

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-225>

Оценка интенсивности дегрануляции и изменений фенотипа нейтрофилов по уровню экспрессии $Fc_{\gamma}RIIIb$ в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов

Кравцов А.Л.[✉], Бугоркова С.А., Ключева С.Н., Гончарова А.Ю.,
Кожевников В.А., Чумачкова Е.А., Портенко С.А., Щербакова С.А.

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

Аннотация

Введение. Тяжесть течения COVID-19 коррелирует с относительным содержанием в крови пациентов специфической популяции нейтрофильных гранулоцитов (НГ) низкой плотности, клетки которой характеризуются сниженной гранулярностью, высокой неоднородностью по экспрессии $Fc_{\gamma}RIIIb$ (CD16) и склонностью к спонтанному аутолизису (нетозу).

Цель исследования — сравнить интенсивность дегрануляции НГ и экспрессию $Fc_{\gamma}RIIIb$ на этих клетках в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов.

Материалы и методы. С помощью проточной цитометрии исследовали лейкоциты крови 40 пациентов с диагнозом COVID-19, 33 реконвалесцентов и 20 здоровых доноров (контроль). Для идентификации НГ (CD16⁺-гранулоцитов) и оценки поверхностной экспрессии молекулярного триггера нетоза $Fc_{\gamma}RIIIb$ применяли одноцветный реагент меченых моноклональных антител CD16-FITC. Иммунофенотипирование лимфоцитов осуществляли с использованием двух четырехцветных реагентов. Кроме того, в каждом образце цельной крови, окрашенном по Lyse/No-Wash-протоколу, определяли содержание клеточного дебриса. Присутствие в крови нейтрофилов на стадии нетоза подтверждали с помощью микроскопии. Продукцию цитокинов клетками определяли на автоматическом иммуноферментном анализаторе.

Результаты. На фоне характерных изменений субпопуляционного состава лимфоцитов и продукции цитокинов в крови больных COVID-19 с острой пневмонией, гипоксией и тахикардией, в сравнении с реконвалесцентами, перенёсшими тяжёлую и среднетяжёлую форму болезни, зарегистрирована более интенсивная дегрануляция НГ (в 2,6 раза), более высокая степень неоднородности по экспрессии CD16 (в 1,8 раза) и повышенная интенсивность лейкоцитоллиза (в 1,6 раза). У реконвалесцентов степень различий с контролем по данным показателям зависела от тяжести ранее перенесённого заболевания.

Заключение. Характер изменения изученных в работе показателей у пациентов с COVID-19 в острый период болезни и в период реконвалесценции подтверждает возможный механизм развития осложнений вследствие нарушения баланса между активностью высвобождаемой из гранул НГ эластазы и её плазменным ингибитором α_1 -антитрипсином.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, дегрануляция нейтрофилов, нейтрофилы низкой плотности, нетоз, экспрессия $Fc_{\gamma}RIIIb$ нейтрофилами, проточная цитометрия

Этическое утверждение. Исследование проводилось на основании добровольного информированного согласия пациентов. Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике при РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 9 от 21.10.2020).

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке бюджетного финансирования в рамках темы НИР АААА-А21-121012090061-9.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Ключева С.Н., Гончарова А.Ю., Кожевников В.А., Чумачкова Е.А., Портенко С.А., Щербакова С.А. Оценка интенсивности дегрануляции и изменений фенотипа нейтрофилов по уровню экспрессии $Fc_{\gamma}RIIIb$ в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(2):172–184.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-225>

Assessment of neutrophil degranulation intensity and changes in neutrophil phenotype by FC_γR11b expression level in blood of patients with COVID-19 and convalescents

Aleksandr L. Kravtsov[✉], Svetlana A. Bugorkova, Svetlana N. Klyueva, Anastasia Yu. Goncharova, Vitaly A. Kozhevnikov, Elena A. Chumachkova, Svetlana A. Portenko, Svetlana A. Scherbakova

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia

Abstract

Introduction. Disease severity in hospitalized COVID-19 patients correlates with the relative content in the blood of a specific low-density neutrophilic granulocyte (NG) population, whose cells are characterized by reduced granularity, high heterogeneity in the expression of FC_γR11b (CD16) and a tendency to spontaneous autolysis (netosis).

The aim of the study was to compare the intensity of NG degranulation and the FC_γR11b expression by these cells in blood of patients with COVID-19 and convalescents.

Materials and methods. The blood leukocytes of 40 patients diagnosed with COVID-19, 33 convalescents and 20 healthy donors (control) were examined using flow cytometry. To identify NG (CD16⁺-granulocytes) and to assess the surface expression of the netosis molecular trigger (FC_γR11b), a single-color reagent of labeled monoclonal antibodies CD16-FITC was used. Immunophenotyping of lymphocytes was performed using two four-color reagents. In addition, cell debris content was determined in each Lyse/No-Wash-stained whole blood sample. The presence of neutrophils at the stage of netosis was confirmed by microscopy. Cytokine production was determined on an automatic enzyme immunoassay analyzer.

Results. Against the background of characteristic changes in the lymphocyte subpopulation composition and cytokine production, in blood of COVID-19 patients with acute pneumonia, hypoxia and tachycardia a more intense degranulation of NG (2.6 times), higher degree of CD16 expression heterogeneity (1.8 times) and an increased leukocytolysis intensity (1.6 times) were observed compared to convalescents who have undergone severe and moderate forms of the disease. In convalescents, the degree of differences of these indicators compared to control values varied in concordance with the disease severity.

Conclusion. The nature of changes in the parameters studied in COVID-19 patients in the acute phase of the disease and during the period of convalescence confirms the possible mechanism of the development of complications due to an imbalance between the activity of elastase released from NG granules and its plasma inhibitor α₁-antitrypsin.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, neutrophil degranulation, low density neutrophils, netosis, FC_γR11b expression by neutrophils, flow cytometry

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" (protocol No. 9, October 21, 2020).

Funding source. The study was supported by budget funding within the framework of the research topic No AAA-A-21-121012090061-9.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., Goncharova A.Yu., Kozhevnikov V.A., Chumachkova E.A., Portenko S.A., Shcherbakova S.A. Assessment of neutrophil degranulation intensity and changes in neutrophil phenotype by FC_γR11b expression level in blood of patients with COVID-19 and convalescents. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(2):172–184.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-225>

Введение

Новая коронавирусная инфекция COVID-19 (CoronaVirus Disease 2019), вызываемая РНК-содержащим вирусом SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2), оказалась серьёзным вызовом для здравоохранения вследствие недостаточной изученности молекулярных механизмов её патогенеза. Полноценное понимание патофизиологических механизмов поражения при

COVID-19 сердечно-сосудистой системы на сегодняшний день не сформировано [1]. До конца не ясно, почему критически тяжёлая форма COVID-19 с грубыми нарушениями гемостаза, проявляющимися в виде диссеминированного внутрисосудистого свёртывания крови и острого респираторного дистресс-синдрома, развивается в организме лишь у 5% пациентов, заражённых SARS-CoV-2 [2]. Мало изучен относительный вклад различных типов кле-

ток иммунной системы в развитие характерных для COVID-19 инфекционных осложнений, и прежде всего это касается нейтрофильных гранулоцитов (НГ) — самой многочисленной и мобильной популяции лейкоцитов крови человека [3, 4].

Повышенный интерес к изучению роли НГ в иммуно- и патогенезе COVID-19 исследователи стали проявлять с конца 2020 г., что объясняют установлением способности SARS-CoV-2 оказывать на нейтрофилы прямое стимулирующее воздействие, запускающее в условиях *in vitro* процесс аутолизиса этих клеток с образованием ДНК-сетей нейтрофильных внеклеточных ловушек (Neutrophil Extracellular Traps — NETs) [5, 6]. Эту способность подтверждают результаты многочисленных клинических исследований, и, согласно современной гипотезе, нетоз (NETosis) может играть в патогенезе новой коронавирусной инфекции ключевую роль [2].

По мнению российских специалистов, повышенное содержание NETs в мазках крови, окрашенных по Романовскому–Гимзе (более 16%), может служить критерием негативного прогноза течения COVID-19 и риска летального исхода [7]. Для быстрой детекции NETs, количественной оценки интенсивности дегрануляции нейтрофилов и характеристики изменённого протетического фенотипа этих клеток за рубежом начинают применять объективные проточно-цитометрические методы исследования лейкоцитов в микрообъёмах цельной крови пациентов. Эти методы не требуют разделения популяций лейкоцитов в градиенте плотности и позволяют быстро проводить иммунофенотипирование в суммарной лейкоцитарной популяции как лимфоцитов, так и гранулоцитов [8–10].

С помощью проточной цитометрии недавно установлено, что в крови пациентов с диагнозом COVID-19 появляется особая специфическая популяция нейтрофилов низкой плотности (Low Density Neutrophils — LDNs) со сниженной степенью гранулярности и сниженным уровнем экспрессии на клетку Fc γ R3b (CD16). Доля таких клеток (CD16^{INT}-LDNs), характеризующихся гиперпродукцией провоспалительных цитокинов (интерлейкина (ИЛ)-6, ИЛ-8, фактора некроза опухоли- α (ФНО- α)) и лейкоцитарных протеиназ, а также склонностью к спонтанному формированию NETs, нарастала в крови при негативном прогнозе COVID-19, достигая максимума перед смертью больного. При благоприятном прогнозе относительное содержание CD16^{INT}-LDNs в процессе терапии в крови снижалось. У реконвалесцентов клетки данной популяции присутствовали в крови в различном количестве [4], но причины этих различий не изучены.

Цель настоящей работы — сравнить интенсивность дегрануляции нейтрофилов и экспрессию ими Fc γ R3b в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов.

Материалы и методы

Оценку степени гранулярности лейкоцитов и их иммунофенотипирование в крови пациентов с диагнозом COVID-19, подтверждённым выявлением РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР, проводили летом 2020 г., в период 1-й волны эпидемии COVID-19 в Саратовской области.

Клинический материал (кровь) поступал в пробирках с гепарином из профильных медицинских организаций г. Саратова и г. Энгельса в течение 3 ч. Забор материала производили на основании письменного согласия пациентов на участие в исследовании, проводимом в рамках плановой научной тематики учреждения, одобренной локальным этическим комитетом РосНИПЧИ «Микроб».

Группы для наблюдения формировали на основании анализа совокупных данных: среди больных в остром периоде заболевания (согласно данным пульсоксиметрии, результатам измерения перед забором крови температуры тела, частоты сердечных сокращений (ЧСС), частоты дыхательных движений (ЧДД) и результатам КТ/R⁰) по степени тяжести течения инфекции; среди реконвалесцентов по степени тяжести течения ранее перенесённой коронавирусной инфекции (через 1 нед – 3 мес после болезни) [11]. Для сравнения была взята группа здоровых доноров (20 человек) в возрасте 23–50 лет. При выполнении работы были обследованы 93 человека, которые были распределены на 6 групп (**табл. 1**).

Прогрессирование болезни до альвеолярной стадии с развитием индуцированной SARS-CoV-2-пневмонии подтверждалось с помощью компьютерной томографии (КТ) и/или обзорной рентгенографии органов грудной клетки. У 34 (85%) из 40 обследуемых пациентов мужского (30%) и женского (70%) пола в возрасте 17–92 года (медиана 60 [минимум–максимум — 51–71]) с острым течением заболевания зарегистрированы КТ-признаки поражения лёгких различной степени (КТ1–КТ4). У пациентов из группы II доля лиц с показателями КТ2, КТ3 и КТ4 составляла 52,9, 41,2 и 5,9% соответственно. Среди больных из группы III доля лиц с показателями КТ1 и КТ2 составляла 76,5 и 23,5% соответственно. У реконвалесцентов (33 человека, 24% мужчин и 76% женщин в возрасте 30–65 лет (52 [46–58]) анализировали результаты КТ, полученные в острый период болезни. Документальное подтверждение проведённого КТ-исследования было представлено 19 (57,6%) добровольцами. Если у ранее перенёвших COVID-19 (группа V) в момент госпитализации в стационар доля лиц с КТ2–КТ3 составляла 53,8%, то среди пациентов, получавших амбулаторную помощь (группа VI), лишь у 6 добровольцев по результатам КТ установлены поражения лёгких 1-й и 2-й степени.

Имунофенотипирование лейкоцитов проводили в микрообъёмах цельной крови с помощью

Таблица 1. Описание групп
Table 1. Description of the study groups

Обозначение группы Name of group	Группа Group	Описание Description
I (n = 20)	Группа сравнения Comparison group	Практически здоровые доноры с нормальной температурой, SpO ₂ > 97%, ЧДД < 20 в 1 мин, ЧСС < 80 уд/мин Conditionally healthy donors with normal temperature, SpO ₂ > 97%, RR < 20 in 1 min, and HR < 80 bpm
II (n = 17)	Пневмония с дыхательной недостаточностью Respiratory pneumonia	Лица с нарушенной дыхательной функцией лёгких и изменённым состоянием сердечно-сосудистой системы: SpO ₂ ≤ 93%, ЧДД > 30 в 1 мин, ЧСС > 90 уд/мин при температуре > 38°C Persons with impaired respiratory function of the lungs and changes in the state of cardiovascular system: SpO ₂ ≤ 93%, RR > 30 in 1 min, and HR > 90 bpm at temperatures > 38°C
III (n = 17)	Пневмония без дыхательной недостаточности Pneumonia without respiratory distress	Лица без нарушения дыхательной функции, с температурой < 38°C, SpO ₂ > 95%, ЧДД < 25 в 1 мин, ЧСС < 90 уд/мин Persons without respiratory impairment, with temperature < 38°C, SpO _{2p} > 95%, RR < 25 in 1 min, and HR < 90 bpm
IV (n = 6)	ОРВИ Acute respiratory viral infection	Только признаки ОРВИ, отсутствие пневмонии Only signs of acute respiratory viral infection, no pneumonia
V (n = 15)	Реконвалесценты после тяжёлого/среднетяжёлого течения COVID-19 Reconvalescents after a severe/moderate course of COVID-19	Лица, завершившие лечение COVID-19 в условиях стационара, с нормальной температурой и нормальными значениями показателей SpO ₂ , ЧДД и ЧСС Patients who completed COVID-19 treatment in a clinical setting with normal temperature, SpO ₂ , HR, and RR
VI (n = 18)	Реконвалесценты после лёгкого течения COVID-19 Reconvalescents after a mild course of COVID-19	Лица, успешно завершившие курс лечения COVID-19 в амбулаторных условиях, с нормальной температурой и нормальными значениями SpO ₂ , ЧДД и ЧСС Individuals who successfully completed COVID-19 outpatient treatment, with normal temperature, SpO ₂ , HR, and RR

Примечание. SpO₂ — показатель насыщения артериальной крови кислородом (сатурация).

Note. SpO₂ — arterial oxygen saturation index (saturation); RR — respiratory rate; HR — heart rate.

процедуры Lyse/No-Wash («BD Bioscience»), исключая потерю клеток и клеточного дегриса при окраске образцов флюоресцирующими реагентами [12, 13]. Использовали два четырехцветных реагента меченых моноклональных антител Cyto-Stat CD45-FITC, CD4-PE, CD8-ECD, CD3-PC5 и Cyto-Stat CD45-FITC, CD56-PE, CD19-ECD, CD3-PC5 («Beckman Coulter») для быстрого определения в крови методом проточной цитометрии относительного содержания Т-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺CD19⁻), В-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁻CD19⁺), Т-лимфоцитов-хелперов (CD45⁺CD3⁺CD4⁺), цитотоксических Т-клеток (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), NK-клеток (CD45⁺CD3⁻CD56⁺) и NKT-клеток (CD45⁺CD3⁺CD56⁺). Индивидуальные значения иммунорегуляторных индексов вычисляли как отношение числа хелперов (индукторов) к числу цитотоксических Т-клеток (супрессоров). Повреждённые лейкоциты идентифицировали и подсчитывали в крови как клеточный дегрис — объекты с низким уровнем экспрессии на клетку общего лейкоцитарного антигена CD45 [13].

В гейте гранулоцитов крови с помощью одноцветного реагента CD16-FITC («Beckman Coulter») идентифицировали нейтрофилы (CD16⁺-гранулоциты) и устанавливали долю НГ в суммарной гранулоцитарной популяции. Определяли средний уровень экспрессии Fc_γRIIIb (CD16) на поверхности нейтро-

филов (Mean Fluorescence Intensity — MFI, в условных единицах — каналах цитометра), а также оценивали неоднородность (CV, %) отдельных клеток по данному параметру [4, 14]. Степень гранулярности НГ определяли в условных единицах интенсивности бокового светорассеяния (Mean Side Scatter Intensity — MSSI) [3]. Дегрануляцию этих клеток в крови каждого обследуемого оценивали (в %) по отношению к среднему значению гранулярности (M) в контроле [15].

Для измерения интенсивности светорассеяния и иммунофлюоресценции отдельных клеток в потоке использовали проточный цитофлюориметр «DakoCytomation» с программным обеспечением «Summit v.4.3 Built 2445» [14]. Присутствие в исследуемых образцах цельной крови нейтрофилов, находящихся на стадии аутолизиса (нетоза), подтверждали результатами микроскопической детекции NETs в мазках крови («Olympus CX41»), окрашенных по Романовскому–Гимзе в соответствии с методикой [7]. Спонтанную и индуцированную конканавалином А продукцию цитокинов клетками крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов для детекции интерферона-γ (ИФН-γ), ФНО-α (ЗАО «Вектор-Бест») и ИЛ-17А («eBioscience»). Результаты учитывали на автоматическом иммуноферментном

анализаторе «Lazurit» («Dynex Technologies») при длине волны 450 нм [16].

Полученные данные статистически обрабатывали с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016», «Statistica 10.0» («StatSoft Inc.»). В исследуемых группах данные представляли в виде медианы (Me) и квартильных отклонений (Q_{25} – Q_{75}). Для расчёта межгрупповых ассоциаций использовали U-критерий Манна–Уитни. Связи между показателями оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Значение $p < 0,05$ считали статистически значимым.

Результаты

У пациентов с COVID-19 в острый период заболевания и в период реконвалесценции доля НГ в суммарной популяции гранулоцитов крови была выше, чем у относительно здоровых доноров. При этом у больных и перенёсших COVID-19 регистрировали снижение гранулярности этих клеток (дегрануляция), степень выраженности которой была максимальной в группе II — у пациентов на фоне пневмонии с дыхательной недостаточностью (табл. 2).

На рис. 1 представлены частотные распределения отдельных лейкоцитов по степени грану-

лярности и уровню экспрессии клетками общего специфического лейкоцитарного антигена (CD45), наглядно иллюстрирующие факт 48% дегрануляции нейтрофилов в крови одного из пациентов группы II. Кроме того, на рис. 1 хорошо видно, что в периферической крови больного COVID-19 содержится в 2,6 раза больше клеточного дебриса, чем у здоровых доноров. Визуальный микроскопический анализ мазков крови на присутствие NETs подтвердил известный факт активации в крови больных COVID-19 процесса аутолизиса НГ (нетоза).

У больных (в группах II, III, IV) и реконвалесцентов, относящихся к группе V, интенсивность дегрануляции нейтрофилов составила в сравнении с показателями у здоровых доноров в среднем 48,8, 28,1, 23,9 и 18,7% соответственно. Достоверные изменения по показателю гранулярности, а также по содержанию в крови клеточного дебриса частично сохранялись в крови реконвалесцентов группы V до 3 мес после перенесённого заболевания. У пациентов группы II интенсивность лейкоцитоллиза в крови была в 1,8 раза выше, чем у лиц группы III, при отсутствии сдвигов по данному параметру у пациентов группы I (табл. 2). Сравнение данных в исследуемых группах выявило сильную обратную корреляционную связь между индивидуальными

Таблица 2. Относительное содержание в крови гранулоцитов (нейтрофилов) и степень их гранулярности, экспрессия $Fc\gamma RIIIb$ (CD16) нейтрофилами больных COVID-19 и реконвалесцентов, Me [Q_{25} – Q_{75}]

Table 2. Relative content of blood granulocytes (neutrophils) and the level of its granularity, expression of $Fc\gamma RIIIb$ (CD16) by blood neutrophils of COVID-19 patients and convalescents, Me [Q_{25} – Q_{75}]

Показатель Parameter	Группа / Group					
	I (n = 20)	II (n = 17)	III (n = 17)	IV (n = 6)	V (n = 15)	VI (n = 18)
Содержание в крови гранулоцитов, % Granulocyte content in the blood, %	61,4 [57–64,6]	54,3 [48–60]*	46,3 [42–61]*	62 [48–70]	53 [48–65]	60 [50–71]
Доля нейтрофилов в гранулоцитарной популяции, % Neutrophils in granulocyte population, %	85 [82–90]	95 [91–97]*	94 [90–98]*	93 [91–95]*	94 [92–95]*	92 [91–93]*
Гранулярность нейтрофилов, MSSl ($\times 10^2$) Neutrophil granularity, MSSl ($\times 10^2$)	51 [49,8–54,8]	28 [22,9–35,4]**	38 [34,1–39,2]**	39 [38,7–40,9]**	42 [41,2–48,0]**	48 [46,2–50,3]*
Экспрессия нейтрофилами CD16, MFI Expression CD16 by neutrophils, MFI	344 [318–364]	119 [94–139]**	169 [160–185]**	200 [178–225]**	183 [158–199]**	212 [198–228]**
Коэффициент вариации по экспрессии CD16 нейтрофилами, % Coefficient of variation for CD16 expression, %	22 [20–28]	81 [61–98]**	49 [40–66]**	52 [46–58]**	38 [28–50]**	30 [23–32]**
Клеточный дебрис (лизис лейкоцитов крови), % Cell debris (blood leukocytolysis), %	4,6 [4,0–7,2]	14 [10,5–18,3]*	8,5 [6,0–12,6]**	7,7 [5,6–11,4]**	9,4 [8,8–12,2]**	6,4 [5,8–10,1]*

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с группой I; ** $p < 0,05$ по сравнению с группой II.

Note. * $p < 0,05$ in comparison with the group I; ** $p < 0,05$ in comparison with the group II.

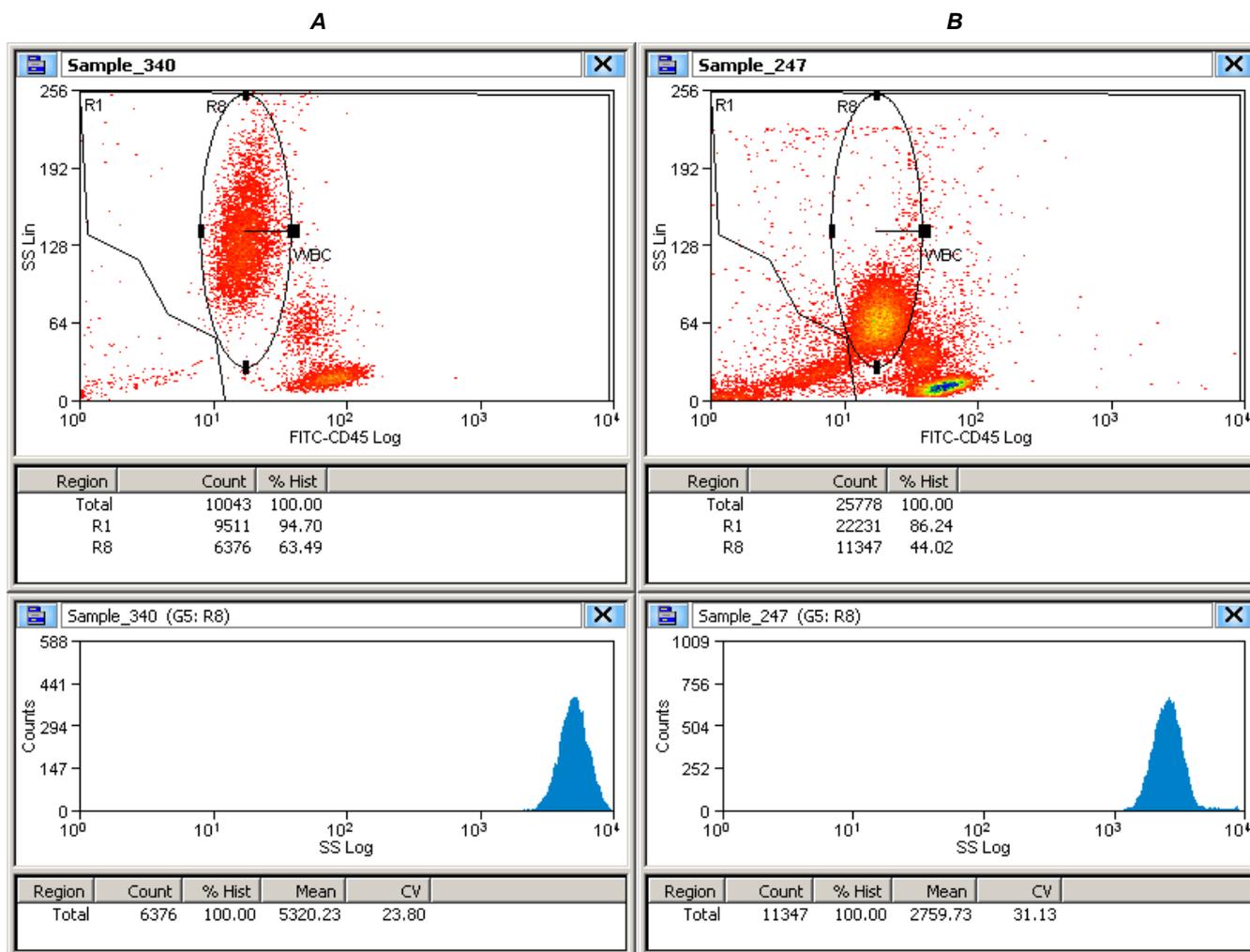


Рис. 1. Интенсивная дегрануляция нейтрофилов и активация лейкоцитоллиза в крови больного среднетяжёлой формой COVID-19 (B) в сравнении с результатом анализа лейкоцитов крови здорового донора (A).

На опытной и контрольной цитограммах (сверху) гранулоциты крови (нейтрофилы) локализируются в регионе R8, отделяясь по интенсивности бокового светорассеяния (степени своей гранулярности — SS), от лимфоцитов и моноцитов. Под каждой цитограммой представлено частотное распределение отдельных клеток в гейте гранулоцитов (в регионе R8) по степени гранулярности в логарифмическом режиме измерения для количественной оценки интенсивности дегрануляции нейтрофилов в опытном образце (в данном случае $100\% \times (5320 - 2759)/5320 = 48\%$). Вне региона R1 на цитограммах учитываются сигналы от клеточного дебриса (лизированных лейкоцитов), доля которых в крови больного (Total – R1 = $100\% - 86,24\% = 13,76\%$) существенно выше, чем в контроле ($100\% - 94,7\% = 5,3\%$).

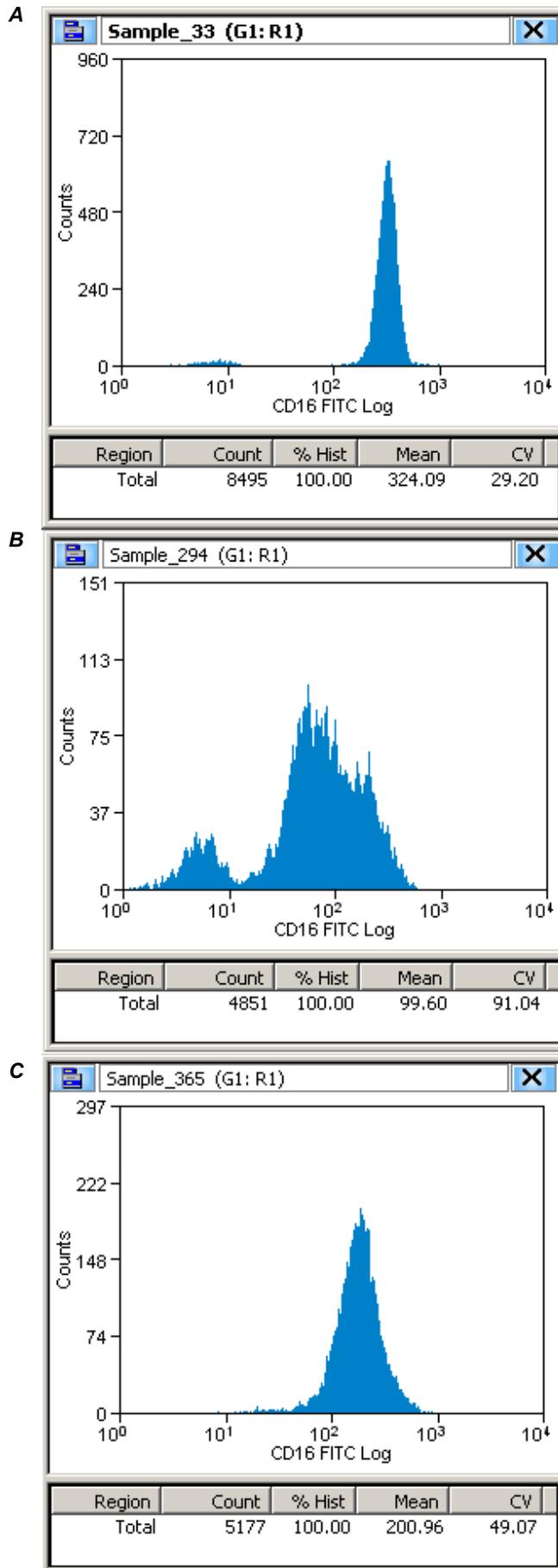
Fig. 1. Intensive neutrophil degranulation and leukocytolysis activation in the blood of patient with a moderate to severe form of COVID-19 (B) in comparison with the result of the healthy donor blood leukocyte analysis (A).

On the experimental and control cytograms (top), blood granulocytes (neutrophils) are localized in the R8 region, separating from monocytes and lymphocytes by the degree of their granularity (light Side Scatter intensity — SS). Under each cytogram the frequency distribution of individual cells in the gate of granulocytes (in the R8 region) according to the degree of granularity is shown in logarithmic measurement mode to estimate the neutrophil degranulation intensity in the studied sample (in this case, $5320 - 2759/5320 = 48\%$). Outside the R1 region of cytograms the signals from cellular debris (lysed leukocytes) are taken into account. The proportion of this signals in the patient's blood (Total – R1 = $100\% - 86,24\% = 13,76\%$) is significantly higher than in the control ($100\% - 94,7\% = 5,3\%$).

показателями сатурации (SpO_2) и интенсивности дегрануляции нейтрофилов периферической крови ($r = -0,97$; $p = 0,00001$), а также сильную прямую корреляцию между ЧСС и содержанием в крови клеточного дебриса ($r = 0,8$; $p = 0,00016$).

Средний уровень экспрессии $Fc\gamma RIIIb$ (CD16) на поверхности НГ больных COVID-19 на фоне пневмонии с признаками дыхательной недостаточности (группа II) был в 3 раза ниже нормы. В периферической крови пациентов с пневмонией

(группы II и III) появлялись НГ как с низким ($CD16^{LOW}$), так и, преимущественно, с промежуточным значением данного параметра ($CD16^{INT}$), которые отсутствовали в образцах цельной крови здоровых доноров группы I (рис. 2). В крови реконвалесцентов нейтрофилы с фенотипом $CD16^{INT}$ присутствовали, но в сравнительно небольшом количестве. В результате степень неоднородности НГ у больных и ранее перенёсших COVID-19 пациентов различалась по уровню экспрессии CD16 на клет-



ку (табл. 2), что регистрировали в виде различий в значениях коэффициентов вариации гистограмм, представленных в качестве примера на рис. 2. Между индивидуальными значениями CV и ЧДД была выявлена сильная прямая корреляционная зависимость ($r = 0,85$; $p = 0,00001$).

Отмечали подавление индуцированной секреции ИФН- γ клетками крови больных COVID-19, но не реконвалесцентов. Спонтанная продукция ФНО- α в кровь пациентов с тяжёлой формой пневмонии была выше, чем в кровь здоровых доноров и лиц групп III и IV. Однако после неспецифической Т-клеточной стимуляции этот провоспалительный цитокин присутствовал в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов в меньшем количестве, чем в крови здоровых доноров. У всех больных, в отличие от реконвалесцентов, был зарегистрирован повышенный уровень индуцированной секреции клетками крови IL-17A (табл. 3).

Изменениям в нейтрофилах крови больных COVID-19 и реконвалесцентов, а также сдвигам в уровне секреции цитокинов сопутствовали изменения в относительном содержании некоторых основных субпопуляций лимфоцитов (табл. 4): снижалась доля Т-хелперов в группе II и повышалось относительное содержание цитотоксических Т-клеток в группе III; снижалась доля В-клеток в группах II, III и V, а также NK-клеток в группах II и III.

Обсуждение

Экспериментальные данные, полученные при выполнении настоящей работы, согласуются с современными представлениями о роли индуцируемой SARS-CoV-2 секреторной азурофильной дегрануляции нейтрофилов в патогенезе COVID-19 [3, 5]. При новой коронавирусной инфекции чрезмерная дегрануляция НГ, сопутствующая интенсивному нетозу, нарушает регуляцию внеклеточной активности лейкоцитарной эластазы (ЛЭ) её плаз-

Рис. 2. Экспрессия $Fc\gamma RIIIb$ (CD16) нейтрофилами крови здорового донора (А), больного тяжёлой формой COVID-19 (В) и реконвалесцента (С). Различия в степени неоднородности клеточных популяций по данному параметру.

На каждой гистограмме результат распределения клеток по интенсивности иммунофлюоресценции получен в условиях гейтирования по области R1 (G1:R1), в которой популяция гранулоцитов крови отделялась от моноцитов и гранулоцитов по параметрам прямого и бокового светорассеяния [14].

Fig. 2. The expression of $Fc\gamma RIIIb$ (CD16) by blood neutrophils of a healthy donor (A), a patient with severe form of COVID-19 (B) and a convalescent (C). The differences in level of cell population heterogeneity for this parameter.

On each histogram, the cell distribution by the cell immunofluorescence intensity was obtained under gating conditions over the R1 (G1:R1) region, into which the blood granulocyte population was separated from monocytes and granulocytes by means of forward and side light scattering parameters [14].

Таблица 3. Уровень цитокинов в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов, Me [Q₂₅–Q₇₅]
Table 3. The level of cytokines in blood of COVID-19 patients and convalescents, Me [Q₂₅–Q₇₅]

Показатель Parameter	Группа / Group					
	I (n = 20)	II (n = 17)	III (n = 17)	IV (n = 6)	V (n = 15)	VI (n = 18)
Спонтанная продукция ИФН-γ, пг/мл Spontaneous production of IFN-γ, pg/ml	3,6 [0,8–14,7]	0,5 [0–2,7]	1,5 [0,3–3,7]	3,0 [2,8–3,5]	0 [0–6,8]	0 [0–9,6]
Индукцированная продукция ИФН-γ Induced production of IFN-γ, pg/ml	346 [174–1045]	44 [11–179]*	89 [20–320]*	122 [95–170]*	492 [277–1047]	442 [324–1046]
Спонтанная продукция ФНО-α, пг/мл Spontaneous production of TNF-α, pg/ml	0 [0–0]	11,5 [2,5–57]*	2,2 [1,4–16,9]*	3,0 [2,5–3,2]*	0 [0–1,4]	0 [0–0]
Индукцированная продукция ФНО-α, пг/мл Induced production of TNF-α, pg/ml	383 [369–413]	135 [11–234]*	58 [9–284]*	64 [33–98]*	263 [234–371]	262 [218–264]
Спонтанная продукция ИЛ-17А, пг/мл Spontaneous production of IL-17A, pg/ml	0,5 [0–1,2]	0 [0–0,4]	0 [0–0,6]	0,4 [0–0,8]	1,0 [0–1,1]	0,9 [0–1,0]
Индукцированная продукция ИЛ-17А, пг/мл Induced production of IL-17A, pg/ml	53 [31–66]	116 [10–269]*	122 [54–332]*	218 [200–311]*	40 [28–93]	45 [29–72]

Примечание. *p < 0,05 по сравнению с группой I.
Note. *p < 0,05 in comparison with the group I.

Таблица 4. Относительное содержание основных субпопуляций лимфоцитов в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов
Table 4. The relative content of the main lymphocyte subpopulations in the blood of COVID-19 patients and convalescents

Показатель Parameter	Группа / Group					
	I (n = 20)	II (n = 17)	III (n = 17)	IV (n = 6)	V (n = 15)	VI (n = 18)
Содержание в крови лимфоцитов, % Lymphocyte content in the blood, %	32 [27,1–36,3]	23 [11,6–31,0]*	32 [18,0–49,4]	30 [24,5–40,0]	36 [29–43,4]	32 [23–41,2]
Т-клетки (CD45 ⁺ CD3 ⁺), % T-cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺), %	68 [66,4–71,7]	69 [60,4–75,0]	69 [60,5–79,0]	66 [62,4–80,0]	67 [62,5–74,0]	71 [65,0–76,2]
В-клетки (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺), % B-cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺), %	9,8 [8,6–12,0]	4,0 [2,4–5,6]*	5,0 [3,8–7,3]*	6,6 [3,7–7,9]	5,2 [4,4–6,6]*	7,8 [6,8–9,6]
Т-хелперы (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺), % T-helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺), %	42 [38,2–46,0]	23 [13,3–30,0]*	38 [28,0–41,8]	40 [31,0–47,6]	41 [37–50]	44 [38,0–51,2]
Цитотоксические Т-клетки (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺), % Cytotoxic T-cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺), %	25 [20,6–28,0]	21 [15,0–41,2]	33 [22,7–39,0]*	25 [19,3–31,0]	21 [18,6–27,0]	22 [17,3–24,0]
Иммунорегуляторный индекс Immunoregulatory index	1,6 [1,3–2,4]	0,8 [0,7–1,4]*	1,3 [0,9–1,6]*	1,6 [1,1–2,4]	2,2 [1,6–2,6]	2,0 [1,4–3,0]
Натуральные киллеры NK-клеток (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ⁺) NK-cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ⁺)	7,9 [6,5–10,0]	3,2 [2,5–6,8]*	2,6 [1,8–5,5]*	7,7 [6,6–8,3]	6,5 [2,4–8,9]	7,8 [5,4–8,6]
Т-клетки с маркером NK-клеток (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ⁺) NKT-cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ⁺)	0,8 [0,5–1,7]	2,4 [0,9–2,3]	1,0 [0,4–1,9]	2,0 [1,4–2,2]	1,6 [1,5–3,4]	1,2 [0,6–3,9]

Примечание. *p < 0,05 по сравнению с группой I.
Note. *p < 0,05 in comparison with the group I.

менным ингибитором α_1 -антитрипсином (ААТ) [2, 10]. Выраженный дисбаланс в системе ЛЭ–ААТ, характерный для всех пациентов с тяжёлой формой течения COVID-19 [17], приводит к развитию в организме «протеолитического шторма», тесно связанного с «цитокиновым штормом», и, как следствие, к интенсивному повреждению эндотелия сосудов, очень быстрому разрушению эластина лёгочной ткани и деградациии ключевых белков плазмы крови, ответственных за регуляцию процесса коагуляции [18].

Поэтому мониторинг интенсивности дегрануляции нейтрофилов в крови, а также в назальной и лаважной жидкостях больных COVID-19 является актуальной медицинской проблемой, решаемой в настоящее время как с помощью биохимических методов определения внеклеточной активности ЛЭ [17, 19], так и на основе альтернативных проточно-цитометрических методов оценки дегрануляции, обеспечивающих получение необходимой информации без использования длительного и трудоёмкого биохимического анализа [3, 10]. В наших исследованиях применялся способ оценки дегрануляции НГ по интенсивности бокового светорассеяния, который даёт результаты, эквивалентные биохимическому анализу по уровню высвобождаемой из гранул активности ЛЭ [15], а также другому известному цитометрическому способу оценки данного показателя по экспрессии CD63 на клеточной поверхности [3].

Активность ЛЭ в плазме крови нами не определялась, но на основании выводов ранее проведённых L.A. Sklar и соавт. сравнительных цитометрических и биохимических исследований [15], а также анализа имеющихся литературных данных [20] причину нарушения дыхательной функции лёгких и тахикардию у пациентов из группы II можно объяснить дисбалансом в системе ЛЭ–ААТ. Чем выше интенсивность дегрануляции НГ и, как следствие, концентрация ЛЭ в плазме, тем выше вероятность развития при COVID-19 тяжёлых инфекционных осложнений, приводящих к летальному исходу [10, 17]. Причём вероятность эта резко увеличивается при врождённом дефиците ААТ, когда концентрация ингибитора ЛЭ в плазме в 10 раз ниже нормы. Носителей такой врождённой патологии в США и странах Европы около 5%, что, видимо, неслучайно совпадает с относительным количеством зарегистрированных в этих странах случаев развития критически тяжелой формы COVID-19 [21]. У пациентов с острым респираторным дистресс-синдромом и синдромом диссеминированного внутрисосудистого свёртывания крови, у которых на фоне гипоксии развивалась множественная недостаточность органов, концентрация ЛЭ в крови более 593 пг/мл, что в 12 раз превышает значение данного показателя, характерное для здоровых доноров [10].

Наличие в аминокислотной последовательности S-белка SARS-CoV-2 специфических сайтов расщепления сериновыми лейкоцитарными протеиназами (ЛЭ и протеиназой 3) является особенностью возбудителя COVID-19, отличающей его от SARS-CoV [22]. Высокую скорость распространения наиболее опасных для людей штаммов SARS-CoV-2 объясняют повышенной чувствительностью их S-белка к расщеплению ЛЭ на этапе проникновения вируса в клетки организма-хозяина [23]. Поэтому регистрация интенсивной дегрануляции НГ в крови пациентов с диагнозом COVID-19 может быть аргументом в пользу выбора стратегии лечения коронавирусной инфекции, основанной на использовании препаратов ингибитора ААТ [24, 25] и других ингибиторов ЛЭ [2, 10, 18]. При решении актуальной проблемы комплексной кардиологической и респираторной реабилитации реконвалесцентов [11] результаты определения и сравнительного анализа индивидуальных показателей интенсивности дегрануляции могут быть использованы для прогнозирования постинфекционных осложнений.

Неоднородность нейтрофилов крови больных COVID-19 по уровню экспрессии $Fc\gamma R11b$ (CD16) на клетку некоторые исследователи объясняют миграцией в кровяное русло незрелых форм НГ (клеток с фенотипом CD16^{LOW}) из костномозгового резерва [8]. Однако результаты более поздних исследований S. Morrissay и соавт. [4], а также наши экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в крови пациентов с диагнозом COVID-19, наряду с клетками, имеющими фенотип CD16^{LOW}, циркулируют преимущественно нейтрофилы с фенотипом CD16^{INT}. Согласно S. Morrissay и соавт., это функционально зрелые НГ, активируемые SARS-CoV-2 в кровяном русле, которые относятся к особой провоспалительной (пронетотической) популяции LDNs [4]. Установлено, что CD16^{INT}-LDNs, присутствующие как в периферической крови, так и в лаважной жидкости пациентов с тяжёлым и среднетяжёлым течением COVID-19, играют существенную роль в развитии системного воспаления и коагулопатии.

