

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт иммунологии и физиологии
Уральского отделения Российской академии наук

Федеральное медико-биологическое агентство
Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение
Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный
медицинский биофизический центр имени А.И.Бурназяна

Добрынина Мария Александровна

**ФОРМИРОВАНИЕ ВТОРИЧНЫХ ИММУНОДИСФУНКЦИЙ
У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ПОДХОДЫ К ИХ КОРРЕКЦИИ**

3.2.7. Иммунология

3.1.18. Внутренние болезни

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научные консультанты:

- *Сарапульцев Алексей Петрович*,
доктор биологических наук
- *Рябова Лиана Валентиновна*,
доктор медицинских наук, доцент

Екатеринбург – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

	С.
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА	14
1.1 – Характеристика коронавирусной инфекции COVID-19	14
1.2 – Патофизиология COVID-19	16
1.3 – Клиническая характеристика постковидного синдрома	23
ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	29
2.1 – Оценка изученных явлений	29
2.2 – Объекты исследования	29
2.3 – Методы исследования	30
2.3.1 – Клинические методы исследований	30
2.3.2 – Биоинформационные методы исследования	30
2.3.3 – Лабораторные методы исследований	43
2.3.3.1 - Вирусологические методы исследования	43
2.3.3.2 - Бактериологические методы исследования	45
2.3.3.3 – Иммунологические методы исследований	47
2.3.4 – Статистические методы исследования	48
2.4 – Оборудование	48
ГЛАВА 3 – КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА	49
ГЛАВА 4 – ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ	63
4.1 – Оценка взаимодействия CD46 с белками вируса SARS-CoV-2	63
4.2 – Оценка врожденных факторов иммунной защиты у постковидных пациентов	69
4.3 – Оценка факторов приобретенной иммунной защиты у постковидных пациентов	81
4.4 – Клинико-иммунологическая характеристика постковидных пациентов	95
ГЛАВА 5 – РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К ИММУНОКОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ	106

5.1 – Выбор препаратов для иммунокоррекции постковидных нарушений иммунной системы	106
5.2 – Дополнительные исследования различных вариантов активности синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF)	108
5.3 – Оценка влияния синтетического пептида активного центра GM-CSF на иммунную систему постковидных пациентов, имеющих снижение параметров иммунной системы	132
5.4 – Оценка эффективности применения глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) у постковидных пациентов	133
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	139
ВЫВОДЫ	162
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	164
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	165
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	166
БЛАГОДАРНОСТИ	190

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработки.

Актуальность исследования обусловлена продолжающимся ростом числа заболеваний, вызванных вирусом SARS-CoV-2, скоростью распространения и наличием тяжелых форм заболевания, вплоть до развития летальных исходов. Именно это заставляет различные страны, в том числе и Россию, экстренно разрабатывать новые противовирусные методы лечения и профилактики [24]. За последние два года сформировалась значительная группа пациентов, перенесших острую форму заболевания, вызванного SARS-CoV-2, состоящих на диспансерном учете после заболевания и имеющих полиорганные нарушения со стороны различных органов и систем организма [16, 18]. В настоящее время многие авторы определяют такое состояние как постковидный синдром [13, 142]. Оценка взаимосвязи клинических проявлений с измененным иммунным статусом у пациентов с постковидным синдромом необходима для понимания особенностей протекания данного синдрома у исследуемой категории больных, что, в конечном итоге, опосредует возникновение как более тяжелых форм протекания сочетанной патологии, так и более длительного реабилитационного периода. Механизмы формирования такого состояния остаются практически не исследованными. Нет методов объективной оценки данного синдрома и патогенетически обоснованных подходов к их коррекции. В основе таких нарушений, как предполагается, находится повреждение вирусом SARS-CoV-2 работы клеток иммунной системы и формирование продолжительных нарушений их функций. Не исключено и обострение на фоне иммунодисфункции хронических заболеваний, напрямую связанных с последствиями воздействия вируса SARS-CoV-2 на другие ткани и органы организма человека. Но все равно воздействие вируса

на иммунную систему постковидных пациентов остается наиболее важным.

Исследования *in silico* являются актуальными, имеют фундаментально-прикладную направленность, высокий уровень значимости, соответствуют мировому уровню исследований в данной области и характеризуются высокой степенью научной новизны в связи с тем, что позволяют создать принципиально новую системную мультитаргетную модель развития коронавирусной инфекции, моделирующую взаимодействие CD46 и релевантных белков-мишеней SARS-CoV-2 в виде искусственной нейронной сети полносвязной архитектуры. Таким образом, результаты исследования доказывают высокую научную новизну, фундаментальную и прикладную значимость исследования, поскольку будет построена новая модель развития коронавирусной инфекции.

Предполагаемый научный подход с привлечением самых современных методов исследования иммунного статуса у переболевших COVID-19 для создания персонализированной терапевтической помощи является новым и инновационным. Создание такого подхода требует более детальной расшифровки иммунопатогенеза как самого «постковидного синдрома», так и оценки влияния иммунокорректоров на клеточную и гуморальную составляющую иммунной системы иммунокомпроментированных людей. Особенно это важно для лиц с сохранившимися нарушениями в иммунной системе после перенесенного острого COVID-19.

В Российской Федерации ежемесячно становятся на диспансерный учет новые пациенты с постковидными нарушениями, и в ближайшие годы такие пациенты могут стать очень большой проблемой для здравоохранения России в целом [18, 16, 21]. В настоящее время разрабатываются подходы к терапии такого состояния, но пока нет точных данных об эффективности терапевтических мероприятий у пациентов с постковидным синдромом. Именно формирование новых патогенетических подходов к терапии постковидных пациентов с нарушением в иммунной системе и определяет актуальность данного исследования.

Решение поставленных задач имеет не только важное фундаментальное значение, но и практический выход для разработки методических подходов к персонализированной иммунотерапии. Все результаты являются новыми и ранее не были исследованы.

Цель исследования: исследование иммунопатогенеза формирования постковидного синдрома для создания методов диагностики и коррекции постковидных пациентов в соответствии с выявленными ключевыми молекулярными и клеточными механизмами иммунной дисфункции.

Задачи исследования:

1. Проанализировать клинические проявления постковидного синдрома у пациентов, перенесших коронавирусную инфекцию.
2. Оценить наличие взаимодействия панлейкоцитарного рецептора CD46 с различными белковыми структурами вируса SARS-CoV-2 методами биоинформатики.
3. Выявить основные фенотипы, характеризующие действие ключевых механизмов формирования иммунной дисфункции у постковидных пациентов.
4. Выявить взаимосвязь между тяжестью течения новой коронавирусной инфекции в остром периоде и формированием иммунных нарушений у пациентов со сформировавшимся постковидным синдромом.
5. Разработать новую концепцию иммунопатогенеза у постковидных пациентов в соответствии с выявленными нарушениями компартментов иммунной системы.
6. Разработать принципы новой персонализированной иммунокоррекции у постковидных пациентов в соответствии с новой концепцией иммунопатогенеза.

Научная новизна работы. Впервые:

- охарактеризовано формирование полиорганной патологии у постковидных пациентов с преимущественным поражением иммунной, сердечно-сосудистой, эндокринной и нервной систем, желудочно-кишечного

тракта, тяжесть проявлений которой напрямую связана с тяжестью течения острого COVID-19, а также формированием инфекционного, аутоиммунного и аллергического синдромов вне зависимости от наличия или отсутствия в остром периоде COVID-19 поражения легких по типу "матового стекла" по данным компьютерной томографии.

- проведен анализ роли мембранного кофакторного белка CD46 (панлейкоцитарный рецептор к комплементу на всех лейкоцитах человека) в патогенезе COVID-19 и развитии постковидного синдрома;

- выявлены иммунофенотипы, характеризующие действие ключевых механизмов формирования иммунной дисфункции у постковидных пациентов;

- определена взаимосвязь клинических проявлений при постковидном синдроме с основными фенотипами нарушений иммунной системы.

- на основе выявленных нарушений компарментов иммунной системы, разработана новая концепция формирования механизмов иммунопатогенеза постковидного синдрома.

- на основе новой концепции иммунопатогенеза разработаны основные принципы персонифицированной иммунокоррекции у лиц с постковидным синдромом.

- дана оценка клинической и лабораторной эффективности иммунотерапии у лиц с постковидным синдромом иммунодисфункции.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Впервые охарактеризовано формирование полиорганной патологии у постковидных пациентов.

Разработана новая концепция иммунопатогенеза постковидных нарушений иммунной системы: у постковидных пациентов формируются, помимо полиорганной патологии, нарушения иммунной системы (выявлено 4 основных фенотипа нарушений врожденного и приобретенного иммунитета), связанные с тяжестью течения коронавирусной инфекции в остром периоде

болезни, что обуславливает формирование новых подходов к иммунокоррекции этих больных.

Дана оценка эффективности проведенной иммунокорректирующей терапии.

Разработаны рекомендации по лечению иммунодисфункций у постковидных пациентов.

Положения, выносимые на защиту

1. Постковидный синдром проявляется развитием полиорганной патологии с преимущественным поражением иммунной, сердечно-сосудистой, эндокринной и нервной систем, желудочно-кишечного тракта и характеризуется развитием инфекционного, аутоиммунного и аллергического синдромов, а выраженность его клинических проявлений зависит от степени поражения легких по типу "матового стекла" по данным компьютерной томографии в остром периоде заболевания новой коронавирусной инфекцией.

2. Белки вируса SARS-CoV-2 могут взаимодействовать с CD46 панлейкоцитарным рецептором лейкоцитов.

3. У части постковидных пациентов через 6-12 месяцев после перенесенного острого заболевания развиваются 4 основных фенотипа нарушения факторов иммунной системы, как врожденных (снижение экспрессии CD46 на Т-лимфоцитах с формированием дисфункции нейтрофилов, снижение NK-клеток), так и приобретенных (нарушение уровня Т-цитотоксических клеток и В-лимфоцитов).

4. Применение синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ стимулирует фагоцитарные реакции нейтрофилов и активирует Т-лимфоциты

5. Применение глюкозаминилмурамилдипептида восстанавливает активность нейтрофилов и В-клеточное звено иммунной системы.

6. Новая концепция иммунопатогенеза постковидных нарушений иммунной системы у постковидных пациентов заключается в том, что белки

вируса SARS-CoV-2 (NP>MP>SP>EP) взаимодействуют с рецептором CD46, что приводит как к длительно сохраняющейся в постковидном периоде активации системы комплемента вне зависимости от тяжести течения острого заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2, так и к нарушению экспрессии CD46 на различных субпопуляциях лимфоцитов в постковидном периоде у пациентов, имевших поражение легких по типу "матового стекла" по данным КТ в остром периоде COVID-19, что приводит к формированию нарушений иммунной системы (выявлено 4 основных фенотипа нарушений врожденного и приобретенного иммунитета, не пересекающихся между собой). Все эти нарушения, вызванные взаимодействием белков вируса SARS-CoV-2 с рецептором CD46 проявляются также клинически в виде полиорганной патологии, тяжесть проявления которой напрямую связана с нарушением экспрессии CD46 на лимфоцитах, что обуславливает формирование новых подходов к иммунокоррекции этих больных.

Методология и методы исследований. Методологической основой диссертации стали принципы научного анализа биологических систем (комплексность, структурность, системность, объективность, достоверность) с применением современных клинических, модельных, иммунологических, микробиологических и статистических методов, адекватных характеру решаемых задач. Работа выполнена в рамках государственного задания «Иммунофизиологические и патофизиологические механизмы регуляции и коррекции функций организма», номер 122020900136-4, и государственного задания «Исследование новых серотонинергических механизмов клеточного стресса при воспалении и функциональных расстройствах различного генеза» номер № FENU-2023-0014 (2023014ГЗ), поддержана грантом РФФИ и NSFC, 20-515-55003 Китай. Исследования выполнялись согласно Хельсинкской Декларации ВМА (2000 г.) и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999 г.).

Согласно поставленным цели и задачам было проанализировано клиническое состояние постковидных пациентов, проведены

иммунологические, биоинформационные, вирусологические, бактериологические исследования на разных этапах работы, а также проведена иммунокоррекция у части пациентов и статистическая обработка результатов исследований.

Степень достоверности, апробация результатов и личный вклад автора. Достоверность полученных результатов исследования определена использованием широкого спектра современных лабораторных методов исследования, достаточным объемом фактического материала, его корректной статистической обработкой, а также подтверждена проверкой достоверности первичной документации экспертами Института иммунологии и физиологии УрО РАН (*акт проверки от 20.06.2024г.*).

Основные материалы диссертационной работы представлены и обсуждены на конференциях различного уровня: 15, 16, 17, 18, 19 Всероссийская конференция с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске»; Международная школа с элементами школы для молодых ученых «Проточная цитометрия в клинической лабораторной диагностике» (г. Челябинск, 2020-2024 гг.); 3 и 4 Балтийский симпозиум по иммунологии, молекулярной и регенеративной медицине (Калининград, 2021, 2024 гг.); 12, 13, 14 Всероссийская школа-конференция по клинической иммунологии (Пушкинские горы, Псковская область, с 2022 по 2024 гг.); «Врач-Пациент-Общество: иммунология и генетика» (Екатеринбург, 2022-2024 гг.); III Поволжская научно-практическая школа по аллергологии, клинической иммунологии и инфектологии (г. Самара, 2022г.); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы педиатрии» (г. Рязань, 2022 г.); Дни науки в Челябинской области (г. Челябинск, 2022 г.); Дни науки в Челябинской области «Научный суверенитет – вектор развития региона»; Круглый стол «Иммунологические исследования в ЮУГМУ» (2023 г.); Международная научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «Ильинские чтения, 2023» (Москва); «Персистенция

и симбиоз микроорганизмов»: X Российская научная конференция с международным участием, посвященная 300-летию Российской академии наук, 10-летию науки и технологий (г. Оренбург, 2023 г.); XIII Межведомственная научно-практическая конференция «Инфекционные болезни: Актуальные проблемы, лечение и профилактика» (Москва, 2023 г.); 9-я и 10-я научно-практические школы-конференции «Аллергология, клиническая иммунология и инфектология для практикующих врачей» (г. Сочи, 2023-2024 гг.).

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах выполнения диссертационного исследования: формирование основной идеи, формулировка рабочей гипотезы, разработка дизайна исследования, анализ современной зарубежной и отечественной литературы по исследуемой проблеме постковидного синдрома, сбор первичных данных, проведение всех экспериментальных методов исследования, их статистическая обработка, интерпретация полученных результатов, аналитическая проработка, написание и оформление рукописи диссертации, представление результатов исследований в научных статьях и докладах на конференциях, подготовка публикаций по теме выполненной работы. Формирование основной идеи, цели и задач, планирование научной работы, определение методологии и общей концепции диссертации выполнялись совместно с научными консультантами, д.б.н. Сарапульцевым А.П. и д.м.н., доцентом Рябовой Л.В. Автором лично проведены все эксперименты; часть опытов выполнена совместно с сотрудниками лаборатории иммунопатофизиологии Института иммунологии и физиологии УрО РАН (в.н.с., д.м.н., профессор, ЗДН РФ Зурочка А.В., д.м.н. Зурочка В.А. и др.); часть опытов выполнена совместно с д.м.н., профессором Гриценко В.А., сотрудником Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН; исследования

противовирусной активности синтетического пептида активного центра GM-CSF были проведены совместно с сотрудниками лаборатории вирусологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, в том числе, с д.б.н. Зарубаевым В.С. Биоинформационные исследования выполнены в лаборатории информационных технологий в фармакологии и компьютерного моделирования лекарств Научного центра инновационных лекарственных средств ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России под руководством д.б.н., проф. Васильева П.М.; по вопросам ведения пациентов с постковидным синдромом и вопросам терапии проводились консультации с Праскурничим Е.А., д.м.н., профессором, заведующим кафедрой терапии Медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 25 печатных работ, в том числе: 22 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ по специальностям 3.2.7 Иммунология и 3.1.18 Внутренние болезни и/или индексируемых в Международных базах данных Scopus, WoS, RSCI, 1 монография.

Внедрение результатов исследований в практику. Результаты исследования внедрены в практику работы лаборатории иммунологии воспаления и лаборатории иммунопатофизиологии Института иммунологии и физиологии УрО РАН, лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии ФГБУН Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиала ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, ООО «Академический инновационный научный центр», ФБУН Федеральный НИИ вирусных инфекций «Виром»

Роспотребнадзора, ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, а также в клиническую и научную практику ООО «ДокторЛаб».

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 190 страницах машинописного текста и состоит из Введения, глав «Обзор литературы» и «Материалы и методы», 3 глав собственных исследований, Заключение, Выводов, Практических рекомендаций, Списка литературы, включающего 206 источников, из них 168 иностранных и 38 отечественных. Работа иллюстрирована 7 рисунками и 34 таблицами.

ГЛАВА 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА

1.1 - Характеристика коронавирусной инфекции COVID-19

Этиология COVID-19. В конце 2019 г. в Китайской Народной Республике (КНР) произошла вспышка новой коронавирусной инфекции с эпицентром в городе Ухань (провинция Хубэй). Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) 11 февраля 2020 г. определила официальное название инфекции, вызванной новым коронавирусом, – COVID-19 («Coronavirus disease 2019»). Международный комитет по таксономии вирусов 11 февраля 2020 г. присвоил официальное название возбудителю инфекции – SARS-CoV-2 [24]. SARS-CoV-2 – оболочечный вирус с одноцепочечной РНК позитивной полярности, относящийся к семейству Coronaviridae, роду Betacoronavirus, подроду Sarbecovirus. Для представителей семейства Coronaviridae характерны выявляемые на поверхности вирусной частицы при электронной микроскопии булабовидные шипы (пепломеры), выглядящие как корона. Входные ворота возбудителя – эпителий верхних дыхательных путей и эпителиоциты желудка и кишечника. Исходный штамм, выделенный из образцов от пациентов, госпитализированных в Ухане в декабре 2019 года, является референсным геномом для всех последующих полученных при секвенировании последовательностей.

Эпидемиология COVID-19. С декабря 2019 г. по март 2020 г. наиболее широкое распространение SARS-CoV-2 получил на территории КНР, в которой подтвержденные случаи заболевания были зарегистрированы во всех административных образованиях. Наибольшее количество заболевших выявлено в Юго-Восточной части КНР с эпицентром в провинции Хубэй (84 % от общего числа случаев в КНР). С конца января 2020 г. во многих странах мира стали регистрироваться случаи COVID-19,

преимущественно связанные с поездками в КНР. В конце февраля 2020 г. резко осложнилась эпидемиологическая обстановка по COVID-19 в Южной Корее, Иране и Италии, что в последующем привело к значительному росту числа случаев заболевания в других странах мира, связанных с поездками в эти страны. ВОЗ объявила 11 марта 2020 г. о начале пандемии COVID-19. К началу мая 2023 года эпидемическая ситуация по COVID-19 была оценена ВОЗ как благоприятная, что позволило снять режим международной чрезвычайной ситуации и 5 мая 2023 г. объявить о завершении пандемии. В настоящее время COVID-19 приобретает черты сезонной инфекции [24].

Клинические особенности COVID-19. Согласно последним клиническим рекомендациям по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции, как отечественным, так и зарубежным [29, 90], инкубационный период COVID-19 до начала распространения варианта Омикрон составлял от 2 до 14 суток, в среднем 5-7 суток. Новая коронавирусная инфекция COVID-19, вызванная вариантом Омикрон, характеризуется более коротким инкубационным периодом (2-7 суток, в среднем 3-4 суток). Для COVID-19 характерно наличие клинических симптомов ОРВИ: повышение температуры тела, кашель (сухой или с небольшим количеством мокроты), одышка, утомляемость, ощущение заложенности в грудной клетке. Также могут отмечаться боль в горле, насморк, снижение обоняния и вкуса, признаки конъюнктивита. Среди первых симптомов могут быть миалгия, спутанность сознания, головные боли, кровохарканье, диарея, тошнота, рвота, сердцебиение. Данные симптомы в начале болезни могут наблюдаться и при отсутствии повышения температуры тела.

Клинические варианты и проявления COVID-19:

- ОРВИ (поражение только верхних отделов дыхательных путей);
- пневмония без дыхательной недостаточности;
- ОРДС (пневмония с ОДН);
- сепсис, септический (инфекционно-токсический) шок;

- ДВС-синдром, тромбозы и тромбоэмболии.

Классификация COVID-19 по степени тяжести:

- легкое течение: температура тела $< 38^{\circ}\text{C}$, кашель, слабость, боли в горле, отсутствие критериев среднетяжелого и тяжелого течения.

- среднетяжелое течение: температура тела $> 38^{\circ}\text{C}$; ЧДД $> 22/\text{мин}$ – одышка при физических нагрузках; изменения при КТ (компьютерной томографии), типичные для вирусного поражения; $\text{SpO}_2 < 95\%$; СРБ сыворотки крови $> 10 \text{ мг/л}$.

- тяжелое течение: ЧДД $> 30/\text{мин}$; $\text{SpO}_2 \leq 93\%$; $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 300 \text{ мм рт.ст.}$; снижение уровня сознания, агитация; нестабильная гемодинамика (систолическое АД менее 90 мм рт.ст. или диастолическое АД менее 60 мм рт.ст. , диурез менее 20 мл/час); изменения в легких при КТ, типичные для вирусного поражения; лактат артериальной крови $> 2 \text{ ммоль/л}$; $\text{qSOFA} > 2$ балла.

- крайне тяжелое течение: стойкая фебрильная лихорадка; ОРДС; ОДН с необходимостью респираторной поддержки (инвазивная вентиляция легких); септический шок; полиорганная недостаточность; изменения в легких при КТ, рентгенографии, типичные для вирусного поражения критической степени или картина ОРДС.

1.2 – Патопфизиология COVID-19

Связывание SARS-Cov2 с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) является критическим шагом в патопфизиологии клинических проявлений у пациентов с COVID-19 [120]. Основная функция ACE2 в нормальной физиологии человека заключается в регулировании артериального давления посредством ингибирования ренин-ангиотензин-альдостероновой системы [104]. ACE2 способствует превращению ангиотензина II (AT2) в ангиотензин. Высокие уровни AT2 связаны с гипертонией, почечной недостаточностью, сердечными заболеваниями, апоптозом и окислительным стрессом. Перечисленные негативные эффекты

ускоряют старение и способствуют дегенерации мозга [104, 75]. Этот ферментный белок в клеточных мембранах многих органов также служит рецептором для SARS-CoV-2. Дефицит ACE2 снижает инфекционную нагрузку SARS-CoV-2 на организм пациента. Таким образом, ACE2 может фактически служить мишенью для терапевтических агентов против SARS-CoV-2 [120].

Связываясь с ACE2, SARS-CoV-2 ингибирует распад AT2, а более высокие уровни AT2, в свою очередь, связаны с проницаемостью сосудов и отеком, повреждением сосудов клеток слизистых оболочек, легких, мозга, сердца и почек, иммунной системы и мозга [68], поскольку AT2 действует не только как сосудосуживающий фактор, но и как провоспалительный цитокин через клеточный рецептор – AT1R [195].

После связывания ACE2 в респираторных эпителиальных клетках (особенно в альвеолоцитах 2-го типа), а затем в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов, SARS-CoV-2 в некоторых случаях запускает формирование «цитокинового шторма» с заметным повышением уровней интерлейкина IL-1, IL-6 и фактора некроза опухоли альфа (TNF α) [72]. Высокий уровень этих цитокинов увеличивает проницаемость сосудов, отеки, широко распространенное воспаление с последующим повреждением нескольких органов [174]. «Цитокиновый шторм» также запускает каскады гиперкоагуляции, вызывая образование маленьких и больших тромбов. Комбинированная гиперактивация маркеров воспаления, сосудистого повреждения и факторов свертывания крови способствует развитию острого респираторного дистресс-синдрома, почечной недостаточности, повреждениям печени, сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, а также множественных неврологических состояний. Прямое попадание SARS-CoV-2 в мозг может играть роль в возможном вкладе SARS-CoV-2 в демиелинизацию или нейродегенерацию [100, 141].

Проникновение в клетку SARS-CoV-2 требует связывания области S1 вирусного шипового (S) белка с рецептором на поверхности клетки с

последующим слиянием вирусной и клеточной мембран, опосредованным субъединицей S2 S-белка. Этот процесс требует примирования S-белка протеазами клетки-хозяина, что влечет за собой расщепление S-белка на границе S1 и S2 или внутри субъединицы S2. При этом SARS-CoV-2 использует ACE2 для входа в клетку, а трансмембранную сериновую протеазу TMPRSS2 и эндосомальные цистеиновые протеазы – катепсины B и L (CatB/L) для прайминга S-белка [164]. Поскольку альвеолоциты типа 2 в обычном состоянии высоко экспрессируют как ACE2, так и TMPRSS2, они могут быть первичными клетками для проникновения SARS-CoV-2 в легкие [91]. Кроме того, необходимо учитывать возрастающее разнообразие генотипов SARS-CoV-2, включая новые мутации S-белка, что предопределяет возможность появления новых инвазивных свойств этого вируса в отношении различных органов [71].

Пациенты с COVID-19, страдающие цереброваскулярными заболеваниями, часто страдают артериальной гипертензией [83, 131]. Инсульты, неврологические нарушения также чаще встречаются у пациентов с COVID-19, страдающих диабетом [166]. В настоящее время доказано, что пациенты с COVID-19 имеют повышенный риск чрезмерного уровня гиперкоагулопатии [40, 78, 94]. Данные церебральной ангиографии и венографии показывают, что сгустки крови при ишемическом инсульте у пациентов с COVID-19 могут возникать как в мозговых артериях, так и в мозговых венах [53]. Состояние гиперкоагуляции у этих пациентов, в свою очередь, связано с более высокими уровнями воспалительных маркеров, таких как С-реактивный белок, ферритин, интерлейкин-1, интерлейкин-6, TNF α и D-димер [102]. При этом анализ литературных источников о COVID-19 показывает, что SARS-CoV-2 вызывает иммунно-опосредованную энцефалопатию, а не прямую вирусную энцефалопатию. Об этом свидетельствует и когортный анализ аутопсий головного мозга и других внутренних органов пациентов со смертельным исходом COVID-19, который демонстрирует преобладание типовых патологических изменений, скорее

связанных с феноменом системного воспаления, а не с прямым вирусным поражением тканей [199]. Активация SARS-CoV-2 цитокинов, таких, как IL-1, IL-16 и TNF α , вызывает повреждение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). По мере увеличения повреждения ГЭБ цитокины проникают в паренхиму головного мозга, особенно в височные доли, где ГЭБ слабее [54].

Особую роль в патогенезе COVID-19 играют иммунные механизмы. При развитии SARS-CoV-2 инфекции практически все компартменты иммунной системы вовлекаются в процесс противодействия инфекции и далеко не всегда успешно. После перенесенного заболевания у 15-20 % переболевших отмечен феномен исчезновения антител, как у больных с легкими формами, так и с тяжелыми формами заболевания (SARS-CoV-2-ассоциированные пневмонии разной степени тяжести) [119]. Патогенез такого процесса остается практически не исследованным. Показано, что пациенты SARS-CoV-2 характеризуются целым рядом нарушений со стороны Т-клеток [110]. Несомненную важность для протекания инфекции играет координация и оптимизация как врожденного, так и адаптивного иммунитета в ответ на вирусные инфекции. В этом очень динамичном сценарии NK-клетки, вероятно, играют определяющую роль в формировании выраженности ответа врождённого иммунитета у пациентов с COVID-19, критически балансируя прямой ответ на вирус – путем устранения инфицированных клеток (дендритных клеток, моноцитов и Т-клеток). Нарушение этого баланса оказывается критичным в случае SARS-CoV-2, поскольку сверхактивный цитокиновый ответ, типичный для тяжелых случаев заболевания, приводит к развитию системных осложнений, полиорганной недостаточности и, в конечном итоге, к смерти [130]. Различные популяции NK-клеток выступают первой линией защиты при COVID-19 [175]. При анализе крови пациентов COVID-19 с легкой и тяжелой формами заболевания было выявлено, что SARS-CoV-2 также вызывает сильные нарушения регуляторных звеньев иммунной системы, характеризующейся относительной потерей лимфоидных клеток в сочетании

с увеличением количества миелоидных клеток. При тяжелом течении заболевания отмечается увеличение количества НК, экспрессирующих KIR2DS4; CD158i, а также изменения со стороны В-клеток, проявляющиеся снижением CD19, CD20 и IgM⁺ [118, 119, 150, 163]. У больных COVID-19 отмечается уменьшение количества CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов, CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов, CD19⁺В-лимфоцитов и CD16⁺CD56⁺ НК-клеток в периферической крови [66]. В тоже время, при особо тяжелом течении заболевания, отмечается сверхактивация Т-клеток, повышение CCR4⁺CCR6⁺Th17, повышение активности и количества цитотоксических CD8⁺ Т-клеток в периферической крови [107].

Необходимо отметить, что описанные нарушения регуляции CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов, CD16⁺CD56⁺ НК-клеток, С1q, а также повышение в крови IL-6, наряду с бактериальной коинфекцией, являются важными причинами развития бактериальной пневмонии, которая приводит к ухудшению состояния и, зачастую, смерти пациента [51].

Стоит отметить и роль регуляторных Treg при SARS-CoV-2. Доказано, что FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺ Treg накапливаются в лимфатических узлах средостения при вирусной пневмонии и ограничивают функцию эффекторных Т-клеток CD8. Таким образом, Treg могут играть достаточно важную роль в замедлении клиренса вируса, что приводит к быстрому прогрессированию заболевания, и поражению центральной нервной системы [87].

При этом роль Treg в развитии неврологических проявлений коронавирусных инфекций была отмечена и в более ранних исследованиях [124].

Особый интерес вызывает потенциальная возможность взаимодействия SARS-CoV-2 с CD46, который является повсеместным рецептором на поверхности клеток человека не только для компонентов комплемента C3b и C4b, но и для ряда патогенов. Связывание лиганда с CD46 не только влияет на защиту аутологичных клеток от атаки комплемента, но и опосредует

внутриклеточные сигналы, которые, в свою очередь, влияют на регуляцию функций многих иммунных клеток, включая презентацию антигена Т-клеткам [59, 88, 112, 129], активацию важной при вирусных инфекциях эффекторной функции цитотоксических Т-лимфоцитов, но и образование индуцибельных Treg (Tr1), обладающих иммуносупрессорной активностью [39]. При этом рецептор CD46 кроме комплемента может связываться с другими эндогенными лигандами, например, CD339 (JAG1), что является важным событием для многих иммунных процессов, включая образование Т-хелперов 1-го типа в противовирусном иммунитете [135]. Потенциальную возможность взаимодействия CD46 и SARS-CoV-2 подчеркивают данные литературы, согласно которым CD46 служит рецептором для нескольких патогенов человека: оболочечные РНК-вирусы (вирус кори [MV]), ДНК-вирусы (HHV-6, HHV-6АиHHV-6В), вирусы без оболочки (аденовирусы разных серотипов) и два типа бактерий (*Streptococcus pyogenes* и патогенная *Neisseria*) [61]. Можно отметить то, что взаимодействие герпесвируса HHV-6 с CD46 способствует развитию нейродегенеративных процессов [99]. Кроме того, CD46 может формировать на мембране клеток рецепторные комплексы с тетраспанинами (CD9, CD151) и бета-1-интегринами (CD29), обладающих широкой лигандной специфичностью и полифункциональностью [64]. При этом важно то, что растворимые формы CD46 (sCD46) способны связывать вирусные лиганды и в жидкой фазе [132]. У здоровых людей уровни циркулирующего sCD46 не зависят от окружающей среды и контролируются генетическим фоном, наследуясь аутосомно-кодминантным образом [115], а в экспериментах на животных было показано, что особи с высоким уровнем sCD46 малочувствительны к вирусной инфекции BVDV [179], поэтому можно предполагать возможность выявления групп пациентов, характеризующихся слабо выраженной симптоматикой на фоне высоких показателей sCD46 и при других CD46-зависимых вирусных инфекциях.

Коронавирус SARS-CoV-2 до сих пор остается существенной проблемой мирового здравоохранения, несмотря на большое число

разрешенных к применению эффективных вакцин [204]. По современным представлениям, основным способом проникновения SARS-CoV-2 в клетку считается взаимодействие белка SP вируса с ACE2 и связанных с ним белков человека [126]. Однако многочисленные клинические данные показывают, что этот путь не является единственным. В частности, селективные и высокоактивные ингибиторы указанного фермента, используемые как антигипертензивные препараты, не влияют на процесс вирусного заражения [181]. Также установлено, что вакцины, основанные на выработке антител к S-белку SARS-CoV-2, не обеспечивают полную защиту от повторной вирусной инфекции [171]. Из этого следует, что должны существовать другие рецепторы, которые не связаны с ACE2 и которые обеспечивают альтернативные способы проникновения вируса в клетку человека. В частности, в качестве кандидатов рассматриваются рецепторы, про которых уже известно, что они участвуют в проникновении других патогенных вирусов и в модуляции клеточных функций и иммунных ответов [114]. Следует отметить, что альтернативные рецепторные входы могут быть основными для клеток, в которых ACE2 слабо экспрессирован.

Учитывая, что вирус может находить дорогу в организм через другие рецепторы разных клеток, в том числе клеток иммунной системы, все это может приводить к развитию постковидных состояний. В настоящее время в литературе имеются разрозненные данные по определению постковида. К сожалению, литературные источники очень сильно расходятся в терминологии, касающейся патологических процессов, вызванных перенесенным COVID-19 [23]. Так, например, на основании Кокрейновского обзора реабилитации [159] для диагностики пост-COVID и лонг-COVID, не делая различий между этими понятиями, предлагают использовать одну из следующих 4 категорий:

- симптомы, которые сохраняются после острой фазы COVID-19 или ее лечения;
- симптомы, которые привели к новому ограничению здоровья;

- новые симптомы, возникшие после окончания острой фазы, но являющиеся результатом заболевания COVID-19;

- обострение ранее существовавшего основного заболевания.

Данная классификация не имеет патогенетического обоснования, так как обозначенные категории имеют разные этиологию и патогенез.

Другие авторы в 2021 г. предложили делить болезнь на три периода: острый – до 4 недель, персистирующий симптоматический – 4-12 недель и пост-COVID или лонг-COVID – сохранение симптомов, возникших во время острой инфекции, после 12-й недели от начала заболевания [178]. В том же 2021 г. National Institute for Health and Care Excellence опубликовал краткое руководство по управлению долгосрочными последствиями COVID-19 [76], в котором авторы под термином лонг-COVID объединяют как продолжающееся симптоматическое течение COVID-19 (от 4 до 12 недель), так и пост-COVID-19 синдром (12 недель и более).

Возможно, подобная размытая терминология связана с тем, что, согласно социальному исследованию Callard F., Perego E. (2021) [57], термин "лонг-COVID" возник стихийно среди пациентов в первую волну новой коронавирусной инфекции. Тогда как термин «постковидный синдром» официально закреплен в МКБ 10 в сентябре 2020 г. под номером U09.9 и сформулирован следующим образом: «Состояние после COVID-19 неуточненное. Этот необязательный код позволяет установить связь с COVID-19. Его нельзя использовать в случаях, когда возбудитель COVID-19 все еще присутствует в организме. Постковидное состояние. Постковидный синдром» [16].

Поэтому, в связи с вышеизложенным, в дальнейшем в работе будет использован термин «постковидный синдром», как наиболее точный.

1.3 – Клиническая характеристика постковидного синдрома

Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, привела к глобальной заболеваемости и высокой смертности во

всем мире. По данным историй болезни, у пациентов отмечается выраженная усталость, повышенная утомляемость, учащение случаев заболеваний ОРВИ за год, учащение рецидивов кожных заболеваний, аллергопатологий, обострение легочной патологии, заболеваний мочевыводящих путей, учащение рецидивов хронических инфекционных заболеваний, таких как герпесвирусная и папилломавирусная инфекции, утяжеление течения хронических сердечно-сосудистых и других соматических заболеваний разных органов и систем. Обследование пациентов проводилось не менее чем через шесть месяцев после выздоровления от острого COVID-19. Подобные стойкие постинфекционные последствия известны как постковидный синдром [142].

Оценивая постковидный синдром, необходимо раскрыть основные клинические синдромы полиорганной патологии, характерной для постковидных пациентов по данным литературы [13].

Так, например, у 410 участников швейцарского исследования удалось оценить жалобы через 7-9 месяцев после постановки диагноза COVID-19, из них 39,0 % пациентов отмечали длительно сохраняющиеся симптомы, такие, как утомляемость (20,7 %), потеря вкуса или обоняния (16,8 %), одышка (11,7 %) и головная боль (10,0 %), в том числе среди молодых ранее здоровых людей. [70]. В китайском исследовании через 6 месяцев после COVID-19 средняя дистанция 6-минутной ходьбы была ниже нормального справочного значения примерно у четверти пациентов. Микротромбоз и макротромбоз легочных сосудов наблюдался у 20-30 % пациентов с острым COVID-19 [13, 98], что выше, чем у других групп больных в критически тяжелом состоянии (1-10 %) [13, 69]. Кроме того, тяжесть повреждения эндотелия и частый и распространенный тромбоз с микроангиопатией, обнаруживавшийся при аутопсии легких, оказывались сравнительно большими, чем при остром респираторном дистресс-синдроме (ОРДС) на фоне гриппа [13, 155]. В другом исследовании китайских ученых через 6 месяцев после перенесенного острого COVID-19 было обследовано 1733

пациента, у которых регистрировались длительное ощущение сердцебиения у 9 % и боль в груди у 5 % пациентов [176]. При аутопсии 39 умерших от COVID-19 вирус SARS-CoV-2 обнаруживался в сердце в 62,5 % случаев [13, 50]. Обусловленный им воспалительный ответ способен приводить к гибели кардиомиоцитов и фиброзно-жировому замещению десмосомальных белков, важных для межклеточного сцепления [156]. У выздоровевших пациентов может стойко повышаться метаболический запрос сердца, наблюдавшийся в долгосрочной перспективе у выживших после COVID-19 [43]. Предположительно это связано со снижением сердечного резерва, использованием кортикостероидов и нарушением регуляции ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. Фиброз, рубцевание миокарда и кардиомиопатия, возникшая после перенесенной вирусной инфекции, нередко приводят к аритмии сердца по механизму re-entry [13, 100, 190]. COVID-19 также способен усугублять сердечную аритмию из-за повышения влияния катехоламинов в результате действия цитокинов интерлейкина-6, интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли- α , которые могут продлить потенциал действия желудочков путем модуляции экспрессии ионных каналов кардиомиоцитов [190]. Вегетативная дисфункция с преобладанием адренергических влияний после вирусного заболевания, в том числе после COVID-19, приводит к синдрому постуральной ортостатической тахикардии и нефизиологической синусовой тахикардии [26]. Подобно хроническим расстройствам после атипичной пневмонии, у пациентов, перенесших COVID-19, отмечаются стойкое недомогание, диффузная миалгия, депрессивные симптомы и нарушения сна [148]. Другим частым проявлением после COVID-19 являются мигреноподобные головные боли [52], часто неустраняемые традиционными анальгетиками [55], и головные боли в отдаленном периоде, объясняющиеся высоким уровнем цитокинов. После исчезновения других симптомов потеря вкуса и обоняния могут сохраняться до 6 месяцев примерно у 10 % пациентов [13, 133, 145, 176, 177]. Отмечаются когнитивные нарушения, проявляющиеся затруднением

концентрации внимания, ухудшением памяти, восприятия и/или воспроизведения речи [161]. У людей, перенесших COVID-19, психиатрические симптомы сохраняются или проявляются через несколько месяцев после заражения [147]. В исследовании китайских ученых через 6 месяцев после перенесенного COVID-19 примерно у четверти пациентов отмечаются беспокойство, депрессия и нарушения сна [176]. Клинически значимые симптомы посттравматического стрессового расстройства регистрировались примерно у 30 % пациентов с COVID-19, требовавшим госпитализации, проявлялись как во время острой инфекции, так и через несколько месяцев [49, 154]. Жалобы пациентов на «мозговой туман» после тяжелого COVID-19 могут быть связаны с повреждением мозга или посттравматическим стрессовым расстройством [105]. Однако сообщения об аналогичных жалобах после легкого COVID-19 предполагают вклад в их развитие дисфункции вегетативной нервной системы [51]. Долговременные когнитивные нарушения отмечены в исследованиях, направленных на оценку состояния пациентов, перенесших критически тяжелые заболевания, они встречаются у 20-40 % пациентов, прошедших госпитализацию при COVID-19 [162]. Китайские ученые в своем исследовании отмечают следующее: снижение расчетной скорости клубочковой фильтрации менее 90 мл/мин/1,73 м² регистрировалось у 35 % пациентов через 6 месяцев после COVID-19, а у 13 % развивался повторный эпизод снижения показателя после документально подтвержденной нормализации функции почек во время острого COVID-19 [176]. Вирус SARS-CoV-2 был выделен из почечной ткани [160], и его обнаружение сочеталось с острым некрозом канальцев по данным биопсии почек [106] и аутопсии [146] умерших от COVID-19. Диабетический кетоацидоз наблюдался у пациентов, ранее не болевших сахарным диабетом (СД), через недели или месяцы после исчезновения симптомов COVID-19 [184]. В настоящее время недостаточно данных о том, в течение какого времени после перенесенного COVID-19 усугубляется тяжесть ранее существовавшего СД или предрасположенность к

диабетическому кетоацидозу, и этот вопрос адресован международному регистру CoviDiab [128]. Ruggeri R.M., et al. (2021) пишут о подостром тиреоидите с клиническими проявлениями тиреотоксикоза через недели после исчезновения респираторных симптомов [182]. COVID-19 может приводить к манифестации латентно протекавшего аутоиммунного тиреоидита в виде впервые возникшего тиреоидита Хашимото [185] или болезни Грейвса [121]. Эндокринные проявления постковидного синдрома могут быть следствием прямого повреждения вирусом, иммунологического и воспалительного повреждения, а также ятрогенного осложнения. Сообщалось об экспрессии в β -клетках поджелудочной железы ACE2 и трансмембранной сериновой протеазы, но исследователи полагали, что первичный дефицит инсулина при COVID-19, вероятно, опосредован воспалением или реакцией на инфекционный стресс наряду с периферической инсулинорезистентностью [73, 74]. При аутопсии умерших от COVID-19 подтвердилась возможность инфицирования и репликации SARS-CoV-2 в β -клетках поджелудочной железы человека, что приводит к их гибели или трансдифференциации, снижению выработки и высвобождения инсулина [167, 169]. Также COVID-19 способен нарушать микробиом кишечника, вызывая рост количества условно-патогенных микроорганизмов и истощая полезные комменсалы [41]. Способность микробиоты кишечника изменять течение респираторных инфекций («ось кишечник–легкие») ранее была признана при гриппе и других респираторных инфекциях [125]. В настоящее время проводится исследование отсроченных влияний COVID-19 на желудочно-кишечный тракт, в том числе у людей с постинфекционным синдромом раздраженного кишечника и диспепсией [13].

Таким образом, в литературе имеются указания на различные клинические патологические проявления постковидного синдрома, но, в то же время, отсутствует систематизация этих исследований, а также нет данных о патогенезе формирования клинических проявлений постковидного синдрома. Кроме того, если при острой коронавирусной инфекции иммунная

система пациентов была достаточно хорошо исследована, то состояние иммунной системы постковидных пациентов остается практически не исследованным. Все это послужило основанием для проведения наших исследований постковидных пациентов.

ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были обследованы 131 пациент из перенесших SARS-CoV-2 инфекцию. Из них 48 мужчин в возрасте от 20 до 76 лет (средний возраст составляет 55,3 года) и 83 женщины в возрасте от 21 до 79 лет (средний возраст – 53,4 года). Критерием включения в группы исследований были: подтвержденный диагноз SARS-CoV-2 инфекции методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), наличие IgA, М к вирусу SARS-CoV-2 в острый и пост-острый периоды инфекции и IgG к вирусу SARS-CoV-2 в период реконвалесценции, данные компьютерной томографии легких о наличии либо отсутствии изменений по типу "матового стекла". Данное исследование проводилось не менее чем через 6-12 месяцев после перенесенной инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

Все пациенты были предварительно обследованы врачом терапевтом и иммунологом-аллергологом, с целью выявления сопутствующих заболеваний, а также врачами других специальностей до перенесенного COVID-19 для установки сопутствующих диагнозов. Группы были рандомизированы по полу, возрасту, сопутствующим заболеваниям по критерию χ^2 . Все исследования были одобрены Независимым локальным этическим комитетом при ГАУЗ ОТКЗ «Городская клиническая больница № 1» г. Челябинска (протокол № 8 от 11.04.2022), на базе которой проводились данные исследования.

2.1 – Оценка изученных явлений

Клинические проявления заболевания и состояние иммунной системы у постковидных пациентов, эффективность иммунотерапии.

2.2 – Объекты исследования

1. Пациенты, перенесшие COVID-19.
2. Анамнестические и демографические данные.

3. Данные клинического обследования (КТ, анализ крови, мочи, биохимические методы, уточняющие диагноз).

4. Клетки иммунной системы (Т, В, НК, ТНК, Т-reg, Тс, Th и их активационные рецепторы, нейтрофилы периферической крови), общие и специфические к COVID-19 иммуноглобулины А, М, G.

2.3 – Методы исследования

2.3.1 – Клинические методы исследований:

- Выявление лиц с постковидным синдромом после осмотра врачами: терапевтом, аллергологом-иммунологом, пульмонологом, ЛОР-врачом.

- Заполнение карты иммунологического обследования.

- Физикальные, лабораторные и инструментальные обследования для постановки диагноза.

2.3.2 – Биоинформационные методы исследования

Предполагается, что на начальном этапе проникновения вируса в клетку человека главным образом с рецепторами взаимодействует белок SP, тогда как белки EP, MP и NP сталкиваются с ограничениями в связи с существующими стерическими препятствиями, обусловленными белком S [67]. Однако при альтернативном пути проникновения SARS-CoV-2 через неспецифическое слияние все структурные белки вируса могут интегрироваться в мембрану клетки и потенциально выступать в качестве рецепторов или корецепторов [192, 193]. В связи с этим, в рамках данного исследования для анализа взаимодействия с белком CD46 человека были выбраны структурные белки EP, MP, NP и SP как наиболее вероятные кандидаты.

Основной задачей биоинформационной части работы стало определение методом множественного докинга валидных белков-мишеней SARS-CoV-2, способных взаимодействовать с CD46, а также выявление участков взаимодействия.

Белок CD46 человека может существовать в 16 различных изоформах в результате альтернативного сплайсинга. Для текущего исследования была выбрана наиболее распространенная изоформа 1, также известная как каноническая изоформа А.

Данные для анализа включали первичные аминокислотные последовательности белков CD46 человека и EP, MP, NP, SP вируса SARS-CoV-2, а также экспериментальные 3D-модели всех пяти белков.

Вычисления выполнялись с использованием суперкомпьютерных технологий.

В качестве основного штамма для исследования использован дикий уханьский штамм M908947 (Wuhan-Hu-1) [45]. Этот штамм считается своего рода «стандартом», на основе которого разработано большинство существующих вакцин [127].

Геном SARS-CoV-2 кодирует 31 белок [196], которые можно разделить на три основные группы:

Структурные белки: оболочечный белок (EP), мембранный белок (MP), нуклеокапсидный белок (NP), шиповидный белок (SP); все эти белки в основном расположены на поверхности вируса и определяют его форму.

Неструктурные белки: NsP1, NsP2, NsP3, NsP4, NsP5, NsP6, NsP7, NsP8, NsP9, NsP10, NsP11, NsP12, NsP13, NsP14, NsP15, NsP16; выполняют различные функции после проникновения вируса в клетку, однако функции некоторых белков остаются недостаточно исследованными.

Белки, кодируемые открытыми рамками считывания: ORF1a, ORF1b, ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF10, ORF14; они также играют различные роли после проникновения вируса в клетку, но их точные функции во многих случаях еще не установлены.

Исследование проводилось в несколько этапов:

Этап 1. Формирование набора данных по экспериментальным 3D-моделям белков и выявление их валидных субъединиц. Первичные последовательности CD46 и EP-MP-NP-SP белков были получены в формате

fasta из базы данных UniProt [197]. Их длина составляет 392, 75, 222, 419, 1273 аминокислотных остатков соответственно (таблица 1).

Таблица 1 – Основные характеристики релевантных белков-мишеней

Белок ¹	Ген ²	Код ³	Название ⁴	Организм	Длина ⁵
CD46	CD46	P15529	Membranecofactorprotein	Homo sapiens	392
EP	E	P0DTC4	Envelopesmallmembraneprotein	SARS-CoV-2	75
MP	M	P0DTC5	Membraneprotein	SARS-CoV-2	222
NP	N	P0DTC9	Nucleoprotein	SARS-CoV-2	419
SP	S	P0DTC2	Spikeglycoprotein	SARS-CoV-2	1273

Примечание: ¹Общепринятое сокращенное обозначение белка. ²Номенклатурное обозначение гена. ³Общепринятый код белка, рекомендуемый UniProt. ⁴Номенклатурное название, рекомендуемое UniProt. ⁵Длина первичной последовательности в аминокислотных остатках.

Поиск экспериментальных 3D-моделей CD46 человека и EP-MP-NP-SP белков SARS-CoV-2 был выполнен в базах данных UniProt, PDBe и RCSB PDB [136, 152]. Всего найдена 281 3D-модель: 6 моделей CD46, 1 модель EP, 21 модель NP, 253 модели SP. Для MP экспериментальных 3D-моделей не найдено (таблица 2).

Ни одна из обнаруженных экспериментальных 3D-моделей не включает полную аминокислотную последовательность соответствующего белка; в ряде случаев разрешенный участок модели является очень коротким (например, всего 9 аминокислот для NP).

Многие модели содержат несколько разрешенных цепочек различной длины, и некоторые из них состоят из нескольких неполных фрагментов. Учитывая эти обстоятельства, был проведен тщательный анализ всех найденных 3D-моделей, чтобы выбрать наиболее подходящие изолированные 3D-субъединицы, представляющие собой целостные разрешенные фрагменты каждого из пяти белков.

Таблица 2 – Экспериментальные 3D-модели релевантных белков-мишеней

Белок	Коды PDB
CD46	1CKL, 2O39, 3INB, 3L89, 3O8E, 5F08
EP	7K3G
MP	—
NP	6M3M, 6VYO, 6WJI, 6WKP, 6WZO, 6WZQ, 6YI3, 6YUN, 6ZCO, 7ACS, 7ACT, 7C22, 7CDZ, 7CE0, 7DE1, 7KGO, 7KGP, 7KGQ, 7KGR, 7KGT, 7RGS
SP	6LVN, 6LXT, 6LZG, 6MO5, 6M17, 6M1V, 6VSB, 6VW1, 6VXX, 6VYB, 6W41, 6WPS, 6WPT, 6X29, 6X2A, 6X2B, 6X2C, 6X6P, 6X79, 6XC2, 6XC3, 6XC4, 6XC7, 6XCM, 6XCN, 6XDG, 6XE1, 6XEY, 6XF5, 6XF6, 6XKL, 6XKP, 6XKQ, 6XLU, 6XMO, 6XM3, 6XM4, 6XM5, 6XR8, 6XRA, 6XS6, 6YLA, 6YM0, 6YOR, 6YZ5, 6YZ7, 6Y2M, 6Z43, 6Z97, 6ZB4, 6ZB5, 6ZBP, 6ZCZ, 6ZDG, 6ZDH, 6ZER, 6ZFO, 6ZGE, 6ZGG, 6ZGI, 6ZH9, 6ZHD, 6ZLR, 6ZOW, 6ZOX, 6ZOY, 6ZOZ, 6ZP0, 6ZP1, 6ZP2, 6ZP5, 6ZP7, 6ZWV, 6ZXN, 7A25, 7A29, 7A4N, 7A5R, 7A5S, 7A91, 7A92, 7A93, 7A94, 7A95, 7A96, 7A97, 7A98, 7AD1, 7B17, 7BEH, 7BEI, 7BEJ, 7BEK, 7BEL, 7BEM, 7BEN, 7BEO, 7BEP, 7BWJ, 7BYR, 7BZS, 7C01, 7C2L, 7C8D, 7C8J, 7C8V, 7C8W, 7CAB, 7CAC, 7CAH, 7CAI, 7CAK, 7CAN, 7CDI, 7CDJ, 7CH4, 7CH5, 7CHB, 7CHC, 7CHE, 7CHF, 7CHH, 7CJF, 7CM4, 7CN9, 7CT5, 7CWL, 7CWM, 7CWN, 7CWO, 7CWS, 7CWU, 7D2Z, 7D30, 7DCC, 7DCX, 7DD2, 7DD8, 7DDD, 7DDN, 7DF3, 7DF4, 7DK3, 7DK4, 7DK5, 7DK6, 7DK7, 7DMU, 7DPM, 7JJC, 7JJI, 7JJJ, 7JMO, 7JMP, 7JMW, 7JV2, 7JV4, 7JV6, 7JVA, 7JVB, 7JVC, 7JW0, 7JWB, 7JWY, 7JX3, 7JZL, 7JZM, 7JZN, 7JZU, 7K43, 7K45, 7K4N, 7K8M, 7K8S, 7K8T, 7K8U, 7K8V, 7K8W, 7K8X, 7K8Y, 7K8Z, 7K90, 7K9Z, 7KDG, 7KDH, 7KDI, 7KDJ, 7KDK, 7KDL, 7KE4, 7KE6, 7KE7, 7KE8, 7KE9, 7KEA, 7KEB, 7KEC, 7KGJ, 7KGK, 7KJ2, 7KJ3, 7KJ4, 7KJ5, 7KKK, 7KKL, 7KL9, 7KLG, 7KLH, 7KLW, 7KMB, 7KMG, 7KMH, 7KMI, 7KMK, 7KML, 7KMS, 7KMZ, 7KN5, 7KN6, 7KN7, 7KNB, 7KNE, 7KNH, 7KHI, 7KS9, 7KSG, 7KSJ, 7KXK, 7KZB, 7L02, 7L06, 7L09, 7L0N, 7L2C, 7L3N, 7L5B, 7L7F, 7L7K, 7LCN, 7LD1, 7LOP, 7ND3, 7ND4, 7ND5, 7ND6, 7ND7, 7ND8, 7ND9, 7NDA, 7NDB, 7NDC, 7NDD, 7NEH

Для оценки адекватности этих субъединиц экспериментальных 3D-моделей были установлены *следующие критерии*:

1. Значительная длина смоделированной аминокислотной последовательности.

2. Полное разрешение: минимальное количество пробелов в виде неразрешенных аминокислот в выбранных фрагментах.

3. Увеличение общей длины разрешенных субъединиц: каждый выбранный фрагмент должен увеличивать покрытие разрешенных последовательностей по сравнению с ранее отобранными фрагментами.

Из шести обнаруженных к 03.05.2021 экспериментальных 3D-моделей белка CD46 были отобраны 25 адекватных фрагментов, что в сумме составляет 252 аминокислоты, или 64,3 % от полной последовательности. Для белка EP SARS-CoV-2 в единственной 3D-модели, найденной на ту же дату, были выбраны 5 адекватных фрагментов, общей длиной 31 аминокислота, что соответствует 41,3 % полной последовательности.

Анализ 21 экспериментальной 3D-модели белка NP, найденной к 03.05.2021, позволил выделить 43 адекватных фрагмента, совокупная длина которых охватывает аминокислоты с 4 по 180 и с 247 по 364. Общая длина этих фрагментов составляет 295 аминокислот, или 70,4 % от полной последовательности.

В случае белка SP в составе вируса – он существует в виде тримера, который состоит из идентичных субъединиц. Из 253 экспериментальных 3D-моделей белка SP, обнаруженных к 03.05.2021, для анализа были выбраны наиболее полно разрешенные тримерные модели, представленные в конфигурации, близкой к нативной. В результате для дальнейших исследований было отобрано пять моделей белка SP с закрытой конфигурацией. Общая длина этих адекватных фрагментов составила 1149 аминокислот, что соответствует 90,3 % полной последовательности белка SP SARS-CoV-2.

Этап 2. Валидность адекватных изолированных субъединиц. Всего для белков CD46, EP, NP и SP было идентифицировано 88 адекватных изолированных субъединиц экспериментальных 3D-моделей — 25, 5, 43 и 15, соответственно. Для оценки их валидности была использована программа QMEAN-v4.2.0 [53]. Эта программа оценивает качество 3D-модели белка,

основываясь на вычисленной скоринг-функции QMEAN4, которая отражает степень сходства модели с нативными структурными особенностями белков и оценивает вероятность того, что данная 3D-модель сопоставима по качеству с высокоразрешенными экспериментальными структурами.

В результате, для наиболее точного представления экспериментальных 3D-структур белков CD46, EP, NP и SP были отобраны валидные субъединицы в количестве 4, 1, 6 и 12 соответственно, их характеристики приведены в *таблице 3*.

Таблица 3 – Валидные субъединицы, представляющие экспериментальную 3D-структуру мембранного кофакторного белка CD46 человека, нуклеокапсидного белка NP и шиповидного белка SPSARS-CoV-2

Обозначение	Длина	Диапазон	QMEAN4
Кофакторный белок CD46 человека			
CD46_3L89-R	126	35-160	-0,05
CD46_3O8E-B	252	35-286	0,96
CD46_3O8E-D	248	35-286	1,42
CD46_5FO8-C	129	158-286	0,08
нуклеокапсидный белок NP SARS-CoV-2			
NP_6YVO-D	125	49-173	1,19
NP_6WZQ-C	116	249-364	0,37
NP_6YUN-A	116	249-364	0,39
NP_7CDZ-B	127	4-130	1,57
NP_7CDZ-D	127	5-131	1,27
NP_7CE0-C	110	255-364	0,37
шиповидный белок SPSARS-CoV-2			
SP_6XR8-A	1107	14-1162	-0,57
SP_6XR8-B	1107	14-1162	-0,65
SP_6XR8-C	1107	14-1162	-0,72
SP_6ZWV-A	985	27-1151	-1,28
SP_6ZWV-B	985	27-1151	-1,26
SP_6ZWV-C	985	27-1151	-1,20
SP_7DDD-A	1088	14-1147	-1,65
SP_7DDD-B	1088	14-1147	-1,67
SP_7DDD-C	1088	14-1147	-1,68
SP_7JJI-A	1109	14-1146	0,87
SP_7JJI-B	1109	14-1146	0,91
SP_7JJI-C	1109	14-1146	0,91

Этап 3. Моделирование по гомологии множества полноразмерных 3D-структур белков и выявление их лучших 3D-моделей. Моделирование по гомологии полных 3D-структур CD46 и EP-MP-NP-SP выполняли с помощью программы I-TASSER-v5.1 [60].

Для CD46, EP-MP-NP-SP в I-TASSER v5.1 было построено по пять 3D-моделей. Дополнительно для EP-MP-NP-SP с помощью подхода D-I-TASSER/C-I-TASSER на основе искусственных нейронных сетей глубокого обучения [86, 187] была построена шестая 3D-модель. Показатели достоверности построенных полноразмерных полноатомных 3D-моделей приведены в *таблице 4*.

Таблица 4 – Достоверность построенных по гомологии полных 3D-моделей белка CD46 человека и EP, MP, NP, SP белков SARS-CoV-2

Белок	C-score для модели №				
	1	2	3	4	5
CD46 человека	-0,84	-3,27	-2,29	-3,39	-3,77
EP SARS-CoV-2	-0,85	-1,66	-1,01	-1,05	-3,90
MPSARS-CoV-2	-3,35	-3,43	-4,81	-5,00	-4,94
NPSARS-CoV-2	-1,58	-1,95	-3,18	-2,73	-3,04
SPSARS-CoV-2	-2,07	-2,12	-2,37	-2,61	-2,69

Этап 4. Оценка валидности. Для 23 полноразмерных полноатомных 3D-моделей белков CD46, EP, NP и SP, построенных на основе гомологии, было выполнено консенсусное сравнение этих моделей с валидными экспериментально определенными 3D-субъединицами соответствующих белков. Для сравнения использовались программы DaliLite-v5.3 [92], PDBeFold-v2.58 [101, 107, 136, 152], TM-score-v19.8.22 [206] и FATKAT-v2.0 [84].

Совместное использование консенсусного подхода и метода непараметрической статистики на основе рангов позволило получить точные контекстно-независимые интегральные оценки 3D-сходства моделей белков. В *таблице 5* представлены результаты оценки валидности 3D-моделей белков CD46, EP, NP и SP, построенных по гомологии. Для белка MP

экспериментальных 3D-моделей не было найдено, поэтому валидность его моделей, построенных по гомологии, оценивалась с использованием программы QMEAN-v4.2.0 [53].

Четыре лучшие полноразмерные полноатомные 3D-модели белков CD46, EP, NP и SP были определены на основе интегрального показателя RankModel, а лучшая модель белка MP была выбрана по величине скоринг-функции QMEAN4, как показано в *таблице 6*.

Построение множества 3D-моделей димерных комплексов белка CD46 с EP-MP-NP-SP белками и выявление наиболее адекватных из них.

Построение дигетеромерных комплексов белка CD46 человека с белками EP-MP-NP-SPSARS-CoV-2 выполняли с использованием программ Cluspro2 [137], GRAMM1 [194], Hex8 [153], SwarmDock [44] и ZDOCK3 [139]. Программы Cluspro2, GRAMM1, Hex8 и ZDOCK3 производят это в режиме жесткой симуляции (без изменений исходных конформаций взаимодействующих белков), а программа SwarmDock – в режиме гибкой симуляции (с изменением конформаций взаимодействующих белков).

Моделирование белковых комплексов во всех пяти программах осуществлялось в двух режимах. В первом режиме CD46 выступал как рецептор, занимая фиксированное положение в пространстве, а белки EP-MP-NP-SP являлись лигандами, передвигаясь вокруг CD46 путем поворота или перемещения. Во втором режиме, наоборот, рецепторами являлись EP-MP-NP-SP, а CD46 выступал как лиганд.

Одновременное применение для построения 3D-моделей комплексов белка CD46 человека с EP-MP-NP-SP белками SARS-CoV-2 пяти различных программ, основанных на использовании разных методов построения начальных конформаций, различных способов их оптимизации и разных алгоритмов оценки качества моделей, позволяет получить представительный набор оптимальных по своим параметрам 3D-моделей указанных комплексов.

Таблица 5 – Средние ранги оценки валидности лучших, построенных по гомологии полноразмерных 3D-моделей белка CD46 человека и EP, MP, NP, SP белков SARS-CoV-2

Экспериментальная Субъединица	Rank												Rank _{Mean}	Rank _{Model}
	DALI		PDBeFold				TM-score		FATKAT					
	Z	RSMD	Q	P	Z	RSMD	RSMD	TM	p	Score	RSMD _{opt}	RSMD _{chain}		
Мембранный белок CD46 человека														
Model1												8.02		
CD46_3O8E-B	3	1	1	3	5	1	7	4	1	3	1	1	2.58	
CD46_3O8E-D	5	2	4	4	7	4	1	13	1	7	4	4	4.67	
CD46_5FO8-C	10	9	9	9	9	9	18	17	1	11	9	9	10.00	
CD46_3L89-R	16	13	11	13	13	13	19	14	15	18	18	15	14.83	
Оболочечный белок EP SARS-CoV-2														
QHD43418												2.10		
EP_7K3G-A	—	—	3	3	4	1	3	3	1	1	1	1	2.10	
Нуклеокапсидный белок NP SARS-CoV-2														
QHD43423												6.36		
NP_6WZQ-C	8	3	4	2	2	3	19	13	1	7	3	3	5.67	
NP_6YUN-A	7	1	2	1	1	1	21	16	1	6	1	1	4.92	
NP_6YVO-D	2	4	1	4	4	4	11	35	1	1	4	5	6.33	
NP_7CDZ-B	3	6	5	11	5	6	12	21	6	3	6	6	7.50	
NP_7CDZ-D	1	5	3	12	6	5	10	18	5	2	5	4	6.33	
NP_7CE0-C	9	2	6	3	3	2	22	28	1	9	2	2	7.42	
Шиповидный белок SP SARS-CoV-2														
Model5												31.34		
SP_6XR8-A	47	36	36	32	20	28	62	65	1	30	49	5	34.25	
SP_6XR8-B	15	7	27	33	34	49	17	17	1	14	38	14	22.13	
SP_6XR8-C	15	5	32	38	39	62	18	18	1	13	38	15	24.50	

Продолжение таблицы 5

SP_7DDD-A	31	31	39	43	43	42	55	54	1	38	58	35	39.17	
SP_7DDD-B	37	69	68	59	39	9	44	35	1	63	12	1	36.38	
SP_7DDD-C	42	30	38	41	43	41	49	55	1	35	53	6	36.13	
SP-6ZWV-A	69	55	1	9	7	5	38	40	1	48	2	39	26.17	
SP-6ZWV-B	70	68	2	7	7	6	52	45	69	70	14	66	39.67	
SP-6ZWV-C	57	57	3	8	9	7	36	35	62	56	5	65	33.29	
SP_7JJI-A	5	65	30	22	35	45	28	37	52	53	29	25	35.50	
SP_7JJI-B	41	13	34	39	45	56	5	6	1	19	35	19	26.08	
SP_7JJI-C	7	16	34	39	45	56	1	2	1	20	35	19	22.88	

Таблица 6 – Оценка валидности построенных по гомологии полноразмерных 3D-моделей белка MPSARS-CoV-2

Модель	QMEAN	Модель	QMEAN
Model1	-10,78	Model4	-16,07
Model2	-12,58	Model5	-11,80
Mode3	-12,65	QHD43419	-5,79

Всего в 40 циклах расчетов обработано ~1108000 конфигураций, из них оптимизировано 28160 перспективных конфигураций. Отобрано 238 оптимальных 3D-моделей белок-белковых комплексов, из которых в 119 моделях CD46 являлся рецептором, а EP-MP-NP-SP являлись лигандами и в 119 моделях наоборот, CD46 лиганд, а EP-MP-NP-SP – рецепторы.

Таблица 7 – Энергетические характеристики белок-белковых комплексов CD46 человека и EP, MP, NP, SP SARS-CoV-2

Комплекс	Программа	ΔE , ккал/моль	Комплекс	Программа	ΔE , ккал/моль
CD46 рецептор — EP, MP, NP, SP лиганды			EP, MP, NP, SP рецепторы — CD46 лиганд		
CD46—EP	Cluspro2	-1218	EP—CD46	Cluspro2	-1217
CD46—EP	GRAMM1	20558	EP—CD46	GRAMM1	20558
CD46—EP	Hex8	-286,5	EP—CD46	Hex8	-278,8
CD46—EP	SwarmDock	-179,0	EP—CD46	SwarmDock	-247,7
CD46—EP	ZDOCK3	1815	EP—CD46	ZDOCK3	1815
CD46—MP	Cluspro2	-1300	MP—CD46	Cluspro2	-1355
CD46—MP	GRAMM1	21735	MP—CD46	GRAMM1	22061
CD46—MP	Hex8	-397,2	MP—CD46	Hex8	-412,7
CD46—MP	SwarmDock	-252,3	MP—CD46	SwarmDock	-398,7
CD46—MP	ZDOCK3	2186	MP—CD46	ZDOCK3	2186
CD46—NP	Cluspro2	-1354	NP—CD46	Cluspro2	-1473
CD46—NP	GRAMM1	20286	NP—CD46	GRAMM1	21072
CD46—NP	Hex8	-468,3	NP—CD46	Hex8	-467,1
CD46—NP	SwarmDock	-193,5	NP—CD46	SwarmDock	-178,9
CD46—NP	ZDOCK3	1834	NP—CD46	ZDOCK3	1834
CD46—SP	Cluspro2	-1329	SP—CD46	Cluspro2	-1329
CD46—SP	GRAMM1	68467	SP—CD46	GRAMM1	65242
CD46—SP	Hex8	-518,3	SP—CD46	Hex8	-493,6
CD46—SP	SwarmDock	-294,2	SP—CD46	SwarmDock	-294,2
CD46—SP	ZDOCK3	2219	SP—CD46	ZDOCK3	2219

Примечание: в программе ZDOCK3 ΔE выражено в условных единицах. Вид основной скоринг-функции энергии из таблицы 7 в разных программах определен по разному: Cluspro2—ELowest, взвешенная скоринг-функция минимальной энергии данного адекватного комплекса; GRAMM1—ETotal, скоринг-функция минимальной общей энергии данного адекватного комплекса; Hex8 EInteraction, скоринг-функция минимальной энергии взаимодействия белков в данном адекватном комплексе; SwarmDock—EInteraction, скоринг-функция минимальной энергии взаимодействия белков в данном адекватном комплексе из наиболее представительного кластера; ZDOCK3—ZDOCKScore, скоринг-функция минимальной энергии взаимодействия белков в данном адекватном по числу аминокислотных контактов комплексе, условные единицы.

Среди 238 найденных оптимальных 3D-моделей по значениям скоринг-оценок были выбраны 40 наиболее адекватных, по две для каждой программы (таблица 7). В 20 моделях CD46 выступал как рецептор, а EP-MP-NP-SP служили лигандами и в 20 моделях CD46 выступал как лиганд, а рецепторами являлись EP-MP-NP-SP.

Этап 5. Анализ областей связывания в адекватных 3D-моделях димерных белок-белковых комплексов, определение в них ключевых связывающих аминокислот. Анализ областей связывания и идентификация связывающих аминокислот во всех 40 наиболее подходящих 3D-моделях белок-белковых комплексов CD46 человека с белками EP, MP, NP и SP вируса SARS-CoV-2 был проведен с использованием программы LigPlotPlus-v1.4.5 [110].

Для каждой из четырех групп 3D-моделей белок-белковых комплексов CD46↔EP, MP, NP и SP (по 10 лучших моделей в каждой группе) был выполнен анализ, на основе которого составлены обобщенные списки связывающих аминокислот. В итоге были сформированы восемь полных списков связывающих аминокислот — по одному для каждого белка в каждом из четырех типов белок-белковых комплексов.

В результате анализа 40 наиболее адекватных 3D-моделей белок-белковых комплексов CD46 было выявлено 1124 связывающих аминокислоты. Наиболее часто встречающиеся из них были определены как ключевые связывающие аминокислоты для каждого типа белок-белковых комплексов CD46↔EP, MP, NP и SP.

Используя полученные списки ключевых связывающих аминокислот, для каждой из 20 моделей в каждой группе комплексов были определены ключевые связывающие аминокислоты, которые образуют предполагаемую область белок-белкового взаимодействия в каждой 3D-модели. Также для каждой из 40 наиболее подходящих 3D-моделей было подсчитано количество ключевых связывающих аминокислот среди аминокислот, участвующих в предполагаемом взаимодействии.

В результате, в этих 40 моделях было выявлено 187 ключевых связывающих аминокислот, что подчеркивает важность этих аминокислот в формировании стабильных белок-белковых взаимодействий.

Выбор лучших 3D-моделей дигетеромерных комплексов белка CD46 с EP MP NP SP белками и выявление областей их взаимодействия.

Для каждой из 20 пар наиболее подходящих 3D-моделей комплексов CD46↔EP, MP, NP, SP, построенных с использованием пяти различных программ (ClusPro2, GRAMM1, Hex8, SwarmDock, ZDock3), было подсчитано общее количество ключевых связывающих аминокислот, выявленных в субъединицах комплекса CD46 (рецептор) -EP/MP/NP/SP (лиганд), а также в субъединицах комплекса EP/MP/NP/SP (рецептор)-CD46 (лиганд).

На основе этих данных были вычислены проценты ключевых связывающих аминокислот, присутствующих в субъединицах CD46 обеих моделей, в субъединицах белков SARS-CoV-2 обеих моделей, в комплексах CD46 (рецептор) -EP/MP/NP/SP (лиганд), а также в комплексах EP/MP/NP/SP (рецептор) - CD46 (лиганд) и в обоих типах димерных комплексов.

По совокупности этих процентных значений была выбрана одна лучшая пара 3D-моделей для каждого комплекса: CD46↔EP, CD46↔MP, CD46↔NP и CD46↔SP. В выбранных парах модели CD46 (рецептор)-EP/MP/NP/SP (лиганд) и EP/MP/NP/SP (рецептор) - CD46 (лиганд) по своим характеристикам не различались. Таким образом, в качестве наиболее валидной модели во всех четырех случаях была выбрана конфигурация CD46 (рецептор) - EP/MP/NP/SP (лиганд).

Выявление областей взаимодействия выполнялось в два этапа. На первом этапе для каждой лучшей валидной 3D-модели были составлены списки ключевых связывающих аминокислот как в субъединицах белка CD46, так и в субъединицах белков SARS-CoV-2. На втором этапе каждой ключевой связывающей аминокислоте в одной субъединице была

сопоставлена пространственно наиболее близко расположенная аминокислота из другой субъединицы.

Таким образом, пары ключевых и пространственно комплементарных связывающих аминокислот, выявленные для каждой из лучших валидных 3D-моделей комплексов CD46 \leftrightarrow EP, CD46 \leftrightarrow MP, CD46 \leftrightarrow NP и CD46 \leftrightarrow SP, позволяют наиболее точно отобразить вероятные области взаимодействия исследуемых белков.

2.3.3 – Лабораторные методы исследований

2.3.3.1 - Вирусологические методы исследования. Оценка прямой антивирусной (вирулицидной) активности заявляемого средства осуществляется следующим образом:

- синтез пептида ZP2 проводился твердофазным способом на синтезаторе «AppliedBiosystems 430A» по методу *in situ* с использованием N α -Boc-защищенных производных аминокислот. Для блокирования боковых цепей трифункциональных аминокислотных остатков были использованы защитные группы бензильного и уретанового типов. Присоединение аминокислотных остатков проводили методом 1-гидроксибензотриазоловых эфиров, используя 5-ти кратные избытки реагентов. По завершении сборки полипептидной цепи пептидил полимер обрабатывали жидким фтористым водородом по Sn1/Sn2 механизмам в присутствии скавенджеров. Продукт высаживали диэтиловым эфиром и очищали методом препаративной обращенно-фазовой хроматографии до гомогенного состояния. Конечный продукт охарактеризован данными аминокислотного и масс-спектрального анализов и аналитической ОФ ВЭЖХ. Аминокислотный состав полученного соединения и его молекулярный вес соответствовали теоретическим данным, чистота по данным аналитической ОФ ВЭЖХ была не менее 95 %.

Оценка прямой антивирусной (вирулицидной) активности заявляемого средства осуществлялась следующим образом:

- было оценено влияние синтетического пептида ZP2 на бактериофаги (вирусы бактерий). Бактериофаги относятся, как правило, к

ДНК-вирусам и, размножаясь в бактериях (вирулентные бактериофаги), могут вызывать их гибель [30]. В качестве объектов-мишеней для бактериофагов использовали бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка) – клинические штаммы №№ 55 и 60. В экспериментах использовали бактериофаги, входящие в состав коммерческого препарата «Пиобактериофаг поливалентный очищенный» (НПО «Микроген» МЗ РФ). Оптимальную концентрацию фагов для каждого штамма предварительно подбирали опытным путем (титрование препарата) таким образом, чтобы на чашке Петри на сплошном газоне культуры бактерий *P. aeruginosa* бактериофаги образовывали 10-50 бляшкообразующих единиц (БОЕ) – пятен лизиса, где отсутствует рост бактерий.

Исследование вирулицидного действия синтетического пептида ZP2 проводилось следующим образом:

1 этап (подготовительный):

- разведение препарата бактериофага физиологическим раствором NaCl в 100 раз;
- растворение пептида ZP2 на физиологическом растворе NaCl в концентрации 10 мкг/мл;
- формирование взвеси суточной агаровой культуры бактерий *P. aeruginosa* (штаммы №№ 55 и 60) на физиологическом растворе NaCl в концентрации $1,5 \cdot 10^8$ бактерий/мл (по стандарту мутности МакФарланда);
- подготовка чашки Петри с 1,5 % мясопептонным агаром (МПА): выливали на дно чашки 5 мл расплавленного МПА, равномерно распределяли его по поверхности, остужали и подсушивали;
- приготовление 0,7 % МПА – расплавляли его в водяной бане и остужали до температуры 42-44°C.

2 этап (основной):

- внесение в пробирки по 0,2 мл приготовленной взвеси бактериофага, добавление по 0,2 мл приготовленного раствора пептида ZP2, для того чтобы его действующая концентрация составляла 5 мкг/мл (в контроле – добавляли

0,2 мл физиологического раствора NaCl), инкубировали 10 мин при комнатной температуре (22-24°C);

- добавление в опытные и контрольные пробирки по 0,2 мл приготовленной взвеси бактерий *P. aeruginosa* (штаммы №№ 55 и 60), инкубировали 10 мин при комнатной температуре (22-24°C);

- добавление в опытные и контрольные пробирки по 4 мл остывшего 0,7 % МПА, содержимое пробирок интенсивно перемешивали и выливали на дно чашки Петри с заранее приготовленной агаровой подложкой из 1,5 % МПА, давали агару затвердеть, переворачивали чашки Петри вверх дном и инкубировали в течение 24 часов в термостате при температуре 37°C;

- опыты осуществляли в 5 повторах с каждым изученным штаммом бактерий *P. Aeruginosa*.

3 этап (учет результатов):

- произведен подсчет бляшкообразующих единиц (БОЕ) на контрольных и опытных чашках,

- высчитана концентрация бактериофагов, которые находились в растворе,

- вызван лизис бактерий *P. aeruginosa* (штаммы №№ 55 и 60) по формуле: Концентрация бактериофагов в 1 мл = количество БОЕ на чашке *5 (поскольку в реакционную смесь добавлялось 0,2 мл взвеси бактериофагов).

2.3.3.2- Бактериологические методы исследования. В работе были использованы музейные штаммы *E. coli* (АТСС 25922) и *P. aeruginosa* АТСС 27853, а также 104 клинических изолята энтеробактерий, включая *E. coli* (n = 22) и *K. pneumoniae* (n = 82), и 98 клинических изолятов неферментирующих грамотрицательных бактерий, в том числе *P. aeruginosa* (n = 43) и *A. baumannii* (n = 55), выделенных от больных с различной гинекологической и хирургической патологией. Выделение и видовую идентификацию бактерий проводили общепринятыми методами с использованием официальных биохимических наборов компании Erba Lachema s.r.o. (ЕС, Чехия) и на микробиологическом анализаторе VITEK 2 Compact (Biomérieux, Франция)

[10]. Бактерицидное действие синтетического пептида ZP2 (СП ZP2) в отношении анализируемых штаммов бактерий оценивалось по методике О.В. Бухарина с соавт. [31] в следующем порядке: на изотоническом растворе NaCl готовили взвеси суточных агаровых культур бактерий (5×10^8 КОЕ/мл); по 25 мкл взвесей инокулировали в ячейки пластикового 96-луночного стерильного планшета; в опыте – к взвесям добавляли по 25 мкл раствора СП ZP2 на дистиллированной воде (концентрация 20 мкг/мл; т.е. его конечная/действующая концентрация составляла 10 мкг/мл), в контроле – вместо раствора СП ZP2 вносили 25 мкл дистиллированной воды; смеси выдерживали в течение 20 мин при 37°C, а затем во все ячейки добавляли 200 мкл мясопептонного бульона; планшета помещалась на 4 часа в термостат при 37°C, после чего с помощью фотометра Multiscan Ascent (Thermo Electron, Финляндия) на длине волны $\lambda = 492$ нм замерялась оптическая плотность (OD) бактериальных культур в ячейках.

Каждый вариант опыта и контроля делался в трех повторностях с вычислением средних значений OD. Для оценки действия СП ZP2 на исследуемые бактерии высчитывали Индекс бактерицидной активности (ИБА, %) по формуле: $\text{ИБА} = (\text{OD}_k - \text{OD}_o) / \text{OD}_k \times 100 \%$, где OD_k и OD_o – оптические плотности контрольной и опытной культур соответственно. Чувствительными считались штаммы при $\text{ИБА} > 10 \%$. Если оптическая плотность опытной культуры превышала оптическую плотность контрольной культуры ($\text{OD}_o > \text{OD}_k$), то рассчитывался Индекс стимуляции (ИС, %) по формуле: $\text{ИС} = \text{OD}_o / \text{OD}_k \times 100 \%$, где OD_k и OD_o – оптические плотности контрольной и опытной культур соответственно. Стимулирующий эффект СП ZP2 регистрировали при $\text{ИС} > 10 \%$. Если значения ИБА и ИС не превышали 10 %, то штаммы бактерий относили к группе устойчивых культур, но индифферентно реагирующих на пептид ZP2.

2.3.3.3 – Иммунологические методы исследования

Общий анализ крови (25 параметров: лейкоцитарный, эритроцитарный и тромбоцитарный ростки кроветворения), количественный и качественный состав ростков кроветворения проведен стандартизованным методом на гематологическом анализаторе Medonic M20 (Швеция).

Оценка маркеров лимфоцитов. Методом проточной цитометрии на цитофлюориметре Navius (Beckman Coulter, США) по стандартизованной технологии оценки лимфоцитарного звена иммунитета [34, 28] оценивали следующие маркеры лимфоцитов; CD45⁺ (панлейкоцитарный маркер для гейтирования лимфоцитов), CD45⁺, CD3⁺ (Т-лимфоциты), CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺ (хелперы индукторы), CD45⁺, CD3⁺, CD8⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты), CD45⁺, CD3⁺ CD16⁺, 56⁺ (ТNK-клетки) CD45⁺, CD3⁻, CD16⁺, 56⁺ (натуральные киллеры), CD45⁺, CD3⁻, CD19⁺ CD5⁺ (В-лимфоциты), CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺, CD127⁻ (Т-регуляторные клетки/супрессоры), CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺ (активированные хелперы, ранняя активация лимфоцитов), CD45⁺, CD3⁺, HLA-DR (активированные Т-лимфоциты – поздняя активация лимфоцитов), В-клеток памяти CD3⁻, CD19⁺ CD27⁺, при помощи моноклональных антител «Beckman Coulter», «Биолегенда» (США).

Оценка фагоцитарной и НСТ-активности нейтрофилов. Исследование проводилось общепринятыми методами оценки функциональной активности фагоцитов: фагоцитарная активность нейтрофилов с использованием частиц латекса диаметром 1,7 мкм (активность фагоцитоза, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число); спонтанная и индуцированная НСТ-активность нейтрофилов морфологическим методом (световая микроскопия с использованием микроскопов Olimpus (Япония) [3, 16].

ИФА-методы диагностики. Определение уровня общих IgA, G, M, специфических IgM, G к коронавирусу SARS-CoV-2, С1-ингибитора С3а и С5а компонентов комплемента методом иммуноферментного и иммунофлюоресцентного анализа на иммуноферментном анализаторе

Multiscan FC Thermoscientific (Китай). Исследование проводилось общепринятыми стандартизованными методами иммуноферментного анализа (тест-системы компаний ВекторБест, Россия; ООО «Цитокин», Россия).

2.3.4 – Статистические методы исследования

По результатам исследования была сформирована база данных в Excel (MS Office 2007). Обработка данных осуществлялась с помощью методов параметрической и непараметрической статистики с использованием программы Statistica v. 8.0 for Windows и IBM SPSS Statistics 19. Цифровые данные были проверены на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова-Смирнова в программе Statistica 8.0. Сравнение данных, подчиняющихся нормальному распределению, было осуществлено с помощью параметрического t-критерия Стьюдента, для множественных сравнений использовали многофакторный анализ ANOVA; в противном случае – непараметрические критерии: U-критерий Манна-Уитни для парных сравнений, метод Конновера. Различия посчитали достоверными при $p < 0,05$.

2.4 – Оборудование

Было использовано следующее оборудование: цитофлюориметр «Navios» (Beckman Coulter, США), линейка микроскопов Olimpus (Япония), мультиплексный анализатор для геномного и протеомного анализа биомаркеров Magpix100 (Luminex, США), иммуноферментный анализатор Multiscan FC Thermoscientific (Китай), иммунохемилюминиметр Mindray SL-1200 A (Китай), гематологический анализатор Medonic M20 (Швеция), сопутствующее оборудование (центрифуги, шейкеры, термостаты и т.д.), компьютеры с пакетами прикладных программ, необходимых для математического и статистического анализа полученных результатов.

Клинико-лабораторные исследования проводились на базе Государственного научного центра Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна (Москва) и Института иммунологии и физиологии УрО РАН (Екатеринбург).

ГЛАВА 3 – КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА

Состав исследованной группы указан ранее в главе «Материалы и методы». Критерием включения в группы исследований были: подтвержденный диагноз SARS-CoV-2 инфекции методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), наличие IgA, М к вирусу SARS-CoV-2 в острый и постострый периоды инфекции и IgG к вирусу SARS-CoV-2 в период реконвалесценции, данные компьютерной томографии легких о наличии либо отсутствии изменений по типу "матового стекла". Исследование проводилось не менее чем через 6-12 месяцев после перенесенной инфекции, вызванной SARS-CoV-2. Достоверных различий между мужчинами и женщинами по возрасту мы не получили, как и достоверных различий по клиническим вариантам постковидного синдрома между мужчинами и женщинами. Поэтому в дальнейшем при анализе клинической картины постковидного синдрома и иммунологических анализов во всех исследуемых группах мужчины и женщины были объединены.

Анализ литературных данных показал, что некоторые авторы выявляют различия в иммунных параметрах и тяжести течения заболевания [33, 32] у мужчин и женщин, однако эти исследования были посвящены конкретным нозологическим формам заболеваний (острый коронарный синдром, сахарный диабет 2 типа, гипергликемия). В этих исследованиях были получены различия в клинической характеристике нозологий и иммунологических показателях между мужчинами и женщинами, но не было выявлено различий в зависимости от возраста мужчин и женщин. По-видимому, при анализе клинических проявлений постковидного синдрома, если анализ проводится по конкретной нозологии, то имеется достоверность различий тех или иных показателей между мужчинами и женщинами. При

анализе симптомокомплексов патологии и исследовании фенотипов иммунопатологии достоверных различий по полу и возрасту выявлено не было.

Все пациенты были проанкетированы как для выяснения частоты обострений хронических заболеваний, диагноз которых был установлен врачами соответствующих специальностей (кардиолог, ревматолог, эндокринолог, невролог, гастроэнтеролог, ЛОР, уролог, пульмонолог, гинеколог, онколог) до перенесенной коронавирусной инфекции, так и на наличие заболеваний, впервые возникших после перенесенного COVID-19.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у постковидных пациентов сформирована полиорганная патология, но отсутствует как четкая ее характеристика по заболеваниям и клиническим синдромам, так и данные о сравнении тяжести выраженности постковидного синдрома с поражением легких в острый период коронавирусной инфекции.

