca B., Franca R.F.O., Cunha F.Q. Neutrophil extracellular traps effectively control acute chikungunya virus infection. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 10, 3108. doi: 10.3389/fimmu.2019.03108.
14. Jimeno S., Ventura P.S., Castellano J.M., García-Adasme S.I., Miranda M., Touza P., Lllana I.L., López-Escobar A. Prognostic implications of neutrophil-lymphocyte ratio in COVID-19. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2021, Vol. 51, no. 1, 13404. doi: 10.1111/eci.13404.
15. Jorch S.K., Kubersky P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat. Med.*, 2017, Vol. 23, pp. 279-287.
16. Kantri A., Ziati J., Khalis M., Haoudar A., Aidaoui K.E., Daoudi Y., Chikhaoui I., Yamani K.E., Mouhaoui M., Bakkouri J.E., Dini N., Mahi M., Naitlho A., Bahlaoui A., Bennana A., Noussair M., Belyamani L., Kettani Ch.El. Hematological and biochemical abnormalities associated with severe forms of COVID-19: A retrospective single-center study from Morocco. *PLoS One*, 2021, Vol. 16, 0246295. doi: 10.1371/journal.pone.0246295.
17. Lefrançois E., Mallavia B., Zhuo H., Calfee C.S., Looney M.R. Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury. *JCI Insight*, 2018, Vol.3, no. 3, 98178. doi: 10.1172/jci.insight.98178.
18. Masso-Silva J., Moshensky A., Lam M., Odish M., Patel A., Xu L., Hansen E., Trescott S., Nguyen C., Kim R., Perofsky K., Perera S., Ma L., Pham J., Rolfsen M., Olay J., Shin J., Dan J.M., Abbott R.K., Ramirez S., Alexander T.H., Lin G.Y., Fuentes A.L., Advani I., Gunge D., Pretorius V., Malhotra A., Sun X., Duran J., Hepokoski M., Crotty Sh., Coufal N.G., Meier A., Crotty A.L.E. 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, Vol. 74, pp. 479-489.