По данным Z. Paraskova и соавт., активированные нейтрофилы больных COVID-19 продуцируют в плазму крови больше молекул ФНО- α и ИЛ-6, чем мононуклеары, и являются, возможно, основным источником этих двух цитокинов при «цитокиновом шторме» [3]. В пользу предположения чешских учёных свидетельствует повышенная спонтанная продукция ФНО- α в кровь пациентов из группы II, зарегистрированная в настоящей работе на фоне повышенной доли в крови НГ и существенно сниженного относительного количества Т-лимфоцитов-хелперов. Кроме того, результаты нашей работы согласуются с хорошо известным фактом сниженной продукции ИФН- γ Т-клетками больных COVID-19 [26, 27]. При стимуляции Т-лимфоцитов

в крови пациентов с ковидной пневмонией повышался в условиях *in vitro* уровень продукции в плазму ИЛ-17, а не ИФН- γ , что подтверждают выводы работы S. De Biasi и соавт. [28].

Рецептор Fc γ RIIIb выполняет на поверхности НГ крови человека важную физиологическую функцию распознавания IgG в составе иммунных комплексов антиген–антитело и является, как известно, молекулярным триггером нетоза [29] при сепсисе и системных аутоиммунных заболеваниях, связанных с воспалением сосудов и тромботическими осложнениями (васкулиты, болезнь Кавасаки, фосфолипидный синдром, красная волчанка и др.) [30–32]. В патогенезе таких болезней существенную роль играют аутоантитела к продуктам распада нейтрофилов, входящим в состав NETs [2], которые присутствуют в крови больных COVID-19 и стимулируют процесс образования тромбов в сосудах различных органов путём активации аутолизиса НГ и секреции в плазму ДНК-сетей NETs [33]. Нетоз запускается, вероятно, через рецептор Fc γ RIIIb, т.к. склонность к аутолизису циркулирующих в крови клеток популяции CD16^{INT}-LDNs на сегодняшний день при COVID-19 достоверно установлена и коррелирует с гиперкоагуляцией [4]. При наличии в организме переболевших COVID-19 стимулирующих нетоз аутоантител повышается вероятность развития постинфекционных осложнений, связанных с нарушением регуляции процесса внутрисосудистой коагуляции [2], и литературные данные подтверждают распространённость таких нарушений среди реконвалесцентов [11].

Сложность идентификации и изучения популяции LDNs, появляющейся в крови пациентов с жизненно опасными инфекционными осложнениями, определяется тем, что морфологически LDNs мало отличаются от мононуклеаров. При градиентном центрифугировании лейкоцитов крови эти клетки попадают не во фракцию, где должны аккумулироваться нейтрофилы, а во фракцию лимфоцитов и моноцитов более низкой плотности [30, 34].

Имунофенотипирование лейкоцитов в образцах цельной крови пациентов решает эту проблему путём идентификации и дифференцирования клеток популяции LDNs по их пренетотическому фенотипу CD16^{INT}. Однако в работах зарубежных исследователей [4, 30] для этого применялся протокол окраски, согласно которому после процедуры лизиса эритроцитов в FACS Lysing Solution («BD Bioscience») лейкоциты осаждались из лизирующего раствора центрифугированием, чтобы отделить целые неповреждённые клетки от клеточного дебриса. На проточном цитометре исследовались лейкоциты, ресуспендированные в фосфатно-солевом буфере. В таких условиях исключалась возможность детекции в крови нейтрофилов, находящихся на стадии аутолизиса (нетоза), несмотря на то что факт

повышенного содержания NETs в крови больных COVID-19 в настоящее время установлен и имеет большое значение с точки зрения прогнозирования исхода инфекционного процесса [7].

В нашей работе применялся другой протокол окраски лейкоцитов в образцах цельной крови человека (Lyse/No-Wash), согласно которому окрашенные реагентами лейкоциты не осаждаются из FACS Lysing Solution центрифугированием, а исследуются на цитометре непосредственно в этом растворе, разработанном для оптимального лизиса в крови только эритроцитов с одновременной фиксацией лейкоцитов присутствующим в FACS Lysing Solution формальдегидом. Применение Lyse/No-Wash-протокола позволило регистрировать повышенное содержание клеточного дебриса в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов, связанное, по данным Д.В. Кассиной и соавт. [7] и Y. Zuo и соавт. [33], с активацией нетоза в кровеносных сосудах. Результаты сравнительных клинических испытаний двух протоколов свидетельствуют о том, что они не различаются по чувствительности и разрешающей способности [13]. Однако в случае выбранного нами протокола выше производительность и информативность анализа (с точки зрения возможности контроля показателей лейкоцитолита и цитотоксичности), а также полностью исключаются любые клеточные потери, что важно учитывать при стандартизации цитологических исследований в клинических условиях.

Заключение

Характер изменения изученных в работе показателей у пациентов с COVID-19 в острый период болезни и в период реконвалесценции подтверждает возможный механизм развития осложнений при этом заболевании, связанный с нарушением баланса между активностью высвобождаемой из гранул НГ эластазы и её плазменным ингибитором α_1 -антитрипсином.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Петриков С.С., Иванников А.А., Васильченко М.К., Эсауленко А.Н., Алиджанова Х.Г. COVID-19 и сердечно-сосудистая система. Часть 1. Патофизиология, патоморфология, осложнения, долгосрочный прогноз. *Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь»*. 2021; 10(1): 14–26. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2021-10-1-14-26>
2. Thierry A., Roch B. Neutrophil Extracellular traps and by-products play a key role in COVID-19: pathogenesis, risk factors, and therapy. *J. Clin. Med.* 2020; 9(9): 2942. <https://doi.org/10.3390/jcm9092942>
3. Paraskova Z., Zentsova I., Bloomfield M., Vrabцова P., Smetanova J., Kloepferk A., et al. Disharmonic inflammatory signatures in COVID-19: augmented neutrophils but impaired monocytes and dendritic cells' responsiveness. *Cell.* 2020; 9(10): 2206. <https://doi.org/10.3390/cells9102206>