Согласно данным, представленным в *таблице 8*, достоверные различия получены между группами КТ0 и КТ1-2, а также КТ0 и КТ3-4 – частота обострений ревматоидного артрита в постковидном периоде достоверно выше в группе с поражением легких менее 50 % в острый период COVID-19 по сравнению с группой пациентов без поражения легких, тогда как частота обострений аутоиммунного тиреоидита достоверно выше у пациентов без поражения легких в остром периоде COVID-19 в сравнении с остальными группами.

Таким образом, выраженность аутоиммунных нарушений в постковидном периоде напрямую не связана с тяжестью течения заболевания, а в большей степени связана с базисной терапией кортикостероидами (ГКС) как для лечения аутоиммунных процессов, так и для лечения COVID-19. Если при аутоиммунном тиреоидите ГКС не применяются, то применение их в острый период инфекции снизило в последующем количество рецидивов. Тогда как при ревматоидном артрите ситуация обратная: применение ГКС в острый период инфекции у пациентов,

уже находящихся на базисной кортикостероидной терапии, приводит в последующем к увеличению числа рецидивов у постковидных пациентов. Возможно, дополнительная терапия кортикостероидами таких пациентов была недостаточно обоснована.

Таблица 8 - Выраженность клинических проявлений аутоиммунного симптомокомплекса у постковидных пациентов в зависимости от степени поражения легких в острый период COVID-19

Заболевания с участвовавшими случаями рецидивов либо впервые выявленные после клинического выздоровления от перенесенной острой инфекции COVID-19/ степень поражения легких по данным КТ	Общее число обследованных пациентов (n=131)		Группа 1 КТ0 (n=38)		Группа 2 КТ1-2 (n=68)		Группа 3 КТ3-4 (n=25)	
	Абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Ревматоидный артрит	30	22,9	4	10,2	19	27,9 P1-2 <0,0 5	7	28,0
Аутоиммунный тиреоидит	20	15,3	11	29,0	7	10,3 P1-2 <0,0 5	2	8,0 P1-3<0,05

Примечание: достоверность различий между группами p1-p2, p1-p3, p2-p3. Достоверными считались различия $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

При анализе влияния степени поражения легких в острый период инфекции COVID-19 на учащение обострений аллергических заболеваний в постковидном периоде (таблица 9) зависимости выявлено не было. Однако при этом у постковидных пациентов выявлена тенденция к росту наиболее клинически тяжелой аллергопатологии: во-первых, во всех группах (52 %) в постковидный период участились обострения таких патологий как отек Квинке, крапивницы, анафилаксии, васкулитов, альвеолитов, бронхолитов.

Всё это свидетельствует о том, что на ухудшение состояния данных пациентов в постковидном периоде повлияла перенесенная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2. На втором месте по частоте обострений находились аллергические поражения кожи – около 28 %.

Таблица 9 – Выраженность клинических проявлений симптомокомплекса алергопатологии у постковидных пациентов в зависимости от степени поражения легких в острый период COVID-19

Заболевания с участвовавшими случаями рецидивов либо впервые выявленные после клинического выздоровления от перенесенной острой инфекции COVID-19/ степень поражения легких по данным КТ	Общее число обследованных пациентов (n=131)		Группа 1 КТ0 (n=38)		Группа 2 КТ1-2 (n=68)		Группа 3 КТ3-4 (n=25)	
	абс	%	Абс	%	абс	%	абс	%
Экземы, контактный дерматит, псориаз	36	27,5	11	29,0	18	26,7	7	28,0
Отек Квинке, крапивница, анафилаксия, васкулиты, альвеолиты, бронхиолиты	68	51,9	20	52,3	35	51,5	13	52,0
сезонные ринит, конъюнктивит	32	24,4	10	26,3	17	25,0	5	20,0
бронхиальная астма	19	14,5	4	10,5	14	20,6	1	4,0

Примечание: достоверность различий между группами p1-p2, p1-p3, p2-p3. Достоверными считались различия $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Частота обострений пролиферативных заболеваний не показала достоверных различий между группами пациентов в зависимости от степени поражения легких в острый период инфекции (таблица 10), но имелась тенденция к увеличению частоты обострений у пациентов с более тяжелыми формами острой инфекции COVID-19. Необходимо также отметить, что процент таких пациентов достаточно высок – от 31,6 % до 48 %. Эти данные дополнительно свидетельствуют о том, что у постковидных пациентов развивается полиорганная патология.

Таблица 10 – Выраженность клинических проявлений пролиферативного симптомокомплекса у постковидных пациентов в зависимости от степени поражения легких в острый период COVID-19

Заболевания с участвовавшими случаями рецидивов либо впервые выявленные после клинического выздоровления от перенесенной острой инфекции COVID-19/ степень поражения легких по данным КТ	Общее число обследованных пациентов (n=131)		Группа 1 КТ0 (n=38)		Группа 2 КТ1-2 (n=68)		Группа 3 КТ3-4 (n=25)	
	Абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Частые лимфадениты	41	31,3	13	34,2	20	29,4	8	32,0
Доброкачественные образования: миомы, кисты, полипы, фиброаденомы, эндометриоз	54	41,2	12	31,6	30	44,1	12	48,0

Примечание: достоверность различий между группами p1-p2, p1-p3, p2-p3. Достоверными считались различия $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Согласно данным, представленным в *таблице 11*, достоверные различия получены между группами КТ0 и КТ1-2, а также КТ0 и КТ3-4: частота обострений заболеваний сердечно-сосудистой системы в постковидном периоде достоверно выше в группах с поражением легких в острый период COVID-19 по сравнению с группой пациентов без поражения легких. Эти данные говорят о том, что поражения сердечно-сосудистой системы напрямую связаны с тяжестью течения COVID-19 и выявлялись наиболее часто (68 %) у постковидных пациентов, перенесших тяжелую коронавирусную инфекцию.

Таблица 11 – Выраженность клинических проявлений симптомокомплекса поражения сердечно-сосудистой системы у постковидных пациентов в зависимости от степени поражения легких в острый период COVID-19

Заболевания с участвовавшими случаями рецидивов либо впервые выявленные после клинического выздоровления от перенесенной острой инфекции COVID-19/степень поражения легких по данным КТ	Общее число обследованных пациентов (n=131)		Группа 1 КТ0 (n=38)		Группа 2 КТ1-2 (n=68)		Группа 3 КТ3-4 (n=25)	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Заболевания сердечно-сосудистой системы (ГБ, ИБС, ОИМ, НМК)	49	37,4	5	13,2	27	39,7	17	68,0
						P1-2 <0,0 5		P1-3<0,0 5 P2-3<0,0 5

Примечание: достоверность различий между группами p1-p2, p1-p3, p2-p3. Достоверными считались различия $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Согласно данным, представленным в таблице 12, частота нарушений обмена глюкозы, в т.ч. и впервые выявленных, достоверно возрастала в постковидный период у пациентов с поражением легких в острый период инфекции, тогда как по заболеваниям щитовидной железы, за исключением АИТ, достоверных различий не обнаружено.

Возможно, эти нарушения также связаны, с одной стороны, с применением кортикостероидной терапии в острый период коронавирусной инфекции, а с другой стороны, с нарушением работы регуляторных механизмов эндокринной и иммунной систем под воздействием вируса SARS-CoV-2, что еще раз подтверждает наши предположения о формировании полиорганной патологии у постковидных пациентов.

Таблица 12 – Выраженность клинических проявлений патологии эндокринной системы, в том числе впервые выявленной, у постковидных пациентов в зависимости от степени поражения легких в острый период COVID-19

Заболевания с участвовавшими случаями рецидивов либо впервые выявленные после клинического выздоровления от перенесенной острой инфекции COVID-19/степень поражения легких по данным КТ	Общее число обследованных пациентов (n=131)		Группа 1 КТ0 (n=38)		Группа 2 КТ1-2 (n=68)		Группа 3 КТ3-4 (n=25)	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Нарушение обмена глюкозы	47	35,9	2	5,3	30	44,1	15	60,0
Заболевания щитовидной железы, за исключением АИТ	35	26,7	7	18,4	19	27,9	9	36,0

Примечание: достоверность различий между группами p1-p2, p1-p3, p2-p3. Достоверными считались различия $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Частота обострений заболеваний печени и желчевыводящих путей, согласно данным *таблицы 13*, значимо выросла у постковидных пациентов с поражением легких в сравнении с пациентами без поражения легких, что, вероятно, связано как с воздействием коронавируса, так и с более интенсивной химиотерапией в острый период коронавирусной инфекции.

Также наблюдалась тенденция к учащению обострений хронических заболеваний ЖКТ у пациентов с наиболее тяжелой формой заболевания COVID-19 в остром периоде.

Таблица 13 – Выраженность клинических проявлений заболеваний желудочно-кишечного тракта у постковидных пациентов в зависимости от степени поражения легких в острый период COVID-19

Заболевания с участвовавшими случаями рецидивов либо впервые выявленные после клинического выздоровления от перенесенной острой инфекции COVID-19/ степень поражения легких по данным КТ	Общее число обследованных пациентов (n=131)		Группа 1 КТ0 (n=38)		Группа 2 КТ1-2 (n=68)		Группа 3 КТ3-4 (n=25)	
	абс	%	Абс	%	абс	%	абс	%
Хронические заболевания ЖКТ (гастродуодениты, гастриты, эзофагиты, энтероколиты, колиты, дисбиоз кишечника)	67	51,1	16	42,1	36	52,9	15	60,0
Хронические заболевания печени (жировой гепатоз)	21	16,0	1	2,6	13	19,1 P1-2 <0,05	7	28,0 P1-3 <0,05
Холецистит	7	5,3	0	0	5	7,4 P1-2 <0,05	2	8,0

Примечание: достоверность различий между группами p1-p2, p1-p3, p2-p3. Достоверными считались различия $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Анализ взаимосвязи выраженности клинических проявлений заболеваний мочеполовой системы у постковидных пациентов и тяжести течения COVID-19 в острый период заболевания, представленный в *таблице 14*, не выявил достоверных различий.

Таблица 14 – Выраженность клинических проявлений заболеваний мочеполовой системы у постковидных пациентов в зависимости от степени поражения легких в острый период COVID-19

Заболевания с участвовавшими случаями рецидивов либо впервые выявленные после клинического выздоровления от перенесенной острой инфекции COVID-19/ степень поражения легких по данным КТ	Общее число обследованных пациентов (n=131)		Группа 1 КТ0 (n=38)		Группа 2 КТ1-2 (n=68)		Группа 3 КТ3-4 (n=25)	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Заболевания мочевыводящих путей	26	19,9	5	13,2	14	20,6	7	28,0
Цервицит, эндометрит, вульвит, эрозия шейки матки	27	20,6	10	26,3	10	14,7	7	28,0

Примечание: достоверность различий между группами p1-p2, p1-p3, p2-p3. Достоверными считались различия $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Согласно данным *таблицы 15*, опрос пациентов показал, что усталость при физической нагрузке, повышенная утомляемость и снижение работоспособности возросли у постковидных пациентов с поражением легких по сравнению с КТ0, но в то же время было отмечено, что и ряд других показателей имел тенденцию к увеличению у пациентов с поражением легких более 50 % (снижение концентрации внимания, а также замедленность речи и движения, заметные окружающим).

Таблица 15 – Выраженность клинических проявлений астено-вегетативного симптомокомплекса у постковидных пациентов в зависимости от степени поражения легких в острый период COVID-19

Заболевания с участвовавшими случаями рецидивов либо впервые выявленные после клинического выздоровления от перенесенной острой инфекции COVID-19/ степень поражения легких по данным КТ	Общее число обследованных пациентов (n=131)		Группа 1 КТ0 (n=38)		Группа 2 КТ1-2 (n=68)		Группа 3 КТ3-4 (n=25)	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Нарушение сна	46	35,1	11	30,0	26	38,2	9	36,0
Раздражительность	45	34,4	11	30,0	25	36,8	9	36,0
Изменение пищевого поведения	19	14,5	7	18,4	8	11,8	4	16,0
Снижение концентрации внимания	22	16,8	4	10,5	12	17,7	6	24,0
Замедленность речи, движения (заметная окружающим)	13	9,9	3	7,9	5	7,4	5	20,0
Головокружение	20	15,3	5	13,2	12	17,7	3	12,0
Усталость при физической нагрузке	58	44,3	10	26,3	33	48,5 P1-2 <0,05	15	60,0 P1-3<0,05
Быстрая утомляемость	52	39,7	10	26,3	33	48,5 P1-2 <0,05	9	36,0
Снижение работоспособности	65	49,6	13	34,2	40	58,8 P1-2 <0,05	12	48,0

Примечание: достоверность различий между группами p1-p2, p1-p3, p2-p3. Достоверными считались различия $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Согласно данным *таблицы 16*, опрос пациентов показал, что у пациентов с поражением легких достоверно учащаются боли в груди и одышка в сравнении с пациентами без поражения легких, что, скорее всего, в большей степени связано с поражением не столько нервной системы, сколько с поражением ССС и легких.

Таблица 16 – Выраженность клинических проявлений болевых симптомов у постковидных пациентов в зависимости от степени поражения легких в острый период COVID-19

Заболевания с участвовавшими случаями рецидивов либо впервые выявленные после клинического выздоровления от перенесенной острой инфекции COVID-19/ степень поражения легких по данным КТ	Общее число обследованных пациентов (n=131)		Группа 1 КТ0 (n=38)		Группа 2 КТ1-2 (n=68)		Группа 3 КТ3-4 (n=25)	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Боли в спине	37	28,2	7	18,4	22	32,3	8	32,0
Боли в суставах, конечностях	42	32,1	8	21,1	23	33,8	11	44,0
Головные боли	25	19,1	5	13,2	16	23,5	4	16,0
Боли в груди, одышка	33	25,2	3	7,9	19	27,9	11	44,0
						P1-2 <0,0 5		P1-3 <0,0 5

Примечание: достоверность различий между группами p1-p2, p1-p3, p2-p3. Достоверными считались различия $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Таким образом, клиническая картина постковидного синдрома характеризуется выраженным разнообразием формирования полиорганной патологии, как впервые выявленной, так и проявляющейся в учащении обострений хронических заболеваний.

Кроме соматической патологии у постковидных пациентов выявился и инфекционный симптомокомплекс.

В ходе исследования при делении выборки по степени поражения легких, в зависимости от клинических проявлений инфекционно-воспалительных заболеваний с участвовавшими случаями рецидивов либо впервые выявленных после клинического выздоровления от перенесенной острой инфекции COVID-19, достоверных различий выявлено не было, за

исключением воспалительных заболеваний почек в группах 1 и 2 (таблица 17).

Таблица 17 – Выраженность клинических проявлений инфекционного симптомокомплекса у постковидных пациентов в зависимости от степени поражения легких в острый период COVID-19.

Заболевания с участвовавшими случаями рецидивов либо впервые выявленные после клинического выздоровления от перенесенной острой инфекции COVID-19/ степень поражения легких по данным КТ	Общее число обследованных пациентов (n=131)		Группа 1 КТ0 (n=38)		Группа 2 КТ1-2 (n=68)		Группа 3 КТ3-4 (n=25)	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Длительный субфебрилитет	63	48,1	13	34,2	36	52,9	14	56,0
Рецидивирующий герпес	85	64,9	21	55,3	46	67,7	18	72,0
ВПЧ	36	27,5	7	18,4	22	32,4	7	28,0
Высокая частота ОРВИ	42	32,1	12	31,6	19	27,9	11	44,0
Гнойно-воспалительные заболевания кожи и подкожно-жировой клетчатки	42	32,1	11	29,0	20	29,4	11	44,0
Хронические инфекции ЛОР-органов	79	60,3	22	57,9	40	58,8	17	68,0
Часто повторяющиеся/ хронические бронхиты и/или пневмонии, ХОБЛ	43	32,8	10	26,3	21	30,9	12	48,0
Лихорадка неуточненного генеза	30	22,9	5	13,2	19	27,9	6	24,0
Воспалительные заболевания почек (хронический пиелонефрит)	26	19,9	4	10,5	17	25,0	5	20,0
Заболевания зубов и десен	48	36,6	16	42,1	24	35,3	8	32,0
Частые гнойные конъюнктивиты	14	10,7	4	10,5	4	5,9	6	24,0

Примечание: достоверность различий между группами p1-p2, p1-p3, p2-p3. Достоверными считались различия p<0,05 (критерий Стьюдента).

При этом следует отметить, что процент выявления ряда проявлений инфекционного синдрома иммунопатологии (длительный субфебрилитет, рецидивирующий герпес, хронические инфекции ЛОР-органов, высокая частота ОРВИ, гнойно-воспалительные заболевания кожи и подкожно-жировой клетчатки, часто повторяющиеся и хронические бронхиты и/или пневмонии, ХОБЛ, частые гнойные конъюнктивиты) имеет тенденцию к повышению у пациентов с более тяжелой перенесенной формой острой коронавирусной инфекции.

По данным МКБ-10 и МКБ-11 [17, 18] все вышеперечисленные соматические заболевания имеют, в том числе, патогенетически значимые механизмы нарушений иммунной системы, как и COVID-19, в основе тяжелых форм которого также лежит повреждение иммунной системы. В связи с этим, была проведена оценка иммунного статуса пациентов, вошедших в это клиническое исследование.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ 3 ГЛАВЫ

Публикации, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и/или индексируемых в международных базах данных WoS, Scopus, RSCI, PubMed

1. **Добрынина, М.А.** Клинико-иммунологическая характеристика постковидных пациентов с инфекционным синдромом иммунопатологии / **М.А. Добрынина, А.В. Зурочка, В.А. Зурочка** // Российский иммунологический журнал. - 2024. - Т 27, № 3. - С.689-698.
2. Клинические особенности проявления заболевания у пациентов с острым коронарным синдромом, болевших и не болевших COVID-19 / Э.А. Сафронова, Л.В. Рябова, А.В. Зурочка, **М.А. Добрынина**, Е.А. Праскурничий // Современные проблемы науки и образования. – 2024. – № 4. <https://doi.org/10.17513/spno.33541>.
3. Савчук, К.С. Исследование качества жизни пациентов с сахарным диабетом 2 типа в зависимости от наличия постковидного синдрома / К.С. Савчук, Л.В. Рябова, **М.А. Добрынина** // Современные проблемы науки и образования. - 2024. – № 2. – 33. DOI: 10.17513/spno.33377.
4. Seroprevalence of SARS-CoV-2 Antibodies in Symptomatic Individuals Is Higher than in Persons Who Are at Increased Risk Exposure: The Results of the Single-Center, Prospective, Cross-Sectional Study / А. Zurochka, **М. Dobrinina**,

V. Zurochka, D. Hu, A. Solovyev, L. Ryabova, I. Kritsky, R. Ibragimov, A. Sarapultsev // *Vaccines*. - 2021. 9. - 627. <https://doi.org/10.3390/vaccines90606-2-7>.

5. Urinalysis, but Not Blood Biochemistry, Detects the Early Renal Impairment in Patients with COVID-19 / H. Zhou, Z. Zhang, **M. Dobrinina**, Y. Dong, Z. Kang, V. Chereshev, D. Hu, Z. Zhang, J. Zhang, A. Sarapultsev // *Diagnostics*. - 2022. - V. 12. - 602. [10.3390/diagnostics12030602](https://doi.org/10.3390/diagnostics12030602) Q2.

Публикации в других изданиях

6. Савчук, К.С. Клинико-иммунологические особенности течения постковидного синдром у больных с сахарным диабетом 2 типа. От клинических рекомендаций к реальной практике / К.С. Савчук, Л.В. Рябова, **М.А. Добрынина** // От клинических рекомендаций к реальной практике: междисциплинарный сборник научно-практических работ. – Челябинск, 2023. - С. 108-110.

7. Савчук, К.С. Клинические проявления постковидного синдрома у больных с сахарным диабетом 2 типа города Челябинска. / К.С. Савчук, Л.В. Рябова, **М.А. Добрынина** // Популяционные, клинические и профилактические аспекты полипатий. Мультидисциплинарный подход: материалы XII Межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 100-летию заслуженного деятеля науки РФ, профессора Д.А. Глубокова (г. Челябинск, 14 декабря 2023 г.). - Челябинск, 2023. - С. 124-125.

ГЛАВА 4 – ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ

4.1 – Оценка взаимодействия CD46 с белками вируса SARS-CoV-2

Прежде чем приступить к оценке иммунного статуса постковидных пациентов, мы провели биоинформационное исследование одного из новых предполагаемых механизмов взаимодействия вируса SARS-CoV-2 с панлейкоцитарным рецептором клеток иммунной системы CD46, актуальность исследования которого была описана в главе 2. Мембранный ко-факторный белок CD46 через стимуляцию Т-лимфоцитов вызывает подавление иммунного ответа, продуцируя интерлейкин 10. CD46 также называют “магнитом для патогенов”, поскольку он является рецептором для 11 известных патогенов [115]. Связываясь с CD46, эти патогены порождают выработку цитотоксических Т-клеток.

Таким образом, одним из весьма вероятных возможных путей развития осложнений SARS-CoV-2 в форме цитокинового шторма является взаимодействие вируса SARS-CoV-2 с мембранным ко-факторным белком CD46 человека, что открывает новое направление поиска средств лечения тяжелых форм SARS-CoV-2 инфекции.

Центральная гипотеза настоящего исследования заключается в том, что при неспецифическом встраивании в липидную мембрану клетки человека вирусная частица SARS-CoV-2 меняет свою форму, за счет чего становится возможным взаимодействие с другими, помимо SP, белками SARS-CoV-2. При этом пространственная конфигурация вируса изменяется настолько сильно, что шиповидный белок SP SARS-CoV-2 перестает играть свою ведущую роль инициатора SARS-CoV-2 инфекции.

В ходе биоинформационного анализа для белков CD46, EP, MP, NP и SP было идентифицировано в общей сложности 281 экспериментальная 3D-

модель (было ранее продемонстрировано в таблице 2), из которых было отобрано 88 адекватных изолированных субъединиц. Их валидность была оценена с использованием программы QMEAN-v4.2.0, что позволило выделить 23 валидные субъединицы. На основе гомологического моделирования были созданы 23 полноразмерные полноатомные 3D-модели белков CD46, EP, NP и SP.

Оценка валидности этих моделей с помощью консенсусного рангового метода, основанного на 3D-структурном сходстве с экспериментально валидированными субъединицами, а также с применением программы QMEAN-v4.2.0, позволила определить пять лучших полноразмерных моделей, построенных по гомологии для белков CD46, EP, MP, NP и SP. Их характеристики представлены в *таблице 18*.

Таблица 18 – Показатели валидности построенных по гомологии лучших полноразмерных 3D-моделей CD46, EP-MP-NP-SP

Protein	Model code	Rank _{Model}	Max Rank _{Model}
CD46	Model1	8,02	15,08
EP	QHD43418	2,10	7,80
NP	QHD43423	6,36	24,89
SP	Model5	31,34	40,45
MP	QHD43419	QMEAN4 = -5,79	QMEAN4 = -16,07

Показатель QMEAN (Qualitative Model Energy ANalysis) — это метрика, применяемая для оценки качества гомологических моделей белков, основанная на анализе различных структурных и энергетических характеристик модели. Это не простой средний ранг, а интегральная комплексная оценка, которая сравнивает предсказанную модель с экспериментально определенными структурами белков, позволяя судить о правдоподобности модели. При вычислении консенсусных оценок валидности RankModel, значения показателей структурного сходства ранжируются от лучшего к худшему, таким образом, минимальные значения RankModel соответствуют наиболее качественным моделям. Поскольку для белка MP не было найдено экспериментальных 3D-моделей, для его

валидности использовалась скоринговая функция QMEAN4, где максимальные значения указывают на лучшую модель.

В ходе построения 3D-моделей димерных комплексов CD46 с белками EP, MP, NP и SP было обработано около 1108000 конфигураций за 40 циклов расчетов. Из них было оптимизировано 28160 конфигураций, что позволило отобрать 238 наиболее подходящих 3D-моделей. Из этих моделей, на основе скоринговых оценок, были выбраны 40 наиболее адекватных (*были представлены ранее в таблице 3*).

В данных комплексах было выявлено 1124 связывающие аминокислоты, из которых 187 были определены как ключевые связывающие аминокислоты, наиболее часто встречающиеся в этих комплексах. Как правило, чем больше количество взаимодействующих аминокислот, тем прочнее белок-белковый комплекс. Процентная встречаемость ключевых связывающих аминокислот была рассчитана для всех 40 адекватных комплексов, что позволило выбрать по одной лучшей 3D-модели для каждого комплекса: CD46_EP, CD46_MP, CD46_NP и CD46_SP. Их характеристики приведены *в таблице 19*.

Таблица 19 – Число ключевых связывающих аминокислот в лучших 3D-моделях комплексов CD46 с EP-MP-NP-SP

Modelcode ¹	N _{All} ²	N _{CD46_Prot} ³	Pr _{КВАА} ⁴
CD46_EP_GRAMM1	26	15	57,7
CD46_MP_ZDock3	37	29	78,4
CD46_NP_ZDock3	62	28	45,2
CD46_SP_ZDock3	44	23	52,3

Примечание: Modelcode¹: Название модели, включающее код программы, использованной для построения 3D-модели комплекса (например, GRAMM1 или ZDock3). Эти программы применяются для предсказания структур белок-белковых взаимодействий. N_{All}² - число всех найденных связывающих аминокислот в комплексе. Это общее количество аминокислот, участвующих в связывании двух белков в димерном комплексе (включая обе субъединицы). N_{CD46_Prot}³ - число связывающих аминокислот, принадлежащих непосредственно белку CD46 в комплексе. Это количество аминокислот из белка CD46, которые участвуют в связывании с другим белком (EP, MP, NP или SP) в составе димерного комплекса. Pr_{КВАА}⁴ - процентное соотношение связывающих аминокислот белка CD46 от общего числа связывающих аминокислот в комплексе. Этот показатель выражает долю аминокислот CD46, участвующих в взаимодействии, относительно всех связывающих аминокислот в комплексе. Чем выше процент, тем большее участие белка CD46 в образовании комплекса.

Для каждой лучшей валидной 3D-модели комплексов определены пары ключевых и пространственно комплементарных им связывающих аминокислот, приведенных в *таблице 20*.

Таблица 20 – Ключевые и комплементарные им связывающие аминокислоты областей взаимодействия в лучших валидных 3D-моделях комплексов CD46 с EP-MP-NP-SP

Modelcode	Aminoacids¹	N_{Pares}²
CD46_EP_GRAMM1	THR188–ILE33, TYR189–ALA32, SER190–VAL29, CYS191–VAL29, PRO193–VAL75, PHE200–VAL25, LEU202–VAL29, GLU205–VAL29, SER206–ALA32, THR207–THR35, LYS244–ILE13, LYS244–VAL17, TYR247–PHE20	13
CD46_MP_ZDock3	PHE11–PHE100, PRO12–PHE100, TRP14–PHE96, PHE16–TRP92, PRO17–LEU93, LEU20–TRP92, MET24–LEU56, MET24–PRO59, VAL25–LEU57, VAL25–VAL60, LEU26–LEU62, LEU27–ALA63, TYR29–VAL66, TYR29–LEU67, PHE31–MET1, PHE31–VAL70, SER32–ASP3, GLU36–SER4, ASN83–TYR71, THR85–TYR71	20
CD46_NP_ZDock3	PRO334–SER21, ILE338–PHE17, SER341–THR16, LEU342–ILE15, ASP343–ILE15, VAL344–ARG14, TRP345–ARG14, VAL346–ILE15, ILE347–THR16, VAL351–GLN242, ALA353–GLN241, ILE354–GLN241, VAL355–GLN240, ALA359–GLN241, VAL360–GLN241, TYR366–LEU219, TYR368–LEU219, ARG372–ALA211, ARG372–GLY212, LYS373–ASN213, LYS374–ASP216, TYR378–LEU223, THR380–LEU223, THR383–LEU227, HIS384–LEU227	25
CD46_SP_ZDock3	GLU177–ASN487, VAL178–PHE486, PRO199–ASN501, GLU205–LYS417, ARG218–GLY416, SER240–SER375, TYR247–ASP405, TYR248–ARG408, TYR248–GLY502, LYS249–VAL503, LYS293–THR114, PRO295–LYS113, SER305–ASP198, THR306–GLY199, SER315–PHE2, ASN327–MET1, TYR328–VAL6, TYR331–PHE4, TYR331–LEU5, LYS333–VAL3	20

Примечание: ¹жирным шрифтом обозначены ключевые связывающие аминокислоты, обычным – комплементарные, ²число пар, связывающих аминокислоты.

Найденные пары связывающих аминокислот позволяют адекватно представить наиболее вероятные области взаимодействия CD46 с EP-MP-NP-SP, визуально представленные на рисунках 1-4.

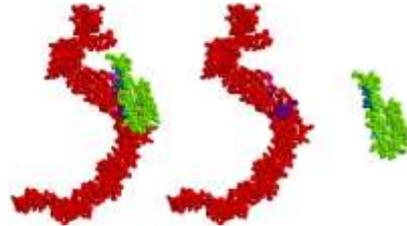


Рисунок 1 - Валидная 3D-модель белок-белкового комплекса CD46 человека и EPSARS-CoV-2. Слева направо: белок-белковый комплекс CD46–EP; отдельно CD46; отдельно EP

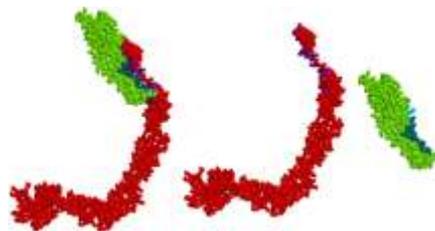


Рисунок 2 - Валидная 3D-модель белок-белкового комплекса CD46 человека и MPSARS-CoV-2. Слева направо: белок-белковый комплекс CD46–EP; отдельно CD46; отдельно EP

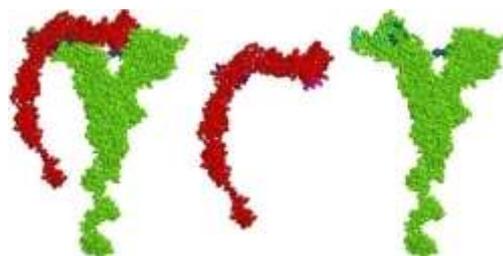


Рисунок 3 - Валидная 3D-модель белок-белкового комплекса CD46 человека и NP SARS-CoV-2. Слева направо: белок-белковый комплекс CD46–EP; отдельно CD46; отдельно EP

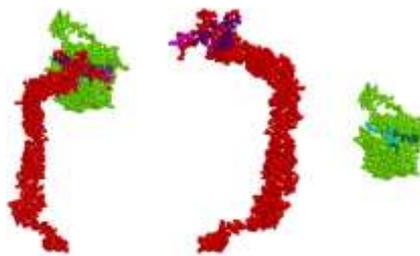


Рисунок 4 - Валидная 3D-модель белок-белкового комплекса CD46 человека и SP SARS-CoV-2. Слева направо: белок-белковый комплекс CD46–EP; отдельно CD46; отдельно EP

По числу ключевых связывающих аминокислот NCD46_Prot (*таблица 19*) комплексы располагаются в следующем порядке: CD46_MP \approx CD46_NP > CD46_SP \gg CD46_EP. По числу пар связывающих аминокислот NPares (*таблица 16*) распределение комплексов выглядит так: CD46_NP > CD46_MP = CD46_SP \gg CD46_EP.

На основании этих данных можно сделать вывод, что белок NP вируса SARS-CoV-2 наиболее интенсивно взаимодействует с белком CD46 человека. Следом по интенсивности взаимодействия идет белок MP, затем — шиповидный белок S, а наименее интенсивное взаимодействие наблюдается у белка оболочки EP.

Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что при неспецифическом встраивании вируса в липидную мембрану клетки человека конфигурация SARS-CoV-2 может претерпевать значительные изменения, что позволяет вирусу взаимодействовать с другими структурными белками, помимо белка S. В этом случае белок S перестает быть главным инициатором инфекции. Исследование показывает, что при реализации неспецифического механизма проникновения основным белком, связывающимся с CD46, является нуклеокапсидный белок NP вируса SARS-CoV-2.

Таким образом, взаимодействие белка NP с CD46 человека можно рассматривать как новый, пока еще малоисследованный механизм развития инфекции SARS-CoV-2. Этот механизм открывает новые перспективы для разработки терапевтических средств для лечения тяжелых форм инфекции.

Вещества, способные блокировать области связывания белка CD46 со структурными белками вируса SARS-CoV-2, могут стать основой для создания инновационных лекарственных препаратов и вакцин, направленных на лечение тяжелых осложнений инфекции.

Например, одна из вакцин, недавно внедренных в Российской Федерации, Конвасэл (производитель: ФГУП СПбНИИВС ФМБА, Россия), основана на использовании рекомбинантного нуклеокапсидного белка NP, что подтверждает его важную роль в патогенезе COVID-19. Вычисления, представленные в исследовании, подчеркивают значимость NP, поскольку он участвует в образовании стабильных белок-белковых комплексов, что видно по результатам анализа димерных комплексов. Это исследование дополнительно акцентирует внимание на ключевой роли белка NP в патогенезе вируса, что делает его использование в составе вакцин оправданным.

4.2 – Оценка врожденных факторов иммунной защиты у постковидных пациентов

Вирус SARS-CoV-2 может проникать в клетки с помощью S1 вирусного шипового (S) белка не только через связывание с ACE2, но и через другие рецепторы клеток. Как было представлено в предыдущих разделах диссертационного исследования, к таким кандидатным рецепторам относится CD46, который также, как и CD45, относится к панлейкоцитарным рецепторам и экспрессируется на всех видах лейкоцитов. В свою очередь, SARS-CoV-2-инфекция сопровождается повреждением практически всех компартментов иммунной системы и, в первую очередь, Т-лимфоцитов. Критерием сравнения общие Т-лимфоциты были выбраны в связи с тем, что их повреждение наиболее часто встречается при обследовании как ковидных, так и постковидных пациентов [81, 151].

Из литературных данных известно, что развитие SARS-CoV-2-инфекции обусловлено связыванием SARS-CoV-2 с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) и является критическим

шагом в патофизиологии клинических проявлений у пациентов с COVID-19 [188]. По-мнению М.К. Liszewski и соавторов, вирус SARS-CoV-2 может проникать в клетки не только с помощью S1 вирусного шипового (S) белка через связывание с ACE2, но и через другие рецепторы клеток. К таким кандидатным рецепторам относится CD46, который, так же как и CD45, относится к панлейкоцитарным рецепторам и экспрессируется на всех видах лимфоцитов [93, 115]. CD46 представляет собой мембранный гликопротеин I типа, экспрессируемый на всех ядерных клетках, характеризующийся как регуляторный белок комплемента и как рецептор для ряда патогенов человека, включая вакцинный штамм вируса кори, аденовирусов (группы В и D) и вирусов герпеса 6 типа [62].

В то же время, SARS-CoV-2 инфекция сопровождается повреждением практически всех компартментов иммунной системы и, в первую очередь, Т-лимфоцитов [138, 170]. При этом именно нарушение лимфоцитарного звена иммунной системы оказывается критичным в случае SARS-CoV-2, поскольку сверхактивный цитокиновый ответ, типичный для тяжелых случаев заболевания, приводит к развитию системных осложнений, полиорганной недостаточности и, в конечном итоге, к смерти [130]. У больных COVID-19 отмечается уменьшение количества CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов, CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов, CD19⁺ В-лимфоцитов и CD16⁺CD56⁺ NK-клеток в периферической крови [66, 81].

В свою очередь, при дефиците CD46 или его лиганда (C3/C3b) отмечается нарушение Th1-ответа и увеличивается риск рецидивирующих инфекций [186], в то время как нарушения со стороны Т-клеточного ответа отмечаются как в ходе самого заболевания [81], так и спустя длительные промежутки времени после клинического выздоровления [151].

Работ, определявших экспрессию CD46⁺ на лимфоцитах у пациентов с постковидным синдромом, в доступной литературе обнаружено не было.

Однако получение фундаментальных знаний о панлейкоцитарных маркерах лимфоцитов и их субпопуляций у постковидных пациентов

является крайне востребованным, так как может позволить разработать новые подходы к лечению и реабилитации больных, в том числе и при иных вирусных (в том числе и сезонных) заболеваниях.

Таким образом, учитывая роль активации системы комплемента при COVID-19, регуляторные свойства CD46 и его потенциальную вовлеченность в процессы проникновения вируса в клетку, мы сочли необходимым дать оценку параметрам иммунной системы, связанным с нарушением уровней CD45⁺ и CD46⁺ на различных субпопуляциях лейкоцитов у постковидных пациентов.

Задачей данной части исследований явилась оценка уровней экспрессии CD45⁺ и CD46⁺ на различных субпопуляциях лимфоцитов у пациентов, перенесших SARS-CoV-2 инфекцию.

На первом этапе исследования было выявлено, что при гейтировании лимфоцитов по CD45⁺ по сравнению с CD46⁺ у части пациентов процент Т-лимфоцитов, несущих рецептор CD45⁺, был достоверно выше, чем при гейтировании CD46⁺, из 72 пациентов таких было 52 человека (72,2 %), у остальных 20 человек процент Т-лимфоцитов, несущих рецептор CD45⁺, был равен или несколько ниже, чем при гейтировании CD46⁺ (*таблица 21*). По этому критерию пациенты были разбиты на 2 группы.

Как показали наши исследования, снижение экспрессии CD46⁺ на Т-лимфоцитах (CD3⁺) сопровождалось таким же уменьшением его экспрессии на цитотоксических Т-лимфоцитах (CD3⁺, CD8⁺), ТНК (CD3⁺, CD56⁺), а также Т-хелперах, несущих маркеры ранней активации (CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺). При этом наиболее выраженное снижение отмечалось как среди общих Т-лимфоцитов, так и цитотоксических. У этих больных несколько повышался уровень экспрессии CD46⁺ на В-лимфоцитах. Последние данные говорят об отсутствии вовлечения в нарушение рецептора CD46 на В-лимфоцитах (*таблица 21*).

Таблица 21 – Сравнение показателей субпопуляций лимфоцитов постковидных пациентов при гейтировании панлейкоцитарными маркерами CD45⁺ и CD46⁺

Показатели субпопуляций лимфоцитов	Группа 1. Постковидные пациенты с уровнем CD45 ⁺ больше уровня CD46 ⁺ , n=52, M±m	Группа 2. Постковидные пациенты с CD45 ⁺ равным или меньшим уровнем CD46 ⁺ , n=20, M±m0
Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD19 ⁻) отн. (%)	68,4±0,7*	74,4±1,0
Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD19 ⁻) абс. (10 ⁶ кл/л)	1427,5±57,9*	1753,3±112,5
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺) отн. (%)	23,3±1,0*	26,3±1,1
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺) абс. (10 ⁶ ккл/л)	466,0±21,2*	611,9±45,9
TNK-клетки (CD3 ⁺ 16 ⁺ 56 ⁺) отн. (%)	6,1±0,4	7,3±0,9
TNK-клетки (CD3 ⁺ 16 ⁺ 56 ⁺) абс. (10 ⁶ ккл/л)	114,6±6,6*	185,3±32,1
В-лимфоциты (CD3 ⁻ CD19 ⁺) отн. (%)	10,5±0,4*	9,0±0,7
В-лимфоциты (CD3 ⁻ CD19 ⁺) абс. (10 ⁶ кл/л)	218,0±11,6	194,4±8,8
Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺) (ранняя активация) отн. (%)	6,6±0,4	6,7±0,5
Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺) (ранняя активация) абс. (10 ⁶ кл/л)	56,3±4,0*	72,1±5,9

Примечание: *достоверность различий между группами p<0,05.

Как показало это исследование, более чем у 70 % обследованных пациентов с постковидным синдромом было выявлено значительное снижение экспрессии CD46⁺ на Т-лимфоцитах. При этом наиболее страдало как общее количество этих клеток, так и клетки, отвечающие за противовирусный иммунитет (Т-цитотоксические и TNK-клетки) и раннюю активацию Т-хелперов. Выявлено, что В-лимфоциты в этой ситуации не страдали, а даже несколько усиливали экспрессию CD46 на мембране клеток.

Полученные нами данные позволяют сделать вывод о том, что вирус SARS-CoV-2 может воздействовать на рецептор CD46, что было также подтверждено данными, полученными нами с помощью биоинформационных методов о возможности взаимодействия вируса SARS-CoV-2 и CD46 панлейкоцитарного рецептора клеток иммунной системы.

Более того, наблюдаемые изменения вполне могли быть вызваны взаимодействием вируса и CD46. Так, согласно литературным данным [108], CD46 вовлечен в контроль, по меньшей мере, трех ключевых метаболических событий: обработанный γ -секретазой внутриклеточный домен CYT-1 CD46 перемещается в ядро, где он индуцирует экспрессию белков-переносчиков (GLUT1, LAT1 и CAT1) и сборку mTORC1. Активация CD46 индуцирует повышенную экспрессию метаболических ферментов, включая синтазы жирных кислот, GAPD; также CD46 увеличивает активацию внутриклеточных пулов C5 с внутриклеточно генерируемым C5a, стимулирующим митохондриальный C5aR1, который управляет продукцией ROS и активацией NLRP3 инфламмасом в CD4⁺ Т-клетках. Все это лежит в основе повышения гликолиза и увеличения продукции OXP^HOS и ROS, необходимых для индукции продукции IFN- γ и экспрессии гранзима В, и, как следствие, реализации защитных эффекторных ответов Th1 Т-киллеров.

Особо стоит отметить, что выявленный комплекс изменений сохраняется у значительного числа переболевших пациентов на протяжении длительного времени, что подчеркивается нарушениями экспрессии этого маркера на различных субпопуляциях Т-лимфоцитов. В целом же, полученные данные подтверждают гипотезу участия рецептора CD46 в патогенезе COVID-19. Более того, такое воздействие приводит к усилению симптомов постковидного синдрома у пациентов и требует формирования новых подходов к коррекции этих нарушений.

Кроме того, исследования показали, что снижение экспрессии CD46 на Т-лимфоцитах (CD3⁺) сопровождалось таким же снижением его экспрессии на цитотоксических Т-лимфоцитах (CD3⁺, CD8⁺), ТНК (CD3⁺, CD56⁺), а

также Т-хелперах, несущих маркеры ранней активации (CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺). При этом наиболее выраженное снижение отмечалось как среди общих Т-лимфоцитов, так и цитотоксических. У этих больных несколько повышался уровень экспрессии CD46 на В-лимфоцитах. Последние данные говорят об отсутствии вовлечения в нарушение рецептора CD46 В-лимфоцитов. Полученные данные позволили сформировать несколько важных выводов:

1. У 72,2 % постковидных пациентов выявляется значительное снижение экспрессии CD46 на Т-лимфоцитах, что было подтверждено данными биоинформационного исследования о возможности взаимодействия вируса SARS-CoV-2 с указанным рецептором лейкоцитов.

2. Снижение уровня CD46 у постковидных пациентов было выявлено также на Т-цитотоксических и TNK-клетках, и Т-хелперах, несущих маркеры «ранней активации».

3. Снижение экспрессии CD46 на Т-лимфоцитах не сопровождалось падением уровня этого маркера на В-лимфоцитах.