19. McKenna E., Wubben R., Isaza-Correa J.M., Melo A.M., Mhaonaigh A.U., Conlon N., O'Donnell J.S., Ní Cheallaigh C., Hurley T., Stevenson N.J., Little M.A., Molloy E.J. Neutrophils in COVID-19: Not innocent bystanders. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 864387. doi: 10.3389/fimmu.2022.864387.
20. Merino A., Vlagea A., Molina A., Egri N., Laguna J., Barrera K., Boldú L., Acevedo A., Díaz-Pavón M., Sibina F., Bascón F., Sibila O., Juan M., Rodellar J. Atypical lymphoid cells circulating in blood in COVID-19 infection: morphology, immunophenotype and prognosis value. *J. Clin. Pathol.*, 2022, Vol. 75, pp. 104-111.
21. Middleton E.A., He X.Y., Denorme F., Campbell R.A., Ng D., Salvatore S.P., Mostyka M., Baxter-Stoltzfus A., Borczuk A.C., Loda M., Cody M.J., Manne B.K., Portier I., Harris E.S., Petrey A.C., Beswick E.J., Caulin A.F., Iovino A., Abegglen L.M., Weyrich A.S., Rondina M.T., Egeblad M., Schiffman J.D., Yost C.C. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood*, 2020, Vol. 136, no. 10, pp. 1169-1179.
22. Naumenko V., Turk M., Jenne C., Kim S. Neutrophils in Viral Infection. *Cell Tissue Res.*, 2018, Vol. 371, pp. 505-516.
23. Nesterova I.V., Khalturina E.O., Malinovskaya V.V., Nguen Duen L. Recombinant IFN α 2b in complex with immunotropic drugs restored antiviral functions of subset IFN α / β RI⁺IFN γ R⁺TLR $_4$ ⁺ neutrophilic granulocyte and demonstrated good clinical efficacy in patients with active chronic herpes-viral infections and chronic fatigue syndrome. Ebook Edition, Filodiritto Publisher, 2021, pp. 70-78.
24. Nicolai L., Leunig A., Brambs S., Kaiser R., Joppich M., Hoffknecht M.L., Gold C., Engel A., Polewka V., Muenchhoff M., Hellmuth J.C., Ruhle A., Ledderose S., Weinberger T., Schulz H., Scherer C., Rudelius M., Zoller M., Keppler O.T., Zwißler B., von Bergwelt-Baildon M., Kääb S., Zimmer R., Bülow R.D., von Stillfried S., Boor P., Massberg S., Pekayvaz K., Stark K. Vascular neutrophilic inflammation and immunothrombosis distinguish severe COVID-19 from influenza pneumonia. *J. Thromb. Haemost.*, 2021, Vol. 19, no. 2, pp. 574-581.
25. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2018, Vol. 18, no. 2, pp. 134-147.
26. Qu R., Ling Y., Zhang Y.H., Wei L.Y., Chen X., Li X.M., Liu X.Y., Liu H.M., Guo Z., Ren H., Wang Q. Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. *J. Med. Virol.*, 2020, Vol. 92, no. 9, pp. 1533-1541.
27. Singh A., Sood N., Narang V., Narang V., Goyal A. Morphology of COVID-19-affected cells in peripheral blood film. *BMJ Case Rep.*, 2020, Vol. 13, no. 5, e236117. doi: 10.1136/bcr-2020-236117.
28. Teluguakula N. Neutrophils set extracellular traps to injure lungs in coronavirus disease 2019. *J. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 223, no. 9, pp. 1503-1505.
29. Thiam H., Wong S., Wagner D., Waterman C. Cellular mechanisms of NETosis. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.*, 2020, Vol. 36, pp. 191-218.
30. Veras F.P., Pontelli M.C., Silva C.M., Toller-Kawahisa J.E., de Lima M., Nascimento D.C., Schneider A.H., Caetité D., Tavares L.A., Paiva I.M., Rosales R., Colón D., Martins R., Castro I.A., Almeida G.M., Lopes M.I.F., Benatti M.N., Bonjorno L.P., Giannini M.C., Luppino-Assad R., Almeida S.L., Vilar F., Santana R., Bollela V.R., Auxiliadora-Martins M., Borges M., Miranda C.H., Pazin-Filho A., da Silva L.L.P., Cunha L.D., Zamboni D.S., dal-Pizzol F., Leiria L.O., Siyuan L., Batah S., Fabro A., Mauad T., Dolhnikoff M., Duarte-Neto A., Saldiva P., Cunha T.M., Alves-Filho J.C., Arruda E., Louzada-Junior P., Oliveira R.D., Cunha F.Q. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 12, 20201129. doi: 10.1084/jem.20201129.
31. Wang X., Li X., Shang Y., Wang J., Zhang X., Su D., Zhao S., Wang Q., Liu L., Li Y., Chen H. Ratios of neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte predict all-cause mortality in inpatients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): a retrospective cohort study in a single medical centre. *Epidemiol. Infect.*, 2020, Vol. 148, e211. doi: 10.1017/S0950268820002071.
32. Wang Y., Luo L., Braun O.Ö., Westman J., Madhi R., Herwald H., Mörgelin M., Thorlacius H. Neutrophil extracellular trap-microparticle complexes enhance thrombin generation via the intrinsic pathway of coagulation in mice. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, 4020. doi: 10.1038/s41598-018-22156-5.
33. Wu C., Chen X., Cai Y., Xia J., Zhou X., Xu Sh., Huang H., Zhang Li, Zhou X., Du Ch., Zhang Y., Song J., Wang S., Chao Y., Yang Z., Xu J., Zhou X., Chen D., Xiong W., Xu L., Zhou F., Jiang J., Bai Ch., Zheng J., Song Y. Risk Factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern. Med.*, 2020, Vol. 180, no. 7, pp. 934-943.
34. Yang A.-P., Liu J., Tao W., Li H. The Diagnostic and predictive role of NLR, d-NLR and PLR in COVID-19 patients. *Int. Immunopharmacol.*, 2020, Vol. 84, 106504. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106504.
35. Yip C.Y.C., Yap E.S., de Mel S., Teo Z. Y., Lee Ch.-T., Kan S., Lee M.C.C., Loh W.N.H., Lim E.L., Lee Sh.Y. Temporal changes in immune blood cell parameters in COVID-19 infection and recovery from severe infection. *Br. J. Haematol.*, 2020, Vol. 190, no. 1, pp. 33-36.

36. Zhang D., Guo R., Lei L., Liu H., Wang Y., Wang Y., Qian H., Dai T., Zhang T., Lai Y., Wang J., Liu Z., Chen T., He A., O'Dwyer M., Hu J. COVID-19 infection induces readily detectable morphological and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes, the severity of which correlate with patient outcome. *MedRxiv*, 2020.03.24.20042655. doi: 10.1101/2020.03.24.20042655.

37. Zuo Y., Zuo M., Yalavarthi S., Gockman K., Madison J., Shi H., Madison J.A., Woodard H.Sh.W., Lezak S.P., Lugogo N.L., Knight J.S., Kanthi Y. Neutrophil extracellular traps and thrombosis in COVID-19. *J. Thromb. Thrombolysis*, 2021, Vol. 51, no. 2, pp. 446-453.

Авторы:

Нестерова И.В. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар; профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адаптологии факультета непрерывного медицинского образования Медицинского института, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Атажыхова М.Г. — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Матушкина В.А. — ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Тетерин Ю.В. — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Городин В.Н. — д.м.н., доцент, заведующий кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Чудилова Г.А. — д.б.н., доцент, заведующая отделом клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Authors:

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar; Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, Medical Institute, P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Atazhakhova M.G., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Matushkina V.A., Assistant Professor, Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Teterin Yu.V., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Gorodin V.N., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chudilova G.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Scientific Research Laboratory, Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation