

ЦИТОКИНЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ COVID-19 В ОСТРОЙ ФАЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ФАЗЕ ПОЛНОГО ВЫЗДОРОВЛЕНИЯ

**Арсентьева Н.А.¹, Любимова Н.Е.¹, Бацунов О.К.^{1,2}, Коробова З.Р.¹,
Станевич О.В.^{2,3}, Лебедева А.А.², Воробьев Е.А.², Воробьева С.В.²,
Куликов А.Н.², Лиознов Д.А.³, Шарапова М.А.², Певцов Д.Э.²,
Тотолян Арег А.^{1,2}**

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. COVID-19 – инфекция, вызванная новым коронавирусом SARS-CoV-2, связана с рядом патофизиологических механизмов, которые мобилизуют широкий спектр биомолекул, в основном цитокинов. Целью настоящего исследования стала оценка уровней широкого спектра цитокинов в плазме крови больных COVID-19 в острой фазе заболевания и фазе полного выздоровления. Были исследованы образцы плазмы периферической крови 56 больных COVID-19, 69 реконвалесцентов и 10 практически здоровых лиц. Методом мультиплексного анализа по технологии xMAP определяли концентрации 46 молекул: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IL-17-E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27, IFN α 2, IFN γ , TNF α , TNF β /Lymphotoxin- α (LTA), CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC, CXCL1/GRO α , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalkine, IL-1ra, IL-10, EGF, FGF-2/FGF-basic, Flt3 Ligand, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF- α , VEGF-A.

В плазме крови больных COVID-19, находящихся в острой фазе заболевания по сравнению с контрольной группой, обнаружены достоверно повышенные уровни для 18 цитокинов: IL-6, IL-7, IL-15, IL-27, TNF α , TNF β /Lymphotoxin- α (LTA), CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CXCL1/GRO α , CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG, IL-1ra, IL-10, M-CSF, GM-CSF, VEGF-A. В группе реконвалесцентов, по сравнению с больными COVID-19, у которых заболевание протекало со средней и тяжелой/крайне тяжелой формами течения, обнаружено достоверное снижение содержания практически всех исследованных нами цитокинов. Причем в плазме крови реконвалесцентов выявлены достовер-

Адрес для переписки:

Арсентьева Наталья Александровна
ФБУН «Санкт-Петербургский
научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера»
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: 8 (904) 646-57-58.
E-mail: arsentieva_n.a@bk.ru

Address for correspondence:

Arsentieva Natalia A.
St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and
Microbiology
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14.
Phone: 7 (904) 646-57-58.
E-mail: arsentieva_n.a@bk.ru

Образец цитирования:

Н.А. Арсентьева, Н.Е. Любимова, О.К. Бацунов,
З.Р. Коробова, О.В. Станевич, А.А. Лебедева,
Е.А. Воробьев, С.В. Воробьева, А.Н. Куликов,
Д.А. Лиознов, М.А. Шарапова, Д.Э. Певцов,
Арег А. Тотолян «Цитокины в плазме крови больных
COVID-19 в острой фазе заболевания и фазе полного
выздоровления» // Медицинская иммунология, 2021.
Т. 23, № 2. С. 311-326.
doi: 10.15789/1563-0625-PCI-2312

© Арсентьева Н.А. и соавт., 2021

For citation:

N.A. Arsentieva, N.E. Liubimova, O.K. Batsunov,
Z.R. Korobova, O.V. Stanevich, A.A. Lebedeva,
E.A. Vorobyov, S.V. Vorobyova, A.N. Kulikov, D.A. Lioznov,
M.A. Sharapova, D.E. Pevtsov, Areg A. Totolian "Plasma
cytokines in patients with COVID-19 during acute phase
of the disease and following complete recovery", Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2021, Vol. 23, no. 2, pp. 311-326.
doi: 10.15789/1563-0625-PCI-2312

DOI: 10.15789/1563-0625-PCI-2312

но сниженные уровни 8 цитокинов по сравнению со значениями контрольной группы: IL-1 α , IL-2, IL-9, IL-12 p40, IL-18, CCL22/MDC, Flt3 Ligand, TGF- α .

Иммунологическая реакция, вызванная заражением SARS-CoV-2, вовлекает многочисленные цитокины, преимущественно провоспалительного характера. Нами впервые показано, что фаза реконвалесценции характеризуется значительно сниженным уровнем цитокинов, которые регулируют дифференцировку клеток, гемопоэз, в особенности лимфоцитарное звено (Т-лимфоциты, NK-клетки). В острую фазу заболевания уровень этих цитокинов не меняется. Значительное снижение в фазу реконвалесценции по сравнению с острой фазой выявлено для подавляющего большинства цитокинов в плазме крови. Наоборот, острая фаза заболевания сопровождается значительно повышенным уровнем провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в плазме крови.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, цитокины, хемокины, реконвалесценция, мультиплексный анализ

PLASMA CYTOKINES IN PATIENTS WITH COVID-19 DURING ACUTE PHASE OF THE DISEASE AND FOLLOWING COMPLETE RECOVERY

Arsentieva N.A.^a, Liubimova N.E.^a, Batsunov O.K.^{a,b}, Korobova Z.R.^a, Stanevich O.V.^{b,c}, Lebedeva A.A.^b, Vorobyov E.A.^b, Vorobyova S.V.^b, Kulikov A.N.^b, Lioznov D.A.^c, Sharapova M.A.^b, Pevtsov D.E.^b, Totolian Areg A.^{a,b}

^a St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

^b First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^c A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. COVID-19, an infection caused by the new coronavirus SARS-CoV-2, is associated with a number of pathophysiological mechanisms, mobilizing a wide spectrum of biomolecules, mainly, cytokines. The purpose of this study was to evaluate levels of multiple cytokines in blood plasma from the patients with COVID-19 during acute phase of the disease, and upon complete recovery. Samples of peripheral blood plasma of 56 patients with COVID-19, 69 convalescents and 10 healthy individuals were examined. Concentrations of 46 molecules, such as IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IL-17-E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27, IFN α 2, IFN γ , TNF α , TNF β /Lymphotoxin- α (LTA), CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC, CXCL1/GRO α , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalkine, IL-1ra, IL-10, EGF, FGF-2/FGF-basic, Flt3 Ligand, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF- α , VEGF-A were measured via xMAP multiplexing technology. Significantly increased levels of 18 cytokines were found in blood plasma from COVID-19 patients during acute phase of the disease (as compared to control group), i.e., IL-6, IL-7, IL-15, IL-27, TNF α , TNF β /Lymphotoxin- α (LTA), CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CXCL1/GRO α , CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG, IL-1ra, IL-10, M-CSF, GM-CSF, VEGF-A. We found a significant decrease of nearly all the mentioned cytokines in recovered patients, in comparison with those who had moderate, severe/extremely severe disease. Moreover, we revealed a significantly decreased level of 8 cytokines in plasma from convalescents, as compared with control group, i.e., IL-1 α , IL-2, IL-9, IL-12 p40, IL-18, CCL22/MDC, Flt3 Ligand, TGF- α . Immune response caused by SARS-CoV-2 infection involves multiple cytokines, mostly, with pro-inflammatory effects. We have shown for the first time that the convalescence phase is characterized by significantly lower levels of cytokines which regulate cellular differentiation and hematopoiesis (in particular, lymphocytes, T-cells and NK-cells). Over acute phase of the disease, the levels of these cytokines did not change. We revealed a significant decrease of most plasma cytokines upon recovery as compared to acute phase. On the contrary, acute phase of the disease is accompanied by significant increase of both pro- and anti-inflammatory cytokines in blood plasma.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, cytokines, chemokines, convalescence, multiplex analysis

Введение

Вспышка новой коронавирусной инфекции, названной COVID-19, началась в декабре 2019 года и перешла в масштаб пандемии в марте 2020. Для COVID-19 характерна летальность около 2% и высокая контагиозность [28]. Источником инфекции является SARS-CoV-2, оболочечный одноцепочечный РНК-вирус рода Betacoronavirus [6]. Схожий с другими коронавирусами, в частности с SARS-CoV, новый коронавирус в качестве входной точки использует ангиотензинпревращающий фермент 2 (angiotensin-converting enzyme 2 – ACE2), через который с помощью преактивированного белка пепломера он внедряется в клетки верхних дыхательных путей с дальнейшим распространением его в ткани легких [14]. Вирус SARS-CoV-2 попадает в организм через слизистую оболочку носа, гортани и бронхов, проникает в периферическую кровь и поражает не только легкие, но и пищеварительный тракт, сердце, почки, клетки которых экспрессируют ACE2. Вирус SARS-CoV-2 связывается поверхностными шипиками S-белка с протеином ACE2, расположенным на клеточной мембране, затем происходит репликация вируса и высвобождение новых вирионов из инфицированной клетки. Вирионы поражают целевые органы и индуцируют развитие местного и системного воспалительного ответа [1, 3].

Клиническую картину новой коронавирусной инфекции можно охарактеризовать как острое респираторное заболевание, однако течение болезни варьирует у разных пациентов от асимптоматического до крайне тяжелого, в частности пневмонии с острым респираторным дистресс-синдромом [18]. Такое разнообразие проявлений может представлять трудность в эпидемиологическом плане, поскольку пациенты без проявлений заболевания способствуют распространению вируса в популяции. Однозначного ответа на вопрос, чем обусловлена вариативность клинической картины у разных пациентов, до сих пор не существует. Выдвигается множество теорий относительно патогенеза инфекции SARS-CoV-2, однако уже сейчас понятно, что в основе разнообразия клинических проявлений лежит индивидуальная иммунная реактивность организма.

Цитокины представляют собой регуляторные пептиды, продуцируемые клетками организма. К системе цитокинов в настоящее время относят около 200 полипептидных веществ [2]. Все они имеют ряд общих биохимических и функциональных характеристик, среди которых важнейшими считаются следующие: плеiotропность и взаимозаменяемость биологического действия, отсутствие антигенной специфичности, проведение сигнала путем взаимодействия со специ-

фическими клеточными рецепторами, формирование цитокиновой сети. В иммунопатогенезе SARS-CoV-2 у многих пациентов описывается развитие так называемого «цитокинового шторма» – патологического гипервоспаления с высвобождением цитокинов [3, 20]. Высвобождение цитокинов в ответ на инфекцию может привести к легким или тяжелым клиническим проявлениям. Предполагается существование связи между тяжестью заболевания, репликацией вируса и цитокиновым штормом [26]. Таким образом, **целью настоящего исследования** стала оценка уровня широкого спектра цитокинов в плазме крови больных COVID-19 в острой фазе заболевания и фазе полного выздоровления.

Материалы и методы

С мая по июль 2020 года было обследовано 135 человек, сформировавших 3 группы: больные COVID-19 (n = 56), реконвалесценты (n = 69), контрольная группа (n = 10). На проведение данного исследования было получено согласие локального этического комитета Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. От каждого участника, включенного в исследование, было получено информированное письменное согласие.

В группу больных COVID-19 входило 56 человек обоего пола (50%/50%) в возрасте от 27 до 89 лет. Все больные находились на стационарном лечении в центре по лечению новой коронавирусной инфекции COVID-19 ПСПбГМУ им. академика И.П. Павлова. У больных был подтвержденный диагноз «новая коронавирусная инфекция» (U07.1 по МКБ-10) на основании положительного результата ПЦР с обнаружением РНК SARS-CoV-2. Больные находились в острой фазе заболевания. У 1,8% (1 человека) наблюдалось легкое течение заболевания, у 50% больных (28 человек) – средняя тяжесть течения, у 48,2% (27 человек) было тяжелое и крайне тяжелое течение заболевания. У троих человек (5,4%) заболевание закончилось летальным исходом, среди них у одного была средняя тяжесть, а у двоих тяжелое течение заболевания. У всех больных было поражение легких. У всех пациентов в плазме крови определяли наличие специфических антител классов IgM и IgG против вируса SARS-CoV-2 методом ИФА (GA, Германия). У 80% пациентов (45 человек) обнаружены специфические антитела класса IgM против вируса SARS-CoV-2. У 75% пациентов (42 человек) обнаружены суммарные специфические антитела класса IgG против вируса SARS-CoV-2. Венозную кровь забирали у пациентов при поступлении в стационар.

Группа реконвалесцентов состояла из 69 человек, переболевших COVID-19, обоего пола (52% мужчин / 48% женщин) в возрасте от 19 до 61 года. Переболевшие лица являлись донорами плазмы в Центре переливания крови ПСПбГМУ им. академика И.П. Павлова и соответствовали критериям отбора для сдачи крови (например, отсутствие беременности в течение последних шести недель, никогда не было диагностировано ВИЧ, ВГВ или ВГС, отсутствовали хронические заболевания в стадии обострения). У всех лиц этой группы ранее был подтвержден диагноз «новая коронавирусная инфекция» на основании положительного результата ПЦР с обнаружением РНК SARS-CoV-2. На момент заболевания у 43,5% больных (30 человек) наблюдалась легкая форма заболевания, у 46,4% (32 человек) – заболевание средней тяжести, у 10,1% (7 человек) – тяжелое и крайне тяжелое течение заболевания. На момент обследования у выздоровевших отсутствовали симптомы новой коронавирусной инфекции, а также был отрицательный тест ПЦР на выявление РНК SARS-CoV-2. После снятия диагноза (двух отрицательных тестов ПЦР на выявление РНК SARS-CoV-2) прошло от 30 до 100 дней. У всех пациентов в плазме крови определяли наличие специфических антител класса IgG против вируса SARS-CoV-2 методом ИФА (GA, Германия). 7,2% переболевших (5 человек) были серонегативными по суммарным специфическим антителам класса IgG против вируса SARS-CoV-2. У 85,5% (59 человек) обнаружены антитела класса IgG против белка спайк гликопротеин 1 (S1) вируса SARS-CoV-2, у 30,3% (20 человек) – против белка спайк гликопротеин 2 (S2) и у 91,3% (63 человек) обнаружены антителам класса IgG против белка нуклеокапсида (N) вируса SARS-CoV-2.

Контрольная группа включала в себя 10 условно здоровых жителей Санкт-Петербурга обоего пола (50%/50%) в возрасте от 24 до 69 лет. У обследованных лиц отсутствовали острые воспалительные заболевания и не наблюдались хронические заболевания в стадии обострения, а также был отрицательный тест ПЦР на выявление РНК SARS-CoV-2 и отсутствовали в плазме крови специфические антитела класса IgG против вируса SARS-CoV-2.

Материалом исследования служила периферическая кровь. Образцы крови забирали в вакуумные пробирки с антикоагулянтом K₂ЭДТА и центрифугировали при 350g в течение 10 минут. Плазму отбирали в криопробирки, замораживали и хранили при -80 °С до проведения анализа.

В плазме крови определяли концентрации 46 молекул: интерлейкинов и некоторых провоспалительных цитокинов (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3,

IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IL-17-E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27, IFN α 2, IFN γ , TNF α , TNF β /Lymphotoxin- α (LTA)); хемокинов (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC, CXCL1/GRO α , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalkine), противовоспалительных цитокинов (IL-1ra, IL-10) и ростовых факторов (EGF, FGF-2/FGF-basic, Flt3 Ligand, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF- α , VEGF-A). Исследование проводили с помощью мультиплексного анализа по технологии xMAP (Luminex, США) с использованием наборов с магнитными частицами Milliplex HCYTA-60K-PX48 (Merck-Millipore) согласно инструкции фирмы-производителя. Регистрацию и анализ данных проводили на приборе Luminex MAGPIX (Luminex, США).

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism5. Поскольку полученные данные не подчинялись нормальному распределению, для анализа выборок использовали методы непараметрической статистики. Для межгрупповых сравнений применяли критерий Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$. Результаты представлены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Для корреляционного анализа применяли коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты

Уровни цитокинов у больных COVID-19 в острой фазе заболевания

Результаты определения концентрации цитокинов представлены в таблице 1.

В плазме крови больных COVID-19, находящихся в острой фазе заболевания, по сравнению с контрольной группой достоверно повышенные уровни обнаружены для 18 цитокинов из 46 анализируемых. Среди них провоспалительные цитокины: IL-6, повышенный в 16,7 раза ($p < 0,0001$), IL-7 в 1,6 раза ($p < 0,005$), IL-15 в 2,1 раза ($p = 0,0007$), IL-27 в 2,1 раза, IFN γ в 2,2 раза ($p = 0,0001$), TNF α в 3 раза ($p < 0,0001$) и TNF β /Lymphotoxin- α (LTA) в 2 раза ($p < 0,05$); СС-хемокины: CCL2/MCP-1 в 3,1 раза ($p < 0,0001$) и CCL7/MCP-3 в 4,4 раза ($p < 0,001$); СХС-хемокины: CXCL1/GRO α в 2,3 раза ($p < 0,001$), CXCL8/IL-8 в 2 раза ($p = 0,0002$), IFN γ -зависимые хемокины: CXCL10/IP-10 в 98,8 раза ($p < 0,001$) и CXCL9/MIG в 5,8 раза ($p < 0,001$). Повышенные уровни противовоспалительных цитокинов: IL-1ra – в 4,2 раза ($p < 0,0001$) и IL-10 в 4,9 раза ($p < 0,0001$). Ростовые факторы: M-CSF, повы-

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ COVID-19, НАХОДЯЩИХСЯ В ОСТРОЙ ФАЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, И РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ, НАХОДЯЩИХСЯ В ФАЗЕ ПОЛНОГО ВЫЗДОРОВЛЕНИЯ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. PLASMA CYTOKINE CONTENT IN PATIENTS WITH COVID-19 IN ACUTE PHASE AND CONVALESCENTS PHASE, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Группы обследованных лиц Groups of examined individuals			p		
	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 56)	COVID-19 реконва- лесценты COVID-19 convalescent (n = 69)	Здоровые до- норы (ЗД) Healthy donors (HD) (n = 10)	COVID-19 острая фаза/ COVID-19 реконва- лесценты COVID-19 acute phase/ COVID-19 convalescent	COVID-19 острая фаза/ ЗД COVID-19 acute phase/HD	COVID-19 реконва- лесценты/ ЗД COVID-19 convalescent/ HD
Интерлейкины и некоторые провоспалительные цитокины Interleukins and some proinflammatory cytokines						
IL-1α	25,5 (18,2-40,9)	9,9 (5,2-17,6)	23,7 (12,5-35,2)	< 0,0001	ns	0,0063
IL-1β	21,5 (15,7-30,7)	9,6 (5,9-17,2)	18,6 (11,1-23,1)	< 0,0001	ns	ns
IL-2	3,5 (2,4-3,5)	0,8 (0,3-1,9)	3,1 (2,5-4,3)	< 0,0001	ns	< 0,0001
IL-3	5,7 (2,6-9,9)	2,4 (1,3-4,5)	4,6 (1,5-6,8)	< 0,0001	ns	ns
IL-4	5,9 (3,3-7,4)	2,0 (1,2-2,8)	3,6 (2,0-3,8)	< 0,0001	ns	ns
IL-5	10,2 (6,9-14,1)	5,5 (3,3-7,8)	8,3 (5,2-13,6)	< 0,0001	ns	ns
IL-6	36,5 (17,8-66,7)	1,3 (0,8-1,7)	2,2 (1,6-3,2)	< 0,0001	< 0,0001	ns
IL-7	26,8 (18,7-40,5)	8,9 (6,2-13,7)	17,2 (9,9-19,9)	< 0,0001	< 0,05	ns
IL-9	36,7 (24,9-42,8)	15,0 (9,8-27,5)	30,8 (23,2-38,9)	< 0,0001	ns	0,0079
IL-12 p40	149,6 (118,1-209,9)	63,91 (47,03-85,90)	114,1 (100,8-144,4)	< 0,0001	ns	< 0,0001
IL-12 p70	9,4 (6,3-15,8)	4,6 (2,0-8,1)	8,1 (4,6-14,5)	< 0,0001	ns	ns
IL-13	45,8 (27,2-64,6)	24,4 (8,9-38,7)	30,0 (8,9-41,8)	< 0,0001	ns	ns
IL-15	38,9 (29,9-46,8)	11,5 (7,7-17,4)	18,3 (14,7-30,6)	< 0,0001	0,0007	ns
IL-17A	24,8 (14,5-33,2)	12,7 (6,9-20,8)	21,2 (12,9-23,8)	< 0,0001	ns	ns
IL-17E/IL-25	982,3 (644,5-1136,0)	525,0 (400,2-872,5)	702,7 (509,6-1070,0)	< 0,0001	ns	ns
IL-17F	21,3 (11,3-36,6)	3,9 (0,0-14,1)	9,5 (3,5-30,8)	< 0,0001	ns	ns
IL-18	138,2 (92,1-195,9)	33,9 (21,23-52,44)	95,9 (68,3-157,1)	< 0,0001	ns	< 0,0001
IL-22	77,6 (65,9-88,3)	49,0 (26,4-59,6)	70,4 (50,8-76,2)	< 0,0001	ns	ns

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Группы обследованных лиц Groups of examined individuals			p		
	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 56)	COVID-19 реконва- лесценты COVID-19 convalescent (n = 69)	Здоровые до- норы (ЗД) Healthy donors (HD) (n = 10)	COVID-19 острая фаза/ COVID-19 реконва- лесценты COVID-19 acute phase/ COVID-19 convalescent	COVID-19 острая фаза/ ЗД COVID-19 acute phase/HD	COVID-19 реконва- лесценты/ ЗД COVID-19 convalescent/ HD
IL-27	4408,0 (2655,0-6549,0)	1422,0 (1095,0-1825,0)	2062,0 (1522,0-2495,0)	< 0,0001	0,0006	ns
IFN α 2	88,2 (46,7-121,4)	41,2 (23,0-72,0)	72,0 (38,3-86,9)	< 0,0001	ns	ns
IFN γ	58,9 (40,2-101,5)	14,6 (7,5-23,8)	26,7 (21,8-36,1)	< 0,0001	0,0001	ns
TNF α	172,3 (116,4-172,3)	42,5 (26,36-54,30)	58,2 (38,5-79,8)	< 0,0001	< 0,0001	ns
TNF β / Lympho- toxin- α (LTA)	24,2 (13,6-30,4)	12,3 (6,8-19,8)	11,7 (4,4-13,6)	< 0,0001	< 0,05	ns
CC-хемокины CC-chemokines						
CCL2/MCP-1	723,4 (500,9-1093,0)	207,3 (153,0-303,0)	234,7 (189,5-383,8)	< 0,0001	< 0,0001	ns
CCL3/MIP-1 α	49,5 (29,8-60,4)	21,2 (0,0-38,9)	36,0 (14,6-48,9)	< 0,0001	ns	ns
CCL4/MIP-1 β	26,3 (19,5-32,3)	16,7 (12,6-19,9)	18,7 (15,4-30,7)	< 0,0001	ns	ns
CCL7/MCP-3	33,1 (0,0-47,7)	0 (0-0)	7,5 (0,0-23,4)	< 0,0001	< 0,001	ns
CCL11/Eo-taxin	143,0 (109,2-188,6)	91,8 (60,1-124,0)	112,2 (95,9-197,9)	< 0,0001	ns	ns
CCL22/MDC	872,7 (556,7 – 1173,0)	653,5 (545,4-965,4)	1155,0 (1049,0-1326,0)	< 0,05	< 0,05	< 0,0001
CXC-хемокины CXC-chemokines						
CXCL1/ GRO α	84,9 (55,8-144,9)	43,6 (24,4-83,7)	36,8 (17,0264,1)	< 0,0001	< 0,001	ns
CXCL8/IL-8	18,7 (15,5-25,0)	5,7 (3,7-7,9)	9,3 (6,5-12,2)	< 0,0001	0,0002	ns
CXCL9/MIG	7677,0 (3864,0-15227,0)	1135,0 (842,1-1699,0)	1312,0 (1182,0-2072,0)	< 0,0001	< 0,001	ns
CXCL10/ IP-10	34270,0 (10578,0-308117,0)	229,0 (156,8-354,3)	346,8 (268,4-439,2)	< 0,0001	< 0,001	ns
CX3C-хемокин CX3C-Chemokine						
CX3CL1/ Fractalkine	294,3 (202,3-395,8)	226 (152,6-286,1)	274,8 (176,4-360,5)	0,0001	ns	ns

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Группы обследованных лиц Groups of examined individuals			p		
	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 56)	COVID-19 реконва- лесценты COVID-19 convalescent (n = 69)	Здоровые до- норы (ЗД) Healthy donors (HD) (n = 10)	COVID-19 острая фаза/ COVID-19 реконва- лесценты COVID-19 acute phase/ COVID-19 convalescent	COVID-19 острая фаза/ ЗД COVID-19 acute phase/HD	COVID-19 реконва- лесценты/ ЗД COVID-19 convalescent/ HD
Противовоспалительные цитокины Anti-inflammatory cytokines						
IL-1ra	58,5 (34,0-99,0)	9,5 (6,3-16,2)	13,8 (7,3-21,6)	< 0,0001	< 0,0001	ns
IL-10	51,8 (31,2-25,0)	6,4 (4,3-10,6)	10,6 (7,4-15,4)	< 0,0001	< 0,0001	ns
Ростовые факторы Growth factors						
EGF	247,5 (122,8-388,8)	174,2 (94,61-293,00)	233,8 (171,0-403,9)	ns	ns	ns
FGF-2/FGF- basic	135,1 (112,1-184,0)	106,8 (79,0-147,3)	106,8 (94,6-150,9)	0,0007	ns	ns
Flt3 Ligand	29,5 (22,1-40,9)	13,7 (9,2-18,6)	29,4 (17,5-33,9)	< 0,0001	ns	0,0007
G-CSF	146,2 (82,3-187,0)	22,2 (4,5-56,2)	68,4 (43,2-100,7)	< 0,0001	ns	ns
M-CSF	633,4 (409,2-889,0)	111,0 (59,9-178,5)	157,6 (116,2-231,0)	< 0,0001	< 0,0001	ns
GM-CSF	65,8 (42,7-81,9)	23,5 (14,7-36,9)	27,9 (20,2-61,1)	< 0,0001	0,0077	ns
PDGF-AA	7229,0 (5458,0-9318,0)	4661,0 (3440,0-5830,0)	6833,0 (5123,0-8155,0)	< 0,0001	ns	ns
PDGF-AB/ BB	38323,0 (29253,0-42536,0)	27361,0 (21452,0-34347,0)	37269,0 (29916,0-42128,0)	< 0,0001	ns	ns
TGF-α	9,0 (6,3-11,9)	2,5 (1,5-4,2)	5,4 (4,0-8,9)	< 0,0001	ns	< 0,05
VEGF-A	313,8 (184,0-620,4)	106,6 (69,3-162,1)	128,9 (114,8-192,3)	< 0,0001	< 0,05	ns

шенный в 4 раза ($p < 0,0001$), GM-CSF в 2,3 раза ($p = 0,0077$), VEGF-A в 2,4 раза ($p < 0,05$).

Корреляционной связи между концентрациями цитокинов в плазме крови больных COVID-19, находящихся в острой фазе заболевания, и тяжестью течения заболевания, не выявлено.

Уровни цитокинов у переболевших COVID-19

Из 46 исследованных цитокинов, в плазме крови реконвалесцентов обнаружен достоверно сниженный уровень 8 цитокинов по сравнению со значениями контрольной группы (рис. 1). Среди них провоспалительные цитокины: IL-1α, сниженный в 2,4 раза ($p = 0,0063$), IL-2 снижен

в 3,9 раза ($p < 0,0001$), IL-9 в 2 раза ($p = 0,0079$), IL-12 p40 – в 1,8 раза ($p < 0,0001$) и IL-18 в 2,8 раза ($p < 0,0001$); СС-хемокин: CCL22/MDC, сниженный в 1,8 раза ($p < 0,0001$); а также факторы роста: Flt3 Ligand, сниженный в 2,1 раза ($p = 0,0007$) и TGF-α в 2,1 раза ($p < 0,05$).

В зависимости от тяжести заболевания в группе реконвалесцентов по сравнению с больными COVID-19, у которых заболевание протекало со средней и тяжелой / крайне тяжелой формами течения, характерно достоверно сниженное содержание интерлейкинов и некоторых провоспалительных цитокинов: IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3,

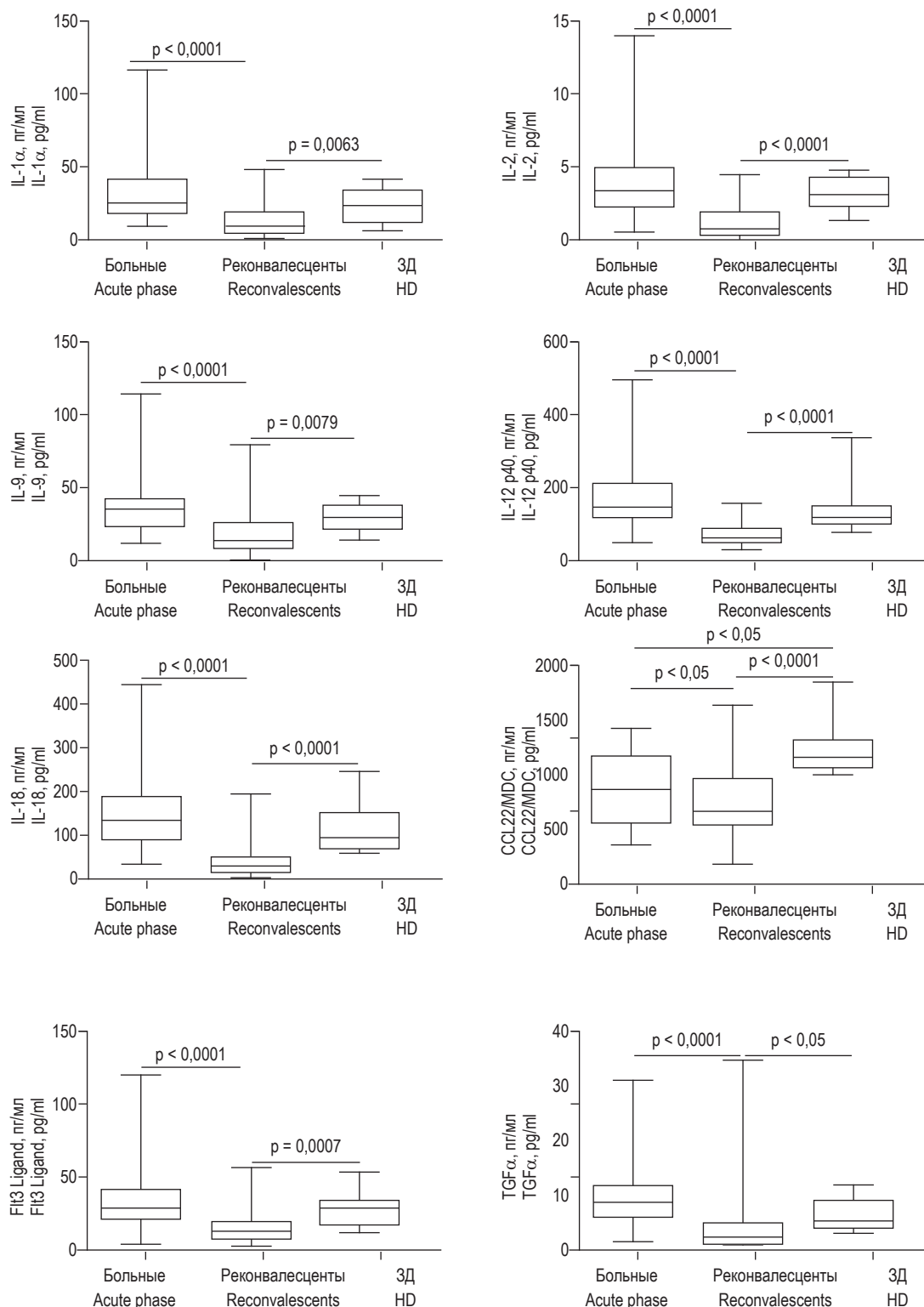


Рисунок 1. Межгрупповые различия уровня цитокинов в плазме крови реконвалесцентов, находящихся в фазе полного выздоровления (n = 69), больных COVID-19, находящихся в острой фазе заболевания (n = 56), и здоровых доноров (ЗД, n = 10)

Примечание. Данные были проанализированы с применением критерия Краскела–Уоллиса. Результаты представлены в виде медианы, межквартильного размаха, минимального и максимального значения.

Figure 1. Differences in the cytokines plasma level in COVID-19 convalescents (n = 69), COVID-19 in the acute phase (n = 56) and healthy donors (HD, n = 10)

Note. Data were analyzed using the Kruskal–Wallis test. Results are presented as median, interquartile range, minimum and maximum values.

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ COVID-19, НАХОДЯЩИХСЯ В ОСТРОЙ ФАЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, И РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ, НАХОДЯЩИХСЯ В ФАЗЕ ПОЛНОГО ВЫЗДОРОВЛЕНИЯ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. PLASMA CYTOKINE CONTENT IN PATIENTS WITH COVID-19 IN ACUTE PHASE AND CONVALESCENTS PHASE IN DEPEND ON DISEASE SEVERITY, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Средняя тяжесть течения заболевания Moderate disease severity			Тяжелая и крайне тяжелая форма течения заболевания Severe and extremely severe disease severity		
	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 28)	COVID-19 реконвалес- центы COVID-19 convalescent (n = 32)	p	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 27)	COVID-19 реконвалесцен- ты COVID-19 convalescent (n = 7)	p
Интерлейкины и некоторые провоспалительные цитокины Interleukins and some proinflammatory cytokines						
IL-1 α	29,63 (21,86-39,23)	9,94 (6,605-15,070)	< 0,0001	22,47 (17,57-45,78)	7,29 (2,34-12,53)	< 0,001
IL-1 β	25,79 (16,43-30,85)	11,15 (5,985-14,190)	< 0,0001	18,63 (14,19-30,51)	8,01 (3,00-11,15)	0,0003
IL-2	3,92 (2,095-5,120)	1,01 (0,32-1,93)	< 0,0001	3,07 (2,38-4,21)	0,495 (0,26-1,01)	0,0003
IL-3	7,08 (3,495-10,520)	2,45 (1,28-4,02)	< 0,0001	4,02 (2,365-7,680)	1,94 (0,95-2,97)	0,0004
IL-4	4,98 (3,04-7,15)	1,99 (1,18-2,78)	< 0,0001	6,0 (3,82-7,40)	1,18 (1,18-2,25)	0,0003
IL-5	11,13 (7,733-14,450)	5,53 (2,78-7,15)	< 0,0001	9,48 (5,30-13,73)	3,69 (3,23-6,92)	0,0086
IL-6	43,18 (14,14-69,05)	1,07 (0,71-1,44)	< 0,0001	42,15 (23,19-85,57)	1,07 (0,83-2,20)	< 0,0001
IL-7	24,23 (18,39-30,91)	9,64 (6,755-13,500)	< 0,0001	32,53 (22,75-58,94)	10,99 (4,18-13,67)	0,0087
IL-9	36,71 (29,98-42,80)	15,01 (9,80-27,54)	< 0,0001	36,71 (22,24-42,14)	12,41 (6,51-19,84)	0,0013
IL-12 p40	149,6 (127,3-198,5)	63,91 (44,17-79,09)	< 0,0001	156,1 (100,7-233,8)	58,33 (35,50-69,46)	0,0007
IL-12 p70	12,04 (6,568-18,220)	4,61 (2,02-7,22)	0,0001	7,22 (6,35-11,60)	2,88 (1,17-8,97)	0,0238
IL-13	54,44 (29,34-63,44)	27,25 (5,22-32,73)	0,0001	40,65 (24,43-63,73)	18,55 (0,80-32,75)	0,0276
IL-15	39,93 (32,91-46,83)	11,54 (7,20-17,36)	< 0,0001	39,43 (31,8-46,5)	9,61 (5,76-16,39)	< 0,0001
IL-17A	27,55 (15,77-35,07)	10,84 (6,95-18,75)	< 0,0001	21,22 (14,46-29,08)	6,95 (4,83-12,68)	0,0031
IL-17E/IL-25	982,3 (644,5-1136,0)	525,0 (400,2-816,6)	0,0002	844,6 (622,4-1077,0)	400,2 (335,2-525,0)	0,0008
IL-17F	24,04 (16,58-40,19)	3,95 (0,00-9,52)	< 0,0001	14,09 (9,52-31,23)	3,95 (2,04-20,43)	ns
IL-18	124,6 (85,17-172,60)	35,91 (23,18-52,44)	< 0,0001	191,3 (106,0-276,2)	57,81 (29,69-100,90)	0,0023
IL-22	81,08 (65,96-89,88)	49,03 (5,90-59,58)	< 0,0001	76,25 (65,96-87,67)	38,86 (28,90-73,38)	0,0256

Таблица 2 (продолжение)
Table 2 (continued)

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Средняя тяжесть течения заболевания Moderate disease severity			Тяжелая и крайне тяжелая форма течения заболевания Severe and extremely severe disease severity		
	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 28)	COVID-19 реконвалес- центы COVID-19 convalescent (n = 32)	p	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 27)	COVID-19 реконвалесцен- ты COVID-19 convalescent (n = 7)	p
IL-27	4446 (2673-7405)	1422 (1142-1803)	< 0,0001	4536 (1990-6915)	1401 (1081-1682)	0,015
IFN α 2	103,6 (54,64-129,50)	41,23 (23,00-59,79)	< 0,0001	69,65 (46,75-102,50)	29,44 (15,97-46,75)	0,0045
IFN γ	61,93 (44,58-107,40)	14,57 (7,46-22,80)	< 0,0001	58,31 (35,70-94,93)	14,57 (7,46-26,66)	0,0007
TNF α	174,7 (127,3-216,9)	42,51 (23,6-50,4)	< 0,0001	192,3 (149,7-259,1)	39,86 (18,00-60,76)	0,0002
TNF β / Lymphotoxin- α (LTA)	24,19 (13,08-27,70)	12,27 (3,83-19,85)	0,0199	17,15 (14,71-34,60)	6,83 (4,65-16,60)	ns
СС-хемокины CC-chemokines						
CCL2/MCP-1	618,9 (489,2-1010,0)	207,3 (172,6-284,8)	< 0,0001	866,5 (657-1261)	256,3 (237,4-373,9)	0,0002
CCL3/MIP-1 α	57,99 (42,51-60,79)	29,82 (0,00-36,15)	< 0,0001	43,72 (29,82-55,48)	14,61 (14,61-36,15)	0,033
CCL4/MIP-1 β	26,28 (19,13-32,08)	16,42 (13,23-21,05)	0,0001	26,98 (21,14-33,97)	19,55 (12,31-23,71)	0,0219
CCL7/MCP-3	33,12 (17,84-41,51)	0 (0-0)	< 0,0001	47,7 (31,82-64,79)	0 (0-0)	0,0003
CCL11/ Eotaxin	148,0 (108,7-188,8)	91,84 (57,25-163,40)	0,0021	144,2 (115,2-194,9)	84,56 (68,97-112,90)	0,01
CCL22/MDC	1118,0 (613,9-1279,0)	731,1 (575,8-999,6)	ns	856,0 (555,1-1040,0)	701,0 (552,1-810,9)	ns
СХС-хемокины CXC-chemokines						
CXCL1/GRO α	69,59 (51,88-122,10)	43,58 (28,47-92,89)	0,0262	127,4 (72,3-206,4)	25,28 (13,94-92,75)	0,002
CXCL8/IL-8	18,75 (16,30-24,56)	5,73 (3,755-7,755)	< 0,0001	21,16 (11,48-27,61)	3,54 (2,26-7,07)	0,0002
CXCL9/MIG	7296 (3802-15060)	980,8 (773,8-1377,0)	< 0,0001	9158 (5904-16863)	1443 (842,1-1942,0)	0,0012
СХЗС-хемокин CXC3C-chemokine						
CX3CL1/ Fractalkine	368 (259,3-415,8)	184,3 (148,3-263,2)	< 0,0001	251,2 (193,4-356,0)	184,3 (135,0-297,1)	ns
Противовоспалительные цитокины Anti-inflammatory cytokines						
IL-1ra	71,71 (35,38-101,00)	8,44 (5,30-19,66)	< 0,0001	59,16 (36,74-109,80)	7,35 (4,06-18,60)	< 0,0001
IL-10	49,17 (30,23-73,04)	5,69 (3,64-10,61)	< 0,0001	70,02 (34,55-94,42)	5,0 (2,96-9,90)	0,0006

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Средняя тяжесть течения заболевания Moderate disease severity			Тяжелая и крайне тяжелая форма течения заболевания Severe and extremely severe disease severity		
	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 28)	COVID-19 реконвалес- центы COVID-19 convalescent (n = 32)	p	COVID-19 острая фаза COVID-19 acute phase (n = 27)	COVID-19 реконвалесцен- ты COVID-19 convalescent (n = 7)	p
Ростовые факторы Growth factors						
EGF	223,6 (93,0-339,4)	190,0 (92,09-359,10)	ns	481,7 (211,0-846,6)	116,3 (63,35-131,80)	0,0014
FGF-2/ FGF-basic	127,6 (105,5-152,7)	106,8 (79,0-147,3)	ns	142,4 (117,3-232,0)	106,8 (67,01-122,50)	0,0192
Flt3 Ligand	28,86 (21,88-35,48)	14,74 (9,915-18,250)	< 0,0001	31,73 (24,49-48,21)	11,54 (4,92-25,13)	0,0046
G-CSF	160,3 (110,3-186,1)	25,72 (12,56-35,84)	< 0,0001	131,8 (80,38-181,50)	12,11 (4,52-63,04)	0,0006
M-CSF	633,4 (411,9-868,4)	183,8 (59,91-121,30)	< 0,0001	677,0 (449,5-931,6)	59,91 (49,83-299,80)	0,0037
GM-CSF	71,08 (51,86-84,63)	25,72 (12,56-35,84)	< 0,0001	61,72 (41,52-73,42)	14,72 (10,42-34,70)	0,0007
PDGF-AA	6239 (5308-8896)	5458 (3792-7042)	0,021	8269 (5677-10505)	4134 (3332-5418)	0,0049
PDGF-AB/BB	39246 (29945-42442)	29990 (23799-35824)	0,0046	39385 (33552-45254)	27301 (22652-34353)	0,0037
TGF-α	10,2 (6,195-12,000)	2,53 (1,315-3,560)	< 0,0001	7,81 (6,28-12,26)	1,84 (1,14-3,90)	< 0,0001
VEGF-A	293,8 (171,3-500,1)	106,6 (67,09-176,80)	< 0,0001	481,7 (211,0-846,6)	116,3 (63,35-131,80)	0,0014

IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IL-17-E/IL-25, IL-18, IL-22, IL-27, IFN α 2, IFN γ , TNF α ; хемокинов (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CXCL1/GRO α , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, противовоспалительных цитокинов: IL-1ra, IL-10 и ростовых факторов: Flt3 Ligand, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF- α , VEGF-A (табл. 2). Кроме того, при средней тяжести течения заболевания в плазме крови реконвалесцентов обнаружены сниженные уровни IL-17F в 6 раз (p < 0,0001) и TNF β /Lymphotoxin- α (LTA) в 2 раза (p = 0,0199), а при тяжелой и крайне тяжелой формах течения сниженные уровни ростовых факторов EGF в 4 раза (p = 0,0014) и FGF-2/FGF-basic (p = 0,0192). Концентрации цитокинов в плазме крови реконвалесцентов, для которых было показано наибольшее снижение значений: IL-6, сниженный в 40 раз (p < 0,0001), CCL7/MCP-3 в плазме крови реконвалесцентов не выявлен, CXCL9/MIG сни-

женный более чем в 6 раз (p < 0,0001; p = 0,0012) и CXCL10/IP-10, сниженный в группе со средней тяжестью в 225 раз (p < 0,0001), в тяжелой и крайне тяжелой формой течения в 138 раз (p = 0,0007).

Достоверных различий в концентрациях цитокинов плазмы крови реконвалесцентов в группах со средней и тяжелой / крайне тяжелой формами заболевания не выявлено. Значимой корреляционной связи между концентрациями цитокинов в плазме переболевших COVID-19, находящихся в фазе полного выздоровления, и тяжестью течения заболевания не обнаружено.

Достоверных различий в содержании цитокинов в группе реконвалесцентов, у которых в крови присутствуют суммарные антитела IgG против вируса SARS-Cov2, и серонегативными пациентами не выявлено.

Значимой корреляционной связи между уровнями цитокинов в плазме крови реконвалесцентов и количеством лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови не обнаружено.

Обсуждение

Результаты нашего исследования свидетельствуют об увеличении уровня ряда цитокинов, среди которых провоспалительные цитокины IL-6, TNF α и TNF β ; противовоспалительный цитокин IL-1ra; цитокины Т-хелперов 1-го типа (Th1): IL-15 и IFN γ ; цитокины Т-хелперов 2-го типа (Th2): IL-10, IL-27; фактор роста эндотелия сосудов – VEGF-A; факторы роста гемопоэтических клеток: IL-7, M-CSF и GM-CSF; СС-хемокины: CCL2/MCP-1 и CCL7/MCP-3; СХС-хемокины: CXCL1/GRO α , CXCL8/IL-8, IFN γ -зависимые хемокины: CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10 в плазме крови больных COVID-19, находящихся в острой фазе заболевания, что подтверждает результаты, которые ранее были получены другими исследователями [7, 11, 12]. Нами показаны повышенные уровни IFN γ и IFN γ -зависимых хемокинов CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10, выявлена прямая корреляционная зависимость между содержанием IFN γ и концентрацией CXCL9/MIG ($r = 0,35$; $p = 0,013$) и CXCL10/IP-10 ($r = 0,67$; $p < 0,0001$), что подтверждают данные литературы [13]. Однако обнаруженные в работе Laing A.G. и соавторов различия в концентрации CXCL10/IP-10 в зависимости от тяжести течения заболевания в нашем исследовании не подтвердились.

У троих больных COVID-19, находящихся в острой фазе заболевания, болезнь закончилась летальным исходом, при этом у одного пациента наблюдалось течение заболевания средней тяжести, а у двоих тяжелое. Мы сравнили концентрации исследованных цитокинов в плазме крови больных COVID-19 с летальным исходом заболевания со значениями в группе больных COVID-19 со средней и тяжелой формами течения заболевания, которые позднее выздоровели. У всех трех пациентов было повышенное содержание цитокинов IL-10, IL-18, TNF α и хемокинов CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10. Таким образом, обнаруженные нами изменения концентрации цитокинов свидетельствуют о том, что уровни цитокинов потенциально могут служить предикторами исхода заболевания, однако требуются дальнейшие исследования с большей выборкой.