Оценка уровня экспрессии CD46 на натуральных киллерах (NK-клетках)

Натуральные киллеры (NK-клетки) играют определяющую роль в формировании выраженности ответа врождённого иммунитета у пациентов с COVID-19 [63], способствуя сбалансированности прямого ответа на вирус – путем устранения инфицированных клеток (дендритных клеток, моноцитов и Т-клеток). Нарушение этого баланса оказывается критичным в случае SARS-CoV-2, поскольку сверхактивный цитокиновый ответ, типичный для тяжелых случаев заболевания, приводит к развитию системных осложнений, полиорганной недостаточности и, в конечном итоге, к смерти [130].

При тяжелом течении COVID-19 отмечается увеличение количества NK-клеток, экспрессирующих KIR2DS4, CD158i, а также изменения со стороны В-клеток, проявляющиеся снижением CD19⁺ и CD20^{+/-}, и падением уровня IgM [150]. Также фиксируется уменьшение количества CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов, CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов, CD19⁺ В-лимфоцитов и CD16⁺CD56⁺

НК-клеток крови [66], что, наряду с бактериальной коинфекцией, является причиной развития бактериальных пневмоний и приводит к значительному ухудшению состояния и, зачастую, смерти пациента [66].

Необходимо отметить, что описанные выше результаты исследований получены у пациентов с острым течением COVID-19, тогда как исследования НК-клеток и их связей с нарушением других компартментов иммунной системы у постковидных пациентов практически не проводилось.

Зарубежные исследователи считают, что основной путь проникновения вируса SARS-CoV-2 в клетки происходит за счет связывания S1 вирусного шипового (S) белка с ACE2 [111, 164]. Однако могут существовать и другие механизмы проникновения вируса в клетку [191] и в качестве одного из альтернативных рецепторов рассматривается CD46. CD46 – это мембранный гликопротеин I типа, относящийся к панлейкоцитарным рецепторам, экспрессирующийся на всех ядерных клетках человека, ключевой ролью которого является регуляция системы комплемента. В тоже время, многочисленные вирусные (вакцинный штамм вируса кори, аденовирусы группы В и D, вирусы герпеса 6 типа) и бактериальные (*Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitides*, *Streptococcus pyogenes*) патогены используют его в качестве рецептора. При этом связывание CD46 комплектом или патогенами влияет на функциональную активность, пролиферацию и дифференцировку различных иммунных клеток (макрофаги, дендритные клетки, Т-клетки) [62, 93, 115]. Лигирование CD46 меняет полярность Т-клеток, предотвращая нормальные ответы на презентацию антигена, и, как следствие, модулирует иммунный ответ и меняет исход заболеваний [88]. Более того, дефицит CD46 или его лиганда (C3/C3b) приводит к нарушению Th1-ответа, увеличивая риск рецидивирующих инфекций [186]. В тоже время, именно нарушение Т-клеточного ответа оказывается критичным в случае SARS-CoV-2 [16], как в ходе самого заболевания [81], так и спустя длительное время после клинического выздоровления [151].

Кроме того, нами были представлены возможности взаимодействия CD46 с другими белками SARS-CoV-2.

Таким образом, учитывая роль натуральных киллеров и активации системы комплемента при COVID-19, регуляторные свойства CD46 и полученные нами данные о его потенциальной вовлеченности в процессы проникновения вируса в клетку, мы сочли необходимым оценить изменение показателей натуральных киллеров (которые уменьшались у постковидных пациентов со снижением CD46) и связанных с их нарушением других различных субпопуляций лейкоцитов у пациентов с постковидом.

Для этого было обследовано 96 пациентов, перенесших SARS-CoV-2 инфекцию. Пациенты, участвующие в исследовании, были разделены по количеству НК-клеток. В качестве референсных интервалов и пороговых значений НК-клеток были приняты данные, представленные в монографии Зурочка А.В. и соавт. (2018) [28]. Кроме того, группы были рандомизированы по полу, возрасту, сопутствующим заболеваниям по критерию χ^2 . Таким образом, нами было выделено 2 группы сравнения:

- группа 1 – постковидные пациенты с уровнем НК-клеток ниже нормы, n=46.
- группа 2 – постковидные пациенты с нормальным уровнем НК-клеток, n=50.

В ходе исследования при делении выборки по количеству натуральных киллеров было выявлено, что среди 96 обследованных пациентов 48 % (группа 1) имели сниженный уровень абсолютного и относительного числа НК-клеток. Гейтирование лимфоцитов панлейкоцитарными маркерами CD45⁺ и CD46⁺ показало, что у пациентов группы 1 отмечено снижение НК-клеток более чем в 2 раза по сравнению с пациентами, относящимися к группе 2 (*таблица 22*).

Таблица 22 – Показатели иммунной системы, эритроидного, тромбоцитарного ростка кроветворения у постковидных пациентов со сниженным уровнем экспрессии CD46 на NK-клетках

Показатели иммунной системы Indicators immune system	Группа 1 Постковидные пациенты со сниженным уровнем экспрессии CD46 на NK-клетках (n=46)	Группа 2 Постковидные пациенты с нормальным уровнем экспрессии CD46 на NK-клетках (n=50)
NK-клетки (CD45 ⁺ CD3 ⁻ 16 ⁺ 56 ⁺) отн, %	6,3±0,4	14,6±0,5
NK-клетки (CD45 ⁺ CD3 ⁻ 16 ⁺ 56 ⁺) абс, 10 ⁶ кл/л	142,7±10,6*	305,8±16,4
NK-клетки (CD46 ⁺ CD3 ⁻ 16 ⁺ 56 ⁺) отн, %	6,0±0,4	13,4±0,5
NK-клетки (CD46 ⁺ CD3 ⁻ 16 ⁺ 56 ⁺) абс, 10 ⁶ кл/л	132,7±10,4*	276,7±15,0
Общее число Т-лимфоцитов (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻) отн, %	77,5±0,8*	69,3±0,9
Общее число Т-лимфоцитов (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻) абс, 10 ⁶ кл/л	1769,4 ±86,8*	1465,9±78,2
Общее число Т-лимфоцитов (CD46 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻) отн, %	74,6±1,0*	66,6±1,0
Общее число Т-лимфоцитов (CD46 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻) абс, 10 ⁶ кл/л	1711,6±86,4*	1409,6±78,9
Т-хелперы (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺) отн, %	51,3±1,8*	44,5±1,1
Т-хелперы (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺) абс, 10 ⁶ кл/л	1108,7±100,2*	985,4±51,8
TNK-лимфоциты (CD46 ⁺ CD3 ⁺ 16 ⁺ 56 ⁺) отн, %	6,5±0,6	5,2±0,5
TNK-лимфоциты (CD46 ⁺ CD3 ⁺ 16 ⁺ 56 ⁺) абс, 10 ⁶ кл/л	145,5±16,0 *	106,4±11,2
Общее число В-лимфоцитов памяти (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD27 ⁺) отн, %	4,2±0,5*	2,8±0,2
Общее число В-лимфоцитов памяти (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD27 ⁺) абс, 10 ⁶ кл/л	99,0±13,5 *	59,8±6,5
IgM общий, г/л	0,7±0,1*	1,0±0,1
Количество тромбоцитов, 10 ⁹ клеток/л	267,9±10,9 *	211,9±7,7
Тромбоцитокрит, %	0,19±0,01 *	0,17±0,01
Средний объем тромбоцита, fL	7,6±0,2 *	8,1±0,1
Концентрация гемоглобина, г/л	131,0±2,3*	141,9±2,2
Гематокрит, %	38,9±0,6 *	41,7±0,6
Средний корпускулярный объем гемоглобина, пг	28,7±0,4*	30,1±0,3
Средняя концентрация корпускулярного гемоглобина, г/л	337,1±1,4*	341,8±1,3

Примечание: данные представлены в виде M±m; * достоверность различий между группами p<0,05.

При этом снижение натуральных киллеров сопровождалось повышением в 1,2 раза абсолютного и относительного числа общих Т-лимфоцитов, которое, по-видимому, происходило за счет компенсаторного увеличения субпопуляций Т-хелперов и ТНК-лимфоцитов, а также ростом общего числа В-клеток памяти. Установлено, что увеличение общего числа В-лимфоцитов сопровождалось полуторократным снижением уровня общего IgM (*таблица 22*).

Анализ показателей тромбоцитарного ростка кроветворения у пациентов со сниженным уровнем НК-клеток показал повышение в 1,3 раза количества тромбоцитов, в 1,1 раза тромбоцитокрита на фоне снижения среднего объема тромбоцитов (*таблица 22*).

Постковидные пациенты со сниженным уровнем НК-клеток также характеризовались значительным снижением показателя гематокрита, концентрации гемоглобина в эритроцитах, среднего корпускулярного объема гемоглобина, средней концентрации корпускулярного гемоглобина (*таблица 22*).

Таким образом, при обсчете по разным исходным точкам иммунной системы (формирование групп по снижению/норме НК-клеток и панлейкоцитарному маркеру CD46 состав групп может различаться и иметь как общие признаки, так и существенные различия. Все это свидетельствует о том, что при анализе полученных результатов нужно проводить более глубокие исследования популяционного состава лейкоцитов с учетом разных точек повреждения системы иммунитета.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у части пациентов, ранее перенесших SARS-CoV-2 инфекцию и страдающих постковидным синдромом, четко прослеживается фенотип, связанный с нарушением систем врожденного иммунитета, включающего в себя снижение НК-клеток и панлейкоцитарного рецептора CD46.

Ранее другими авторами тоже было показано, что в течение первых 3 месяцев после выздоровления у пациентов с лёгкой и средней тяжестью

течения острого COVID-19 наблюдалось значительное снижение общего количества NK-клеток [97]. Эти данные согласуются с результатами наших исследований и свидетельствуют о том, что COVID-19 может влиять на количество и функции клеток врожденной иммунной системы (в том числе натуральных киллеров), приводя к развитию постострых последствий заболевания. В силу этого, эпигенетическая память иммунных клеток врожденного иммунитета и их предшественников может играть роль в развитии постковидных нарушений [82].

Отмеченные нарушения факторов врожденного иммунитета сопровождались изменениями в эритроцитарном и тромбоцитарном ростках кроветворения. Снижение эритроцитарных индексов может свидетельствовать о нарушении оксигенации организма. Было сделано предположение об ингибировании метаболизма гема путем связывания вирусного белка ORF8 с порфирином [116, 201]. Гемоглобин крови является наиболее простым для измерения гемопротеином, однако в метаболизме клеток принимает участие большое количество других важных белков, представляющих собой гемопротеины (миоглобин, каталаза, циклооксигеназа, пероксидаза, цитохром р450 и синтаза оксида азота, митохондриальные белки), которые, по-видимому, также могут снижаться при COVID-19. Подобные события приводят к белковой дисфункции, повреждению клеток, потере энергии митохондриями и утечке железа с последующим повышением уровня ферритина в сыворотке, а также к усталости и объективной мышечной слабости, о которых сообщают пациенты [173].

Кроме того, для постковидных пациентов с нарушенным иммунным статусом характерны тромботические осложнения [117]. Установлено повышение общего количества тромбоцитарных пластинок при одновременном снижении их среднего объема. По мнению Sumbalova Z., с соавт. (2022), нарушение регуляции врожденной и адаптивной иммунных систем является одним из критических факторов, вызывающих тромбоз при

COVID-19 [140]. Эти исследователи показали, что у пациентов после COVID-19 снижены функция дыхательной цепи митохондрий тромбоцитов, окислительное фосфорилирование и уровень эндогенного CoQ10, что приводит к нарушению их функциональной активности [140].

Согласно проанализированным литературным данным, CD46 играет значительную роль во врожденных и адаптивных иммунных реакциях, а нарушения CD46-опосредованных сигнальных путей приводят к врожденным иммунодефицитам. Так, пациенты с мутациями в CD46 не генерируют Th1 ответ, что приводит к развитию у них тяжелых рецидивирующих инфекций [186]. Oliaro J. и соавт. (2006) установили, что лигирование CD46 на NK-клетках влияет на поляризацию в направлении клеток-мишеней и снижает их цитотоксичность [113]. Эти результаты демонстрируют возможный механизм нарушения нормальной передачи сигналов между иммунными клетками, опосредованный патогенами, которые связывают CD46 [113].

Результаты настоящего исследования показали значительное снижение у постковидных пациентов как общего количества Т-лимфоцитов, так и NK-клеток, несущих на своей поверхности рецептор CD46. По-видимому, именно лигирование CD46 вирусом индуцирует его подавление [129]. В супернатантах CD46-активированных Т-клеток выделение CD46 приводит к образованию растворимого CD46 (sCD46), способного связывать лиганды. В свою очередь, активированные Т-клетки секретируют C3b, который, в свою очередь, связывается с выделенным sCD46 и приводит к ингибированию Т-клеток в петле отрицательной обратной связи [129]. Вероятно, именно эти механизмы иммунопатогенеза определяют дисфункцию Т-клеточного звена и, как следствие, развитие постострых симптомов COVID-19. Таким образом, можно сделать предварительные выводы по полученным результатам исследования:

1. У части постковидных пациентов через 6 месяцев и более сохранялось повреждение врожденных факторов иммунной системы, а

именно снижение уровня НК-клеток (48 %) и клеток, имеющих панлейкоцитарный маркер CD46 (64,5 %).

2. Снижение натуральных киллеров сопровождалось повышением уровня общих Т-лимфоцитов, преимущественно за счет Т-хелперов и ТНК-лимфоцитов, и ростом общих В-клеток памяти, которое сочеталось со снижением уровня общего IgM.

3. Снижение уровня НК-клеток сопровождалось нарушением тромбоцитарного (повышением уровня тромбоцитов, тромбоцитокрита на фоне снижения среднего объема тромбоцитов) и эритроидного (снижением гемоглобина, гематокрита, среднего корпускулярного объема гемоглобина, средней концентрации корпускулярного гемоглобина) ростков кроветворения.

4. У пациентов со сниженной экспрессией CD46 на Т-лимфоцитах значительно уменьшилось как общее количество этих клеток, так и НК-клеток. Полученные нами данные указывают на участие CD46 и НК-клеток в развитии не только инфекции SARS-CoV-2, но и постковидного состояния.

Все это, а также выявленные нами нарушения факторов приобретенного иммунитета, связанные также с повреждением CD46 рецепторов лейкоцитов, обосновывает важность оценки главных противовирусных параметров приобретенной системы иммунной защиты, а именно цитотоксических Т-лимфоцитов и В-клеток.

4.3 – Оценка факторов приобретенной иммунной защиты у постковидных пациентов

Исследование популяции Т-лимфоцитов у постковидных пациентов. Развитие SARS-CoV-2 инфекции характеризуется повреждением различных звеньев иммунной системы, которые вовлекаются в процесс противодействия вирусу, и эти повреждения могут оставаться достаточно длительное время. Выявлено, что у пациентов SARS-CoV-2 определяются различные нарушения со стороны Т-клеток [138]. У больных COVID-19

отмечается уменьшение количества $CD3^+CD4^+$ Т-лимфоцитов, $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов, $CD19^+$ В-лимфоциты и $CD16^+CD56^+$ NK-клетки в периферической крови [66]. В то же время, при особо тяжелом течении заболевания отмечается сверхактивация Т-клеток, повышение $CCR4^+$ $CCR6^+$ Th17 и повышение активности и количества цитотоксичных $CD8^+$ Т-клеток в периферической крови [134].

Необходимо отметить, что описанные нарушения регуляции $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов, $CD16^+CD56^+$ NK-клеток, С1q, а также повышение в крови ИЛ-6, наряду с бактериальной коинфекцией, являются важными причинами развития бактериальной пневмонии, которая приводит к ухудшению состояния вплоть до летального исхода [66].

Стоит отметить и роль регуляторных Т-reg при SARS-CoV-2. Было показано, что $FoxP3^+CD25^+CD4^+$ Т-reg накапливаются в лимфатических узлах средостения при вирусной пневмонии и ограничивают функцию эффекторных Т-клеток CD8. Таким образом, Treg могут играть достаточно важную роль в замедлении клиренса вируса, что приводит к быстрому прогрессированию заболевания и поражению центральной нервной системы [87]. При этом роль Т-reg в развитии неврологических проявлений коронавирусных инфекций была отмечена и в более ранних исследованиях [124].

Как правило, все эти исследования проводились у пациентов в период острой фазы развития SARS-CoV-2 инфекции. Исследование же клеток иммунной системы, в том числе и цитотоксических Т-лимфоцитов у постковидных пациентов, практически не исследовалось.

Было выявлено, что пациенты, страдающие от осложнений COVID-19, включая госпитализацию и изоляцию от членов своей семьи, испытывают сильный психологический и социальный стресс. Кроме того, нельзя исключать и отрицательное воздействие массажной терапии на функционирование клеток иммунной системы (так называемое ятрогенное влияние терапии, не всегда адекватной состоянию пациента). Экстремальные

уровни стресса также повышают уровень цитокинов и способствуют медицинским осложнениям у пациентов с COVID-19, которые уже имеют повреждение органов из-за цитокинового шторма [89]. Длительное стрессорное и ятрогенное воздействие также способствует формированию нарушений иммунной системы [122, 198]. Все это приводит к формированию большой группы пациентов с постковидным синдромом.

Малочисленные фундаментальные исследования состояния иммунной системы у постковидных пациентов, в том числе цитотоксических Т-лимфоцитов, отсутствие разработок подходов к терапии нарушений иммунных механизмов у таких больных может серьёзно осложнить сроки реабилитации таких постковидных пациентов и ухудшить прогноз их дальнейшей выживаемости при последующих вирусных (в том числе и сезонных) заболеваниях.

Учитывая, что Т-цитотоксические клетки являются одними из ключевых клеток иммунной системы [28], участвующих в противовирусной защите, мы сочли необходимым исследовать параметры иммунной системы, связанные с нарушением цитотоксических Т-клеток у постковидных пациентов. Для оценки уровня цитотоксических Т-клеток и особенностей нарушений иммунной системы у пациентов, перенесших SARS-CoV-2 инфекцию было обследовано 78 пациентов, перенесших SARS-CoV-2 инфекцию.

Пациенты были разделены на 2 группы сравнения: 1. Пациенты с уровнем цитотоксических Т-клеток ниже нормы. 2. Пациенты с нормальным уровнем цитотоксических Т-клеток. За норму цитотоксических Т-клеток были приняты данные, представленные в монографии Зурочка А.В. и соавт. (2018) [28].

Как показали наши исследования, нарушения Тс-клеток были выявлены у 35 пациентов (44,8 %) из 78 обследованных. При этом снижение уровней цитотоксических Т-клеток у этой группы пациентов было в 1,7 раза, чем у постковидных пациентов, не имеющих такого нарушения. Важно, что

данное нарушение связано с другими компартментами иммунной системы – Т- и В-лимфоцитами. Так, падение уровня Тс-клеток сопровождалось снижением уровня Т-лимфоцитов, ТНК-клеток, при почти двукратном росте соотношения Т-хелперов к цитотоксическим Т-клеткам, уровнем Т-хелперов, В лимфоцитов, в том числе за счет уровня В2-лимфоцитов, общих В-лимфоцитов не клеток памяти и субпопуляций В-лимфоцитов не клеток памяти (таблица 23).

Таблица 23 – Показатели иммунной системы у постковидных пациентов с нарушением уровня цитотоксических Т-клеток

Показатели иммунной системы	Группа 1. Постковидные пациенты со сниженным уровнем Тс-клеток (n=35), M±m	Группа 2. Постковидные пациенты с нормальным уровнем Тс-клеток (n=43), M±m
Т-цитотоксические (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺) отн. (%)	17,8±0,8*	28,5±1,2
Т-цитотоксические (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺) абс. (10 ⁶ кл/л)	343,7±22,4*	651,4±34,1
Т-лимфоциты (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻) отн. (%)	69,3±1,4*	73,8±1,1
Т-лимфоциты (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻) абс.(10 ⁶ кл/л)	1383,2±104,6*	1717,5±80,2
Т-хелперы (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺) отн. (%)	49,9±1,6*	44,7±1,2
Т-хелперы (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺) абс. (10 ⁶ кл/л)	1006,1±86,1	1051,6±57,0
Соотношение CD4 ⁺ /CD8 ⁺ клеток (усл.ед)	3,0±0,2*	1,7±0,1
ТНК-лимфоциты (CD45 ⁺ CD3 ⁺ 16 ⁺ 56 ⁺) отн. (%)	3,9±0,4*	7,3±0,7
ТНК-лимфоциты (CD45 ⁺ CD3 ⁺ 16 ⁺ 56 ⁺) абс. (10 ⁶ кл/л)	76,2±9,0*	164,7±19,1
В-лимфоциты (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺) отн. (%)	13,3±0,8*	10,1±0,6

Продолжение таблицы 23

В-лимфоциты (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺) абс. (10 ⁶ кл/л)	264,3±23,1	232,5±16,2
В2-лимфоциты общие (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁻) отн. (%)	9,6±0,9*	6,6±0,6
В2-лимфоциты общие (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁻) абс. (10 ⁶ кл/л)	188,2±19,9*	142,1±12,6
В-лимфоциты не клетки памяти общие (CD45 ⁺ CD3 ⁻ D19 ⁺ CD27 ⁻) отн. (%)	9,2±0,8*	5,8±0,6
В-лимфоциты не клетки памяти общие (CD45 ⁺ CD3 ⁻ D19 ⁺ CD27 ⁻) абс. (10 ⁶ кл/л)	178,6±19,8*	129,5±12,5
В1-лимфоциты не клетки памяти (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁻) отн. (%)	2,0±0,3*	1,4±0,1
В1-лимфоциты не клетки памяти (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁻) абс. (10 ⁶ кл/л)	37,4±5,2	30,7±2,8
В2-лимфоциты не клетки памяти (CD 45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD27 ⁻) отн. (%)	7,2±0,7*	4,3±0,5
В2-лимфоциты не клетки памяти (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD27 ⁻) абс. (10 ⁶ кл/л)	140,9±17,2*	94,2±10,7

Примечание: * достоверность различий между группами, $p < 0,05$.

При анализе полученных результатов выявлено, что у 44,8 % среди обследованных лиц в 1,7 раза снижено количество цитотоксических Т-клеток. Это явление сопровождалось снижением уровня Т-лимфоцитов в целом, ТНК-лимфоцитов, некоторым ростом Т-хелперов, увеличением соотношения CD4/CD8 клеток, уровней В-лимфоцитов, за счет В-общих и ВСД45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺CD27⁻, В-лимфоцитов CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁻CD27⁻ не клеток памяти, относящихся к плазмочитам (или, иначе, наиболее активно продуцирующим иммуноглобулины В-клеткам). Все эти данные свидетельствуют о том, что у таких пациентов в большей степени начал формироваться иммунный ответ по ТН2-типу (усиление продукции антител),

а не по ТН1-типу (формирование клеточных иммунных реакций) [28]. Кроме того, у таких больных было выявлено нарушение ТН1 ответа, а также увеличилась вероятность развития патологических процессов, связанных с неадекватным ответом на вирусные антигены (включая повторные заражения вирусом SARS-CoV-2, обострения хронических инфекций). Выявленное нами снижение Тс-клеток и нарушение регуляции ТН1/ТН2 ответов также могло способствовать и обострению заболеваний, вызванных персистирующими вирусами (например, герпетическими). Возможно, выявленные нами нарушения у таких пациентов могут в дальнейшем способствовать возникновению или обострению аллергических и аутоиммунных процессов при нарушении функционирования (гиперактивации) В-клеточного звена иммунной системы. Очень важным также является и выявленное почти двукратное снижение ТНК-лимфоцитов. Многие авторы относят такие нарушения указанных клеток также к снижению противовирусной активности иммунной системы, что может способствовать как некачественному ответу на новые вирусные антигены, так и способствовать активации хронических вирусных инфекций [28]. Все это требует дальнейшего более детального исследования как с точки зрения дальнейших клинических наблюдений за этими пациентами, так и с точки зрения разработки методов коррекции выявленных нарушений иммунной системы.

На основе данных, полученных нами в этой части исследований можно сделать следующие выводы:

1. У 44,8 % постковидных пациентов выявляется значительное, более чем в 1,7 раза, снижение уровня цитотоксических Т-клеток.
2. Снижение уровня Тс-клеток у постковидных пациентов сопровождается снижением Т-лимфоцитов и ТНК-лимфоцитов.

Низкий уровень Тс-клеток у постковидных пациентов сопровождается более высоким уровнем Th, соотношения CD4/CD8 клеток, В2 общих лимфоцитов, преимущественно за счет субпопуляций В-общих и В

CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺CD27⁻, В-лимфоцитов CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁻CD27⁻ не клеток памяти.

Полученные нами данные о компенсаторном изменении субпопуляций В-лимфоцитов, в том числе и у пациентов с нарушением экспрессии CD46 рецепторов поставили перед нами вопрос о роли В-лимфоцитов у постковидных пациентов.

Оценка субпопуляций В-лимфоцитов у постковидных пациентов

Среди людей, перенесших COVID-19, у тех пациентов, которым в последующем был поставлен диагноз "постковидный синдром", была выявлена высокая активность клеток врожденного иммунного ответа на фоне практически полного отсутствия наивных Т- и В-клеток и повышенная экспрессия ИФН I типа (ИФН-β) и ИФН III типа (ИФН-λ1), которая оставалась стабильно высокой даже через 8 месяцев с момента установки диагноза [95].

В то время как большинство исследований, посвященных иммунным нарушениям у лиц с постострыми последствиями COVID-19, направлено на анализ клеток врожденного иммунитета и популяций Т-лимфоцитов [172], повреждению В-клеточного звена иммунной системы, который определяет продолжительность и широту защитного иммунитета, уделено недостаточно внимания. SARS-CoV-2 вызывает стойкий ответ В-клеток [109], но уровни антител со временем снижаются, что повышает риск ослабления иммунитета, поскольку титр нейтрализующих антител снижается ниже порогового значения, необходимого для защиты от повторного заражения [96]. Реакция В-клеток памяти, специфичная для SARS-CoV-2, увеличивается в течение первых 4–5 месяцев после заражения, прежде чем стабилизируется [109], однако специфичные для SARS-CoV-2 плазматические клетки сохраняются в костном мозге между 7 и 11 месяцами после заражения, поддерживая уровни сывороточных антител [168].

В публикациях, которые были посвящены долгосрочным В-клеточным ответам [183] также было показано усиление активации В-клеток,

определяемое повышением частоты маркеров CD95⁺, CD69⁺ и PD1⁺, которое с течением времени возвращается к нормальным значениям, однако устойчивое присутствие В-клеток FCRL4⁺ и PD1⁺ у таких пациентов предполагает сохранение их дисрегуляции [183]. Крайне важно, что содержание антигенспецифичных В-клеток памяти SARS-CoV-2 обычно пропорционально тяжести COVID-19. И в группе с тяжелым течением заболевания, как правило, было выявлено более высокое содержание всех В-клеток памяти IgM⁺, IgA⁺ и IgG⁺ по сравнению с другими группами [80], что придает их исследованию особенную значимость.

Как уже было показано, у пациентов, перенесших острый COVID-19, отмечается три вида нарушений иммунной системы, выделенных нами в отдельные фенотипы (поражение NK-клеток, цитотоксических клеток и клеток, несущих рецептор CD46⁺). В то же время, исследование В-клеток отдельно не проводилось, что и сформировало дальнейшую задачу исследований, которая заключалась в анализе В-клеточного роста иммунной системы у постковидных пациентов и особенностей нарушений иммунной системы у таких больных.

Было обследовано 98 пациентов, перенесших SARS-CoV-2 инфекцию. Определение групп сравнения проводилось по уровню В-клеток памяти с фенотипом CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺CD27⁺. Выбор данной популяции для сравнения был обусловлен тем, что при предварительном индивидуальном анализе было выявлен ряд пациентов с очень высоким уровнем этих клеток. В качестве референсных интервалов и пороговых значений субпопуляций В-клеток и В-клеток памяти были приняты данные, представленные в монографии Зурочка А.В. и соавт. (2018) [28]. Кроме того, группы были рандомизированы по полу, возрасту, сопутствующим заболеваниям по критерию χ^2 . Таким образом, нами было выделено 2 группы сравнения:

- группа 1 – постковидные пациенты с повышенным уровнем В1-клеток памяти CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺CD27⁺ (n=15);

- группа 2 – постковидные пациенты с нормальным уровнем В1-клеток памяти CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺CD27⁺ (n=83).

При делении общей выборки исследованных постковидных пациентов по уровню В-клеток памяти CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺CD27⁺ было выявлено, что у 15,3 % наблюдался повышенный абсолютный и относительный уровень В-клеток памяти CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺CD27⁺ по сравнению с группой с нормальным их содержанием (таблица 24).

Таблица 24 – Содержание субпопуляций В-лимфоцитов у постковидных пациентов с нарушением уровня В1-клеток памяти

Показатели иммунной системы Immune System Indicators	Группа 1. Постковидные пациенты с повышенным уровнем В1-клеток памяти, n=15	Группа 2. Постковидные пациенты с нормальным уровнем В1-клеток памяти, n=83
В-лимфоциты клетки памяти общие (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD27 ⁺), отн. (%)	6,7±0,9*	2,8±0,2
В-лимфоциты клетки памяти общие (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD27 ⁺), абс. (10 ⁶ кл/л)	168,1±33,3*	61,4±4,9
В-лимфоциты не клетки памяти общие (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺), отн. (%)	3,2±0,5*	7,8±0,5
В-лимфоциты не клетки памяти общие (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺), абс. (10 ⁶ ккл/л)	69,8±10,1*	169,3±12,8
В1-лимфоциты клетки памяти (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺), отн. (%)	6,2±0,9*	0,37±0,04
В1-лимфоциты клетки памяти (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺), абс. (10 ⁶ ккл/л)	154,8±30,6*	7,7±0,8
В1-лимфоциты общие (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺), отн. (%)	8,2±0,8*	2,0±0,2

Продолжение таблицы 24

В1-лимфоциты общие(CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺), абс. (10 ⁶ кл/л)	196,2±29,1*	42,5±3,5
В2-лимфоциты клетки памяти(CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD27 ⁺), отн. (%)	0,5±0,1*	2,5±0,2
В2-лимфоциты клетки памяти(CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD27 ⁺), абс. (10 ⁶ кл/л)	13,1±3,2*	54,7±4,5
В2-лимфоциты не клетки памяти(CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD27 ⁻), отн. (%)	1,3±0,3*	6,1±0,4
В2-лимфоциты не клетки памяти(CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD27 ⁻), абс. (10 ⁶ кл/л)	25,5±7,6*	134,2±10,8
В2-лимфоциты общие (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁻), отн. (%)	1,8±0,3*	8,5±0,5
В2-лимфоциты общие (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁻), абс. (10 ⁶ кл/л)	41,9±7,9*	189,0±13,0

Примечание: * достоверность различий между группами, $p < 0,05$.

Это повышение сопровождалось трехкратным увеличением количества общих В-клеток памяти и четырехкратным повышением В-общих лимфоцитов CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺ (преимущественно за счет В-клеток памяти CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺CD27⁺).

В тоже время у этих пациентов было обнаружено снижение более чем в 4 раза субпопуляции общих В-лимфоцитов с фенотипом CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁻, которое происходило как за счет снижения В-лимфоцитов клеток памяти с фенотипом CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁻CD27⁺, так и В-лимфоцитов не клеток памяти с фенотипом CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁻CD27⁻ (таблица 23). Кроме того, у пациентов с повышенным уровнем В-клеток памяти с фенотипом CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺CD27⁺ было отмечено усиление продукции IgA (рисунок 5).

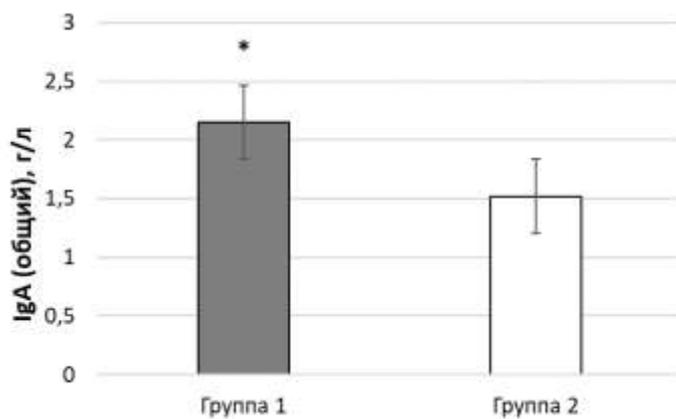


Рисунок 5 – Уровень общего IgA у постковидных пациентов с нарушением уровня В-клеток с фенотипом CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺CD27⁺, *достоверность различий между группами, p<0,05

Анализ полученных показателей выявил нарушение врожденных факторов иммунной системы. Так, у пациентов, перенёсших COVID-19 с повышенным уровнем В-клеток памяти с фенотипом CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺CD27⁺, было отмечено значимое абсолютное и относительное снижение уровня натуральных киллеров CD45⁺CD3⁻CD16⁺56⁺ (NK-киллеры, абс, 10⁶кл/л – группа 1: 208,8±20,65; группа 2: 269,35±20,25; NK-киллеры, отн, % – группа 1: 9,17±1,16; группа 2: 12,32±0,74). Вместе с тем, у этих пациентов было обнаружено снижение на 13 % С3а-фрагмента комплемента относительно группы постковидных пациентов с нормальным уровнем В-клеток памяти с фенотипом CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺CD27⁺ (группа 1: 100,29±4,26; группа 2: 114,78±2,92).

Исследование популяции Т-лимфоцитов у постковидных пациентов группы 1 выявило повышение ее уровня по сравнению с группой 2, а также изменения в субпопуляционном составе. Так, у пациентов с повышенным содержанием В-клеток памяти с фенотипом CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺CD27⁺ отмечено снижение в 1,3 раза Т-регуляторных клеток и в 1,6 раз Т-клеток ранней активации лимфоцитов (CD25⁺) (таблица 25).

Таблица 25 – Содержание субпопуляций Т-лимфоцитов у постковидных пациентов с нарушением уровня В1-клеток памяти

Показатели иммунной системы Immune System Indicators	Группа 1. Постковидные пациенты с повышенным уровнем В1-клеток памяти с фенотипом CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺ , n=15	Группа 2. Постковидные пациенты с нормальным уровнем В1-клеток памяти с фенотипом CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺ , n=83
Общее число Т-лимфоцитов (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻), отн. (%)	77,1±1,5*	71,8±1,0
Общее число Т-лимфоцитов (CD46 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻), абс. (10 ⁶ кл/л)	1806,3±161,0*	1576,3±63,8
Т-лимфоциты (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺) ранняя активация, отн. %	4,5±0,7*	7,6±0,4
Т-лимфоциты (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺) ранняя активация, абс. (10 ⁶ кл/л)	46,2±6,7*	75,5±4,6
Т-регуляторные лимфоциты (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻) отн. %	1,6±0,2*	2,2±0,2
Т-регуляторные лимфоциты (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻) абс. (10 ⁶ кл/л)	17,2±1,4*	22,6±1,8

Примечание: * достоверность различий между группами, p<0,05.

При анализе показателей тромбоцитарного роста кроветворения у пациентов с повышенным уровнем В-клеток памяти с фенотипом CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺CD27⁺ было выявлено снижение среднего объема тромбоцитов (группа 1: 7,3±0,3; группа 2: 8,0±0,1). Кроме того, у таких больных наблюдалось снижение параметров гемоглобина: среднего корпускулярного объема гемоглобина (группа 1: 28,0±0,6; группа 2: 29,7±0,3) и средней концентрации корпускулярного гемоглобина (группа 1: 332,3±1,2; группа 2: 340,9±1,1). Данные изменения в системе эритроцитарного и тромбоцитарного

ростков кроветворения могут способствовать проявлениям гипоксии и нарушению системы свертывания крови.

В целом, исследование подтверждает литературные данные о наличии устойчивого изменения лимфоцитов после перенесенного COVID-19 [109, 42]. Более того, нами были выделены дистинктные фенотипы по ответу иммунной системы у постковидных больных. В этом ключе интересно сопоставить наши результаты с работой H.S. Shuwa (2021), в которой также было выделено три 3 подгруппы выздоравливающих пациентов, на основе различных фенотипов лимфоцитов, при этом, выявление одной из них четко ассоциировалось с худшим клиническим исходом [42], что было показано и в наших предыдущих исследованиях. Так, в данной работе группа 1 характеризовалась высокой экспрессией транспортирующих молекул и увеличенной долей наивных В- и Т-клеток; группа 2 – высокой долей IgA⁺ и IgG⁺, В-клеток и В-клеток памяти (как переключаемых, так и не переключаемых); а группа 3 показала повышенное содержание цитотоксических Т-клеток, CD8⁺ TEMRA и цитокинов типа 1 как CD8⁺, так и CD4⁺ Т-клеток и характеризовалась худшей клинической картиной [42].

Интересно, что пациенты группы 2 по анамнестическим и демографическим характеристикам не отличалась от группы 3, но имели существенно более благоприятную (по данным рентгена) клиническую картину. В силу этого, можно говорить, что именно особенности иммунного ответа являлись фактором, определяющим процесс выздоровления.

По-видимому, у пациентов с повышенным уровнем В-клеток памяти CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁺CD27⁺ сформировался особый тип нарушения иммунной системы, заключающийся в дезорганизации переключения В-лимфоцитов с синтеза IgM на IgG и IgA, что привело к резкому снижению В-субпопуляций лимфоцитов CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁻. Возможно, такое нарушение связано с резким снижением Т-регуляторных лимфоцитов и Т-лимфоцитов, отвечающих за регуляцию дифференцировки В-лимфоцитов - клеток, несущих IgM рецепторы, на клетки, синтезирующие IgG и IgA (Т-

лимфоцитов ранней активации, несущих маркер к IL-2). Необходимо отметить, что представленность изотипов Ig среди популяции В-клеток памяти, специфичных для SARS-CoV-2, меняется со временем [96], что является как ограничением данного исследования, так и причиной возможных расхождений с другими авторами, которые исследовали больных в другие временные периоды.

В целом, настоящее исследование подтверждает данные о наличии фенотипических и функциональных изменений в В- и Т-клетках по всей траектории иммунного ответа, и выявляет комплекс изменений лимфоцитов у выздоравливающих пациентов с COVID-19 [42], который может быть ассоциирован с развитием долгосрочных осложнений в виде антипатогенных или аутовоспалительных реакций и требовать адресной иммунокоррекции.

Таким образом, по данному разделу исследований можно сделать следующие выводы:

1. У 15,3 % пациентов с постковидным синдромом нарушения иммунной системы выявляется резкое увеличение $CD45^+CD3^-CD19^+CD5^+CD27^+$ В-клеток памяти.

2. Повышение $CD45^+CD3^-CD19^+CD5^+CD27^+$ В-клеток памяти сопровождается увеличением общих В-клеток $CD45^+CD3^-CD19^+CD5^+$ (за счет $CD45^+CD3^-CD19^+CD5^+CD27^+$ В-клеток памяти), уровня общих Т-лимфоцитов, уровня IgA, но резко снижается уровень В-лимфоцитов не клеток памяти, В-лимфоцитов $CD45^+CD3^-CD19^+CD5^-CD27^+$ клеток памяти, так и $CD45^+CD3^-CD19^+CD5^-CD27^-$ не клеток памяти, уровень натуральных киллеров, Т-регуляторных клеток, Т-клеток ранней активации лимфоцитов ($CD25^+$).

3. Все эти изменения формируют новый, неизвестный ранее, фенотип повреждения иммунной системы у постковидных пациентов.

4.4 – Клинико-иммунологическая характеристика постковидных пациентов

SARS-CoV-2 инфекция сопровождается повреждением систем и приобретенного, и врожденного иммунитета. Мы исследовали роль В-клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов, натуральных киллеров и регуляторных свойств CD46, как и его вовлеченности в процессы проникновения вируса в клетку. На следующем этапе мы проанализировали связь иммунных нарушений этих факторов врожденного и приобретенного иммунитета с клиническими проявлениями постковидного инфекционного синдрома у данной категории пациентов и степенью выраженности поражения легких у этих пациентов в острый период COVID-19.

Был обследован 131 пациент из числа перенесших SARS-CoV-2 инфекцию.

Определение групп сравнения проводилось по двум параметрам врожденного иммунитета – по количеству NK-клеток и панлейкоцитарному маркеру CD46, а также по двум параметрам приобретенного иммунитета – снижению Т-цитотоксических лимфоцитов и повышению В-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD19⁺CD5⁺CD27⁺.

На первом этапе исследования пациенты также были разделены по степени поражения легких в зависимости от фенотипа повреждения иммунной системы (*таблица 26*) на три группы:

- группа 1 – постковидные пациенты без поражения легких, n=38;
- группа 2 – постковидные пациенты с поражением легких менее 50%, n=68;
- группа 3 – постковидные пациенты с поражением легких более 50%, n=25.

Таблица 26 – Наличие фенотипов нарушений иммунной системы у постковидных пациентов в зависимости от степени поражения легких в острый период COVID-19

Фенотип нарушений иммунной системы / степень поражения легких по данным КТ	Общее число обследованных пациентов (n=131)		Группа 1 КТ 0 (n=38)		Группа 2 КТ 1-2 (n=68)		Группа 3 КТ 3-4 (n=25)	
	Абс	%	Абс	%	Абс	%	Абс	%
Снижение NK	50	38,2	0	0	40	58,8	10	40,0
						P1-2 <0,0 5		P1-3 <0,0 5
Снижение экспрессии CD46 на Т-лимфоцитах	57	43,5	0	0	45	66,2	12	48,0
						P1-2 <0,0 5		P1-3 <0,0 5
Снижение Tc	26	19,9	0	0	21	30,9	5	17,9
						P1-2 <0,0 5		P1-3 <0,0 5
Повышение В-клеток с фенотипом CD3 ⁻ D19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺	15	11,5	0	0	12	17,7	3	12,0
						P1-2 <0,0 5		P1-3 <0,0 5

Примечание: достоверность различий между группами p1-p2, p1-p3, p2-p3. Достоверными считались различия $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Из данных *таблицы 26* видно, что наличие фенотипов нарушения иммунной системы характерно только для пациентов, имевших поражение легких по типу "матового стекла" по данным компьютерной томографии в остром периоде COVID-19.

На втором этапе работы пациенты были разделены по фенотипам повреждения иммунной системы, в зависимости от клинических проявлений инфекционно-воспалительных заболеваний с участвовавшими случаями рецидивов либо впервые выявленные после клинического выздоровления от перенесенной острой инфекции COVID-19 (*таблица 27*). На этом этапе работы было сформировано 4 группы сравнения:

- группа 1 – постковидные пациенты с повышением В-клеток с фенотипом CD3⁺CD19⁺CD5⁺CD27⁺, n=15;
- группа 2 – постковидные пациенты со снижением Т-цитотоксических клеток, n=26;
- группа 3 – постковидные пациенты со снижением экспрессии CD46 на NK-клеток, n=50;
- группа 4 – постковидные пациенты со снижением экспрессии рецептора CD46 на Т-лимфоцитах, n=57.

Таким образом, второй этап исследования показал, что формирование фенотипов иммунной патологии характерно только для пациентов с поражением легких вне зависимости от степени поражения легких.

На третьем этапе исследования мы разделили обследованных пациентов с постковидным синдромом по ранее нами выявленным фенотипам иммунных нарушений и клиническим проявлениям инфекционного синдрома иммунопатологии, а также по данным литературы [144] согласно анкетированию и данным историй болезни этих пациентов (таблица 27).

