

Министерство здравоохранения Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Самарский государственный медицинский университет»

На правах рукописи

**Иванов Михаил Федорович**

**ИММУНОПАТОГЕНЕЗ И ИММУНОДИАГНОСТИКА  
ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ  
С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ**

3.2.7. Иммунология

Диссертация

на соискание ученой степени доктора медицинских наук

**Научный консультант:**

Балмасова Ирина Петровна,  
доктор медицинских наук, профессор  
Заслуженный деятель науки РФ

Самара – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	С.
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 – СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ГЕМОМРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ И ЕЕ ИММУНОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ	20
1.1 – Эпидемиология и этиология геморрагической лихорадки с почечным синдромом	20
1.2 – Ортохантавирусы и обусловленные ими патогенетические механизмы геморрагической лихорадки с почечным синдромом, связь с клиническими проявлениями заболевания	25
1.3 – Реакции врожденного иммунитета при геморрагической лихорадке с почечным синдромом	35
1.4 – Реакции адаптивного иммунного ответа при геморрагической лихорадке с почечным синдромом	41
1.5 – Лабораторная и иммунологическая диагностика геморрагической лихорадкой с почечным синдромом	45
1.6 – Этиотропная терапия и специфическая профилактика геморрагической лихорадки с почечным синдромом	48
Резюме к главе 1	53
ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	56
2.1 – Характеристика объектов и дизайн исследования	56
2.2 – Методы исследования	62
2.2.1 – Клинико-лабораторные критерии диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом	62
2.2.2 – Общеклинические лабораторные исследования	63
2.2.3 – Молекулярно-биологические методы исследования	65
2.2.4 – Иммунологические методы исследования	65
2.3 – Методы статистического анализа	68
ГЛАВА 3 – ГЕМОМРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ: ПАТОГЕНЕЗ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА В НАЧАЛЬНЫЙ ПЕРИОД	70
3.1 – Клинико-лабораторная характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом в начальный период, дифференциально-диагностическое значение	70

3.2 – Иммунологическая характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом в начальный период, дифференциально-диагностическое значение	86
3.3 – Интегральный подход к оценке лабораторно-иммунологических показателей в начальный период геморрагической лихорадки с почечным синдромом как дифференциально-диагностический прием на ранних этапах заболевания	106
Обсуждение главы 3	121
Список работ, опубликованных по материалам, изложенным в 3 главе	133
<b>ГЛАВА 4 – ГЕМОМРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ В НАЧАЛЬНЫЙ ПЕРИОД</b>	136
4.1 – Клинико-лабораторная характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период	136
4.2 – Иммунологическая характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период	149
4.3 – Интегральный подход к оценке лабораторно-иммунологических показателей в начальный период геморрагической лихорадки с почечным синдромом как способ определения риска тяжелого течения заболевания	162
Обсуждение главы 4	167
Список работ, опубликованных по материалам, изложенным в 4 главе	175
<b>ГЛАВА 5 – КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ИММУНОПАТОГЕНЕЗ ГЕМОМРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В ОЛИГОУРИЧЕСКИЙ И ПОЛИУРИЧЕСКИЙ ПЕРИОДЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ</b>	176
5.1 – Общая характеристика пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом и серологический диагноз заболевания	176
5.2 – Клинико-лабораторная характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом разной степени тяжести в олигоурический период заболевания	178
5.3 – Иммунологическая характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом разной степени тяжести в олигоурический период заболевания	193

5.4 – Клинико-лабораторная характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом разной степени тяжести в полиурический период заболевания	210
5.5 – Иммунологическая характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом разной степени тяжести в полиурический период заболевания	222
Обсуждение главы 5	232
Список работ, опубликованных по материалам, изложенным в 5 главе	244
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	247
ВЫВОДЫ	264
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	266
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	268
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	270

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – острое вирусное природно-очаговое заболевание, характеризующееся системным поражением мелких сосудов, геморрагическим диатезом, гемодинамическими расстройствами и развитием острого повреждения почек по типу интерстициального нефрита [8, 10, 14, 56, 57].

ГЛПС распространена по всему миру. Она наблюдается в скандинавских странах (Швеция, Норвегия, Финляндия), Болгарии, Югославии, Чехословакии, Бельгии, Франции, на Дальнем Востоке и в Китае, КНДР, Южной Корее [9, 231, 286, 405]. В настоящее время ежегодно во всем мире регистрируется около 150000 случаев ГЛПС [16, 419]. В Российской Федерации ГЛПС по уровню заболеваемости занимает первое место среди природно-очаговых болезней [52, 366], при этом природные очаги на территории России характеризуются высокой эпидемической активностью и являются одними из самых напряженных в мире [11, 409]. Так, в 2022 г. в России отмечен рост заболеваемости ГЛПС в три раза по сравнению с показателями 2021 г., при этом, в связи с изменениями природно-климатических условий, значительно выросло выявление грызунов, инфицированных вирусным возбудителем этого заболевания, что свидетельствует о высокой вероятности осложнения эпидемиологической обстановки на территориях повышенной эпидемической опасности по ГЛПС [48].

Возбудителями ГЛПС являются ортохантавирусы, относящиеся к категории одноцепочечных РНК-содержащих вирусов и принадлежащие к семейству *Hantaviridae*, роду *Orthohantavirus* [162, 214]. К настоящему времени известны более 24 серологически и генетически отличающихся друг от друга ортохантавирусов [285], вызывающих две клинические формы ортохантавирусной

инфекции у людей: геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС) в Европе и Азии и хантавирусный легочный синдром в Америке [200, 231, 339].

На территории России встречается ГЛПС, этиологически связанная с 6 типами ортохантавирусов: *Puumala*, *Hantaan*, *Seoul*, *Amur*, *Dobrava*, *Sochi* [10, 31]. На территории Приуралья и Среднего Поволжья, где проводилось данное исследование, встречается только вид *Orthohantavirus puumalaense* (*Puumala*) [14, 30], а основным природным резервуаром является европейская рыжая полевка [1, 20].

Тяжесть течения заболевания зависит от варианта ортохантавируса, при этом летальность колеблется от 1 % до 40 % [174, 207], при этом одной из основных причин летальных исходов при ГЛПС служит инфекционно-токсический шок [10]. Наиболее легкое течение ГЛПС при минимальной летальности (0,1 %) этиологически обусловлено вирусом *Puumala* [155, 279]. Тем не менее, даже в последнем случае полное восстановление деятельности почек происходит только у больных легкой формой ГЛПС, а у больных со среднетяжелой и тяжелой формами заболевания сохраняются нарушения как со стороны почек, так и гормональной системы, которые восстанавливаются в течение 1-4 лет [11, 219].

Клиническая картина ГЛПС, описанная многочисленными авторами из разных регионов мира и ассоциированная с разными ортохантавирусами, демонстрирует сходство основных проявлений болезни. Генерализованный характер инфекции с вовлечением в патологический процесс различных органов и систем обуславливает полиморфизм симптоматики независимо от этиологического агента (вида ортохантавируса) [14, 31, 48, 100, 154]. Болезнь характеризуется циклическим течением и многообразием клинических вариантов от abortивных лихорадочных форм до тяжелого течения с геморрагическим синдромом и стойким повреждением почек [10, 167, 252], что и придает проблеме ГЛПС актуальность [34].

Актуальность проблемы геморрагической лихорадки с почечным синдромом, как и других геморрагических лихорадок, в XXI веке значительно

возросла в связи с тем, что вирусные возбудители этих инфекций стали рассматриваться в качестве биологического оружия [49, 90, 129].

В патогенезе ГЛПС на первый план выступают иммунологические сдвиги, дисфункция тромбоцитов и генетические особенности клеток-мишеней макроорганизма [3, 248, 263, 362]. Подчеркивая ведущую роль иммунной системы при ортохантавирусных инфекциях, в частности, ГЛПС, исследователи отмечают как прямые, так и опосредованные эффекты ортохантавирусов при очень широком спектре их клеточных мишеней, в число которых входят, наряду с эндотелиальными, эпителиальными клетками и тромбоцитами, макрофаги, дендритные клетки, лимфоциты, нейтрофилы, имеющие непосредственное отношение к развитию иммунного ответа [250]. В связи с этим, ГЛПС присуще наличие системного воспаления, сопровождающегося «цитокиновым штормом» [242, 339, 388].

В настоящее время исследователи значительно продвинулись в изучении отдельных сторон иммунопатогенеза ГЛПС и механизмов участия в иммунном процессе при данном заболевании отдельных клеток и молекулярных компонентов иммунной системы [200, 232, 246]. Особый интерес в последние годы проявляется к иммунным механизмам, определяющим тяжесть течения инфекционного процесса, а также методам ранней иммунодиагностики этого заболевания [167, 201, 280].

Несмотря на это, следует признать, что при всем интересе исследователей к иммунопатогенезу ГЛПС, накопленные сведения пока носят отрывочный характер и плохо сопоставляются друг с другом, что нарушает целостность представлений о том, что происходит с иммунным ответом при ГЛПС. Это препятствует успешной разработке и внедрению средств специфической терапии и иммунопрофилактики данного заболевания, поскольку в одном из последних зарубежных обзоров литературы по проблеме отмечается, что пока не существует специального лечения или одобренной на международном уровне профилактической вакцины для ГЛПС [200].

Учитывая обозначенные аспекты проблемы, можно констатировать, что исследование иммунопатогенеза с разработкой основанных на нем приемов иммунодиагностики ГЛПС до сих пор остается актуальной проблемой.

### **Степень разработанности темы исследования**

Научное направление по изучению иммунопатогенеза ГЛПС, вызванной ортохантавирусом *Puumala*, было основано в 70-х годах XX века на кафедре инфекционных болезней Куйбышевского медицинского института (в настоящее время Самарского государственного медицинского университета) профессором Рощупкиным В.И. и продолжено его последователями: профессорами Суздальцевым А.А., Морозовым В.Г., Алексеевым О.А., Стальной Л.Н., Стребковой Е.А., Веховой Е.В. и др. За последнее десятилетие в регионе Среднего Поволжья и Приуралья появился целый ряд отечественных научных школ, детально изучающих вопросы эпидемиологии, патогенеза, диагностики и лечения ГЛПС, вызванной ортохантавирусами *Puumala*.

Как подчеркивается в современной научной литературе, ортохантавирусная инфекция приводит к чрезмерной активации иммунитета, сопровождаемой «цитокиновым штормом» и выраженной стимуляцией функций цитотоксических лимфоцитов [81, 123, 232, 336, 361, 373] как в кровотоке, так и в отдельных органах, в первую очередь, в почках [196, 313, 335, 336]. Названная особенность иммунного реагирования при ГЛПС, по всей вероятности, может быть объяснена отсутствием у ортохантавирусов цитопатического эффекта при их способности препятствовать апоптозу инфицированных клеток и модулировать их функции [186, 200, 247].

На начальных этапах развития ГЛПС вирусный возбудитель поступает в организм преимущественно через дыхательные пути, реже через кожу [31, 333]. В связи с этим, в поле зрения исследователей, прежде всего, попадают HLA-DR-позитивные клетки врожденного иммунитета с антиген-презентирующими свойствами – моноциты/макрофаги и дендритные клетки, число которых в месте локализации патогена резко возрастает. Обнаруживается высокая корреляция между ростом числа CD123<sup>+</sup> плазмоцитоидных дендритных клеток и CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов [335]. В этом контексте особый интерес

представляют данные о возможности пополнения пула дендритных клеток в связи с трансформацией в них моноцитов под влиянием ортохантавируса [318]. Следует подчеркнуть, что данные о содержании в крови всех указанных клеток при ГЛПС очень противоречивы. Например, есть свидетельства как об увеличении содержания моноцитов в крови [326], так и, наоборот, о его резком снижении [335].

Столь же противоречивы данные и о роли натуральных киллеров (НК) - клеток врожденного иммунитета при ГЛПС. В активном участии НК в иммунопатогенезе этого заболевания исследователи практически не сомневаются, однако функции этих клеток тесно связывают со сроками исследования биологического материала, в частности, периферической крови. В начале заболевания число НК в крови падает, что авторы связывают с их миграцией в органы-мишени [84, 257], затем их число возрастает и достигает пика примерно к 10-му дню болезни и держится на этом уровне, по меньшей мере, 2 месяца [85, 313]. Что касается механизма активации НК, то исследователи придают особое значение лектиновым активирующим рецепторам этих клеток (NKG2D), высокий уровень экспрессии которых на мембране НК связан с индукцией ортохантавирусом одного из их лигандов – стрессиндуцированных молекул MICA и MICB, экспрессируемых инфицированными эндотелиальными клетками [200].

Довольно много вопросов возникает и при исследовании иммунопатогенетического значения CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) при ГЛПС. Известно, что число этих клеток преобладает над содержанием в крови Т-хелперной (CD4<sup>+</sup>) субпопуляции [232], однако, когда речь идет о механизмах реализации антиген-специфического ответа и формирования иммунологической памяти с участием этих клеток, высказывается множество разных суждений, что особо подчеркивается исследователями, работающими в этом направлении [190, 368].

Существует определенный интерес и к содержанию в крови регуляторных Т-клеток с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> при ГЛПС [201, 241, 246, 392]. Есть экспериментальные и клинические данные об их активном участии в иммунопатогенезе этой инфекции [97, 148, 164]. Наряду с этим, в современной

литературе встречаются сведения о том, что  $CD4^+$  Т-клетки с регуляторным фенотипом присутствуют в периферической крови во время острой хантавирусной инфекции, но число их не увеличивается [232]. В то же время некоторыми авторами обсуждается вопрос о диагностическом значении числа этих клеток при прогнозировании тяжести течения ГЛПС [201]. В доступной литературе отсутствуют публикации об иммунопатогенетическом значении  $CD3^+CD8^+FoxP3^+$  регуляторных Т-клеток при данном заболевании.

Исследователи проблемы иммунопатогенеза ГЛПС подчеркивают, что до сих пор отсутствуют всесторонние исследования в отношении реакций В-клеток, нетрадиционных Т-клеток, таких как ассоциированные со слизистой оболочкой НКТ и  $\gamma\delta$ Т-клетки, а также лимфоцитов врожденного иммунитета (ILCs), особенно при острой инфекции, вызванной ортохантавирусом *Puumala* [200].

Имеются сведения и о некоторых особенностях цитокинового профиля при ГЛПС с учетом типа возбудителя. Так, для ортохантавирусов вида *Puumala* в литературе указывается на высокий уровень в плазме крови IL-6, ассоциированного с повреждением почек и тромбоцитопенией при ГЛПС [293]. Для ГЛПС в целом особое значение в патогенезе придается провоспалительному и проапоптотическому цитокину TNF $\alpha$  [83, 199, 213, 227, 323].

Что касается вопросов иммунодиагностики ГЛПС, то детально они разработаны только в аспекте специфической серодиагностики данного заболевания, а многообразие и неспецифичность клинических проявлений ГЛПС в начале заболевания приводят к тому, что довольно часто больные направляются в стационар с диагнозами «лихорадка неясного генеза», «ОРВИ», «пневмония» [28].

Следует подчеркнуть, что серодиагностика в силу простоты постановки тестов и их экономической доступности является основным методом верификации диагноза ГЛПС, при этом было показано, что В-клеточные эпитопы, локализующиеся на G1 и G2 белках не выявляют различий между хантавирусами, принадлежащими разным серотипам [208]. Серологические реакции воспроизводят как в парных сыворотках, так и путем регистрации антител к хантавирусам, принадлежащих отдельным классам/подклассам иммуноглобулинов

[10, 185, 245, 281]. В последнем случае удается установить и серотип возбудителя при использовании в качестве диагностикумов для ИФА рекомбинантных белков нуклеокапсида хантавирусов (белок N), принадлежащих разным серотипам [68, 167]. Однако у больных с сопутствующей онкопатологией возможен ложнопозитивный результат [33], что объясняется схожестью структуры молекул нуклеокапсида хантавирусов и опухолевого супрессорного фактора PD-1 у человека [336]. В любом случае результаты серодиагностики становятся достоверными не ранее 7-11 дня заболевания [185].

Более рациональным, хотя и значительно более сложным для воспроизведения, при ГЛПС является выделение ортохантавирусной РНК с применением гнездовой ПЦР с обратной транскрипцией и последующей амплификацией и секвенированием нуклеотидных последовательностей РНК-сегментов ортохантавирусного генома [10, 100, 167, 168].

В соответствии с указанными особенностями специфических диагностических методов возникает проблема ранней диагностики ГЛПС с учетом необходимости раннего прогнозирования тяжести течения заболевания с использованием неспецифических (суррогатных) маркеров. Например, в качестве раннего признака ГЛПС, появляющегося уже в лихорадочный период, некоторые авторы отмечают рост уровня гомоцистеина, достигающего максимума в олигоурический период и сохраняющего высокие значения на протяжении всего заболевания [50]. Помимо отдельных тестов для прогнозирования тяжелого течения, создаются комплексы тестов и шкалы для их оценки: например, SAPS II, SOFA, H-SOFA, что значительно повышает эффективность прогноза [411]. В последние годы к числу суррогатных маркеров тяжести течения ГЛПС относят такие иммунологические показатели как высокий уровень экспрессии моноцитами CD163 и CD206 [225], обнаружение растворимой формы маркера плазматических клеток (В-лимфоцитов) sCD138 в крови [224].

Несмотря на отдельные достижения, представленный список «белых пятен» в изучении проблемы ГЛПС с иммунологических позиций можно было бы продолжать, в связи с чем и возникли цель и задачи настоящего исследования. При

этом особый интерес с позиций разработки эффективных способов таргетной терапии и специфической профилактики ГЛПС представляет тип ортохантавируса *Puumala*, наиболее распространённый на территории Среднего Поволжья.

**Цель исследования:** расшифровка неизвестных сторон иммунопатогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вызванной ортохантавирусом *Puumala*, с последующей разработкой приемов ранней иммунодиагностики и иммунопрогнозирования тяжести течения данного заболевания.

#### **Задачи исследования**

1. Охарактеризовать особенности пусковых механизмов иммунного ответа с участием оригинального фенотипического набора лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунитета и его цитокинового сопровождения при геморрагической лихорадке с почечным синдромом в сравнении с острыми респираторными вирусными инфекциями.

2. Разработать систему ранних маркеров геморрагической лихорадки с почечным синдромом на основе особенностей клинико-лабораторной и иммунологической оценки этого заболевания в начальный период при дифференциальной диагностике с острыми респираторными вирусными инфекциями.

3. Выявить особенности пусковых механизмов иммунного ответа с участием оригинального фенотипического набора лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунитета и его цитокинового сопровождения, влияющие на тяжесть течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом.

4. Определить прогностические критерии тяжелого течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом с учетом иммунологических сдвигов в начальный период заболевания на основе анализа рутинных лабораторных показателей, фенотипических характеристик лимфоцитов крови, цитокинового профиля пациентов.

5. Установить особенности иммунного реагирования пациентов на возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом в разгар заболевания с участием оригинального фенотипического набора лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунитета и его цитокинового сопровождения.

6. Разработать схему иммунопатогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом на разных стадиях инфекционного процесса с учетом данных по оценке патогенетической и протективной роли оригинального фенотипического набора лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунитета и его цитокинового сопровождения.

### **Научная новизна исследования**

В процессе выполнения работы впервые был установлен целый ряд не описанных ранее феноменов:

- с начального периода у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом активационный процесс у цитотоксических Т-лимфоцитов осуществляется NKG2D-зависимым путем, а число лимфоцитов, экспрессирующих NKG2D (CD314), то есть с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD314<sup>+</sup>, статистически значимо возрастает;
- в число характерных признаков геморрагической лихорадки с почечным синдромом входит высокое содержание в крови уровня IL-15, коррелирующее с числом CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> Т-лимфоцитов, экспрессирующих активирующий рецептор NKG2D (CD314);
- при тяжелом течении геморрагической лихорадки с почечным синдромом число регуляторных Т-клеток с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> по сравнению со среднетяжелым течением статистически значимо падает, в то время как число Treg с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> достоверно возрастает;
- у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом особое патогенетическое значение имеют характерный для данного заболевания рост уровней в крови IL-6 и IL-10;
- в олигоурический и полиурический периоды у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом зарегистрирован довольно значительный рост содержания в крови НКТ (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), принадлежащих к субпопуляции CD8<sup>+</sup>;
- в первую неделю развития геморрагической лихорадки с почечным синдромом (до наступления сероконверсии) для дифференциальной диагностики

данного заболевания можно использовать ранний неспецифический интегральный показатель (РНИП), вновь разработанный на основе валидных рутинных лабораторных и иммунологических показателей;

- в начальный период геморрагической лихорадки с почечным синдромом можно прогнозировать тяжелое течение заболевания с помощью прогностического критерия тяжелого течения (ПКТТ), вновь разработанного на основе информативных рутинных лабораторных и иммунологических показателей;

- оценка полученных результатов позволила предложить новую схему иммунопатогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вызванной ортохантавирусом *Puumala*, которая основана на следующих положениях:

- при геморрагической лихорадке с почечным синдромом на фоне высокой антигенной нагрузки, на ранних этапах заболевания, у больных включаются механизмы контрлирующие выраженность системного воспаления и цитотоксических реакций врожденного иммунитета, ключевым звеном которых являются регуляторные Т-клетки с фенотипом  $CD3^+CD8^+CD25^+FoxP3^+$ ;

- иммуносупрессорного контроля регуляторных Т-клеток удастся избежать цитотоксическим Т-лимфоцитам с фенотипом  $CD3^+CD8^+CD56^-CD314^+$ , экспрессирующим активирующий лектиновый рецептор NKG2D, что способствует значительному нарастанию числа этих клеток в крови и раннему формированию пула  $CD8^+$  Т-клеток памяти при поддержке IL-15; в случае подверженности этих клеток иммуносупрессорному контролю развивается тяжелое течение геморрагической лихорадки с почечным синдромом;

- в разгар геморрагической лихорадки с почечным синдромом в условиях меняющегося цитокинового профиля и преобладания NKG2D-зависимого цитотоксического механизма у Т-лимфоцитов происходит активация  $CD8^+$  НКТ, то есть  $NKG2D^+$  НКТ с присущей им гиперпродукцией цитокинов и цитолитическими свойствами.

### **Теоретическая и практическая значимость результатов исследования**

Теоретическая значимость диссертационной работы связана с расшифровкой неизвестных ранее иммунопатогенетических механизмов, присущих ГЛПС, их

обобщением в виде схем иммунопатогенеза ГЛПС в каждый клинический период и построением рабочих гипотез, объясняющих их развитие и роль при тяжелом течении заболевания на современном уровне знаний. Так, было установлено, что основной особенностью иммунопатогенеза ГЛПС является уникальное сочетание механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответа с ключевым участием одной и той же категории лимфоцитов адаптивного иммунного ответа –  $\text{NKG2D}^+$  CTL.

Практическая значимость исследования связана с разработкой новых прогностически и диагностически значимых показателей – прогностического критерия тяжелого течения (ПКТТ), позволяющего прогнозировать тяжелое течение в начальном (лихорадочном) периоде ГЛПС, а также раннего неспецифического интегрального показателя (РНИП), дающего возможность диагностировать ГЛПС на первой неделе заболевания еще до развития диагностически значимой сероконверсии.

#### **Методология и методы исследования**

Основной методологический подход к выполнению работы по изучению проблемы ГЛПС заключался в исследовании ее иммунопатогенеза путем выявления взаимосвязи между общепринятыми в клинической практике лабораторными исследованиями при данном заболевании и иммунологическими показателями, учета клинических периодов и тяжести течения ГЛПС, получения доказательств валидности установленных информативных признаков.

Работа включала клинико-лабораторное и иммунологическое наблюдение пациентов с серологически верифицированным диагнозом ГЛПС – 65 человек, а также пациентов с острой респираторной вирусной инфекцией (ОРВИ) – 20 человек, здоровых людей – 15 человек. Кроме этого, были сформированы 2 группы для тестирования вновь разработанных диагностических критериев – раннего неспецифического интегрального показателя (РНИП) ГЛПС (36 пациентов в начальный период ГЛПС) и прогностического критерия тяжелого течения (ПКТТ) ГЛПС (25 пациентов в начальный период ГЛПС).

Методы исследования включали:

- клиническую оценку пациентов с выделением отдельных периодов ГЛПС и степени тяжести течения заболевания в соответствии с клиническими рекомендациями, утвержденными Министерством здравоохранения РФ;

- проведение рутинных лабораторных исследований (клинический и биохимический анализ крови, клинический анализ и проба Нечипоренко мочи) при ГЛПС в разные периоды и разной степени тяжести заболевания, в том числе путем сравнения их результатов на начальных этапах заболевания с ОРВИ и острым поражением почек токсической природы;

- проточную цитофлуориметрию крови в исследуемых группах с целью получения традиционных и оригинальных фенотипических характеристик лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунного ответа;

- иммуноферментный анализ для изучения цитокинового профиля крови в исследуемых группах.

Полученные данные анализировались методами описательной и сравнительной непараметрической статистики, корреляционного и регрессионного анализа, путем определения 95 % доверительного интервала показателей и построения ROC-кривых их диагностической значимости на основе пакета статистических программ SPSS, версия 23.

Исследование включало сопоставление собственных данных с результатами, полученными другими исследователями, предложение рабочих схем иммунопатогенеза ГЛПС на каждом этапе заболевания и оригинальных трактовок в оценке собственных результатов, обсуждение диагностического значения проведенных исследований.

### **Личное участие автора в получении результатов**

Личный вклад автора в выполнение работы включал планирование исследования, анализ научной литературы по проблеме, сбор клинического материала по диссертационной работе, участие в выполнении лабораторных исследований, обработку и статистический анализ полученных данных. Автором самостоятельно сформулированы основные положения, выводы диссертации и практические рекомендации, оформлены публикации и патенты по теме

диссертации, результаты исследования представлены на конференциях и конгрессах, написан текст диссертационной работы.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. На примере дифференциальной диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом и острых респираторных вирусных инфекций удалось установить, что иммунопатогенез геморрагической лихорадки с почечным синдромом на ранних этапах инфекционного процесса включает неизвестные ранее для данного заболевания механизмы противовирусного иммунитета.

2. Установленные особенности иммунопатогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом в сочетании с рутинными клинико-лабораторными признаками этого заболевания в первые дни его клинических проявлений служат основой для разработки критериев дифференциальной диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом и острых респираторных вирусных инфекций.

3. Состояние механизмов контроля активационного процесса у цитотоксических Т-лимфоцитов с участием рецептора NKG2D влияет на развитие тяжелого течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом и может быть использовано в начальный период заболевания для прогнозирования риска тяжелого течения.

4. При геморрагической лихорадке с почечным синдромом в разгар заболевания (в олигоурический и полиурический периоды) иммунные реакции противовирусной защиты с участием механизмов NKG2D-зависимой активации цитотоксических Т-клеток и их контроля со стороны CD8<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток могут поддерживаться субпопуляцией CD8<sup>+</sup> НКТ, что отражает вновь разработанная схема иммунопатогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом.

### **Соответствие диссертации паспорту специальности**

Диссертационное исследование соответствует пунктам 2, 3, 6 паспорта специальности 3.2.7. Иммунология (медицинские науки):

## **Степень достоверности и апробация результатов**

Апробация диссертации проведена на совместном заседании кафедр общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии, инфекционных болезней с курсом эпидемиологии, профессиональных болезней с курсом клинической фармакологии им. Заслуженного деятеля науки РФ профессора В.В. Косарева и детских инфекций Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (далее - ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России), протокол № 3 от 27.06.2024 г.

Проведение работы одобрено Комитетом по биоэтике при ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (протокол № 200 от 22.05.2016 г.). Тема диссертации утверждена на заседании Ученого совета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (протокол № 6 от 26.12.2019 г.).

Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

- XXIII Всемирном конгрессе по клинической медицине и иммунореабилитации (Нью-Йорк, США, 28 апреля – 1 мая 2017 г.);
- Международной научной конференции «Медицина, фармацевтика, здоровье – 2017» (Москва, Россия, 10 ноября 2017 г.);
- XXV Всемирном конгрессе по реабилитации в медицине и иммунореабилитации (Барселона, Испания, 19 – 25 апреля 2018 г.);
- XII Всемирном конгрессе по ХОБЛ, астме и респираторной аллергии (Дубай, ОАЭ, 2 – 5 февраля 2018 г.);
- XII Всемирном конгрессе по астме, аллергии и ХОБЛ и II Международном конгрессе по молекулярной аллергологии (Санкт-Петербург, Россия, 29 июня – 2 июля 2019 г.);
- Объединенном иммунологическом форуме (Новосибирск, Россия, 24 – 28 июня 2019 г.);
- XIII Всемирном конгрессе по астме, аллергии и ХОБЛ и III Международном конгрессе по молекулярной аллергологии (Москва, Россия, 22 – 24 октября 2020 г.);

- III Объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи-Дагомыс, Россия, 3-8 октября 2021 г.).

По материалам диссертации опубликована 31 печатная работа, из них 13 публикаций - в журналах, рекомендованных ВАК РФ по специальности 3.2.7. Иммунология и/или индексируемых в международных системах цитирования Scopus, Web of Science, RSCI. По материалам диссертации получен патент РФ на изобретение «Способ прогнозирования тяжелого течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом на ранних этапах заболевания» № 2790962 от 28.02.2023 г. и свидетельство № 2023662769 о регистрации программы для ЭВМ «Калькулятор ранней лабораторной диагностики и прогнозирования тяжелого течения ГЛПС».

### **Внедрение результатов**

Полученные результаты исследования используются в учебном процессе (лекционном курсе, на практических занятиях) со студентами, ординаторами, слушателями факультета повышения квалификации на кафедрах общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии, инфекционных болезней с эпидемиологией, общей и клинической патологии: патологической анатомии, патологической физиологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, а также в лечебной работе клиники инфекционных болезней ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, инфекционных больниц городов Самара и Тольятти.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертация изложена на 316 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы по материалам и методам исследования, трёх глав собственных исследований с обсуждением результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 26 таблицами, 76 рисунками, 4 клиническими примерами. Список использованной литературы содержит 428 источников, из них 62 отечественных и 366 зарубежных авторов.

# ГЛАВА 1 – СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ И ЕЕ ИММУНОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ

## 1.1 – Эпидемиология и этиология геморрагической лихорадки с почечным синдромом

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – острое вирусное природно-очаговое заболевание, проявляющееся геморрагическим синдромом, гемодинамическими расстройствами и острым поражением почек [8, 10, 14]. Эпидемическая геморрагическая лихорадка с нефропатией как самостоятельная нозология была описана в 1930 г. в Швеции [348]. Несколько позднее (1944 г.) А.А. Смородинцевым была доказана вирусная природа ГЛПС [10]. Первая серьезная вспышка ГЛПС произошла во время Корейской войны (1950-1953), когда более чем 3000 военнослужащих из войск Организации Объединенных Наций были поражены этим заболеванием [150]. В 1967 г. А.Д. Лебедев выделил шесть очаговых областей, где были отмечены значительные вспышки заболеваемости ГЛПС – Амуро-Корейская, Восточно-Европейская, Карпато-Балканская, Кавказская, Скандинавская [41]. В 1976 г. южнокорейскому ученому Н.В. Lee удалось выделить из легких грызуна *Apodemus agrarius coreae* вирус *Hantaan*, а в 1978 г. им же был выделен аналогичный возбудитель, принадлежащий к роду хантавирусов (в настоящее время ортохантавирусов), и от человека [220].

Позднее оказалось, что хантавирусы вызывают у человека не только ГЛПС [231]. В 1993 г. было установлено, что синдром неизвестной ранее этиологии, проявляющийся поражением легких и шоком и встречающийся на юго-западе США, тоже вызывается хантавирусом (вирусом *Sin Nombre*), передается человеку от мышей *Peromyscus maniculatus* и получил название хантавирусный легочный синдром (ХЛС) [282]. Другой тип хантавирусов (*Andes virus*), вызывающих ХЛС,

был обнаружен в 1995 г. в Аргентине [243]. Позднее удалось доказать хантавирусную природу заболеваний, ассоциированных с природным резервуаром грызунов, и в других странах Центральной и Южной Америки [297, 380].

ГЛПС и ХЛС ограничены географическим распространением естественных мелких млекопитающих-хозяев. Группа ортохантавирусов, вызывающих ГЛПС, циркулирует преимущественно у мелких грызунов, населяющих европейский и азиатский регионы [171, 339].

Возбудителя ГЛПС долго относили к семейству буньявирусов (*Bunyaviridae*) и к роду *Hantavirus* [10]. По данным на 2019 год, в связи с пересмотром классификации, его таксономическая принадлежность определена как семейство *Hantaviridae*, род *Orthohantavirus* [162, 214, 365].

Итак, ортохантавирусы – зоонозные патогены, принадлежащие к роду *Orthohantavirus* семейства *Hantaviridae* [214, 339]. Несколько представителей рода *Orthohantavirus* являются патогенами человека: вирус Хантаан (HNTV), вирус Сеул (SEOV), вирус Пуумала (PUUV) и вирус Добрава-Белград (DOBV). В настоящее время идентифицировано 38 видов ортохантавирусов, из которых не менее 24 способны вызывать инфекционные заболевания у человека [10, 32, 106, 140, 285]. Распространение отдельных видов ортохантавирусов в мире носит природно-очаговый характер. Так, например, показано преобладание вируса *Hantaan* на территории Кореи [193], *Dobrava* в Албании [318]. На территории европейских стран отмечена циркуляция серотипа *Tula* [328]. Относительно недавно случаи ГЛПС серотипа *Sangassou* были зарегистрированы на территории Африки [195].

В настоящее время частота встречаемости ортохантавирусных инфекций в мире неуклонно возрастает [93, 321], и данная тенденция прослеживается последние 20 лет [315, 369]. Это связано с увеличением численности и инфицированности грызунов, расширением ареалов природных очагов и требует больших экономических затрат [35]. В год во всем мире регистрируется от 150000 до 200000 случаев ортохантавирусных инфекций, от 70 % до 90 % которых приходится на ГЛПС в Китае [413, 423, 426, 427]. Эндемичные очаги этих

заболеваний регистрируются в Азии, Скандинавии, Америке, одна из последних крупных вспышек была отмечена в 2012 г. в Германии [209].

На территории России из двух описанных нозологических форм ортохантавирусных инфекций регистрируется только геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, этиология которой связана с 6 видами ортохантавирусов, патогенных для человека. Наиболее активная очаговая территория расположена в широколиственных и хвойно-широколиственных лесах Приуралья и Среднего Поволжья [55], где возбудителем заболевания в подавляющем большинстве случаев является вид *Puumala* [14, 16], а основным природным резервуаром является европейская рыжая полевка [1, 20]. Показана также возможность циркуляции в европейской части России видов *Hantaan*, *Seoul* и *Dobrava*. В частности, природные очаги циркуляции вируса *Dobrava* выявлены на территории Краснодарского края, где были изолированы штаммы данного вируса от кавказской лесной мыши [29, 50]. Вирусы *Hantaan*, *Seoul*, *Amur* и, реже, *Puumala* циркулируют в природных очагах Дальнего Востока [10, 181, 274, 406]. В последние годы появились сообщения о росте частоты выделения вируса *Seoul* в европейской части и его способности инфицировать домовых крыс [10], а его распространение в Европе исследователи связывают с миграцией серых крыс [229, 306]. Тип *Sochi* встречается на территории Краснодарского края [31].

Природный резервуар ортохантавирусов очень обширен. Он включает более 80 видов животных, в том числе 51 вид грызунов, 7 видов летучих мышей, 20 видов землероек [106, 158], 13 видов птиц [41].

В России геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) является самым распространенным природно-очаговым заболеванием и занимает лидирующие позиции по эпидемиологической, социальной и экономической значимости [20, 26]. По данным Роспотребнадзора, в течение 10 лет, начиная с 2000 г., в 58 субъектах РФ, относящихся к семи федеральным округам, было зарегистрировано 117433 случая ГЛПС, 516 случаев (0,5 %) закончились летальным исходом [43]. В 2015 г. число заболевших ГЛПС в России достигло уже 194116 случаев [19]. Около 97 % от общего количества ежегодно регистрируемых

случаев ГЛПС приходится на Европейскую и 3 % – на Азиатскую часть России [10]. Заболеваемость в регионах Среднего Поволжья, к которым относится Самарская область, где выполнялась данная работа, колеблется от 11,4 до 21,1 на 100 тыс. населения. Самый высокий уровень заболеваемости в регионе отмечен в 1997 г. – 59,98 на 100 тыс. населения (1984 заболевших). Показатель заболеваемости превысил среднероссийский в 4,2 раза [58]. В последние годы заболеваемость ГЛПС в природных очагах России продолжает нарастать [43].

Возбудитель ГЛПС является сферическим односпиральным РНК-содержащим вирусом диаметром 80-210 нм, окруженным липопротеиновой оболочкой. РНК вируса состоит из 3-х сегментов негативно поляризованной нити [175]. Сегменты вирусного минус-генома – большой (L), средний (M) и малый (S) – кодируют, соответственно, вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу, поверхностные гликопротеины G1 и G2 и нуклеокапсидный белок N. Снаружи вирус окружен оболочкой, состоящей из компонентов мембран клеток организма-хозяина [333].

Экспериментальные и полевые исследования показали, что ГЛПС протекает у грызунов как хроническая бессимптомная инфекция, не оказывающая заметного влияния на жизнедеятельность животных [45, 174].

Основным путем заражения человека является воздушно-пылевой путь, при котором вирус, содержащийся в биологических выделениях зверьков, в виде аэрозоля попадает через верхние дыхательные пути в легкие человека, где условия для его размножения наиболее благоприятны, и затем с кровью переносится в другие органы и ткани. Заражение возможно также через поврежденную кожу при контакте с экскрементами инфицированных грызунов или со слюной в случае укуса зверьком человека. Случаев заражения и передачи возбудителя ГЛПС от человека к человеку за всю историю изучения этой инфекции не зафиксировано [31, 95, 333].

ГЛПС характеризуется сезонностью. Наиболее часто это заболевание регистрируется в период от поздней осени до следующей весны [235]. Более точно начало сезонного подъема ГЛПС зависит от типа хантавируса, поражаемой

популяции грызунов и активности человека по выездам в природную среду. Заражение больных вирусом *Puumala* наиболее часто происходит во время посещений леса, чаще всего во время прогулок (22,9 %), при выездах на рыбную ловлю (4,3 %), охоту (3,0 %). При работе в садах и на огородах, проживании на дачах заражаются около трети всех заболевших. В то же время заражение больных вирусом *Dobrava* происходит, главным образом, при уходе за домашними животными [58]. Определенное исключение составляет вирус *Seoul*, поражающий домашних крыс, для которого пик встречаемости ГЛПС приходится на раннюю весну [167, 185], в то время как для остальных ортохантавирусов пик развития ГЛПС приходится на октябрь-ноябрь [1].

ГЛПС чаще болеют мужчины (70-90 %) в возрасте от 16 до 50 лет, то есть наиболее активная и трудоспособная часть населения [10]. Это преобладание оказалось более выраженным среди жителей сельских районов, чем среди горожан [26]. Заболевание развивается как у взрослых, так и у детей [41].

Тяжесть течения заболевания зависит от варианта ортохантавируса, при этом летальность колеблется от 1 % до 40 % [174, 207, 393]. Наиболее легкое течение ГЛПС при минимальной летальности, связанной с острым поражением почек, этиологически обусловлено вирусом *Puumala* [285], тип *Seoul* вызывает ГЛПС средней тяжести, вирусы *Hantaan*, и *Dobrava* вызывают более тяжелое течение с летальностью от 5 % до 10 % [174], а наибольшей вирулентностью для человека обладают вирусы *Sin Nombre* и *Andes*, но они вызывают у человека хантавирусный легочный синдром, хотя могут поражаться и почки, при этом названные вирусы способны еще и передаваться от человека к человеку [260, 282].

Наиболее часто выявляемым ортохантавирусом, вызывающим эпидемическую нефропатию как относительно легкую форму ГЛПС, в европейских странах является *Puumala* (PUUV). PUUV обычно выявляется у рыжих полевок, ареал которых простирается от Испании до Сибири и от Балкан до Северной Скандинавии. Лесная и лесостепная зоны, охватывающие обширные территории Европы, поддерживают популяцию рыжей полевки, обеспечивая ее пищей и кровом. Миграции рыжих полевок способствуют распространению PUUV

как естественных хозяев, проникающих на новые территории. Когда популяция рыжих полевок достигает пика, время от времени может происходить реинфекция PUUV и заражение рыжих полевок, что увеличивает генетическое разнообразие вируса. Более того, контакт между разными инфицированными группами грызунов приводит к обмену штаммами PUUV посредством ре- и коинфекции [178, 299, 381].

В целом в качестве характерных особенностей ГЛПС, придающих ей медико-социальное значение, отмечаются возможность летального исхода, высокая частота резидуальных явлений, длительно сохраняющихся у реконвалесцентов, что значительно удлиняет сроки временной нетрудоспособности и негативно влияет на качество жизни пациентов. Сложность ранней диагностики ГЛПС связана с наличием атипичных, стертых форм заболевания, преобладанием в первые дни болезни общетоксического синдрома без патогномоничных симптомов [35].

В последние годы появились сведения о том, что пациенты с ГЛПС подвергаются повышенному риску злокачественных новообразований солидных органов по сравнению с общей популяцией, и этот риск увеличивается пропорционально течению времени [407].

## **1.2 – Ортохантавирусы и обусловленные ими патогенетические механизмы геморрагической лихорадки с почечным синдромом, связь с клиническими проявлениями заболевания**

Характеризуя патогенез ГЛПС, следует подчеркнуть, что данное заболевание служит одним из классических проявлений синдрома системного воспаления [15, 167], а основу патологических изменений при ГЛПС составляет дисфункция сосудистого эндотелия, проявляющаяся значительным ростом проницаемости сосудов [124, 132]. Это ведет к выходу плазмы крови за пределы сосудов и сгущению крови, к падению артериального давления вплоть до шока, развитию геморрагического синдрома [152], что, впрочем, не исчерпывает всего многообразия клинических проявлений ГЛПС. С этой точки зрения, при анализе патогенетических механизмов данного заболевания целесообразно выделять вирусные факторы, иммунные факторы, генетические особенности организма-

хозяина [167], из которых в данном разделе обзора особое внимание будет уделено вирусному фактору.

Ортохантавирусы имеют геном в виде минус-цепи (не способной к репликации без РНК-репликазы) одноцепочечной РНК, которая организована в три сегмента: малый (S), средний (M) и большой (L). Эти РНК кодируют белок нуклеокапсид (N), предшественник гликопротеина (GPC), который процессируется в два гликопротеина (Gn и Gc) и белок вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp), соответственно [170].

Ортохантавирусы инфицируют, главным образом, эндотелиальные клетки и реплицируются в них, не оказывая при этом цитопатического эффекта [186, 379]. Преимущественно поражается эндотелий капилляров и мелких сосудов [167]. Была установлена также способность ортохантавирусов активировать калликреин-кининовую систему с высвобождением брадикинина как потенциального индуктора сосудистой проницаемости [358]. Более того, зарегистрирован разрыв межклеточных контактов в почечных клубочках у эндотелиальных клеток, инфицированных ортохантавирусами [206]. В то же время ортохантавирусы политропны и, помимо клеток эндотелия, они способны инфицировать моноциты, клетки легких, почек, печени, слюнных желез, при этом вирус размножается в цитоплазме пораженных клеток [10].

Клеточный тропизм ортохантавирусов связан с тем, что наружные белки G1 и G2 этого вируса имеют конформационное сходство с определенными специфическими рецепторами на поверхности эндотелиоцитов и моноцитов/макрофагов и являются белками слияния с ними [102]. В качестве рецептора для проникновения внутрь чувствительных клеток патогенные ортохантавирусы используют  $\beta 3$ -интегрины (CD61) – поверхностные клеточные рецепторы, взаимодействующие с внеклеточным матриксом и передающие различные межклеточные сигналы. Неслучайно на примере ХЛС и однонуклеотидного полиморфизма гена, кодирующего  $\alpha \nu \beta 3$  интегрин человека, была показана принципиальная возможность существования высокой чувствительности человека к ортохантавирусной инфекции [259]. Кроме  $\beta 3$ -

интегринов, в качестве рецепторов для ортохантавирусов исследователи называют фактор, ускоряющий инактивацию комплемента – DAF/CD55, рецептор к одному из белков первого компонента комплемента – gClqR, рi-интегрины [2, 72, 249]. Установлено также, что белки N и Gn/Gc ортохантавируса *Puumaa* могут доставлять в клетки микровезикулы. При этом микровезикулы, загруженные вирусными белками, могут вызывать специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ [342].

Как уже отмечалось, при ГЛПС у человека ортохантавирусы поражают сосудистые эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки, моноклеарные фагоциты, фолликулярные дендритные клетки и, вероятно, также другие типы клеток [125, 252, 413]. Хотя ортохантавирусы влияют на несколько клеточных функций, заражение ортохантавирусами само по себе не является цитопатическим [67, 197, 247].

Возбудитель проникает в клетку путем клатринзависимого эндоцитоза комплекса вирус –  $\beta 3$ -интегрин [172], а затем  $\beta 3$ -интегрины возвращаются на клеточную поверхность и потенциально могут способствовать проникновению внутрь клетки новых вирионов. Находясь в составе эндосомы, липопротеиновая оболочка ортохантавируса сливается с мембраной эндосомы, происходит "раздевание" вируса и высвобождение вирусного нуклеокапсида внутрь клетки [3].

Нуклеокапсидный белок N, как недавно было показано Jiang H, et al., осуществляет на своей поверхности "кэппинг" мРНК клетки-хозяина и использует ее для регуляции вирусной репродукции [161, 165]. Далее идет присоединение фактора эукариотических клеток, инициирующего трансляцию мРНК, что обеспечивает трансляцию вирусных белков. Поскольку по своей структуре нуклеопротеины ортохантавируса очень напоминают опухолевый супрессорный фактор PD-1 эукариотических клеток, то, мимикрируя под этот фактор, вирус блокирует трансляцию мРНК клетки-хозяина, создавая преимущество для синтеза собственных белков [289].

Параллельно осуществляется репликация вирусной РНК при участии РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса [289].

Вирусные белки и молекулы РНК образуются в разных локусах клеточной цитоплазмы, после чего они независимо друг от друга достигают клеточной мембраны, где происходит самосборка вирионов. Вначале на поверхность клеточной мембраны транспортируются гликопротеины G1 и G2. Белки капсида и РНК «узнают» модифицированные участки мембраны, подходят к ним со стороны цитоплазмы и присоединяются к гликопротеинам. Затем происходит выпячивание конгломерата и последующее отторжение вириона от клетки [3].

Наибольшую чувствительность к ортохантавирусам проявляет эндотелий венул при отсутствии прямого цитопатического воздействия на них самого вируса [136]. В связи с этим, обнаружена прямая корреляционная зависимость между вирусной нагрузкой и тяжестью течения ГЛПС [408], особенно это касается вируса *Dobrava* [327]. Более того, анализ результатов биопсии почек больных ГЛПС показал, что у таких пациентов в значительной степени нарушена экспрессия белка ZO-1, определяющего плотные межклеточные контакты, благодаря которому клетки почечных клубочков максимально приближены и "сшиты" друг с другом. В настоящее время разрушение межклеточных контактов признается исследователями как основной механизм повреждения почек при ГЛПС [206].

В экспериментах на примере инфекции, вызванной вирусом *Hantaan*, было показано, что при ГЛПС значительно возрастает продукция ростового фактора эндотелия сосудов (VEGF), который при взаимодействии с рецепторами второго типа (VEGFR2) способствует образованию на поверхности эндотелиальных клеток их функционального комплекса с  $\beta 3$ - интегринами, что приводит, помимо нарастания проникновения вирусов в клетки, к реорганизации цитоскелета и еще большему увеличению сосудистой проницаемости примерно на 3-й день после инфицирования клеточного монослоя [131, 394]. Репликация и накопление ортохантавирусов в организме с начала клинических проявлений происходит довольно быстро: уже на 2-6 сутки после инфицирования количество вирусной РНК в клетках возрастает тысячекратно [399]. Недавно была показана роль протокадгеринов (молекул адгезии, обеспечивающих межклеточное соединение) как рецепторов ортохантавируса [111, 164]. Их участие в проникновении вируса в

клетку и переходе из клетки в клетку подтверждает гипотезу о серьезном нарушении целостности монослоя эндотелия у пациентов, инфицированных ортохантавирусом. В совокупности эти данные предоставляют убедительные доказательства существенного разрушения структур, поддерживающих целостность эндотелия.

Воспроизведение нескольких циклов репродукции вируса в клетках эндотелия и моноцитах/макрофагах с последующим выходом их в кровь вызывает вирусемию. Распространение вирусов по организму хозяина происходит гематогенным путем не столько в свободном виде, сколько в составе зараженных вирусом моноцитов с последующим инфицированием новых моноцитов и эндотелиальных клеток и вовлечением к концу инкубационного периода в патологический процесс многих органов и тканей [3].

Результатом диссеминации ортохантавируса являются развитие лихорадки, появление сильной головной боли, инъектированности склер, гиперемии лица, шеи, верхней части туловища (симптом «капюшона»), геморрагий, гипотонии в начальный период болезни, рвоты. Позднее присоединяются боли в поясничной области различной степени выраженности, олигурия вплоть до анурии, одутловатость лица, боли в области живота, геморрагические симптомы. В особо тяжелых случаях могут развиваться инфекционно-токсический шок, острое поражение почек, синдром диссеминированного свертывания крови (ДВС-синдром), дыхательная недостаточность, желудочно-кишечные кровотечения, подкапсульные разрывы почек, кровоизлияния в гипофиз, надпочечники, брюшную полость, что может привести к летальному исходу (1,3-15,5 % от общего числа заболевших) [31, 45].

Клиническая картина ГЛПС, описанная многочисленными авторами из разных регионов мира и ассоциированная с разными хантавирусами, демонстрирует сходство основных проявлений болезни, в то же время ряд авторов указывает, что от 5 % до 60 % случаев ГЛПС по своим клиническим проявлениям выявляют зависимость от вида ортохантавируса [127, 174, 286]. Генерализованный характер инфекции с вовлечением в патологический процесс различных органов и

систем обуславливает полиморфизм симптоматики независимо от этиологического агента [14]. При этом болезнь характеризуется циклическим течением и многообразием клинических вариантов от abortивных лихорадочных до тяжелых форм с выраженным геморрагическим синдромом и стойким поражением почек [10].

Клинически различают следующие периоды болезни: инкубационный (от 1 до 5 недель, в среднем 2-3 недели), начальный, (общетоксический), продолжающийся в среднем от 3 до 7 дней, при этом некоторые авторы выделяют в нем две фазы – лихорадочную и гипотензивную (как результат падения тонуса сосудов, сосудистой проницаемости и забрюшинного отека); олигоурический (в среднем 6-12 дней), полиурический (в среднем 6-14 дней), период реконвалесценции (ранний – до 2 мес. и поздний – до 2-3 лет) [128, 174].

Важные для клинических проявлений ГЛПС события происходят в предшествующий инкубационный период. Как было отмечено, ортохантавирусная инфекция возникает чаще всего в результате вдыхания зараженного вирусом аэрозоля [393]. В связи с этим, начальным местом репликации ортохантавируса являются дыхательные пути. Недавно *in vitro* была обнаружена восприимчивость эпителиальных клеток человека, полученных из бронхов, бронхиол и альвеол, к *Puumala*-инфекции [109]. Несмотря на то, что вирус реплицируется в респираторной ткани, реакция организма человека на такую репликацию явно задерживается. Такую задержку клинических симптомов может объяснить нецитопатическая природа репликации ортохантавирусов, подтвержденная *in vitro* [339]. Кроме того, в тканях, собранных у пациентов, инфицированных ортохантавирусом, не было обнаружено повреждений, объясняемых репликацией вируса [67], при том, что медленная способность репликации ортохантавирусов на начальных этапах инфекционного процесса подтверждается и другими исследователями [69]. Самым интригующим открытием стали существенные различия в эффективности репликации вируса в респираторных эпителиальных клетках в зависимости от донора. Эти данные трактуются как основа для

индивидуальной восприимчивости к ортохантавирусной инфекции [339], а также ставят вопрос о причастности иммунной системы к этому эффекту.

В клинической картине заболевания выделяют 6-7 основных клинико-патогенетических синдромов: 1) общетоксический; 2) гемодинамический (центральные и микроциркуляторные нарушения); 3) почечный; 4) геморрагический; 5) абдоминальный; 6) нейроэндокринный; 7) респираторный. Именно различное сочетание указанных синдромов характеризует каждый из четырех периодов заболевания. Симптомы нарушения функций различных органов, вовлеченных в инфекционный процесс, наблюдаются в течение всех периодов болезни [10].

Клинические признаки отдельных периодов заболевания, описанные разными авторами [9, 10, 12, 23, 31, 167, 252], могут быть обобщены следующим образом.

В *начальный период* преобладают симптомы острой интоксикации: повышение температуры тела, озноб, головная боль, ломота в мышцах и суставах, общая слабость, сухость во рту и жажда. Могут наблюдаться тошнота и рвота, иногда жидкий стул. Патогномоничным для ГЛПС является нарушение зрения. Больные отмечают «туман», «сетку перед глазами». Пациенты имеют характерный внешний вид — у них отмечают гиперемия кожи лица, шеи, верхней половины туловища, пастозность век, инъекция сосудов склер. Могут регистрироваться геморрагические проявления в виде кровяных корок в носовых ходах, непродолжительные носовые кровотечения, единичные петехиальные элементы. У части больных на 3-4-й день болезни фиксируется артериальная гипотония с падением артериального давления. Имеются признаки сгущения крови, у части пациентов может наблюдаться лейкоцитоз, характерна тромбоцитопения, СОЭ значительно не повышается, а при тяжелом течении даже снижается до 5 мм/ч и менее.

Именно с тромбоцитопенией, как наиболее ранним и стойким признаком ГЛПС, указывающим на нарушение гомеостаза, ряд исследователей связывает начало развития геморрагического синдрома при инфицировании

ортохантавирусом [24, 205]. При этом было показано, что снижение уровней факторов свертывания крови II, V, VIII, IX и X и повышенный уровень фибриногена в сыворотке отрицательно коррелируют с тромбоцитопенией [216].

Еще один механизм нарушения гемостаза при ГЛПС связан с формированием микровезикул, которые представляют собой небольшие фрагменты мембраны, высвобождающиеся из активированных или апоптотических клеток [374]. Известно, что микровезикулы способствуют тромбообразованию в присутствии тканевого фактора [135], рост содержания которого в сыворотке крови при ГЛПС в настоящее время установлен [334].

В *олигоурический период* отмечается тенденция к снижению температуры тела, но состояние больных не улучшается. Кардинальным признаком наступления олигоурического периода является появление сильных болей в пояснице или/и в животе у большинства пациентов. Одновременно снижается диурез, вплоть до анурии, развивается острое повреждение почек (ОПП). Появляются тошнота, рвота, при выраженной уремии – икота. Интенсивность геморрагических проявлений зависит от тяжести течения болезни. Характерными являются кровоизлияния в склере (симптом «красной вишни»), носовые кровотечения, геморрагическая сыпь на коже, кровоизлияния под кожу, кишечные кровотечения, кровоизлияния во внутренние органы. У женщин могут быть маточные кровотечения. Фиксируются относительная или абсолютная брадикардия. В начале и первой половине олигоурического периода чаще регистрируется артериальная гипотензия, во второй половине – артериальная гипертензия. Определяется положительный симптом Пастернацкого, чаще с обеих сторон.

В крови наблюдается лейкоцитоз. Характерным является появление плазматических клеток в формуле крови, наблюдается тромбоцитопения, которая при тяжелых формах может быть весьма значительной. Концентрации мочевины и креатинина сыворотки крови начинают увеличиваться с начала олигоурического периода и достигают своего максимума к 8-9-му дню болезни. При выраженном ОПП повышается концентрация калия, снижаются концентрации натрия и хлора в сыворотке крови. В общем анализе мочи с первого дня олигурии наблюдаются

протеинурия, у большинства пациентов – микрогематурия и цилиндрурия. Патогномоничным для ГЛПС является обнаружение в моче клеток вакуолизированного почечного эпителия. Практически постоянным признаком болезни является снижение к середине олигоурического периода относительной плотности мочи.

В *полиурический период* состояние больных улучшается, уменьшается интенсивность болей, увеличивается диурез. Развивается полиурия, характерна никтурия. Общий анализ крови нормализуется, снижаются показатели мочевины и креатинина. Патологические изменения в осадке мочи исчезают, но сохраняется изогипостенурия.

В *реконвалесцентный период* состояние больных существенно улучшается, больные становятся активными, нормализуется диурез. Данный период в основном характеризуется астеновегетативными проявлениями, которые могут сохраняться и после выписки больного из стационара. Лабораторные показатели крови приходят в норму, в моче сохраняется изогипостенурия, которая иногда фиксируется несколько месяцев после выписки больного из стационара.

Несмотря на то, что, благодаря совершенствованию методов патогенетической терапии, в настоящее время реже наблюдается возникновение тяжелых и осложненных форм заболевания (инфекционно-токсического шока, синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС), острого повреждения почек (ОПП) с переводом на гемодиализ, ишемического инсульта), современная клиническая картина ГЛПС характеризуется удлинением лихорадки, сокращением длительности олигурии, усилением интенсивности болей в пояснице, увеличением частоты поражения дыхательных путей. Такие изменения клинической картины заболевания, помимо самих свойств возбудителя, исследователи часто связывают со сдвигами со стороны иммунного статуса человеческой популяции в целом вследствие ухудшения экологической обстановки и увеличения доли иммунокомпроментированных лиц [1, 54].

Для ГЛПС, вызванной вирусом *Puumala*, как уже упоминалось, характерно наиболее мягкое течение заболевания, которое изучено довольно хорошо

[219, 340]. В симптоматике преобладают ОПП, лихорадка, боли в спине и пояснице, реже – тошнота и рвота. Летальность не превышает 0,1 % и регистрируется, как правило, у лиц пожилого возраста [155]. Геморрагический синдром отмечается у 14-20 % пациентов [31], довольно выражены тромбоцитопения, лейкоцитоз с левым сдвигом, высокий уровень С-реактивного белка [219].

Клинические особенности ГЛПС с этиологическим значением вируса *Tula* проявляются довольно значительным вовлечением легких в патологический процесс, а также наличием лихорадки и экзантем в случае укусов грызунами [196, 273, 339, 414].

ГЛПС, вызванная вирусом *Seoul*, может иметь довольно тяжелое течение, а клиника включает триаду симптомов – лихорадку, поражение почек, кровоточивость [127]. Примерно у половины пациентов регистрируют петехиальную сыпь, гематурию, носовые кровотечения [415, 416]. Особенностью данной формы является частое поражение печени. Повышение концентрации билирубина в сыворотке крови обнаруживается почти у каждого пятого больного, повышение активности АЛТ и АСТ – более чем у половины пациентов [31].

Наиболее тяжелое течение имеет ГЛПС, этиологически связанная с вирусами *Hantaan*, и *Dobrava* [47, 178, 296, 299]. Эти заболевания более чем в половине случаев протекают с выраженным геморрагическим синдромом [416, 417], а летальность достигает 5-10 % [174]. На территории Российской Федерации встречаются и другие виды ортохантавирусов. Так, ГЛПС-*Amur* описана относительно недавно, регистрируется только в дальневосточных очагах, а в особенности течения входят более частая регистрация абдоминальных симптомов и тяжелых форм болезни. ГЛПС-*Куркино* регистрируется в очагах Центральной России. Заболевание, подобное ГЛПС-*Puumala*, имеет относительно мягкое течение, геморрагические проявления фиксируются относительно редко – у 8-9 % больных, летальность при данной форме не превышает 0,5 %. ГЛПС-*Sochi* регистрируется в субтропической зоне Краснодарского края и представляет собой наиболее тяжелую форму ГЛПС из регистрируемых к настоящему времени

этиологических форм болезни. У большинства больных ГЛПС-*Sochi* отмечаются признаки поражения желудочно-кишечного тракта в виде болей в животе, тошноты, рвоты и диареи, у каждого десятого пациента отмечаются признаки поражения печени, летальность составляет 11-14 % [31].

### **1.3 – Реакции врожденного иммунитета при геморрагической лихорадке с почечным синдромом**

Определяя роль иммунных реакций в патогенезе ГЛПС, можно сослаться на мнение целого ряда исследователей, согласно которому на первый план в патогенезе заболевания выступают реакции иммунного ответа, дисфункция тромбоцитов и генетические особенности клеток-мишеней макроорганизма [3, 248, 263, 362].

Очень многие исследователи, подчеркивают, что ортохантавирусная инфекция приводит к чрезмерной активации иммунитета, включая массивные цитокиновые реакции и активацию цитотоксических лимфоцитов [81, 123, 232, 336, 361, 373], при этом у пациентов наблюдается также повышенная инфильтрация органов (в частности, почек) клетками иммунной системы [198, 313, 336, 358].

Необходимо иметь в виду, что при данных заболеваниях организм человека сталкивается как с прямым, так и опосредованным воздействием ортохантавирусов на иммунную систему. Дело в том, что в число клеток, чувствительных к этим вирусным возбудителям, входят не только эндотелиальные и эпителиальные клетки, но и макрофаги, дендритные клетки, лимфоциты, нейтрофилы [252].

В то же время, подобно многим другим патогенным вирусам, ортохантавирусы оказывают опосредованное воздействие на инфицированный организм через иммунную систему, осуществляющую как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ [115, 167, 187].

Среди клеток врожденного иммунитета при ГЛПС особого внимания заслуживают нейтрофильные гранулоциты, моноциты/макрофаги, дендритные клетки и лимфоциты врожденного иммунитета, в частности, натуральные киллеры (NK) и NKT [5].

При заболеваниях, вызываемых ортохантавирусами, многими исследователями отмечается рост числа нейтрофилов в крови больных [44, 56, 412], а также их активность, что проявляется повышенным содержанием в крови миелопероксидазы и эластазы как содержимого гранул нейтрофилов и IL-8 как основного хемокина для этих клеток [351]. Было показано, что при взаимодействии с активированными ортохантавирусом эндотелиальными клетками нейтрофилы дают явление NET-оза [139, 325], являющегося проявлением апоптотического процесса у этих клеток [89]. NETs (neutrophil extracellular traps) представляют собой молекулы двуспиральной ДНК, покрытые гистонами и содержимым гранул нейтрофилов (миелопероксидазой, эластазой, катепсином G). Этот механизм усиливает сосудистую проницаемость и усугубляет клиническое течение заболевания [139, 324, 326, 379].

Установлено также, что ортохантавирусы могут и прямо активировать нейтрофилы через  $\beta_2$ -интегрины этих клеток [311]. Через  $\beta_2$ -интегрины нейтрофилов в дальнейшем происходит активация тромбоцитов [413], а следствием агрегации тромбоцитов на поверхности нейтрофилов служит все тот же NET-оз, а также тромбоцитопения [95, 99, 166, 268].

Моноциты/макрофаги служат своеобразным мостом между врожденным и адаптивным иммунитетом в связи с их важнейшей функцией презентации антигенов [5, 62], что же касается ГЛПС, то активированные моноциты/макрофаги являются важнейшим источником цитокинов и развития системного воспаления в ранние фазы этого заболевания [71, 94, 279, 386], а одна из мембранных молекул этих клеток (CD163), переходя в растворимое состояние, может служить маркером ранних этапов ГЛПС и предиктором тяжести течения этого заболевания [386], как и экспрессия моноцитами крови CD206 как маннозного рецептора этих клеток [225].

Моноциты/макрофаги одними из первых реагируют на попадание в организм возбудителя этого заболевания, поскольку после первоначальной репликации в эпителии легких ортохантавирусы могут инфицировать близлежащие альвеолярные макрофаги [193]. При этом макрофаги уже в первые часы начинают

довольно активно продуцировать оксид азота (NO), способствующий клеточному апоптозу и усиливающий повреждение отдельных клеток, сосудов, почек [41, 255]. При значительном увеличении синтеза оксида азота его цитотоксичность определяется преимущественно способностью превращаться в другие токсичные оксиды азота и новые вторичные оксиданты [3]. Основным цитотоксическим фактором в этих условиях является накапливающийся пероксинитрит-анион, что проявляется в способности этого аниона к индукции процессов перекисного окисления липидов [309] и усугубляет при ГЛПС деструкцию мембран, ингибирование митохондриального дыхания [354] с последующим усилением тканевой гипоксии. Кроме того, он блокирует синтез простаглицлина и усиливает продукцию тромбоксана и лейкотриенов, участвуя, таким образом, в развитии ДВС-синдрома. Не случайно в число полиморфизмов генов, влияющих на тяжесть течения ГЛПС, входят определенные аллели гена индуцируемой синтазы оксида азота (NOS2A\*11, NOS2A\*12, NOS2A\*11/\*12) – фермента, участвующего в синтезе оксида азота [59].

У ортохантавирусов отмечена одна уникальная особенность в воздействии на моноциты в виде их трансформации в дендритные клетки [217, 256].

Именно дендритные клетки моноцитарного происхождения служат первым и очень важным фактором запуска последующей антигензависимой дифференцировки Т-лимфоцитов, специфичных к вирусным возбудителям, проникающим через кожу и слизистые оболочки [260]. Именно эти клетки представлены в большом количестве в эпителиальных тканях легких, через которые происходит внедрение ортохантавирусов в организм человека [217, 301]. Незрелые дендритные клетки, получив сигнал в виде антигенов ортохантавирусов, мигрируют в лимфоидные органы, подвергаясь в процессе миграции созреванию и превращаясь в "профессиональные" антигенпрезентирующие клетки, передающие сигналы активации наивным Т-лимфоцитам и запускающие с их участием процесс вирусной элиминации [61].

Однако по мере роста числа ортохантавирусов в организме они начинают инфицировать не только клетки эндотелия, но и сами дендритные клетки [311].

Очень важным с иммунопатогенетической точки зрения является тот факт, что инфицирование дендритных клеток ортохантавирусами не приводит к потере ими антигенпрезентирующих функций, которые реализуются в отношении Т-лимфоцитов столь же успешно, как и любыми другими зрелыми дендритными клетками. Эта особенность ортохантавирусов также является уникальной, поскольку инфицирование дендритных клеток другими иммунотропными вирусами (вирусом кори, цитомегаловирусом, флавивирусами и др.) приводит к подавлению ими синтеза молекул гистосовместимости I класса, интерферонов, цитокинов и, в конечном итоге, негативно влияет на взаимодействие дендритных клеток с Т-лимфоцитами [312]. Именно этим обстоятельством некоторые авторы объясняют принадлежность ГЛПС к инфекционным заболеваниям с исключительно острым течением [310].

Натуральные киллеры (NK), как лимфоциты врожденного иммунитета, занимают особое место в патогенезе ГЛПС, особенно в развитии капилляротоксического синдрома [81]. В то же время было показано, что инфицированные клетки проявляют устойчивость к NK-цитолиту, поскольку ортохантавирусы обладают способностью ослаблять их апоптоз и индуцировать у них экспрессию молекул HLA I класса [89], подавляющих активность натуральных киллеров через ингибирующие рецепторы [43]. Кроме того, отмечено, что ортохантавирусы могут подавлять активность таких ферментативных белков, как гранзим В и каспаза-3, определяющих цитотоксические свойства лимфоцитов [138]. Интересно, что в этой ситуации менее защищенными от цитотоксического воздействия активированных NK остаются неинфицированные клетки, что усугубляет клинические проявления болезни [80, 86].

Детальных сведений о роли НКТ в иммунопатогенезе ГЛПС мы в доступной литературе не встретили.

Клетки врожденного иммунитета воспринимают паттерны патогенных микробов преимущественно через Toll-подобные рецепторы [22, 65], результатом взаимодействия которых с вирусами служит продукция клетками провоспалительных цитокинов и интерферонов I типа [109]. Известно, что ведущая

роль в ответе на нуклеопротеины ортохантавирусов принадлежит TLR3 [148], в то время как эндотелиальные клетки, пораженные ортохантавирусами, экспрессируют 5 типов рецепторов – TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR9, среди которых наиболее высокий уровень экспрессии показывает TLR4 [169]. Этот рецептор усиливает продукцию клеткой фактора некроза опухолей  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), интерферона  $\beta$  (IFN $\beta$ ), интерлейкина-6 (IL-6). Zhang et al. [418] показали, что односпиральный РНК-содержащий ортохантавирус проявляет себя по отношению к TLR как двуспиральный вирус, который способствует экспрессии индуцибельного гена ретиноидной кислоты (RIG-1) с модуляцией секреции хемокинов.

Поскольку ГЛПС проявляется системным воспалением, это заболевание сопровождается "цитокиновым штормом". Цитокины продуцируются широким спектром клеток – эндотелиальными клетками, макрофагами, моноцитами, лимфоцитами [372]. Характерным признаком ГЛПС является ранняя активация цитокинов при ГЛПС [261]. Особенно значительно в сыворотке крови возрастают уровни TNF $\alpha$ , IL-6, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IP-10, RANTS в начальный и олигоурический периоды, что способствует росту сосудистой проницаемости и более тяжелому течению заболевания [147, 388]. Такие цитокины как IFN $\alpha$ , IL-6, IL-1 определяют развитие лихорадки, инфекционно-токсического шока, продукцию белков острой фазы, а TNF $\alpha$ , IFN $\beta$ , IL-6 повышают проницаемость сосудов и нарушают функции эндотелиальных клеток [242].

Особое значение в патогенезе ГЛПС придается провоспалительному и проапоптотическому цитокину TNF $\alpha$  [83, 199, 213, 227, 323]. Этот цитокин вырабатывается как клетками врожденного иммунитета (нейтрофилами, натуральными киллерами, дендритными клетками, моноцитами/ макрофагами), так и специфическими Т-лимфоцитами (CD8<sup>+</sup> CTL) [258, 310, 344].

TNF $\alpha$  оказывает при ГЛПС двойное действие. С одной стороны, он нарушает репликацию ортохантавирусов, способствуя клеточному апоптозу инфицированных клеток [185], а с другой стороны, этот же эффект усугубляет

поражение эндотелия сосудов при данном заболевании [283], усиливает NET-оз нейтрофилов [89, 188].

Отмечено также, что генетический полиморфизм, связанный с высокой продукцией TNF $\alpha$ , сочетается с более тяжелым течением ГЛПС [249, 367]. В то же время подчеркивается, что при низком уровне TNF $\alpha$  диссеминация ортохантавирусов происходит быстрее, поскольку N белок возбудителя конкурирует с этим цитокином, присоединяясь к его рецепторам [291, 357].

Подчеркивается также значение высокого уровня IFN $\beta$ , подавляющего репликацию ортохантавирусов при ГЛПС [169], а также способствующего продукции IL-12 и IFN $\gamma$  [167], определяющих развитие клеточного иммунного ответа как важнейшего компонента противовирусной защиты организма [63]. IFN $\beta$  способен индуцировать в моноклеарных клетках человека экспрессию белка MxA, который подавляет ранние стадии репликации вирусов *Puumala* и *Hantaan* [137, 288].

Довольно показателен высокий уровень в плазме крови IL-6, ассоциированный с повреждением почек и тромбоцитопенией при ГЛПС, этиологически обусловленной вирусом *Puumala* [293], при инфицировании вирусом *Dobrava* особенно значительно возрастают уровни IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  [328]. Для ГЛПС, ассоциированной с ортохантавирусом *Seoul*, отмечается значительное повышение уровня IL-12 как продукта моноцитов, отвечающих за запуск клеточного иммунного ответа [38].

Цитокины могут характеризовать и процессы восстановления сосудистой стенки, начиная с полиурической стадии при ГЛПС. К этой категории относятся фактор роста сосудистого эндотелия, эритропоэтин, ангиопоэтин, стромальный клеточно-продуцируемый фактор 1 [101].

Таким образом, цитокиновый профиль в крови при ГЛПС зависит от вида возбудителя, связан с клиническими проявлениями заболевания и может служить потенциальным маркером тяжести течения инфекционного процесса. На примере инфицирования вирусом *Puumala* установлено патогенетическое значение активации системы комплемента при ГЛПС. В частности, был зарегистрирован

рост содержания в крови растворимого мембраноатакующего комплекса (SC5b-9), формирующегося на заключительных этапах активации комплемента [84]. Степень активации комплемента коррелировала с тяжестью течения заболевания [329]. Механизм этого феномена, опосредован белком острой фазы из группы пентраксинов (РТХ3), индуцируемых ортохантавирусами [293].

#### **1.4 – Реакции адаптивного иммунного ответа при геморрагической лихорадке с почечным синдромом**

Гуморальный иммунный ответ организма на ортохантавирусы, опосредованный В-лимфоцитами, проявляется выработкой антител разных классов, специфичных к возбудителю [5, 61]. Krüger D.H., с соавторами было показано, что В-клеточные эпитопы, локализующиеся на N, G1 и G2 белках, не выявляют различий между ортохантавирусами, принадлежащими разным серотипам [208].

ГЛПС – острое заболевание и на всем его протяжении сопровождается высоким уровнем IgM-антител ко всем трем белкам ортохантавирусов (N, G1, G2). Содержание этого класса антител в сыворотке крови достигает максимума на 7-11 день от появления первых симптомов заболевания и продолжает сохраняться вплоть до периода реконвалесценции, служа биомаркером ГЛПС [185].

Содержание IgG-антител к возбудителю ГЛПС зависит от их субкласса. Так, уровень IgG1- и IgG3-антител неуклонно возрастает по мере прогрессирования заболевания, а уровень IgG2-антител остается примерно на одном и том же уровне [245]. IgG3-антитела к белку нуклеокапсида (N) и к G1-гликопротеину ортохантавирусов достигают пика к периоду реконвалесценции, а в последующую декаду начинают снижаться, хотя детали этого процесса не совсем ясны [167].

Наличие IgA-антител, характерное и для острой фазы ГЛПС, и для периода реконвалесценции, имеет очень важное значение, как для выздоровления, так и для продолжительности постинфекционной защиты от повторного заражения. Уровень этих антител максимален в начальные периоды заболевания, а затем снижается. В связи с этим, высокий уровень IgA-антител при наличии клинических проявлений ГЛПС расценивают как маркер ранних этапов развития этого заболевания [282].

В целом, оценивая функциональное значение антител при ГЛПС, необходимо подчеркнуть, что нейтрализующую роль выполняют только антитела к G1 и G2 гликопротеидам вируса, но не к N-белку. Это создало основу для разработки препаратов моноклональных антител к указанным белкам в качестве лекарственных средств при ГЛПС уже на ранних стадиях этого заболевания [403].

Образующиеся с участием антител циркулирующие иммунные комплексы (СІС) подвергаются деградации клетками моноцитарно-макрофагальной системы в лимфоузлах, селезенке, печени, а также при участии системы комплемента. Факторы этой системы способствуют разрыву связей между антигеном и антителом, поддерживая СІС в растворимом состоянии [61]. При ГЛПС, как уже сообщалось, фагоцитарная активность лейкоцитарных клеток, инфицированных ортохантавирусом, снижена. Это в сочетании с низкой комплементарной активностью снижает клиренс СІС, что ведет к накоплению слабо растворимых комплексов сначала в пределах кровеносных сосудов, а затем и в строме органов и тканей, особенно почек [254]. По мнению ряда исследователей, одной из причин повреждения сосудистой интимы с развитием полиорганной недостаточности при ГЛПС является депонирование СІС на поверхности эндотелиоцитов [18, 184].

Т-клеточный адаптивный иммунный ответ при вирусных инфекциях выполняет двойную роль. С одной стороны, он способствует элиминации вирусного возбудителя путем запуска гуморального и клеточного иммунного ответа с участием Т-хелперной популяции ( $CD3^+CD4^+$ ), а с другой стороны, усугубляет повреждение органов и тканей через цитотоксическое повреждение клеток, инфицированных вирусом, цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL,  $CD3^+CD8^+$ ) [61]. Обе эти роли в полной мере реализуются при ортохантавирусной инфекции [321], а Т-клеточный ответ коррелирует с тяжестью ГЛПС [361], причем, развитие летального исхода нередко сопровождалось высокой степенью активации этого звена иммунной системы [295].

Первый сигнал Т-лимфоциты получают через хемокины инфицированных ортохантавирусами эндотелиальных клеток, что заставляет их мигрировать в очаги поражения [411].

CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты проявляют специфичность в отношении гликопротеинов ортохантавирусов, а ведущее значение в иммунном ответе при ГЛПС приобретают Т-хелперы 1-го типа [246], поддерживающие клеточный иммунный ответ через стимуляцию CD8<sup>+</sup> CTL и NK [61].

Рост числа CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (CTL) был наиболее выраженным при ГЛПС [232]. Этот показатель негативно коррелировал с уровнем креатинина и мочевины в крови [404], при этом была отмечена значительная инфильтрация ткани почек CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами [359]. В то же время в эксперименте показана роль CTL в развитии почечной гематурии [343].

Что касается специфичности CTL, то ответ этих клеток был направлен на N белок нуклеокапсида [356]. Распознавание иммунодоминантных эпитопов нуклеокапсидного белка ортохантавирусов CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами было рестриктировано по молекулам гистосовместимости и ассоциировано с HLA-A11, A24, B7, а сами эпитопы могут служить основой для получения вакцинных препаратов [390, 395]. Более того, носительство аллелей HLA B8, C4A\*Q0 и DRB1\*0301 оказалось прогностически значимым по тяжести течения ГЛПС и отражало высокую предрасположенность к повреждению стенки сосудов [280].

Следует отметить, что специфичность CD8<sup>+</sup> иммунного ответа направлена против эпитопов всех 3-х структурных белков ортохантавирусов (N, G1, G2), но при формировании иммунологической памяти на основе этих клеток, иммунодоминантными являются эпитопы только N белка [387]. Более того, такая иммунологическая память является перекрестной и защищает от развития в дальнейшем инфекций, вызываемых вирусами *Puumala* и *Hantaan* [373].

В последние годы была описана особая субпопуляция цитотоксических Т-лимфоцитов – CD8<sup>low</sup>CD100<sup>-</sup> [239]. Молекула CD100 способствует поляризации дендритных клеток в сторону индукции гуморального иммунного ответа [210]. В связи с этим, субпопуляция CTL, не несущая таких молекул, характеризуется высоким уровнем цитотоксической активности, активно продуцирует IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ , участвует в формировании иммунологической памяти. Было установлено, что CD8<sup>low</sup>CD100<sup>-</sup> характерны для ранних стадий развития ГЛПС, а их высокое

содержание в крови больных коррелирует с мягким течением ГЛПС даже в тех случаях, когда это заболевание вызывается одним из наиболее агрессивных видов ортохантавирусов - *Hantaan* [238, 239].

Следует иметь в виду, что CD8<sup>+</sup> CTL не только способствуют элиминации ортохантавирусов, подвергая цитолизу инфицированные эндотелиальные клетки, но и усугубляют, таким образом, повреждение сосудистой стенки и различных органов (почек, легких), особенно, если учесть, что сам ортохантавирус цитопатическим эффектом не обладает [225].

Flippe L. et al. отмечен рост числа регуляторных Т-клеток (Treg, FoxP3<sup>+</sup>) при ГЛПС [118], которые являются активными продуцентами трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ) с его иммуносупрессорными свойствами, у крыс, инфицированных вирусом *Seoul* [402]. Это явление имеет неоднозначное трактование. Существует такое объяснение, что причина высоких значений Treg кроется в обследовании лиц из эндемичных регионов, ранее уже сталкивавшихся с ортохантавирусами [249]. Некоторые авторы придают значение этой особенности иммунного реагирования на ортохантавирусы как фактору, снижающему воспалительно-деструктивные процессы при ГЛПС [167], часть исследователей связывает рост числа Treg с латентным характером инфекционного процесса у грызунов [115, 266], в то же время есть точка зрения, что именно рост числа FoxP3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (Treg) определяет тяжесть течения ортохантавирусной инфекции [201]. Что касается значения фенотипа регуляторных Т-клеток, часто характеризуемого как CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> [17], в патогенезе ГЛПС, то отмечен рост как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup> Treg [201].

В целом следует подчеркнуть, что при всем интересе исследователей к иммунопатогенезу ГЛПС, накопленные сведения носят отрывочный характер и плохо сопоставляются друг с другом, что нарушает целостность представлений о том, что происходит с иммунным ответом при ГЛПС.

## **1.5 – Лабораторная и иммунологическая диагностика геморрагической лихорадки с почечным синдромом**

Основу лабораторной диагностики ГЛПС, как и любых других инфекционных заболеваний, составляет определение их неспецифических (суррогатных) и специфических маркеров [4]. Диагноз геморрагической лихорадки с почечным синдромом основан на серологических исследованиях, полимеразной цепной реакции (ПЦР), иммуногистохимии, выделении вирусных культур [266].

Вирусологические методы включают выявление ортохантавирусного антигена путем заражения клеток VERO-E6 с последующей его идентификацией непрямой метод флуоресцирующих антител; существует метод обнаружения вирусных частиц с использованием феномена фокусобразующих единиц и реакция нейтрализации ортохантавирусов на основе феномена подавления числа фокусобразующих единиц [16, 167]. Эти методы раньше широко использовали при выделении ортохантавирусов от грызунов, однако, вирусологическая лабораторная диагностика, направленная на выделение ортохантавируса от больных ГЛПС, малоэффективна и практически в настоящее время не применяется [31].

Серологическая диагностика вирусных заболеваний на основе выявления антител в исследуемых сыворотках с помощью стандартных антигенов-диагностикумов – является основным и наиболее традиционным направлением исследований в практических вирусологических и иммунологических лабораториях [31, 32].

Серологическая диагностика ГЛПС проводится с использованием реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), а также с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и позволяет подтвердить диагноз заболевания даже в случае стертых и легких форм заболевания с учетом того, что в 2-4 % случаев регистрируются серонегативные формы болезни. РНИФ осуществляется с помощью парных сывороток с интервалом 4-7 дней. Диагностическим считается нарастание титра антител в 4 и более раз. После перенесенного заболевания специфические антитела в невысоком титре 1:64 - 1:128 сохраняются практически пожизненно, независимо от тяжести перенесенного

заболевания. С помощью ИФА определяются специфические антитела раннего и позднего классов – иммуноглобулины М и G (IgM к возбудителю ГЛПС в сыворотке пациента обнаруживаются с 6-го по 56-й дни болезни, IgG начинают выявляться с 6-го дня, достигают высокого уровня к 11 дню и сохраняются на этих значениях до 5-ти месяцев от начала заболевания и в анамнестическом титре пожизненно [10, 31, 57, 223, 226, 304]. В процессе серодиагностики можно определить и вид возбудителя, в этих случаях в качестве диагностикумов для ИФА используют рекомбинантные белки нуклеокапсида ортохантавирусов, принадлежащих разным видам [68, 167].

Указывается на возможность ложноположительного результата серологических реакций у больных с онкопатологией [33], что вполне объяснимо с точки зрения схожести структуры молекул нуклеокапсида ортохантавирусов и опухолевого супрессорного фактора PD-1 у человека [289].

Появление методов индикации генетического материала возбудителя непосредственно в биоматериалах в определенных случаях упростило и ускорило исследования по обнаружению ортохантавирусов и их идентификации. Это особенно актуально при выявлении новых ортохантавирусных инфекций, принимая во внимание трудности с выделением вируса *in vitro* [31]. Наиболее часто это осуществляется путем выделения ортохантавирусной РНК с применением гнездовой ПЦР с обратной транскрипцией и последующей амплификацией и секвенированием нуклеотидных последовательностей РНК-сегментов ортохантавирусного генома [10, 100, 167, 168].

Помимо методов специфической диагностики ГЛПС, очень важны и значимы рутинные лабораторные методы для определения тяжести течения заболевания, прогнозирования осложнений и назначения адекватного лечения. Например, есть клиническая необходимость детально характеризовать состояние острого почечного повреждения (ОПП) [167], которое является следствием тубулоинтерстициального нефрита, развивающегося вследствие воспалительной инфильтрации почечной ткани [194]. ОПП может приводить к летальным исходам, особенно, в олигоурическом периоде. При тяжелом течении ОПП у пожилых

людей ей сопутствуют шок, гематурия, тромбоцитопения и лейкоцитоз, а одним из необходимых лечебных мероприятий в этом случае является гемодиализ [391].

Важными признаками подобного тяжелого состояния у больных ГЛПС служит резкое многократное повышение уровней креатинина и мочевины в крови, а также выраженная протеинурия, сохраняющаяся довольно длительное время [1, 270]. Подчеркивается значение гипонатриемии при определении тяжести течения ГЛПС [318]. В последние годы в качестве маркера ОПП используют высокое содержание кластерина (аполипопротеина J) в моче больных как показателя апоптоза клеток проксимальных канальцев почек [262]. Одним из важнейших факторов развития повышенной сосудистой проницаемости при ГЛПС является тромбоцитопения [107, 117], уровень которой отражает и тяжесть ОПП [154]. В качестве раннего признака ГЛПС, появляющегося уже в лихорадочный период, некоторые авторы отмечают рост уровня гомоцистеина, достигающего максимума в олигоурический период и сохраняющего высокие значения на протяжении всего заболевания [50].

В связи с этим, в рекомендации по лабораторной диагностике ГЛПС входят клинический анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови с определением уровней мочевины, креатинина, аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), исследование электролитов крови (калий, натрий, хлор), гемостатической системы [10, 45].

Помимо отдельных тестов для прогнозирования тяжелого течения, создаются комплексы тестов и шкалы для их оценки: например, SAPS II, SOFA, H-SOFA, что значительно повышает эффективность прогноза [410].

В последние годы к числу суррогатных маркеров тяжести течения ГЛПС относят такие иммунологические показатели как высокий уровень экспрессии моноцитами CD163 и CD206 [226], обнаружение растворимой формы маркера плазматических клеток (В-лимфоцитов) sCD138 в крови [224].

## **1.6 - Этиотропная терапия и специфическая профилактика геморрагической лихорадки с почечным синдромом**

Лечение ортохантавирусной инфекции является поддерживающим и неспецифическим [97]. Единственное зарегистрированное в Российской Федерации средство – инъекционная форма рибавирина – виразол. Эффективность рибавирина при ГЛПС впервые была продемонстрирована в Китае при лечении ортохантавирусной инфекции типа *Hantaan* [48]. В контролируемом исследовании в группе пациентов, получающих рибавирин, наблюдалось значительное уменьшение смертности, выраженности олигурии и геморрагических проявлений [188]. В работах отечественных исследователей в очагах ГЛПС также отмечено положительное влияние рибавирина на течение ГЛПС [36, 48, 269]. Рибавирин рекомендуется применять на ранних стадиях инфекционного процесса, при этом некоторые авторы считают целесообразным использование таблетированных форм рибавирина для лечения ГЛПС (*Puumala*) [322, 404]. Тем не менее, есть зарубежные публикации [250], которые свидетельствуют о недостаточной эффективности и безопасности рибавирина при ГЛПС, вызванной серотипом *Puumala*, даже в случаях его внутривенного введения.

Одним из перспективных препаратов для лечения ортохантавирусных инфекций является фавипиравир (Т-705, 6-фтор-3-гидрокси-2-пиазинкарбоксамид), который является новым производным пиазинкарбоксамидов, обладающим ингибирующей противовирусной активностью в отношении ряда РНК-содержащих вирусов, в том числе членов семейства *Bunyaviridae* [29, 122, 134], что продемонстрировано как *in vitro*, так и *in vivo* [267]. Механизм действия Т-705 отличается от рибавирина тем, что он, по-видимому, способен специфично ингибировать вирусную РНК-полимеразу, практически не влияя на пул нуклеиновых кислот [122]. Фавипиравир обладает широкой противовирусной активностью и уже прошел II и III фазы клинических испытаний как препарат для лечения гриппа и II фазу клинических испытаний как препарат для лечения инфекций, вызываемых ортохантавирусами [134].

Помимо названных препаратов противовирусного действия в качестве этиотропных средств для лечения ГЛПС применяют интерфероны [31], индукторы интерферонов (тилорон, йодантипирин, анандин) [160], гипериммунную плазму [71], специфический иммуноглобулин [48].

Так, интерферон подавляет репликацию ортохантавирусов *in vitro*, но не проявляет подобного действия в клинических условиях [128]. Более эффективным считают йодантипирин (1-фенил-2,3-диметил-4-йодпиразолон-5), который является индуктором  $\alpha$ - и  $\beta$ -интерферонов, существенно повышает активность фибробластов и индуцирует их противовирусную резистентность, задерживает проникновение вируса в клетку за счет стабилизирующего действия на биологические мембраны, значительно стимулирует продукцию антител. Исследование клинической эффективности применения препарата при ГЛПС свидетельствовало о положительном влиянии на течение болезни, сокращении продолжительности интоксикационного и болевого синдромов, ускоренном восстановлении параметров клеточного иммунитета, повышении способности лейкоцитов продуцировать альфа-интерферон [29].

Расширение арсенала используемых при ГЛПС иммуномодуляторов продолжается. Выявлен положительный клинический эффект применения амиксина, циклоферона, анандина [8] и др. Для популярного ранее преднизолона не доказано выраженного клинического эффекта в плацебо контролируемых клинических испытаниях при ГЛПС [128, 158].

В то же время следует констатировать, что ни одно из упомянутых средств не нашло неоспоримого практического применения, в первую очередь, ввиду недостаточной доказательной базы их эффективности [48]. Патологический каскад, запущенный вирусом ГЛПС, не прерывается при использовании ни одной из имеющихся групп препаратов, хотя и отмечается снижение частоты формирования тяжелых и осложненных форм заболевания [29].

В ходе нерандомизированного многоцентрового исследования было показано, что перенос реконвалесцентной сыворотки ортохантавируса, содержащей нейтрализующие антитела, оказывает защитное действие [377]. Кроме

того, защитная эффективность реконвалесцентной сыворотки была подтверждена в экспериментах *in vivo* [421, 428]. Основываясь на этих данных, было получено несколько моноклональных антител с нейтрализующей активностью против ортохантавирусов [428]. Клинические исследования I и II фазы продемонстрировали терапевтическую эффективность этих нейтрализующих антител на ранней стадии ГЛПС [319, 428].

Что касается непрерывной заместительной терапии жидкостью и электролитами, то она применяется у пациентов с ГЛПС при наличии синдрома полиорганной дисфункции [409].

Новые терапевтические подходы, нацеленные на проникновение ортохантавируса, все еще находятся в стадии разработки. Один из них основан на связывании пептидов с интегриновыми рецепторами  $\alpha v \beta 3$  [144]. Ортохантавирусы связываются с этим интегриновым рецептором для проникновения в клетку [132]. Предотвратив это взаимодействие, можно предотвратить проникновение вируса, защищая клетки от инфекции. Исследования Song J.-W. et al. [350] подтвердили эту гипотезу, согласно которой моноклональные антитела к интегрину  $\beta 3$  защищали мышей от ортохантавирусной инфекции. Эта концепция была далее развита Hall P.R. et al. [143]. Последующие исследования продемонстрировали эффективность этого подхода с использованием циклических нанопептидов [144].

В настоящее время разрабатывается новая технология этиотропной терапии ортохантавирусной инфекции. Речь идет о получении синтетическим путем малых интерферирующих РНК, которые могут присоединяться к мРНК вируса, деградировать ее и нарушать синтез вирусных белков. Чтобы повысить эффективность таких РНК и сделать их действие специфичным для ортохантавирусов, эти молекулы соединяют с химерным одноцепочечным белком – легкой цепью антитела против гликопротеина G ортохантавируса, что делает их действие вирусспецифическим [403].

Что касается неспецифической профилактики ГЛПС в форме борьбы с грызунами, то в ней, в первую очередь, нуждаются жители географических регионов, эндемичных по ортохантавирусным инфекциям, а также люди с

профессиональными рисками заражения, например, работники лесного хозяйства, работники конюшен, имеющих животных дома или содержащие их в лабораториях, военнослужащие, живущие в военных лагерях [208, 233, 298, 300, 365].

Для специфической профилактики ГЛПС велась и ведется до сих пор разработка вакцинных препаратов [332].

Для вакцинации людей в Корее и Китае с 1993 года используются инактивированные вакцины [176, 237]. Хантавакс, применяемый в Корее, готовили путем инактивации вирусов формалином или  $\beta$ -пропиолактоном, а в качестве адъюванта использовали алюминиевые квасцы. Применяли как вакцину из вирусов *Hantaan*, так и двухвалентную вакцину *Hantaan/Puumala* [221]. Исследования продемонстрировали наличие антител к ортохантавирусу через несколько месяцев после иммунизации [349].

В Китае также инактивированные вакцины были разработаны как моновалентная (*Hantaan*), так и бивалентная (*Hantaan/Seoul*). Иммунизация охватывала около 2 миллионов человек в год при незначительных побочных эффектах [240], однако в литературе появились сведения о сравнительно невысокой эффективности этих инактивированных вакцин [222, 329, 424]. Недавно доклинические исследования инактивированной поливалентной вакцины против ГЛПС продемонстрировали активацию сбалансированного иммунного ответа на ортохантавирусы *Puumala*, *Hantaan*, *Dobrava* [114].

В России была разработана бивалентная, цельновирионная, инактивированная вакцина "КомбГЛПС-Вак" против ортохантавирусов *Puumala/Dobrava* [6, 51].

Как альтернатива инактивированным вакцинам, в литературе описана попытка получения вакцины на основе вирусоподобных частиц (VLP). VLP представляют собой наноразмерные самосборочные компетентные структуры, созданные вирусными белками [382]. У них есть шиповидные белки, которые могут связываться с рецептором хозяина [63, 119]. Следовательно, проникновение VLP в клетку-хозяин напоминает естественную инфекцию. Было показано, что

химерные VLP индуцируют долгосрочный иммунный ответ, позволяющий регистрировать нейтрализующие антитела, циркулирующие через шесть месяцев после иммунизации [112]. При этом в VLP отсутствует нуклеиновая кислота, что делает их неспособными к репликации [382]. В результате VLP могут доставлять вирусные антигены в клетки-хозяева без репликации вируса и, следовательно, симптомов заболевания. Эта особенность VLP сделала их привлекательным инструментом для разработки вакцин второго поколения.

К настоящему времени исследователями (главным образом, в США) предприняты попытки создания рекомбинантных генно-инженерных ортохантавирусных вакцин. К ним относятся четыре вакцины на основе субклонированных кДНК, представляющих М- и S-сегменты РНК вируса *Hantaan*, встроенных в геном вируса осповакцины и в геном вируса *Sindbis*; а также вирусов *Seoul* и *Sin Nombre*, встроенных в геном цитомегаловируса. На лабораторных животных была показана иммуногенная и протективная активность рекомбинантных вакцинных препаратов в отношении соответствующих ортохантавирусов. Вместе с тем, при испытании таких препаратов (на основе встроенных в геном вируса осповакцины сегментов генома *Hantaan*) на волонтерах было установлено, что среди ранее привитых против оспы, процент выявления вируснейтрализующих антител к вирусу *Hantaan* составлял лишь 26 % [208].

К указанной категории относятся также субъединичные вакцины, продуктом которых служат белки Gn/Gc и N ортохантавируса, вызывающие выраженный гуморальный иммунный ответ [305]. Белки Gn/Gc могут индуцировать образование нейтрализующих антител [317], тогда как белок N способствует продукции ненейтрализующих антител, но при этом стимулирует иммунный ответ Т-клеток [113]. Недавно была продемонстрирована эффективность индукции гуморального и Т-клеточного иммунного ответа путем доставки *Puumala* Gn/Gc и N-белков с использованием микровезикул [87].

В последнее десятилетие интенсивно разрабатывается новый класс противовирусных вакцин – так называемых ДНК-вакцин. Их отличают полноформатный защитный эффект (одновременно "гуморальный" и клеточный),

а также безопасное производство. Очень важным преимуществом ДНК-вакцин следует назвать их способность к индукции нейтрализующих (защитных) антител [339]. Эти вакцины представляют собой гены протективных белков, способные контролировать в клетках вакцинируемого организма синтез протективных белков и формирование защитного иммунного ответа. Применительно к ортохантавирусам подобная ДНК-вакцина (на основе вируса *Seoul*) разработана в США [85, 147]. Определенный оптимизм внушает разработка в настоящее время ДНК-вакцины на основе Gc гликопротена ортохантавирусов в сочетании с лизосом-ассоциированным мембранным белком 1 (LAMP-1) [170].

Тем не менее, следует признать, что утвержденной Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) вакцины для предотвращения ортохантавирусной инфекции в настоящее время не существует [339].

Таким образом, по оценке исследователей, эффективного лечения ГЛПС в современном мире пока нет, а состояние вакцинопрофилактики оставляет желать лучшего [170].

### **Резюме к главе 1**

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – острое вирусное природно-очаговое заболевание, проявляющееся геморрагическим синдромом, гемодинамическими расстройствами и поражением почек с развитием острого поражения почек. Природно-очаговый характер ГЛПС делает проблему этой тяжело протекающей вирусной инфекции актуальной для России, а в число эндемичных районов входит Самарская область, где выполнялось данное исследование.

В настоящее время известно более 80 серологически и генетически отличающихся друг от друга видов ортохантавирусов, к числу которых принадлежит возбудитель ГЛПС. Выделяют 24 вида, патогенных для человека, среди них – вид *O. puumala*, преобладающий в Самарской области, основным природным резервуаром которого служит рыжая полевка.

Наибольшую чувствительность к ортохантавирусам проявляет эндотелий венул при отсутствии прямого цитопатического воздействия на них самого вируса. Подчеркивается, что вирус обладает пантропностью, в частности, в клетках почек он нарушает экспрессию белка, определяющего плотные межклеточные контакты, что признается как основной механизм повреждения почек при ГЛПС.

ГЛПС характеризуется циклическим течением и многообразием клинических вариантов от abortивных лихорадочных до тяжелых форм с выраженным геморрагическим синдромом и острым повреждением почек. Клинически различают следующие периоды болезни: инкубационный, лихорадочный, олигоурический, полиурический, период реконвалесценции.

Ортохантавирусы, как возбудители ГЛПС, обладают как прямым, так и опосредованным воздействием на иммунную систему, поскольку в число клеток, чувствительных к этим вирусным возбудителям, входят не только эндотелиальные клетки и эпителиальные клетки почек, но и макрофаги, дендритные клетки, лимфоциты, нейтрофилы, тромбоциты. Уникальной особенностью ортохантавирусов является воздействие на моноциты в виде их трансформации в дендритные клетки. Дендритные клетки, будучи инфицированными такими возбудителями, не утрачивают своих функций, в связи с чем, ГЛПС всегда имеет только острое течение.

В целом следует признать, что сведения об иммунопатогенезе ГЛПС в настоящее время носят отрывочный характер и плохо сопоставляются друг с другом, что нарушает целостность представлений о том, что происходит с иммунным ответом при данном заболевании.

Помимо методов специфической диагностики ГЛПС, важное значение для определения тяжести течения заболевания, прогнозирования осложнений и назначения адекватного лечения имеют рутинные лабораторные методы. Существуют попытки внедрения иммунологических методов, не связанных со специфическими для ГЛПС серологическими методами и предназначенных преимущественно для определения тяжести течения заболевания. Сложность ранней диагностики ГЛПС связана с наличием атипичных, стертых форм

заболевания, преобладанием в первые дни болезни общетоксического синдрома без патогномоничных симптомов.

Что касается лечения и профилактики ГЛПС в целом, то, по оценке исследователей, эффективного лечения и вакцинопрофилактики этого заболевания в современном мире пока не разработано.

## ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 – Характеристика объектов и дизайн исследования

Клинический материал был собран у 100 человек, которые составили 3 группы исследования – основную группу и две группы сравнения, в том числе группу здоровых людей.

На базе кафедр инфекционных болезней с эпидемиологией, а также общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии, клиники инфекционных болезней ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России было проведено обследование 245 подтвержденных случаев ГЛПС, разной степени тяжести течения заболевания, находившихся на стационарном лечении с 2016 по 2019 гг. Анализировалась клиническая картина, иммунологические, общие клинические и биохимические изменения в крови и моче пациентов.

Выполненные исследования и манипуляции соответствовали положениям Хельсинской Декларации по вопросам медицинской этики.

Из группы больных ГЛПС были выделены 84 пациента со среднетяжелой и тяжелой формой течения заболевания, в дальнейшем из них были отобраны 65 заболевших, которые полностью соответствовали необходимым критериям.

Таким образом, в основную группу вошли 65 пациентов с верифицированным диагнозом геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), которые на протяжении всего заболевания наблюдались в Инфекционном отделении № 1 (зав. отделением – к.м.н. Любушкина А.В.) кафедры инфекционных болезней с эпидемиологией (зав. кафедрой – д.м.н., доцент Константинов Д.Ю.) Клиники Самарского государственного медицинского университета (главный врач – к.м.н., доцент Измалков Н.С.). 24 пациента поступили в стационар на 2-4-й день болезни, то есть находились под наблюдением, начиная с лихорадочного периода ГЛПС; остальные 41 пациент наблюдались, начиная с олигоурического периода заболевания.

Пациенты группы сравнения 1 на первой неделе заболевания находились в том же стационаре и включали 20 человек, поступивших с подозрением на ГЛПС в период сезонного роста встречаемости этого заболевания (осенне-зимний период). У 7 человек впоследствии методом ПЦР была диагностирована аденовирусная инфекция, у 5 человек – грипп В, у 4 больных – риновирусная инфекция, у 4 пациентов – респираторно-синцитиальная вирусная инфекция. Основанием для включения этих больных в группу сравнения послужила вирусная природа заболевания при аэрогенном пути заражения, схожая клиническая симптоматика в начальный период заболевания, что и определяло возможности их сопоставления с ГЛПС.

Группа сравнения 2 состояла из 15 клинически здоровых доноров крови Самарской областной клинической станции переливания крови (главный врач – Кузнецов С.И.).

Кроме того, с целью тестирования вновь разработанной нами программы для расчета раннего неспецифического интегрального показателя ГЛПС (РНИП ГЛПС) из 36 пациентов, поступавших в разное время в то же инфекционное отделение с клиническими признаками, регистрируемыми, в том числе, и при ГЛПС, была сформирована группа, в которой определялся РНИП ГЛПС, а впоследствии был верифицирован диагноз как ГЛПС, так и ОРВИ.

Аналогичным образом проводилась апробация вновь разработанного в ходе исследования способа прогнозирования тяжести течения ГЛПС с использованием созданной нами компьютерной программы для расчета прогностического критерия тяжелого течения ГЛПС (ПКТТ ГПС), в которой участвовали 25 пациентов, получавших стационарное лечение по поводу геморрагической лихорадки с почечным синдромом.

Таким образом, в целом в исследовании приняли участие 161 человек.

Критерии включения в исследование:

- для всех групп исследования – лица обоих полов в возрасте от 20 до 70 лет, подписавшие информированное согласие на участие в исследовании;

- для основной группы исследования – верифицированный диагноз ГЛПС, вызванной ортохантавирусом *Puumala*;

- для основной группы исследования – наличие ГЛПС среднетяжелого или тяжелого течения;

- для основной группы исследования – четкое выделение клинически выраженных и лабораторно подтвержденных периодов заболевания (лихорадочный, олигоурический, полиурический, реконвалесцентный);

- для группы сравнения № 1 – наличие клинических и лабораторных признаков лихорадочного и общетоксического инфекционного синдрома среднетяжелого и тяжелого течения с последующим подтверждением вирусной этиологии заболевания методом ПЦР.

Всем пациентам проводилась стандартная патогенетическая терапия, включающая в себя дезинтоксикационные и антиоксидантные компоненты согласно клиническим рекомендациям.

Критерии невключения в исследование:

- наличие тяжелых хронических соматических заболеваний в стадии декомпенсации;

- наличие на момент исследования острых заболеваний любой другой этиологии;

- наличие психических заболеваний в настоящее время или в анамнезе;

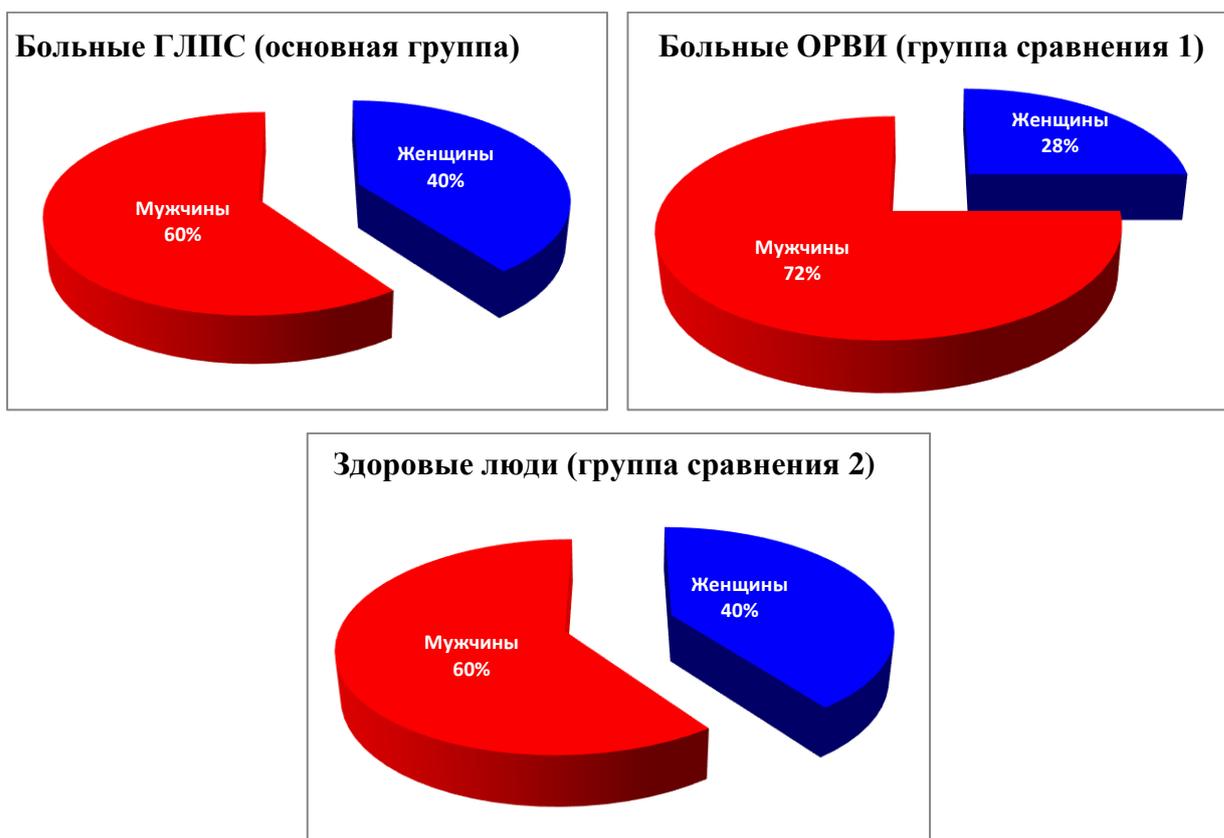
- беременность и лактация;

- отсутствие информированного согласия.

Критериями исключения из исследования были:

- патологические состояния, развившиеся в процессе проведения исследований и патогенетически не связанные с основным заболеванием.

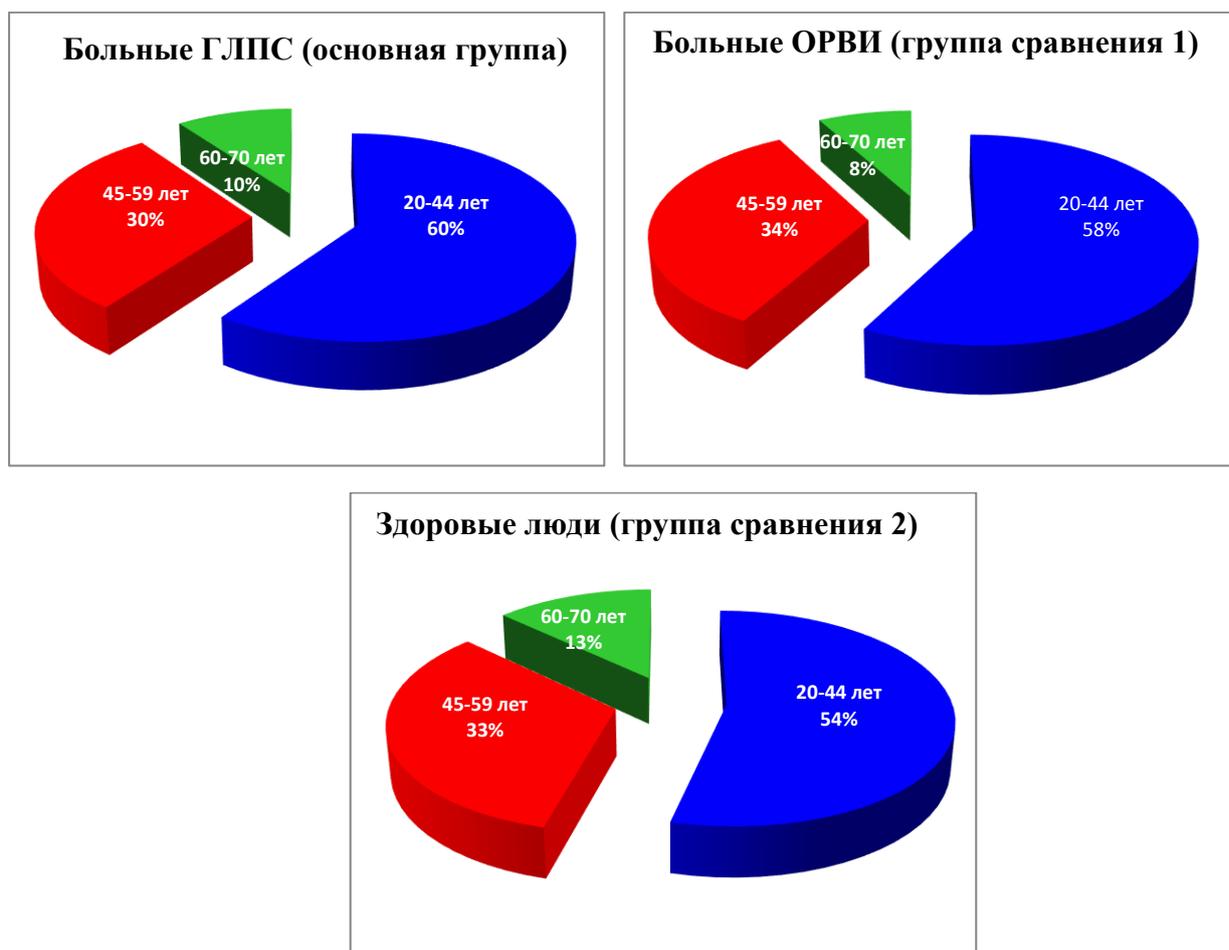
Распределение больных и здоровых лиц по полу в группах исследования представлено на *рисунке 1*.



**Рисунок 1 – Распределение обследуемых лиц по полу в группах исследования**

Распределение по полу в группах исследования несколько различалось по цифрам, но полностью совпадало по тенденциям. Во всех группах число мужчин в 1,5-4 раза больше, чем женщин.

Распределение по возрасту в группах исследования, представленное на *рисунке 2*, проводилось в соответствии с рекомендациями ВОЗ, согласно которым все обследованные нами пациенты распределялись по трем возрастным категориям: (1) молодой возраст – 20-44 лет, (2) средний возраст – 45-59 лет, (3) пожилой возраст (60-70 лет). Соотношение частоты встречаемости различных возрастных категорий в группах исследования примерно совпадало, что делает группы вполне сопоставимыми по возрастному признаку. В группе сравнения № 3 два человека пожилого возраста, не входившие в число доноров, были отобраны из сотрудников отделения переливания крови.



**Рисунок 2 – Распределение обследуемых лиц по возрастным категориям в группах исследования**

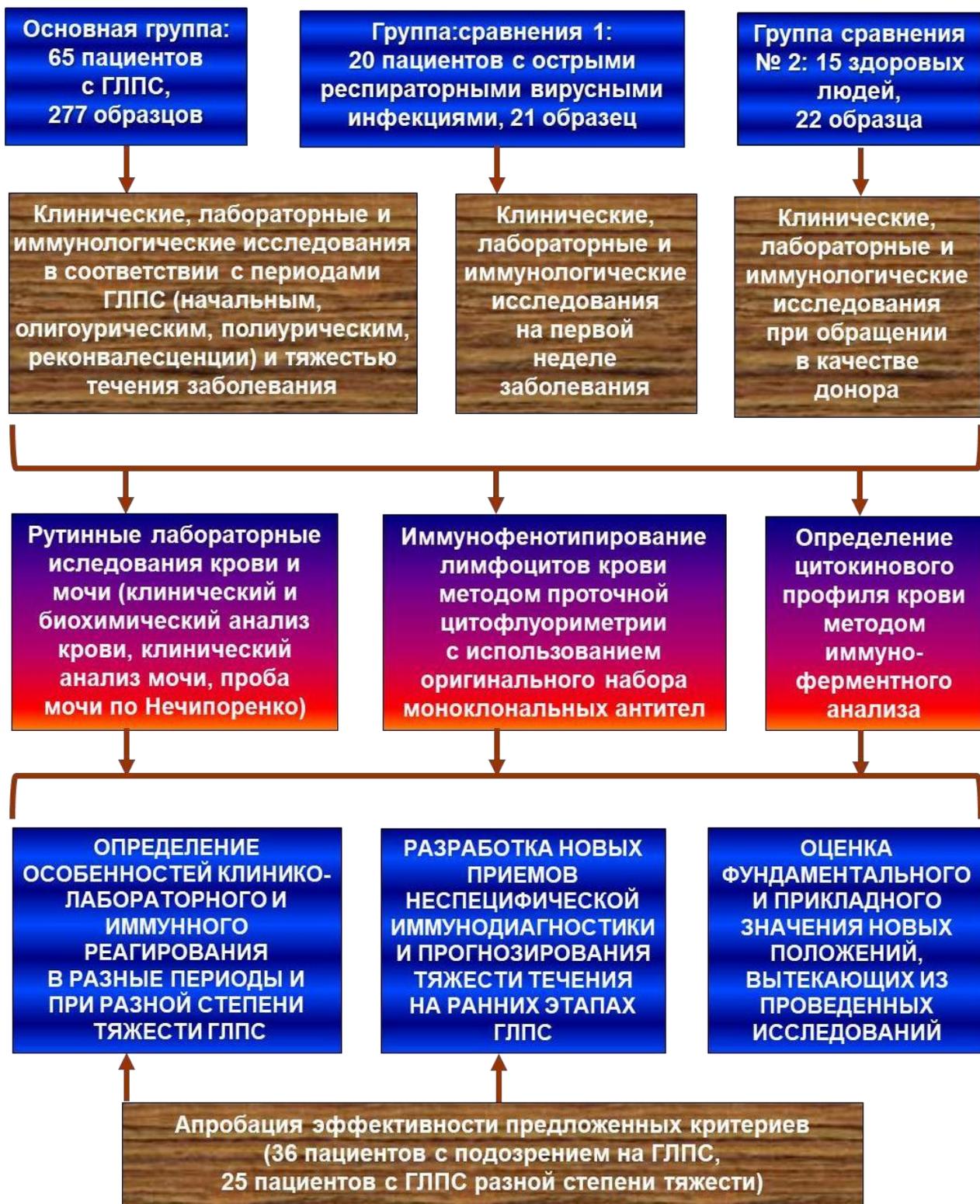
На *рисунке 3* отражен дизайн данного исследования с указанием числа исследуемых лабораторных образцов.

Рутинные лабораторные тесты включали:

- клинический анализ крови,
- биохимический анализ крови,
- клинический анализ мочи,
- исследование мочи по Нечипоренко.

Иммунологические тесты, выполненные методом проточной цитофлуориметрии, включали:

- фенотипическую характеристику популяционного/супопуляционного состава лимфоцитов,
- наличие у лимфоцитов маркеров активации.



**Рисунок 3 – Блок-схема, отражающая дизайн исследований**

Иммунологические тесты с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) проводились как с целью серологической диагностики ГЛПС, так и для определения цитокинового профиля крови.

## **2.2 – Методы исследования**

### **2.2.1 - Клинико-лабораторные критерии диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом**

Клинические признаки ГЛПС: для ГЛПС характерны острое начало, лихорадка, выраженные симптомы интоксикации, явления симпатикотонии, цикличность течения, с 4-5 дня болезни присоединение почечного и геморрагического синдромов.

В анамнезе – контакт с грызунами или инфицированными объектами внешней среды (хворост, солома, сено), а также употребление продуктов, не подвергавшихся термической обработке (капуста, морковь), загрязненных инфицированными грызунами [10].

Серологическая верификация диагноза ГЛПС проводилась с использованием реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) с парными сыворотками. Сыворотку получали из венозной крови пациента, забор которой осуществлялся дважды с интервалом в 5-7 дней [10].

Метод основан на обнаружении специфических анти-ортохантавирусных антител в сыворотке крови пациентов с помощью препарата «Диагностикум геморрагической лихорадки с почечным синдромом культуральный, поливалентный для непрямого метода иммунофлуоресценции» ФГАУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (институт полиомиелита) Россия).

Для серотипирования антител использовали культуральные моновалентные антигенные препараты, приготовленные на основе вирусов Пуумала и Добрава/Белград.

Критерии тяжелого течения ГЛПС включали [10]:

- выраженную интоксикацию (сильная головная боль, упорная икота, тошнота, многократная рвота, лихорадка выше 39,5°C, нарушение зрения, расстройство сна, заторможенность, миалгия, артралгия);
- выраженный геморрагический синдром: геморрагии на коже и слизистых оболочках, носовые обильные кровотечения, кровотечения из внутренних органов;

- олигоанурию (менее 350 мл мочи в сутки в течение 1-3 дней), или анурию (менее 50 мл в сутки),
- значительную протеинурию (белка в моче более 3,3 г/л), гематурию, цилиндрурию;
- выраженную гиперазотемию – мочевины крови выше 20 ммоль/л, креатинин крови до 600 мкмоль/л;
- рост калия плазмы до 6,0 ммоль/л;
- резко положительный симптом Пастернацкого, нередко определяются симптомы перитонизма;
- в гемограмме гиперлейкоцитоз, выраженная тромбоцитопения.

### **2.2.2 – Общеклинические лабораторные исследования**

Общий анализ крови проводили на гематологическом анализаторе фирмы “BESMAN-COULTER” (США) в соответствии с инструкцией по применению данного прибора. Определялся следующий набор показателей с референсными значениями:

- абсолютное число эритроцитов ( $3,80 - 5,19 \times 10^{12}$  клеток/л),
- уровень гемоглобина (113 – 155 г/л),
- относительный показатель гематокрита (35,3 – 47,1 %),
- абсолютное число тромбоцитов ( $150 - 450 \times 10^9$  клеток/л),
- абсолютное число лейкоцитов ( $3,57 - 10,46 \times 10^6$  клеток/л),
- относительное число эозинофилов (0 – 5 %),
- относительное число палочкоядерных нейтрофилов (1 – 6 %),
- относительное число сегментоядерных нейтрофилов (47 – 72 %),
- относительное число лимфоцитов (19 – 37 %),
- относительное число моноцитов (2 – 9 %),
- скорость оседания эритроцитов (СОЭ) (1 – 15мм/час)

Биохимические исследования крови осуществлялись на биохимических анализаторах Hitachi Roche – 902 Automatic analyzer (Япония), Erba XL-600 (Германия), А-25 Bio Systems (Испания) в соответствии с инструкциями по применению приборов.

В спектр определяемых биохимических параметров крови входили:

- общий белок (65 – 85 г/л),
- альбумины (35 – 52 г/л),
- мочевины (2 – 8,3 ммоль/л),
- креатинин (62 – 106 мкмоль/л),
- мочевая кислота (202 – 417 мкмоль/л),
- глюкоза (4,11 – 6,05 г/л),
- общий билирубин (0 – 20,5 ммоль/л),
- холестерин (2,8 – 6,2 ммоль/л),
- амилаза (28 – 100 ЕД/л),
- аспаратаминотрансфераза (АСТ) (0 – 40 ЕД/л),
- аланинаминотрансфераза (АЛТ) (0 – 41 ЕД/л),
- щелочная фосфатаза (ЩФ) (35 – 104 ЕД/л),
- гаммаглутамилтранспептидаза (ГГТ) (7 – 32 ЕД/л),
- лактатдегидрогеназа (ЛДГ) (240 – 480 ЕД/л),
- креатининфосфокиназа (КФК) (0 – 190 ЕД/л),
- ферритин (15 – 200 мкг/л),
- трансферрин (2,0 – 3,6 г/л),
- С-реактивный белок (0,5 – 5 мг/л),
- натрий (137 – 155 ммоль/л),
- калий (3,6 – 6,1 ммоль/л),
- хлор (95 – 110 ммоль/л).

Клинический анализ мочи включал определение следующих параметров:

- суточное количество мочи (1000 – 1600 мл),
- удельный вес (1,018 – 1,025 г/мл),
- рН,
- компоненты осадка (средние показатели в поле зрения): цилиндры, лейкоциты, эритроциты свежие и выщелоченные и др.

Анализ суточной мочи по Нечипоренко проводился для выявления наличия в моче цилиндров различных видов, эритроцитов и лейкоцитов, количество которых подсчитывали в 1 мл осадка.

### **2.2.3 – Молекулярно-биологические методы исследования**

Определение этиологии вирусных инфекций осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Исследуемым материалом служила слизь из носоглотки пациентов.

ПЦР для качественного определения РНК-содержащих вирусов (вирусов гриппа А/В, парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов, риновирусов, респираторно-синцитиальных вирусов, коронавирусов SARS-CoV-2) и ДНК-содержащих аденовирусов осуществлялась с использованием аппаратуры «StepOne™ Real-Time PCR System» (США) в соответствии с инструкцией по применению прибора и реагентов.

Обнаружение в исследуемом материале РНК указанных вирусов осуществлялось методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) «ОТ-ГЕПАТОГЕН-С КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ» (Аналитика, Россия), основанном на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации комплементарной ДНК (кДНК), заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройкой полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Качественное определение ДНК аденовирусов также проводилось на основе тест-систем Аналитика (Россия).

### **2.2.4 – Иммунологические методы исследования**

Иммунологические лабораторные исследования по фенотипированию лимфоцитов проводились в отделе лабораторной диагностики (зав. отделом Бочкарева Н.Н.) Самарского диагностического центра (и.о. директора – Мелкова Е.Г.).

Материалом для исследования являлась венозная кровь. Забор крови проводился у пациентов утром натощак в количестве 5 мл в пробирки Vacuum Tube

EDTA.К3 (цельная кровь). Исследование крови осуществлялось в течение двух часов после забора.

Фенотипирование лимфоцитов проводилось методом проточной цитофлуориметрии с использованием цитофлуориметра BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) после автоматизированной пробоподготовки цельной крови с помощью станции автоматической пробоподготовки BD FACS Sample Prep Assistant II (Becton Dickinson, США) в соответствии с инструкцией по применению приборов и моноклональных антител.

Проводилось изучение следующих показателей иммунограммы:

- абсолютное и относительное число  $CD19^+$  клеток среди лимфоцитов ( $CD45^+$ ) крови (В-лимфоцитов);
- абсолютное и относительное число  $CD3^+$  клеток среди лимфоцитов ( $CD45^+$ ) крови (Т-лимфоцитов);
- абсолютное и относительное число  $CD3^+CD4^+$  клеток среди лимфоцитов ( $CD45^+$ ) крови (Т-хелперов, или Th);
- абсолютное и относительное число  $CD3^+CD8^+$  клеток среди лимфоцитов ( $CD45^+$ ) крови (цитотоксических Т-лимфоцитов, или CTL);
- абсолютное и относительное число  $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$  клеток среди лимфоцитов ( $CD45^+$ ) крови ( $CD4^+$  регуляторных Т-клеток, или Treg);
- абсолютное и относительное число  $CD3^+CD8^+CD25^+FoxP3^+$  клеток среди лимфоцитов ( $CD45^+$ ) крови ( $CD8^+$  регуляторных Т-клеток, или Treg);
- абсолютное и относительное число  $CD3^+CD4^+CD56^+$  клеток среди лимфоцитов ( $CD45^+$ ) крови ( $CD4^+$  натуральных киллерных Т-лимфоцитов, или NKT);
- абсолютное и относительное число  $CD3^+CD8^+CD56^+$  клеток среди лимфоцитов ( $CD45^+$ ) крови ( $CD8^+$  натуральных киллерных Т-лимфоцитов, или NKT);
- абсолютное и относительное число  $CD3^+CD4^-CD8^-CD56^+$  клеток среди лимфоцитов ( $CD45^+$ ) крови (дважды негативных натуральных киллерных Т-лимфоцитов, или DN NKT);

- абсолютное и относительное число CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> клеток среди лимфоцитов (CD45<sup>+</sup>) крови (натуральных киллеров, или NK);

- абсолютное и относительное число CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток среди лимфоцитов (CD45<sup>+</sup>) крови (Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор активации CD25);

- абсолютное и относительное число CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD314<sup>+</sup> клеток среди лимфоцитов (CD45<sup>+</sup>) крови (цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор активации NKG2D, или NKG2D<sup>+</sup> CTL);

- абсолютное и относительное число CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD314<sup>+</sup> клеток среди лимфоцитов (CD45<sup>+</sup>) крови (натуральных киллеров, экспрессирующих рецептор активации NKG2D).

Для определения перечисленных показателей использовался стандартизированный комплект моноклональных антител (МКАТ) BD Multitest 6-Color TBNK Reagent (BD Biosciences, США), содержащий меченные PerCP-Cy5.5 anti-CD45 МКАТ, меченные FITC anti-CD3 МКАТ, меченные PE-Cy7 anti-CD4 МКАТ, меченные APC-Cy7 anti-CD8 МКАТ, меченные APC anti-CD19 МКАТ, меченные PE anti-CD16/anti-CD56 МКАТ.

Расчет абсолютных величин показателей проводился по формуле:

$$\text{Число клеток (10}^9\text{/л)} = \frac{\% \text{ клеток от общего числа лимфоцитов} * \text{число лимфоцитов (10}^9\text{/л)}}{100\%} \quad (1)$$

*Определение функциональной активности лимфоцитов.* Для анализа функциональной активности лимфоцитов регистрировались уровни экспрессии на их мембране таких маркеров как: 1) активирующие рецепторы CD25 на мембране Т-лимфоцитов, 2) активирующие лектиновые рецепторы NKG2D (CD314) на мембране CTL и NK, 3) внутриклеточные маркеры FoxP3 в составе CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток, 4) мембранный маркер CD56 на мембране CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> НКТ.

*Определение функциональных свойств лимфоцитов* проводилось в отдельной пробе крови с использованием следующих моноклональных антител: меченные PE-Cy5 anti-CD3 МКАТ (IOtest, Beckman Coulter, США), меченные PE anti-CD25 МКАТ (IOtest, Beckman Coulter, США); меченные PE-Cy5 anti-CD56

МКАТ (IOTest, Beckman Coulter, США), меченные PE anti-NKG2D МКАТ (IOTest, Beckman Coulter, США); меченные FITC anti-FoxP3 МКАТ (BD Biosciences, США) с использованием пермеабилизирующих компонентов фирмы Beckman Coulter, США.

*Определение цитокинов в крови.* Проводилось тестирование уровней интерлейкинов (IL) -4, -1 $\beta$ , -6, -10, -12, -15, факторов некроза опухолей  $\alpha$  и  $\beta$  (TNF $\alpha$  и TNF $\beta$ ), интерферона  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. Иммуноферментный анализ (ИФА) осуществлялся из проб сыворотки крови с использованием комплекта аппаратуры, включающего планшетный фотометр «OPSYS MR» (ридер) фирмы «THERMOLABSYSTEMS» (Финляндия), планшетный вошер ПП2-428 фирмы «ИММЕДТЕХ» (Россия), принтер «EPSON» (Япония) для раздельного определения в соответствии с инструкцией по применению аппаратуры и комплектов соответствующих моноклональных антител производства Вектор Бест (Россия).

### **2.3 – Методы статистического анализа**

Статистическая обработка данных проводилась на основе пакета статистических программ SPSS (версия 23) в соответствии с инструкцией по его применению.

Для статистической обработки количественных данных применялись методы дескриптивной статистики с определением медианы, минимума и максимума показателей. При определении отдельных признаков (например, средний возраст и др.) указывались средние величины и их стандартные отклонения. Сравнение величин, в связи с отсутствием нормального распределения данных, осуществлялось приемами непараметрической статистики с использованием критерия Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Для определения связей между разными категориями показателей выполнялся корреляционный анализ с использованием коэффициента корреляции Спирмена.

Для определения диагностически значимых интервалов значений индексов, маркеров, показателей рассчитывался их 95 % доверительный интервал.

Соотношение чувствительности и специфичности полученных критериев при оценке диагностической точности каждого информативного признака или показателя устанавливалось методом линейной регрессии с построением ROC-кривой и расчетом площади под кривой – AUC [39, 381, 415].

### **ГЛАВА 3 - ГЕМОРРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ: ПАТОГЕНЕЗ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА В НАЧАЛЬНЫЙ ПЕРИОД**

#### **3.1 – Клинико-лабораторная характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом в начальный период, дифференциально-диагностическое значение**

Объектами исследования в данном разделе работы служили 44 пациента в начальный период заболевания (2-5-й дни болезни), поступавшие с 2016 по 2019 годы на стационарное лечение в инфекционное отделение № 1 Клиники Самарского государственного медицинского университета с преобладанием клинических признаков лихорадки и общей интоксикации в сочетании с проживанием в эндемичной зоне по геморрагической лихорадке с почечным синдромом в эпидемиологически опасный период (сентябрь-ноябрь). В этот период часто возникала необходимость дифференциальной диагностики ГЛПС с острыми респираторными вирусными инфекциями, которые также имеют аэрогенный механизм инфицирования и похожие клинические проявления.

После 5-го дня болезни у всех пациентов проводилась серологическая диагностика геморрагической лихорадки с почечным синдромом, в результате которой 24 пациентам был установлен диагноз ГЛПС. Среди остальных пациентов у 7 человек впоследствии методом ПЦР была диагностирована аденовирусная инфекция, у 7 человек – грипп В, у 4 больных – риновирусная инфекция, у 4 пациентов – респираторно-синцитиальная вирусная инфекция, эти 20 пациентов были объединены нами в группу острых респираторных вирусных инфекций. Допустимый размер каждой выборки пациентов устанавливался с помощью программы G\*Power и составлял не менее 20 образцов.

Частота регистрации основных клинических симптомов и результаты объективного обследования в начальный период заболевания у пациентов обеих

групп, сформированных в соответствии с установленным в более поздние сроки диагнозом ГЛПС и ОРВИ представлены в *таблице 1*.

**Таблица 1 – Клинические признаки у пациентов групп сравнения в начальный период заболевания**

Клинические признаки		Частота встречаемости признака (человек/%)		ONE WAY ANOVA	
		ГЛПС n = 24	ОРВИ n = 20	F	p
1		2	3	4	5
Жалобы пациента	Общая слабость	24 чел. / 100%	17 чел. / 85%	5,727	0,062
	Головная боль	15 чел. / 62,5%	18 чел. / 90%	0,934	0,339
	Боль в мышцах	16 чел. / 66,7%	18 чел. / 90%	4,667	0,254
	Озноб	16 чел. / 66,7%	14 чел. / 70%	0,053	0,818
	Сухость во рту	21 чел. / 87,5%	7 чел. / 35%	17,601	<0,001***
	Икота	3 чел. / 12,5%	1 чел. / 10%	0,721	0,401
	Тошнота	10 чел. / 41,7%	2 чел. / 10%	6,019	0,018*
	Рвота	7 чел. / 29,2%	3 чел. / 15%	1,225	0,275
	Насморк	2 чел. / 8,3%	12 чел. / 60%	18,439	<0,001***
	Носовые кровотечения	9 чел. / 37,5%	5 чел. / 25%	0,764	0,387
	Кашель	9 чел. / 37,5%	9 чел. / 45%	0,244	0,624
	Снижение зрения	2 чел. / 8,3%	1 чел. / 10%	0,183	0,671
	Резь в глазах, слезотечение	1 чел. / 4,2%	4 чел. / 20%	2,762	0,104
	Боли в пояснице	18 чел. / 75%	3 чел. / 15%	23,397	<0,001***
	Снижение суточного количества мочи	9 чел. / 37,5%	2 чел. / 10%	4,667	0,037*
Объективное исследование	Лихорадка (38°C и выше)	24 чел. / 100%	20 чел. / 100%	1,206	0,278
	Гиперемия лица	24 чел. / 100%	9 чел. / 45%	12,336	0,001**
	Пастозность лица	15 чел. / 62,5 %	4 чел. / 20%	9,378	0,004**

Продолжение таблицы 1

		1	2	3	4	5
Объективное исследование	Инъекция сосудов склер	21 чел. / 87,5%	14 чел. / 70%	2,056	0,159	
	Кровоизлияния в склеру и конъюнктиву глаз (симптом «вишни»)	5 чел. / 20,8%	-	-	-	
	Геморрагический синдром	11 чел. / 45,8%	4 чел. / 20%	3,339	0,075	
	Симптом Пастернацкого	14 чел. / 58,3%	2 чел. / 10%	14,022	0,001**	
	Жесткое дыхание	18 чел. / 75%	13 чел. / 65%	0,506	0,481	

Примечание: n – число пациентов в группе, F – критерий Фишера дисперсии данных, p – вероятность гетерогенности групп исследования, достоверность межгрупповых различий:

\* - умеренная, \*\* - высокая, \*\*\* - очень высокая

Степень соответствия клинических признаков обоих заболеваний друг другу наглядно показана на рисунке 4.



**Рисунок 4 – Области совпадения и различия частоты регистрации симптоматики геморрагической лихорадки с почечным синдромом и острых респираторных вирусных инфекций в начальный период заболевания**

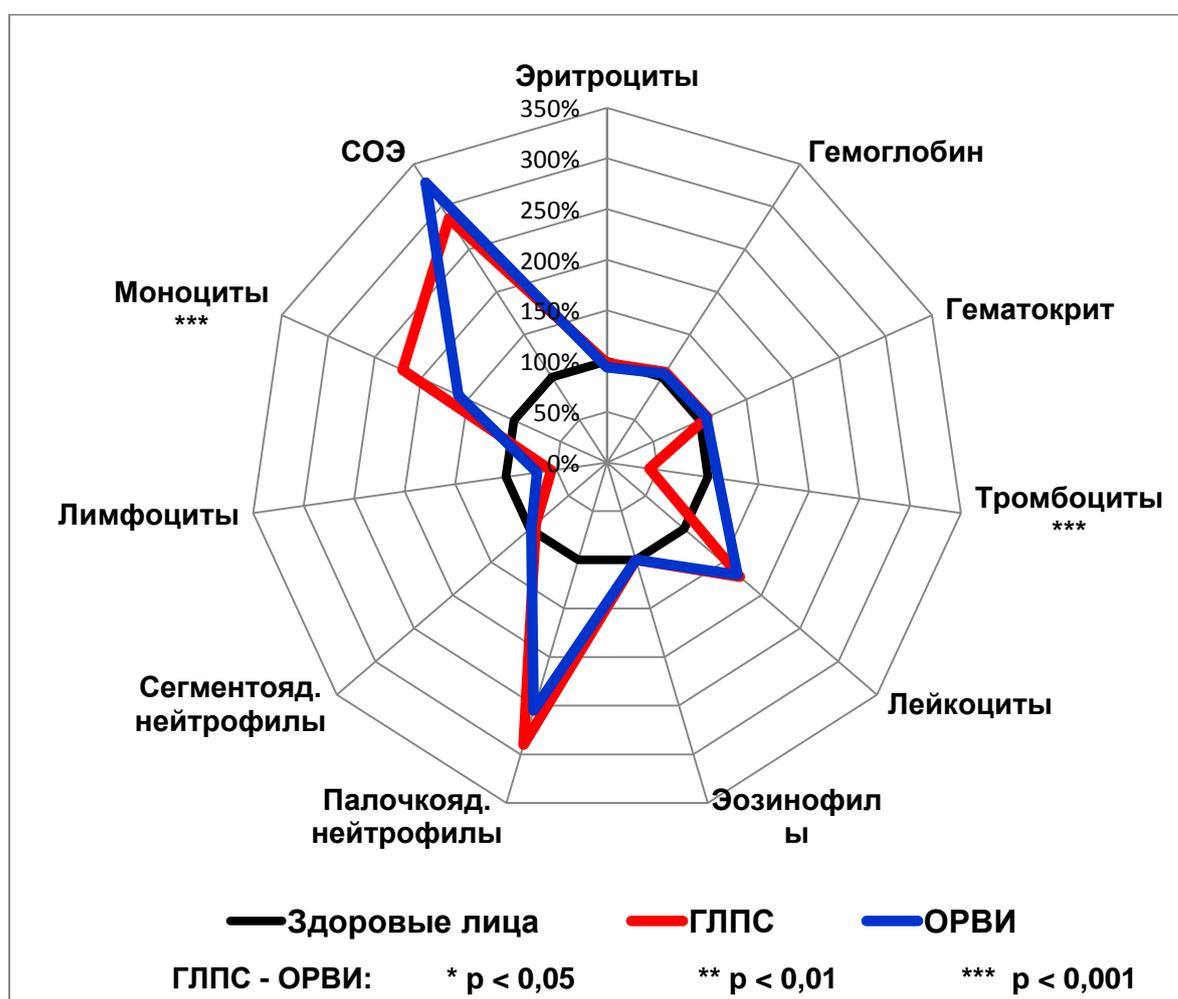
Как следует из *таблицы 1* и *рисунка 4*, около 60 % жалоб, предъявляемых пациентами, и клинических признаков, отмеченных при объективном исследовании, регистрировались с примерно одинаковой частотой у пациентов в первые дни болезни, которым впоследствии были диагностированы либо ГЛПС, либо ОРВИ. С эпидемиологической точки зрения эти совпадения не случайны, поскольку оба заболевания имеют сезонный характер и, преимущественно, аэрогенный путь заражения. Более того, несмотря на последующие клинические проявления ГЛПС, связанные с преимущественным поражением почек и геморрагическим синдромом, по мнению большинства исследователей, это заболевание и у животных, и у людей начинается с первичного накопления ортохантавирусов в дыхательной системе [109, 339, 393].

Около 40 % клинических проявлений ГЛПС и ОРВИ имеют различия по частоте встречаемости, то есть при одной из категорий заболеваний регистрируются достоверно чаще. К этой группе симптомов, как следует из таблицы, относятся при ГЛПС начальные проявления поражения почек, а при ОРВИ – симптомы поражения слизистой оболочки носа.

Интересно, что такое во многом патогномоничное для ГЛПС патологическое состояние как геморрагический синдром в число характерных клинических проявлений данного заболевания не вошло, поскольку при ряде острых респираторных вирусных инфекций, например, при гриппе, геморрагический синдром является одним из типичных клинических признаков [121, 202]. Несмотря на то, что ряд симптомов являются более характерными для ГЛПС, в наших исследованиях среди них не было ни одного, который встречался бы только при одной из анализируемых патологий. В связи с этим, клинические признаки вряд ли можно считать надежными диагностическими критериями ГЛПС, они играют лишь вспомогательную роль.

Далее аналогичным образом анализировалось дифференциально-диагностическое значение в начальный период сопоставляемых заболеваний результатов рутинных лабораторных исследований, к числу которых относились клинический и биохимический анализ крови, клинический анализ мочи.

Клинический анализ крови выполнялся всем пациентам как с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, так и с острой респираторной вирусной инфекцией, в том числе поступившим на стационарное лечение в начальный период заболевания. Результаты клинического анализа крови в этот период по обеим группам исследования, а также у здоровых людей представлены в *таблице 2* и на *рисунке 5*. При этом на рисунке 5 отражены не собственно значения показателей, а проценты их отклонения в группах ГЛПС и ОРВИ от данных в группе клинически здоровых лиц.



**Рисунок 5 – Проценты отклонения от показателей здоровых лиц гемограмм пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом и острыми респираторными вирусными инфекциями**

**Таблица 2 – Показатели клинического анализа крови у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом и острыми респираторными вирусными инфекциями по сравнению с данными клинически здоровых лиц**

Лабораторные показатели	Медиана (минимум; максимум)			Критерий Манна-Уитни
	Пациенты с ГЛПС n = 24	Пациенты с ОРВИ n = 20	Здоровые лица n = 15	p <sub>1</sub> p <sub>2</sub> p <sub>3</sub>
Эритроциты (10 <sup>12</sup> клеток/л)	4,9 (3,9; 6,2)	4,7 (3,6; 5,5)	5,0 (3,3; 6,5)	0,194 0,868 0,763
Гемоглобин (г/л)	150 (89; 208)	146 (119; 202)	141 (104; 204)	0,733 0,602 0,852
Гематокрит (%)	43,0 (30,5; 55,1)	42,6 (30; 56,4)	39,9 (29,3; 55,7)	0,889 0,093 0,167
Тромбоциты (10 <sup>9</sup> клеток/л)	96,0 (14,0; 391,0)	254 (289; 358)	230,0 (187,0; 301,0)	0,001** 0,778 <0,001***
Лейкоциты (10 <sup>6</sup> клеток/л)	10,7 (2,5; 35,7)	10,5 (3,4; 17,8)	6,2 (3,4; 7,9)	<0,001*** 0,002** 0,199
Эозинофилы (%)	0 (0; 6,0)	0 (0; 3)	0 (0; 2,0)	0,912 0,166 0,641
Палочкоядерные нейтрофилы (%)	6,0 (0; 22,0)	5 (1; 8)	2 (1; 5)	0,036* 0,048* 0,260
Сегментоядерные нейтрофилы (%)	59,0 (37,0; 72,8)	63 (49; 70)	64 (42; 74)	0,458 0,894 0,162
Лимфоциты (%)	17,5 (6,4; 39,1)	22 (15; 43)	31,8 (19,2; 45,6)	<0,001*** 0,003** 0,211
Моноциты (%)	11,0 (3,9; 25,4)	8 (6; 18)	5 (4; 10)	0,034* 0,049* <0,001***
СОЭ мм/час	20 (5; 40)	23 (9; 38)	7 (3; 12)	0,002** <0,001*** 0,380

*Примечание:* n - число исследований в группе, p<sub>1</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС и здоровых лиц, p<sub>2</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ОРВИ и здоровых лиц, p<sub>3</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС и с ОРВИ; статистическая значимость различий: \* при p < 0,05; \*\* при p < 0,01; \*\*\* при p < 0,001

Как следует из *таблицы 2* и *рисунка 5*, в первые дни ГЛПС и ОРВИ различия по клиническому анализу крови минимальны и на достоверном уровне ( $p < 0,05$ ) касаются только двух показателей – абсолютного содержания тромбоцитов в крови и процента моноцитов среди лейкоцитов крови.

Снижение числа тромбоцитов в крови является патогномоничным для ГЛПС. В данном исследовании на начальном периоде заболевания тромбоцитопения уже принимает статистически значимый характер, а медиана числа тромбоцитов становится в 2,6 раза ниже, чем в группе ОРВИ.

Что касается моноцитов, то количество этих клеток в крови при ГЛПС, наоборот, в 1,4 раза выше, чем при заболеваниях другой вирусной природы.

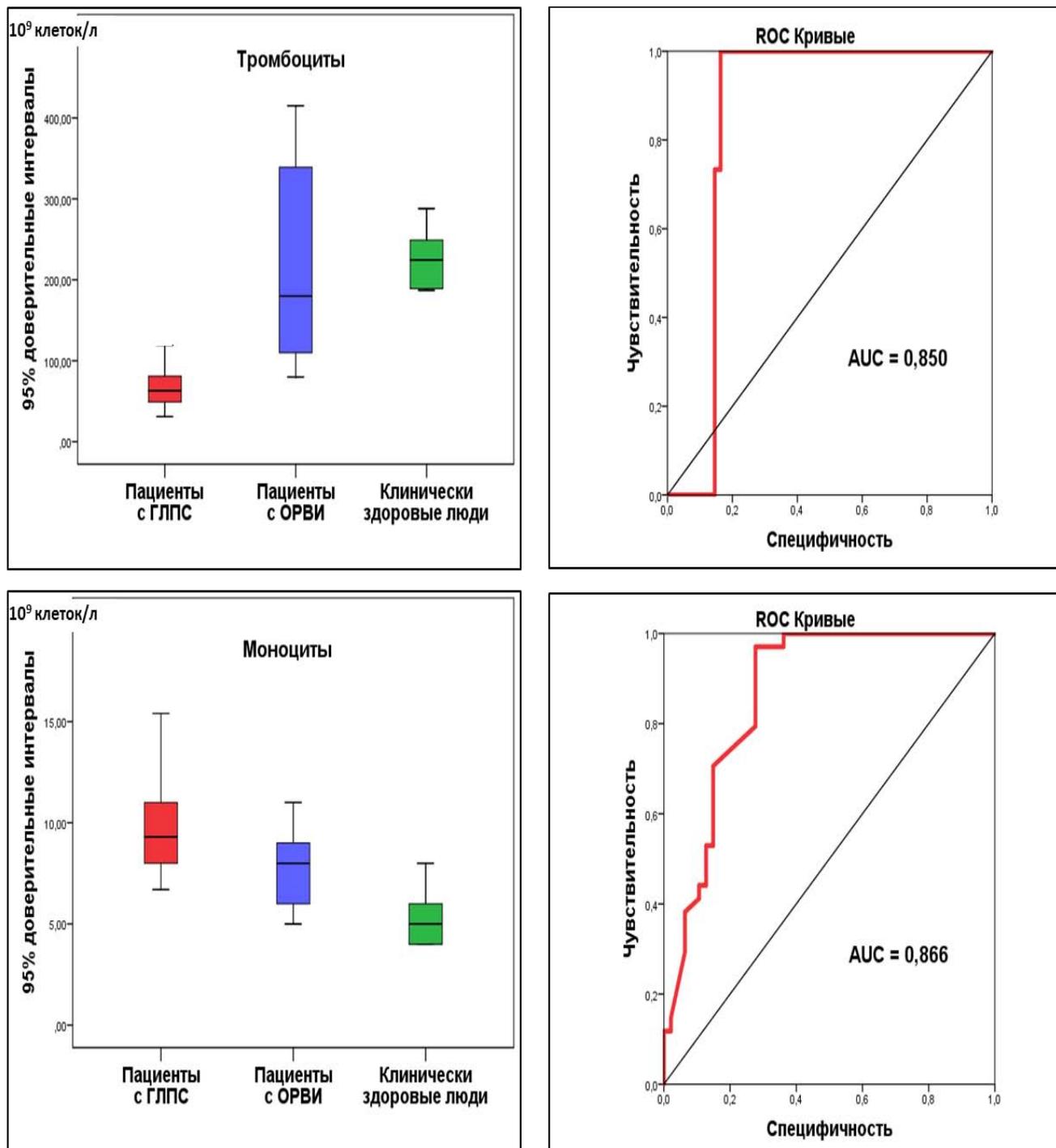
Остальные показатели, такие как число лейкоцитов, процент сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, СОЭ достоверно повышаются у больных при любых анализируемых вирусных заболеваниях и различий между ГЛПС и ОРВИ не выявляют, то есть имеют не специфичный для ГЛПС характер.

Для подтверждения диагностической значимости наиболее характерных для ГЛПС сдвигов со стороны тромбоцитов и моноцитов крови определялись 95 % доверительные интервалы этих показателей у пациентов с ГЛПС и ОРВИ, по сравнению со здоровыми людьми, а также выполнялось построение ROC-кривых с вычислением площади под ROC-кривой – AUC. Эти данные представлены на *рисунке 6*.

Как показывают диаграммы, и число тромбоцитов, и процент моноцитов при ГЛПС обладают диагностической значимостью.

Так, число тромбоцитов в случае сравнения геморрагической лихорадки с почечным синдромом с острыми респираторными вирусными инфекциями в первые дни заболевания при величине  $< 160 \times 10^9$  клеток/л свидетельствует в пользу ГЛПС с высокой диагностической значимостью, составляющей в единицах AUC 0,850 (при максимуме 1,0).

Доля моноцитов среди лейкоцитов крови при величине  $> 7,2\%$  также делает вероятным наличие ГЛПС с высокой диагностической значимостью при  $AUC = 0,866$ .



**Рисунок 6 – 95 % доверительные интервалы содержания тромбоцитов и моноцитов в крови и ROC-кривые их диагностической значимости**

Далее выполнялся анализ биохимических показателей крови в начальный период у пациентов с ГЛПС и ОРВИ в сравнении с группой клинически здоровых

лиц, как это представлено в *таблице 3*, и в виде процента отклонения показателей при заболеваниях от параметров здоровых людей, показанного на *рисунке 7*.

**Таблица 3 – Показатели биохимического анализа крови у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом и острыми респираторными вирусными инфекциями по сравнению с данными клинически здоровых лиц**

Лабораторные показатели	Медиана (минимум; максимум)			Критерий Манна-Уитни p <sub>1</sub> p <sub>2</sub> p <sub>3</sub>
	Пациенты с ГЛПС n = 24	Пациенты с ОРВИ n = 20	Здоровые лица n = 15	
1	2	3	4	5
Мочевина, ммоль/л	7,3 (3,1; 37,8)	5,5 (2,9; 14,3)	5,3 (2,5; 6,8)	0,039* 0,603 0,041*
Креатинин, мкмоль/л	119,1 (72; 608)	79,2 (57,4; 95,8)	76 (54; 89)	0,003** 0,754 0,001**
Мочевая кислота, мкмоль/л	324,5 (105; 668)	300,95 (227; 493)	299,5 (220; 342)	0,688 0,556 0,914
Общий белок, г/л	61,9 (14; 391)	68,9 (53,5; 83,5)	75 (60; 88)	0,005** 0,067 0,182
Альбумин, г/л	36,0 (27,3; 45,4)	40,6 (31,4; 46,7)	49,8 (33,8; 54,3)	0,011* 0,059 0,143
Общий билирубин, ммоль/л	7,8 (3,8; 58)	10,6 (6,3; 27,8)	11,4 (7; 18)	0,146 0,022* 0,793
Холестерин, ммоль/л	3,3 (2,1; 4,0)	3,9 (3,5; 6,7)	5,2 (4,0; 6,3)	<0,001*** 0,020* 0,045*
Амилаза, ЕД/л	37,4 (31,7; 61,8)	44 (29,9; 77,1)	55 (54; 75)	0,013* 0,214 0,115
Аланинаминотрансфераза (АЛТ), ЕД/л	38,8 (22,5; 128,0)	31,6 (10,2; 104,2)	26,5 (13; 51)	0,017* 0,262 0,039*
Аспаратаминотрансфераза (АСТ), ЕД/л	43,9 (13,2; 111,0)	24 (11,3; 94,5)	18,5 (14; 35)	<0,001*** 0,183 0,030*
Щелочная фосфатаза (ЩФ), ЕД/л	60,9 (34,6; 86,1)	69,7 (53,3; 84,2)	72 (44; 107)	0,186 0,053 0,094
γ-глутамилтранспептидаза (ГГТП), ЕД/л	31,7 (7,4; 272,9)	35,2 (23,8; 182)	12,4 (8,3; 15,4)	<0,001*** <0,001*** 0,040*

Продолжение таблицы 3

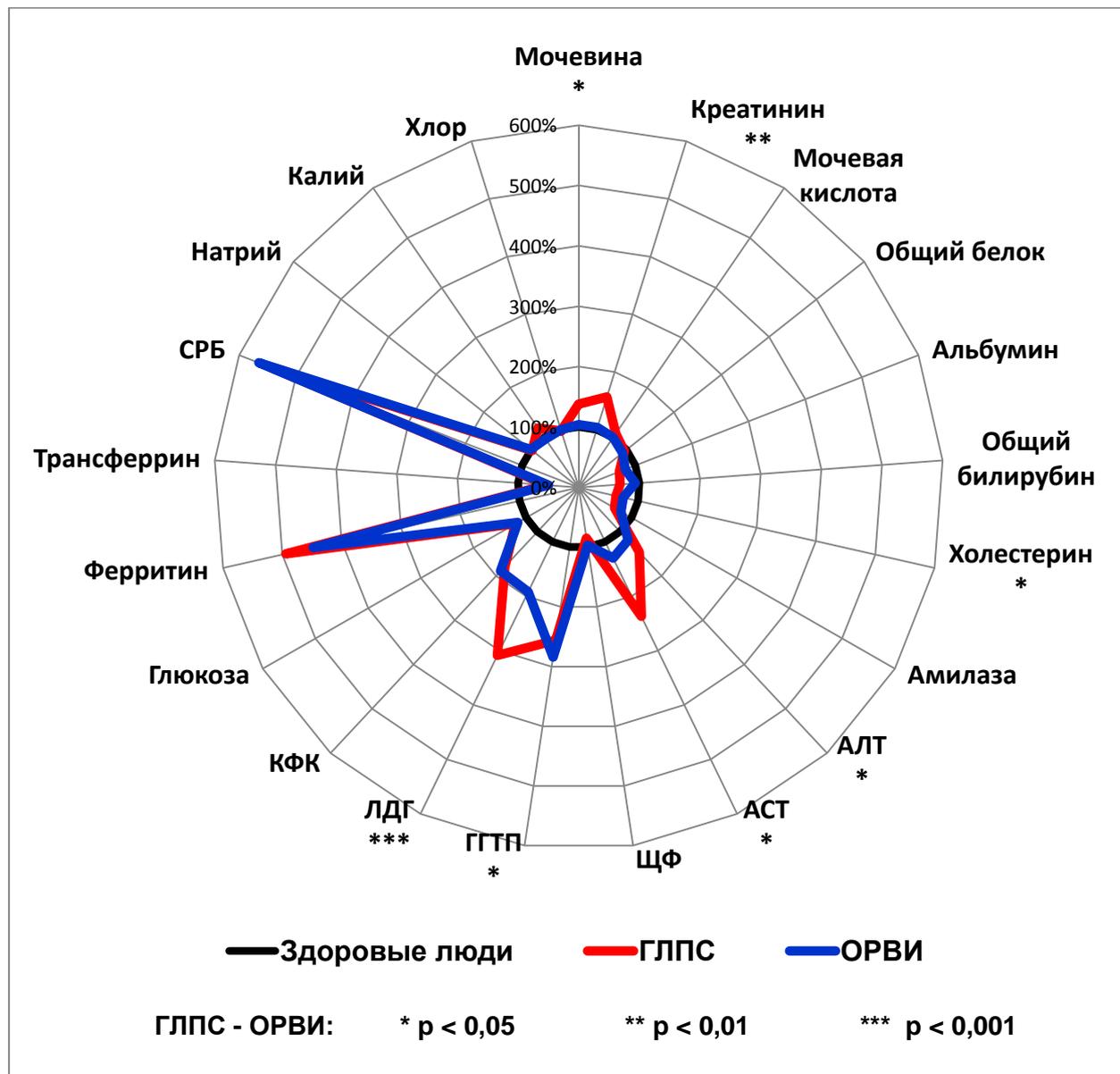
1	2	3	4	5
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ), ЕД/л	522,6 (379; 985)	324 (274; 536,5)	169 (135; 200)	<0,001*** <0,001*** <0,001***
Креатинфосфокиназа (КФК), ЕД/л	118 (14,6; 934,0)	124 (23; 887)	66 (25; 101)	0,627 0,106 0,128
Глюкоза, г/л	6,1 (4,1; 8,4)	5,9 (4,0; 7,8)	5,1 (3,5; 8,5)	0,824 0,068 0,250
Ферритин, мкг/л	760 (77,5; 1012)	702 (92,5; 998)	128 (35; 174)	0,004** 0,004** 0,069
Трансферрин, г/л	2,0 (1,5; 3,7)	1,9 (1,4; 2,7)	38 (27; 41)	0,001** 0,004** 0,998
С-реактивный белок (СРБ), мг/л	67,4 (12,8; 250,0)	77,2 (1,1; 413,6)	0,8 (0,5; 1,1)	<0,001*** <0,001*** 0,364
Натрий, ммоль/л	139 (115; 149)	142 (126; 149)	141 (136; 146)	0,727 0,723 0,998
Калий, ммоль/л	4,4 (3,1; 7,2)	3,6 (3,5; 3,9)	3,7 (3,0; 4,1)	0,001** 0,005** 0,244
Хлор, ммоль/л	99,4 (84,0; 112,7)	100,8 (96; 105)	101 (95; 106)	0,753 0,462 0,390

*Примечание:* n - число людей в группе, p<sub>1</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС и здоровых лиц, p<sub>2</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ОРВИ и здоровых лиц, p<sub>3</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС и с ОРВИ; статистическая значимость различий: \*при p<0,05; \*\*при p<0,01; \*\*\*при p<0,001

При сравнении биохимических показателей больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом с аналогичными показателями больных с острыми респираторными вирусными инфекциями в первую неделю заболевания достоверность различий для разных нозологий касается только уровней мочевины, креатинина, холестерина, активности аланин-аминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ),  $\gamma$ -глутамил-транспептидазы (ГГТП), лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

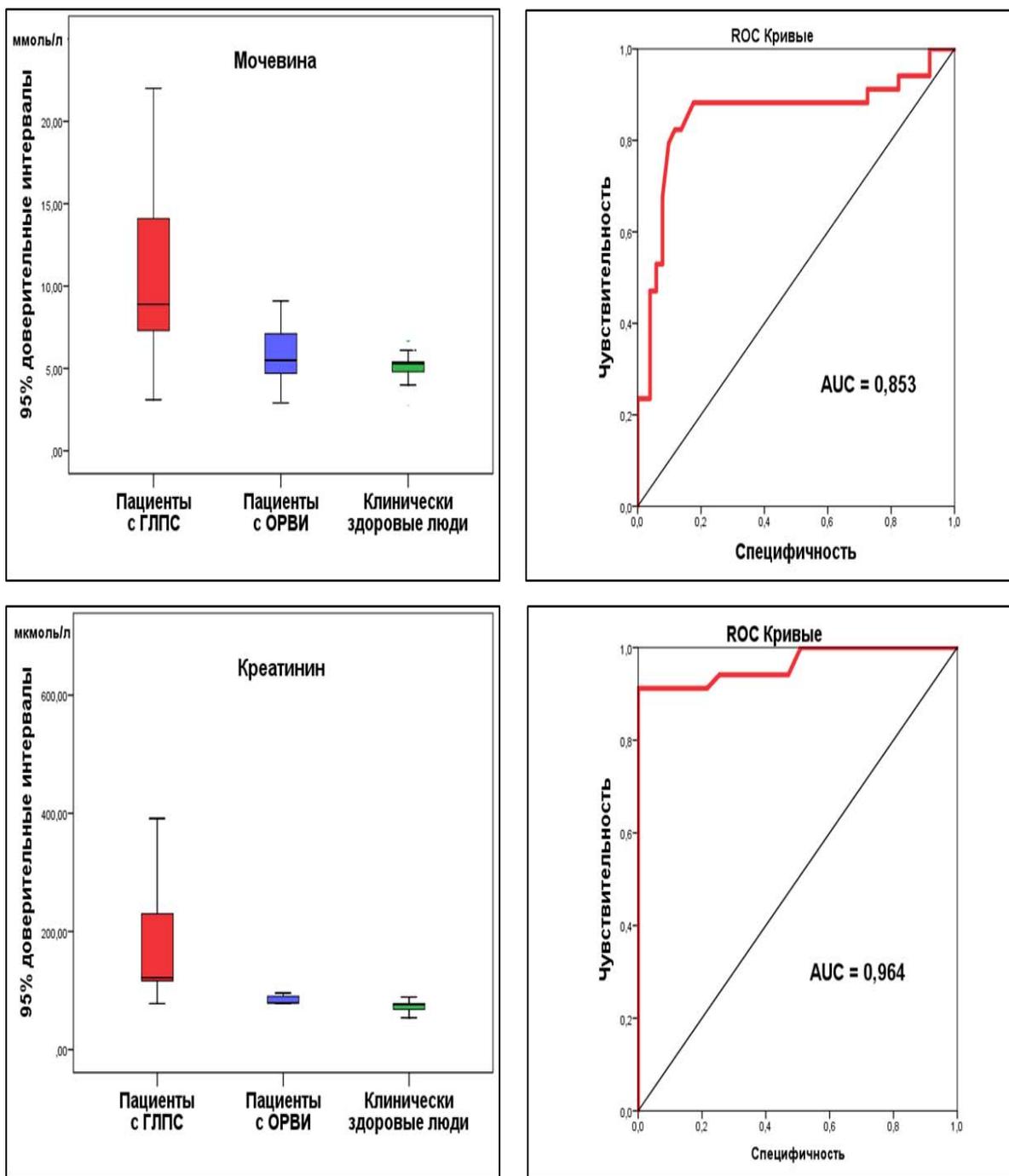
При оценке ГЛПС и ОРВИ все перечисленные признаки, кроме холестерина и общего белка, показывают значительное повышение. Статистически более значимо при ГЛПС нарастают уровни мочевины и креатинина, активность АЛТ,

АСТ, ГГТП, ЛДГ, падает уровень холестерина, а снижение в крови содержания общего белка сопоставимо с этим признаком при ОРВИ в первые дни заболевания.



**Рисунок 7 – Проценты отклонения от показателей здоровых лиц биохимических параметров пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом и острыми респираторными вирусными инфекциями**

Не являются строго специфичными для ГЛПС снижение уровней альбумина, билирубина, трансферрина, рост показателей ферритина, СРБ, калия в крови. Все отмеченные информативные показатели тестировались далее с точки зрения их диагностической значимости по их 95 %-ным доверительным интервалам и путем построения ROC-кривых, как показано на рисунках 8-11.

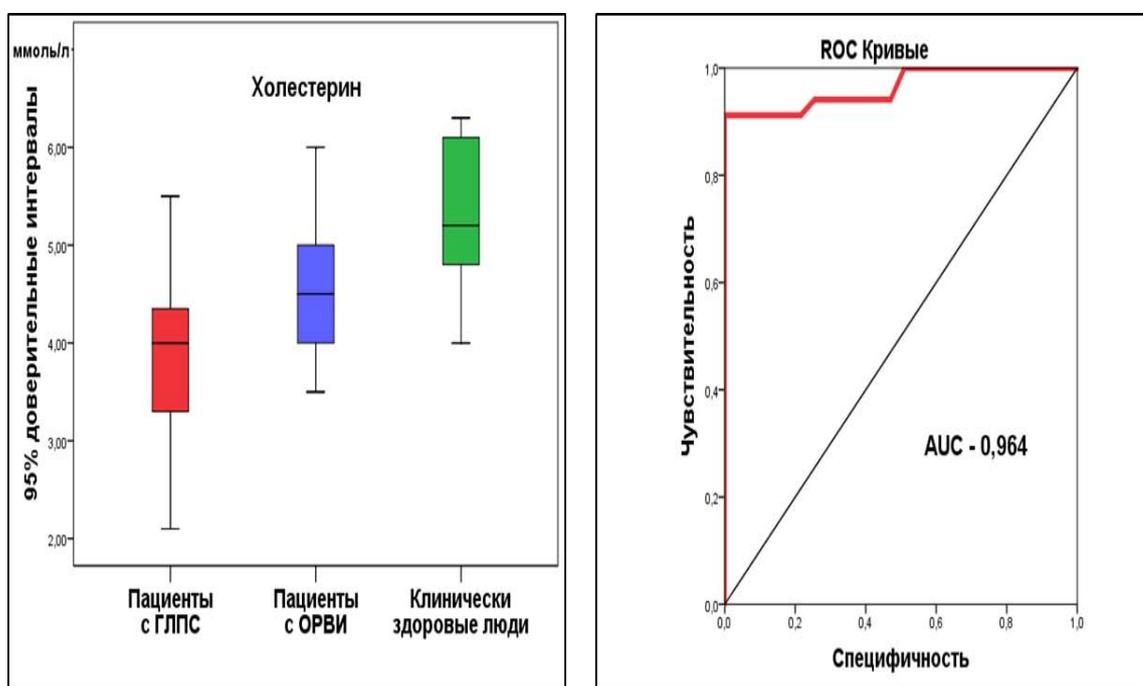


**Рисунок 8 – 95 % доверительные интервалы содержания мочевины и креатинина в крови и ROC-кривые их диагностической значимости**

На *рисунке 8* графически отражены 95 % доверительные интервалы для диапазона значений показателей уровня мочевины и креатинина крови при сравнении групп ГЛПС и ОРВИ в начальный период и клинически здоровых людей, а также ROC-кривые диагностической значимости указанных показателей в их количественном выражении – площади под ROC-кривой (AUC). Рисунок демонстрирует, что при сравнении уровней мочевины в крови при ГЛПС и ОРВИ

диапазоны значений четко различаются, при этом диагностическую значимость различий, как показывает ROC-анализ, судя по величине  $AUC = 0,853$ , при величине уровня мочевины в крови выше  $6,8$  ммоль/л следует оценить как высокую.

Результаты аналогичного статистического анализа для креатинина крови показывают, что при уровне этого анализа выше  $97$  мкмоль/л и наличии клинических признаков инфекционного процесса можно с очень высокой диагностической значимостью ( $AUC = 0,964$ ) предполагать наличие у больного геморрагической лихорадки с почечным синдромом, хотя по единичному признаку судить об этом довольно трудно.

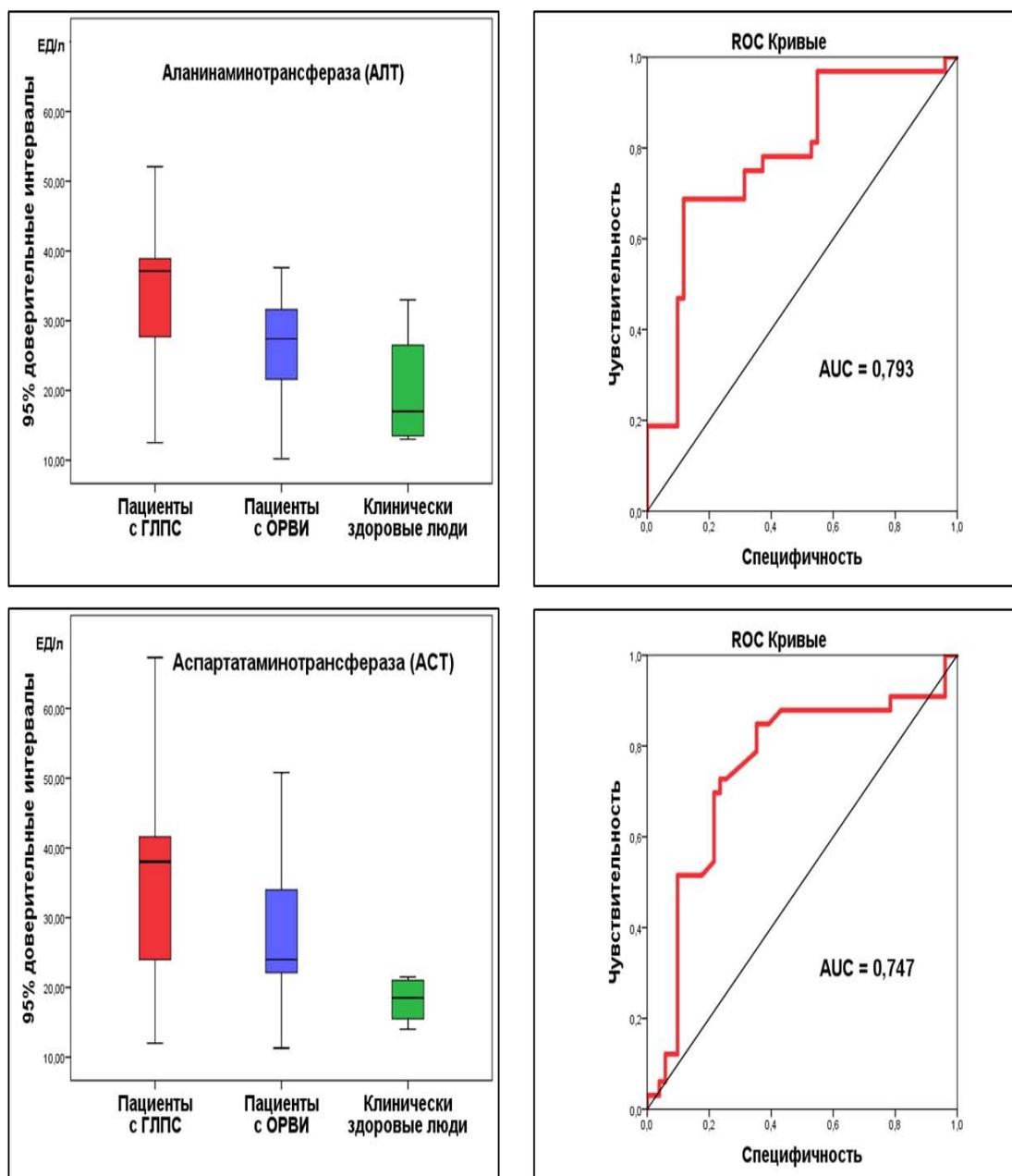


**Рисунок 9 – 95 % доверительные интервалы содержания холестерина в крови и ROC-кривые их диагностической значимости**

Уровень холестерина крови (*рисунок 9*), как было отмечено выше, при ГЛПС падал и при значениях ниже  $4$  ммоль/л и при очень высоком диагностическом значении этого показателя ( $AUC = 0,964$ ) также вполне может быть отнесен к признакам этой вирусной инфекции.

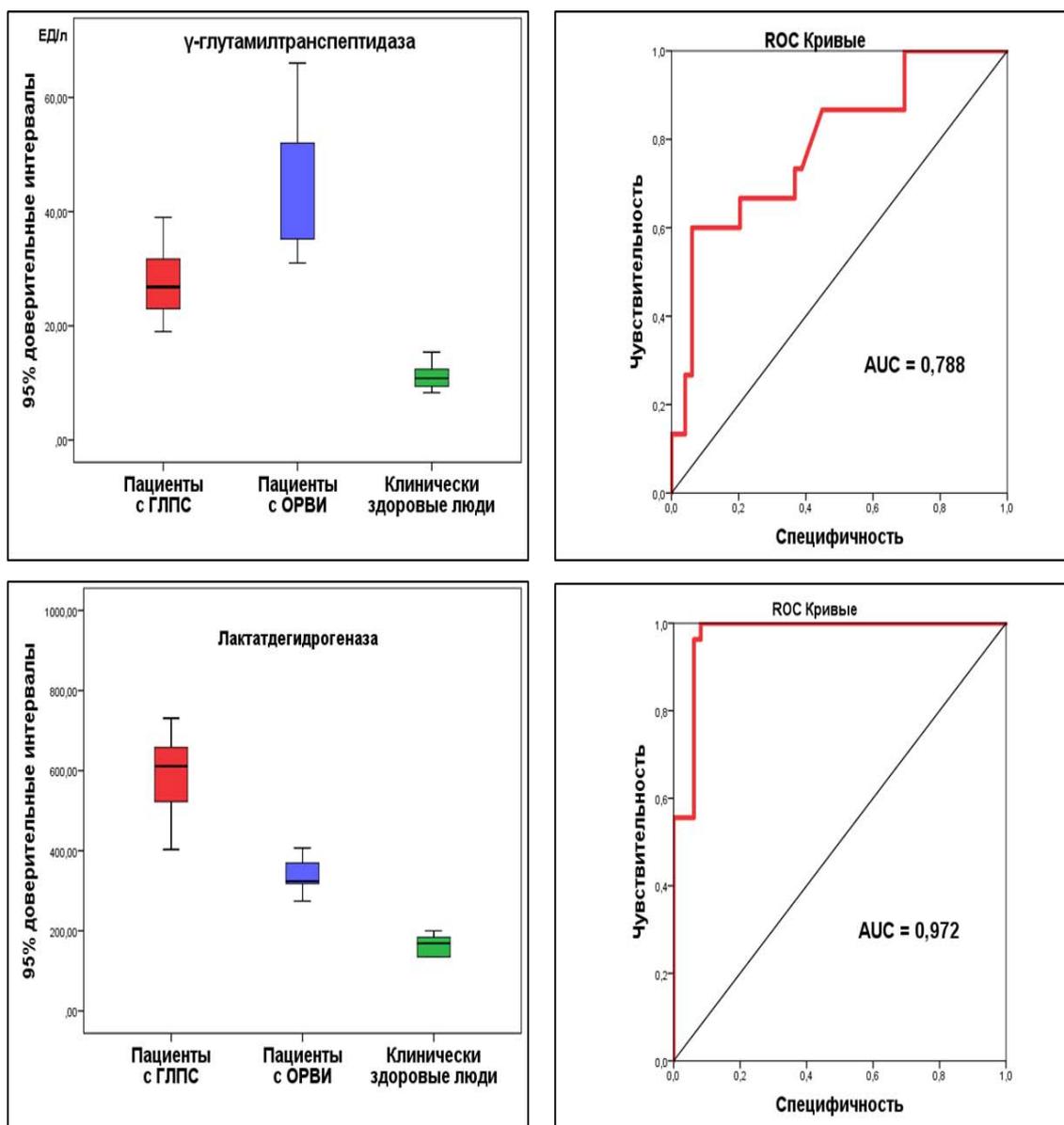
На *рисунке 10* в сравнительном аспекте представлены показатели активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ). Оба фермента показывали возрастание активности как при ГЛПС, так и при ОРВИ, тем

не менее, при сопоставлении данных в группах ГЛПС и ОРВИ было установлено умеренное диагностическое значение имеющихся различий. Как следует из 95 %-ных доверительных интервалов, при величинах АЛТ > 38 ЕД/л и  $AUC = 0,793$  диагностическая значимость показателя приближается к высокой. В то же время по АСТ > 50 ЕД/л можно было бы судить о наличии у пациента ГЛПС лишь с умеренной диагностической значимостью ( $AUC = 0,747$ ).



**Рисунок 10 – 95 % доверительные интервалы содержания аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы в крови и ROC-кривые их диагностической значимости**

Активность  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы (ГГТП), как показано на *рисунке 11*, при ГЛПС была ниже, чем при ОРВИ, но выше, чем у здоровых людей. Несмотря на такое промежуточное положение, этот показатель имел диагностическое значение в интервале от 18 ЕД/л до 32 ЕД/л, которое следует оценить как умеренное ( $AUC = 0,788$ ). Активность лактатдегидрогеназы при ГЛПС принимала наиболее высокие значения по сравнению с остальными группами и при значениях выше 40 ЕД/л обладала очень высокой диагностической значимостью ( $AUC = 0,972$ ).



**Рисунок 11 – 95 % доверительные интервалы содержания  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы и лактатдегидрогеназы в крови и ROC-кривые их диагностической значимости**

Далее проводилась оценка клинического анализа мочи в сочетании с пробой по Нечипоренко. Результаты оценки этих показателей в динамике инфекционного процесса у больных ГЛПС и ОРВИ, а также у здоровых людей в *таблице 4*.

**Таблица 4 – Показатели клинического анализа мочи у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом и острыми респираторными вирусными инфекциями по сравнению с данными клинически здоровых лиц**

Лабораторные показатели	Медиана (минимум; максимум)			Критерий Манна-Уитни  p <sub>1</sub> p <sub>2</sub> p <sub>3</sub>
	Пациенты с ГЛПС n = 24	Пациенты с ОРВИ n = 20	Здоровые лица n = 15	
Суточное количество мочи, мл	600 (0; 1000)	1030 (900; 1500)	1050 (850; 1600)	<0,001*** 0,914 <0,001***
Удельный вес мочи г/мл	1,02 (1; 1,02)	1,01 (1,0; 1,03)	1,013 (1,01; 1,02)	0,524 0,695 0,723
pH мочи	5,5 (5; 8)	5 (5; 8)	5 (5; 6,5)	0,423 0,119 0,666
Белок, г/л	1,12 (0; 5)	0 (0; 0,1)	0 (0; 0,3)	<0,001*** 0,934 <0,001***
Лейкоциты, клеток/поле зрения	2 (0; 10)	0 (0; 5)	0 (0; 6)	0,002** 0,892 0,003**
Эритроциты свежие, клеток/поле зрения	0 (0; 25)	0 (0; 5)	0 (0; 5)	0,425 0,949 0,382
Эритроциты выщелоченные, клеток/поле зрения	10 (0; 20)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	<0,001*** - <0,001***
Лейкоциты по Нечипоренко, *10 <sup>6</sup> клеток/л	1250 (250; 5000)	250 (0; 450)	300 (0; 500)	<0,001*** 0,768 <0,001***
Эритроциты по Нечипоренко, *10 <sup>6</sup> клеток/л	1500 (250; 2000)	250 (0; 650)	250 (0; 400)	<0,001*** 0,930 <0,001***

*Примечание:* n - число людей в группе, p<sub>1</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС и здоровых лиц, p<sub>2</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ОРВИ и здоровых лиц, p<sub>3</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС и с ОРВИ; статистическая значимость различий: \*при p<0,05; \*\*при p<0,01; \*\*\*при p<0,001

Из таблицы следует, что сравнение показателей клинического анализа мочи при ГЛПС и ОРВИ выявляет ряд достоверных отличий параметров в группе ГЛПС, что, несомненно, может иметь значение в клинической практике. Однако полуколичественный характер самих показателей не позволяет широко использовать их при более детальном статистическом сравнении.

Таким образом, среди рутинных лабораторных показателей установлены определенные количественные диагностически значимые параметры, которые вполне могут служить маркерами ГЛПС уже в первые дни заболевания. Эти показатели не были характерны только для ГЛПС, то есть служили суррогатными маркерами.

В этой ситуации они нуждались в дополнении тестами, которые используются при любом инфекционном процессе, – оценке реакции со стороны иммунной системы.

### **3.2 – Иммунологическая характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом в начальный период, дифференциально-диагностическое значение**

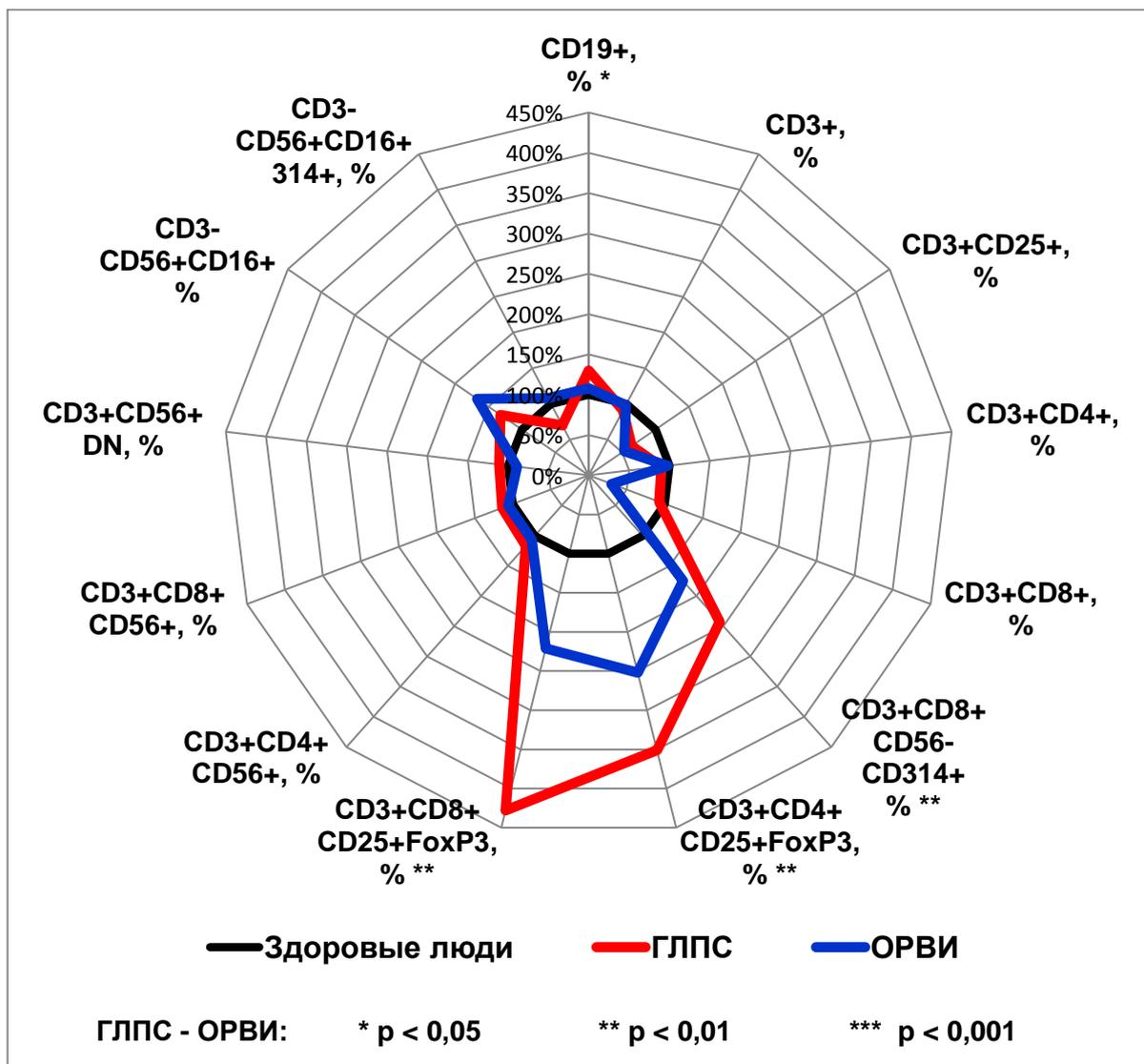
Характеристика иммунного статуса в данном разделе исследований включала анализ фенотипического состава лимфоцитов крови на самых ранних этапах ГЛПС, в том числе клеток врожденного и адаптивного иммунитета, а также цитокинового профиля крови в сравнении с ранними этапами развития ОРВИ и значениями этих показателей у здоровых людей.

Процесс формирования определяемых фенотипических признаков лимфоцитов происходил с учетом нескольких принципов:

- определение фенотипов лимфоцитов как врожденного, так адаптивного иммунитета;
- ориентация на существующие данные по иммунологии ГЛПС с обозначением ключевого значения натуральных киллеров, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, регуляторных Т-клеток;
- уровень чувствительности прибора для проточной цитофлуориметрии и его конфигурации: 2 лазера (488 нм и 633 нм), 6 детекторов флуоресценции (4+2);

- доступность сочетаний флуоресцентных красителей и моноклональных антител.

Перечень определяемых фенотипов лимфоцитов и результаты их анализа в начальные периоды ГЛПС, ОРВИ, а также у здоровых людей представлены в *таблице 5*, а в виде процентного отношения данных у пациентов при заболеваниях к параметрам здоровых людей – на *рисунке 12*.



**Рисунок 12 – Проценты отклонения числа лимфоцитов разных фенотипов у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом и острыми респираторными вирусными инфекциями в начальные периоды заболевания от показателей у здоровых людей**

**Таблица 5 - Относительные и абсолютные показатели содержания в крови фенотипов лимфоцитов у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом и острыми респираторными вирусными инфекциями по сравнению с данными клинически здоровых лиц**

Лимфоциты крови и их фенотипические характеристики		Медиана (минимум; максимум)			Критерий Манна-Уитни
		Пациенты с ГЛПС n = 24	Пациенты с ОРВИ n = 20	Здоровые лица n = 15	p1 p2 p3
1		2	3	4	5
В-лимфоциты CD19 <sup>+</sup>	%	13,6 (5,0; 25,0)	11,3 (6,9; 17,4)	10,5 (2,5; 15,7)	0,039* 0,044* 0,046*
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,22 (0,05; 0,57)	0,19 (0,07; 0,34)	0,18 (0,08; 0,30)	0,036* 0,150 0,043*
Т-лимфоциты CD3 <sup>+</sup>	%	68,0 (49,7; 87,0)	73,5 (52,0; 89,5)	75 (62; 87,0)	0,338 0,023* 0,881
	10 <sup>9</sup> клеток/л	1,23 (0,64; 3,50)	2,0 (0,57; 3,50)	1,2 (0,7; 3,1)	0,695 0,816 0,719
Активированные Т-лимфоциты CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	%	4,8 (1,1; 27,0)	4,0 (1,6; 7,4)	7,5 (2,6; 7,8)	0,026* 0,164 0,707
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,1 (0,04; 0,32)	0,07 (0,02; 0,22)	0,11 (0,03; 0,20)	0,230 0,833 0,469
Т-хелперы CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	%	36,8 (16,0; 67,0)	40,0 (20,5; 61,2)	41 (14; 57)	0,737 0,289 0,858
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,73 (0,38; 1,50)	1,40 (0,26; 2,0)	0,7 (0,4; 1,4)	0,571 0,698 0,549
Цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	%	26,0 (10,4; 78,0)	8,3 (13,3; 37,5)	28 (16; 71)	0,950 0,754 0,929
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,54 (0,11; 2,70)	0,48 (0,26; 1,50)	0,4 (0,2; 2,6)	0,965 0,792 0,530
NKG2D <sup>+</sup> CTL CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD314 <sup>+</sup>	%	30,6 (8,3; 58,9)	21,8 (10,2; 31,5)	12,6 (9,6; 27,0)	<0,001*** 0,091 0,003**
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,47 (0,10; 2,09)	0,31 (0,17; 1,90)	0,24 (0,14; 0,40)	0,009** 0,066 0,008**

Продолжение таблицы 5

1		2	3	4	5
CD4 <sup>+</sup> Treg CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	%	10,7 (4,9; 16,3)	7,7 (5,0; 18,0)	3,05 (2,30; 8,10)	<0,001*** 0,074 0,044*
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,22 (0,07; 0,58)	0,18 (0,06; 0,33)	0,05 (0,02; 0,20)	0,001** 0,088 0,033**
CD8 <sup>+</sup> Treg CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	%	13,0 (3,5; 23,9)	7,3 (6,2; 23,0)	0,45 (0,1; 4,4)	<0,001*** 0,001** 0,048*
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,24 (0,07; 0,72)	0,09 (0,14; 0,60)	0,01 (0; 0,07)	<0,001*** <0,001*** 0,009**
CD4 <sup>+</sup> NKT CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	%	0,21 (0,15; 0,27)	0,19 (0,13; 0,24)	0,18 (0,13; 0,22)	0,431 0,669 0,233
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,02 (0,01; 0,05)	0,03 (0,01; 0,03)	0,03 (0,01; 0,04)	0,433 0,561 0,349
CD8 <sup>+</sup> NKT CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	%	3,04 (2,01; 3,89)	2,84 (2,12; 4,0)	2,67 (1,94; 3,28)	0,398 0,705 0,219
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,05 (0,02; 0,06)	0,06 (0,03; 0,07)	0,05 (0,03; 0,06)	0,587 0,354 0,325
Дважды нега- тивные (DN) NKT CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	%	0,61 (0,38; 0,69)	0,49 (0,37; 0,66)	0,55 (0,42; 0,71)	0,661 0,425 0,331
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,05 (0,01; 0,05)	0,04 (0,02; 0,05)	0,04 (0,01; 0,05)	0,144 0,254 0,325
Натуральные киллеры (NK) CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	%	17,0 (7,7; 53,0)	21,5 (4,0; 34,4)	12,9 (9,5; 27,7)	0,022* 0,001** 0,049*
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,32 (0,13; 1,75)	0,31 (0,10; 1,03)	0,26 (0,14; 0,42)	0,446 0,117 0,0291
NKG2D <sup>+</sup> NK CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD314 <sup>+</sup>	%	6,7 (1,0; 16,3)	10,4 (0; 15,0)	9,6 (7,7; 21,6)	0,068 0,018 0,254
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,14 (0,02; 0,44)	0,17 (0; 0,28)	0,19 (0,11; 0,32)	0,059 0,225 0,628

Примечание: n - число исследований в группе, p<sub>1</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС и здоровых лиц, p<sub>2</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ОРВИ и здоровых лиц, p<sub>3</sub> - вероятность различий между группами ГЛПС и ОРВИ; статистическая значимость различий: \* при p < 0,05; \*\* при p < 0,01; \*\*\* при p < 0,001

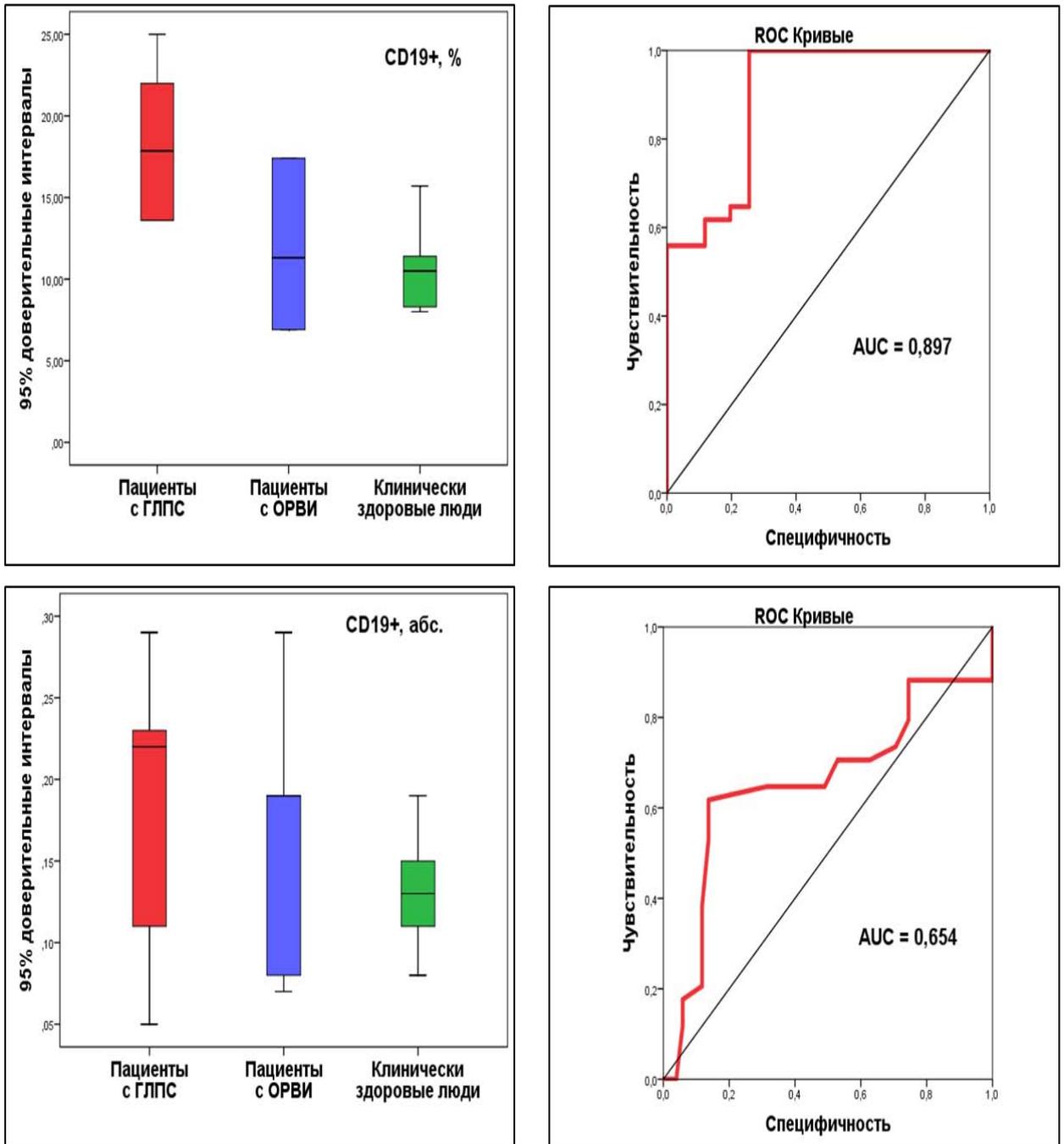
Оценивая перечень наблюдаемых сдвигов со стороны фенотипического состава лимфоцитов адаптивного и врожденного иммунитета при сравнении групп ГЛПС и ОРВИ, следует подчеркнуть, что среди этих сдвигов зарегистрированы как базовые показатели иммунограмм, так и набор тех оригинальных фенотипов, что были введены нами для оценки фенотипического профиля лимфоцитов в данном исследовании.

Как показывают данные таблицы и рисунка, в число показателей, связанных с фенотипической характеристикой лимфоцитов, по содержанию которых в крови зарегистрированы достоверные различия между ГЛПС и ОРВИ, входят:

- относительное и абсолютное число В-лимфоцитов –  $CD19^+$ ,
- относительное и абсолютное число цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), экспрессирующих активирующий лектиновый рецептор С-типа  $NKG2D$  –  $CD3^+CD8^+CD56^-CD314^+$ ;
- относительное и абсолютное число  $CD4^+$  регуляторных Т-клеток –  $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ;
- относительное и абсолютное число  $CD8^+$  регуляторных Т-клеток –  $CD3^+CD8^+CD25^+FoxP3^+$ ;
- относительное число натуральных киллеров –  $CD3^-CD16^+CD56^+$ .

Каждый из этих параметров детально анализировался в дальнейшем отдельно путем сравнения в группах исследования 95 %-ных доверительных интервалов показателей с определением их диагностического значения методом ROC-анализа.

На *рисунке 13* представлены 95 %-ные доверительные интервалы и соответствующие им ROC-кривые числа В-лимфоцитов.



**Рисунок 13 – 95 % доверительные интервалы относительного и абсолютного числа В-лимфоцитов в крови и ROC-кривые их диагностической значимости**

И относительные, и абсолютные значения содержания этих клеток в крови пациентов как при ГЛПС, так и при ОРВИ возрастало. Однако при ГЛПС относительное и абсолютное число В-лимфоцитов с фенотипом CD19<sup>+</sup> статистически значимо было выше, чем при ОРВИ, соответственно в 1,3 и в 1,2 раза. Кроме того, у пациентов с ОРВИ статистически достоверно возрастало только относительное число В-лимфоцитов.

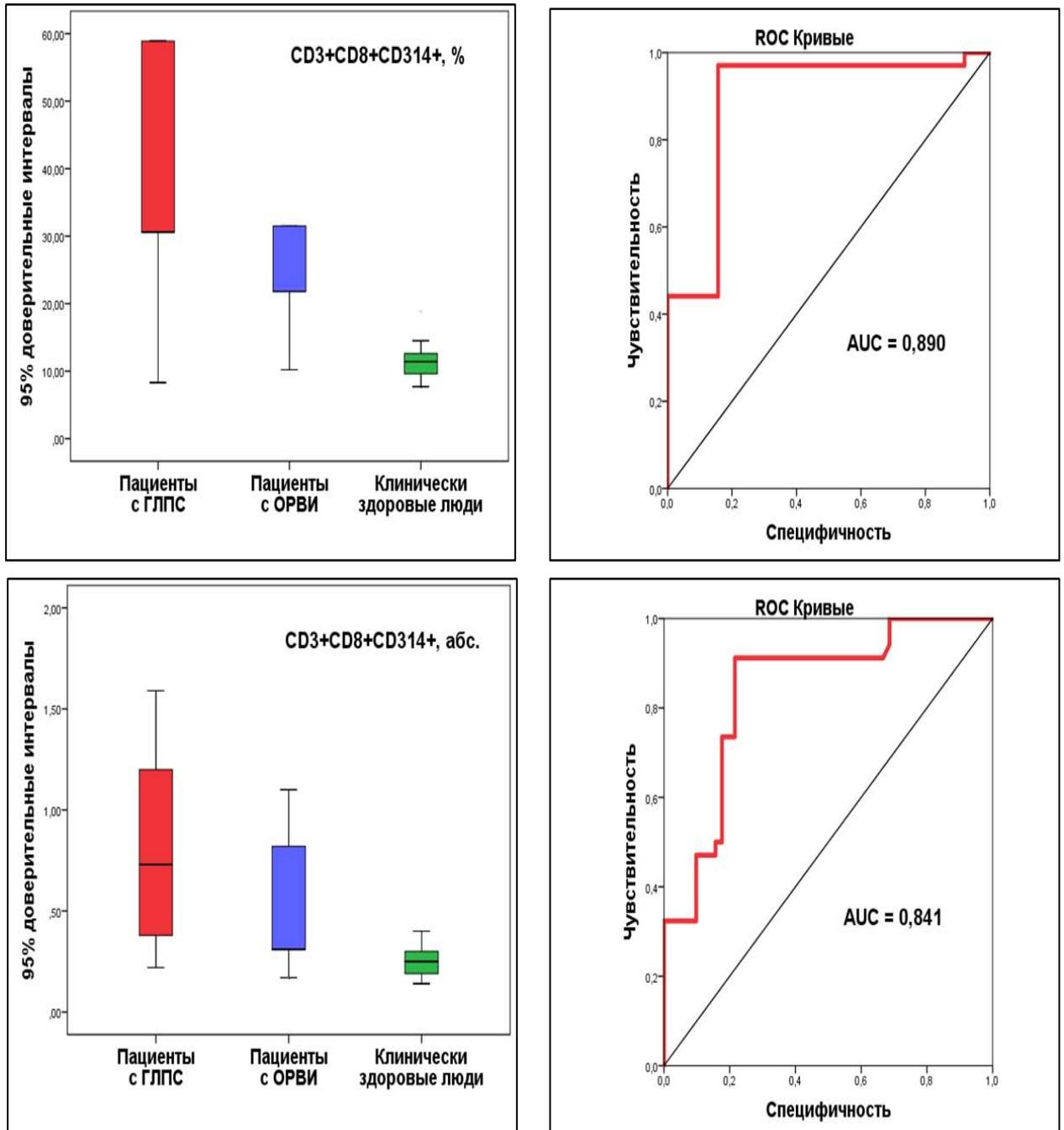
Патогенетически возрастание числа В-лимфоцитов в начальный период болезни вполне оправдано как при ГЛПС, так и при ОРВИ и будет еще проанализировано нами в ходе обсуждения. Что касается диагностического значения этого нарастания, то оно устанавливалось с применением ROC-анализа. При ГЛПС диагностическая значимость роста относительного числа В-лимфоцитов выше 17,5 % оценивалась как высокая, поскольку площадь под ROC-кривой приближалась к 0,9 (AUC = 0,897). Что касается абсолютного числа В-лимфоцитов, то, несмотря на достоверность различий между величиной показателей при ГЛПС и ОРВИ, оно диагностической значимостью не обладало, поскольку площадь под ROC-кривой (AUC) не достигала даже 0,7.

Аналогичным образом анализировались данные по фенотипу лимфоцитов, который ранее в контексте противовирусной защиты организма при ГЛПС не рассматривался. Этот фенотип в его относительных и абсолютных значениях содержания в крови целесообразно рассмотреть в сочетании с относительным числом натуральных киллеров (абсолютные величины для этих клеток не выявляли статистически значимых различий). Эти данные представлены на *рисунках 14 и 15*.

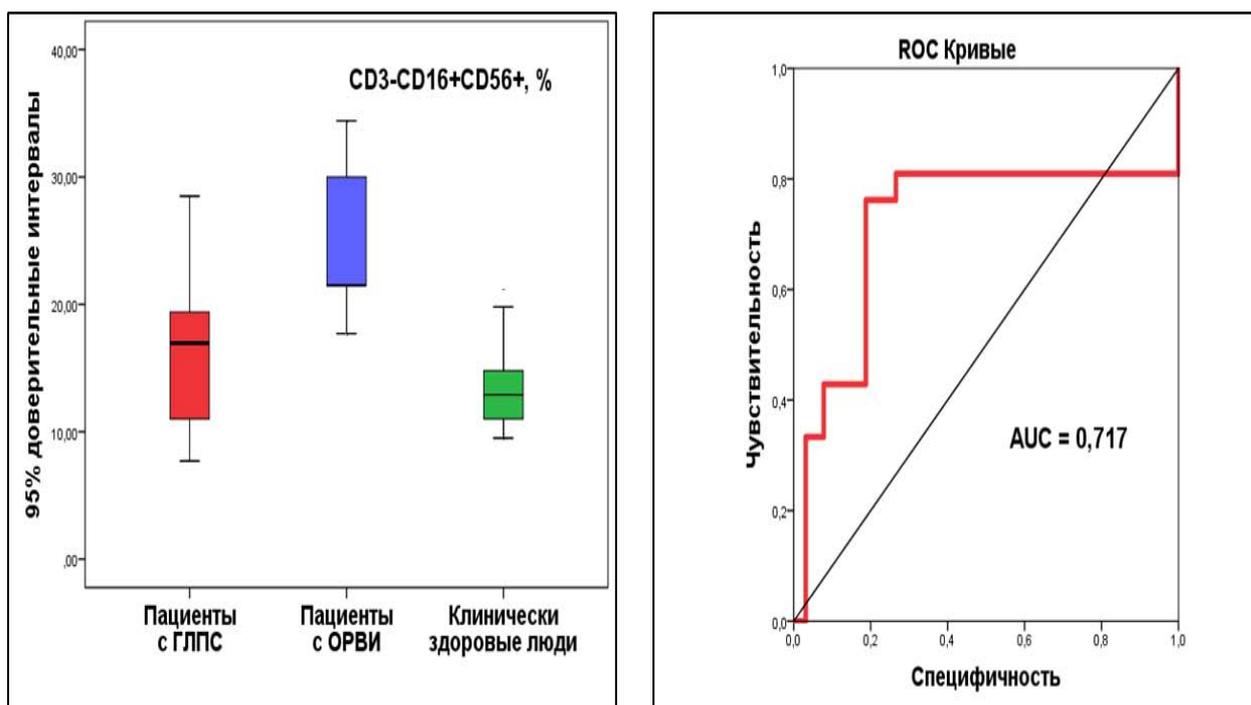
Более детально вопрос о возможной патогенетической роли экспрессии лимфоцитами рецепторов NKG2D еще будет обсуждаться нами. Тем не менее, пока целесообразно сослаться на мотивацию, приведшую к исследованию нами фенотипа лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD314<sup>+</sup> при ГЛПС.

В работах последних лет встречаются сведения, в частности, о снижении экспрессии NKG2D натуральными киллерами на фоне роста секреции этими клетками интерферона  $\gamma$  в первые дни при вакцинации БЦЖ [104], а также при прогрессировании опухолевых процессов [145], при осложнениях беременности [420], в которых НК играют довольно выраженную защитную роль. Что касается экспрессии NKG2D CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами, то анализ этого феномена в современной литературе встречается на уровне единичных сведений, например, при волчаночном нефрите [398], а в публикации Gonzalez J.P. et al. (2019) указывается на примере злокачественного опухолевого процесса, что снижению

экспрессии этого рецептора у натуральных киллеров сопутствует ее рост у CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов [130].



**Рисунок 14 – 95 % доверительные интервалы относительного и абсолютного числа цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих NKG2D, в крови и ROC-кривые их диагностической значимости**



**Рисунок 15 – 95 % доверительные интервалы относительного числа натуральных киллеров в крови и ROC-кривые их диагностической значимости**

Все эти относительно немногочисленные сведения не связаны с развитием острых инфекционных процессов, к которым принадлежит ГЛПС, и не касаются патогенеза ортохантавирусных инфекций, хотя явления клеточного стресса при данной патологии довольно выражены [420], что и послужило основанием для исследования нами NKG2D<sup>+</sup> NK и CTL при ГЛПС.

Как следует из *таблицы 5*, в начальный период ГЛПС не отмечено отклонений от показателей у здоровых людей ни по общему числу Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), ни по числу Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), ни по числу цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), при этом число Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор ранней активации CD25 (CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), было достоверно снижено. Не отмечено и статистически значимых различий по содержанию Т-лимфоцитов и их основных субпопуляций в крови при сравнении с данными пациентов с ОРВИ.

На этом фоне, как показано на *рисунке 14*, только при ГЛПС статистически значимо возрастало и абсолютное, и относительное число цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих активирующий рецептор NKG2D (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD314<sup>+</sup>) – в 1,7-2,4 раза по сравнению с пациентами с ОРВИ и со

здоровыми людьми. При ОРВИ отмечена некоторая тенденция к росту числа этих клеток, но различия со здоровыми людьми в этом случае не были статистически достоверными. В целом, данный тест при значениях числа  $CD3^+CD8^+CD56^-CD314^+$  лимфоцитов выше 32 % или выше  $0,8 \cdot 10^9/\text{л}$  с высокой диагностической значимостью (AUC от 0,8 до 0,9) свидетельствовал в пользу ГЛПС.

Число НК, экспрессирующих NKG2D, ни при ГЛПС, ни при ОРВИ статистически значимо не изменялось, хотя тенденция к их снижению при ГЛПС отмечалась. Что касается общего содержания НК в крови (*рисунок 15*), то в интервале 15-20 % оно с умеренной диагностической значимостью (AUC = 0,717) характеризовало ГЛПС и было ниже, чем при ОРВИ.

Еще одна группа клеток, проявившая свою информативность при геморрагической лихорадке с почечным синдромом, – регуляторные Т-клетки (Treg). Их значение в патогенезе при ГЛПС, как описано в обзоре литературы (*глава 1*), отмечается многими авторами. В данном исследовании была сделана попытка оценить эти клетки с точки зрения несколько необычной фенотипической характеристики.

Основным фенотипом регуляторных Т-клеток, наиболее часто детектируемым в клинических исследованиях, служит  $CD3^+CD4^+CD25^{\text{bright}}CD127^{\text{dim-to-neg}}FoxP3^+$ , хотя данный фенотип не обязательно должен включать FoxP3 [17]. Treg необходимы для поддержания иммунного гомеостаза и предотвращения аутоиммунных нарушений. Однако в отличие от относительно хорошо изученных Treg указанного выше фенотипа недавние достижения позволили начать раскрытие медико-биологического значения  $CD8^+$  Treg – очень гетерогенной с фенотипической точки зрения категории регуляторных клеток, активно изучаемой в настоящее время преимущественно на мышиных моделях [274].

На подобной экспериментальной модели были получены данные о том, что в отсутствие активности  $CD8^+$  регуляторных Т-клеток противовирусный иммунитет усиливается, в результате вредные последствия вирусной инфекции ограничиваются. Это наводит на мысль о возможности в дальнейшем за счет

блокирования ингибирующего действия CD8<sup>+</sup> Treg разработать уникальные подходы к лечению вирусной инфекции [157].

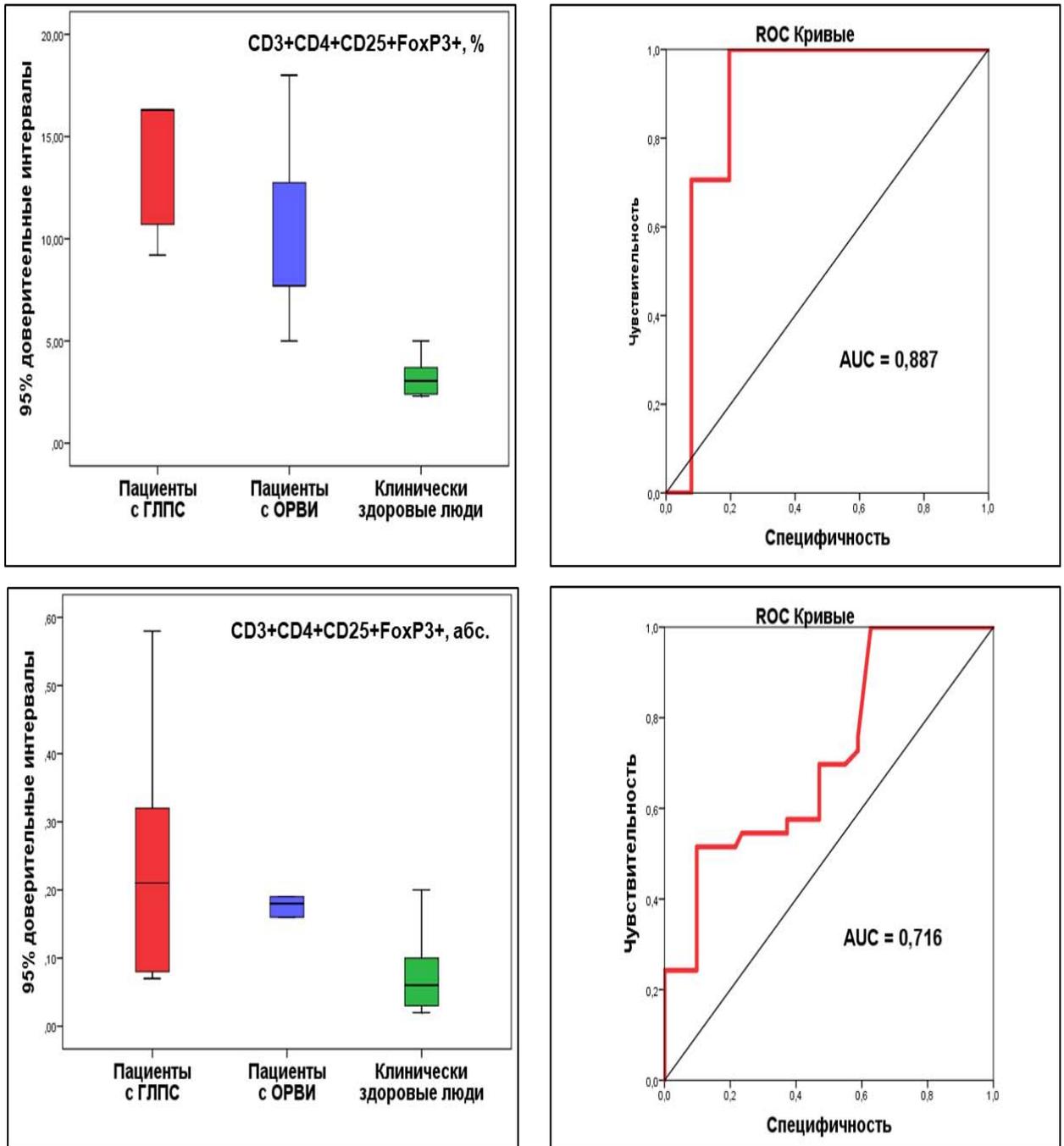
Учитывая тот факт, что изучаемым нами вариантом ГЛПС является заболевание, вызванное ортохантавирусом Puumala, источником которого служат мыши-полевки при высокой гетерогенности CD8<sup>+</sup> Treg и новизне их исследования при ГЛПС, нами использовано определение упрощенного фенотипа этих клеток, широко используемого при проведении подобных исследований, – CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> [64, 221] в сопоставлении с CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>.

На рисунках 16 и 17 представлены 95 % доверительные интервалы и соответствующие им ROC-кривые CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток в начальные периоды ГЛПС и ОРВИ, а также у здоровых людей.

Анализ относительного и абсолютного числа CD4<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), как и других иммунологических параметров, показал более высокую диагностическую значимость (AUC = 0,887) в начале клинических проявлений ГЛПС при значениях выше 13%, но только умеренный уровень значимости в случае абсолютных величин (*рисунок 16*).

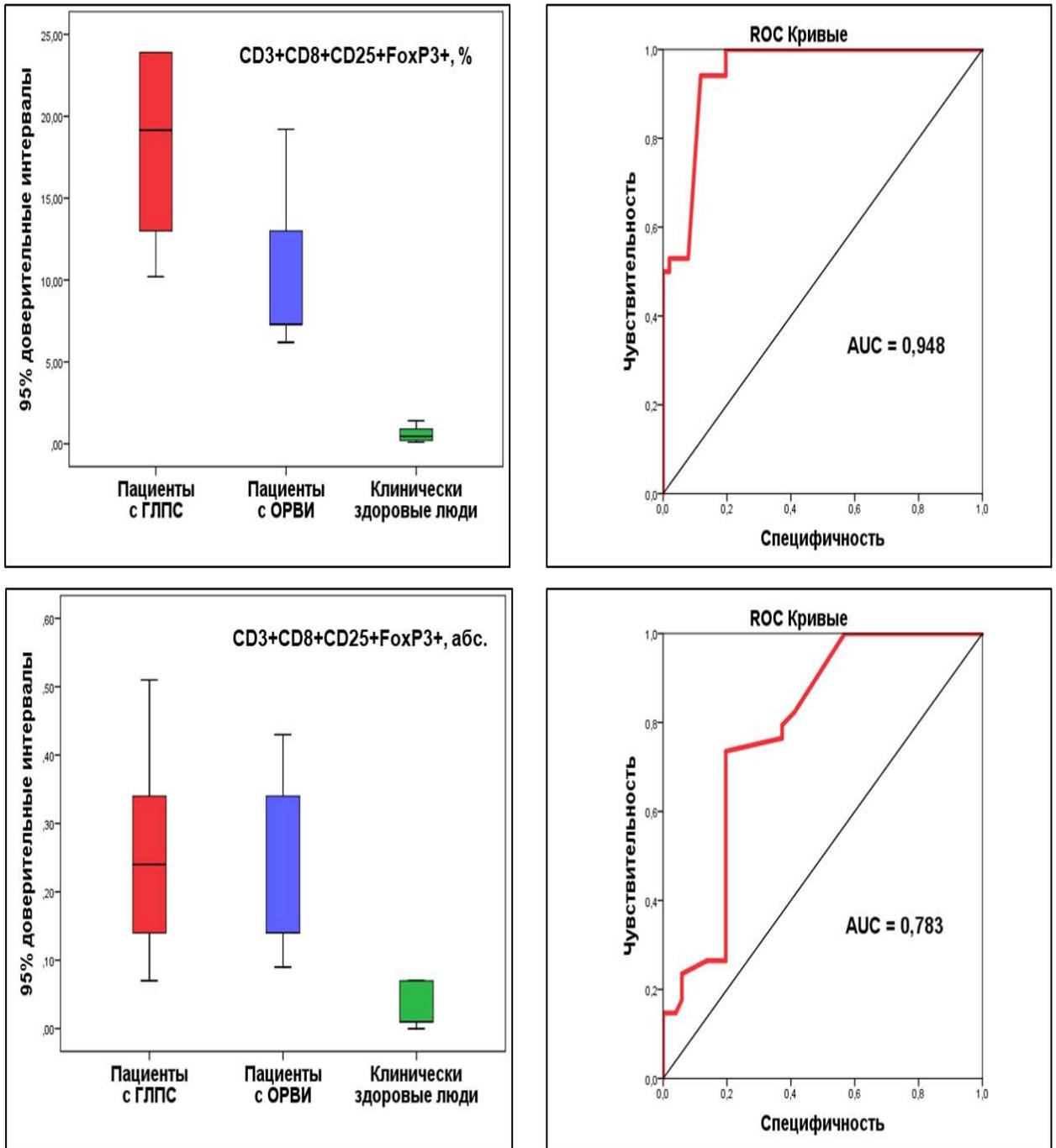
Что касается CD8<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток (*рисунок 17*), то их относительное число в начальный период ГЛПС возрастало еще более значительно. По сравнению с данными пациентов с ОРВИ оно было выше в 1,8 раза, а по сравнению со здоровыми людьми – в 28,9 раза. Соответственно, диагностическое значение определения процентного содержания CD8<sup>+</sup> Treg (выше 13 %) оказалось очень высоким (AUC = 0,948), то есть было выше, чем для CD4<sup>+</sup> Treg.

Абсолютное число CD8<sup>+</sup> Treg проявляло умеренную диагностическую значимость и было выше, чем в других группах сравнения, в 2,7 раза (ОРВИ) и в 24 раза (здоровые люди), в то время как для CD4<sup>+</sup> Treg – соответственно в 1,2 и в 4,4 раза.



**Рисунок 16 – 95 % доверительные интервалы относительного и абсолютного числа  $CD4^+$  регуляторных Т-клеток в крови и ROC-кривые их диагностической значимости**

Иными словами, обе фенотипические категории регуляторных Т-клеток уже в первые дни развития ГЛПС показывали диагностически значимый рост содержания в крови, особенно, в относительных величинах. Нарастание величин  $CD8^+$  Treg (очень низкое у здоровых людей) многократно опережало таковое для  $CD4^+$  Treg.



**Рисунок 17 – 95 % доверительные интервалы относительного и абсолютного числа  $CD8^+$  регуляторных Т-клеток в крови и ROC-кривые их диагностической значимости**

При этом следует отметить, что некоторое нарастание этих клеток наблюдалось и при ОРВИ, а в случае  $CD8^+$  Treg оно было даже статистически достоверным, но все-таки значительно уступало по величинам, отмеченным для ГЛПС.

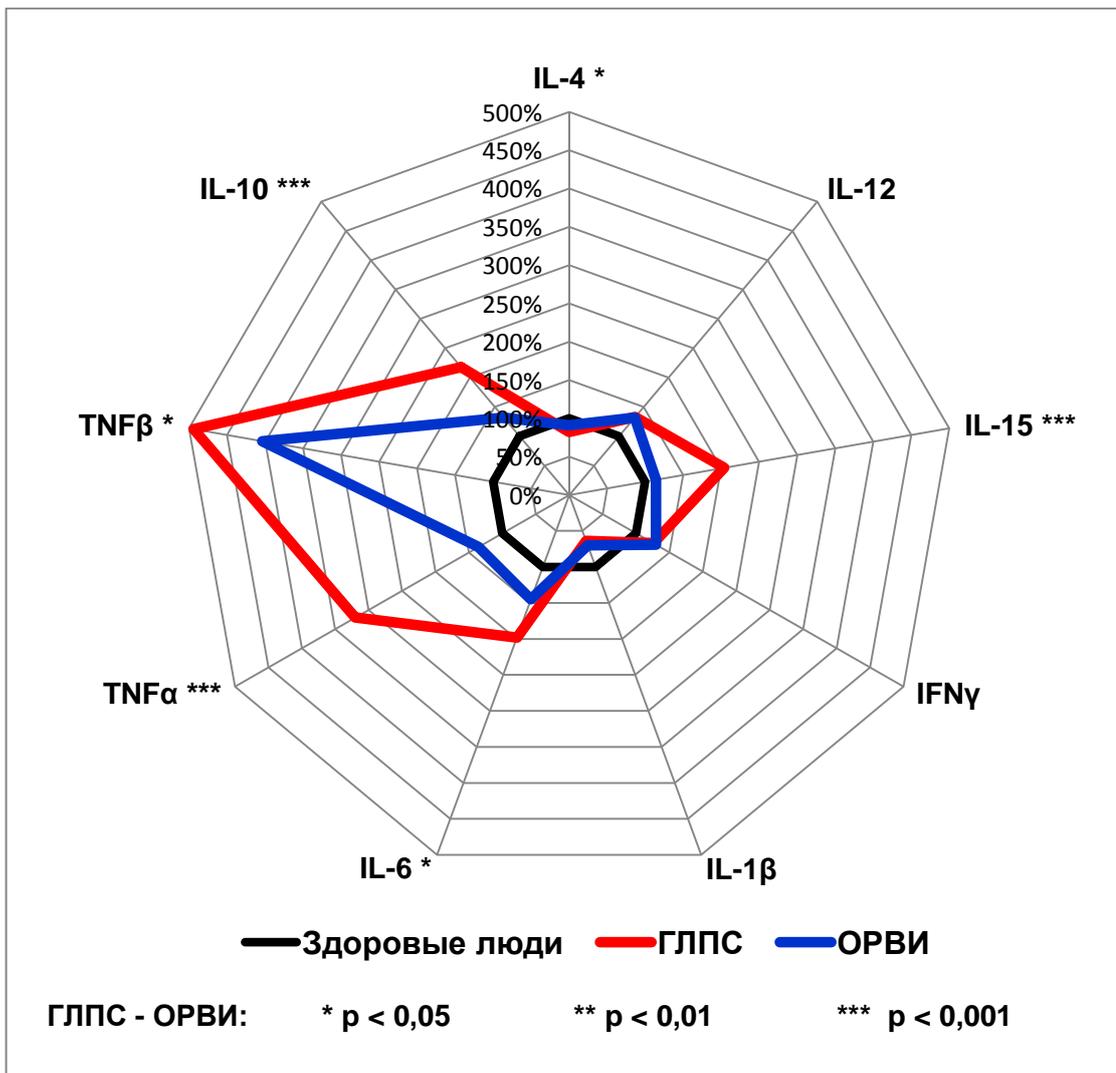
Далее в начальный период ГЛПС анализировался цитокиновый профиль пациентов с ГЛПС в сравнении с таковым при ОРВИ и у здоровых людей.

Результаты исследования роли цитокинов в крови в указанных группах представлены в *таблице 6* и на *рисунке 18*.

**Таблица 6 – Уровни цитокинов в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом и острыми респираторными вирусными инфекциями по сравнению с данными клинически здоровых лиц**

Цитокины плазмы крови	Медиана (минимум; максимум)			Критерий Манна-Уитни p <sub>1</sub> p <sub>2</sub> p <sub>3</sub>
	Пациенты с ГЛПС n = 24	Пациенты с ОРВИ n = 20	Здоровые лица n = 15	
Интерлейкин-4 (IL-4), пг/мл	1,8 (1,5; 1,9)	2,05 (1,6; 2,8)	2,2 (1,3; 4,2)	<0,001*** 0,079 0,021*
Интерлейкин-12 (IL-12), пг/мл	12,1 (10,9; 13,7)	12,0 (9,0; 12,7)	9,1 (7,8; 14,4)	<0,001*** 0,001*** 0,149
Интерлейкин-15 (IL-15), пг/мл	6,73 (4,92; 9,02)	3,74 (2,48; 4,12)	3,29 (1,79; 4,03)	<0,001*** 0,049* <0,001***
Интерферон $\gamma$ , (IFN $\gamma$ ), пг/мл	212,6 (185,4; 302,1)	219,6 (145,8; 281,4)	169,3 (127,6; 208,6)	<0,001*** <0,001*** 0,576
Интерлейкин-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), пг/мл	2,45 (2,02; 3,42)	2,65 (2,1; 2,98)	3,8 (2,5; 5,2)	<0,001*** <0,001*** 0,109
Интерлейкин-6 (IL-6), пг/мл	12,3 (9,0; 16,4)	9,0 (6,2; 15,1)	6,2 (2,7; 9,2)	<0,001*** <0,001*** 0,034*
Фактор некроза опухолей $\alpha$ (TNF $\alpha$ ), пг/мл	8,0 (4,4; 9,8)	3,4 (2,8; 6,0)	2,5 (1,8; 3,5)	<0,001*** <0,001*** <0,001***
Фактор некроза опухолей $\beta$ (TNF $\beta$ ), пг/мл	32,6 (22,1; 52,3)	28,4 (25,1; 48,4)	4,7 (2,6; 5,95)	<0,001*** <0,001*** 0,020*
Интерлейкин-10 (IL-10), пг/мл	14,8 (11,2; 40,5)	9,0 (7,0; 12,2)	6,8 (3,4; 9,1)	<0,001*** <0,001*** <0,001***

*Примечание:* n - число исследований в группе, p<sub>1</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС и здоровых лиц, p<sub>2</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ОРВИ и здоровых лиц, p<sub>3</sub> - вероятность различий между группами ГЛПС и ОРВИ; статистическая значимость различий: \* при p<0,05; \*\* при p<0,01; \*\*\* при p<0,001



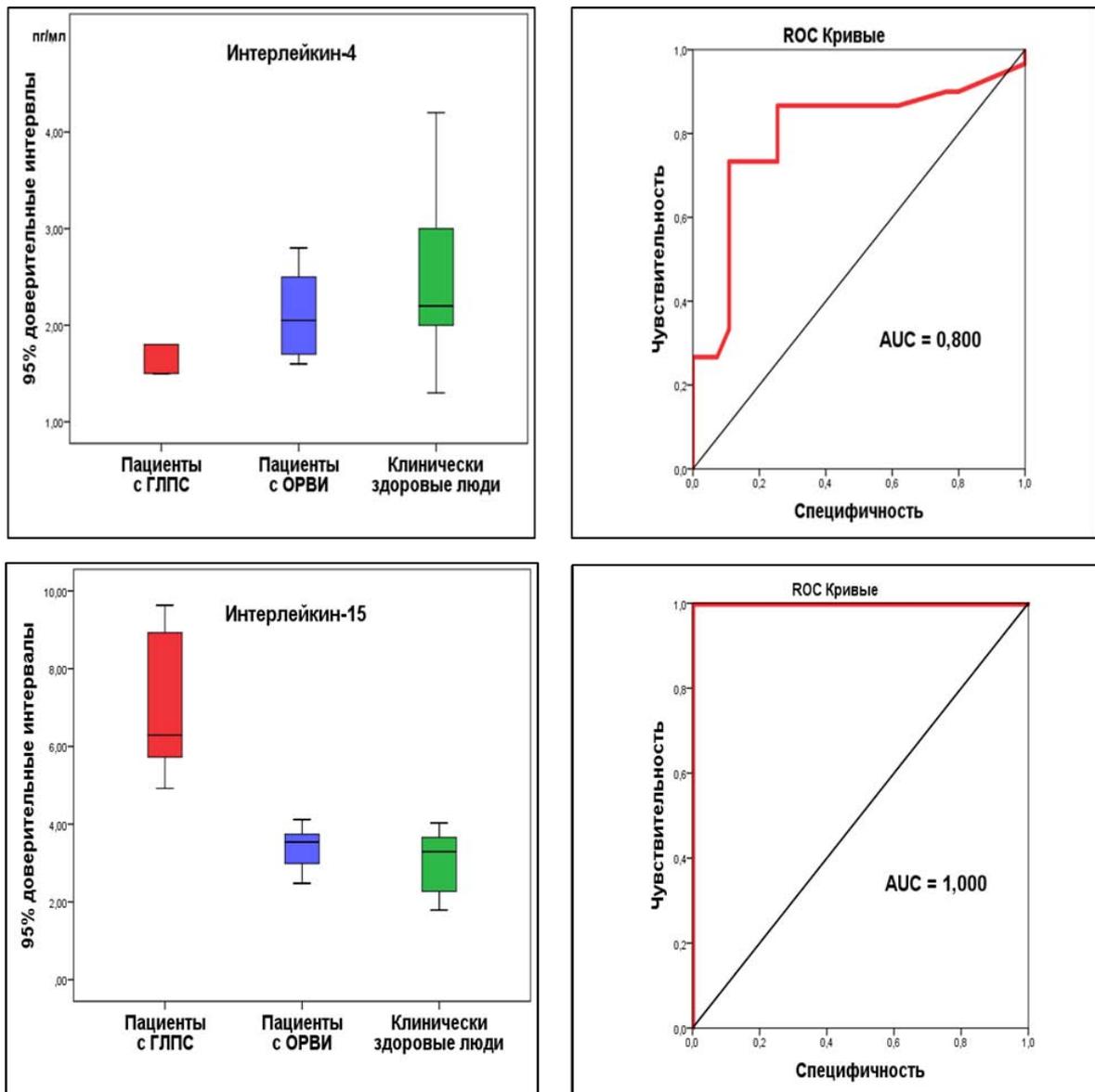
**Рисунок 18 – Проценты отклонения уровней цитокинов у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом и острыми респираторными вирусными инфекциями в начальные периоды заболевания от показателей у клинически здоровых лиц**

Как следует из *рисунка 18*, среди цитокинов, вошедших в определяемый цитокиновый профиль, нет ни одного, который не подвергался бы при ГЛПС статистически значимому отклонению от контроля. Подобная ситуация наблюдалась и при острой респираторной вирусной инфекции, при которой направление отклонений уровней цитокинов примерно совпадало с ГЛПС, кроме IL-4, уровень которого при ОРВИ соответствовал нормативным значениям.

При обоих заболеваниях отмечен значительный рост содержания в крови цитокинов, сопряженных с клеточными иммунными реакциями: IFN $\gamma$ , IL-12, IL-15, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , а также провоспалительного IL-6. Кроме того, возростал уровень IL-

10 – цитокина с регуляторными и противовоспалительными свойствами, что создает весьма благоприятный фон для дифференцировки регуляторных Т-клеток.

Однако с количественной точки зрения различия между цитокиновыми профилями при ГЛПС и ОРВИ имелись и обладали статистической достоверностью. К числу цитокинов, выявляющих различия между ГЛПС и ОРВИ, относятся: IL-4, IL-15, IL-6, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IL-10, анализ содержания которых в крови во всех группах исследования был проведен далее на уровне 95 %-ных доверительных интервалов и ROC-анализа.



**Рисунок 19 – 95 % доверительные интервалы уровней цитокинов интерлейкина-4 и интерлейкина-15 в крови и ROC-кривые их диагностической значимости**

На *рисунке 19* представлены результаты такого анализа для 2-х цитокинов с выраженными регуляторными свойствами: IL-4 с его участием в индукции гуморального иммунного ответа [7] и IL-15 как цитокина, причастного к активации клеток с цитотоксическими свойствами (NK, CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, в гораздо меньшей степени NKT) [375].

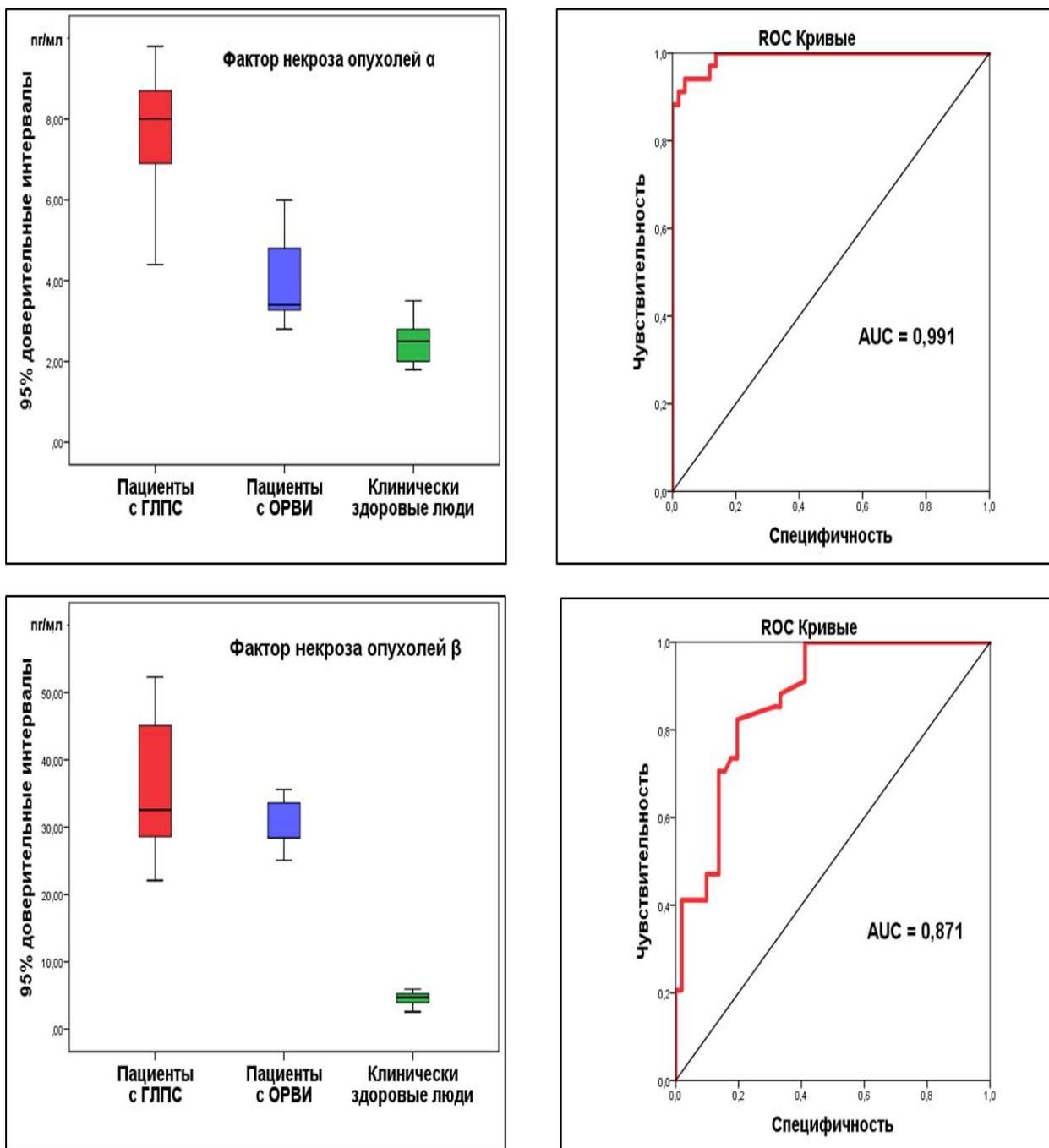
Содержание IL-4 в крови больных ГЛПС оказалось наименьшим при сравнении с аналогичным показателем в других группах. При значениях ниже 1,8 пг/мл этот цитокин с высокой диагностической значимостью (AUC = 0,8) свидетельствовал в пользу геморрагической лихорадки с почечным синдромом.

IL-15, наоборот, при ГЛПС показывал наиболее высокие величины. Его диагностическая значимость оценивалась как максимальная (AUC = 1,0), если содержание IL-15 в крови было выше 4 пг/мл.

Как следует из *рисунка 20*, уровни факторов некроза опухолей (TNF $\alpha$  и TNF $\beta$ ) как при геморрагической лихорадке с почечным синдромом, так и при острой респираторной вирусной инфекции, повышались по сравнению с данными здоровых людей.

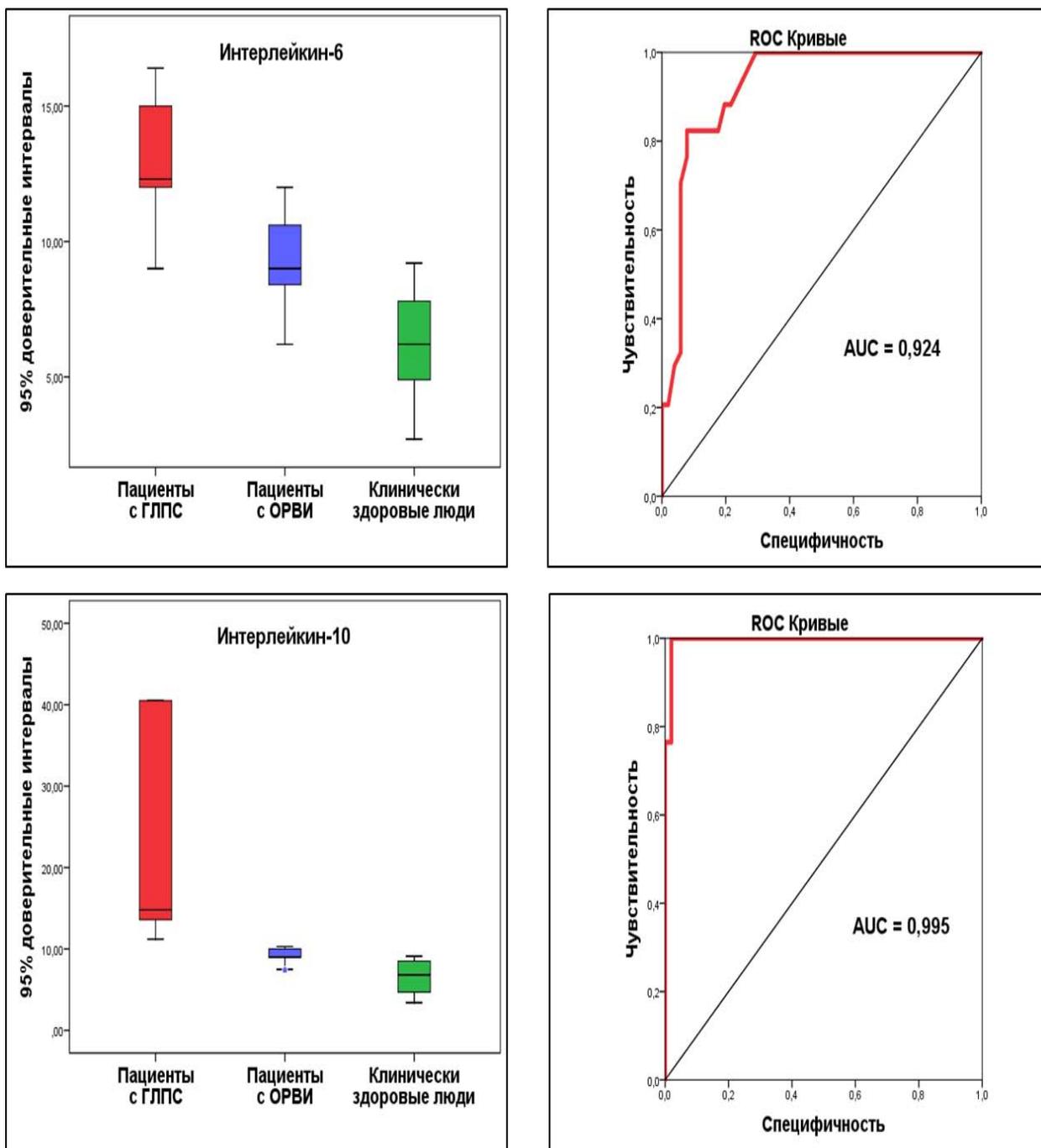
Более высокая степень повышения была характерна для фактора некроза опухолей  $\alpha$  как показателя системного воспаления при ГЛПС, что при значениях выше 5 пг/мл с очень высокой диагностической значимостью (AUC = 0,991) указывало на ГЛПС.

Для TNF $\beta$ , который отражает состояние локальных воспалительных реакций с механизмом гиперчувствительности замедленного типа, степень повышения содержания в крови при геморрагической лихорадке с почечным синдромом хотя и была несколько меньшей, но оставалась все-таки высоко диагностически значимой (AUC = 0,871) при величинах показателя > 33,5 пг/мл.



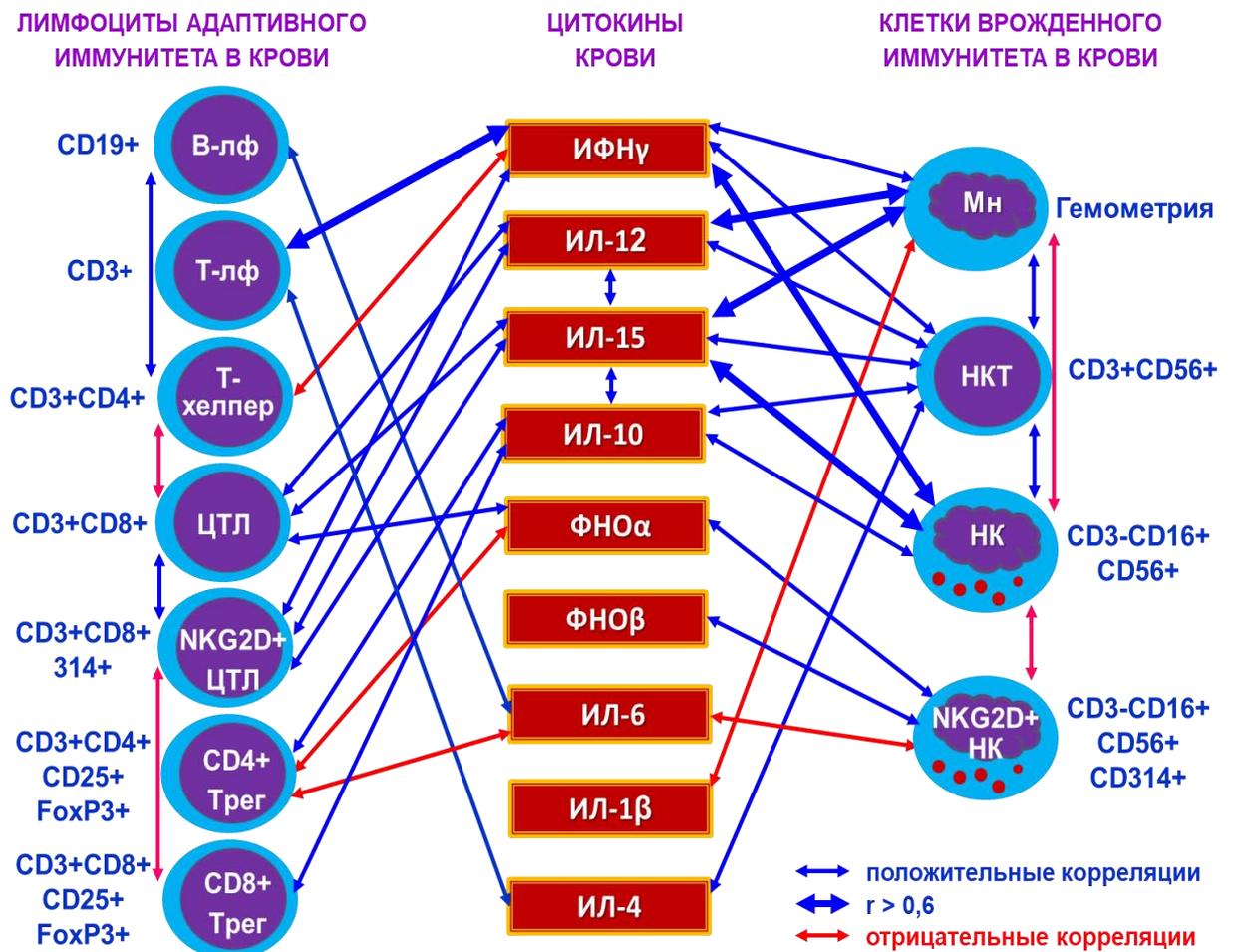
**Рисунок 20 – 95 % доверительные интервалы уровней фактора некроза опухоли  $\alpha$  и фактора некроза опухоли  $\beta$  в крови и ROC-кривые их диагностической значимости**

Очень высокой диагностической значимостью при ГЛПС, помимо IL-15 и TNF $\alpha$ , обладали такие цитокины, как провоспалительный IL-6 и противовоспалительный IL-10 (рисунок 21). Значения IL-6 выше 11,5 пг/мл и, особенно, IL-10 выше 10 пг/мл при величинах AUC соответственно 0,924 и 0,995 с полным основанием можно использовать в качестве маркеров ГЛПС.



**Рисунок 21 – 95 % доверительные интервалы уровней провоспалительного цитокина интерлейкина-6 и противовоспалительного цитокина интерлейкина-10 в крови и ROC-кривые их диагностической значимости**

Поскольку описанный цитокиновый профиль является результатом функционирования клеток иммунной системы различной фенотипической принадлежности, далее проводился корреляционный анализ для ориентировочного определения взаимосвязи между цитокинами и определяемыми нами фенотипами лимфоцитов, а также макрофагами (рисунок 22).



**Рисунок 22 – Корреляционные взаимосвязи цитокинов крови, моноцитов, фенотипов лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунитета**

В качестве показателя степени корреляции, учитывая непараметрический принцип статистической обработки, использовался коэффициент корреляции Спирмена ( $r$ ) с указанием вероятности выявления с его помощью статистической закономерности ( $p$ ) и направления корреляционной взаимосвязи (положительная или отрицательная корреляция).

Как следует из *рисунка 22*, наибольшее число корреляционных связей было зарегистрировано для цитокинов, участвующих в реализации клеточно-опосредованного иммунного ответа – IFN $\gamma$ , IL-12, IL-15, а также выраженных регуляторных и противовоспалительных эффектов, в частности, IL-10 (от 4-х до 6-и корреляционных связей).

Интересно, что такие провоспалительные цитокины как IL-6 и IL-1 $\beta$ , демонстрировали преимущественно отрицательные корреляционные связи в отличие от TNF $\alpha$  и TNF $\beta$ .

Среди достоверных корреляций между фенотипами лимфоцитов следует отметить взаимосвязь между NKG2D<sup>+</sup> CTL и CD8<sup>+</sup> Treg.

Таким образом, установленные нами изменения со стороны проанализированных показателей иммунитета, проявляют довольно много корреляционных связей уже с начального периода ГЛПС, что позволяет более точно оценить иммунопатогенез на ранних этапах заболевания.

### **3.3 – Интегральный подход к оценке лабораторно-иммунологических показателей в начальный период геморрагической лихорадки с почечным синдромом как дифференциально-диагностический прием на ранних этапах заболевания**

Как показано в предыдущих разделах данной главы, в начальном периоде ГЛПС как с позиций общеклинических лабораторных исследований, так и с точки зрения иммунологической оценки заболевания зарегистрировано определенное количество диагностически значимых признаков, причем (что особенно важно), до наступления сероконверсии на 5-7-й дни клинически выраженного инфекционного процесса, когда диагноз заболевания становится возможным верифицировать методами серодиагностики.

В данном разделе исследований сделана попытка с помощью интегрального подхода, в том числе с использованием регрессионного анализа, получившего широкое признание в современной научной литературе [25, 389], разработать единый критерий, позволяющий провести раннюю дифференциальную диагностику геморрагической лихорадки с почечным синдромом до верификации этого заболевания специфическими методами (серодиагностика).

С этой целью проводился регрессионный анализ с использованием всех информативных лабораторных показателей, установленных в начальный период (3-5-й дни) заболевания. В число этих показателей входили следующие параметры крови:

- абсолютное число тромбоцитов в крови;
- % моноцитов среди лейкоцитов крови;
- уровень мочевины крови;
- уровень креатинина крови;
- уровень холестерина крови
- активность АЛТ в крови;
- активность АСТ в крови;
- активность ГГТП в крови;
- активность ЛДГ в крови;
- относительное число В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>);
- относительное число цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих активизирующие NKG2D рецепторы (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD314<sup>+</sup>);
- относительное число регуляторных Т-клеток, экспрессирующих молекулы CD4 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>);
- относительное число регуляторных Т-клеток, экспрессирующих молекулы CD8 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>);
- относительное число естественных киллеров (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) в крови;
- уровень IL-4;
- уровень IL-15;
- уровень TNF $\alpha$ ;
- уровень TNF $\beta$ ;
- уровень IL-6;
- уровень IL-10.

В связи с тем, что группа ОРВИ с нозологической точки зрения была неоднородна, отдельно с использованием статистики малых чисел (ONE WAY ANOVA) был осуществлен контроль сохранения выявленных статистических закономерностей путем сравнения по наиболее информативным рутинным лабораторным показателям (*таблица 7*) и иммунологическим показателям (*таблица 8*) в группах пациентов с ГЛПС и с каждым отдельным заболеванием из группы ОРВИ.

**Таблица 7 – Информативность рутинных лабораторных показателей с наиболее выраженной диагностической значимостью в группах геморрагической лихорадки с почечным синдромом и острыми респираторными вирусными инфекциями с учетом нозологической характеристики острых респираторных вирусных инфекций**

Лабораторные показатели и критерии их оценки при ГЛПС		Процент соответствия диагностическому критерию		ONE WAY ANOVA	
		Пациенты с ГЛПС	Пациенты с ОРВИ	F	p
1		2	3	4	5
<b>Аденовирусная инфекция (n<sub>глпс</sub> = 24, n<sub>ави</sub> = 7)</b>					
Тромбоциты < 160 x 10 <sup>9</sup> клеток/л	соответствует	95,8%	14,3%	57,57	<0,001***
	не соответствует	4,2%	85,7%		
Моноциты > 7,2%	соответствует	91,7%	28,6%	19,18	<0,001***
	не соответствует	8,3%	71,4%		
Мочевина > 6,8 ммоль/л	соответствует	79,2%	28,6%	7,468	0,011*
	не соответствует	20,8%	71,4%		
Креатинин > 97 мкмоль/л	соответствует	91,7%	-	72,03	<0,001***
	не соответствует	8,3%	100%		
Холестерин < 4 ммоль/л	соответствует	79,2%	14,3%	13,74	0,001**
	не соответствует	20,8%	85,7%		
Аланинамино-трансфераза(АЛТ) > 38 ЕД/л	соответствует	87,5%	-	45,84	<0,001***
	не соответствует	12,5%	100%		
Аспаратамино-трансфераза (АСТ) > 50 ЕД/л	соответствует	83,3%	-	32,74	<0,001***
	не соответствует	16,7%	100%		

Продолжение таблицы 7

1		2	3	4	5
γ-глутамилтранс- пептидаза (ГТП) от 18 до 32 ЕД/л	соответствует	91,7%	28,6%	19,18	<0,001***
	не соответствует	8,3%	71,4%		
Лактатдегидро- геназа (ЛДГ) > 40 ЕД/л	соответствует	100%	28,6%	58,13	<0,001***
	не соответствует	-	71,4%		
<b>Грипп В (n<sub>глиц</sub> = 24, n<sub>грипп</sub> = 6)</b>					
Тромбоциты < 160 x 10 <sup>9</sup> клеток/л	соответствует	95,8%	16,7%	47,01	<0,001***
	не соответствует	4,2%	83,3%		
Моноциты > 7,2%	соответствует	91,7%	33,3%	14,44	0,001**
	не соответствует	8,3%	66,7%		
Мочевина > 6,8 ммоль/л	соответствует	79,2%	16,7%	10,96	0,003**
	не соответствует	20,8%	83,3%		
Креатинин > 97 мкмоль/л	соответствует	91,7%	-	61,60	<0,001***
	не соответствует	8,3%	100%		
Холестерин < 4 ммоль/л	соответствует	79,2%	16,7%	10,96	0,003**
	не соответствует	20,8%	83,3%;		
Аланинамино- трансфераза(АЛТ) > 38 ЕД/л	соответствует	87,5%	-	38,20	<0,001***
	не соответствует	12,5%	100%		
Аспаратамино- трансфераза (АСТ) > 50 ЕД/л	соответствует	83,3%	-	38,20	<0,001***
	не соответствует	16,7%	100%		
γ-глутамилтранс- пептидаза (ГТП) от 18 до 32 ЕД/л	соответствует	91,7%	-	61,60	<0,001***
	не соответствует	8,3%	100%		

Продолжение таблицы 7

1		2	3	4	5
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) > 40 ЕД/л	соответствует	100%	16,7%	112,0	<0,001***
	не соответствует	-	83,3%		
<b>Риновирусная инфекция (n<sub>г.лпс</sub> = 24, n<sub>ри</sub> = 4)</b>					
Тромбоциты < 160 x 10 <sup>9</sup> клеток/л	соответствует	95,8%	25%	26,18	<0,001***
	не соответствует	4,2%	75%		
Моноциты > 7,2%	соответствует	91,7%	25%	15,34	0,001**
	не соответствует	8,3%	75%		
Мочевина > 6,8 ммоль/л	соответствует	79,2%	25%	5,555	0,026*
	не соответствует	20,8%	75%		
Креатинин > 97 мкмоль/л	соответствует	91,7%	-	40,86	<0,001***
	не соответствует	8,3%	100%		
Холестерин < 4 ммоль/л	соответствует	79,2%	-	14,11	0,001**
	не соответствует	20,8%	100%		
Аланинаминотрансфераза(АЛТ) > 38 ЕД/л	соответствует	87,5%	-	26,00	<0,001***
	не соответствует	12,5%	100%		
Аспаратаминотрансфераза (АСТ) > 50 ЕД/л	соответствует	83,3%	-	18,57	<0,001***
	не соответствует	16,7%	100%		
γ-глутамилтранспептидаза (ГГТП) от 18 до 32 ЕД/л	соответствует	91,7%	-	40,86	<0,001***
	не соответствует	8,3%	100%		
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) > 40 ЕД/л	соответствует	100%	-	114,4	0,001**
	не соответствует	-	100%		

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4	5	
<b>Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция (n<sub>глиц</sub> = 24, n<sub>рсви</sub> = 4)</b>					
Тромбоциты < 160 x 10 <sup>9</sup> клеток/л	соответствует	95,8%	25%	26,18	<0,001***
	не соответствует	4,2%	75%		
Моноциты > 7,2%	соответствует	91,7%	50%	15,34	0,001**
	не соответствует	8,3%	50%		
Мочевина > 6,8 ммоль/л	соответствует	79,2%	25%	5,555	0,026*
	не соответствует	20,8%	75%		
Креатинин > 97 мкмоль/л	соответствует	91,7%	-	40,86	<0,001***
	не соответствует	8,3%	100%		
Холестерин < 4 ммоль/л	соответствует	79,2%	25%	14,11	0,001**
	не соответствует	20,8%	75%		
Аланинамино- трансфераза(АЛТ) > 38 ЕД/л	соответствует	87,5%	-	26,00	<0,001***
	не соответствует	12,5%	100%		
Аспартамино- трансфераза (АСТ) > 50 ЕД/л	соответствует	83,3%	-	18,57	<0,001***
	не соответствует	16,7%	100%		
γ-глутамилтранс- пептидаза (ГГТП) от 18 до 32 ЕД/л	соответствует	91,7%	-	40,86	<0,001***
	не соответствует	8,3%	100%		
Лактатдегидро- геназа (ЛДГ) > 40 ЕД/л	соответствует	100%	25%	60,92	<0,001***
	не соответствует	-	75%		

Примечание: n – число пациентов в группе, F – критерий Фишера дисперсии данных, p – вероятность гетерогенности групп исследования, достоверность межгрупповых различий: \* – умеренная, \*\* – высокая, \*\*\* – очень высокая.

**Таблица 8 – Информативность иммунологических показателей с наиболее выраженной диагностической значимостью в группах геморрагической лихорадкой с почечным синдромом и острыми респираторными вирусными инфекциями с учетом нозологической характеристики острых респираторных вирусных инфекций**

Лабораторные показатели и критерии их оценки при ГЛПС		Процент соответствия диагностическому критерию		ONE WAY ANOVA	
		Пациенты с ГЛПС	Пациенты с ОРВИ	F	p
1		2	3	4	5
<b>Аденовирусная инфекция (n<sub>ГЛПС</sub> = 24, n<sub>ави</sub> = 7)</b>					
В-лимфоциты CD19 <sup>+</sup> > 17,5%	соответствует	79,2%	14,3%	13,74	0,001**
	не соответствует	20,8%	85,7%		
NKG2D <sup>+</sup> CTL CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup> CD314 <sup>+</sup> > 32%	соответствует	75%	14,3%	10,81	0,003**
	не соответствует	25%	85,7%		
CD4 <sup>+</sup> Treg CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> > 13%	соответствует	79,2%	28,6%	6,966	0,013*
	не соответствует	20,8%	71,4%		
CD8 <sup>+</sup> Treg CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> > 13%	соответствует	75%	14,3%	10,81	0,003**
	не соответствует	25%	85,7%		
Натуральные киллеры (NK) CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> 15-20%	соответствует	75%	-	19,64	<0,001****
	не соответствует	25%	100%		
Интерлейкин-4 (IL-4) < 1,8 пг/мл	соответствует	75%	28,6%	5,614	0,024*
	не соответствует	25%	71,4%		
Интерлейкин-15 (IL-15) > 4 пг/мл	соответствует	95,8%	14,3%	134,7	<0,001****
	не соответствует	4,2%	85,7%		
Интерлейкин-6 (IL-6) > 11,5 пг/мл	соответствует	87,5%	14,3%	24,19	<0,001****
	не соответствует	12,5%	85,7%		

Продолжение таблицы 8

1		2	3	4	5
Фактор некроза опухолей $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) > 5 пг/мл	соответствует	91,7%	28,6%	19,18	<0,001***
	не соответствует	8,3%	71,4%		
Фактор некроза опухолей $\beta$ (TNF $\beta$ ) > 33,5 пг/мл	соответствует	83,3%	14,3%	17,88	<0,001***
	не соответствует	16,7%	85,7%		
Интерлейкин-10 (IL-10) > 10 пг/мл	соответствует	95,8%	14,3%	57,57	<0,001***
	не соответствует	4,2%	85,7%		
<b>Грипп В (n<sub>глиц</sub> = 24, n<sub>грипп</sub> = 6)</b>					
В-лимфоциты CD19 <sup>+</sup> > 17,5%	соответствует	79,2%	16,7%	10,96	0,003**
	не соответствует	20,8%	83,3%		
NKG2D <sup>+</sup> CTL CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup> CD314 <sup>+</sup> > 32%	соответствует	75%	16,7%	8,575	0,007**
	не соответствует	25%	83,3%		
CD4 <sup>+</sup> Treg CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> > 13%	соответствует	79,2%	33,5%	9,585	0,005**
	не соответствует	20,8%	66,7%		
CD8 <sup>+</sup> Treg CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> > 13%	соответствует	75%	16,7%	8,575	0,007**
	не соответствует	25%	83,3%		
Натуральные киллеры (NK) CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> 15-20%	соответствует	75%	-	16,80	<0,001***
	не соответствует	25%	100%		
Интерлейкин-4 (IL-4) < 1,8 пг/мл	соответствует	75%	28,6%	8,575	0,007**
	не соответствует	25%	71,4%		
Интерлейкин-15 (IL-15) > 4 пг/мл	соответствует	95,8%	-	128,0	<0,001***
	не соответствует	4,2%	100%;		

Продолжение таблицы 8

1		2	3	4	5
Интерлейкин-6 (IL-6) > 11,5 пг/мл	соответствует	87,5%	28,6%	9,962	0,004**
	не соответствует	12,5%	71,4%		
Фактор некроза опухолей α (TNFα) > 5 пг/мл	соответствует	91,7%	16,7%	28,35	<0,001***
	не соответствует	8,3%	83,3%		
Фактор некроза опухолей β (TNFβ) > 33,5 пг/мл	соответствует	83,3%	33,3%	7,200	<0,012*
	не соответствует	16,7%	66,7%		
Интерлейкин-10 (IL-10) > 10 пг/мл	соответствует	95,8%	16,7%	47,01	<0,001***
	не соответствует	4,2%	83,3%		
<b>Риновирусная инфекция (n<sub>г.лпс</sub> = 24, n<sub>при</sub> = 4)</b>					
В-лимфоциты CD19 <sup>+</sup> > 17,5%	соответствует	79,2%	25%	5,000	0,026*
	не соответствует	20,8%	75%		
NKG2D <sup>+</sup> CTL CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup> CD314 <sup>+</sup> > 32%	соответствует	75%	25%	4,245	0,049*
	не соответствует	25%	75%		
CD4 <sup>+</sup> Treg CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> > 13%	соответствует	79,2%	25%	4,245	0,049*
	не соответствует	20,8%	75%		
CD8 <sup>+</sup> Treg CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> > 13%	соответствует	75%	25%	5,000	0,026*
	не соответствует	25%	75%		
Натуральные киллеры (NK) CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> 15-20%	соответствует	75%	25%	4,245	0,049*
	не соответствует	25%	75%		
Интерлейкин-4 (IL-4) < 1,8 пг/мл	соответствует	75%	25%	4,245	0,049*
	не соответствует	25%	75%		

Продолжение таблицы 8

1		2	3	4	5
Интерлейкин-15 (IL-15) > 4 пг/мл	соответствует	95,8%	25%	26,18	<0,001***
	не соответствует	4,2%	75%		
Интерлейкин-6 (IL-6) > 11,5 пг/мл	соответствует	87,5%	25%	10,32	<0,001***
	не соответствует	12,5%	75%		
Фактор некроза опухолей $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) > 5 пг/мл	соответствует	91,7%	-	40,86	<0,001***
	не соответствует	8,3%	100%		
Фактор некроза опухолей $\beta$ (TNF $\beta$ ) > 33,5 пг/мл	соответствует	83,3%	50%	4,245	0,049*
	не соответствует	16,7%	50%		
Интерлейкин-10 (IL-10) > 10 пг/мл	соответствует	95,8%	25%	26,18	<0,001***
	не соответствует	4,2%	75%		
<b>Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция (n<sub>глиц</sub> = 24, n<sub>рсви</sub> = 4)</b>					
В-лимфоциты CD19 <sup>+</sup> > 17,5%	соответствует	79,2%	-	14,11	0,001**
	не соответствует	20,8%	100%		
NKG2D <sup>+</sup> CTL CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD314 <sup>+</sup> > 32%	соответствует	75%	25%	4,245	0,049*
	не соответствует	25%	75%		
CD4 <sup>+</sup> Treg CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> > 13%	соответствует	79,2%	-	7,429	0,011*
	не соответствует	20,8%	100%		
CD8 <sup>+</sup> Treg CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> > 13%	соответствует	75%	-	11,14	0,003**
	не соответствует	25%	100%		
Натуральные киллеры (NK) CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> 15-20%	соответствует	75%	25%	4,245	0,049*
	не соответствует	25%	75%		

Продолжение таблицы 8

1		2	3	4	5
Интерлейкин-4 (IL-4) < 1,8 пг/мл	соответствует	75%	25%	4,245	0,049*
	не соответствует	25%	75%		
Интерлейкин-15 (IL-15) > 4 пг/мл	соответствует	95,8%	-	85,43	<0,001***
	не соответствует	4,2%	100%		
Интерлейкин-6 (IL-6) > 11,5 пг/мл	соответствует	87,5%	-	26,00	<0,001***
	не соответствует	12,5%	100%		
Фактор некроза опухолей $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) > 5 пг/мл	соответствует	91,7%	-	40,86	<0,001***
	не соответствует	8,3%	100%		
Фактор некроза опухолей $\beta$ (TNF $\beta$ ) > 33,5 пг/мл	соответствует	83,3%	50%	4,245	0,049*
	не соответствует	16,7%	50%		
Интерлейкин-10 (IL-10) > 10 пг/мл	соответствует	95,8%	25%	26,18	<0,001***
	не соответствует	4,2%	75%		

*Примечание:* n – число пациентов в группе, F – критерий Фишера дисперсии данных, p – вероятность гетерогенности групп исследования, достоверность межгрупповых различий: \* – умеренная, \*\* – высокая, \*\*\* – очень высокая.

Как следует из представленных данных, у пациентов с ГЛПС и с отдельными нозологическими формами острой респираторной вирусной инфекции сохраняются все те различия, что были выявлены при статистическом сравнении групп с ГЛПС и ОРВИ в целом, что подтверждает информативность выявленных критериев, характерных для ГЛПС.

Установленные информативные показатели были использованы в качестве независимых переменных для проведения регрессионного анализа, при выполнении которого зависимой переменной выступала принадлежность пациента к группе ГЛПС, а принципом отбора показателей – первые 5 дней болезни.

В результате проведенного анализа было получено уравнение линейной регрессии следующего вида:

$$\text{РНИП ГЛПС} = 1,65 - 0,785*[\text{АСТ}] + 0,531*[\text{АЛТ}] + 0,395*[\text{тромбоциты}] - 0,209*[\text{моноциты}] + 0,156*[\text{CD4}^+ \text{Treg}] + 0,145*[\text{NK}] - 0,142*[\text{В}] - 0,13*[\text{IL-15}] + 0,128*[\text{креатинин}] + 0,127*[\text{NKG2D}^+ \text{CTL}] + 0,114*[\text{ГГТП}], \quad (2)$$

где РНИП – ранний неспецифический интегральный показатель ГЛПС,

\* – знак умножения,

АСТ – активность аспаратаминотрансферазы в крови в ЕД/л, АЛТ – активность аланинаминотрансферазы в крови в ЕД/л,

тромбоциты – число тромбоцитов в 1л крови/ $10^9$ ,

моноциты – процент моноцитов среди лейкоцитов крови,

$\text{CD4}^+ \text{Treg}$  – процент  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$  клеток среди лимфоцитов крови,

НК – процент натуральных киллеров среди лимфоцитов крови,

В – процент В-лимфоцитов среди лимфоцитов крови,

IL-15 - уровень IL-15 в крови в пг/мл,

креатинин – уровень креатинина в крови в ммоль/л,

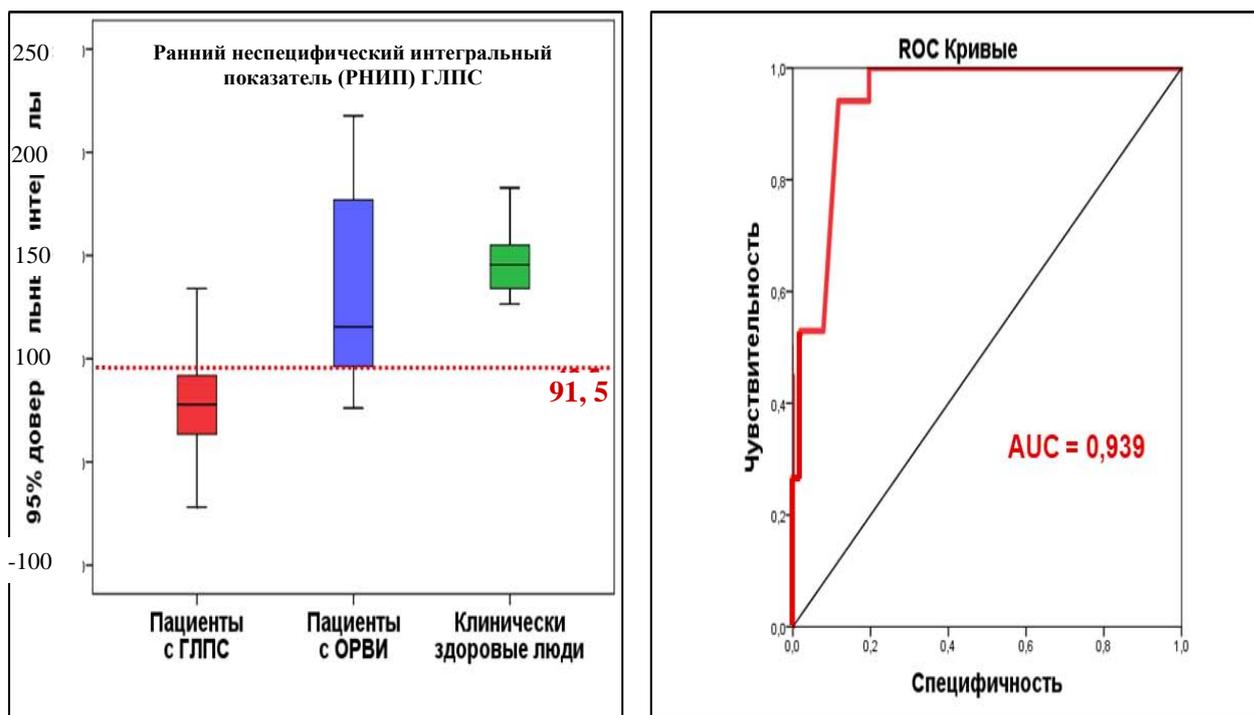
$\text{NKG2D}^+ \text{CTL}$  – процент  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD56}^-\text{CD314}^+$  клеток среди лимфоцитов крови,

ГГТП – активность  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы в крови в ЕД/л.

Как следует из полученной формулы, среди 19 использованных параметров статистической программой было отобрано 11 показателей, которые вошли в состав уравнения регрессии для расчета раннего неспецифического интегрального показателя (РНИП) ГЛПС.

На основе полученного уравнения регрессии в настоящее время нами разработана программа для ЭВМ (Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭМВ № 2023662769 от 14.06.2023 г.), которую используют для определения РНИП ГЛПС у конкретного пациента. С этой целью в программу вводят числовые значения каждого из 11 информативных показателей у конкретного больного в первые 5 дней от начала появления симптомов, и программа выдает числовое значение РНИП ГЛПС для данного больного и его оценку (% вероятности ГЛПС).

Чтобы получить критериальные значения РНИП ГЛПС, при которых ранний диагноз заболевания является наиболее вероятным, проводилось сравнение 95 %-ных доверительных интервалов этого коэффициента при ГЛПС и других заболеваний из групп сравнения. Диагностическая значимость РНИП устанавливалась путем построения ROC-кривой (рисунок 23).



**Рисунок 23 – 95 % доверительные интервалы и ROC-кривые значений – раннего неспецифического интегрального показателя геморрагической лихорадки с почечным синдромом в группах сравнения**

Статистический анализ показал, что при значениях ниже 91,5 РНИП ГЛПС на первой неделе заболевания свидетельствует в пользу ГЛПС с высокой диагностической значимостью ( $AUC = 0,939$ ).

В 2022 году нами было проведено тестирование разработанной программы у 36 пациентов, поступавших в разное время в инфекционное отделение № 1 Клиники ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России на вторые-пятые сутки от начала заболевания на фоне выраженной лихорадки, слабости, головной боли, болях в мышцах и пояснице с предварительным диагнозом: «Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом».

Всем больным были выполнены лабораторные исследования с определением в крови числа тромбоцитов, процента моноцитов среди лейкоцитов, активности АЛТ, АСТ, ГТП, уровня креатинина, а также процентного содержания среди лимфоцитов натуральных киллеров, В-лимфоцитов, CD314<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов, CD4<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток, уровня IL-15.

Среди 36 пациентов у 25 человек значения РНИП ГЛПС колебались в пределах от 48,7 до 65,2, а впоследствии серологически был подтвержден диагноз ГЛПС. У 12 человек РНИП ГЛПС показывал значения в диапазоне от 95,4 до 167,2, а по данным метода ПЦР в слизи из носоглотки были обнаружены возбудители аденовирусной инфекции (4 человека), гриппа (5 человек), смешанной гриппозной и респираторно-синтициальной вирусной инфекции (3 человека).

Практическое использование уравнения линейной регрессии для определения раннего неспецифического интегрального показателя демонстрируется нами на следующих клинических примерах.

**Пример 1.** Больной А., 49 лет, в 2022 г. находился на стационарном лечении в инфекционном отделении № 1 Клиники ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Поступает в клинику на 4 день болезни с жалобами на повышение температуры тела до 38,5°C, выраженную слабость, боли в мышцах рук, ног, спины. Беспокоит также умеренно выраженная головная боль, незначительная сухость во рту. Объективно: кожный покров обычной окраски, сыпи нет. Язык влажный, обложен беловатым налетом. Лимфатические узлы не увеличены. В легких дыхание везикулярное, хрипов нет. Частота дыхания – 16 в минуту. Тоны сердца ясные, пульс 102 удара в минуту, артериальное давление 140 и 80 мм. рт. ст. Симптом Пастернацкого – отрицательный с обеих сторон. Со слов больного, диурез достаточный, кратность мочеиспускания и количество мочи не изменилось. Три дня назад отметил озноб, повышение температуры тела до 39°C, головную боль. Принимал парацетамол по 1 таблетке 3 раза в день и аскорбиновую кислоту в терапевтических дозах, за медицинской помощью не обращался. Температура тела снижалась до 37,5-38°C через час после приема лекарства и снова повышалась до 38°C через 4-5 часов. Эпидемиологический анамнез: двадцать дней назад выезжал

за город на турбазу «Дубки», жил в деревянном доме 5 дней, ежедневно гулял в лесу. На основании клинико-эпидемиологических данных был поставлен предварительный диагноз: «Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, начальный период». Больному было проведено обследование согласно действующим клиническим рекомендациям для больных ГЛПС. Дополнительно к рекомендованному стандартом обследованию, при поступлении (4-е сутки болезни) были исследованы информативные показатели, входящие в уравнение регрессии для РНИП ГЛПС. Были определены значения следующих лабораторных показателей: содержание тромбоцитов в крови –  $157 \cdot 10^9/\text{л}$ , моноциты – 8,3%, АЛТ – 36,3 ЕД/л, АСТ – 53 ЕД/л, ГГТП – 39 ЕД/л, креатинин – 77,6 ммоль/л, НК – 8,7%, В-лф – 12,6%,  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD56}^-\text{CD314}^+$  - 11,8%,  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$  - 5,4%, IL-15 – 54 пг/мл для определения РНИП.

В результате включения показателей пациента А. в уравнение регрессии для вычисления РНИП, результат составил 42,7, что говорит о высокой диагностической значимости наличия у пациента А., 49 лет, ГЛПС с вероятностью (в соответствии со значениями AUC) 93,9 %. В дальнейшем данный диагноз был подтвержден серологическим методом (РНИФ с парными сыворотками с нарастанием титра антител в 6 раз). Пациент выписан из стационара на 28 день болезни с заключительным диагнозом: «Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, средней степени тяжести, период реконвалесценции».

**Пример 2.** Больная К., 54 года, в 2022 г. поступает в клинику инфекционных болезней ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России с направительным диагнозом: «Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, начальный период». Болеет три дня. Всё началось остро, с выраженной головной боли, озноба, повышения температуры тела до  $40^\circ\text{C}$ . Пациентка начала самостоятельно лечение: принимала таблетки ацетилсалициловой кислоты (0,5 г) и таблетки умифеновира (0,2 г) 3 раза в день. Эффекта от проводимой терапии не получила, на протяжении всех дней сохранялось повышение температуры тела до  $38,5\text{-}39^\circ\text{C}$ , нарастала головная боль, болезненные ощущения в мышцах спины (особенно в области поясницы), рук, ног, была однократно рвота на второй день болезни и жидкий стул. Пациентка отмечает

на утро (3-й день болезни) снижение артериального давления до 100 и 60 мм. рт. ст., тахикардию (пульс 122 удара в минуту), сухость во рту, жажду, озноб. Вызвала скорую помощь и была доставлена в клинику. Данные эпидемиологического анамнеза: проживает в частном секторе за городом более 5 месяцев. Три недели назад делала уборку в гараже, подметала пол, видела экскременты грызунов, со слов пациентки, периодически в доме слышит шорох, связанный, скорее всего, с мышами. Данные объективного осмотра без особенностей, катаральных явлений нет. Предварительный диагноз: «Геморрагическая лихорадка с почечным синдром, начальный период». Дополнительно к рекомендованному стандартом обследованию, при поступлении (3-е сутки болезни) больной К. были исследованы отдельные показатели лимфоцитов крови и цитокинового профиля. Были определены значения следующих лабораторных показателей: содержание тромбоцитов в крови –  $243 \cdot 10^9/\text{л}$ , моноциты – 6%, АЛТ – 19,4 ЕД/л, АСТ – 23,2 ЕД/л, ГТП – 46,2 ЕД/л, креатинин – 64 ммоль/л, НК – 32,1%, В-лф – 6,2%,  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD56}^-\text{CD314}^+$  - 42,1%,  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$  - 8,2%, IL-15 – 7,3 пг/мл, для определения РНИП.

В результате включения показателей пациентки К., 54 года, в уравнение регрессии для вычисления РНИП, результат составил 111,4, что говорит о высокой вероятности отсутствия у нее ГЛПС. В дальнейшем у данной пациентки была диагностирована аденовирусная инфекция и установлено сопутствующее заболевание почек. Больная выписана с заключительным диагнозом: «Острая аденовирусная инфекция. Инфекция мочевых путей. Хронический пиелонефрит, обострение. Хроническая болезнь почек 1 ст.».

### **Обсуждение главы 3**

К основным патогенетическим механизмам ГЛПС относятся: (1) прямое микрососудистое эндотелиальное повреждение, приводящее к повышению проницаемости капилляров и развитию некардиогенного отека легких и острого респираторного дистресс-синдрома, и (2) усиленный иммунный ответ хозяина, приводящий к вторичному повреждению органов и тканей [316].

ГЛПС имеет природно-очаговый характер с преобладанием аэрогенного механизма заражения, в который не входит передача от человека к человеку [318]. В соответствии с этим при поражении организма человека вирусному возбудителю присущ процесс миграции от входных ворот (легкие, поврежденная кожа) в сосудистую систему организма без обратного перехода в барьерные ткани, что способствовало бы распространению возбудителя в природе. Способность ортохантавирусов к первичному накоплению в эпителиальных клетках респираторного тракта в свое время послужило довольно интригующим открытием при исследовании патогенеза ГЛПС [339]. В связи с этим, еще на начальных этапах изучения этого заболевания исследователи отметили, что клиника с легочными проявлениями нередко сопровождается ГЛПС, вызванную ортохантавирусом *Puumala* (эпидемическая нефропатия) и служащую объектом исследования в данной работе [142, 180, 190, 230]. Отчасти это связано с тем, что ортохантавирус *Puumala* генетически тесно связан с вирусом *Sin Nombre*, вызывающим лихорадочный синдром с поражением легких [180]. Некоторые авторы даже выделяют отдельно такую форму заболевания как геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, осложненная острым респираторным дистресс-синдромом [113].

Все это приводит к необходимости дифференцировать это заболевание, в первую очередь, с острыми респираторными вирусными инфекциями, особенно в начальном периоде, пока не начали превалировать симптомы поражения почек. Наши клинические и лабораторные исследования полностью подтвердили целесообразность такого подхода, тем более, что инфекционисты реально сталкиваются с этой проблемой в клинической практике.

Как отмечено выше, в особенности патогенеза ГЛПС входит также значение иммунных реакций организма, характерные признаки которых во многом связаны со свойствами вирусного возбудителя, особенно по принципам его взаимодействия с клетками организма-хозяина. Указанные особенности развития пусковых механизмов ГЛПС и их взаимосвязи между собой отражены нами на схеме (рисунки 24).



**Рисунок 24 – Пусковые механизмы патогенетического воздействия ортохантавирусов Puumala на организм человека**

Так, для проникновения в клетку ортохантавирусы используют клеточные интегриновые рецепторы [172], которые экспрессируются на поверхности эндотелиальных клеток и многих других клеток организма человека. Присоединяясь к интегринам таких клеток как нейтрофилы [295], тромбоциты [380], моноциты/макрофаги [99], натуральные киллеры [84], вирус предположительно влияет на их функции и количественное представительство в крови, что отмечается в научной литературе и подтверждается нашими исследованиями.

В частности, нами зафиксировано наличие палочкоядерного сдвига у нейтрофилов как проявление нарастающей их активности и статистически значимое падение числа тромбоцитов – феномены, подтвержденные данными источников литературы [101, 107]. При этом, как сообщают отдельные авторы, патогенетически значимым проявлением роста активности нейтрофилов и его итогом служит явление нетоза, сопровождающееся выбрасыванием из нейтрофилов в состоянии апоптоза нитей, состоящих из молекул двуспиральной ДНК, покрытых гистонами и содержимым гранул нейтрофилов (миелопероксидазой, эластазой, катепсином G) и усиливающих сосудистую проницаемость [85, 136, 308, 354].

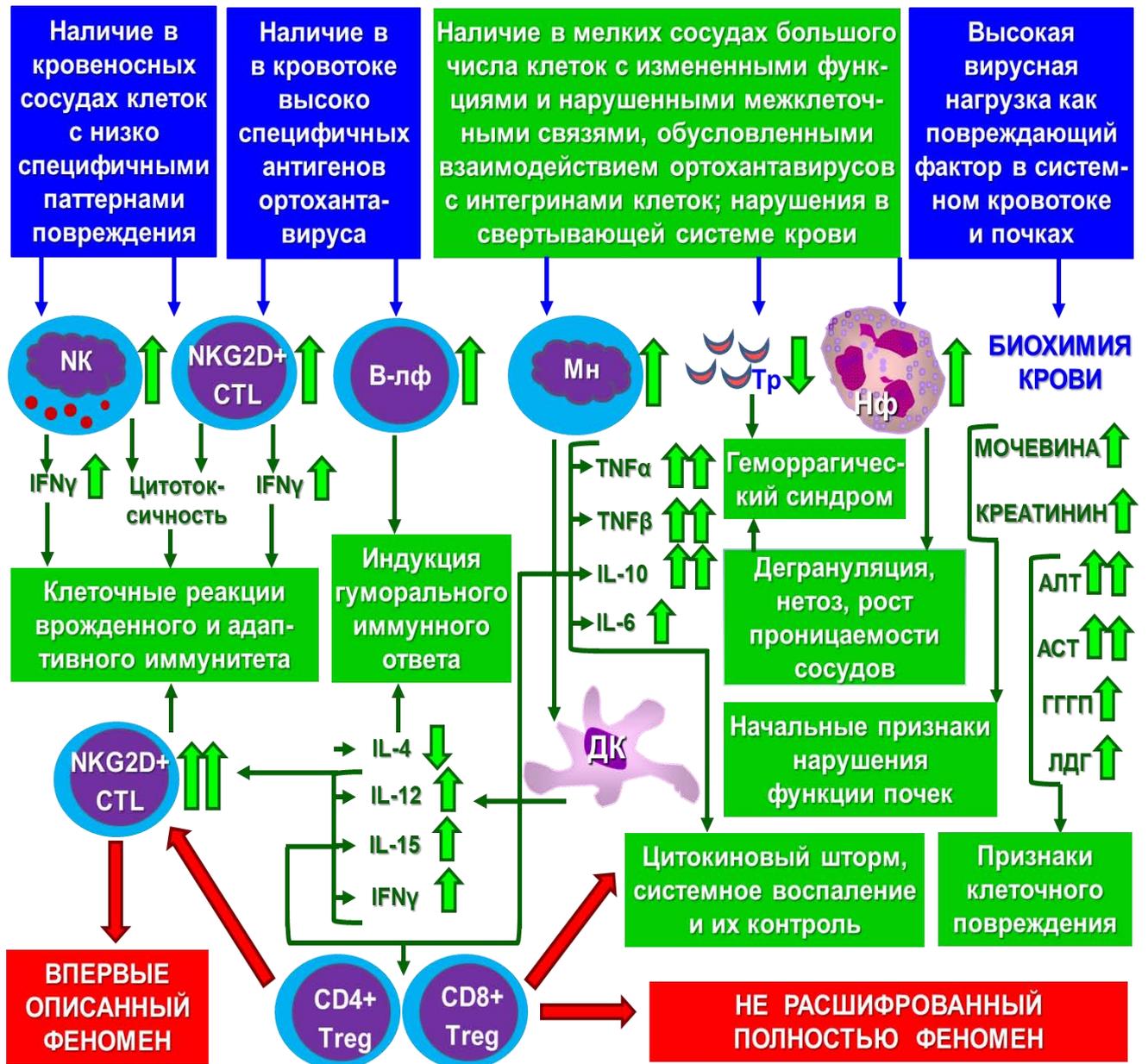
Результатом нарастающей тромбоцитопении, отмеченной и в наших исследованиях, является развитие у больных геморрагического синдрома, характеризующегося повышенной кровоточивостью, склонностью к образованию кровоподтеков и геморрагической сыпи, спонтанным кровотечениям различных локализаций. Тромбоцитопения, а также способность ортохантавирусов прямо активировать калликреин-кининовую систему с высвобождением брадикинина, входящие в патогенетические механизмы геморрагического синдрома ГЛПС, многократно отмечались другими авторами [95, 99, 166, 268, 335, 339].

Тропизм ортохантавирусов к эпителиальным клеткам легких человека определяет их проникновение в клетки эндотелия системы кровотока и в моноциты/макрофаги [116], в связи с чем, высказывается мнение, что широкое распространение ортохантавирусов по организму человека происходит гематогенным путем не только в свободном виде, но и в составе зараженных вирусом моноцитов с последующим инфицированием новых моноцитов и эндотелиальных клеток, что обеспечивает «экранирование» вируса от взаимодействия с факторами врожденной иммунной защиты, возможность достижения им к концу инкубационного периода отдаленных органов и тканей, в том числе почек [3, 10]. Известно также, что ортохантавирусы трансформируют моноциты/макрофаги в дендритные клетки [242] без потери последними

антигенпрезентирующих функций и способности индуцировать в дальнейшем адаптивный иммунный ответ [74, 187].

В наших исследованиях был отмечен такой диагностически значимый признак ГЛПС как статистически значимое нарастание моноцитов в крови – моноцитоз. Более того, было показано, что моноциты в значительной степени влияют на формирование цитокинового профиля крови, поскольку отмеченные сильные положительные корреляционные связи числа моноцитов с цитокинами, участвующими в формировании клеточно-опосредованных иммунных реакций ( $IFN\gamma$ , IL-12, IL-15) и особенно активно секретлируемыми моноцитами, трансформированными в дендритные клетки [149]. Кроме этого, отмечена отрицательная корреляционная связь числа этих клеток с IL-1 $\beta$  крови, что сочетается с тенденцией к падению уровня этого провоспалительного цитокина, секреция которого моноцитами связана с инфламмасомным механизмом, более характерным для бактериальных инфекций [146, 278]. Наконец, выраженная положительная корреляция связывает нарастание числа моноцитов и уровня IL-10 – цитокина с выраженным противовоспалительным эффектом, в регуляторные свойства которого входит поддержание высокого уровня  $IFN\gamma$  [330], что вполне вписывается в контекст наблюдаемых нами сдвигов цитокинового профиля в начальный период ГЛПС и будет еще детально обсуждено нами.

На *рисунке 25* представлены данные наших собственных исследований, встроенные в современные представления об иммунопатогенезе ГЛПС в начальный период. Комментируя схему на рисунке, следует еще раз подчеркнуть, что основными триггерными компонентами в начальный период ГЛПС является сам вирус с его антигенами и индуцированными им паттернами клеточного повреждения, нарастающее число клеток, подверженных прямой вирусной атаке (эндотелиальных, макрофагальных, лимфоидных), а также опосредованный ортохантавирусами эффект конкуренции с клеточными  $\beta_3$ -интегринами на мембране нейтрофилов, тромбоцитов, лимфоцитов и других клеток-мишеней.



**Рисунок 25 – Триггерные патогенетические механизмы, как подтвержденные данными литературы, так и вновь установленные при выполнении данной работы**

*Примечание:* Нф – нейтрофильные гранулоциты, Тр – тромбоциты, Мн – моноциты/макрофаги, В-лф – В-лимфоциты, НК – натуральные киллеры, НКТ – НК-подобные Т-лимфоциты, CTL – цитотоксические Т-лимфоциты, Treg – регуляторные Т-клетки, красными стрелками отмечены вновь установленные изменения клеточного состава, характерные для геморрагической лихорадки с почечным синдромом.

С позиций оценки иммунопатогенетического значения таких клеток врожденного иммунитета, как натуральные киллеры, особую роль играет отсутствие у ортохантавирусов цитопатического эффекта [69, 186, 379] и связанного с этим ключевого значения цитотоксической активности клеток иммунной системы как основного механизма элиминации вирусного возбудителя

[316]. Например, в начальный период ГЛПС нами был зафиксирован диагностически значимый рост содержания НК в крови, а также нарастание числа цитотоксических  $CD8^+$  Т-лимфоцитов, в фенотип которых входила экспрессия активирующего лектинового рецептора NKG2D (CD314).

В связи с этим, стоит подчеркнуть, что одной из важнейших особенностей иммунопатогенеза начального периода ГЛПС является осуществление клеточных реакций не только врожденного иммунитета, но и развитие триггерных механизмов клеточной фазы адаптивного иммунного ответа по довольно необычному сценарию, близкому к реакциям врожденного иммунитета.

Известно, что CTL являются лимфоцитами клеточного иммунного ответа, несущими специфичные к антигенам рецепторы (TCR), в активации которых принимают участие Т-хелперы 1-го типа [5]. В современной литературе широко дискутируется вопрос о ведущей роли цитотоксических Т-лимфоцитов у больных ГЛПС [226], при этом исследователи нередко подчеркивают, что при изучении механизмов реализации антиген-специфического ответа и формирования иммунологической памяти с участием этих клеток возникает очень много спорных вопросов [184, 344].

В наших исследованиях общее число CTL ( $CD3^+CD8^+$ ) статистически значимого роста в начальный период не показало, но зато статистически значимо возростала определенная категория этих клеток, экспрессирующих NKG2D (CD314), как активирующие лектиновые рецепторы, взаимодействующие со стресс-индуцированными молекулами (MICA, MICB) на поверхности клеток-мишеней и экспрессируемые преимущественно натуральными киллерами, а также CTL [234].

В данной работе впервые отмечена такая особенность ГЛПС, как начало активационного процесса в Т-системе лимфоцитов не с активации Т-хелперов IL-2-зависимым механизмом (через CD25), а с активации CTL NKG2D-зависимым путем, поскольку в лихорадочный период этого заболевания число Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD25 ( $CD3^+CD25^+$ ), не изменялось или даже падало, в то время

как число лимфоцитов с фенотипом  $CD3^+CD8^+CD56^-CD314^+$  увеличивалось в 1,6 раза по сравнению с контролем.

По всей вероятности, это связано с активным размножением ортохантавирусов в эндотелии сосудов еще в начале инкубационного периода и довольно быстрым тысячекратным ростом антигенной нагрузки на клетки крови в начальный период клинических проявлений [368], то есть со стрессовой ситуацией в кровотоке, которая потенциально может проявиться появлением на мембране эндотелиоцитов стресс-индуцированных молекул как паттернов повреждения этих клеток. Обычно такой механизм характеризуется с точки зрения вовлечения в противовирусный иммунный ответ  $NKG2D^+$  натуральных киллеров ( $CD3^-CD16^+CD56^+CD314^+$ ), но в наших исследованиях изменений в количественном составе этих клеток в начальный период зафиксировано не было, в отличие от  $CD3^+CD8^+CD56^-CD314^+$  CTL.

$NKG2D$  ( $CD314$ ) является одним из наиболее хорошо охарактеризованных лектиноподобных рецепторов С-типа. Экспрессия белков  $NKG2D$  на клеточной поверхности требует их ассоциации с адаптерными белками для стабилизации рецепторного комплекса. Функции адаптерных белков во всех случаях выполняют  $DAP10$ , а у CTL в рецепторный комплекс входит еще и специфический рецептор этих клеток (TCR). Лиганды  $NKG2D$  не обнаружены на поверхности здоровых клеток, их индукцию часто приписывают клеточному «стрессу», например, вследствие инфицирования клеток вирусами [234]. Хотя  $NKG2D$  экспрессируется на всех наивных  $CD8^+$  Т-клетках человека, он не может костимулировать TCR-индуцированную активацию покоящихся CTL, а делает это только после того, как Т-клетки уже были активированы с участием TCR [409].

После преобразования костимулирующего сигнала с участием TCR и  $NKG2D$  CTL приобретают способность к цитолизу [380]  $NKG2D$ -зависимым и TCR-независимым способом [234], то есть доля специфических реакций по элиминации антигена с участием CTL значительно снижается. В связи с этим, можно предположить, что ортохантавирусы, индуцируя опосредованно повышенную экспрессию цитотоксическими Т-лимфоцитами молекул  $NKG2D$  как

костимуляторов TCR, переводят специфическую элиминацию инфицированных клеток в низко специфичную, что значительно снижает эффективность освобождения организма человека от вирусного возбудителя.

В эксперименте на мышах было показано, что IL-15 является ключевым компонентом выживания T-клеток со свойствами NKG2D<sup>+</sup> CD8-предшественников памяти [73, 264, 303, 397]. В современной литературе имеются указания на довольно значительное повышение уровня IL-15 при ГЛПС, хотя некоторые авторы связывают это с функциональным значением совершенно других клеток – натуральных киллеров [69], в регуляции которых IL-15 на всех этапах развития этих клеток принадлежит одна из ключевых ролей [375]. Экспрессия мРНК IL-15 обнаружена в различных клетках организма, синтезирующих этот цитокин: моноцитах, макрофагах, нейтрофилах, дендритных клетках, клетках костного мозга и вилочковой железы, скелетной мускулатуры, сердца, легких, кишечника, а также эпителиальных клетках почечных канальцев [396]. Именно этот цитокин определяет трансформацию моноцитов/макрофагов в дендритные клетки. Для многих типов клеток IL-15 при этом является мощным антиапоптотическим фактором. Имеются также данные о том, что, например, у натуральных киллеров, помимо IL-15-индуцированного влияния на дифференцировку этих клеток, возрастает пролиферативная активность, выживаемость. Способствует IL-15 и экспрессии NKG2D [27, 375]. Отмечается также, что параллельно с НК-клетками передача сигналов IL-15 влияет на все фазы биологии CD8<sup>+</sup> T-клеток, включая их развитие, активацию, пролиферацию, выживание, цитотоксичность и формирование пула CD8<sup>+</sup> T-лимфоцитов памяти [60, 66].

Что касается IL-15 при вирусных инфекциях, сведения о его защитной роли носят единичный характер. В частности, отмечено значение этого цитокина при инфекциях, этиологически связанных с вирусами лимфоцитарного хориоменингита, везикулярного стоматита, иммунодефицита человека, гепатита В [375], однако сам механизм такого участия описан лишь примерно, при этом ни в одном из доступных источников он не касался ГЛПС.

В то же время полученные нами данные свидетельствуют о том, что характерным признаком начального периода ГЛПС является не только рост числа  $CD8^+$  Т-лимфоцитов, экспрессирующих активирующий рецептор NKG2D, но и коррелирующее с числом этих клеток, как и с числом НК, нарастание в крови уровня IL-15 [352].

Недавно в литературе появились сведения о способности IL-15 влиять еще на одну категорию клеток иммунной системы – регуляторные Т-клетки. Так, было выявлено снижение пролиферации Treg под воздействием IL-15, которое может приводить к задержке восстановления пула Treg у больных с аутоиммунным заболеванием (ревматоидным артритом) в случае лимфопении [342].

Более детальные исследования позволили установить, что у здоровых людей присутствуют в крови  $CD8\alpha\alpha$  регуляторные Т-клетки. По данным Tang X. et al. (2019), эти клетки служат механизмом регуляции по принципу обратной связи и нацелены только на высоко активированные эффекторные Т-клетки. Такое регулирование позволяет контролировать избыточную активность эффекторных клеток, избегая при этом чрезмерного повреждения тканей. Дополнительные особенности  $CD8\alpha\alpha$  Treg включают зависимость от передачи сигналов с участием IL-15, экспрессию НК-ингибирующих рецепторов и способность к формированию фенотипа памяти [355].

В соответствии с этими данными возникла еще одна гипотеза, которая помогла бы объяснить взаимосвязь между значительным нарастанием в крови в начальный период ГЛПС не только  $NKG2D^+$  CTL, но и регуляторных Т-клеток. С позиций существующих представлений, этот факт довольно сложно интерпретировать, поскольку функциональное значение этих клеток при инфекционных процессах системного характера, как правило, признается противоположным: основная функция CTL – элиминация вируса через цитотоксическое повреждение клеток, в которых этот вирус реплицируется, что нередко еще и усугубляет повреждение тканей, а Treg призваны ограничивать воспалительный и иммунный ответ организма, чтобы уменьшить его повреждающее действие на ткани [183, 234, 409]. Можно предположить, что при

определенных фенотипических признаках как CTL, так и Treg, могут иметь и некоторую общую направленность функциональных признаков. С этой точки зрения заслуживают внимания попытки использования NKG2D<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> CTL с терапевтическими целями [307].

Например, можно предполагать, что индукции Treg у больных ГЛПС способствует падение специфичности цитотоксических реакций CTL вследствие экспрессии ими NKG2D, как это описано выше. В результате этого рост антигенной нагрузки на иммунную систему начнет возрастать из-за снижения элиминации вируса, что приведет к увеличению представительства пула индуцированных Treg в организме человека [254], в том числе и CD8<sup>+</sup> Treg.

Возможный механизм вовлечения Treg в иммунный процесс при ГЛПС подтверждается следующими данными, полученными при выполнении этого исследования. К числу таких фактов относятся, например, наши результаты по росту уровня IFN $\gamma$ , факторов некроза опухолей, а также умеренное нарастание содержания в крови IL-6. Из литературы известна способность IFN $\gamma$  индуцировать Treg [192], IL-6 и TNF $\alpha$  – активировать пролиферацию этих клеток [349], а у IL-6 – еще и стимулировать продукцию IL-10 как широко известного индуктора Treg на фоне нарушения миграционной способности этих клеток [153], что препятствует их поступлению в ткани.

Патогенетическое значение нарастания числа Treg при ГЛПС, как и при других вирусных инфекциях, на ранних этапах заболевания уже отмечалась другими исследователями [118, 128, 201], но мы подошли к этой проблеме с учетом дифференцирования функций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> фенотипов Treg.

Суммируя данные литературы, посвященные дифференцированному подходу к оценке CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Treg безотносительно к ГЛПС, можно констатировать, что первыми зарегистрированными супрессорными клетками были CD8<sup>+</sup> Treg, но затем из-за низкого содержания FoxP3<sup>+</sup> клеток среди субпопуляции CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов исследования были сосредоточены почти исключительно на CD4<sup>+</sup> Treg [128]. CD4<sup>+</sup> Treg конститутивно экспрессируют IL-2R $\alpha$  (CD25), ингибируют продукцию IL-2 и способствуют остановке клеточного

цикла  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток по механизму, который требует межклеточного контакта [376]. К сожалению, антигены, которые распознают  $CD4^+FoxP3^+$  Treg, остаются в значительной степени неизвестными [82, 355]. Более того, к настоящему времени становится ясно, что клетки  $CD4^+FoxP3^+$  Treg, особенно у людей, весьма гетерогенны и далеко не все из них обладают супрессорной активностью [290, 341, 400, 425]. Именно в связи с этим, клинические испытания с использованием поликлональных  $CD4^+FoxP3^+$  Treg для лечения иммуноопосредованных (прежде всего аутоиммунных) заболеваний имели весьма ограниченный успех [82] и именно по этой причине характеристика  $CD8^+$ Treg-клеток как в экспериментальных условиях, так и на людях, является перспективной областью исследований.