В нашем исследовании была выявлена достоверная положительная корреляционная связь между уровнями цитокинов GM-CSF, CXCL1/GRO α , CCL4/MIP-1 β и уровнем вирус-нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19 в острой фазе. В работе Wang K. и соавторов была проанализирована 48-плексная панель для определения цитокинов Bio-Plex Human Cytokine Screening Panel производства Bio-Rad и выявлены положительные корреляции между уровнем вирус-нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19 в

острой фазе и концентрациями цитокинов SCF, TRAIL, M-CSF [27].

В то же время существуют скудные данные о выздоровевших пациентах, перенесших COVID-19, и содержании цитокинов в их плазме. В результате нашего исследования было показано, что в плазме крови реконвалесцентов выявлены достоверно сниженные концентрации практически всех исследованных нами цитокинов, по сравнению с больными COVID-19, находящихся в острой фазе заболевания: интерлейкинов и некоторых провоспалительных цитокинов (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IL-17-E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27, IFN α 2, IFN γ , TNF α , TNF β /Lymphotoxin- α (LTA)); противовоспалительных цитокинов (IL-1ra, IL-10); ростовых факторов (FGF-2/FGF-basic, Flt3 Ligand, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF- α , VEGF-A); хемокинов (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC, CXCL1/GRO α , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalkine). В работе Nasichaolu и соавторов было проведено исследование цитокинов в плазме крови реконвалесцентов через две недели после выздоровления [10]. Исследователи обнаружили повышенные уровни следующих цитокинов: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α , IFN γ в плазме крови реконвалесцентов по сравнению со здоровыми донорами. Эти данные частично совпадают с нашими результатами, полученными у больных COVID-19, находящихся в острой фазе заболевания, у которых обнаружены повышенные уровни IL-6, IL-10, TNF α и IFN γ . С другой стороны, нами получены противоположные результаты о концентрации этих цитокинов в плазме крови реконвалесцентов, исследование которых проводилось на 30-100-й день после выздоровления. Таким образом, через две недели после выздоровления уровни цитокинов еще повышены, а спустя 30-100 дней зафиксированы достоверно сниженные концентрации цитокинов.

Результаты нашего исследования свидетельствуют о сниженном уровне некоторых цитокинов в плазме крови реконвалесцентов по сравнению со здоровыми лицами. Так, сниженный уровень провоспалительных цитокинов IL-1 α и IL-18 скорее всего свидетельствует об истощении ресурсов клеток, продуцирующих эти цитокины. Биологическое значение этого явления требует дальнейшего изучения.

Стоит отметить, что в плазме крови реконвалесцентов достоверно снижены концентрации цитокинов, ответственных за гемопоэз, в частно-

сти лимфопоэза и Т-клеточную дифференцировку по сравнению со здоровыми лицами.

Например, в крови реконвалесцентов показано достоверное снижение концентрации IL-18. Этот цитокин регулирует дифференцировку как Th1, так и Th2 [16]. IL-18, действуя совместно с IL-12, концентрация которого в плазме крови реконвалесцентов также снижена, стимулирует наивные Т-, CD8⁺ и NK-клетки к пролиферации и синтезу IFN γ [21]. Кроме того, IL-18 способствует дифференцировке Th1 и увеличению цитотоксичности NK-клеток, индуцируя экспрессию Fas-лиганда и способствуя уничтожению инфицированных клеток путем Fas-опосредованного апоптоза [22]. IL-18 совместно с IL-2 (концентрация которого также снижена в плазме крови реконвалесцентов) и без участия IL-12 может индуцировать продукцию Th2-цитокинов, а также NK-клеток и естественных киллерных Т-клеток [24]. Таким образом, IL-18 является уникальным цитокином, способным стимулировать различные субпопуляции Т- и NK-клеток.

Ключевая функция IL-12 заключается в регуляции дифференцировки Th1- и Th17-лимфоцитов [17]. IL-12 также индуцирует продукцию IFN γ Т-лимфоцитами и NK-клетками по механизму положительной обратной связи [24].

В плазме крови реконвалесцентов установлен сниженный уровень IL-2, который является одним из основных факторов роста Т-клеток, необходимый для пролиферации Т-клеток и генерации эффекторных клеток и клеток памяти. Важнейшей функцией IL-2 является контроль иммунных реакций и поддержание собственной толерантности, а его отсутствие приводит к дефектному контролю эффекторных клеток и развитию аутоиммунных заболеваний [4]. Помимо Т-лимфоцитов, IL-2 способствует пролиферации В-лимфоцитов и NK-клеток [23]. Следовательно, IL-2 участвует в профилактике аутоиммунных заболеваний и необходим для контроля иммунных реакций и поддержания самотолерантности [29]. Также в плазме крови реконвалесцентов обнаружена сниженная концентрация IL-9, ответственного за лимфопоэз, одного из важнейших факторов роста Т-лимфоцитов. Таким образом, у лиц, перенесших COVID-19, через 30-100 дней после выздоровления наблюдается сниженный уровень цитокинов в циркуляции, ответственных за дифференцировку Т-лимфоцитов и NK-клеток.

К тому же в нашем исследовании установлен сниженный уровень Flt3 Ligand (Fms-like tyrosine kinase 3 ligand) у реконвалесцентов. Этот цитокин является одним из ключевых факторов гемопоэза, а также основным фактором роста для дендритных клеток [19]. Flt3 Ligand служит индикатором клеточности костного мозга. Показано,

что он имеет реципрокную связь с количеством лейкоцитов при апластической анемии и химиотерапевтически индуцированной нейтропении [9]. В нашем исследовании корреляционной связи между уровнем FLT-3L и содержанием лейкоцитов и лимфоцитов в крови реконвалесцентов не обнаружено.

Снижение концентрации TGF- α в плазме крови реконвалесцентов также свидетельствует о нарушении процессов клеточной дифференцировки. TGF- α – член семейства эпидермальных факторов роста (EGF), он является митогенным полипептидом. Белок TGF- α при связывании с рецептором EGFR может инициировать множественные события клеточной пролиферации [15]. TGF- α участвует в процессах репарации, ангиогенеза и эмбриогенеза. Было также показано, что TGF- α стимулирует пролиферацию нервных клеток в поврежденном мозге взрослого человека [7].

Нами установлено снижение концентрации хемокина CCL22/MDC в плазме крови переболевших COVID-19 в фазе полного выздоровления по сравнению со здоровыми лицами. CCL22/MDC – макрофагальный хемокин конститутивно экспрессируется макрофагами, зрелыми дендритными клетками и В-клетками, а повышенная экспрессия CCL22/MDC была отмечена Т-лимфоцитами, которые одновременно продуцируют Th2-цитокины IL-4, IL-5 и IL-6, а также в моноцитах, стимулированных Th2-цитокинами IL-4 и IL-13 [5]. Кроме того, эпителиальные клетки кишечника человека продуцируют CCL22/MDC, который может подавлять воспаление слизистой оболочки. Таким образом, снижение этого конститутивного хемокина может свидетельствовать о нарушении работы кишечника у выздоровевших.

Заключение

Иммунологическая реакция, вызванная заражением SARS-CoV-2, вовлекает многочисленные цитокины, преимущественно провоспалительного характера. В настоящем исследовании впервые показано, что фаза реконвалесценции характеризуется значительно сниженным уровнем цитокинов, регулирующих клеточную дифференцировку, гемопоэз, в особенности лимфоцитарное звено (Т-лимфоциты, NK-клетки). В острую фазу заболевания уровень этих цитокинов не меняется. Значительное снижение в фазу реконвалесценции по сравнению с острой фазой выявлено для подавляющего большинства цитокинов в плазме крови. Наоборот, острая фаза заболевания сопровождается значительно повышенным уровнем цитокинов в плазме крови (провоспалительных и противовоспалительных).