Таблица 27 – Клинические проявления инфекционного синдрома у постковидных пациентов в зависимости от фенотипа иммунных нарушений

Заболевания с участвовавшими случаями рецидивов либо впервые выявленные после клинического выздоровления от перенесенной острой инфекции COVID-19 /фенотип нарушений иммунной системы	Повышение В1 -клеток n=15		Снижение Тс n=26		Снижение экспрессии и CD46 на NK n=50		Снижение экспрессии CD46 на Т-лимфоцитах n=57	
	Абс	%	Абс	%	Абс	%	Абс	%
Длительный субфебрилитет	7	46,7	11	42,3	25	50,0	32	56,1
Рецидивирующий герпес	4	26,7	18	69,2 P1-2 <0,05	37	74,0 P1-3 <0,05	38	66,7 P1-4 <0,05

Продолжение таблицы 27

ВПЧ	1	6,7	3	11,5	12	24,0 P1-3 <0,0 5	16	28,1 P1-4 <0,05
Высокая частота ОРВИ	6	40,0	5	19,2 P2-3 <0,05	26	52,0	20	35,1
Гнойно-воспалительные заболевания кожи и подкожно-жировой клетчатки	4	26,7	7	26,9	13	26,0	22	38,6
Хронические инфекции ЛОР-органов	7	46,7	12	46,2	35	70,0 P2-3 <0,0 5	30	52,6
Часто повторяющиеся /хронические бронхиты и/или пневмонии, ХОБЛ	1	6,7	10	38,5 P1-2 <0,05	18	36,0 P1-3 <0,0 5	21	36,8 P1-4 <0,05
Лихорадка неуточненного генеза	2	13,3	5	19,2	12	24,0	12	21,1
Воспалительные заболевания почек	1	6,7	5	19,2	7	14,0	14	24,6 P1-4 <0,05
Заболевания зубов и десен	2	13,3	7	26,9	16	32,0	20	35,1 P1-4 <0,05
Частые гнойные конъюнктивиты	0	0	2	7,7	6	12,0 P1-3 <0,0 5	5	8,8 P1-4 <0,05

Примечание: достоверность различий между группами p1-p2, p1-p3, p1-p4, p2-p3, p2-p4, p3-p4. Достоверными считались различия $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

При анализе данных некоторые показатели (герпесвирусная инфекция, хронические заболевания легких) продемонстрировали достоверно высокие

различия по Т-цитотоксическим, NK-клеткам и рецептору CD46 на Т-лимфоцитах (приобретенный и врожденный иммунитет) относительно В-лимфоцитов. В отличие от этих двух видов патологии папилломавирусная инфекция, воспалительные заболевания почек, воспалительные заболевания зубов и десен, а также рецидивирующие гнойные конъюнктивиты вызывали, в основном, различия по врожденным звеньям иммунитета (NK-клетки и CD46 рецептор комплемента). Таким образом, наиболее выраженные клинико-иммунологические проявления постковидного синдрома выявлялись при сравнении заболеваний инфекционно-воспалительной природы с фенотипами нарушений иммунной системы.

Одним из ключевых показателей иммунного статуса является система комплемента. Нарушения активности системы комплемента могут приводить к тяжелым последствиям для различных органов и тканей – центральной нервной системы, печени, легких, иммунной системы в целом [108].

Следующим этапом исследования было сравнение уровня показателей системы комплемента у постковидных пациентов в зависимости от степени тяжести течения острой коронавирусной инфекции (таблица 28).

Таблица 28 – Анализ показателей системы комплемента у постковидных пациентов в зависимости от степени поражения легких по данным компьютерной томографии в острый период COVID-19

Степень поражения легких по данным КТ / Уровень показателей системы комплемента	Группа 1 КТ 0 (n=38) M±m, p	Группа 2 КТ 1-2 (n=68) M±m, p	Группа 3 КТ 3-4 (n=25) M±m, p	Группа 4 Условно - здоровые лица не болевшие COVID-19, n=16 M±m
C1q мкг/мл	273,9±31,7	275,5±27,9	199,1±20,3 P1-3 <0,05 P2-3 <0,05 P 3-4<0,05	287,2±31,2
C3a нг/мл	109,7±6,4	115,3±6,9	106,3±13,0	119,7±18,3
C5a нг/мл	27,2±3,5 P1-4<0,05	25,2±2,6 P2-4<0,05	27,1±5,9 P 3-4<0,05	15,1±2,7

Примечание: достоверность различий между группами p1-p2, p1-p3, p1-p4, p2-p3, p2-p4, p3-p4. Достоверными считались различия p<0,05 (критерий Стьюдента).

Как видно из *таблицы 28*, у всех пациентов, перенесших COVID-19, увеличена активность C5a фрагмента комплемента, что свидетельствует о длительной (не менее полугода) стимуляции классического пути активации комплемента. Также обращает на себя внимание стойкое снижение активности C1q, отвечающего за нормализацию активированного комплемента, у наиболее клинически тяжелых пациентов. Эти данные свидетельствуют о том, что вирус SARS-CoV-2 может взаимодействовать с рецептором CD46 и активировать комплемент, а также объясняют наличие клинических проявлений постковидного синдрома у лиц, перенесших острую форму COVID-19 в легкой форме без поражения легких по данным компьютерной томографии и не имеющих выявленных нами ранее фенотипов повреждения иммунной системы.

Всё это свидетельствует о том, что обследование постковидных пациентов следует проводить, не только оценивая их клинические характеристики, но и обязательно исследуя состояние иммунной системы таких пациентов для постановки правильного диагноза и назначения этиологической и патогенетической терапии, в том числе и иммунной терапии.

Таким образом, по данному разделу работы можно сделать следующие выводы:

1. Достоверных различий между группами пациентов, разделенных по степени поражения легких в острый период COVID-19 в зависимости от клинических проявлений инфекционно-воспалительных заболеваний с участвовавшими случаями рецидивов либо впервые выявленных после клинического выздоровления от перенесенной острой инфекции COVID-19 получено не было, за исключением воспалительных заболеваний почек в группах 1 и 2 (КТ 0 и КТ1-2, соответственно).

2. При сопоставлении фенотипов нарушений иммунной системы у постковидных пациентов в зависимости от степени поражения легких в

остром периоде коронавирусной инфекции получены достоверные различия между группой 1 (КТ 0) по сравнению с другими группами. При этом в группе 1 не было найдено ни одного фенотипа нарушений в отличие от второй и третьей групп (КТ1-2 и КТ3-4 соответственно) и эти показатели были достоверно лучше, чем в группах с поражением легких. Это свидетельствует о том, что формирование фенотипов иммунной патологии характерно только для пациентов с поражением легких вне зависимости от степени поражения легких.

3. Наиболее выраженные клиничко-иммунологические проявления постковидного синдрома выявляются при сравнении заболеваний инфекционно-воспалительной природы с фенотипами нарушений иммунной системы.

4. Длительно сохраняющаяся активация системы комплемента наблюдается у всех обследованных лиц, перенесших COVID-19, по сравнению с контрольной группой, вне зависимости от тяжести течения острой формы заболевания, что объясняет наличие клинических проявлений постковидного синдрома у лиц, перенесших острую форму COVID-19 в легкой форме без поражения легких по данным компьютерной томографии и не имеющих выявленных нами ранее фенотипов повреждения иммунной системы.

Таким образом, все полученные нами данные приводят нас к новой концепции патогенеза постковидного синдрома: предполагаемое взаимодействие белков SARS-CoV-2 (NP>MP>SP>EP) с рецептором CD46, во-первых, вызывает длительно сохраняющуюся активацию системы комплемента у всех пациентов с постковидным синдромом, наиболее выраженную у лиц, перенесших тяжелую форму острой коронавирусной инфекции с поражением легких по типу "матового стекла" более 50 % по данным компьютерной томографии, а во-вторых, к нарушению экспрессии рецептора CD46 на клетках иммунной системы у лиц, перенесших COVID-19 с поражением легких по типу "матового стекла" данным компьютерной

томографии, что сопровождается рядом нарушений в формировании этих клеток и формирует, в свою очередь, не пересекающиеся между собой фенотипы иммунных нарушений у пациентов с постковидным синдромом (рисунок 6).

Все эти данные приводят нас к необходимости проведения иммунокоррекции данных пациентов.

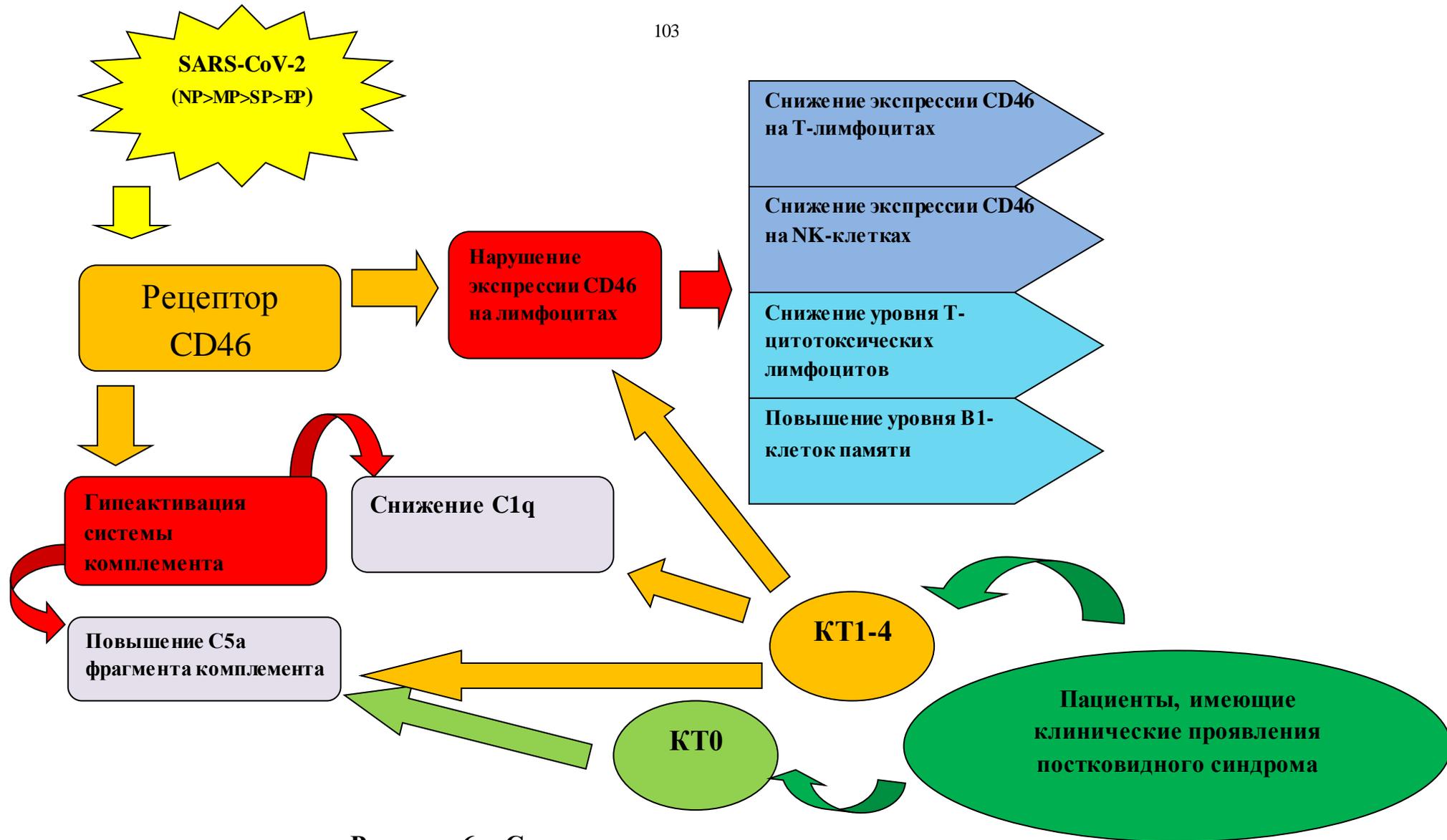


Рисунок 6 – Схема патогенеза постковидного синдрома

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ 4 ГЛАВЫ

Публикации, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и/или индексируемых в международных базах данных WoS, Scopus, RSCI, PubMed

1. Динамическая оценка Т-лимфоцитов и гуморального иммунитета у пациентов с острым коронарным синдромом, болевших и не болевших COVID-19, в зависимости от содержания CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов / Э.А. Сафронова, Л.В. Рябова, А.В. Зурочка, **М.А. Добрынина**, Е.В. Задорина // Медицинский вестник Юга России. – 2024. – Т. 15 (1). С.148-158. DOI: 10.21886/2219-8075-2024-15-1-148-158.
2. Нарушения Т-клеточного звена иммунитета через 6-12 месяцев после острой фазы коронавирусной инфекции, скрининговое исследование / А.В.Зурочка, И.В. Кудрявцев, **М.А. Добрынина**, Э.А.Сафронова, В.А. Зурочка, А.А.Зуйкова, Г.П. Сарапульцев, О.И. Забков, А.А. Мосунов, М.Д. Верховская, В.В. Дукардт, Л.О. Фомина, Е.Г. Костоломова, Ю.В. Останкова, А.А. Тотолян // Инфекция и иммунитет. – 2024. - Т. 14, № 4. С. 756–768.
3. Особенности Т-клеточного и гуморального иммунитета пациентов с острым коронарным синдромом, болевших и не болевших COVID-19, в зависимости от содержания В₁-лимфоцитов периферической крови / Э.А. Сафронова, Л.В. Рябова, А.В. Зурочка, **М.А. Добрынина** // Инфекция и иммунитет. 2024. - Т. 14, № 2. - С. 277-288.
4. Изменения врожденных факторов иммунной системы по данным изучения иммунной системы периферической крови у постковидных пациентов / **М.А. Добрынина**, А.В. Зурочка, М.В. Комелькова, В.А. Зурочка, Е.А. Праскуриничий, Л.В. Рябова, А.П. Сарапульцев // Инфекция и иммунитет. - 2023. - Т. 13, № 5. - С. 864–872. DOI: 10.15789/2220-7619-АП-9641.
5. Нарушение В-клеточного звена иммунной системы и связанных с ним нарушений иммунитета у постковидных пациентов / **М.А. Добрынина**, А.В. Зурочка, М.В. Комелькова, В.А. Зурочка, А.П. Сарапульцев // Российский иммунологический журнал. - 2023. - Т. 26, № 3. - С. 241-250. DOI: 10.46235/1028-7221-9636-DIT.
6. Post-COVID immunopatology syndrome: characteristics of phenotypical changes in the immune system in post-COVID patients / **М.А. Dobrynina**, R.V. Ibragimov, I.S. Kritsky, M.D. Verkhovskaya, A.A. Mosunov, G.P. Sarapultsev, A.V. Zurochka, V.A. Zurochka, A.P. Sarapultsev, M.V. Komelkova, L.V. Ryabova, E.A. Praskurnichiy // Medical Immunology (Russia). – 2023. - Vol. 25, № 4. P. 791-796. DOI: 10.15789/1563-0625-PCI-2707.

7. Исследование нарушения натуральных киллеров у пациентов, перенесших Covid-19 / *М.А. Добрынина*, А.В. Зурочка, М.В. Комелькова, Ш. Ло // Российский иммунологический журнал. – 2022. - Т. 25, № 2. С. 161-166, DOI: 10.46235/1028-7221-1132-ION.

8. Исследование экспрессии CD45⁺ и CD46⁺ на субпопуляциях лимфоцитов периферической крови постковидных пациентов / *М.А. Добрынина*, А.В. Зурочка, М.В. Комелькова, Ш. Ло, В.А. Зурочка, Д. Ху, Л.В. Рябова, А.П. Сарапульцев // Российский иммунологический журнал. – 2022. - Т. 25, № 4. - С. 431-436. DOI: 10.46235/1028-7221-1160-SOC.

ГЛАВА 5 – РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К ИММУНОКОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ

5.1 – Выбор препаратов для иммунокоррекции постковидных нарушений иммунной системы

Как было представлено в предыдущих главах, после острой SARS-CoV-2-инфекции у пациентов через 6-12 месяцев формируется постковидный синдром, часто сопровождающийся развитием тех или иных нарушений иммунной системы. Было выявлено, что у пациентов с постковидным синдромом появились нарушения Т-, В-, НК- клеток, фагоцитов, комплемента. Практически «посковидный синдром» иммунодефицита проявляется нарушениями во всех звеньях иммунной системы. Это связано, скорее всего, с тем, что развитие острого процесса SARS-CoV-2 инфекции сопровождается повреждением практически всех компартментов иммунной системы и, в первую очередь, Т-лимфоцитов [138]. При этом именно нарушение иммунной системы оказывается критичным в случае SARS-CoV-2, поскольку сверхактивный цитокиновый ответ, типичный для тяжелых случаев заболевания, приводит к развитию системных осложнений, полиорганной недостаточности и, в конечном итоге, к смерти [130, 186, 188].

В тоже время нарушения иммунной системы, выявленные у постковидных пациентов, требуют разработки подходов к их иммунной коррекции. Одним из таких подходов является применение синтетического пептида активного центра GM-CSF, успешно применявшегося при различных патологических состояниях, в том числе при патологиях, связанных с нарушениями в иммунной системе человека [4, 22, 24, 25].

Работ, посвященных иммунокоррекции нарушений иммунной системы у постковидных пациентов, в литературных данных на данный момент

недостаточно для формирования патогенетических подходов к ним. Так, например, исследование влияния рекомбинатного ИЛ-2 на 29 постковидных пациентах в возрасте от 45 до 65 лет [157] показало, что до начала терапии рекомбинатным ИЛ-2 у этих пациентов с постковидным синдромом наблюдалось с одной стороны снижение процента зрелых и продуцирующих цитокины НК-клеток, а с другой стороны повысился уровень незрелых клеток CD56^{dim}. Следует отметить, что такие изменения в составе субпопуляции НК-клеток возникают наряду со снижением процентного и абсолютного количества общих НК-клеток. После иммунореабилитации количество общих НК-клеток полностью восстанавливается до контрольной величины. Уровень зрелых (CD16⁺CD56⁺) НК-клеток повышен в 3 раза по сравнению с исходным уровнем, но остается значительно сниженным относительно контрольных значений. Низкий уровень НК-клеток, продуцирующих цитокины, и повышенный процент клеток CD16^{-/+}CD56^{dim} оставались практически интактными после лечения рекомбинатным ИЛ-2. При этом количество цитотоксических клеток увеличилось более чем в 4 раза. В целом, можно сделать вывод, что у пациентов с постковидным синдромом с количественным восстановлением общего количества НК-клеток после иммунокоррекции рекомбинатным ИЛ-2 до контрольного уровня сохраняется неравномерный состав субпопуляции НК-клеток.

Эти данные свидетельствуют о необходимости получения фундаментальных знаний о иммунокоррекции у постковидных пациентов, которые являются крайне востребованными, так как могут позволить разрабатывать новые подходы к лечению и реабилитации больных, в том числе и при иных вирусных (в том числе и сезонных) заболеваниях.

Таким образом, учитывая роль иммунной системы в формировании нарушений у постковидных пациентов, мы проанализировали возможность применения у таких больных синтетического пептида активного центра GM-CSF и ГМДП.

Следующим этапом диссертационного исследования был анализ влияния синтетического пептида активного центра GM-CSF на состояние иммунной системы пациентов с «постковидным синдромом» иммунопатологии.

5.2 – Дополнительные исследования различных вариантов активности синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF)

Противовирусные механизмы действия синтетического пептида активного центра GM-CSF. Перспективную группу противовирусных средств представляют препараты прямого противовирусного действия. Под препаратами прямого действия в данном случае понимаются конкретные вещества или их смеси, увеличивающие устойчивость клеток организма к вирусной инфекции путем разрушения вируса, блокирования его репликации или иным способом, который может осуществляться без участия иммунной системы. Отличительной особенностью таких противовирусных средств служит повышение устойчивости клеток-мишеней к вирусной атаке, которое выявляется в условиях *in vitro* (то есть вне организма), например, при введении препарата в культуральную среду с клетками до, во время или после их инфицирования вирусом [8].

К таким противовирусным средствам прямого действия, в том числе, относятся препараты, получаемые путем экстракции тканей насекомых, в частности, представителей отрядов Odonata (стрекозы), Mantoptera (богомолы), Hemiptera (полужесткокрылые), Coleoptera (жуки), Diptera (двукрылые), Mecoptera (скоропионницы) или Lepidoptera (бабочки). Средство получено путем препаративного получения вещества из гемолимфы насекомых и используется как противовирусный препарат [36].

Недостатком данного средства является отсутствие химической формулы действующего вещества или веществ, сложность и трудоемкость получения препарата в большом количестве и невозможность его

стандартизации, так как выделяемые от разных насекомых препараты гемолимфы могут отличаться как по составу и удельному весу, так и по молекулярной массе экстрагируемых веществ.

Известен патент на изобретение № 2338553 «Средство для наружного применения, обладающее противовирусной активностью», опубликованный 20.01.2008 г. (автор Черныш С.И.) [37]. Данное изобретение относится к области медицины. Сущность изобретения заключается в том, что создано средство для наружного применения, в состав которого входит пептид из группы аллоферонов, аллостатин-1 и вспомогательные вещества. Предлагаемое средство применяется для лечения заболеваний кожи и слизистых оболочек, вызываемых вирусом герпеса, вирусом папилломы человека, а также косметических дефектов кожи. Преимущество изобретения заключается в расширении области применения.

Недостатком данного средства является то, что в отличие от заявляемых материалов, данный пептид влияет на иммунную систему и не обладает прямым противовирусным действием, то есть его противовирусный эффект связан с влиянием на воспаление, а не на репликацию вирусов.

Известен патент на изобретение «Применение пептида Arg-Pro-Gly-Pro в качестве противовирусного средства для животных», опубликованный 20.03.2011 г. (разработан авторским коллективом Института молекулярной генетики РАН) [27]. Это изобретение относится к ветеринарии. Изобретение раскрывает применение тетрапептида Arg-Pro-Gly-Pro в качестве средства для профилактики и лечения вирусных заболеваний. Фармацевтическая композиция для профилактики и лечения вирусных заболеваний содержит водный раствор тетрапептида Arg-Pro-Gly-Pro, в концентрации 0,1-1 %, и нипагин при определенном соотношении компонентов. Способ профилактики вирусных заболеваний, включает введение указанной фармацевтической композиции интраназально, перорально или внутрибрюшинно в дозе 0,2-5 мг в сутки на мышь в течение 2-х суток. Способ лечения вирусных заболеваний включает введение указанной

фармацевтической композиции интраназально, перорально или внутрибрюшинно в дозе 0,2-5 мг в сутки на мышь в течение 3-х суток. Изобретение позволяет расширить ассортимент противовирусных лекарственных средств, повысить эффективность профилактики и лечения вирусных инфекций, снизить стоимость препарата.

Недостатком данного средства является то, что противовирусный эффект тетрапептида показан в эксперименте на животных без расшифровки механизма его действия, в то время как у синтетического пептида выявлено прямое антивирусное (вирулицидное) действие, проявляющееся в виде нейтрализации (ингибирования) вирусных частиц.

Общество с ограниченной ответственностью "Ликели" получило патент на изобретение «Биологически активный пептид и иммуномодулирующая и противовирусная фармацевтическая композиция», опубликованный 10.02.2016 г. [2]. Изобретение относится к области биотехнологии, а именно, к синтетическим пептидам с иммуностимулирующими свойствами, и может быть использовано в медицине. Синтезирован ряд пептидов, отличающихся по химической структуре от известных биологически активных пептидов Аллоферонов и Аллостатинов. Отличие состоит в том, что в положении 6 структуры His-Gly-Val-Ser-Gly-X-Gly-Gln-His-Gly-Val-His-Gly вместо гистидина или триптофана, характерных для этих пептидов, находятся другие аминокислоты алифатического и ароматического рядов, а также их химические модификации. Полученные пептиды используются в составе иммуномодулирующей и противовирусной фармацевтической композиции. Изобретение позволяет получать пептиды, эффективно индуцирующие выработку интерлейкина-18 и интерферона гамма (прототип).

Недостатком данного средства является то, что в отличие от заявляемых материалов данный пептид обладает иммуномодулирующим действием, но не обладает прямым противовирусным действием, то есть его противовирусный эффект связан с влиянием на воспаление и модулирование активности иммунной системы, а не на репликацию вирусов.

Известен патент на изобретение «Биологически активные производные АЛЛОФЕРОНА-1», опубликованный 10.03.2016 г [1]. В патенте описана группа изобретений, которая относится к медицине и касается применения производного АЛЛОФЕРОНА-1 Phe(p-NH₂)-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Gln-His-Gly-Val-His-Gly в качестве средства, обладающего высокой иммуномодулирующей и противовирусной активностью. Группа изобретений также касается иммуномодулирующей и противовирусной композиции, содержащей пептид Phe(p-NH₂)-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Gln-His-Gly-Val-His-Gly или его фармацевтически приемлемые соли в сочетании со стандартными вспомогательными веществами. Группа изобретений обеспечивает стимулирование индукции интерлейкина-18, интерферона гамма и подавление вирусов гриппа А и В.

Недостатком данного изобретения является то, что он обладает иммуностимулирующим действием и не обладает прямым противовирусным действием, то есть его противовирусный эффект связан с влиянием на воспаление и модулирование активности иммунной системы, а не на репликацию вирусов.

Известен патент на изобретение «Пептиды, подавляющие инфекции респираторных вирусов, их применение и способы получения», авторы изобретения Б. Чжен и Х. Чжао, который был опубликован 21.17.2017 г. [38]. Изобретение касается пептида, синтезированного химическим способом или способом генной инженерии, композиции, включающей такой пептид, ДНК, кодирующей полипептид, вектора, включающего такую ДНК, клетки-хозяина для экспрессии представленного пептида, набора для скрининга пептида, способного подавлять инфекцию респираторного вируса, и способа скрининга пептида, способного подавлять инфекцию респираторного вируса. Представленный пептид содержит 5 или более основных аминокислот, из которых 2 или более основных аминокислот расположены в N-терминальной области или в C-терминальной области, причем, N-терминальная область содержит последовательность не более 10 аминокислот, считая от N-

терминальной аминокислоты пептида, а С-терминальная область содержит последовательность не более 10 аминокислот, считая от С-терминальной аминокислоты пептида, при этом пептид состоит из последовательности аминокислот, по меньшей мере, на 90 % идентичной SEQ ID NO: 10. Изобретения могут применяться для блокирования в клетках-мишенях инфекций таких респираторных вирусов, как вирусы гриппа или коронавирусы, а также для профилактики и лечения указанных инфекций.

Этот патент является наиболее близким к требованиям нашего исследования по эффектам запатентованных пептидов, которые также обладают противовирусной активностью, но отличаются формулой (строением) пептида.

Таким образом, актуальным является поиск новых подходов к созданию препаратов, обладающих выраженной прямой антивирусной (вирулицидной) активностью. В этом плане перспективен подход, предусматривающий направленный синтез веществ с заданными свойствами, в частности, обладающих антивирусной (прежде всего, вирулицидной) активностью.

Пептид GM-CSF решает задачу расширения арсенала средств для борьбы с вирусами вне организма, а также для профилактики и лечения вирусных инфекций, вызванных как ДНК-, так и РНК-вирусами [12].

Поставленная задача решается тем, что в качестве противовирусного (вирулицидного) средства используют синтетический пептид (ZP2) с молекулярной массой 1400 дальтон, имеющий химическую структуру (аминокислотную последовательность): THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO, и обладающий прямым антивирусным (вирулицидным) действием, как против ДНК-вирусов, так и против РНК-вирусов.

За счет того, что в качестве противовирусного средства используют синтетический пептид (ZP2), расширяется арсенал средств для

нейтрализации вирусов вне организма, а также профилактики и лечения вирусных инфекций, вызванных как ДНК-, так и РНК-вирусами.

Синтетический пептид активного центра GM-CSF обладает новизной в сравнении с прототипом, отличается высокой эффективностью, прямой антивирусной (вирулицидной) активностью, получается путем химического контролируемого синтеза (нет примесей других веществ), имеет точную химическую структуру (аминокислотную последовательность) с конкретной молекулярной массой, что позволяет получать стандартизованный препарат, содержащий синтетический пептид (ZP2), имеющий структуру THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO, м.м. 1400 дальтон, который обладает вирулицидной активностью против как ДНК-, так и РНК-вирусов и может быть использован для борьбы (нейтрализации) вирусных частиц вне организма, а также для профилактики и лечения вирусных инфекций, причем, степень выраженности антивирусной активности у данного пептида значительно выше при профилактической схеме применения.

Оценка прямой антивирусной (вирулицидной) активности заявляемого средства представлена на *рисунке 7*.

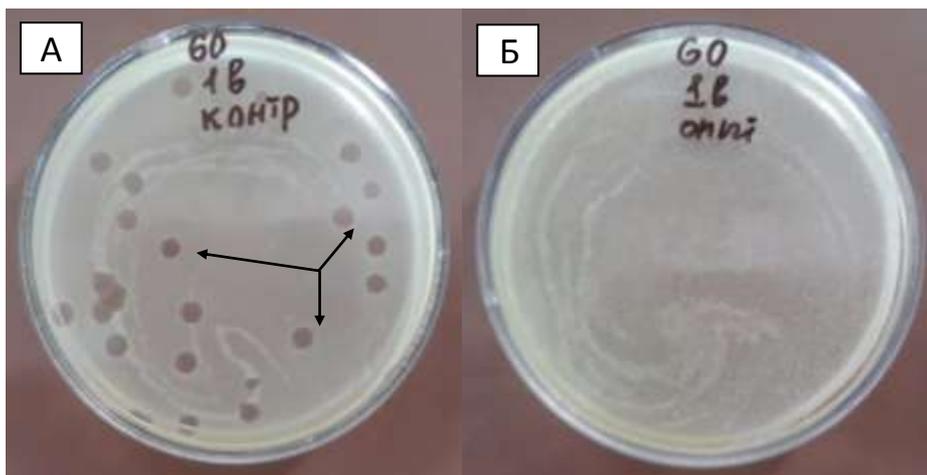


Рисунок 7 – Вирулицидное действие синтетического пептида ZP2 в отношении вирусов бактерий (бактериофагов) при тестировании на культуре *P. aeruginosa* (штамм № 60)

Примечание: фото слева (А) – контроль; фото справа (Б) – опыт; стрелками указаны БОЕ.

Методика оценки прямой вирулицидной активности описана в Главе «Материалы и методы исследования».

На обеих культурах *P. aeruginosa* (штаммы №№ 55 и 60) были получены идентичные результаты: в контроле – на чашках регистрировались 22-34 БОЕ, то есть концентрация вирусов бактерий в растворе составляла 110-170 бактериофагов в 1 мл (рисунк 7), в опыте – образование бляшкообразующих единиц (БОЕ) не наблюдалось (рисунк 7), что свидетельствовало о полной инактивации бактериофагов и, следовательно, вирулицидном действии синтетического пептида ZP2 в отношении вирусов бактерий (таблица 29).

Таблица 29 – Показатели активности бактериофагов в отношении изученных культур *P. aeruginosa* в контроле и опыте (после контакта с синтетическим пептидом ZP2 в концентрации 5 мкг/мл) (n=5)

Проанализированные культуры бактерий	Количество БОЕ на чашках (M±m)	
	Контроль	Опыт
<i>P. aeruginosa</i> , штамм №55	32,0±0,9*	БОЕ отсутствуют
<i>P. aeruginosa</i> , штамм №60	23,0±0,4*	БОЕ отсутствуют

Примечание: *p<0,05 достоверность отличий между контролем и опытом.

Таким образом, синтетический пептид ZP2 (в конечной действующей концентрации 5 мкг/мл) ингибировал способность бактериофагов (вирусы бактерий) взаимодействовать с бактериальной клеткой-мишенью *P. aeruginosa*, то есть данный пептид обладал прямым антивирусным (вирулицидным) действием.

В дальнейшем анализировали влияние синтетического пептида ZP2 на ДНК- и РНК-вирусы человека. Синтетический пептид ZP2 использовали в градиенте концентраций: 5, 20, 50 и 100 мкг/мл.

В качестве тестируемых вирусов использовали: вирус парагриппа 3 типа (штамм Вок) и аденовирус 3 серотипа (штамм 3/Воронеж/2174/82), полученные из Государственной коллекции вирусов (Институт вирусологии

им. Д.И. Ивановского, входящий в состав ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва).

При проведении исследований *in vitro* использовали перевиваемую культуру клеток карциномы гортани человека HEp-2.

При подготовке к экспериментам *in vitro* сначала готовили рабочий раствор синтетического пептида ZP2 путем растворения 1 г препарата в 2 мл DMSO, а затем его добавляли во флаконы с поддерживающей средой (2ИГЛА MEM и 199, взятые в равных соотношениях), в объемах, создающих следующие конечные концентрации пептида ZP2 – 5, 20, 50 и 100 мкг/мл.

Монослой клеточных культур получали в культуральных матрасах полезной площадью 25 см². Перед заражением ростовую среду удаляли, а монослой клеток однократно промывали раствором Хенкса.

Для заражения клеток HEp-2 вирусом парагриппа 3 типа или аденовирусом использовали множественность инфицирования (МИ), равную 0,1 или 0,01 ТЦД₅₀ / клетка соответственно.

Для оценки противовирусного действия препарата использовали две схемы инфицирования: «профилактическую» и «лечебную».

При профилактической схеме после удаления ростовой среды в матрасы с неинфицированными культурами клеток добавляли поддерживающую среду (ПС), содержащую пептид ZP2 в концентрациях 5, 20, 50 и 100 мкг/мл.

Через 3 часа экспозиции при комнатной температуре в культуральные матрасы добавляли по 5 мл культуральной жидкости, содержащей вирус парагриппа или аденовирус (вируссодержащая жидкость – ВСЖ) с множественностью инфицирования (МИ), равной 0,1 или 0,01 ТЦД₅₀/клетка, соответственно. Часть матрасов использовали для контроля инфекционной активности вирусов (контроль вируса), добавляя в инфицированные культуры клеток ПС, не содержащую анализируемый препарат – пептид ZP2.

При лечебной схеме после удаления ростовой среды в матрасы с неинфицированными культурами клеток добавляли по 5 мл культуральной жидкости, содержащей вирус парагриппа или аденовирус (ВСЖ) в дозе 0,1 или 0,01 ТЦД₅₀ / клетка, соответственно. После 1 часа контакта при комнатной температуре в инфицированные матрасы добавляли поддерживающую среду (ПС), не содержащую анализируемый препарат (*контроль вируса*) или содержащую пептид ZP2 в концентрациях 5, 20 50 и 100 мкг/мл.

Поддерживающую среду (ПС), содержащую пептид ZP2 в концентрациях 50 и 100 мкг/мл, также вносили в неинфицированные вирусами культуры клеток для определения возможного токсического действия препарата на клетки (*контроль препарата*).

При обеих схемах применения пептида ZP2 наблюдение за инфицированными культурами клеток проводили в течение 3-5 суток инкубации при $34,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ – до полной деструкции монослоя клеток в контрольных матрасах (*контроль вируса*). Возможное токсическое действие препарата на клетки оценивали путем ежедневной микроскопии неинфицированных клеточных культур (*контроль препарата*).

По окончании периода наблюдения образцы вирусосодержащей культуральной жидкости (ВСЖ) титровали для определения инфекционной активности вирусов в опытных и контрольных пробах. Для этого использовали микрометод титрования ВСЖ. По 0,1 мл суспензии клеток НЕр-2, приготовленной в посевной концентрации, помещали в лунки полистероловых планшетов, маркированных «для работы с культурой клеток». Через 24-48 часов формирования клеточного монослоя в лунки вносили ВСЖ в разведении от 1:10 до 1:1000000 с коэффициентом (шагом) 10 в ростовой среде и переносили по 0,1 мл каждого разведения в 4 лунки планшета. Шесть лунок оставляли в качестве контроля клеток, внося в них по 0,1 мл поддерживающей среды. Зараженные и контрольные клетки инкубировали в термостате с 5 % CO₂ в стационарном положении при

34,0±0,5°C. Учет результатов титрования проводили через 5 суток по наличию прямого цитопатогенного действия (ЦПД) вируса на клетки.

Активность вирусной репродукции оценивали по величине инфекционных титров, которые рассчитывали по «простому методу оценки пятидесяти процентов конечных точек» [158].

Все опыты проводились в 10 повторах.

Результаты оценки противовирусной активности препарата синтетического пептида ZP2 представлены в *таблице 30*.

Из данных, представленных в таблице, следует, что синтетический пептид ZP2 проявлял противовирусное действие, как в отношении аденовируса, так и вируса парагриппа 3 типа (ВПГЗ). Это действие оказалось значительно более выражено при внесении препарата за 3 часа до заражения клеток HEp-2 (профилактическая схема) и отмечалось при всех использованных концентрациях пептида ZP2.

Таблица 30 – Показатели инфекционной активности вирусов (в Ig ТЦД 50/0,1мл) в культуре клеток HEp-2 под действием разных концентраций препарата пептида ZP2 (n=10)

Вирус	Инфекционная активность вируса без препарата (контроль)	Инфекционная активность вируса (Ig ТЦД 50/0,1мл) в присутствии пептида ZP2 в разных концентрациях (мкг/мл)			
		5	20	50	100
Аденовирус (ДНК-вирус)	5,5±0,2	<i>Профилактическая схема</i>			
		3,7±0,1*	3,5±0,2*	2,5±0,2*	2,0±0,2*
		<i>Лечебная схема</i>			
		5,3±0,2	5,0±0,2	4,2±0,1*	3,5±0,1*
Вирус парагриппа 3 типа (РНК-вирус)	5,2±0,1	<i>Профилактическая схема</i>			
		3,4±1,5*	3,2±0,2*	3,0±0,2*	1,2±0,1*
		<i>Лечебная схема</i>			
		5,5±0,1	5,0±0,1	4,8±0,2*	3,0±0,2*

Примечание: *p<0,05 достоверность отличий в сравнении с контролем (культура клеток без препарата).

Максимальное снижение инфекционной активности аденовируса и ВПГ3, более чем на 3,5 и 4,0 lg, то есть в 3500 и 10000 раз соответственно, регистрировали при использовании пептида ZP2 в концентрации 100 мкг/мл. При использовании препарата в концентрации 50 мкг/мл инфекционные титры этих вирусов снижались на 3,0 и 2,2 lg, то есть в 1000 и 220 раз соответственно. При более низких концентрациях В диапазоне концентраций препарата 5 и 20 мкг/мл также отмечалось достоверное снижение инфекционной активности вирусов по отношению к контрольным образцам, но существенных различий в эффективности использования указанных концентраций пептида ZP2 не выявлено. При использовании лечебной схемы противовирусное действие синтетического пептида ZP2 проявлялось в меньшей степени: достоверное снижение инфекционной активности вирусов (в 100 и 10 раз) регистрировали только при применении высоких концентраций препарата – 100 и 50 мкг/мл соответственно.

В то же время в условиях данного эксперимента *in vitro* при ежедневной микроскопии не инфицированных образцов клеточной культуры не было выявлено токсического действия пептида ZP2 на клетки HEp-2.

В опытах *in vitro* установлена противовирусная активность синтетического пептида ZP2 в отношении двух вирусов-возбудителей ОРВИ: аденовируса (ДНК-вирус) и вируса парагриппа 3 типа (РНК-вирус). В ходе эксперимента выявлено преобладание «профилактического» действия препарата: при внесении пептида ZP2 в матрасы с культурой HEp2 за 3 часа до инфицирования клеток существенное снижение инфекционной активности как аденовируса, так и ВПГ3 регистрировали в диапазоне концентраций 100-5 мкг/мл; тогда как внесение препарата в образцы клеток после их инфицирования вирусами достоверно снижало их инфекционные титры только при применении высоких концентраций препарата (100 мкг/ мл и 50 мкг/ мл).

В целом, это говорит о многофакторном действии пептида (ZP2) на взаимодействие вирусов с инфицируемыми клетками с преобладанием

ингибирования начального этапа этого взаимодействия – уменьшение количества вирусных частиц, инфицирующих клетки-мишени.

Установленное существенное снижение инфекционной активности ВПГ 3 типа и аденовируса под действием пептида ZP2 при использовании «профилактической» (в концентрациях 5-100 мкг/мл) и «лечебной» (в концентрациях 50-100 мкг/мл) схем свидетельствует о возможной эффективности применения данного средства для профилактики и лечения ОРВИ.

В следующих экспериментах было проведено исследование вирулицидной активности пептида в отношении различных РНК и ДНК вирусов. Целью настоящего исследования явилась оценка вирулицидных свойств препарата ZP-2 в отношении панели РНК- и ДНК-геномных вирусов человека. В задачи работы входило исследование вирулицидной активности препарата в отношении вирусов гриппа, парагриппа, коронавируса ОС43, вирусов Коксаки В3 и ЕСНО30, аденовируса человека, вируса простого герпеса 1 типа и цитомегаловируса человека при предварительной инкубации препарата с вирусами, до внесения их в клетки перmissive линий.

Исследуемые препараты:

В работе использовали субстанцию синтетического пептида активного центра GM-CSF (ZP-2). В качестве препарата сравнения использовали 70 % этанол.

Вирусы и клетки:

В исследовании использовали следующие вирусы из коллекции вирусных штаммов НИИЭМ им. Пастера:

- аденовирус человека 5 типа;
- вирус Коксаки В3;
- вирус ЕСНО 30;
- вирус гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1);
- вирус парагриппа человека 3 типа;
- вирус простого герпеса 1 типа;

- коронавирус ОС43;
- цитомегаловирус человека

Вирусы накапливали в клетках перmissive линий: вирус гриппа – в клетках MDCK (ATCCCL-34), аденовирус, вирус ECHO 30, вирус простого герпеса, коронавирус и вирус Коксаки В3 – в клетках Vero (ATCCCL-81), вирус парагриппа – в клетках MA-104 (ATCCRL-2378), цитомегаловирус – в линии фибробластов легкого эмбриона человека (ATCCSRC-1041). В качестве экспериментального материала использовали бесклеточную культуральную жидкость, полученную после культивирования вирусов в перmissive линиях клеток.

Оценка цитопротективной активности ZP-2

Из препарата ZP-2 готовили серию трехкратных разведений от 600 до 7,4 мкг/мл на среде MEM. Разведения смешивали с вирусосодержащей жидкостью в соотношении 1:1 (конечная концентрация ZP-2 составила, таким образом, 300 – 3,7 мкг/мл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. По истечении этого срока в вирусосодержащей жидкости определяли инфекционную активность вируса по наличию вирусспецифического ЦПД, как описано далее. В каждой группе образцов использовали три параллели.

Титрование вирусов

Клетки соответствующей перmissive линии рассеивали в 96-луночный планшет в количестве 10^4 кл./лунку и объеме 100 мкл/лунку полной среды MEM. Инкубацию проводили в течение суток в CO_2 -инкубаторе при 37°C в 5 % атмосфере CO_2 до формирования монослоя. Непосредственно перед экспериментом клетки промывали средой MEM, дальнейшие манипуляции проводили в бессывороточной среде.

Из вирусосодержащего материала готовили серию десятикратных разведений на среде для культивирования клеток. Этими разведениями заражали клетки перmissive линии, рассеянные в 96-луночные планшеты.

На каждое разведение вируса использовали две параллели. Каждая аналитическая группа, таким образом, содержала 6 повторностей (3 повторности при инкубации вируса с препаратом и 2 повторности при титровании вируса). Планшеты инкубировали в атмосфере 5 % CO₂ при 36°С в течение 72-120 часов в зависимости от вируса. По окончании инкубации визуально оценивали наличие вирусспецифического ЦПД в лунках. За проявление цитопатогенного эффекта в случае вирусов гриппа, Коксаки В3, ЕСНО 30 и вируса парагриппа принимали разрушение клеток, проявляющееся появлением бляшек в монослое. Результат: в случае цитомегаловируса – значительное увеличение, округление клеток с последующим формированием синцитиев, вируса простого герпеса – округление клеток, образование фокусов клеточных агрегатов по типу «виноградных гроздьев» с последующим отсоединением клеток от субстрата и их гибелью, в случае аденовируса и коронавируса ОС43 – округление и разрушение клеток. За титр вируса принимали наибольшее разведение образцов, при котором отмечалось развитие вирусного ЦПД. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча (1) и выражали в логарифмах числа 50 % инфекционных доз (lgTCID₅₀).

Результаты оценки инфекционной активности вирусов после инкубации с изученным образцом суммированы в *таблице 31*.

Как следует из представленных результатов, анализируемый пептид при инкубации с внеклеточными вирионами оказывал вирулицидное действие в отношении всех использованных вирусов. В наибольшей степени инактивации были подвержены оболочечные РНК-геномные вирусы – вирус парагриппа и коронавирус ОС43 (степень подавления активности 2 и 1,5 lgTCID₅₀/0,2 мл соответственно). В то же время степень инактивации вируса гриппа составила лишь 0,8 lgTCID₅₀/0,2 мл, что может свидетельствовать об избирательности вирулицидного действия препарата даже в пределах оболочечных РНК-геномных вирусов. Безоболочечные РНК-геномные вирусы – ЕСНО30 и Коксаки В3 – инактивировались в меньшей степени,

снижая свою активность на $1,3 - 1,5 \lg\text{TCID}_{50}/0,2$ мл. ДНК-геномные вирусы были подвержены влиянию ZP-2 в наименьшей степени независимо от наличия или отсутствия оболочки. Так, степень инактивации вируса простого герпеса, аденовируса и цитомегаловируса составила $0,5; 1$ и $0,8 \lg\text{TCID}_{50}/0,2$ мл соответственно.

Следует отметить, что в подавляющем большинстве случаев оптимальными ингибирующими показателями ZP-2 обладал в малых концентрациях (11-33 мкг/мл).

В совокупности эти данные отражают универсальность механизма прямого противовирусного (вирулицидного) действия синтетического пептида ZP2, проявляющегося в отношении как вирусов бактерий (бактериофаги), так и ДНК- и РНК-содержащих вирусов человека. Все это дополняет его механизмы иммуотропной, антибактериальной и репарационной активности.

Таким образом, для синтетического пептида активного центра GM-CSF было доказано его прямое противовирусное действие на РНК- и ДНК-вирусы как *in vitro*, так и *in vivo*.

Таблица 31 – Вирулицидная активность препарата ZP-2 (7127)

Вирус	Титр вируса (lgTCID ₅₀ /0,2 mL) при концентрации пептида (мкг/мл) (n=6)						
	0 (КВ)	3,7	11	33	100	300	Этанол 70%
Грипп А	5,5±0,5	5,0±0,6	4,7±0,5*	5,2±0,4	5,5±0,5	5,5±0,5	0,0±0,0*
Коронавирус ОС43	4,5±0,5	3,5±0,5*	2,5±0,5*	2,5±0,5*	3,5±0,8*	4,5±0,5	0,0±0,0*
ВПГ-1	6,5±0,5	6,0±0,0	6,2±0,7	6,3±0,5	6,0±0,6	4,5±0,5*	0,0±0,0*
Вирус Коксаки В3	7,5±0,5	7,5±0,5	6,3±0,5*	6,0±0,6*	7,0±0,0*	7,5±0,5	0,0±0,0*
Вирус ЕСНО 30	7,5±0,5	7,2±0,4	6,7±0,5*	6,2±0,4*	6,5±0,5*	7,3±0,5	0,0±0,0*
Вирус парагриппа	5,5±0,5	4,5±0,5	4,0±0,6*	4,0±0,6*	4,5±0,5*	5,5±0,5	0,0±0,0*
Аденовирус	5,7±0,5	5,7±0,5	4,8±0,4*	4,7±0,5*	5,3±0,5	5,5±0,5	0,0±0,0*
Цитомегаловирус	4,7±0,5	4,0±0,6	3,8±0,4*	4,5±0,5	4,7±0,5	4,3±0,5	0,0±0,0*

Примечание: *значения, достоверно отличающиеся от контроля вируса (КВ) при p<0,05.

Дополнительные исследования влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на различные грамположительные и грамотрицательные бактерии

Санация внутренних органов и тканей организма, инфицированных патогенными и потенциально патогенными бактериями, обеспечивается различными механизмами и факторами антибактериального иммунитета. При инфекционных заболеваниях в элиминацию возбудителей из очага воспаления вовлекаются как физиологические процессы (мочевыделительная функция организма, эвакуация желчи в двенадцатиперстную кишку и иные способы биосекреции, слущивание ороговевшего эпителия с адгезированными на них бактериями и др.), так и компартменты гуморального и клеточного врожденного и адаптивного иммунитета (система комплемента, лизоцим, иммуноглобулины, тромбо- и лейкодефенсины, нейтрофилы, макрофаги и др.) [7, 31, 85]. Кроме того, при лечении инфекционно-воспалительных заболеваний для эрадикации патогенов используется обширный арсенал противомикробных средств – антибиотиков и химиотерапевтических препаратов с бактерицидным и бактериостатическим действием. Однако применение последних не всегда гарантирует ожидаемую терапевтическую эффективность из-за нарастающей распространенности и циркуляции (особенно активной – в стационарах) микроорганизмов, обладающих высокой устойчивостью к широкому спектру антимикробных средств – поли-антибиотикорезистентностью [6, 9, 20, 47, 48, 180, 203].

Эти обстоятельства заставляют вести интенсивный поиск новых высокоактивных антибактериальных препаратов, одним из перспективных направлений которого служит синтез соединений – аналогов эндогенных пептидов макроорганизма, участвующих в его противоиной защите [47, 56, 200, 205]. Относительно самостоятельными современным направлением таких исследований является разработка антибактериальных препаратов на основе некоторых цитокинов, в частности, интерлейкина-26

(IL-26), интерферона бета (IFN β) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) [48, 77, 79, 123]. Так, зарубежными исследователями [123] было обнаружено, что интерлейкин-26 (IL-26), преимущественно продуцируемый особым типом Т-хелперных клонов лимфоцитов (Th17), представляющий собой катионный амфипатический белок, может вызывать гибель и подавлять рост *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), некоторых штаммов *Escherichia coli* (O1: K1: H7, O18: K1: H7, O111: B4, O111: K58: H2) и *Klebsiella pneumoniae* (O1: K2), но не *Enterococcus faecalis* и *Candida albicans*. Причем, эффективная его концентрация в отношении *E. coli* была в 2,5 раза выше, чем в опытах с золотистым стафилококком [77, 123]. В 2017 г. нашим научным коллективом под руководством д.м.н., профессора Зурочки А.В. было доказано наличие у IFN β антимикробной (причем, не только противовирусной, но и антибактериальной) активности. Нами было экспериментально показано, что человеческий и мышинный IFN β способны ингибировать рост и непосредственно убивать стафилококки (*S. aureus* и *S. epidermidis*), но не *E. coli*. В ряде наших работ экспериментально показано, что синтетический пептид активного центра GM-CSF – ZP2 проявляет антибактериальное действие, ингибируя рост стафилококков, энтеробактерий и псевдомонад. Вместе с тем остается открытым вопрос о бактерицидной активности синтетического пептида ZP2 (СП ZP2) в отношении микроорганизмов, в частности, грамотрицательных бактерий разной видовой принадлежности. Острота этого вопроса, с одной стороны, связана с тем, что данные микроорганизмы, а именно, энтеробактерии (клебсиеллы, эшерихии и др.), псевдомонады и ацинетобактеры, являются приоритетными возбудителями многих неспецифических инфекционно-воспалительных заболеваний эндогенной природы, в том числе нозокомиальных инфекций и послеоперационных осложнений при хирургических вмешательствах у больных с гинекологической и гнойно-воспалительной патологией [7]. С другой стороны, острота вопроса обусловлена высокой резистентностью

(естественной или приобретенной) указанных патогенов к используемым в клинической практике антимикробным препаратам (даже к резервным карбапенемам) [6, 9, 48, 180], что заставило Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ) отнести их в разряд «критических» инфекционных агентов, против которых необходима срочная разработка новых эффективных лекарственных средств [200].

Следующим этапом исследования было проведение сравнительного анализа бактерицидной активности синтетического пептида ZP2 в отношении музейных штаммов и клинических изолятов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*.

В работе были использованы музейные штаммы *E. coli* (ATCC 25922) и *P. aeruginosa* ATCC 27853, а также 104 клинических изолята энтеробактерий, включая *E. coli* (n = 22) и *K. pneumoniae* (n = 82), и 98 клинических изолятов неферментирующих грамотрицательных бактерий, в том числе *P. aeruginosa* (n = 43) и *A. baumannii* (n = 55), выделенных от больных с различной гинекологической и хирургической патологией. Выделение и видовую идентификацию бактерий проводили общепринятыми методами с использованием официальных биохимических наборов компании Erba Lachema s.r.o. (ЕС, Чехия) и на микробиологическом анализаторе VITEK 2 Compact (Biomerieux, Франция) [10]. Бактерицидное действие синтетического пептида ZP2 (СП ZP2) в отношении оцениваемых штаммов бактерий осуществляли по методике Бухарина О.В. и соавт. [31] в следующем порядке: на изотоническом растворе NaCl готовили взвеси суточных агаровых культур бактерий (5×10^8 КОЕ/мл); по 25 мкл взвесей инокулировали в ячейки пластикового 96-луночного стерильного планшета; в опыте – к взвесям добавляли по 25 мкл раствора СП ZP2 на дистиллированной воде (концентрация 20 мкг/мл; т.е. его конечная/действующая концентрация составляла 10 мкг/мл), в контроле – вместо раствора СП ZP2 вносили 25 мкл дистиллированной воды; смеси выдерживали в течение 20 мин при 37°C, а затем во все ячейки добавляли

200 мкл мясопептонного бульона; планшета помещалась на 4 часа в термостат при 37°C, после чего с помощью фотометра Multiscan Ascent (Thermo Electron, Финляндия) на длине волны $\lambda = 492$ нм замерялась оптическая плотность (OD) бактериальных культур в ячейках.

Каждый вариант опыта и контроля делался в трех повторностях с вычислением средних значений OD. Для оценки действия СП ZP2 на исследуемые бактерии высчитывали Индекс бактерицидной активности (ИБА, %) по формуле:

$$\text{ИБА} = (\text{OD}_k - \text{OD}_o) / \text{OD}_k \times 100 \%, \quad (1)$$

где OD_k и OD_o – оптические плотности контрольной и опытной культур соответственно.

Чувствительными считались штаммы при ИБА > 10 %. Если оптическая плотность опытной культуры превышала оптическую плотность контрольной культуры ($\text{OD}_o > \text{OD}_k$), то рассчитывался Индекс стимуляции (ИС, %) по формуле:

$$\text{ИС} = \text{OD}_o / \text{OD}_k \times 100 \%, \quad (2)$$

где OD_k и OD_o – оптические плотности контрольной и опытной культур соответственно.

Стимулирующий эффект СП ZP2 регистрировали при ИС > 10 %. Если значения ИБА и ИС не превышали 10 %, то штаммы бактерий относили к группе устойчивых культур, но индифферентно реагирующих на пептид ZP2. В экспериментах *in vitro* установлено, что синтетический пептид ZP2 (СП ZP2) в конечной концентрации 10 мкг/мл проявлял выраженное бактерицидное действие в отношении грамотрицательных бактерий разной таксономической принадлежности (таблица 32).

Таблица 32 – Параметры чувствительности музейных и клинических штаммов грамотрицательных бактерий разной видовой принадлежности к бактерицидному действию синтетического пептида ZP2 (концентрация – 10 мкг/мл)

Изученные штаммы бактерий	Штаммы, чувствительные к синтетическому пептиду ZP2			Штаммы, резистентные к синтетическому пептиду ZP2		
	Доля штаммов, чувствительных к пептиду ZP2 (%)	Диапазон ИБА (min-max, %)	Среднее значение ИБА (%)	Доля штаммов, индифферентных к пептиду ZP2 (%)	Доля штаммов со стимуляцией (%)	Среднее значение ИС (%)
Тест-штамм <i>E. coli</i> (ATCC 25922)		3,4-69,7	65,7±2,0			
Тест-штамм <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)		53,8-61,0	56,4±2,3			
Клинические штаммы <i>E. coli</i> (n = 22)	95,5±4,5	45,8-98,9	77,6±3,5	-	4,5±4,5	55,1±2,9
Клинические штаммы <i>K. pneumoniae</i> (n = 82)	97,6±1,7	42,1-99,8	82,8±1,6	1,2±1,2	1,2±1,2	47,8±2,3
Клинические штаммы <i>P. aeruginosa</i> (n = 43)	97,7±2,3	24,4-93,4	74,0±2,3 ^{1,2}	2,3±2,3	-	-
Клинические штаммы <i>A. baumannii</i> (n = 55)	98,2±1,8	44,8-98,8	84,3±1,7	1,8±1,8	-	-

Примечание: достоверные отличия показателей ($p < 0,05$) в сравнении: 1 – с *K. pneumoniae*; 2 – с *A. baumannii*.

На это, в первую очередь, указывали показатели чувствительности к СП ZP2 эталонных штаммов *E. coli* (ATCC 25922) и *P. aeruginosa* (ATCC 27853), средние значения ИБА которых составили 65,7±2,0 и 56,4±2,3 %

соответственно. Кроме того, СП ZP2 оказывал бактерицидное действие на значительную долю (95,5-98,2 %) исследованных клинических изолятов бактерий вне зависимости от их видовой принадлежности. Вместе с тем, следует отметить, что клинические штаммы микроорганизмов характеризовались внутривидовым разнообразием по своей чувствительности к бактерицидному действию СП ZP2, о чем свидетельствовали широкие диапазоны варьирования Индексов бактерицидной активности (ИБА, %), СП ZP2 во всех выборках проанализированных изолятов бактерий. Так, значения ИБА клинических штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* колебались в диапазонах 45,8-98,9 и 42,1-99,8 %, соответственно, а клинических изолятов *P. aeruginosa* и *A. baumannii* – 24,4-93,4 и 44,8-98,8 %, соответственно. Вместе с тем, при проведении сравнительного анализа средних значений ИБА клинических штаммов грамотрицательных бактерий разной видовой принадлежности установлено, что более высокую чувствительность к бактерицидному действию СП ZP2 проявляли изоляты *K. pneumoniae* и *A. baumannii* (ИБА – $82,8 \pm 1,6$ и $84,3 \pm 1,7$ %, соответственно), а менее высокую – штаммы *E. coli* и *P. aeruginosa* (ИБА – $77,6 \pm 3,5$ и $74,0 \pm 2,3$ % соответственно), хотя достоверные межгрупповые отличия по этому показателю регистрировались только в выборке псевдомонад при их сравнении с клебсиеллами и ацинетобактерами.

Таким образом, по средним значениям ИБА СП ZP2 проанализированные грамотрицательные бактерии можно ранжировать в порядке повышения их чувствительности к данному пептиду в следующий ряд: *P. aeruginosa* – *E. coli* – *K. pneumoniae* – *A. baumannii*. Кроме того, следует подчеркнуть, что среди проанализированных клинических изолятов энтеробактерий, псевдомонад и ацинетобактеров имелась очень незначительная доля (1,8-4,5 %) штаммов, отличающихся резистентностью к бактерицидному действию СП ZP2, а стимуляция бактериального роста после контакта с СП ZP2 наблюдалась только у энтеробактерий – по 1 штамму среди клебсиелл и эшерихий, уровень которой составил $47,8 \pm 2,3$ и

55,1±2,9 % от контроля. Выявленный феномен стимуляции роста бактерий при действии СП ZP2 требует специального анализа, хотя, вероятно, он встречается не часто. Представленные экспериментальные данные по сравнительному анализу бактерицидного действия синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на грамотрицательные микроорганизмы разной видовой принадлежности интересны как в теоретическом, так и практическом отношении. Во-первых, они подтверждают тезис о наличии у цитокинов (возможно, не у всех) бивалентной иммунобиологической активности, сочетающей в себе иммуномодулирующую (регуляторную) и антимикробную направленность. Вполне возможно, что в ближайшее время к GM-CSF, IL-26, IFN β и некоторым хемокинам (киноцидинам) присоединятся и другие цитокины с функциональной бивалентностью и, в первую очередь, те из них, в молекулярной структуре которых имеются α -спиральные пептидные участки с катионными и амфипатическими свойствами. Причем, антимикробные эффекты таких цитокинов могут быть обусловлены не только (или не столько) цельной молекулой иммуномедиатора, но и отдельными ее пептидными компонентами, образующимися при ферментативной деградации цитокина, как, например, это происходит при расщеплении под действием сериновых протеаз кателицидина с выделением антимикробного пептида из 37 аминокислотных остатков (LL-37) [48, 79]. По крайней мере, о таком сценарии свидетельствуют полученные данные по оценке антибактериальной активности IFN β , которую связывают с отдельными частями его молекулярной структуры (особенно пептидной спиралью 4), которые характеризовались катионными и амфипатическими свойствами, аналогичными α -спиральным известным катионным антимикробным пептидам, поскольку *de novo* синтезированный пептид указанной спирали 4 обладал антибактериальным эффектом, тождественным действию такого антимикробного пептида, как LL-37 [48, 79]. Авторы относят IFN β (на наш взгляд, в значительной степени условно) к семейству α - и β -киноцидинов, многие из которых, действительно являясь хемокинами

(СХС- и СС-типов) с присущей им иммуностропной активностью, формируют большую группу тромбоцитарных белков, параллельно выполняющих микробицидную функцию [35, 77, 205]. Таким образом, некоторые (или многие) цитокины, кроме своей регуляторной (иммуномодулирующей) функции, способны, во-первых, оказывать прямое антибактериальное действие на различные патогены в условиях *in vitro* и *in vivo*. Во-вторых, эти результаты демонстрируют возможность использования синтетического пептида ZP в качестве основы для создания новых высокоэффективных антимикробных лекарственных средств, в которых так нуждается клиническая медицина, ежедневно сталкивающаяся с проблемой устойчивости возбудителей к применяемым препаратам. Важно отметить, что синтетический пептид ZP способен не только ингибировать рост грамотрицательных бактерий, но и оказывать на них прямое бактерицидное действие. Учитывая, что синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора – ZP2, кроме антибактериальной активности, обладает иммуномодулирующими и репарационными эффектами, созданное на его основе косметическое средство «АЦЕГРАМ» может быть рекомендовано для местного лечения гнойно-некротических процессов (например, при синдроме диабетической стопы), а также для профилактики послеоперационных инфекционных осложнений в хирургии и гинекологии, нередко инициируемых энтеробактериями, псевдомонадами и ацинетобактерами. Учитывая, что у постковидных пациентов кроме обострения хронических вирусных инфекций, также могут обостряться и бактериальные инфекции, вызванные грамотрицательными или грамположительными бактериями, применение синтетического пептида активного центра GM-CSF, может дополнительно повлиять не только на иммунную систему пациентов, но и помочь при лечении обострений, вызванных персистирующими вирусами и бактериями. Все эти данные позволили нам применить синтетический пептид активного

центра GM-CSF для иммунокоррекции выявленных нарушений у пациентов с «постковидным синдромом» иммунодефицита.

5.3 – Оценка влияния синтетического пептида активного центра GM-CSF на иммунную систему постковидных пациентов, имеющих снижение параметров иммунной системы

Результаты исследований показали, что местное применение на слизистых синтетического пептида активного центра GM-CSF (Ацеграм-спрей) достоверно влияет преимущественно на функциональную бактерицидную активность нейтрофилов, увеличивает процент Т-хелперов и С3а фрагмент комплемента (таблица 33). Остальные показатели иммунной системы не имели достоверных отличий.

Таблица 33 – Показатели иммунной системы до и после применения синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ у постковидных пациентов

Показатели клеток иммунной системы	Группа 1. Постковидные пациенты до лечения пептидом, n=21, M±m	Группа 2. Постковидные пациенты после лечения пептидом, n=21, M±m
НСТ нейтрофилов спонтанная активность, отн. (%)	14,6±2,7	22,3±2,7 p<0,01
НСТ нейтрофилов спонтанная интенсивность, усл. ед.	0,2±0,1	0,33±0,04 p<0,02
НСТ нейтрофилов индуцированная активность, отн. (%)	40,4±4,0	55,75±3,77 p<0,01
НСТ нейтрофилов индуцированная интенсивность, усл. ед.	0,5±0,1	0,7±0,1 p<0,05
Т-хелперы (CD45+CD3+CD4+) отн. (%)	41,5±2,0	47,6±2,3 p<0,03
С3а фрагмент комплемента усл. ед.	104,3±3,8	128,0±5,3 p<0,001

Согласно полученным данным, синтетический пептид активного центра GM-CSF влиял преимущественно на активность бактерицидной

системы нейтрофилов (уровни спонтанной и индуцированной НСТ). При этом также увеличивалось число Т-хелперов и активность классического пути активации комплемента (С3а). Все это свидетельствует о том, что пептид, в основном, действует на врожденные факторы иммунной системы, в то же время, скорее всего, через их активацию влияет и на Т-клеточное звено иммунной системы у постковидных пациентов. Отсутствие влияния на другие компартменты иммунной системы говорит о том, что формирование подходов к терапии постковидных пациентов с нарушением иммунной системы требует поиска дополнительных иммуномодуляторов, влияющих в том числе и на Т-, В- и NK-клетки. Все это, конечно же, требует дополнительных исследований в данном направлении.

Полученные данные позволили сделать следующие выводы:

1. Применение местно на слизистые оболочки (носоглотка) человека синтетического пептида активного центра GM-CSF стимулирует спонтанную и индуцированную НСТ-активность нейтрофилов, С3а- фрагмента комплемента, Т-хелперы.

2. Для восстановления других компартментов иммунной системы требуется дополнительные исследования различных иммуномодуляторов на состояние иммунной системы постковидных пациентов.

5.4 – Оценка эффективности применения глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) у постковидных пациентов

Как было представлено в главе 4, после перенесенной SARS-CoV-2-инфекции у части пациентов формируется через 6-12 месяцев постковидный синдром, сопровождающийся развитием различных нарушений в иммунной системе. Данные исследования показывают, что у пациентов с «постковидным синдромом» выявляются нарушения всех звеньев иммунной системы: Т-, В-, NK- клеток, фагоцитов, комплемента (снижение экспрессии CD46 рецептора и нарушение активности различных фрагментов комплемента), так как развитие острого процесса SARS-CoV-2 инфекции

сопровождается повреждением как гуморального, так и клеточного звена иммунной системы. Все это приводит к необходимости разработки подходов к иммунокоррекции нарушений иммунной системы, отмечающиеся у постковидных пациентов. Одним из таких подходов является применение глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП), успешно применявшегося при различных патологических состояниях, в том числе при патологиях, связанных с нарушениями в иммунной системе человека при вирусных инфекциях [4, 22, 24, 25].

Исследований, посвященных иммунокоррекции нарушений иммунной системы у постковидных пациентов глюкозаминилмурамилдипептидом, на сегодняшний день не проводилось.

Однако получение фундаментальных знаний о иммунокоррекции у постковидных пациентов являются крайне востребованными, так как могут позволить разработать новые подходы к лечению и реабилитации больных, в том числе и при иных вирусных (в том числе и сезонных) заболеваниях.

Таким образом, учитывая роль иммунной системы в формировании нарушений у постковидных пациентов, мы проанализировали возможность применения у таких больных глюкозаминилмурамилдипептида.

Следующим этапом исследования была оценка влияния глюкозаминилмурамилдипептида на состояние иммунной системы пациентов с «постковидным синдромом» иммунопатологии.

Было обследовано 24 пациента, перенесших SARS-CoV-2 инфекцию.

Пациенты были разделены на 2 группы сравнения по гейтированию панлейкоцитарными маркерами: 1) Пациенты с «постковидным синдромом» нарушений иммунной системы до применения ГМДП (n=24). 2). Пациенты с «постковидным синдромом» нарушений иммунной системы после применения ГМДП (n=24). Дополнительным критерием для лечения были нарушения фагоцитарного звена иммунитета, как одно из наиболее часто встречающихся повреждений иммунной системы у таких больных на фоне повреждения других компартментов иммунной системы, ранее

представленное в главе 4. ГМДП применялся по стандартной схеме 2 раза в день в течение 10 дней дозе 10 мг перорально (суточная доза 20 мг, за весь курс 200 мг). Схема лечения применялась ранее у больных с герпетическими инфекциями. Повторное исследование иммунной системы проводили через месяц после применения ГМДП.

Таблица 34 – Показатели иммунной системы, параметров тромбоцитов и эритроцитов до и после применения глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) у постковидных пациентов

Показатели клеток иммунной системы	Группа 1. Постковидные пациенты до лечения ГМДП, n=24, M±m	Группа 2. Постковидные пациенты после лечения ГМДП, n=24, M±m
НСТ нейтрофилов спонтанная активность, отн. (%)	21,8±2,7	14,8±1,4 p<0,03
НСТ нейтрофилов спонтанная интенсивность, усл. ед.	0,34±0,05	0,21±0,02 p<0,02
С5а фрагмент комплемента, усл. ед.	24,9±3,2	18,1±2,5 p<0,03
В-лимфоциты не клетки памяти общие с фенотипом (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD27 ⁻), отн (%)	6,3±0,8	9,2±1,1 p<0,02
В-лимфоциты не клетки памяти с фенотипом (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD27 ⁻) отн (%)	4,6±0,8	6,7±0,7 p<0,03
Иммуноглобулины класса G к вирусу SARS-CoV-2 (Covid-19), коэффициент позитивности	15,7±1,5	19,4±1,0 p<0,03
Ширина распределения клеток красной крови, усл. ед.	15,1±0,2	13,7±0,3 p<0,002
Тромбоцитокрит, усл. ед.	0,18±0,01	0,16±0,01 p<0,03
Средний объем тромбоцита, усл. ед.	8,2±0,2	7,6±0,2 p<0,03

Результаты исследований показали, что применение глюкозаминилмурамилдипептида достоверно влияло на функциональную бактерицидную активность нейтрофилов, снижая спонтанную их НСТ-

активность, увеличивало процент В-плазматических клеток, преимущественно за счет В-лимфоцитов не клеток памяти фракции CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁻CD27⁻, также отмечается рост специфических IgG к вирусу SARS-CoV-2, снижалась активность C5a фрагмента комплемента. Кроме того, нормализовались и показатели эритроидного и тромбоцитарного ростков кроветворения (*таблица 34*). Остальные показатели иммунной системы не имели достоверных отличий.

Согласно полученным данным, глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП) влиял на активность бактерицидной системы нейтрофилов (снижая уровни спонтанной НСТ-реакции). При этом увеличивал процент В-плазматических клеток, преимущественно за счет В-лимфоцитов не клеток памяти с фенотипом (CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁻CD27⁻), сопровождающийся ростом специфических IgG к вирусу SARS-CoV-2, снижал активность C5a фрагмента комплемента. Все это свидетельствует о том, что ГМДП нормализует не только факторы врожденного иммунитета (фагоцитов и комплемента), но и стимулирует гуморальный иммунный ответ, в том числе и специфический. Последний факт, возможно, связан с тем, что ГМДП в данной ситуации может уменьшать программированную гибель активированных В-лимфоцитов, тем самым усиливая (сохраняя) их ответ на иммунную систему, измененную под действием вируса SARS-CoV-2, но данный вопрос требует более тщательного исследования. Что очень важно, он нормализует показатели именно плазматических клеток вторичного иммунного ответа, а значит, влияет позитивно на их дифференцировку с IgM на IgG ответ (а такой фенотип нарушения был нами описан в предыдущих главах диссертационного исследования). Очень важным является и факт его влияния на эритроидный и тромбоцитарный ростки кроветворения, так как это способствует улучшению оксигенации органов и тканей и снижает риск развития тромбоцитарных осложнений. Отсутствие влияния на Т- и NK-звенья иммунной системы свидетельствует о сложных механизмах регуляции иммунной системы у постковидных пациентов и важности поисков новых

подходов к коррекции этих нарушений. Все это требует поиска дополнительных иммуномодуляторов, влияющих в том числе и на Т- и НК-клетки. Поиск таких препаратов является одной из ключевых проблем для данного вида патологии.

Таким образом, помимо характеристики вариантов нарушений иммунной системы постковидных пациентов, нами был разработан подход к коррекции этих нарушений, позволяющий восстанавливать функции фагоцитов, Т- и В-лимфоцитов.

Резюмируя полученные данные, можно сделать следующие выводы:

1. Применение активного центра GM-CSF приводит к стимуляции спонтанной и индуцированной НСТ-активности фагоцитов, росту Т-хелперов и С3а фрагмента комплемента, что способствует улучшению состояния пациентов, у которых снижены показатели фагоцитоза, Т-хелперного звена лимфоцитов и уровня комплемента.

2. Применение ГМДП приводит к снижению НСТ-активности у лиц с повышенным уровнем НСТ-активности фагоцитов, восстанавливает В-клеточное звено иммунной системы за счет восстановления В2-клеток и улучшает раннюю активацию Т-лимфоцитов, что свидетельствует о том, что ГМДП может применяться у пациентов с нарушением как врожденного, так и приобретенного звена иммунитета (фагоциты, Т- и В-клетки). Кроме того, от выбора препарата зависит восстановление нарушенных функции других компартментов системы крови (тромбоцитарный и эритроцитарный ростки).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ 5 ГЛАВЫ

Публикации, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и/или индексируемых в международных базах данных WoS, Scopus, RSCI, PubMed

1. Иммунобиологические свойства гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и синтетических пептидов его активного центра / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, **М.А. Добрынина**, В.А. Гриценко // Медицинская иммунология. – 2021. - Т. 23, № 5. - С. 1033-1056. doi: 10.15789/1563-0625-IP0-2216.

2. Иммунобиологические свойства синтетических аналогов гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, **М.А. Добрынина**, Л.О. Фомина, О.И. Забков, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. - 2019. - Т.13 (22), № 2. - С.778-780. DOI: 10.31857/S102872210006701-6.

3. Спектр иммунобиологической активности и потенциал практического применения синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, **М.А. Добрынина**, В.В. Дукардт, О.И. Забков, Е.Б. Зуева, Л.О. Фомина, А.И. Файзуллина, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. - 2019. – Т. 12, № 4. – С. 665-669.

4. Иммунологические критерии эффективности комплексной этиопатогенетической терапии у больных хронической вирусной инфекцией, ассоциированной с вирусом Эпштейна–Барр / В.А. Зурочка, О.И. Забков, **М.А. Добрынина**, В.А. Гриценко, Е.В. Давыдова, А.В. Чукичев, Н.А. Забокрицкий, А.П. Сарапульцев, А.В. Зурочка // Инфекция и иммунитет. - 2020. - Т.10, № 2. – С.338-346. DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-CDC-1141>.

5. Сравнительный анализ бактерицидных свойств синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 в отношении грамотрицательных бактерий разной таксономической принадлежности / В.А. Гриценко, Я.В. Тяпаева, **М.А. Добрынина**, А.В. Зурочка // Российский иммунологический журнал. – 2021. - Т. 24, № 2. – С. 221-228. doi: 10.46235/1028-7221-1016-CAO.

6. Формирование подходов к иммунокоррекции нарушений иммунной системы у постковидных пациентов / **М.А. Добрынина**, Зурочка А.В., В.А. Зурочка, Л.В. Рябова, А.П. Сарапульцев // Российский иммунологический журнал. – 2023. – Т. 26, № 4. – С. 641-646. DOI: 10.46235/1028-7221-13492-ATC

Монография

7. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и его синтетические аналоги: Иммунологические эффекты и клиническое применение: монография / А.В. Зурочка, В.А. Гриценко, В.А. Зурочка, **М.А. Добрынина**, В.А. Черешнев. – Екатеринбург: УрО РАН, 2021. - 288 с. ISBN 978-5-7691-2549-2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования последних лет значительно расширили наше понимание SARS-CoV-2-инфекции, очертив глубокие и характерные для заболевания изменения в компартментах врожденного и адаптивного иммунитета. Лимфопения и измененная функция лимфоцитов у больных COVID-19 коррелируют с тяжестью заболевания, что указывает на ключевую роль Т- и В-клеток в патологии.

Учитывая длительную и глубокую иммунную дисрегуляцию, наблюдаемую во время острой инфекции SARS-CoV2, существует острая необходимость определить, переходят ли эти изменения в долгосрочные иммунные изменения и последующую дисфункцию у выздоравливающих людей. В то же время, именно долгосрочные последствия инфекции SARS-CoV-2 остаются недостаточно изученными и проанализированными. Данные диссертационной работы свидетельствуют о том, что у пациентов с COVID-19 определяются значительные и долгосрочные изменения в популяциях Т-клеток и ключевых событиях, связанных с патогенезом COVID-19. Так, согласно мнению ряда исследователей, в частности, Глазановой Т.В., Шиловой Е.Р. (2022), Федорова В.С. с соавт. (2021), Канорского С.Г. (2021) специфические нейтрализующие антитела против SARS-CoV-2 и ответы Т-клеток сохраняются и через 12 месяцев после первоначального заражения [5, 11], кроме того, у части больных может наблюдаться широкий спектр соматических и психических симптомов, включающих хроническую усталость, миалгию, нарушения памяти и эмоционального состояния, а также признаки фиброзных поражений легких и заболеваний легочных сосудов [13]. Все это послужило цели настоящего исследования – оценке параметров иммунной системы у пациентов, перенесших SARS-CoV-2 инфекцию.

Анализ клинической картины постковидного синдрома и формирующих его симптомокомплексов показал взаимосвязь тяжести течения COVID-19 в остром периоде заболевания с выраженностью клинических проявлений самого постковидного синдрома впоследствии. Так, при оценке учащения обострений аутоиммунных заболеваний в постковидный период достоверные различия были получены между группами КТ0 и КТ1-2, а также КТ0 и КТ3-4 – частота обострений ревматоидного артрита в постковидном периоде достоверно выше в группе с поражением легких менее 50 % в острый период COVID-19 по сравнению с группой пациентов без поражения легких, тогда как частота обострений аутоиммунного тиреоидита достоверно выше у пациентов без поражения легких в остром периоде COVID-19 в сравнении с остальными группами. Таким образом, выраженность аутоиммунных нарушений в постковидном периоде напрямую не связаны с тяжестью течения заболевания, а в большей степени связаны с базисной терапией кортикостероидами как для лечения аутоиммунных процессов, так и для лечения COVID-19. Если при аутоиммунном тиреоидите ГКС не применяются, то применение их в острый период инфекции снизило в последующем количество рецидивов. Тогда как при ревматоидном артрите ситуация обратная – применение ГКС в острый период инфекции у пациентов, уже находящихся на базисной кортикостероидной терапии, приводит в последующем к увеличению числа рецидивов у постковидных пациентов. Возможно, дополнительная терапия кортикостероидами таких пациентов была недостаточно обоснована.

При оценке влияния степени поражения легких в острый период инфекции COVID-19 на учащение обострений аллергических заболеваний в постковидном периоде зависимости выявлено не было. Однако при этом у постковидных пациентов выявлено учащение наиболее клинически тяжелой аллергопатологии – в среднем, во всех группах у 52 % в постковидных период участились обострения таких патологий как отек Квинке, крапивницы, анафилаксии, васкулитов, альвеолитов, бронхиолитов. Всё это

свидетельствует о том, что на ухудшение состояния данных пациентов в постковидном периоде повлияла перенесенная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2. На втором месте по частоте обострений находятся аллергические поражения кожи – около 28 %.

Частота обострений пролиферативных заболеваний не показывает достоверных различий между группами пациентов в зависимости от степени поражения легких в острый период инфекции, но имеется тенденция к увеличению частоты обострений у пациентов с более тяжелыми формами острой инфекции COVID-19. Хотелось бы также отметить, что процент таких пациентов достаточно высок – от 31,6 % до 48 %. Эти данные дополнительно свидетельствуют о том, что у постковидных пациентов развивается полиорганная патология.

Частота обострений заболеваний сердечно-сосудистой системы в постковидном периоде достоверно выше в группах с поражением легких в острый период COVID-19 по сравнению с группой пациентов без поражения легких. Эти данные говорят о том, что поражения сердечно-сосудистой системы напрямую связаны с тяжестью течения COVID-19 и выявляются наиболее часто (68 %) у постковидных пациентов, перенесших тяжелую коронавирусную инфекцию.

Частота нарушений обмена глюкозы, в том числе и впервые выявленных, достоверно возрастает в постковидный период у пациентов с поражением легких в острый период инфекции, тогда как заболевания щитовидной железы, за исключением аутоиммунного тиреоидита, достоверных различий не продемонстрировали. Возможно, эти нарушения также связаны, с одной стороны, с применением кортикостероидной терапии в острый период коронавирусной инфекции, а с другой стороны, с нарушением работы регуляторных механизмов эндокринной и иммунной систем под воздействием вируса SARS-CoV-2.

Частота обострений заболеваний печени и желчевыводящих путей значимо выросла у постковидных пациентов с поражением легких в

сравнении с пациентами без поражения легких, что, вероятно, связано как с воздействием коронавируса, так и с более интенсивной химиотерапией в острый период коронавирусной инфекции. Также наблюдается тенденция к учащению обострений хронических заболеваний ЖКТ у пациентов с наиболее тяжелой формой заболевания COVID-19 в остром периоде.

Опрос пациентов показал, что усталость при физической нагрузке, повышенная утомляемость и снижение работоспособности возросли у постковидных пациентов с поражением легких по сравнению с КТ0, но в то же время было отмечено, что и ряд других показателей имеет тенденцию к увеличению у пациентов с поражением легких более 50 % (снижение концентрации внимания, замедленность речи и движения, заметные окружающим).

Также опрос переболевших COVID-19 показал, что у пациентов с поражением легких достоверно учащаются боли в груди и одышка в сравнении с пациентами без поражения легких, что, скорее всего, в большей степени связано с поражением не столько нервной системы, сколько с поражением сердечно-сосудистой системы и легких.

Таким образом, клиническая картина постковидного синдрома наблюдается у пациентов вне зависимости от наличия или отсутствия поражения легких по типу "матового стекла" по данным компьютерной томографии в остром периоде заболевания, характеризуется выраженным разнообразием формирования полиорганной соматической патологии, как впервые выявленной, так и проявляющейся в учащении обострений хронических заболеваний, а степень выраженности постковидного синдрома напрямую связана с тяжестью течения острого заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2 и, вероятно, более высокой вирусной нагрузкой.

Кроме соматической патологии у постковидных пациентов выявляется и инфекционный симптомокомплекс.

По данным МКБ-10 и МКБ-11 [17, 18] соматические и инфекционные заболевания имеют, в том числе, патогенетически значимые механизмы

нарушений иммунной системы, как и COVID-19, в основе тяжелых форм которого также лежит повреждение иммунной системы. В связи с этим, была проведена оценка иммунного статуса пациентов, вошедших в это клиническое исследование.

Прежде, чем приступить к оценке иммунного статуса постковидных пациентов, мы провели биоинформационное исследование одного из новых предполагаемых механизмов взаимодействия вируса SARS-CoV-2 с панлейкоцитарным рецептором клеток иммунной системы CD46, актуальность исследования которого была описана в главе 2. Мембранный ко-факторный белок CD46 через стимуляцию Т-лимфоцитов вызывает подавление иммунного ответа, продуцируя интерлейкин 10. CD46 также называют “магнитом для патогенов”, поскольку он является рецептором для 11 известных патогенов [115]. Связываясь с CD46, эти патогены порождают выработку цитотоксических Т-клеток.

Таким образом, одним из весьма вероятных возможных путей развития осложнений SARS-CoV-2 в форме цитокинового шторма является взаимодействие вируса SARS-CoV-2 с мембранным ко-факторным белком CD46 человека, что открывает новое направление поиска средств лечения тяжелых форм SARS-CoV-2 инфекции.

Полученные биоинформационными методами результаты выявили взаимодействие антигенов вируса SARS-CoV-2 с панлейкоцитарным рецептором CD46: вирус SARS-CoV-2 может проникать в клетки с помощью S1 вирусного шипового (S) белка не только через связывание с ACE2, но и через другие рецепторы клеток, и как показано в диссертационной работе, к таким кандидатным рецепторам относится CD46, который также, как и CD45, относится к панлейкоцитарным рецепторам и экспрессируется на всех видах лейкоцитов. В свою очередь, SARS-CoV-2-инфекция сопровождается повреждением практически всех компартментов иммунной системы и в первую очередь Т-лимфоцитов [81, 151].

Из работ зарубежных исследователей известно, что при дефиците CD46 или его лиганда (C3/C3b) отмечается нарушение Th1-ответа и увеличивается риск рецидивирующих инфекций [186], в то время как нарушения со стороны Т-клеточного ответа отмечаются как в ходе самого заболевания [81], так и спустя длительные промежутки времени после клинического выздоровления [151].

Центральная гипотеза настоящего исследования заключалась в том, что при неспецифическом встраивании в липидную мембрану клетки человека вирусная частица SARS-CoV-2 меняет свою форму, за счет чего становится возможным взаимодействие с другими, помимо SP, белками SARS-CoV-2. При этом пространственная конфигурация вируса изменяется настолько сильно, что шиповидный белок SP SARS-CoV-2 перестает играть свою ведущую роль инициатора SARS-CoV-2 инфекции.

На основании полученных в ходе диссертационной работы данных можно сделать вывод, что белок NP вируса SARS-CoV-2 наиболее интенсивно взаимодействует с белком CD46 человека. Следом по интенсивности взаимодействия идет белок MP, затем — шиповидный белок S, а наименее интенсивное взаимодействие наблюдается у белка оболочки EP.

Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что при неспецифическом встраивании вируса в липидную мембрану клетки человека конфигурация SARS-CoV-2 может претерпевать значительные изменения, что позволяет вирусу взаимодействовать с другими структурными белками, помимо белка S. В этом случае белок S перестает быть главным инициатором инфекции. Исследование показывает, что при реализации неспецифического механизма проникновения основным белком, связывающимся с CD46, является нуклеокапсидный белок NP вируса SARS-CoV-2.

Таким образом, взаимодействие белка NP с CD46 человека можно рассматривать как новый, пока еще малоизученный механизм развития инфекции SARS-CoV-2. Этот механизм открывает новые перспективы для

разработки терапевтических средств для лечения тяжелых форм инфекции. Вещества, способные блокировать области связывания белка CD46 со структурными белками вируса SARS-CoV-2, могут стать основой для создания инновационных лекарственных препаратов и вакцин, направленных на лечение тяжелых осложнений инфекции.

Например, одна из вакцин, недавно внедренных в Российской Федерации, Конвасэл (производитель: ФГУП СПбНИИВС ФМБА, Россия), основана на использовании рекомбинантного нуклеокапсидного белка NP, что подтверждает его важную роль в патогенезе COVID-19. Вычисления, представленные в исследовании, подчеркивают значимость NP, поскольку он участвует в образовании стабильных белок-белковых комплексов, что видно по результатам анализа димерных комплексов. Это исследование дополнительно акцентирует внимание на ключевой роли белка NP в патогенезе вируса, что делает его использование в составе вакцин оправданным.

Работ, определявших экспрессию CD46⁺ на лимфоцитах у пациентов с постковидным синдромом, на данный момент не проводилось.

Задачей данной части исследований явилась оценка уровней экспрессии CD45 и CD46 на различных субпопуляциях лимфоцитов у пациентов, перенесших SARS-CoV-2 инфекцию.

На первом этапе исследования было выявлено, что при гейтировании лимфоцитов по CD 45⁺ по сравнению с CD46⁺ у части пациентов процент Т-лимфоцитов, несущих рецептор CD45⁺, был достоверно выше, чем при гейтировании CD46⁺, из 72 пациентов таких было 52 человека (72,2 %), у остальных 20 человек процент Т-лимфоцитов, несущих рецептор CD45⁺, был равен или несколько ниже, чем при гейтировании CD46⁺. По этому критерию пациенты были разбиты на 2 группы: группа с уровнем экспрессии CD46 ниже уровня экспрессии CD45 на Т-лимфоцитах и группа с нормальным или более высоким уровнем экспрессии CD46 относительно уровня экспрессии CD45 на Т-лимфоцитах.

Полученные результаты показали, что снижение экспрессии CD46 на Т-лимфоцитах (CD3⁺) сопровождается таким же уменьшением его экспрессии на цитотоксических Т-лимфоцитах (CD3⁺, CD8⁺), TNK (CD3⁺, CD56⁺), а также Т-хелперах, несущих маркеры ранней активации (CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺). При этом наиболее выраженное снижение отмечалось как среди общих Т-лимфоцитов, так и цитотоксических. У этих больных несколько повышался уровень экспрессии CD46 на В-лимфоцитах. Последние данные свидетельствуют об отсутствии вовлечения в нарушение рецептора CD46 на В-лимфоцитах. Более того, наблюдаемые изменения вполне могут быть вызваны взаимодействием вируса и CD46. На сегодняшний день известно, что CD46 вовлечен в контроль, по меньшей мере, трех ключевых метаболических событий: обработанный γ -секретазой внутриклеточный домен CYT-1 CD46 перемещается в ядро, где он индуцирует экспрессию белков-переносчиков (GLUT1, LAT1 и CAT1) и сборку mTORC1. Активация CD46 индуцирует повышенную экспрессию метаболических ферментов, включая синтазы жирных кислот, GAPD; также CD46 увеличивает активацию внутриклеточных пулов C5 с внутриклеточно генерируемым C5a, стимулирующим митохондриальный C5aR1, который управляет продукцией ROS и активацией NLRP3 инфламмасом в CD4⁺ Т-клетках. Все это лежит в основе повышения гликолиза и увеличения продукции OXPHOS и ROS, необходимых для индукции продукции IFN- γ и экспрессии гранзима В, и, как следствие, реализации защитных эффекторных ответов Th1 Т-киллеров [108].

Особо стоит отметить, что выявленный комплекс изменений сохраняется у значительного числа переболевших пациентов на протяжении длительного времени, что подчеркивается нарушениями экспрессии этого маркера на различных субпопуляциях Т-лимфоцитов. В целом же, полученные данные подтверждают гипотезу участия рецептора CD46 в патогенезе COVID-19. Более того, такое воздействие приводит к усилению

симптомов постковидного синдрома у таких пациентов и требует формирования новых подходов к коррекции этих нарушений.

В формировании выраженности ответа врождённого иммунитета у пациентов с COVID-19 одну из определяющих ролей играют также натуральные киллеры (NK-клетки) [63], способствуя сбалансированности прямого ответа на вирус – путем устранения инфицированных клеток (дендритных клеток, моноцитов и Т-клеток). Нарушение этого баланса оказывается критичным в случае SARS-CoV-2, поскольку сверхактивный цитокиновый ответ, типичный для тяжелых случаев заболевания, приводит к развитию системных осложнений, полиорганной недостаточности и, в конечном итоге, к смерти [130].

Таким образом, учитывая роль натуральных киллеров и активации системы комплемента при COVID-19, регуляторные свойства CD46 и полученные нами данные о его потенциальной вовлеченности в процессы проникновения вируса в клетку, мы сочли необходимым проанализировать изменения показателей натуральных киллеров (которые уменьшались у постковидных пациентов со снижением CD46) и связанных с их нарушением других различных субпопуляций лейкоцитов у пациентов с постковидным синдромом.

В ходе исследования при делении выборки по количеству натуральных киллеров было выявлено, что среди 96 обследованных пациентов 48 % имели сниженный уровень абсолютного и относительного числа NK-клеток, сопровождающийся снижением экспрессии CD46 на NK-клетках. Гейтирование лимфоцитов панлейкоцитарными маркерами CD45 и CD46 показало, что у пациентов 1-й группы отмечено снижение NK-клеток более чем в 2 раза по сравнению с пациентами, относящихся к 2-й группе. При этом снижение натуральных киллеров сопровождалось повышением в 1,2 раза абсолютного и относительного числа общих Т-лимфоцитов, которое, по-видимому, происходило за счет компенсаторного увеличения субпопуляций Т-хелперов и ТНК-лимфоцитов, а также ростом общего числа В-клеток

памяти. Установлено, что увеличение общего числа В-лимфоцитов сопровождалось полуторакратным снижением уровня общего IgM.

Анализ показателей тромбоцитарного ростка кроветворения у пациентов со сниженным уровнем NK-клеток показал повышение в 1,3 раза количества тромбоцитов, в 1,1 раза тромбоцитокрита на фоне снижения среднего объема тромбоцитов.

Постковидные пациенты со сниженным уровнем NK-клеток также характеризовались значительным снижением показателя гематокрита, концентрации гемоглобина в эритроцитах, среднего корпускулярного объема гемоглобина, средней концентрации корпускулярного гемоглобина.

Таким образом, при обсчете по разным исходным точкам иммунной системы (формирование групп по снижению/норме NK-клеток и панлейкоцитарному маркеру CD46⁺ состав групп может различаться и иметь как общие признаки, так и существенные различия). Все это свидетельствует о том, что при анализе полученных результатов, нужно проводить более глубокие исследования популяционного состава лейкоцитов с учетом разных точек повреждения системы иммунитета.

Полученные в ходе диссертационной работы результаты свидетельствуют о том, что у части пациентов, ранее перенесших SARS-CoV-2 инфекцию и страдающих постковидным синдромом, четко прослеживается фенотип, связанный с нарушением систем врожденного иммунитета, включающего в себя снижение NK-клеток и панлейкоцитарного рецептора CD46.

Ранее другими исследователями (Ruenjaiman V, Sodsai P, Kueanjinda P, et al., 2022 г.) тоже было показано, что в течение первых 3 месяцев после выздоровления у пациентов с лёгкой и средней тяжестью течения острого COVID-19 наблюдалось значительное снижение общего количества NK-клеток [97]. Эти данные согласуются с результатами наших исследований и свидетельствуют о том, что COVID-19 может влиять на количество и функции клеток врожденной иммунной системы (в том числе натуральных

киллеров), приводя к развитию постострых последствий заболевания. В силу этого, эпигенетическая память иммунных клеток врожденного иммунитета и их предшественников может играть роль в развитии постковидных нарушений [82].

Отмеченные нарушения факторов врожденного иммунитета сопровождались изменениями в эритроцитарном и тромбоцитарном ростках кроветворения. Снижение эритроцитарных индексов может свидетельствовать о нарушении оксигенации организма. Liu W, Li H. (2022), Wenzhong L, Hualan L. (2020) предположили, что ингибирование метаболизма гема происходит путем связывания вирусного белка ORF8 с порфирином [116, 201]. Гемоглобин крови является наиболее простым для измерения гемопротеином, однако в метаболизме клеток принимает участие большое количество других важных белков, представляющих собой гемопротеины (миоглобин, каталаза, циклооксигеназа, пероксидаза, цитохром р450 и синтаза оксида азота, митохондриальные белки), которые, по-видимому, также могут снижаться при COVID-19. Подобные события приводят к белковой дисфункции, повреждению клеток, потере энергии митохондриями и утечке железа с последующим повышением уровня ферритина в сыворотке, а также к усталости и объективной мышечной слабости, о которых сообщают пациенты [173].

Кроме того, для постковидных пациентов с нарушенным иммунным статусом характерны тромботические осложнения [117]. Установлено повышение общего количества тромбоцитарных пластинок при одновременном снижении их среднего объема. По мнению, таких исследователей, как Sumbalova Z. и соавт. (2022), нарушение регуляции врожденной и адаптивной иммунных систем является одним из критических факторов, вызывающих тромбоз при COVID-19 [140]. Они показали, что у пациентов после COVID-19 снижены функция дыхательной цепи митохондрий тромбоцитов, окислительное фосфорилирование и уровень

эндогенного CoQ10, что приводит к нарушению их функциональной активности.

Результаты диссертационного исследования показали значительное снижение у постковидных пациентов как общего количества Т-лимфоцитов, так и NK-клеток, несущих на своей поверхности рецептор CD46. По-видимому, именно лигирование CD46 вирусом индуцирует его подавление [129]. Известно, что в супернатантах CD46, активированных Т-клеток, выделение CD46 приводит к образованию растворимого CD46 (sCD46), способного связывать лиганды. В свою очередь, активированные Т-клетки секретируют C3b, который в свою очередь, связывается с выделенным sCD46 и приводит к ингибированию Т-клеток в петле отрицательной обратной связи [129]. Вероятно, именно эти механизмы иммунопатогенеза определяют дисфункцию Т-клеточного звена и, как следствие, развитие постострых симптомов COVID-19. Диссертационное исследование показало следующие результаты:

У части постковидных пациентов через 6 месяцев и более сохранялось повреждение врожденных факторов иммунной системы, а именно снижение уровня NK-клеток (48 %) и клеток, имеющих панлейкоцитарный маркер CD46⁺ (64,5 %).

Снижение натуральных киллеров сопровождалось повышением уровня общих Т-лимфоцитов, преимущественно за счет Т-хелперов и ТНК-лимфоцитов, и ростом общих В-клеток памяти, которое сочеталось со снижением уровня общего IgM.

Снижение уровня NK-клеток сопровождалось нарушением тромбоцитарного (повышением уровня тромбоцитов, тромбоцитокрита на фоне снижения среднего объема тромбоцитов) и эритроидного (снижением гемоглобина, гематокрита, среднего корпускулярного объема гемоглобина, средней концентрации корпускулярного гемоглобина) ростков кроветворения.

У пациентов со сниженной экспрессией CD46⁺ на Т-лимфоцитах значительно снижено как общее количество этих клеток, так и NK-клеток. Полученные нами данные указывали на участие CD46 и NK-клеток в развитии не только инфекции SARS-CoV-2, но и постковидного состояния.

Все это, а также выявленные нами нарушения факторов приобретенного иммунитета, связанные также с повреждением CD46 рецепторов лейкоцитов, обосновывают важность оценки главных противовирусных параметров приобретенной системы иммунной защиты, а именно цитотоксических Т-лимфоцитов и В-клеток.

У больных COVID-19 было выявлено уменьшение количества CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов, CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов, CD19⁺ В-лимфоцитов и CD16⁺CD56⁺ NK-клеток в периферической крови [66].

Стоит отметить и роль регуляторных Т-reg при SARS-CoV-2. Было показано, что FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺Т-reg накапливаются в лимфатических узлах средостения при вирусной пневмонии, ограничивая функцию эффекторных Т-клеток CD8. Таким образом, Тreg могут играть достаточно важную роль в замедлении клиренса вируса, что приводит к быстрому прогрессированию заболевания, и поражению центральной нервной системы [87].

Как правило, все эти исследования проводились у пациентов в острую фазу развития SARS-CoV-2 инфекции. Исследование клеток иммунной системы, в том числе и цитотоксических Т-лимфоцитов, у постковидных пациентов практически не проводилось.

Малочисленные фундаментальные исследования, направленные на оценку состояния иммунной системы у постковидных пациентов, и, в частности, цитотоксических Т-лимфоцитов, отсутствие разработок подходов к терапии нарушений иммунных механизмов у таких больных может серьезно осложнить сроки реабилитации указанных пациентов и ухудшить прогноз их дальнейшей выживаемости при последующих вирусных (в том числе и сезонных) заболеваниях.

Учитывая, что Т-цитотоксические клетки (Тс, CD3⁺CD8⁺) являются одними из ключевых клеток иммунной системы [28], участвующих в противовирусной защите, в диссертационной работе была проведена оценка параметров иммунной системы, связанных с нарушением уровня цитотоксических Т-клеток у постковидных пациентов.

При анализе полученных результатов выявлено, что у 44,8 % среди обследованных лиц в 1,7 раза снижено количество цитотоксических Т-клеток. Это явление сопровождалось снижением уровня Т-лимфоцитов в целом, ТНК-лимфоцитов, некоторым ростом Т-хелперов, увеличением соотношения CD4/CD8 клеток, уровней В-лимфоцитов, за счет В-общих и BCD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁺CD27⁻, В-лимфоцитов CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁻CD27⁻ не клеток памяти, относящихся к плазмцитам (или иначе наиболее активно продуцирующим иммуноглобулины В-клеткам). Все эти данные свидетельствуют о том, что у таких пациентов в большей степени формируется иммунный ответ по ТН2-типу (усилением продукции антител), а не по ТН1-типу (формирование клеточных иммунных реакций) [28]. Кроме того, у таких больных было выявлено нарушение ТН1 ответа, что влечет за собой увеличение вероятности развития патологических процессов, связанных с неадекватным ответом на вирусные антигены (включая повторные заражения вирусом SARS-CoV-2, а также обострения хронических инфекций). Выявленное нами снижение Тс-клеток и нарушение регуляции ТН1/ТН2 ответов также может способствовать и обострению заболеваний, вызванных персистирующими вирусами (например, герпетическими). Возможно, выявленные нами нарушения у таких пациентов могут способствовать возникновению или обострению аллергических и аутоиммунных процессов при нарушении функционирования (гиперактивации) В-клеточного звена иммунной системы. Очень важным также является и выявленное почти двукратное снижение ТНК-лимфоцитов, нарушение уровня которых также приводит к снижению противовирусной активности иммунной системы, и также может способствовать как

некачественному ответу на новые вирусные антигены, или способствовать активации хронических вирусных инфекций [28]. Все это требует дальнейшего более детального исследования, как с точки зрения дальнейших клинических наблюдений за этими пациентами, так и с точки зрения разработки методов коррекции выявленных нарушений иммунной системы.

Вторичная иммунодисфункция у постковидных пациентов формируется в компартментах как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Полученные в ходе диссертационного исследования данные о компенсаторном изменении субпопуляций В-лимфоцитов, в том числе и у пациентов с нарушением экспрессии CD46 рецепторов, поставили перед нами вопрос о роли В-лимфоцитов у постковидных пациентов.

В то время как большинство исследований, посвященных иммунным нарушениям у лиц с постострыми последствиями COVID-19, направлено на изучение и анализ клеток врожденного иммунитета и популяций Т-лимфоцитов [172], повреждению В-клеточного звена иммунной системы, который определяет продолжительность и широту защитного иммунитета, уделено недостаточно внимания. SARS-CoV-2 вызывает стойкий ответ В-клеток [109], но уровни антител со временем снижаются, что повышает риск ослабления иммунитета, поскольку титр нейтрализующих антител снижается ниже порогового значения, необходимого для защиты от повторного заражения [96].

В тех работах, которые были посвящены долгосрочным В-клеточным ответам [183], также было показано усиление активации В-клеток, определяемое повышением частоты маркеров CD95⁺, CD69⁺ и PD1⁺, которое с течением времени возвращается к нормальным значениям; однако устойчивое присутствие В-клеток FCRL4⁺ и PD1⁺ у таких пациентов предполагает сохранение их дисрегуляции [183]. Крайне важно то, что содержание антигенспецифичных В-клеток памяти к SARS-CoV-2 обычно пропорционально тяжести COVID-19, и в группе с тяжелым течением заболевания, как правило, наблюдается более высокое содержание всех В-

клеток памяти IgM⁺, IgA⁺ и IgG⁺ по сравнению с другими группами [80], что придает их оценке и анализу особенную значимость.

В ходе диссертационного исследования было показано, что у пациентов, перенесших острый COVID-19, отмечается три вида нарушений иммунной системы, выделенных нами в отдельные фенотипы (поражение NK-клеток, Т-цитотоксических клеток и клеток, несущих рецептор CD46⁺). В тоже время, исследование В-клеток отдельно не проводилось, что и сформировало дальнейшую задачу исследований, которая заключалась в анализе В-клеточного роста иммунной системы у постковидных пациентов и особенностей нарушений иммунной системы у таких больных.

При делении общей выборки постковидных пациентов по уровню В-клеток памяти CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁺CD27⁺ было выявлено, что у 15,3 % наблюдался повышенный абсолютный и относительный уровень В-клеток памяти CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁺CD27⁺ по сравнению с группой с нормальным их содержанием. Это повышение сопровождалось трехкратным увеличением количества общих В-клеток памяти и четырехкратным повышением В-общих лимфоцитов CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁺ (преимущественно за счет В-клеток памяти CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁺CD27⁺).

В тоже время у этих пациентов обнаружено снижение более чем в 4 раза субпопуляции общих В-лимфоцитов с фенотипом CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁺, которое происходило как за счет снижения В-лимфоцитов клеток памяти с фенотипом CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁺CD27⁺, так и В-лимфоцитов не клеток памяти с фенотипом CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁺CD27⁻. Кроме того, у пациентов с повышенным уровнем В-клеток памяти с фенотипом CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁺CD27⁺ отмечено усиление продукции IgA.

Анализ полученных показателей выявил нарушение врожденных факторов иммунной системы. Так, у пациентов, перенёсших COVID-19 с повышенным уровнем В-клеток памяти с фенотипом CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁺CD27⁺, отмечено значимое абсолютное и относительное снижение уровня натуральных киллеров CD45⁺CD3⁺CD16⁺56⁺ (NK-киллеры,

абс, 10^6 кл/л – группа 1: $208,8 \pm 20,7$; группа 2: $269,4 \pm 20,3$; NK-киллеры, отн, % – группа 1: $9,2 \pm 1,2$; группа 2: $12,3 \pm 0,7$). Вместе с тем у этих пациентов обнаружено снижение на 13 % C3a-фрагмента комплемента относительно группы постковидных пациентов с нормальным уровнем В-клеток памяти с фенотипом $CD45^+CD3^-CD19^+CD5^+CD27^+$ (группа 1: $100,3 \pm 4,3$; группа 2: $114,8 \pm 2,9$).

Исследование популяции Т-лимфоцитов у постковидных пациентов группы 1 выявило повышение ее уровня по сравнению с группой 2, а также изменения в субпопуляционном составе. Так, у пациентов с повышенным содержанием В-клеток памяти с фенотипом $CD45^+CD3^-CD19^+CD5^+CD27^+$ отмечено снижение в 1,3 раза Т-регуляторных клеток и в 1,6 раз Т-клеток ранней активации лимфоцитов ($CD25^+$).

В целом, исследование подтверждает зарубежные исследования о наличии устойчивого изменения лимфоцитов после перенесенного COVID-19 [42, 109]. Более того, нами были выделены дистинктные фенотипы по ответу иммунной системы у постковидных больных. В этом ключе интересно сопоставить наши результаты с исследованием H.S. Shuwa, с соавт. (2021), в котором также было выделено три 3 подгруппы выздоравливающих пациентов на основе различных фенотипов лимфоцитов, при этом выявление одной из них четко ассоциировалось с худшим клиническим исходом [42], что было также показано в диссертационном исследовании. Так, в работах указанных ученых группа 1 характеризовалась высокой экспрессией транспортирующих молекул и увеличенной долей наивных В- и Т-клеток; группа 2 – высокой долей IgA^+ и IgG^+ , В-клеток и В-клеток памяти (как переключаемых, так и не переключаемых); а группа 3 показала повышенное содержание цитотоксических Т-клеток, $CD8^+TEMRA$ и цитокинов типа 1 как $CD8^+$, так и $CD4^+$ Т-клеток и характеризовалась худшей клинической картиной [42]. Интересно, что пациенты группы 2 (наиболее близкой к выявленной нами), по анамнестическим и демографическим характеристикам не отличалась от группы 3, но имела существенно более благоприятную (по

данным рентгена) клиническую картину. В силу этого, именно особенности иммунного ответа являлись фактором, определяющим процесс выздоровления.

По-видимому, у пациентов с повышенным уровнем В-клеток памяти $CD45^+CD3^-CD19^+CD5^+CD27^+$ сформировался особый тип нарушения иммунной системы, заключающийся в дезорганизации переключения В-лимфоцитов с синтеза IgM на IgG и IgA, что привело к резкому снижению В-субпопуляций лимфоцитов $CD45^+CD3^-CD19^+CD5^-$. Возможно, такое нарушение связано с резким снижением Т-регуляторных лимфоцитов и Т-лимфоцитов, отвечающих за регуляцию дифференцировки В-лимфоцитов с клеток, несущих IgM рецепторы, на клетки, синтезирующие IgG и IgA (Т-лимфоцитов ранней активации, несущих маркер к IL-2). Необходимо отметить, что представленность изотипов Ig среди популяции В-клеток памяти, специфичных для SARS-CoV-2, меняется со временем [96], что является как ограничением данного исследования, так и причиной возможных расхождений с другими авторами, которые оценивали больных в другие временные периоды.

В целом, настоящее исследование подтверждает данные о наличии фенотипических и функциональных изменений в В- и Т-клетках по всей траектории иммунного ответа, и выявляет комплекс изменений лимфоцитов у выздоравливающих пациентов с COVID-19 [42], который может быть ассоциирован с развитием долгосрочных осложнений в виде антипатогенных или аутовоспалительных реакций, и требовать адресной иммунокоррекции.

Таким образом, наиболее выраженные клиничко-иммунологические проявления постковидного синдрома выявляются при сравнении заболеваний инфекционно-воспалительной природы с фенотипами нарушений иммунной системы. Кроме того, наше исследование показало, что наличие фенотипов нарушения иммунной системы характерно только для пациентов, имевших поражение легких по типу "матового стекла" по данным компьютерной томографии в остром периоде COVID-19.

Одним из ключевых показателей иммунного статуса является система комплемента. Нарушения активности системы комплемента могут приводить к тяжелым последствиям для различных органов и тканей: центральной нервной системы, печени, легких, иммунной системы в целом [108].

Следующим этапом исследования было сравнение уровня показателей системы комплемента у постковидных пациентов в зависимости от степени тяжести течения острой коронавирусной инфекции, которое показало, что у всех пациентов, перенесших COVID-19, увеличена активность C5a фрагмента комплемента в сравнении с контрольной группой, что свидетельствует о длительной (не менее полугода) стимуляции классического пути активации комплемента. Также обращает на себя внимание стойкое снижение активности C1q, отвечающего за нормализацию активированного комплемента, у наиболее клинически тяжелых пациентов.

Эти данные также свидетельствуют о том, что вирус SARS-CoV-2 может взаимодействовать с рецептором CD 46 и активировать комплемент, а также объясняют наличие клинических проявлений постковидного синдрома у лиц, перенесших острую форму COVID-19 в легкой форме без поражения легких по данным компьютерной томографии и не имеющих выявленных нами ранее фенотипов повреждения иммунной системы.

Таким образом, диссертационное исследование показало, что после острой SARS-CoV-2-инфекции у пациентов через 6-12 месяцев формируется постковидный синдром, часто сопровождающийся развитием тех или иных нарушений иммунной системы. У пациентов с постковидным синдромом выявляются нарушения Т-, В-, NK- клеток, фагоцитов, комплемента. Постковидный синдром проявляется дисфункцией всех звеньев иммунной системы. Это связано, скорее всего, с тем, что развитие острого процесса SARS-CoV-2 инфекции сопровождается повреждением практически всех компартментов иммунной системы и, в первую очередь, Т-лимфоцитов [138, 170]. Всё это свидетельствует о том, что обследование постковидных пациентов следует проводить, не только оценивая их клинические

характеристики, но и обязательно анализируя состояние иммунной системы таких пациентов для постановки правильного диагноза и назначения этиологической и патогенетической терапии, в том числе и иммунной терапии.

Исследований, посвященных патогенетическим подходам к иммунокоррекции нарушений иммунной системы у постковидных пациентов, в настоящее время не проводилось. Однако получение фундаментальных знаний о иммунокоррекции у постковидных пациентов является крайне востребованным, так как они могут позволить разработать новые подходы к лечению и реабилитации больных, в том числе и при иных вирусных (в том числе и сезонных) заболеваниях.

Учитывая роль иммунной системы в формировании нарушений у постковидных пациентов, одним из подходов к иммунокоррекции является применение синтетического пептида активного центра GM-CSF, успешно применявшегося при различных патологических состояниях, в том числе при патологиях, связанных с нарушениями в иммунной системе человека, и глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП).

Согласно полученным в ходе работы данным синтетический пептид активного центра GM-CSF влияет преимущественно на активность бактерицидной системы нейтрофилов (уровни спонтанной и индуцированной НСТ). При этом также увеличивается число Т-хелперов и активность классического пути активации комплемента (С3а). Все это свидетельствует о том, что пептид, в основном, действует на врожденные факторы иммунной системы, в тоже время, скорее всего, через их активацию влияет и на Т-клеточное звено иммунной системы у постковидных пациентов. Отсутствие влияния на другие компартменты иммунной системы свидетельствует о том, что формирование подходов к терапии постковидных пациентов с нарушением иммунной системы требует поиска дополнительных иммуномодуляторов, влияющих в том числе и на Т-, В- и НК-клетки. Все

вышеизложенное требует дополнительных исследований в данном направлении.

Еще одним из патогенетических подходов к иммунокоррекции является использование глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП), успешно применявшегося при различных патологических состояниях, в том числе при патологиях, связанных с нарушениями в иммунной системе человека при вирусных инфекциях [4, 22, 24, 25]. Работ, посвященных иммунокоррекции нарушений иммунной системы у постковидных пациентов глюкозаминилмурамилдипептидом, на момент работы над диссертационным исследованием, не проводилось. Таким образом, учитывая роль иммунной системы в формировании нарушений у постковидных пациентов была проанализирована возможность применения у таких больных препарата, разработанного на основе глюкозаминилмурамилдипептида.

Как показало данное исследование, ГМДП влияет на активность бактерицидной системы нейтрофилов (снижая уровни спонтанной НСТ-реакции). При этом увеличивает процент В-плазматических клеток, преимущественно за счет В-лимфоцитов не клеток памяти с фенотипом CD45⁺CD3⁻CD19⁺CD5⁻CD27⁻, сопровождающийся ростом специфических IgG к вирусу SARS-CoV-2, снижает активность C5a фрагмента комплемента. Все это свидетельствует о том, что ГМДП нормализует не только факторы врожденного иммунитета (фагоцитов и комплемента), но и стимулирует гуморальный иммунный ответ, в том числе и специфический. Последний факт, возможно, связан с тем, что ГМДП в данной ситуации может уменьшать программированную гибель активированных В-лимфоцитов, тем самым усиливая (сохраняя) их ответ на иммунную систему, измененную под действием вируса SARS-CoV-2, но данный вопрос требует более тщательного исследования. Что очень важно, он нормализует показатели именно плазматических клеток вторичного иммунного ответа, а значит, влияет позитивно на их дифференцировку с IgM на IgG ответ. Очень важным является и факт его влияния на эритроидный и тромбоцитарный ростки

кроветворения, так как это влияние способствует улучшению оксигенации органов и тканей и снижает риск развития тромбоцитарных осложнений. Отсутствие влияния на Т- и НК- звенья иммунной системы свидетельствует о сложных механизмах регуляции иммунной системы у постковидных пациентов и важности поисков новых подходов к коррекции этих нарушений. Все это требует поиска дополнительных иммуномодуляторов, влияющих в том числе и на Т- и НК-клетки. Поиск таких препаратов является одной из ключевых проблем для данного вида патологии.

Таким образом, помимо клинической и лабораторной характеристики вариантов нарушений иммунной системы постковидных пациентов нами был разработан подход к коррекции этих нарушений, позволяющий восстанавливать функции фагоцитов, Т- и В-лимфоцитов, а также нарушенные функции других компартментов системы крови (тромбоцитарный и эритроцитарный ростки кроветворения).

Подводя итоги проделанной диссертационной работы, можно утверждать, что новая концепция патогенеза нарушений иммунной системы у постковидных пациентов позволяет найти новые подходы к иммунокоррекции постковидных пациентов, в том числе исходя из анамнеза острого заболевания новой коронавирусной инфекцией: постковидные пациенты с клиническими проявлениями постковидного синдрома и SARS-CoV-2-ассоциированной вирусной пневмонией в анамнезе нуждаются не только в полноценном клиническом обследовании, но и, в первую очередь, в проведении расширенного спектра иммунодиагностики и, при необходимости, персонифицированного подхода к иммунокоррекции, тогда как как пациенты, перенесшие COVID-19 без поражения легких, имеют нарушения активации системы комплемента крови и требуют тщательного клинического обследования, так как подобные изменения в системе врожденного иммунитета также могут повлечь за собой тяжелые последствия для различных систем органов [108].

Диспансерное наблюдение данной группы пациентов продолжается. После применения этих двух препаратов у пациентов с постковидным синдромом, согласно проведенному анкетированию, снизились симптомы астенизации, уменьшилась выраженность болевого синдрома при неврологической симптоматике, снизилась частота обострений хронических инфекционных заболеваний, а также частота обострений хронических заболеваний эндокринной системы; а по данным лабораторной диагностики нормализовались показатели тромбоцитарного и эритроцитарного ростков кроветворения.

ВЫВОДЫ

1. У большинства пациентов при развитии постковидного синдрома иммунопатологии формируются нарушения нервной, эндокринной, иммунной систем и обострение хронических инфекционных процессов, свидетельствующие о проявлении полиорганной патологии.

2. У пациентов с постковидным синдромом от тяжести течения COVID-19 в остром периоде зависит учащение обострений таких клинических синдромов как пролиферативный, аллергический, в меньшей степени, и поражения сердечно-сосудистой, эндокринной, гепатобилиарной и нервной систем, достоверно в большей степени, тогда как от тяжести течения COVID-19 в остром периоде не зависит развитие клинических проявлений аутоиммунного и инфекционного синдромов, а зависит от наличия перенесенной коронавирусной инфекции.

3. Биоинформационный анализ показал, что белки вируса SARS-CoV-2 могут взаимодействовать с CD46 рецептором лейкоцитов человека, наиболее интенсивно с CD46 человека взаимодействует белок NP, за ним по интенсивности взаимодействия следует белок MP, белок SP находится на третьем месте, а наименее интенсивно с CD46 взаимодействует белок оболочки EP

4. Существует 4 новых, не известных ранее фенотипа повреждения врожденной (снижение экспрессии рецептора CD46 на Т-лимфоцитах, снижение уровня NK-клеток) и приобретенной (нарушение В-клеточного звена лимфоцитов, снижение уровня Т-цитотоксических клеток) иммунной системы у постковидных пациентов.

5. Применение местно на слизистые оболочки (ротоглотка) человека синтетического пептида активного центра GM-CSF стимулирует спонтанную

и индуцированную НСТ-активность нейтрофилов, С3а- фрагмента комплемента, активирует Т-хелперы.

6. Применение глюкозаминилмурамилдипептида снижает спонтанную НСТ-активность нейтрофилов, С5а- фрагмента комплемента, увеличивает процент В плазматических клеток, преимущественно за счет В2-лимфоцитов, при этом отмечается рост специфических IgG к вирусу SARS-CoV-2, а также нормализует показатели эритроидного и тромбоцитарного ростков кроветворения.

7. Сформулирована новая концепция иммунопатогенеза постковидных нарушений иммунной системы: белки вируса SARS-CoV-2 (NP>MP>SP>EP) взаимодействуют с рецептором CD46, что приводит как к длительно сохраняющейся в постковидном периоде активации системы комплемента вне зависимости от тяжести течения острого заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2, так и к нарушению экспрессии CD46 на различных субпопуляциях лимфоцитов в постковидном периоде у пациентов, имевших поражение легких по типу "матового стекла" по данным КТ в остром периоде COVID-19, что приводит к формированию четырех фенотипов нарушений иммунной системы. Все эти нарушения, вызванные взаимодействием белков вируса SARS-CoV-2 с рецептором CD46, проявляются также клинически в виде полиорганной патологии, тяжесть которой напрямую связана с нарушением экспрессии CD46 на лимфоцитах, что обуславливает формирование новых подходов к иммунокоррекции этих больных.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Помимо клинической и лабораторной характеристики вариантов нарушений иммунной системы постковидных пациентов в ходе диссертационного исследования был разработан подход к коррекции этих нарушений, позволяющий восстанавливать функции клеток иммунной системы. От иммунного статуса пациента от выбора препарата зависит выбор препарата для иммунокоррекции:

1. Рекомендовано применение препарата синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ (Ацеграм-спрей) в дозировке 20мкг/мл по 5 мл 3 раза в день в течение 5 дней местно на слизистые оболочки (ротоглотка) человека, стимулирующее спонтанную и индуцированную НСТ-активность нейтрофилов, С3а- фрагмента комплемента, активирующее Т-хелперы.

2. Рекомендовано применение глюкозаминилмурамилдипептида (препарат Ликопид) в дозировке 10мг 2 раза в день в течение 10 дней, перорально снижающее спонтанную НСТ-активность нейтрофилов, С5а фрагмента комплемента, увеличивающее процент В-плазматических клеток, преимущественно за счет В2-лимфоцитов. способствующее росту специфических IgG к вирусу SARS-CoV-2, а также нормализующее показатели эритроидного и тромбоцитарного ростков кроветворения.

3. При диспансеризации пациентов, перенесших коронавирусную инфекцию с поражением легких более 50 %, рекомендуется дополнительно обследовать сердечно-сосудистую, эндокринную, гепатобилиарную, нервную и иммунную системы.

4. Результаты диссертационного исследования могут быть использованы в работе научно-исследовательских лабораторий, изучающих действие стрессоров и механизмы развития постстрессорных состояний.

5. Разработанный в ходе работы патогенетический подход к иммунокоррекции может быть включен в клинические рекомендации для практикующих врачей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД	артериальное давление
БОЕ	бляшкообразующие единицы
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ГМДП	глюкозаминилмурамилдипептид
ГЭБ	гематоэнцефалический барьер
ДВС-синдром	синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания
ЖКТ	желудочно-кишечный тракт
IL 1-n	интерлейкины 1-n
КТ	компьютерная томография
МКБ-10, МКБ-11	международная классификация болезней
НСТ-тест	реакция восстановления нитросинего тетразолия в диформозан
ОДН	острая дыхательная недостаточность
ОРВИ	острая респираторная вирусная инфекция
ОРДС	острый респираторный дистресс синдром
ПЦР	полимеразная цепная реакция
СД	сахарный диабет
СРБ	С-реактивный белок
ССС	сердечно-сосудистая система
ЧДД	частота дыхательных движений
C1q, C3a, C3b, C4b, C5a	фрагменты комплемента
COVID-19	инфекция, вызванная коронавирусом
GM-CSF	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
IFN γ	интерферон γ
NK	натуральные киллеры
SARS-CoV-2	коронавирус
T, B, NK, TNK, T-reg, Tc, Th	субпопуляции лимфоцитов
TNF- α	фактор некроза опухоли α

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологически активные производные АЛЛОФЕРОНА-1: патент на изобретение RU № 2576830 С2 / Беккер И., Кучер М., Чарниевска Э., и др.; Патентообладатели: Общество с ограниченной ответственностью "Ликели"; Заявка № 2013141484/15 от 10.09.2013. Оpubл. 10.03.2016.
2. Биологически активный пептид и иммуномодулирующая и противовирусная фармацевтическая композиция: патент на изобретение RU № 2575069 С2 / Беккер И., Кучер М., Чарниевска Э., и др.; Патентообладатели: Общество с ограниченной ответственностью "Ликели" (ООО "Ликели"); Заявка № 2013141485/10 от 10.09.2013. Оpubл. 10.02.2016.
3. Виксман, М.Е. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия : методические рекомендации / М.Е. Виксман, А.Н. Маянский; Казанский НИИЭМ. Казань, 1979. 16 с.
4. Влияние В-гликозидов мурамилдипептида на НК-активность мононуклеарных лейкоцитов и фагоцитарную функцию нейтрофилов человека / А.Н. Хочанский, А.Е. Земляков, О.В. Калюжин, В.В. Решетникова // Российский биотерапевтический журнал. 2014. Т. 13, № 1. С. 27-30.
5. Глазанова, Т.В. Нарушения в системе иммунитета после перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19 / Т.В. Глазанова, Е.Р. Шилова // Журнал инфектологии. 2022. 14(4). С. 26-37. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2022-14-4-26-37>.
6. Горбич, Ю.Л. Значение адекватной эмпирической терапии при нозокомиальных инфекциях, вызванных *Acinetobacterbaumannii* / Ю.Л. Горбич, И.А. Карпов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012. Т. 14, № 1. С. 67-73.

7. Гриценко, В.А. Роль персистентных свойств в патогенезе эндогенных инфекций / В.А.Гриценко, Ю.Б. Иванов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2009. № 4. С. 66-71.

8. Ершов, Ф.И. Антивирусные препараты: справочник. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 311 с.

9. Иванов, Д.В. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, этиология, антибактериальная терапия и профилактика / Д.В. Иванов, И.В. Крапивина, Е.В. Галева // Антибиотики и химиотерапия, 2005. Т. 50, № 12. С. 19-28.

10. Идентификация микроорганизмов и определение их чувствительности к антибиотикам с применением автоматического микробиологического анализатора VITEK 2 Compact: методические рекомендации MR 02.032-08 / утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 30 июня 2008 г. Москва: ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора», 2008. 25 с.

11. Иммунный ответ на новую коронавирусную инфекцию / В.С. Федоров, О.Н. Иванова, И.Л. Карпенко, А.В. Иванов // Клиническая практика. 2021. Т. 12, № 1. С. 33-41. <https://doi.org/10.17816/clinpract64677>.

12. Исследование влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) в комбинированной терапии инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр / В.А. Зурочка, А.В.Зурочка, О.И. Забков, Н.А. Забокрицкий // Российский иммунологический журнал. 2018. Т. 12 (4). С. 670-673.

13. Канорский, С.Г. Постковидный синдром: распространенность и патогенез органных поражений, направления коррекции. Систематический обзор // Кубанский научный медицинский вестник. 2021. Т. 28 (6). С.90-116. <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2021-28-6-90-116>.

14. Лакин, Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для студентов биологических специальностей высших учебных заведений. 4 изд., перераб. и доп. Москва: Высшая школа, 1990. 352 с.

15. Лучевая диагностика коронавирусной болезни (COVID-19): организация, методология, интерпретация результатов: методические рекомендации № 72 / Препринт № ЦДТ - 2020 – I; ГБУЗ города Москвы «Научно-практический клинический центр диагностики и телемедицинских технологий Департамента здравоохранения города Москвы». Москва, 2020. 75 с. (Серия «Лучшие практики лучевой и инструментальной диагностики»).

16. Маянский, А.Н. Клинические аспекты фагоцитоза: монография / А.Н. Маянский, О.И. Пикуза. Казань: Магариф, 1993. 180 с.

17. Международная классификация болезней 11 пересмотра: МКБ-11: глобальный стандарт для диагностической информации о здоровье: онлайн версия / Всемирная организация здоровья. 2022. <https://icd.who.int/ru>.

18. Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра, (МКБ-10): онлайн версия / Принята 43-ей Всемирной Ассамблеей Здравоохранения. 2019. Режим доступа: <https://mkb-10.com/>.

19. Методическое пособие по проведению профилактического медицинского осмотра и диспансеризации определенных групп взрослого населения, углубленной диспансеризации для граждан, перенесших новую коронавирусную инфекцию (COVID-19) / ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Минздрава России. Москва, 2021. 84 с.

20. Мругова, Т.М. Особенности таксономической структуры и резистентности к антибиотикам микрофлоры, изолированной от больных в многопрофильном хирургическом стационаре / Т.М. Мругова, И.В. Качалова // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016. № 2. С. 1-12. [электр. ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/MTM-2016-2.pdf>.

21. Об утверждении Порядка проведения профилактического медицинского осмотра и диспансеризации определенных групп взрослого населения: Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 27.04.2021 № 404н. Москва, 2021. 54 с. (Зарегистрирован 30.06.2021 № 64042).

22. Основные причины и факторы формирования иммунных дисфункций у человека и современные подходы к их коррекции / Л.В. Лусс, Н.И. Ильина, А.Е. Шульженко, и др. // Российский Аллергологический Журнал. 2019. Т. 16 (2). С. 82-92.

23. Особенности течения Long-COVID инфекции. Терапевтические и реабилитационные мероприятия: методические рекомендации / утв. 18.11.2021 на XVI Национальном Конгрессе терапевтов; Российское научное медицинское общество терапевтов, Национальное научное общество инфекционистов, Союз реабилитологов России. Москва, 2021. 217 с. [mr_long_covid.pdf](#).

24. Пинегин, Б.В. Иммуностимуляторы мурамилпептидной природы в лечении и профилактике инфекционно-воспалительных процессов / Б.В. Пинегин, М.В. Пашенков // Иммунология. 2019. Т. 40 (3). С. 65-71. doi: 10.24411/0206-4952-2019-13007.

25. Половинкина, В.С. Иммуноадьювантные свойства мурамилдипептида / В.С. Половинкина, Е.Ю. Марков // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2012. № 1 (83). С.149-153.

26. Постковидный синдром и тахикардия: теоретические основы и опыт лечения / В.И. Подзолков, А.Е. Брагина, и др. // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. 2021. № 17 (2). С. 256–262. DOI:10.20996/1819-6446-2021-04-08.

27. Применение пептида ARG-PRO-GLY-PRO в качестве противовирусного средства для животных: патент на изобретение RU № 2414235 С1 / Андреева Л.А., Мезенцева М.В., Шаповал И.М., и др.;

Патентообладатели: Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН; Заявка № 2009148708/15 от 29.12.2009. Оpubл. 20.03.2011.

28. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях: монография / А.В. Зурочка, С.В. Хайдуков, И.В. Кудрявцев, В.А. Черешнев. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018. 720 с. ISBN 978-5-7691-2374-0.

29. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19): временные методические рекомендации / Минздрав России. Москва, 2023. 250 с. Версия 18 (26.10.2023).

30. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике: федеральные клинические (методические) рекомендации / Б.И. Асланов, Л.П. Зуева, Л.А. Кафтырева, и др. Москва: Изд-во «Ремедиум Приволжье», 2017. 54 с.

31. Роль способности бактерий к инаktivации факторов естественной противoinфекционной резистентности в их устойчивости к бактерицидному действию крови (сыворотки крови) / О.В. Бухарин, Ю.А. Брудастов, В.А. Гриценко, Д.Г. Дерябин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1996. № 2. С. 174-176.

32. Савчук, К.С. Клинические особенности течения постковидного синдрома у больных с нарушениями углеводного обмена // Саратовский научно-медицинский журнал. 2024. № 20 (1). С. 28–33.