4. Morrissay S., Geller A.E., Hu X., Tieri 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): e148435.
5. Cavalcante-Silva L.H.A., Carvalho D.C.M., Lima É.A., Galvão J.G.F.M., da Silva J.S.F., Sales-Neto J.M., et al. Neutrophils and COVID-19: The road so far. *Int. Immunopharmacol.* 2021; 90: 107233. <https://doi.org/10.1916/j.intimp.2020.107233>
6. Veras F.P., Poutelli M.C., Silva C.M., Toller-Kawahisa J.E., de Lima M., Nascimento D.C., et al. SARS-CoV-2 triggered neutrophil extracellular traps mediated COVID-19 pathology. *J. Exp. Med.* 2020; 217(12): e20201129. <https://doi.org/10.1084/jem.20201129>
7. Кассина Д.В., Василенко И.А., Гурьев А.С., Волков А.Ю., Метелин В.Б. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: значение для диагностики и прогноза COVID-19. *Альманах клинической медицины*. 2020; 48(S1): S43–50. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2020-48-029>
8. Carissimo G., Xu W., Kwok I., Abdad M.Y., Chan Y.H., Fong S.W., et al. Whole blood immunophenotyping uncovers immature neutrophil-to-VD2 T-cell ratio as an early marker for severe COVID-19. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 5243. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19080-6>
9. Schneck E., Mallek F., Schiederich S., Kramer E., Markmann M., Hecker M., et al. Flow cytometry based quantification of neutrophil extracellular traps shows an association with hypercoagulation in septic shock and hypocoagulation in postsurgical systemic inflammation – a proof – of – concept study. *J. Clin. Med.* 2020; 9(1): 174. <https://doi.org/10.3390/jcm9010174>
10. Guéant J.L., Guéant-Rodrigues R.M., Fromonot J., Oussalah A., Louis H., Chery C., et al. Elastase and exacerbation of neutrophil innate immunity are involved in multi-visceral manifestations of COVID-19. *Allergy*. 2021; 76(6): 1846–58. <https://doi.org/10.1111/all.14746>
11. Бубнова М.Г., Шляхто Е.В., Аронов Д.М., Белевский А.С., Герасименко М.Ю., Глезер М.Г. и др. Новая коронавирусная болезнь COVID-19: особенности комплексной кардиологической и респираторной реабилитации. *Российский кардиологический журнал*. 2021; 26(5): 4487. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2021-4487>
12. Direct Immunofluorescence Staining of Whole Blood using a Lyse/No-Wash Procedure. BD Bioscience Resources and Tools. Available at: <https://www.bdbioscience.com/en-us/resources/protocols/stain-lyse-no-wash>
13. Vera E.J., Chew Y.V., Nicholson L., Bruns H., Anderson P., Chen H.T., et al. Standardization of flow cytometry for whole blood immunophenotyping of islet transplant and transplant clinical trial recipients. *PLoS One*. 2019; 14(5): e0217163. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217163>
14. Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Ключева С.А., Кожевников В.А., Кудрявцева О.М. Определение экспрессии FcγRIIIb (CD16) на поверхности нейтрофилов крови привитых против чумы людей. *Молекулярная медицина*. 2020; 18(2): 33–8. <https://doi.org/10.29296/24999490-2020-02-06>
15. Sklar L.A., Oades Z.G., Finney D.A. Neutrophil degranulation detected by right angle light scattering: spectroscopic methods suitable for simultaneous analyses of degranulation or shape change, elastase release, and cell aggregation. *J. Immunology*. 1984; 133(3): 1483–7.
16. Ключева С.Н., Бугоркова С.А., Гончарова А.Ю., Кравцов А.Л., Кудрявцева О.М., Санджиев Д.Н. и др. Комплексный анализ корреляционных взаимосвязей между показателями гуморального и клеточного иммунитета у лиц, вакцинированных против чумы. *Инфекция и иммунитет*. 2019; 9(1): 135–46. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-135-146>
17. Zerimech F., Jourdian M., Ouraed B., Bouche-careilh M., Sen-did B., Dauhamel A., et al. Proteinase-antiproteinase imbalance in patients with severe COVID-19. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2021; 59(8): 000010151520210137. <https://doi.org/10.1515/cclm-2021-0137>
18. Fornasari P.M. COVID-19: Neutrophils «unfriendly fire» imbalance proteolytic cascades triggering clinical worsening and viral sepsis. Potential role explanation for convalescent plasma as «fire hose». *J. Blood Res. Hematol. Dis.* 2020; 5: 2. [https://doi.org/10.37532/jbrhd.2020.5\(2\).120](https://doi.org/10.37532/jbrhd.2020.5(2).120)
19. Akgun E., Tuzuner M.B., Suhin B., Kilercik K.M., Kulah S., Cakiroglu H.V., et al. Proteins associated with neutrophil degranulation are upregulated in nasopharyngeal swabs from SARS-CoV-2 patients. *PLoS One*. 2020; 15(10): e0240012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240012>
20. Кравцов А.Л., Бугоркова С.А. Роль плазменного ингибитора сериновых лейкоцитарных протеиназ в защите организма от COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(5): 567–78. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-160>
21. Yoshikura H. Epidemiological correlation between COVID-19 and epidemiological prevalence of α-1 antitrypsin deficiency in the world. *Glob. Health Med.* 2020; 3(2): 73–81. <https://doi.org/10.35772/ghm.2020.01068>
22. Mustofa Z., Zhanapiya A., Kalbacher H., Burster T. Neutrophil elastase and proteinase 3 cleavage sites are adjacent to the polybasic sequence within the proteolytic sensitive activation loop of the SARS-CoV-2 spike protein. *ACS Omega*. 2021; 6(10): 7181–5. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00363>
23. Pokhrel S., Kraemer B.R., Lee L., Samardzic K., Mochly-Rosen D. Increased elastase sensitivity and decreased intramolecular interactions in the more transmissible 501Y.V1 and 501Y.V2 SARS-CoV-2 variants' spike protein – an in silico analysis. *PLoS One*. 2021; 16(5): e0251426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251426>
24. Bai H., Hippensteel J., Leavitt A., Maloney J.P., Beckham D., Garcia C., et al. Hypothesis: alpha-1-antitrypsin is a promising treatment option for COVID-19. *Med. Hypothesis*. 2021; 146: 110394. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110394>
25. Oguntuyo K.Y., Stevens C.S., Siddiquey M., Schilke R.M., Woodland M.D., Zang H.S., et al. In plain sight: the role of alpha-1 antitrypsin in COVID-19 pathogenesis and therapeutics. *bioRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.08.14.248880>
26. Бавькин А.С. Клеточный и молекулярный уровень стратегии COVID-19 по индукции иммунодефицита. Возможные терапевтические решения. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(4): 450–7. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-119>
27. Giamarellos-Bourboulis E.J., Netea M.G., Rovina N., Akinosoglou K., Automadou A., Antonakos N., et al. Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(6): 992–1000. e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.009>
28. De Biasi S., Meschiari M., Gibellini L., Bellinazzi C., Borella R., Fidauza L., et al. Marked T-cell activation, senescence, exhaustion and skewing toward TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 3434. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17292-4>
29. Aleman O.R., Mora N., Cortes-Vieyra R., Uribe-Querol E., Rosales C. Differential use of human Fcγ-receptors for inducing neutrophil extracellular traps formation. *J. Immunol. Res.* 2016; 2016: 2908034. <https://doi.org/10.1155/2016/2908034>
30. Mhaonaigh A.U., Coughlan A.U., Dwivedi A., Hartnett J., Cabral J., Moran B., et al. Low density granulocytes in ANCA vasculitis are heterogeneous and hypo-responsive to antimyeloperoxidase autoantibody. *Front. Immunol.* 2019; 10: 2603. <https://doi.org/10.3399/fimmu.2019.02603>

31. Hara T., Yamamura K., Sakai Y. The up-to date pathophysiology of Kawasaki disease. *Clin. Transl. Immunol.* 2021; 10(5): e1284. <https://doi.org/10.1002/cti2.1284>
 32. Seman B.G., Robinson C.M. The enigma of low density granulocytes in humans: complexities in the characterization and function of LDGs during disease. *Pathogens.* 2021; 10(9): 1091. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091091>
 33. Zuo Y., Estes S.K., Ali R.A., Gandhi A.A., Yalavarthi S., Shi H., et al. Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Sci. Transl. Med.* 2020; 12(570): eabd3876. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd3876>
 34. Cloke T., Munder M., Tayler J., Müller I., Kropf P. Characterization of a novel population of low-density granulocytes associated with disease severity in HIV-1 infection. *PLoS One.* 2012; 7(11): e48939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048939>
- REFERENCES
1. Petrikov S.S., Ivannikov A.A., Vasil'chenko M.K., Esaulenko A.N., Alidzhanova Kh.G. COVID-19 and cardiovascular system. Part 1. Pathophysiology, pathomorphology, complications, long-term prognosis. *Zhurnal im. N.V. Sklifosovskogo «Neotlozhnaya meditsinskaya pomoshch'».* 2021; 10(1): 14–26. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2021-10-1-14-26> (in Russian)
 2. Thierry A., Roch B. Neutrophil Extracellular traps and by-products play a key role in COVID-19: pathogenesis, risk factors, and therapy. *J. Clin. Med.* 2020; 9(9): 2942. <https://doi.org/10.3390/jcm9092942>
 3. Paraskova Z., Zentsova I., Bloomfield M., Vrabcova P., Smetanova J., Kloperk A., et al. Disharmonic inflammatory signatures in COVID-19: augmented neutrophils but impaired monocytes and dendritic cells' responsiveness. *Cell.* 2020; 9(10): 2206. <https://doi.org/10.3390/cells9102206>
 4. Morrissay S., Geller A.E., Hu X., Tieri 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): e148435.
 5. Cavalcante-Silva L.H.A., Carvalho D.C.M., Lima É.A., Galvão J.G.F.M., da Silva J.S.F., Sales-Neto J.M., et al. Neutrophils and COVID-19: The road so far. *Int. Immunopharmacol.* 2021; 90: 107233. <https://doi.org/10.1916/j.intimp.2020.107233>
 6. Veras F.P., Poutelli M.C., Silva C.M., Toller-Kawahisa J.E., de Lima M., Nascimento D.C., et al. SARS-CoV-2 triggered neutrophil extracellular traps mediated COVID-19 pathology. *J. Exp. Med.* 2020; 217(12): e20201129. <https://doi.org/10.1084/jem.20201129>
 7. Kassina D.V., Vasilenko I.A., Gur'ev A.S., Volkov A.Yu., Metelin V.B. Neutrophil extracellular traps: diagnostic and prognostic value in Covid-19. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny.* 2020; 48(S1): S43–50. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2020-48-029> (in Russian)
 8. Carissimo G., Xu W., Kwok I., Abdad M.Y., Chan Y.H., Fong S.W., et al. Whole blood immunophenotyping uncovers immature neutrophil-to-VD2 T-cell ratio as an early marker for severe COVID-19. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 5243. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19080-6>
 9. Schneck E., Mallek F., Schiederich S., Kramer E., Markmann M., Hecker M., et al. Flow cytometry based quantification of neutrophil extracellular traps shows an association with hypercoagulation in septic shock and hypocoagulation in post-surgical systemic inflammation – a proof – of – concept study. *J. Clin. Med.* 2020; 9(1): 174. <https://doi.org/10.3390/jcm9010174>
 10. Guéant J.L., Guéant-Rodrigues R.M., Fromont J., Oussalah A., Louis H., Chery C., et al. Elastase and exacerbation of neutrophil innate immunity are involved in multi-visceral manifestations of COVID-19. *Allergy.* 2021; 76(6): 1846–58. <https://doi.org/10.1111/all.14746>
 11. Bubnova M.G., Shlyakhto E.V., Aronov D.M., Belevskiy A.S., Gerasimenko M.Yu., Glezer M.G., et al. Coronavirus disease 2019: features of comprehensive cardiac and pulmonary rehabilitation. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal.* 2021; 26(5): 4487. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2021-4487> (in Russian)
 12. Direct Immunofluorescence Staining of Whole Blood using a Lyse/No-Wash Procedure. BD Bioscience Resources and Tools. Available at: <https://www.bdbioscience.com/en-us/resources/protocols/stain-lyse-no-wash>
 13. Vera E.J., Chew Y.V., Nicholson L., Bruns H., Anderson P., Chen H.T., et al. Standardization of flow cytometry for whole blood immunophenotyping of islet transplant and transplant clinical trial recipients. *PLoS One.* 2019; 14(5): e0217163. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217163>
 14. Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.A., Kozhevnikov V.A., Kudryavtseva O.M. Determination of FcγRIIIb (CD16) expression on the surface of blood neutrophils in anti-plague vaccinated people. *Molekulyarnaya meditsina.* 2020; 18(2): 33–8. <https://doi.org/10.29296/24999490-2020-02-06> (in Russian)
 15. Sklar L.A., Oades Z.G., Finney D.A. Neutrophil degranulation detected by right angle light scattering: spectroscopic methods suitable for simultaneous analyses of degranulation or shape change, elastase release, and cell aggregation. *J. Immunology.* 1984; 133(3): 1483–7.
 16. Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Goncharova A.Yu., Kravtsov A.L., Kudryavtseva O.M., Sandzhiev D.N., et al. Complex analysis of correlation interrelations between indicators of humoral and cellular immunity in persons vaccinated against plague. *Infektsiya i immunitet.* 2019; 9(1): 135–46. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-135-146> (in Russian)
 17. Zerimech F., Jourdan M., Ouraed B., Bouche-careilh M., Sennid B., Dauhamel A., et al. Proteinase-antiproteinase imbalance in patients with severe COVID-19. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2021; 59(8): 000010151520210137. <https://doi.org/10.1515/ccim-2021-0137>
 18. Fornasari P.M. COVID-19: Neutrophils «unfriendly fire» imbalance proteolytic cascades triggering clinical worsening and viral sepsis. Potential role explanation for convalescent plasma as «fire hose». *J. Blood Res. Hematol. Dis.* 2020; 5: 2. [https://doi.org/10.37532/jbrhd.2020.5\(2\).120](https://doi.org/10.37532/jbrhd.2020.5(2).120)
 19. Akgun E., Tuzuner M.B., Suhin B., Kilercik K.M., Kulah S., Cakiroglu H.V., et al. Proteins associated with neutrophil degranulation are upregulated in nasopharyngeal swabs from SARS-CoV-2 patients. *PLoS One.* 2020; 15(10): e0240012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240012>
 20. Kravtsov A.L., Bugorkova S.A. The role of plasma serine leukocyte proteinase inhibitor in the body's defense against covid-19. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2021; 98(5): 567–78. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-160> (in Russian)
 21. Yoshikura H. Epidemiological correlation between COVID-19 and epidemic prevalence of α-1 antitrypsin deficiency in the world. *Glob. Health Med.* 2020; 3(2): 73–81. <https://doi.org/10.35772/ghm.2020.01068>
 22. Mustofa Z., Zhanapiya A., Kalbacher H., Burster T. Neutrophil elastase and proteinase 3 cleavage sites are adjacent to the polybasic sequence within the proteolytic sensitive activation loop of the SARS-CoV-2 spike protein. *ACS Omega.* 2021; 6(10): 7181–5. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00363>
 23. Pokhrel S., Kraemer B.R., Lee L., Samardzic K., Mochly-Rosen D. Increased elastase sensitivity and decreased intramolecular interactions in the more transmissible 501Y.V1 and 501Y.V2 SARS-CoV-2 variants: spike protein – an in silico analysis. *PLoS One.* 2021; 16(5): e0251426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251426>

24. Bai H., Hippensteel J., Leavitt A., Maloney J.P., Beckham D., Garcia C., et al. Hypothesis: alpha-1-antitrypsin is a promising treatment option for COVID-19. *Med. Hypothesis*. 2021; 146: 110394. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110394>
25. Oguntuyo K.Y., Stevens C.S., Siddiquey M., Schilke R.M., Woodlard M.D., Zang H.S., et al. In plain sight: the role of alpha-1 antitrypsin in COVID-19 pathogenesis and therapeutics. *bioRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.08.14.248880>
26. Bavykin A.S. Cell and molecular level of strategy of COVID-19 to induce immunodeficiency. Possible therapeutic solutions. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021; 98(4): 450–7. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-119> (in Russian)
27. Giamarellos-Bourboulis E.J., Netea M.G., Rovina N., Akinosoglou K., Automadou A., Antonakos N., et al. Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(6): 992–1000.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.009>
28. De Biasi S., Meschiari M., Gibellini L., Bellinazzi C., Borella R., Fidausa L., et al. Marked T-cell activation, senescence, exhaustion and skewing toward TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat. Commun*. 2020; 11(1): 3434. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17292-4>
29. Aleman O.R., Mora N., Cortes-Vieyra R., Uribe-Querol E., Rosales C. Differential use of human Fcγ-receptors for inducing neutrophil extracellular traps formation. *J. Immunol. Res*. 2016; 2016: 2908034. <https://doi.org/10.1155/2016/2908034>
30. Mhaonaigh A.U., Coughlan A.U., Dwivedi A., Hartnett J., Cabral J., Moran B., et al. Low density granulocytes in ANCA vasculitis are heterogeneous and hypo-responsive to anti-myeloperoxidase autoantibody. *Front. Immunol*. 2019; 10: 2603. <https://doi.org/10.3399/fimmu.2019.02603>
31. Hara T., Yamamura K., Sakai Y. The up-to date pathophysiology of Kawasaki disease. *Clin. Transl. Immunol*. 2021; 10(5): e1284. <https://doi.org/10.1002/cti2.1284>
32. Seman B.G., Robinson C.M. The enigma of low density granulocytes in humans: complexities in the characterization and function of LDGs during disease. *Pathogens*. 2021; 10(9): 1091. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091091>
33. Zuo Y., Estes S.K., Ali R.A., Gandhi A.A., Yalavarthi S., Shi H., et al. Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Sci. Transl. Med*. 2020; 12(570): eabd3876. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd3876>
34. Cloke T., Munder M., Tayler J., Müller I., Kropf P. Characterization of a novel population of low-density granulocytes associated with disease severity in HIV-1 infection. *PLoS One*. 2012; 7(11): e48939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048939>

Информация об авторах

Кравцов Александр Леонидович — д.б.н., в.н.с. отдела иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, kravzov195723@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>

Бугоркова Светлана Александровна — д.м.н., г.н.с. отдела иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Клюева Светлана Николаевна — к.б.н., н.с. отдела иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5550-6063>

Гончарова Анастасия Юрьевна — к.м.н., н.с. отдела иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Кожевников Виталий Александрович — м.н.с. отдела иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7267-7027>

Чумачкова Елена Арнольдовна — н.с. отдела эпидемиологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6866-0169>

Портенко Светлана Анатольевна — к.б.н., зав. отделом диагностики инфекционных болезней РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8334-9173>

Щербакоева Светлана Анатольевна — д.б.н., заместитель директора по научной и противоэпидемической работе РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1143-4069>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 27.12.2021;
принята к публикации 15.03.2022;
опубликована 29.04.2022

Information about the authors

Aleksandr L. Kravtsov — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, kravzov195723@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>

Svetlana A. Bugorkova — D. Sci. (Med.), Deputy head, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Svetlana N. Klyueva — Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5550-6063>

Anastasia Y. Goncharova — Cand. Sci. (Med.), Researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Vitaly A. Kozhevnikov — junior researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7267-7027>

Elena A. Chumachkova — Researcher, Department of epidemiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6866-0169>

Svetlana A. Portenko — Cand. Sci. (Biol.), Head, Department of diagnostics of infectious diseases, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8334-9173>

Svetlana A. Scherbakova — D. Sci. (Biol.), Deputy director for scientific and anti-epidemic work, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1143-4069>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 27.12.2021;
accepted for publication 15.03.2022;
published 29.04.2022