Список литературы / References

1. Абатуров А.Е., Агафонова Е.А., Кривуша Е.Л., Никулина А.А. Патогенез COVID-19 // Здоровье ребенка, 2020. Т. 15, № 2. С. 133-144. [Abaturov A.E., Agafonova E.A., Krivusha E.L., Nikulina A.A.. Pathogenesis of COVID-19. *Zdorovye rebenka = Child's Health*, 2020, Vol. 15, no. 2, pp. 133-144. (In Russ.)]
2. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и функции // Цитокины и воспаление, 2004. Т. 3, № 2. С. 16-22. [Simbirtsev A.S. Cytokines: classification and functions. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2004, Vol. 3, no. 2, pp. 16-22. (In Russ.)]
3. Смирнов В.С., Тотолян Арег А. Некоторые возможности иммунотерапии при коронавирусной инфекции // Инфекция и иммунитет, 2020. Т. 10, № 3. С. 446-458. [Smirnov V.S., Totolian Areg A. Some opportunities for immunotherapy in coronavirus infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, Vol. 10, no. 3, pp. 446-458. (In Russ.)]
4. Abbas A.K., Trotta E.R., Simeonov D., Marson A., Bluestone J.A. Revisiting IL-2: biology and therapeutic prospects. *J. Sci. Immunol.*, 2018, Vol. 3, no. 25, eaat1482. doi: 10.1126/sciimmunol.aat1482.
5. Andrew D.P., Chang M.S., McNinch J., Wathen S.T., Rihaneck M., Tseng J., Spellberg J.P., Elias C.G. 3rd. STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 161, no. 9, pp. 5027-5038.
6. Breaching N.J., Fletcher T.E., Fowler R. COVID-19. *BMJ Best Practices*. Available at: <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/3000168/pdf/3000168/COVID-19.pdf>.
7. Costela-Ruiz V.J., Illescas-Montes R., Puerta-Puerta J.M., Ruiz C., Melguizo-Rodríguez L. SARS-CoV-2 infection: the role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2020, no. 54, pp. 62-75.
8. Fallon J., Reid S., Kinyamu R., Opole I., Opole R., Baratta J., Korc M., Endo T.L., Duong A., Nguyen G., Karkehabadhi M., Twardzik D., Patel S., Loughlin S. *In vivo* induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, Vol. 97, no. 26, pp. 14686-14691.
9. Haidar J.H., Bazarbachi A., Mahfouz R., Haidar H.A., Jaafar H., Daher R. Serum Flt3 ligand variation as a predictive indicator of hematopoietic stem cell mobilization. *J. Hematother. Stem Cell Res.*, 2002, Vol. 11, no. 3, pp. 533-538.
10. Hasichaolu, Zhang X., Li X., Li X., Li D. Circulating cytokines and lymphocyte subsets in patients who have recovered from COVID-19. *BioMed Res. Int.*, 2020, Vol. 2020, 7570981. doi: 10.1155/2020/7570981.
11. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *J. Lancet*. 2020, no. 395, pp. 497-506.
12. Kox M., Waalders N.J.B., Kooistra E.J., Gerretsen J., Pickkers P. Cytokine levels in critically ill patients with COVID-19 and other conditions. *JAMA*, 2020, Vol. 3, no. 324 (15), pp. 1565-1567.
13. Laing A.G., Lorenc A., Del Molino Del Barrio I., Das A., Fish M., Monin L. et al. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *J. Nat. Med.*, 2020, Vol. 26, no. 10, pp. 1623-1635.
14. Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Greenough T.C., Choe H., Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 2003, Vol. 426, no. 6965, pp. 450-454.
15. McInnes C., Wang J., Al Moustafa A.E., Yansouni C., O'Connor-McCourt M., Sykes B.D. Structure-based minimization of transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) through NMR analysis of the receptor-bound ligand. Design, solution structure, and activity of TGF-alpha 8-50. *J. Biol. Chem.*, 1998, Vol. 273, no. 42, pp. 27357-27363.
16. Nakanishi K., Yoshimoto T., Tsutsui H., Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001, Vol. 19, pp. 423-474.
17. O'Shea J.J., Paul W.E. Regulation of T(H)1 differentiation – controlling the controllers. *Nat. Immunol.*, 2002, no. 3, pp. 506-508.
18. Parasher A. COVID-19: Current understanding of its pathophysiology, clinical presentation and treatment. *Postgrad. Med. J.*, 2020, postgradmedj-2020-138577. doi: 10.1136/postgradmedj-2020-138577.
19. Restifo N.P., Dudley M.E., Rosenberg S.A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *J. Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 4, pp. 269-281.
20. Rodriguez L., Brodin P. Unraveling the immune response in severe COVID-19. *J. Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 40, no. 7, pp. 958-959.
21. Takeda K., Tsutsui H., Yoshimoto T., Adachi O., Yoshida N., Kishimoto T., Akira S. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *J. Immunology*. 2008, Vol. 180, no. 3, pp. 383-390.
22. Tsutsui, H., Matsui, K., Kawada, N., Hyodo, Y., Hayashi, N., Okamura, H., Nakanishi, K. IL-18 accounts for both TNF-alpha and Fas ligand mediated hepatotoxic pathways in endotoxin induced liver injury in mice. *J. Immunol.*, 1997, Vol. 159, no. 8, pp. 3961-3967.
23. Turner M.D., Nedjai B., Hurst T., Pennington D.J. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014, Vol. 1843, no. 11, pp. 2563-2582.
24. Vecchié A., Bonaventura A., Toldo S., Dagna L., Dinarello C.A., Abbate A. IL-18 and infections: is there a role for targeted therapies? *J. Cell. Physiol.*, 2021, Vol. 236, no. 3, pp. 1638-1657.

25. Vignali D.A.A., Kuchroo V.K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat. Immunol.*, 2012, no. 13, pp. 722-728.
26. Wang J., Jiang M., Chen X., Montaner L.J. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *J. Leukoc. Biol.*, 2020, Vol. 108, no. 1, pp. 17-41.
27. Wang K., Long Q.X., Deng H.J., Hu J., Gao Q.Z., Zhang G.J., He C.L., Huang L.Y., Hu J.L., Chen J., Tang N., Huang A.L. Longitudinal dynamics of the neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 infection. *J. Clin. Infect. Dis.*, 2020, c1aa1143. doi: 10.1093/cid/ciaa1143.
28. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Available at: <https://covid19.who.int/>.
29. Yuan X., Cheng G., Malek T.R. The importance of regulatory T-cell heterogeneity in maintaining self-tolerance. *J. Immunol. Rev.*, 2014, Vol. 203, no. 1, pp. 103-114.

Авторы:

Арсентьева Н.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Любимова Н.Е. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Бацунов О.К. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Коробова З.Р. — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Станевич О.В. — врач-инфекционист отдела эпидемиологии клиник ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ; аспирант ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Лебедева А.А. — врач-терапевт СОСМП ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Воробьев Е.А. — врач-нефролог, ассистент кафедры нефрологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Arsentieva N.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Liubimova N.E., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Batsunov O.K., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Korobova Z.R., Laboratory Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, PhD student, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Stanevich O.V., Clinical Infectologist, Epidemiology Department, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Postgraduate Student, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Lebedeva A.A., Physician, Emergency Department, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Vorobyov E.A., Clinical Nephrologist, Assistant Professor, Nephrology Department, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Воробьева С.В. — врач-терапевт, ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Куликов А.Н. — д.м.н., профессор ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Лизнов Д.А. — д.м.н., исполняющий обязанности директора ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Шарапова М.А. — врач-трансфузиолог, Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Певцов Д.Э. — руководитель отделения переливания крови, врач-трансфузиолог, Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Vorobyova S.V., Physician, Assistant Professor, Department of Internal Diseases, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Kulikov A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Lioznov D.A., PhD, MD (Medicine), Acting Director, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Sharapova M.A., Blood Bank Physician, R. Gorbacheva Memorial Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Pevtsov D.E., Head, Transfusiology Department, R. Gorbacheva Memorial Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 22.03.2021
Принята к печати 22.03.2021

Received 22.03.2021
Accepted 22.03.2021