33. Сафронова, Э.А. Клинико-иммунологическая характеристика пациентов с острым коронарным синдромом, перенесших COVID-19 / Э.А. Сафронова, Л.В. Рябова, А.В. Зурочка // Вестник уральской медицинской академической науки. 2023, Т. 20, № 1-2. С. 31–39, DOI: 10.22138/2500-0918-2023-20-1-31-39.

34. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» / С.В. Хайдуков, Л.А. Байдун,

А.В. Зурочка, А.А. Тотолян // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8 (17), № 4. С.974-992.

35. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций: ч 2. Тромбоциты как участники иммунных реакций / Н.Б. Серебряная, С.Н. Шанин, Е.Е. Фомичева, П.П. Якуцени // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21, № 1. С. 9-20. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-9-20.

36. Черныш С.И. Антивирусное вещество: патент на изобретение RU 2276988 С2 / Патентообладатель: Черныш С.И.; Заявка № 2004100857/15 от 15.01.2004. Оpubл. 27.05.2006.

37. Черныш, С.И. Средство для наружного применения, обладающее противовирусной активностью: патент на изобретение RU № 2338553 С2 / Патентообладатели: Общество с ограниченной ответственностью "Аллофарм, ООО "Аллофарм"; Заявка № 2006125090/15 от 13.07.2006; Оpubл. 20.11.2008.

38. Чжен, Б. Пептиды, подавляющие инфекции респираторных вирусов, их применение и способы получения: патент на изобретение RU № 2639559 / Чжен Б., Чжао Х.; Патентообладатели: Сянсюе Групп (Хонг Конг) Компани Лимитед; Заявка № 2015152086 от 19.02.2014. Оpubл. 21.12.2017.

39. Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype / C. Kemper, A.C. Chan, J.M. Greenet, et al. // Nature. 2003. Vol. 421. P. 388–392. <https://doi.org/10.1038/nature01315>.

40. Acute cerebrovascular disease following COVID-19: a single center, retrospective, observational study / Y. Li, M. Li, M. Wang, et al. // Stroke Vasc Neurol. 2020. Vol. 5 (3). P. 279-284. doi: 10.1136/svn-2020-000431.

41. Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization / Z. Tao, Z. Fen, C.Y. L.Grace, et al. // Gastroenterology. 2020. Vol. 159 (3). P. 944-955. e8. doi: 10.1053/j.gastro.2020.05.048.

42. Alterations in T and B cell function persist in convalescent COVID-19 patients / H.A. Shuwa, T.N. Shaw, S.B. Knight, et al. // Med. 2021. Vol. 6. P. 720-735. e4. doi: 10.1016/j.medj.2021.03.013.

43. Altered Lipid Metabolism in Recovered SARS Patients Twelve Years after Infection / Q. Wu, L. Zhou, X. Sun, et al. // *Sci Rep.* 2017. Vol. 7 (1). P. 9110. doi: 10.1038/s41598-017-09536-z.
44. A Markov-chain model description of binding funnels to enhance the ranking of docked solutions / M. Torchala, I.H. Moal, R.A.G. Chaleil, et al. // *Proteins.* 2013. Vol. 81 (12). P. 2143-2149. <https://doi.org/10.1002/prot.24369>.
45. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China / F. Wu, S. Zhao, B. Yu, et al. // *Nature.* 2020. Vol. 579 (7798). P. 265-269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>.
46. A novel simple scoring model for predicting severity of patients with SARS-CoV-2 infection / Y. Dong, H. Zhou, M. Li, et al. // *Transbound Emerg Dis.* 2020. Vol. 67 (6). P. 2823–2829.
47. Antimicrobial activity of thein doligidin derived novel synthetic peptide In-58 / A.S. Vasilchenko, A.V. Vasilchenko, T.M. Pashkova, et al. // *J. Pept. Sci.* 2017. Vol. 23. P. 855-863.
48. Antimicrobial drug resistance among clinically relevant bacterial isolates in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review / S.J. Leopold, F. van Leth, H. Tarekegn, C. Schults // *J. Antimicrob. Chemother.* 2014, Vol. 69, № 9. P. 2337-2353.
49. Anxiety and depression in COVID-19 survivors: Role of inflammatory and clinical predictors / M.G. Mazza, R. De Lorenzo, C. Conte, et al.; COVID-19 BioB Outpatient Clinic Study group // *Brain Behav Immun.* 2020. Vol. 89. P. 594-600. doi: 10.1016/j.bbi.2020.07.037.
50. Association of Cardiac Infection With SARS-CoV-2 in Confirmed COVID-19 Autopsy Cases / D. Lindner, A. Fitzek, H. Bräuninger, et al. // *JAMA Cardiol.* 2020. Vol. 5 (11). P. 1281-1285. doi:10.1001/jamacardio.2020.3551.
51. Autonomic dysfunction in 'long-COVID': rationale, physiology and management strategies / M. Dani, A. Dirksen, P. Taraborrelli, et al. // *Clin Med (Lond).* 2021. Vol. 21 (1). P. e63–e67. DOI: 10.7861/clinmed.2020-0896.

52. Belvis, R. Headaches During COVID-19: My Clinical Case and Review of the Literature // *Headache*. 2020. Vol. 60 (7). P. 1422–1426. DOI: 10.1111/head.13841.

53. Benkert, P. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models / P. Benkert, M. Biasini, T. Schwede // *Bioinformatics*. 2011. Vol. 27 (3). P. 343-350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>.

54. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy / E.A. van Vliet, S. da Costa Araújo, S. Redeker, et al. // *Brain*. 2007. Vol. 130. P. 521–534. doi: 10.1093/brain/awl318.

55. Bolay, H. COVID-19 is are al headache! / H.Bolay, A.Gül, B.Baykan // *Headache*. 2020. Vol. 60(7). P 1415–1421. DOI:10.1111/head.13856.

56. Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? // *Nat. Rev. Microbiol*. 2005. Vol. 3. P. 238-250.

57. Callard, F. How and why patients made Long Covid / F. Callard, E. Perego // *Soc Sci Med*. 2021. Vol. 268. 113426. doi: 10.1016/j.socscimed.2020.113426.

58. Cardiovascular disease potentially contributes to the progression and poor prognosis of COVID-19 / M. Li, Y. Dong, H. Wang, et al. // *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2020. Vol. 30 (7). P. 1061-1067.

59. Cardone, J. CD46 in innate and adaptive immunity: an update / J. Cardone, G. Le Friec., C. Kemper // *Clin. Exp. Immunol. : journal*. 2011. Vol. 164, № 3. P. 301-311. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04400.x.

60. CASP: Protein Structure Prediction Center. <https://predictioncenter.org/> (03 May 2021, date last accessed).

61. Cattaneo, R. Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet // *J Virol*. 2004. Vol. 78 (9). P. 4385-8. doi: 10.1128/jvi.78.9.4385-4388.2004.

62. CD46 facilitates entry and dissemination of human cytomegalovirus / K.R. Stein, T.J. Gardner, R.E. Hernandez, et al. // *Nat Commun*. 2019. Vol. 10 (1). 2699. doi: 10.1038/s41467-019-10587-1.

63. Characteristics of a Danish Post-COVID Cohort Referred for Examination due to Persistent Symptoms Six Months after Mild Acute COVID-19 / J. Agergaard, W.M. Ullahammer, J.D. Gunst, et al. // *J Clin Med*. 2022. Vol. 11 (24). 7338. doi: 10.3390/jcm11247338.25

64. Characterization of CD46 and β 1 integrin dynamics during sperm acrosome reaction / M. Frolikova, N. Sebkova, L. Ded, et al. // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. 33714. doi: 10.1038/srep33714.

65. Chippa, V. Post Acute Coronavirus (COVID-19) Syndrome: textbook / V. Chippa, A. Aleem, F.Anjum // *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2023. Jan. PMID: 34033370.

66. Clinical Characteristics and Immune Injury Mechanisms in 71 Patients with COVID-19 /Y. Wu, X. Huang, J. Sun, et al. // *mSphere*.2020.Vol. 5(4). e00362-20. doi: 10.1128/mSphere.00362-20.

67. Comprehensive Structural and Molecular Comparison of Spike Proteins of SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV, and Their Interactions with ACE2 / M.M. Hatmal, W. Alshaer, M.A.I. Al-Hatamleh, et al. // *Cells*. 2020. Vol. 9 (12). 2638. <https://doi.org/10.3390/cells9122638>.

68. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): current status and future perspectives / H. Li, S.-M. Liu, X.-H. Yu, et al. // *Int J Antimicrob Agents*. 2020. Vol. 55 (5). 105951. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105951.

69. Corrigan, D. Pulmonary embolism: the diagnosis, risk-stratification, treatment and disposition of emergency department patients / D.Corrigan, C. Prucnal, C. Kabrhel // *Clin. Exp. Emerg. Med*. 2016.Vol. 3(3). P. 117–125. DOI:10.15441/ceem.16.146.

70. CoviCareStudy Team. Prevalence of Symptoms More Than Seven Months After Diagnosis of Symptomatic COVID-19 in an Outpatient Setting / M.Nehme, O.Brillard, F.Chappuis, et al. // *Ann. Intern. Med*. 2021. Vol. 174(9). P. 1252-1260. DOI: 10.7326/M21-0878.

71. COVID-19 CG: Tracking SARS-CoV-2 mutations by locations and dates of interest / A.T. Chen, K. Altschuler, S.H. Zhan, et al. // bioRxiv [Preprint]. 2020. 2020.09.23. 310565. doi: 10.1101/2020.09.23.310565.

72. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression / P. Mehta, D.F. McAuley, M. Brown, et al. // Lancet. 2020. Vol. 28, № 395 (10229). P. 1033-1034. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0.

73. COVID-19, ketoacidosis and new-onset diabetes: are there possible cause and effect relationships among them? / S. Gentile, F. Strollo, A. Mambro, A. Ceriello // Diabetes Obes. Metab. 2020. Vol. 22 (12). P. 2507–2508. DOI: 10.1111/dom.14170.

74. COVID-19 patients benefit from early antiviral treatment: A comparative, retrospective study / T. Yu, C. Tian, S. Chu, et al. // J Med Virol. 2020. Vol. 10. 1002/jmv.26129.

75. COVID-19 presenting as stroke / A. Avula, K. Nalleballe, N. Narula, et al. // Brain Behav Immun. 2020. Vol. 87. P. 115-119. doi: 10.1016/j.bbi.2020.04.077.

76. COVID-19 rapid guideline: managing the long-term effects of COVID-19: NICE guideline. Published: 18 December 2020 Last updated: 25 January 2024 www.nice.org.uk/guidance/ng188.

77. Criterion for amino acid composition of defensins and antimicrobial peptides based on geometry of membrane destabilization / N.W. Schmidt, A. Mishra, G.H. Lai, et al. // J. Am. Chem. Soc. 2011. Vol. 133. P. 6720-6727.

78. Diabetes is a risk factor for the progression and prognosis of COVID-19 / W. Guo, M. Li, Y. Dong, et al. // Diabetes Metab Res Rev. 2020. Vol. 6 (7). e3319. doi: 10.1002/dmrr.3319. Epub 2020 Apr 7.

79. Direct Antimicrobial Activity of IFN- β / A. Kaplan, M.W. Lee, A.J. Wolf, et al. // J. Immunol. 2017. № 198. P. 4036-4045.

80. Distinct Immune Response at 1 Year Post-COVID-19 According to Disease Severity / C.K. Kang, M. Kim, J. Hong, et al. // Front Immunol. 2022. Vol.

13. 830433. doi: 10.3389/fimmu.2022.830433. Erratum in: Front Immunol. 2022. 13. 929770.

81. Elevated Exhaustion Levels of NK and CD8⁺ T Cells as Indicators for Progression and Prognosis of COVID-19 Disease / M. Li, W. Guo, Y. Dong, et al. // Front Immunol. 2020. Vol. 11. 580237. doi: 10.3389/fimmu.2020.580237.

82. Epigenetic memory of COVID-19 in innate immune cells and their progenitors / J.-G. Cheong, A. Ravishankar, S. Sharma, et al. // Cell. 2023. Vol. 186 (18). P. 3882-3902. e24. doi: 10.1016/j.cell.2023.07.019.

83. Fang, L. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? / L. Fang, G. Karakiulakis, M. Roth // Lancet Respir Med. 2020. Vol. 8(4). e21. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30116-8.

84. FATCAT 2.0: towards a better understanding of the structural diversity of proteins / Z. Li, L. Jaroszewski, M. Iyer, et al. // Nucleic Acids Res. 2020. Vol. 48 (W1). W60-4.

85. Finlay, B.B. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? / B.B. Finlay, R.E.W. Hancock // Nat. Rev. Microbiol. 2004. № 2. P. 497-504.

86. Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations / W. Zheng, C. Zhang, Y. Li, et al. // Cell Rep Meth. 2021. № 1. 100014. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100014>.

87. Girija, A.S.S. Fox3⁺ CD25⁺ CD4⁺ T regulatory cells (Tregs) may transform the n-CoV's final destiny to CNS! // Journal of Medical Virology. 2021. Vol. 93 (10). P. 5673-5675. <https://doi.org/10.1002/jmv.26482>.

88. Hawkins, E.D. CD46 signaling in T cells: linking pathogens with polarity / E.D. Hawkins, J. Oliaro // FEBS Lett. 2010. Vol. 584 (24). P.4838-4844. doi: 10.1016/j.febslet.2010.09.003.

89. Heffner, K.L. Neuroendocrine effects of stress on immunity in the elderly: implications for inflammatory disease // Immunol Allergy Clin North Am. 2011. Vol. 31 (1). P. 95–108. doi: 10.1016/j.iac.2010.09.005.

90. High-resolution computed tomographic imaging disclosing COVID-19 pneumonia: A powerful tool in diagnosis / Z. Zhang, Y. Shen, H. Wang, et al. // *J Infect*. 2020. Vol. 81 (2). P. 318–356.

91. Hirano, T. COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome / T. Hirano, M. Murakami // *Immunity*. 2020. Vol. 52 (5) > P. 731-733. doi: 10.1016/j.immuni.2020.04.003.

92. Holm, L. DALI and the persistence of protein shape // *Protein Sci*. 2020. Vol. 29 (1). P. 128-140. <https://doi.org/10.1002/pro.3749>.

93. Human species D adenovirus hexon capsid protein mediates cell entry through a direct interaction with CD46 / B.D. Persson, L. John, K. Rafie, et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021. Vol. 118 (3). e2020732118. doi: 10.1073/pnas.2020732118.

94. Iba, T. Thrombosis and thrombocytopenia in COVID-19 and after COVID-19 vaccination / T. Iba, J.H. Levy // *Trends Cardiovasc Med*. 2022. Vol. 32 (5). P. 249-256. doi: 10.1016/j.tcm.2022.02.008.

95. Immunological dysfunction persists for 8 months following initial mild-to-moderate SARS-CoV-2 infection / C. Phetsouphanh, D.R. Darley, D.B. Wilson, et al. // *Nat Immunol*. 2022. Vol. 23. P. 210–216. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01113-x>.

96. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection / J.M. Dan, J. Mateus, Y. Kato, et al. // *Science*. 2021. Vol. 371 (6529). eabf4063. doi: 10.1126/science.abf4063. Epub 2021 Jan 6. PMID: 33408181; PMCID: PMC7919858.

97. Impact of SARS-CoV-2 infection on the profiles and responses of innate immune cells after recovery / V. Ruenjaiman, P. Sodsai, P. Kueanjinda, et al. // *J Microbiol Immunol Infect*. 2022. Vol. 5 (6), pt. 1. P.993-1004. doi: 10.1016/j.jmii.2022.09.001.

98. Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19 / S. Middeldorp, M. Coppens, T.F. van Haaps // *J Thromb Haemost*. 2020. Vol. 18 (8). P. 1995-2002. doi: 10.1111/jth.14888.

99. Induction of Proinflammatory Multiple Sclerosis-Associated Retrovirus Envelope Protein by Human Herpesvirus-6A and CD46 Receptor Engagement / B. Charvet, J.M. Reynaud, G. Gourru-Lesimple, et al // *Front Immunol.* 2018. Vol. 9. 2803. doi: 10.3389/fimmu.2018.02803.
100. Insights on SARS-CoV-2 Molecular Interactions With the Renin-Angiotensin System / L.B. Costa, L.G. Perez, V.A. Palmeira, et al. // *Front Cell Dev Biol.* 2020 Sep 16;8:559841. doi: 10.3389/fcell.2020.559841.
101. Integrating Statistical Pair Potentials into Protein Complex Prediction / J. Mintseris, B. Pierce, K. Wiehe, et al. // *Proteins.* 2007. Vol. 69 (3). P. 511-520. <https://doi.org/10.1002/prot.21502>.
102. Jose, R.J. COVID-19 cytokine storm: The interplay between inflammation and coagulation / Jose RJ, Manuel A // *Lancet Respir Med.* 2020. Vol. 8 (6). e46-e47. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30216-2.
103. Kadir, M. Post-COVID Sequelae: From Lung Disease to Long Disease / M. Kadir, T. Ahmad, J. Bass // *Cureus.* 2023. Vol. 15 (3). e35668. doi: 10.7759/cureus.35668.
104. Kai, H. Interactions of coronaviruses with ACE2, angiotensin II, and RAS inhibitors-lessons from available evidence and insights into COVID-19 / H. Kai, M. Kai // *Hypertension Research.* 2020. Vol. 43. P. 648–654.
105. Kaseda, E.T. Post-traumatic stress disorder: A differential diagnostic consideration for COVID-19 survivors/ E.T. Kaseda, A.J. Levine // *Clin. Neuropsychol.* 2020. Vol. 34 (7–8). P. 1498–1514. DOI: 10.1080/13854046.2020.1811894.
106. Kidney Biopsy Findings in Patients with COVID-19/ Kudose S., Batal I., Santoriello D., et al. // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2020; 31(9): 1959–1968. DOI:10.1681/ASN.2020060802.
107. Krissinel, E. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions / E. Krissinel, K. Henrick // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2004. Vol. 60 (12-1). P. 2256-68. <https://doi.org/10.1107/s0907444904026460>.

108. Kunz, N. Complement Has Brains-Do Intracellular Complement and Immunometabolism Cooperate in Tissue Homeostasis and Behavior / N. Kunz, C. Kemper // *Front Immunol.* 2021. Vol. 12. 629986. doi:10.3389/fimmu.2021.629986.
109. Laidlaw, B.J. The germinal centre B cell response to SARS-CoV-2 / B.J. Laidlaw, A.H. Ellebedy // *Nat Rev Immunol.* 2022. № 22 (1). P. 7–18. doi.org/10.1038/s41577-021-00657-1.
110. Laskowski, R.A. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery / R.A. Laskowski, M.B. Swindells // *J Chem Inf Model.* 2011. Vol. 51 (10). P. 2778-86. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>.
111. Leowattana, W. Circulating angiotensin converting enzyme 2 and COVID-19 / W. Leowattana, T. Leowattana, P. Leowattana // *World J Clin Cases.* 2022. Vol. 10 (34). P. 12470-12483. doi: 10.12998/wjcc.v10.i34.12470.
112. Ligand binding determines whether CD46 is internalized by clathrin-coated pits or macropinocytosis / C.-I. Blessing, E. Sarah, C. Dale, et al. // *J Biol Chem.* 2003. Vol. 278 (47). P.6927-6937. doi: 10.1074/jbc.M308261200.
113. Ligation of the cell surface receptor, CD46, alters T cell polarity and response to antigen presentation / J. Oliaro, A. Pasam, N.J. Waterhouse, et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006. Vol. 103 (49). P. 18685-18690. doi: 10.1073/pnas.0602458103.
114. Lim, S. ACE2-Independent Alternative Receptors for SARS-CoV-2 / S. Lim, M. Zhang, T. Chang // *Viruses.* 2022. Vol. 14 (11). 2535. <https://doi.org/10.3390/v14112535>.
115. Liszewski, M.K. Membrane cofactor protein (MCP; CD46): deficiency states and pathogen connections / M.K. Liszewski, J.P. Atkinson // *Curr Opin Immunol.* 2021. Vol. 72. P. 126-134. doi: 10.1016/j.coi.2021.04.005.
116. Liu, W. COVID-19: Attacks the 1-beta Chain of Hemoglobin to disrupt respiratory function and escape immunity / W. Liu, H. Li. 2022. doi:10.26434/chemrxiv-2021-dtpv3-v12.

117. Long COVID: The Nature of Thrombotic Sequelae Determines the Necessity of Early Anticoagulation / C. Wang, C. Yu, H. Jing, et al. // *Front Cell Infect Microbiol.* 2022. Vol. 12. 861703. doi: 10.3389/fcimb.2022.861703.

118. Longitudinal immune profiling of mild and severe COVID-19 reveals innate and adaptive immune dysfunction and provides an early prediction tool for clinical progression / A.F. Rendeiro, J. Casano, C.K. Vorkas, et al. // *medRxiv [Preprint]*. 2020. Sep 9. 2020.09.08. 20189092. doi: 10.1101/2020.09.08.20189092.

119. Long-term infection of SARS-CoV-2 changed the body's immune status / L. Lin, S. Luo, R. Qin, et al. // *Clin Immunol.* 2020. № 218.108524.

120. Magrone, T. Focus on Receptors for Coronaviruses with Special Reference to Angiotensin- Converting Enzyme 2 as a Potential Drug Target - A Perspective / T. Magrone, M. Magrone // *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2020. Vol. 20 (6). P. 807-811. doi: 10.2174/1871530320666200427112902.

121. Mateu-Salat, M. SARS-COV-2 asa trigger for autoimmune disease: report of two cases of Graves' disease after COVID-19 / M.Mateu-Salat, E. Urgell, A. Chico // *J. Endocrinol. Invest.* 2020. Vol. 43(10). P. 1527–1528. DOI: 10.1007/s40618-020-01366-7.

122. Mattos Dos Santos R. Isolation, social stress, low socioeconomic status and its relationship to immune response in Covid-19 pandemic context // *Brain Behav Immun Health.* 2020. Vol. 7. 100103. doi:10.1016/j.bbih.2020.100103.

123. Meller, S. Th17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26 / S. Meller, J.D. Domizio, K.S. Voo // *Nat. Immunol.* 2015. Vol. 16, № 9. P. 970-979.

124. Memory CD4⁺ T-cell-mediated protection from lethal coronavirus encephalomyelitis / C. Savarin, C.C. Bergmann, D.R. Hinton, et al. // *J Virol.* 2008. Vol. 82. 1243212440.

125. Microbiota-Driven Tonic Interferon Signals in Lung Stromal Cells Protect from Influenza Virus Infection / K.C. Bradley, K. Finsterbusch, D. Schnepf, et al. // *Cell Rep.* 2019. Vol. 28 (1). P. 245–256. e4. DOI:10.1016/j.celrep.2019.05.105.
126. Molecular signaling pathways, pathophysiological features in various organs, and treatment strategies in SARS-CoV2 infection / Y. Rasmi, S. Hatamkhani, R. Naderi, et al. // *Acta Histochem.* 2022. Vol. 124 (5). 151908. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2022.151908>.
127. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity / W.F. Garcia-Beltran, E.C. Lam, K.S. Denis, et al. // *Cell.* 2021. V. 184 (9). P. 2372-83. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.013>.
128. New-onset diabetes in COVID-19 / F. Rubino, S.A. Amiel, P. Zimmet, et al. // *N. Engl. J. Med.* 2020. Vol. 383(8). P. 789–790. DOI: 10.1056/NEJMc2018688.
129. Ni Choileain, S. CD46 processing: a means of expression / S. Ni Choileain, A.L. Astier // *Immunobiology.* 2012. Vol. 217 (2). P.169-175. doi: 10.1016/j.imbio.2011.06.003.
130. NK cells: A double edge sword against SARS-CoV-2 / E. Masselli, M. Vaccarezza, C. Carubbi, et al. // *Adv Biol Regul.* 2020. Vol. 77. 100737. doi: 10.1016/j.jbior.2020.100737.
131. Obesity is a potential risk factor contributing to clinical manifestations of COVID-19 / Z. Kang, S. Luo, Y. Gui, et al. // *Int J Obes (Lond).* 2020. Vol. 44 (12). P. 2479-2485. doi: 10.1038/s41366-020-00677-2.
132. Octamerization enables soluble CD46 receptor to neutralize measles virus in vitro and in vivo / D. Christiansen, P. Devaux, B. Réveil, et al. // *J Virol.* 2000. Vol. 74. P. 4672-4678. doi: 10.1128/jvi.74.10.4672-4678.2000.
133. Patient outcomes after hospitalisation with COVID-19 and implications for follow-up: results from a prospective UK cohort / D.T. Arnold, F.W. Hamilton, A. Milne, et al. // *Thorax.* 2021. Vol. 76 (4). P. 399–401. doi: 10.1136/thoraxjnl-2020-216086.

134. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome / Z. Xu, L. Shi, Y. Wang, et al. // *Lancet Respir Med*. 2020. Vol. 8 (4). P. 420-422.
135. PC-COS project steering committee. A core outcome set for post-COVID-19 condition in adults for use in clinical practice and research: an international Delphi consensus study / D. Munblit, T. Nicholson, A. Akrami, et al. // *Lancet Respir Med*. 2022. Vol. 10(7). P. 715-724. doi: 10.1016/S2213-2600(22)00169-2.
136. PDBe: *Protein Data Bank in Europe*. <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/>(01 May 2021, date last accessed).
137. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking / I.T. Desta, K.A. Porter, B. Xia, et al.// *Structure*. 2020. 28 (9). 1071-81. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.06.006>.
138. Phenotypical and functional alteration of unconventional T cells in severe COVID-19 patients / Y. Jouan, A. Guillon, L. Gonzalez, et al. // *J Exp Med*. 2020. Vol. 217 (12). e20200872. doi: 10.1084/jem.20200872.
139. Pierce, B.G. Accelerating Protein Docking in ZDOCK Using an Advanced 3D Convolution Library / B.G. Pierce, Y. Hourai, Z. Weng // *PLoS One*. 2011. Vol. 6 (9). e24657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024657>.
140. Platelet mitochondrial function and endogenous coenzyme Q10 levels are reduced in patients after COVID-19 / Z. Sumbalova, J. Kucharska, P. Palacka, et al. // *Bratisl Lek Listy*. 2022. Vol. 123 (1). P. 9-15. doi: 10.4149/BLL_2022_002.
141. Pleasure, S.J. The Spectrum of Neurologic Disease in the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Pandemic Infection. Neurologists Move to the Frontlines / S.J. Pleasure, A.J. Green, S.A. Josephson // *JAMA Neurol*. 2020. Vol. 77 (6). P. 679-680. doi:10.1001/jamaneurol.2020.1065.
142. Post-COVID-19 Syndrome / J.D. Pierce, Q. Shen, S.A. Cintron, J.B. Hiebert // *Nurs Res*. 2022. Vol. 71 (2). P. 164-174. doi: 10.1097/NNR.0000000000000565.

143. Post-COVID-19 Syndrome and the Potential Benefits of Exercise / A. Jimeno-Almazán, J.G. Pallarés, Á. Buendía-Romero, et al. // *Int J Environ Res Public Health*. 2021. Vol. 18 (10). 5329. doi: 10.3390/ijerph18105329.
144. Post-COVID-19 Syndrome Base don Disease Formand Associated Comorbidities / R. Cioboata, D. Nicolosu, C.T. Streba, et al. // *Diagnostics (Basel)*. 2022. Vol. 12 (10). 2502. doi: 10.3390/diagnostics12102502.
145. Post-discharge persistent symptoms and health-related quality of life after hospitalization for COVID-19 / E. Garrigues, P. Janvier, Y. Kherabi, et al. // *J. Infect.* 2020. Vol. 81. e4–e6. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.08.029.
146. Postmortem Kidney Pathology Findings in Patients with COVID-19 / D. Santoriello, P. Khairallah, A.S. Bomback, et al. // *J. Am.Soc. Nephrol.* 2020. Vol. 31 (9). P. 2158–2167. DOI: 10.1681/ASN.2020050744.
147. Postolache, T.T. Targetable Biological Mechanisms Implicated in Emergent Psychiatric Conditions Associated With SARS-CoV-2 Infection/ T.T. Postolache, M.E. Benros, L.A. Brenner // *JAMA Psychiatry*. 2021. Vol. 78(4). P. 353-354. doi:10.1001/jamapsychiatry.2020.2795.
148. Potential Neurologic Manifestations of COVID-19 / A.S. Nordvig, K.T. Fong, J.Z. Willey, et al. // *Neurol Clin Pract.* 2021. Vol. 11 (2). P. e135-e146. doi: 10.1212/CPJ.0000000000000897.
149. Proal, A.D. Long COVID or Post-acute Sequelae of COVID-19 (PASC): An Overview of Biological Factors That May Contribute to Persistent Symptoms / A.D. Proal, M.B. Van Elzaker // *Front Microbiol.* 2021. Vol. 2. 698169. doi: 10.3389/fmicb.2021.698169.
150. Profiling of immune dysfunction in COVID-19 patients allows early prediction of disease progression / A.F. Rendeiro, J. Casano, C.K. Vorkas, et al. // *Life Sci Alliance*. 2020. Vol. 4 (2). e202000955. doi: 10.26508/lsa.202000955.
151. Prolonged enhancement of cytotoxic T lymphocytes in the post-recovery state of severe COVID-19 / Y. Mitsuyama, K. Yamakawa, K. Kayano, et al. // *J Intensive Care*. 2021. Vol. 9 (1). 76. doi: 10.1186/s40560-021-00591-3.

152. *Protein Data Bankin Europe: PDBe new service links (RCSB PBD):* <https://www.rcsb.org/>(01 May 2021, date last accessed).
153. Protein Docking Using Case-Based Reasoning / A.W. Ghoorah, M. Smail-Tabbone, M-D. Devignes, et al.// *Proteins*. 2013. Vol. 81 (12). P. 50-2158. <https://doi.org/10.1002/prot.24433>.
154. Psychiatric and neuropsychiatric presentations associated with severe coronavirus infections: asystematic review and meta-analysis with comparisonto the COVID-19 pandemic / J.P.Rogers, E.Chesney, D.Oliver, et al. // *Lancet Psychiatry*. 2020. Vol. 7(7). P. 611–627. DOI: 10.1016/S2215-0366(20)30203-0.
155. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19 / M. Ackermann, S.E. Verleden, M. Kuehne, et al. // *N Engl J Med*. 2020. Vol. 383 (2). P. 120-128. doi: 10.1056/NEJMoa2015432.
156. Recognizing COVID-19-related myocarditis: The possible pathophysiology and proposed guideline for diagnosis and management / B. Siripanthong, S. Nazarian, D.Muser, et al. // *Heart Rhythm*. 2020. Vol. 17 (9). P. 1463-1471. doi: 10.1016/j.hrthm.2020.05.001.
157. Recombinant Human Interleukin-2 Corrects NK Cell Phenotype and Functional Activity in Patients with Post-COVID Syndrome / A.A. Savchenko, I.V. Kudryavtsev, D.V. Isakov, et al. // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023. Vol. 16 (4). 537. doi: 10.3390/ph16040537.
158. Reed, L.J. A simple method of estimating fifty percent end points / L.J. Reed, H. Muench // *The American Journal of Hygiene*. 1938. № 27. P. 493-497.
159. Rehabilitation and COVID-19: the Cochrane Rehabilitation 2020 rapid living systematic review / M.G. Ceravolo, C. Arienti, A. Desire, et al. // *Eur J Phys Rehabil Med*. 2020. Vol. 56. P. 642-651 DOI: 10.23736/S1973-9087.20.06501-6.
160. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China/ H. Su, M. Yang, C. Wan, et al. // *Kidney Int*. 2020. Vol. 98 (1). P. 219–227. DOI: 10.1016/j.kint.2020.04.003.

161. Ritchie, K. The cognitive consequences of the COVID-19 epidemic: collateral damage? / K. Ritchie, D. Chan, T. Watermeyer // *Brain Commun.* 2020. Vol. 2 (2). fcaa069. DOI:10.1093/braincomms/fcaa069.
162. Sakusic A., Rabinstein A.A. Cognitive outcomes after critical illness // *Curr. Opin. Crit. Care.* 2018. Vol. 24 (5). P. 410–414. DOI: 10.1097/MCC.0000000000000527.
163. Sarapultsev, A. Immunological environment shifts during pregnancy may affect the risk of developing severe complications in COVID-19 patients / A. Sarapultsev, P. Sarapultsev // *Am J Reprod Immunol.* 2020. Vol.84 (3). e13285. doi: 10.1111/aji.13285.
164. SARS-CoV-2, ACE2 expression, and systemic organ invasion / U.M. Ashraf, A.A. Abokor, J.M. Edwards, et al. // *Physiol Genomics.* 2021. Vol. 53 (2). P. 51-60. doi: 10.1152/physiolgenomics.00087.2020. Epub 2020 Dec 4.
165. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor / M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, et al. // *Cell.* 2020. Vol. 181 (2). P. 271-280. e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
166. SARS-CoV-2 infection and its effects on the endocrine system / C. Steenblock, N. Toepfner, F. Beuschlein, et al. // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2023. 101761. doi: 10.1016/j.beem.2023.101761.
167. SARS-CoV-2 infection induces beta cell transdifferentiation / Tang X., Uhl S., Zhang T., et al. // *Cell Metab.* 2021. Vol. 33(8). P. 1577-1591. e7. doi: 10.1016/j.cmet.2021.05.015.
168. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans / J.S. Turner, W. Kim, E. Kalaidina, et al. // *Nature.* 2021. Vol. 595 (7867). P. 421-425. doi: 10.1038/s41586-021-03647-4.
169. SARS-CoV-2 infects and replicates in cells of the human endocrine and exocrine pancreas / J.A. Müller, R. Groß, C. Conzelmann, et al. // *Nat Metab.* 2021. Vol. 3 (2). P. 149–165. DOI: 10.1038/s42255-021-00347-1.

170. SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19 / E. Gusev, A. Sarapultsev, L. Solomatina, V. Chereshevnev // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23 (3). 1716. DOI: 10.3390/ijms23031716.

171. SARS-CoV-2 vaccines: A double-edged sword throughout rapid evolution of COVID-19 / M.A. Zolfaghari, F.G. Moghaddam, S. Rajput, et al.// *Cell Biol Int*. 2022. Vol. 46 (12). P. 2009-2017. <https://doi.org/10.1002/cbin.11903>.

172. SARS-CoV-2 Viral RNA Shedding for More Than 87 Days in an Individual With an Impaired CD8⁺ T Cell Response / J.S. Turner, A. Day, W.B. Alsoussi, et al. // *Front Immunol*. 2021. Vol. 11. 618402. doi:10.3389/fimmu.2020.618402.

173. Serum Metabolic Profile in Patients With Long-Covid (PASC) Syndrome: Clinical Implications / E. Pasini, G. Corsetti, C. Romano, et al. // *Front Med (Lausanne)*. 2021. Vol. 8. 714426. doi: 10.3389/fmed.2021.714426.

174. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and the neuroendocrine stress axis / C. Steenblock, V. Todorov, W. Kanczkowski, et al. // *Mol Psychiatry*. 2020. Vol. 25 (8). P. 1611-1617. doi: 10.1038/s41380-020-0758-9.

175. Siena COVID Unit. Peripheral biomarkers' panel for severe COVID-19 patients / M. d'Alessandro, L. Bergantini, P. Cameli, et al. // *J Med Virol*. 2021. Vol. 93(3). P.1230-1232. doi: 10.1002/jmv.26577.

176. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study / C. Huang, L. Huang, Y. Wang, et al. // *Lancet*. 2021. Vol. 397 (10270). P. 220–232. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32656-8.

177. Sixty-day outcomes among patients hospitalized with COVID-19 / V. Chopra, S.A. Flanders, M. O'Malley, et al. // *Ann. Intern Med*. 2021. Vol. 74(4). P. 576–578. DOI: 10.7326/M20-5661.

178. S1-Leitlinie Post-COVID/Long-COVID / A.R. Koczulla, T. Ankermann, U. Behrends, et al. // *Pneumologie*. 2021. Vol. 75 (11). P. 869–900 (in German)]. DOI: 10.1055/a-1551-9734.

179. Soluble forms of CD46 are detected in *Bos taurus* plasma and neutralize BVDV, the bovine pestivirus / N. Alzamel, C. Bayrou, A. Decreux, D. Desmecht // *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2016. Vol. 49. P. 39-46. doi: 10.1016/j.cimid.2016.09.001.
180. Spellberg, B. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the infectious diseases society of America / B. Spellberg, R. Guidos, D. Gilbert // *Clin. Infect. Dis*. 2008. Vol. 46. P. 155-164.
181. Sriram, K. Risks of ACE Inhibitor and ARB Usage in COVID-19: Evaluating the Evidence / K. Sriram, P.A. Insel // *Clin Pharmacol Ther*. 2020. Vol. 108 (2). P. 236-241. <https://doi.org/10.1002/cpt.1863>.
182. Subacute thyroiditis in a patient infected with SARS-COV-2: an endocrine complication linked to the COVID-19 pandemic / R.M. Ruggeri, A. Campenni, M. Siracusa, et al. // *Hormones (Athens)*. 2021. Vol. 20 (1). P. 219–221. DOI: 10.1007/s42000-020-00230-w.
183. Sustained cellular immune dysregulation in individuals recovering from SARS-CoV-2 infection / J.K. Files, S. Boppana, M.D. Perez, et al. // *J Clin Invest*. 2021. V. 131 (1). e140491. doi: 10.1172/JCI140491.
184. Suwanwongse, K. Newly diagnosed diabetes mellitus, DKA, and COVID-19: Causality or coincidence? A report of three cases/ K. Suwanwongse, N. Shabarek // *J. Med. Virol*. 2021. Vol. 93 (2). P. 1150–1153. DOI: 10.1002/jmv.26339.
185. Tee, L.Y. COVID-19 complicated by Hashimoto's thyroiditis / L.Y. Tee, S. Hajanto, B.H. Rosario // *Singapore Med J*. 2021. Vol. 62 (5). 265. doi: 10.11622/smedj.2020106.
186. The CD46-Jagged1 interaction is critical for human TH1 immunity / G. Le Friec, D. Sheppard, P. Whiteman, et al. // *Nat Immunol*. 2012. Vol. 13 (12). P. 1213-1221. doi: 10.1038/ni.2454.
187. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction / J. Yang, R. Yan, A. Roy et al. // *Nat Methods*. 2015. Vol. 12 (1). P. 7-8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>.

188. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection / P. Verdecchia, C. Cavallini, A. Spanevello, F. Angeli // *Eur J Intern Med.* 2020. Vol. 76. P. 14-20. doi: 10.1016/j.ejim.2020.04.037.

189. The prevalence and long-term health effects of Long Covid among hospitalised and non-hospitalised populations: A systematic review and meta-analysis / L.L. O'Mahoney, A. Routen, C. Gillies, et al. // *eClinical Medicine.* 2023. Vol. 55. 101762. doi: 10.1016/j.eclinm.2022.101762.

190. The Science Underlying COVID-19: Implications for the Cardiovascular System / P.P Liu, A. Blet, D. Smyth, H. Li // *Circulation.* 2020. Vol. 142 (1). P. 68-78. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047549.

191. TMPRSS2 expression dictates the entry route used by SARS-CoV-2 to infect host cells / J. Koch, Z.M. Uckelely, P. Doldan, et al. // *EMBO J.* 2021. Vol. 40 (16). e107821. doi: 10.15252/embj.2021107821.

192. Tobi, D. Designing coarse grained-and atom based-potentials for protein-protein docking // *BMC Struct Biol.* 2010. Vol. 10. 40. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-10-40>.

193. Tobi, D. Distance-dependent, pair potential for protein folding: Results from linear optimization / D. Tobi, R. Elber // *Proteins.* 2000. Vol. 41 (1). P. 40-46.

194. Tovchigrechko, A. Development and testing of an automated approach to protein docking / A. Tovchigrechko, I.A. Vakser // *Proteins.* 2005. Vol. 60 (2). P. 296-301. <https://doi.org/10.1002/prot.20573>.

195. Understanding Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling in Vascular Pathophysiology / S. Eguchi, T. Kawai, R. Scalia, V. Rizzo // *Hypertension.* 2018. Vol. 71 (5). P. 804-810. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10266.

196. Understanding the COVID-19 via the Comparative Analysis of the Dark Proteomes of SARS-CoV-2, Human SARS and Bat SARS-Like Coronaviruses / R. Giri, T. Bhardwaj, M. Shegane, et al. // *Cell Mol Life Sci.* 2021. Vol. 78(4). P. 1655-1688. doi.org/10.1007/s00018-020-03603-x.

197. UniProt. <https://www.uniprot.org/>(01 May 2021, date last accessed).

198. Vasile C. Mental health and immunity (Review) // *Exp Ther Med*. 2020. Vol. 20 (6). 211. doi: 10.3892/etm.2020.9341.
199. Viral presence and immunopathology in patients with lethal COVID-19: a prospective autopsy cohort study / B. Schurink, E. Ross, T. Radonic, et al. // *The Lancet. Microbe*. 2020. Vol. 1, iss. 2666-5247. DOI:10.1016/S2666-5247(20)30144-0.
200. Walsh C. Where will new antibiotics come from? // *Nat. Rev. Microbiol*. 2003. Vol. 1, № 1. P. 65-70.
201. Wenzhong, L. COVID-19: Attacks the 1-Beta Chain of hemoglobin and captures the porphyrin to inhibit human heme metabolism / L. Wenzhong, L. Hualan. 2020. doi:10.26434/chemrxiv.11938173.v9.
202. WHO Clinical Case Definition Working Group on Post-COVID-19 Condition. A clinical case definition of post-COVID-19 condition by a Delphi consensus / J.B. Soriano, S. Murthy, J.C. Marshall, et al. // *Lancet Infect Dis*. 2022. Vol. 22 (4). P. e102-e107. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00703-9.
203. WHO: First ever list of antibiotic-resistant “priority pathogens”. GENEVA, 2017. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed>.
204. WHO. *Weekly epidemiological update on COVID-19 - 20 July 2023: Edition 152*. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---20-july-2023> (25 July 2023, date last accessed).
205. Yount, N.Y. Emerging themes and therapeutic prospects for anti-infective peptides / N.Y. Yount, M.R. Yeaman // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2012. Vol. 52. P. 337-360.
206. Zhang, Y. Scoring function for automated assessment of protein structure template quality / Y. Zhang, J. Skolnick // *Proteins*. 2004. Vol. 57 (4). P. 702-710. <https://doi.org/10.1002/prot.20264>.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность за помощь, оказанную в работе:

- коллективу сотрудников лаборатории иммунопатофизиологии Института иммунологии и физиологии УрО РАН (в.н.с., д.м.н., профессору, ЗДН РФ Зурочке А.В., д.м.н. Зурочке В.А. и др.);

- д.м.н., профессору Гриценко В.А., сотруднику Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН;

- коллективу сотрудников лаборатории вирусологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, в том числе, с д.б.н. Зарубаеву В.С.;

- коллективу лаборатории информационных технологий в фармакологии и компьютерного моделирования лекарств Научного центра инновационных лекарственных средств ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России под руководством д.б.н., проф. Васильева П.М.;

- д.м.н., профессору Праскурничему Е.А., заведующему кафедрой терапии Медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации.

Моим научным консультантам д.б.н. Сарапульцеву А.П. и д.м.н., доценту Рябовой Л.В.