Пока только можно отметить,  $CD8^+$  Treg обладают гораздо более выраженной супрессорной активностью, чем  $CD4^+$  Treg, которая реализуется не только контактным путем, но и через секрецию таких цитокинов как  $IFN\gamma$ , IL-10, IL-34, трансформирующий фактор роста  $\beta$  [128]. Большинство  $CD8^+$  Treg имеют тимусное происхождение. Формирование и значительное нарастание пула индуцибельных эффекторных и  $CD8^+$  Treg у человека наблюдается при воздействии на Т-клетки IL-15 и IL-2 в низких дозах [128, 228]. В механизмы действия этих клеток входит модуляция баланса регуляторные/эффекторные Т-клетки (в первую очередь, с участием IL-34) путем дифференцировки моноцитов в регуляторные макрофаги, которые, в свою очередь, могут индуцировать как  $CD4^+$ , так и, особенно,  $CD8^+$  Treg, ответственные, благодаря связи с механизмами иммунологической памяти, в том числе и за ее развитие [120, 240].

По результатам анализа данных, полученных для начального периода ГЛПС и включающих, как следует из обсуждения, несколько неисследованных ранее феноменов, появилась рабочая гипотеза, что эти феномены составляют единый механизм, влияющий на дальнейшее развитие инфекционного процесса.

Все изменения иммунного статуса и прочие лабораторные сдвиги, зарегистрированные нами у больных в начальный период ГЛПС, были подвергнуты регрессионному анализу с целью разработки интегрального

критерия, который позволил бы использовать их для ранней диагностики ГЛПС до наступления сероконверсии.

Интересно, что большинство обсуждаемых нами признаков в начальный период ГЛПС вошли в уравнение регрессии, положенное в основу разработанной диагностической формулы данного заболевания. Дело в том, что отмеченная выше способность ортохантавирусов к межклеточному распространению без концентрации в жидкостях организма в значительной степени, затрудняет их диагностическое обнаружение в начальный период болезни [102] и создает необходимость предусмотреть разработку метода ранней дифференциальной диагностики ГЛПС на основе определения суррогатных маркеров этого заболевания, не связанных с его антигенной или генетической структурой.

Из всех загруженных информативных параметров в процессе регрессионного анализа программой были отобраны такие суррогатные маркеры ГЛПС как число тромбоцитов и моноцитов, активность АЛТ, АСТ и ГГТП, уровень креатинина в крови. Наряду с этим в уравнение регрессии вошли иммунологические показатели содержания в крови натуральных киллеров, В-лимфоцитов, NKG2D<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов, CD4<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток, уровня в сыворотке крови IL-15. Решение этого уравнения для каждого пациента позволяет получить так называемый ранний неспецифический интегральный показатель (РНИП) ГЛПС. Диагностическая значимость этого показателя оказалась очень высокой, а тот факт, что среди наиболее информативных показателей ГЛПС оказалось содержание в крови NKG2D<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов и CD4<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток, лишний раз подтверждает правомочность той рабочей гипотезы, которая была положена в основу данного исследования.

**СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ,  
ИЗЛОЖЕННЫМ В 3 ГЛАВЕ**

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

1. *Иванов, М.Ф.* Иммунологическая составляющая поражения почек при геморрагической лихорадке с почечным синдромом / М.Ф. Иванов, И.П. Балмасова, Р.И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология. – 2021. – Т. 22, № 1. – С. 36-37.

2. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом как социально значимая природно-очаговая инфекция / *М.Ф. Иванов, И.П. Балмасова, Д.Ю. Константинов, Е.С. Малова* // Международный научно-исследовательский журнал. – 2023. – №3 (129). – URL: <https://research-journal.org/archive/3-129-2023-march/10.23670/> IRJ.2023. 129.6 (дата обращения: 17.03.2023). – <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.129.6>

5. *Иванов М.Ф.* Роль иммунных механизмов в патогенезе геморрагической лихорадки с почечным синдромом / М.Ф. Иванов // Аспирантский вестник Поволжья. – 2023. – № 23 (3). – С. 4-12. <https://doi.org/10.55531/2072-2354.2023.23.3.4-12>.

3. Роль иммунных механизмов в поражении почек при геморрагической лихорадке с почечным синдромом / *М.Ф. Иванов, Д.Ю. Константинов, И.П. Балмасова, А.Ю. Улитина* // Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». Реабилитация, Врач и Здоровье. – 2023. – Т.13 (3). – С. 93-98. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2023.3.CLIN.11>.

4. Экспрессия NKG2D цитотоксическими Т- лимфоцитами как возможный механизм иммунопатогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом / *М.Ф. Иванов, И.П. Балмасова, А.В. Жестков, Д.Ю. Константинов, Е.С. Малова* // Иммунология. – 2023. – 44 (1): 93–102. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2023-43-1-93-102>

6. Иммунопатогенетические особенности геморрагической лихорадки с почечным синдромом как критерии ранней иммунодиагностики / М.Ф. Иванов, И.П. Балмасова, Е.С. Малова, Д.Ю. Константинов // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2024. – Т. 28, № 2. – С. 265- 281. doi: 10.22363/2313–0245–2024–28–2–265–281.

*Патенты:*

1.Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023662769 Российская Федерация. Калькулятор ранней лабораторной диагностики и прогнозирования тяжелого течения ГЛПС: № 2023661581: заявл. 02.06.2023: опубл. 14.06.2023 Бюл. №6 / М.Ф. Иванов, А.Ю. Улитина, И.П. Балмасова [и др.]; правообладатель Г.В. Недугов. – 1 с.

## ГЛАВА 4 – ГЕМОРРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ В НАЧАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

### 4.1 – Клинико-лабораторная характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период

В начальный период ГЛПС возникает еще одна проблема патогенетического и диагностического характера. Дело в том, что, несмотря на относительно благоприятное течение этого заболевания, вызванного ортохантавирусом *Puumala* и рассматриваемого в данной работе, в случаях тяжелого течения ГЛПС могут развиваться довольно серьезные осложнения, приводящие к длительному нарушению здоровья после перенесенной инфекции и даже к летальному исходу. Особенно тяжелые нарушения при ГЛПС, этиологически связанным с вирусом *Puumala*, возникают со стороны почек, что заставляет прибегать в ряде случаев к процедуре гемодиализа. В связи этим, очень важно было бы как можно раньше диагностировать тяжелое течение ГЛПС, чтобы учесть это в тактике ведения пациента.

В то же время в начальный период заболевания это сделать не так просто. Как уже сообщалось в предыдущей главе, под наблюдением в этот период находились 24 пациента, которым после 5-го дня болезни была проведена серологическая диагностика и установлен диагноз ГЛПС. Четырем пациентам при поступлении был поставлен диагноз: «Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, тяжелое течение». Однако по мере развития заболевания оно приобрело тяжелое течение не только у четырех обозначенных пациентов, а у 9 человек из тех 24, что поступали на стационарное течение в начальный период ГЛПС.

Задачей данного раздела исследований служило определение таких признаков и маркеров ГЛПС, которые позволяли бы прогнозировать развитие тяжелого течения этого инфекционного процесса в начальный период заболевания. Тяжесть течения ГЛПС определялась в соответствии с критериями, детально охарактеризованными в клинических рекомендациях, утвержденных МЗ РФ [10], и описанными нами в главе 2.

Частота регистрации основных клинических симптомов и результатов объективного обследования в начальный период заболевания у пациентов, которым во время регистрации результатов исследования или позднее была определена тяжесть течения ГЛПС (среднетяжелая или тяжелая), представлена в *таблице 9*.

**Таблица 9 – Клинические признаки у пациентов с разной тяжестью течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом в начальный период заболевания**

Клинические признаки		Частота встречаемости признака (человек/%)		ONE WAY ANOVA	
		ГЛПС средней тяжести n = 15	ГЛПС тяжелого течения n = 9	F	p
1		2	3	4	5
Жалобы пациента	Общая слабость	15 чел. / 100%	9 чел. / 100%	-	-
	Головная боль	7 чел. / 47%	8 чел. / 89%	4,773	0,040*
	Боль в мышцах	8 чел. / 53%	8 чел. / 89%	3,385	0,079
	Озноб	10 чел. / 66,7%	6 чел. / 66,7%	0,743	0,398
	Сухость во рту	12 чел. / 80%	9 чел. / 100%	2,062	0,165
	Икота	2 чел. / 13%	1 чел. / 11%	0,023	0,880
	Тошнота	6 чел. / 40%	4 чел. / 44%	0,275	0,605
	Рвота	4 чел. / 26,7%	3 чел. / 33,3%	0,111	0,742
	Насморк	1 чел. / 6,7%	1 чел. / 11%	0,134	0,718

Продолжение таблицы 9

	1	2	3	4	5
Жалобы пациента	Носовые кровотечения	6 чел. / 40%	3 чел. / 33,3%	0,098	0,757
	Кашель	5 чел. / 33,3%	4 чел. / 44%	6,125	0,022*
	Снижение зрения	1 чел. / 6,7%	1 чел. / 11%	1,269	0,272
	Резь в глазах, слезотечение	-	1 чел. / 11%	1,719	0,203
	Боли в пояснице	11 чел. / 73%	7 чел. / 78%	0,313	0,582
	Снижение суточного количества мочи	5 чел. / 33,3%	4 чел. / 44%	0,098	0,757
Результаты объективного исследования	Лихорадка (38°С и выше)	15 чел. / 100%	9 чел. / 100%	-	-
	Гиперемия лица	15 чел. / 100%	9 чел. / 100%	-	-
	Пастозность лица	5 чел. / 33,3%	4 чел. / 44%	0,275	0,605
	Инъекция сосудов склер	13 чел. / 86,7%	8 чел. / 89%	0,023	0,880
	Кровоизлияния в склеру (симптом)	-	2 чел. / 22%	3,929	0,060
	Кровоизлияния в кожу (экхимозы)	1 чел. / 6,7%	3 чел. / 33%	0,010	0,920
	Симптом Пастернацкого	7 чел. / 47%	7 чел. / 78%	2,265	0,147
	Жесткое дыхание	12 чел. / 80%	6 чел. / 66,7%	0,500	0,487

Примечание: n – число пациентов в группе, F – критерий Фишера дисперсии данных, p – вероятность гетерогенности групп исследования, достоверность межгрупповых различий: \* – умеренная, \*\* – высокая, \*\*\* – очень высокая.

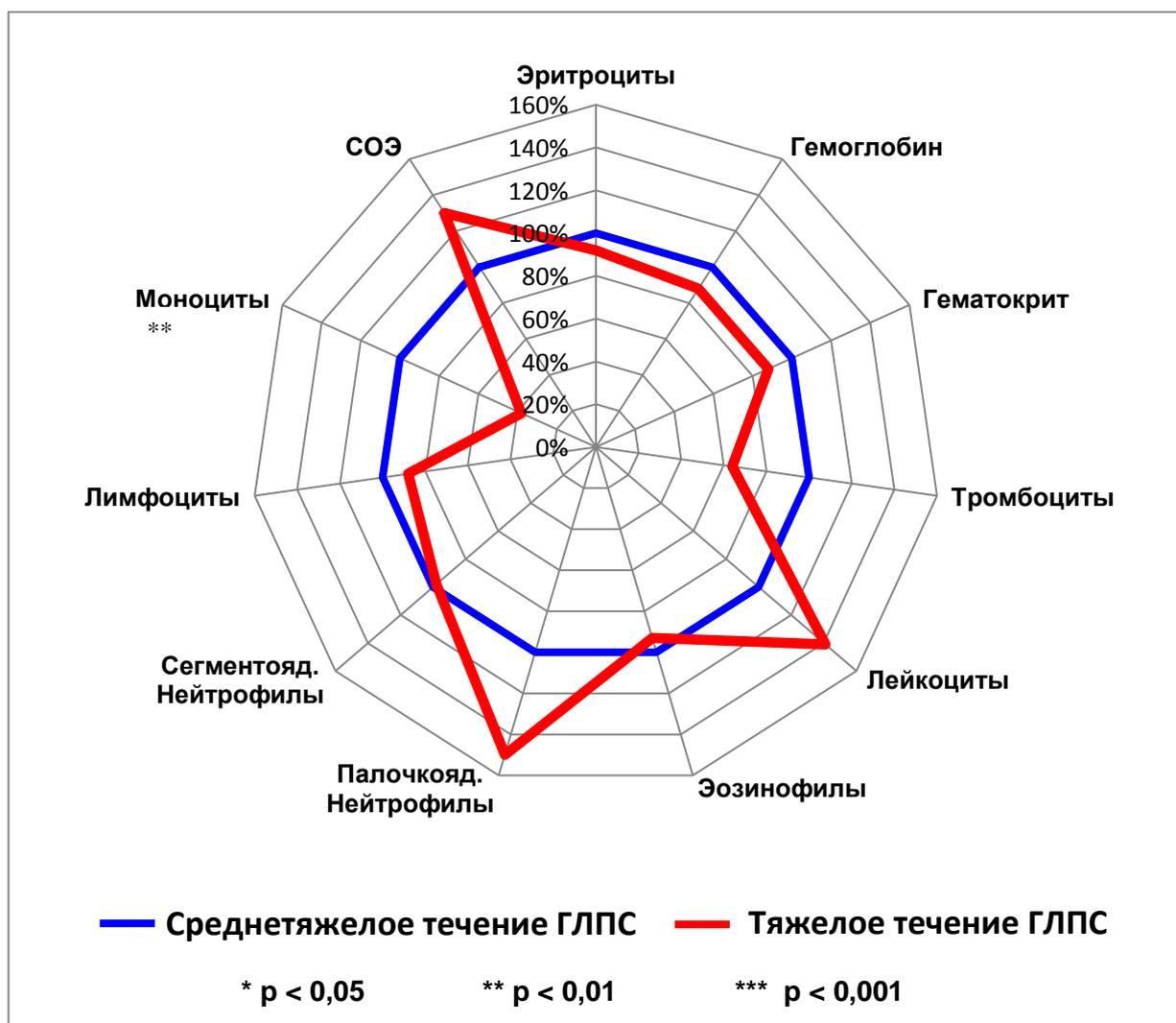
Как следует из таблицы 9, различия между клиническими показателями при ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения минимальны. К ним относятся всего 2 признака (головная боль и кашель), которые, несмотря на различия, регистрируются в обеих группах сравнения. По этой причине клинические признаки, в целом, вряд ли можно оценивать как прогностически значимые, их следует считать вспомогательными.

Результаты статистического анализа результатов определения клинического анализа крови с учетом тяжести течения ГЛПС в начальном периоде заболевания представлены в *таблице 10* и на *рисунке 26*, при этом на рисунке показаны проценты отклонения показателей при тяжелом течении от показателей при среднетяжелом течении.

**Таблица 10 – Показатели клинического анализа крови у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период заболевания**

Лабораторные показатели	Медиана (минимум; максимум)		Критерий Манна-Уитни
	ГЛПС средней тяжести, n = 15	ГЛПС тяжелого течения, n = 9	p
Эритроциты (10 <sup>12</sup> клеток/л)	5,0 (4,0; 6,2)	4,7 (3,8; 5,2)	0,066
Гемоглобин (г/л)	150,5 (111; 172)	135,5 (84; 147)	0,052
Гематокрит (%)	44,2 (31; 65)	41,0 (30,5; 60)	0,161
Тромбоциты (10 <sup>9</sup> клеток/л)	64 (31; 168)	59 (37; 79)	0,610
Лейкоциты (10 <sup>6</sup> клеток/л)	10,7 (2,5; 35,7)	13,0 (7,5; 19,4)	0,129
Эозинофилы (%)	1 (0; 6)	0 (0; 3)	0,702
Палочкоядерные нейтрофилы (%)	6,0 (0; 22,0)	8,0 (1; 19)	0,174
Сегментоядерные нейтрофилы (%)	59,0 (37; 72,8)	60,5 (39; 74,5)	0,833
Лимфоциты (%)	17,5 (6,4; 39,1)	13 (6; 17,5)	0,108
Моноциты (%)	12,3 (6,7; 18,2)	8,2 (7,9; 9,2)	0,003**
СОЭ мм/час	12,4 (5; 40)	19 (9; 38)	0,567

*Примечание:* n - число исследований в группе, p - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения; статистическая значимость различий: \* при p < 0,05; \*\* при p < 0,01; \*\*\* при p < 0,001.

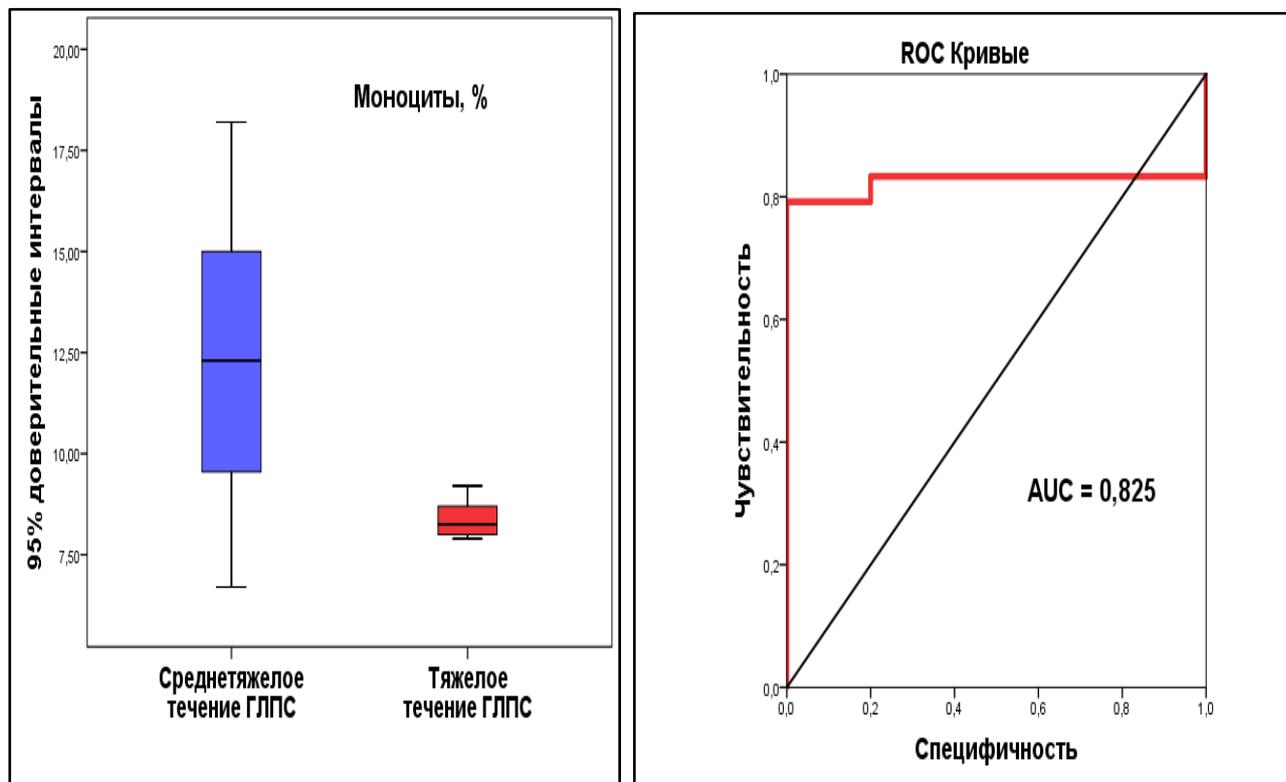


**Рисунок 26 – Проценты отклонения показателей гемограмм больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом тяжелого течения от показателей среднетяжелого течения в начальный период заболевания**

Из анализа показателей гемограмм у больных ГЛПС разной степени тяжести следует, что статистическая значимость различий в начальный период заболевания установлена только для одного показателя – процента моноцитов среди лейкоцитов крови, который был в 1,5 раза ниже при тяжелом течении заболевания. Тенденцию к более выраженному снижению проявляли также тромбоциты, а к повышению – лейкоциты, палочкоядерные нейтрофилы, СОЭ, но различия в этом случае не были статистически достоверными.

Далее такой информативный признак как более низкое процентное содержание моноцитов в крови тестировался на диагностическую значимость путем определения 95 %-ных доверительных интервалов показателя при

среднетяжелом и тяжелом течении ГЛПС, а также методом ROC-анализа (рисунок 27).



**Рисунок 27 – 95 % доверительные интервалы процентного содержания моноцитов в крови и ROC-кривая их диагностической значимости**

В предыдущей главе нами было отмечено, что развитие ГЛПС сопровождается статистически и диагностически значимым нарастанием процентного содержания моноцитов среди лейкоцитов крови в начальный период ГЛПС.

В данном разделе удалось установить, что отмеченное нарастание числа моноцитов в начальном периоде происходило только при среднетяжелом течении заболевания, а в случае тяжелого течения ГЛПС процент моноцитов был статистически значимо ниже. При значениях относительного числа моноцитов менее 8,7 % это снижение может быть оценено как высоко диагностически значимое, поскольку площадь под ROC-кривой (AUC) составляла 0,825.

Результаты аналогичной оценки биохимических показателей в начальном периоде ГЛПС разной степени тяжести представлены в *таблице 11* и на *рисунке 28*.

**Таблица 11 – Показатели биохимического анализа крови у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период заболевания**

Лабораторные показатели	Медиана (минимум; максимум)		Критерий Манна-Уитни
	ГЛПС средней тяжести, n = 15	ГЛПС тяжелого течения, n = 9	p
1	2	3	4
Мочевина, ммоль/л	8,4 (4,4; 9,1)	14,7 (9,6; 17,2)	0,034*
Креатинин, мкмоль/л	113,8 (70,2; 471,1)	2043,0 (93,3; 391,3)	0,034*
Мочевая кислота, мкмоль/л	325,6 (268,0; 578,0)	313,8 (105,0; 668,0)	0,212
Общий белок, г/л	71,5 (45,6; 92,7)	55,7 (48,7; 91,5)	0,149
Альбумин, г/л	45,4 (25,5; 59,2)	36,0 (27,3; 45,4)	0,084
Общий билирубин, ммоль/л	10,3 (3,9; 18,2)	8,4 (3,1; 58,0)	0,664
Холестерин, ммоль/л	3,0 (1,9; 5,8)	3,4 (2,1; 11,6)	0,707
Амилаза, ЕД/л	45,5 (40,2; 101,4)	40,2 (31,7; 61,8)	0,237
Аланинаминотрансфераза (АЛТ), ЕД/л	65,0 (36,3; 93,8)	281,8 (108,4; 289,0)	0,049*
Аспаргатаминотрансфераза (АСТ), ЕД/л	47,3 (41,9; 52,7)	153,8 (113,2; 181,0)	0,049*
Щелочная фосфатаза, ЕД/л	60,9 (46,7; 71,8)	70,2 (34,6; 141,0)	0,361
γ-глутамилтранспептидаза (ГГТП), ЕД/л	39,0 (19,3; 104,3)	37,5 (5,9; 272,9)	0,707
Креатинфосфокиназа (КФК), ЕД/л	54,4 (29,6; 769,4)	66,7 (30,6; 363,8)	0,234
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ), ЕД/л	403,0 (329,3; 899,6)	416 (61,6; 1202,2)	0,593

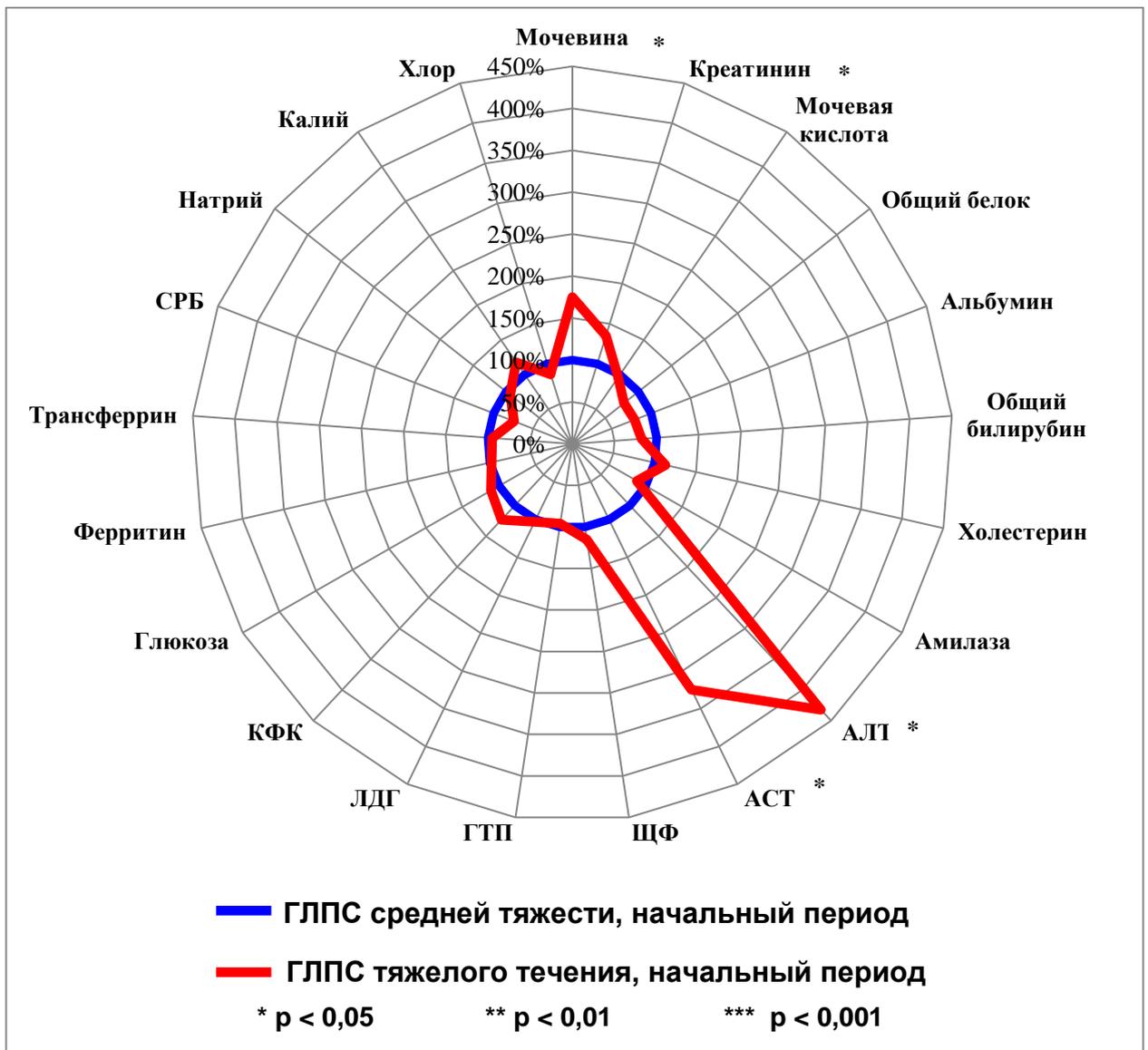
Продолжение таблицы 11

1	2	3	4
Глюкоза, г/л	6,5 (4,5; 8,2)	7,2 (4,0; 8,5)	0,689
Ферритин, мкг/л	859,7 (830,6; 1072,0)	841,8 (27,5; 1743,0)	0,734
Трансферрин, г/л	2,1 (1,8; 2,6)	2,0 (1,5; 3,7)	0,423
С-реактивный белок (СРБ), мг/л	22,8 (6,0; 89,2)	16,8 (0,5; 78,5)	0,449
Натрий, ммоль/л	138,4 (116,0; 147,0)	129,5 (114,9; 151,0)	0,733
Калий, ммоль/л	4,4 (3,1; 5,7)	5,2 (3,1; 14,1)	0,108
Хлор, ммоль/л	97,7 (71,0; 115,0)	84,9 (81,0; 114,0)	0,263

*Примечание:* n - число исследований в группе, p - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения; статистическая значимость различий: \* при  $p < 0,05$ ; \*\* при  $p < 0,01$ ; \*\*\* при  $p < 0,001$ .

Как следует из *таблицы 11* и *рисунка 28*, статистически значимые различия между биохимическими показателями при разной степени тяжести ГЛПС включали, как это обозначено и в критериях степени тяжести, более высокие значения содержания мочевины и креатинина в крови в случае тяжелого течения заболевания. При этом медианы значений этих показателей находились на уровне более низком, чем обозначено в критериях тяжелого течения ГЛПС, поскольку речь идет о начальном периоде заболевания.

Кроме этого, при тяжелом течении ГЛПС в начальный период у больных наблюдался рост активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаргатаминотрансферазы (АСТ) соответственно в 4,3 и 3,3 раза.

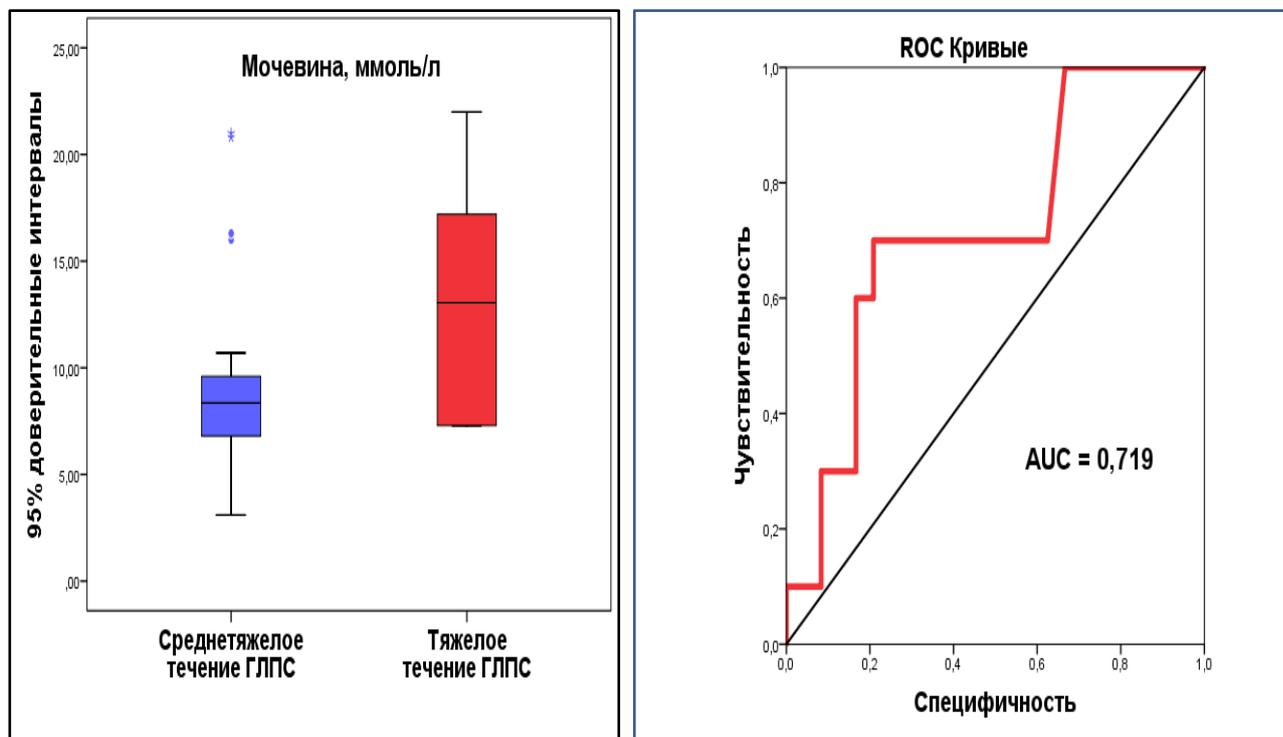


**Рисунок 28 – Проценты отклонения биохимических показателей у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом тяжелого течения от показателей среднетяжелого течения в начальный период заболевания**

Все отмеченные информативные показатели далее оценивались с точки зрения их диагностической значимости. С этой целью определялись 95 %-ные доверительные интервалы каждого показателя для среднетяжелого и тяжелого течения ГЛПС, а также выполнялся ROC-анализ.

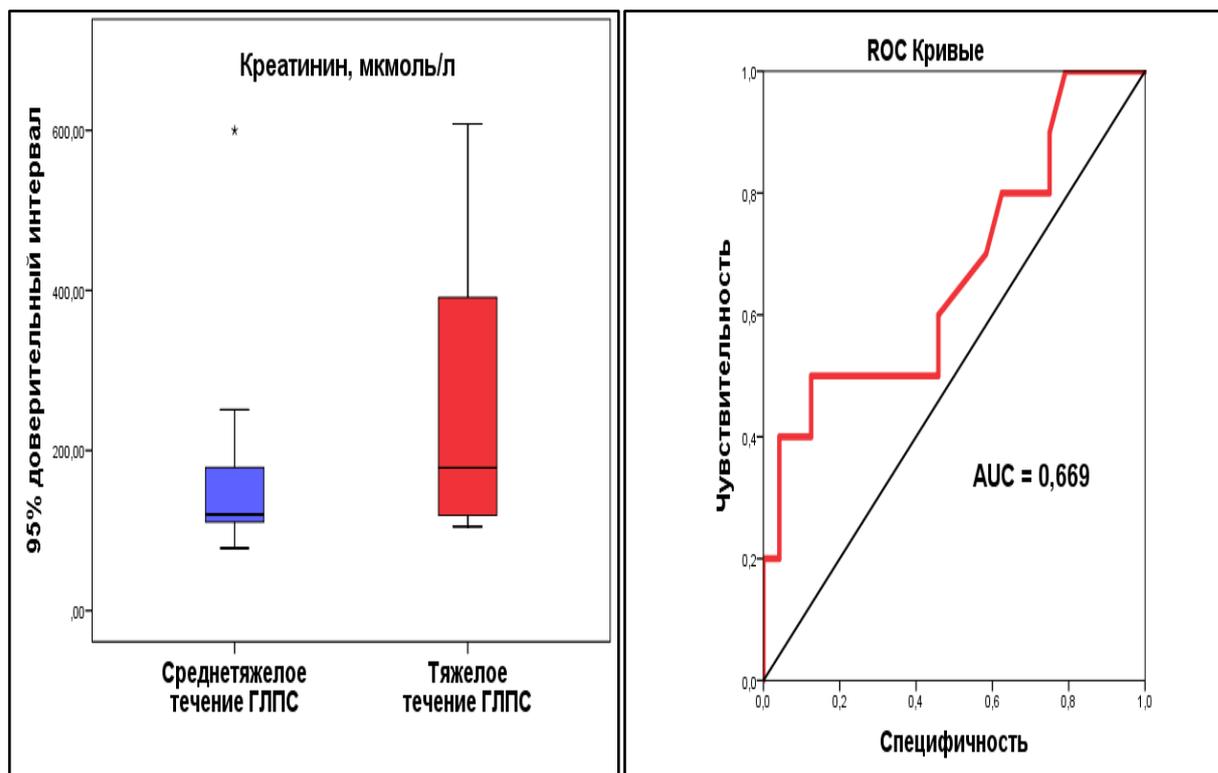
На *рисунке 29* представлены результаты такого исследования для уровня мочевины. В соответствии с критериями тяжелого течения ГЛПС у пациентов уровень этого анализа превышал 20 ммоль/л. В наших исследованиях прогноз ГЛПС становился реальным при значениях мочевины выше 11,5 ммоль/л, но в данном случае, как уже отмечалось, надо учитывать, что речь идет о периоде

заболевания, когда у некоторых пациентов пока отсутствовали клинические признаки тяжелого течения. Прогностическая значимость такого исследования была умеренной, поскольку  $AUC = 0,719$ .

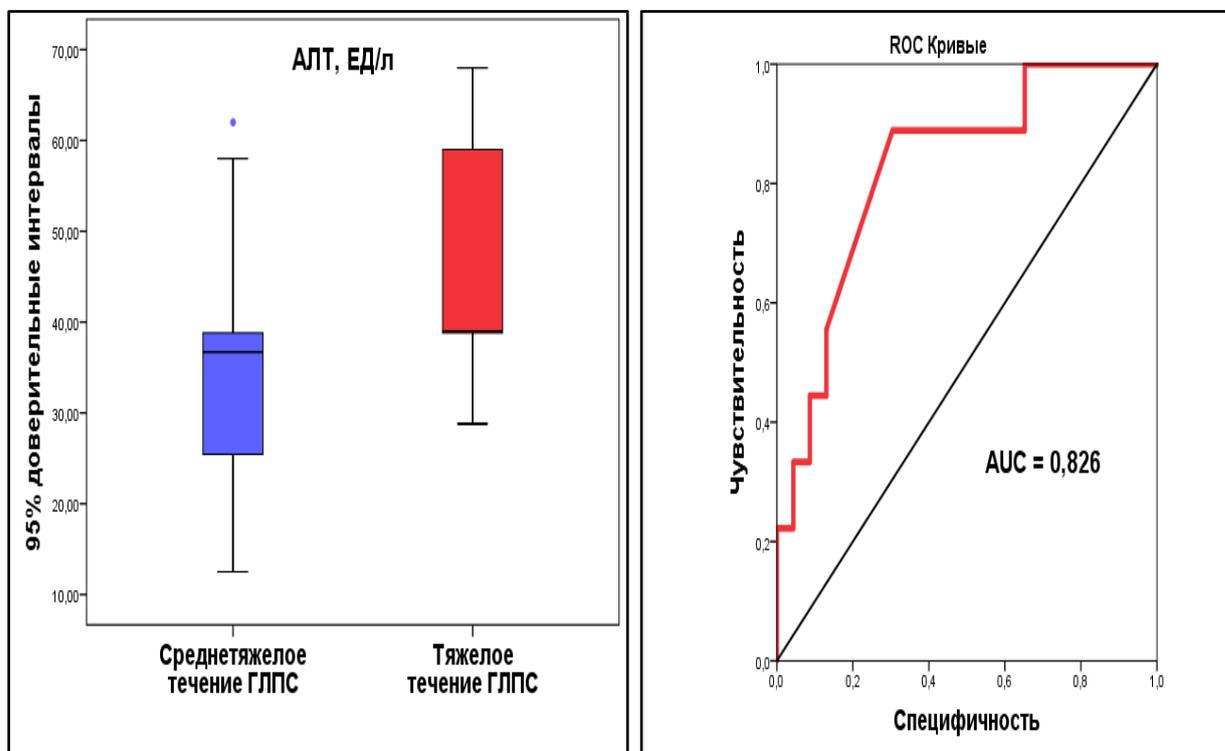


**Рисунок 29 – 95 % доверительные интервалы уровней мочевины в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период заболевания и ROC-кривая их диагностической значимости**

Еще один показатель нарушения почечных функций – уровень креатинина в крови. Результаты анализа его прогностической значимости представлены на *рисунке 30*. Как следует из рисунка, значения креатинина крови выше 190 мкмоль/л, судя по результатам определения 95 % доверительного интервала этого показателя, присущи, как правило, пациентам, у которых впоследствии развивается тяжелое течение геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Однако, построение ROC-кривой показало, что прогностическая значимость креатинина в данном случае была низкой, поскольку  $AUC = 0,669$ , то есть не превышала 0,7. Что касается активности ферментных систем крови (АЛТ и АСТ), то результаты анализа их прогностической значимости представлены на *рисунках 31-32*.

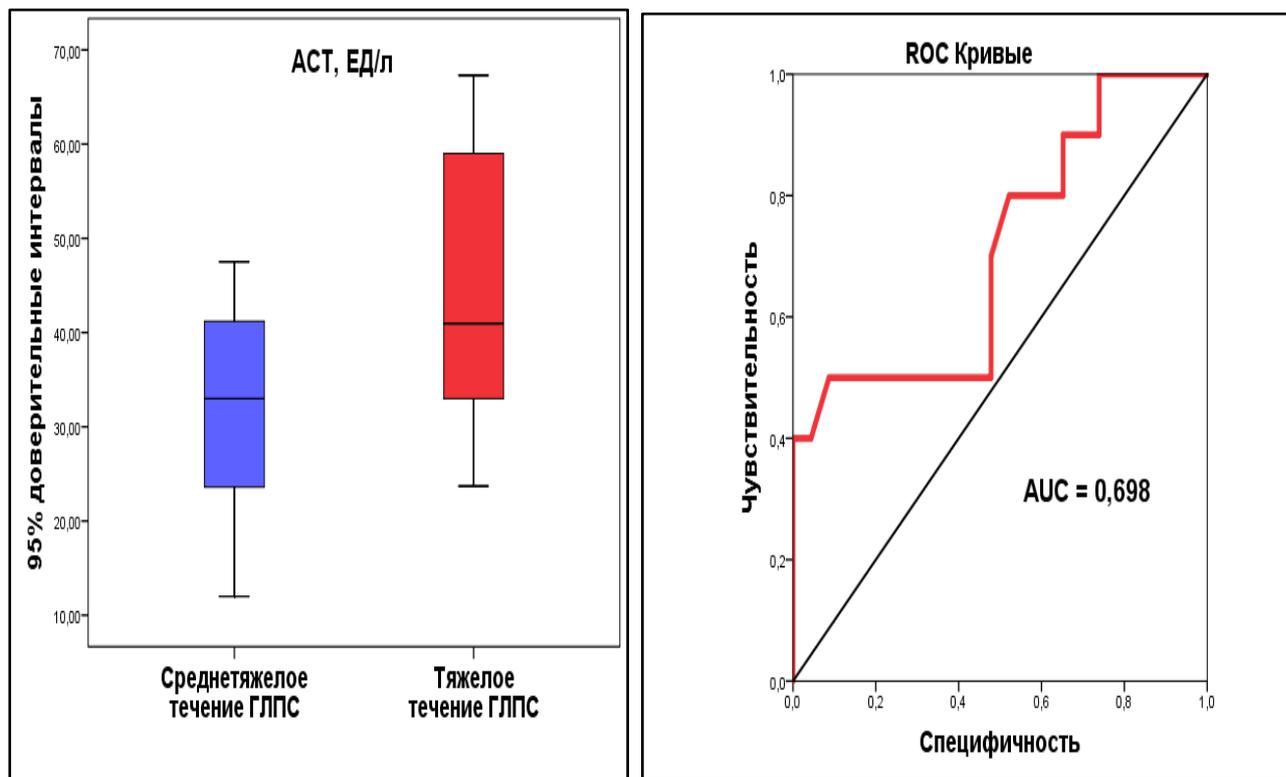


**Рисунок 30 – 95 % доверительные интервалы уровней креатинина в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период заболевания и ROC-кривая их диагностической значимости**



**Рисунок 31 – 95 % доверительные интервалы активности аланинаминотрансферазы в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период заболевания и ROC-кривая их диагностической значимости**

Как следует из *рисунка 31*, для аланинаминотрансферазы (АЛТ) при тяжелом течении ГЛПС зарегистрированы более высокие значения активности, которые превышают 40 ЕД/л. Прогностическая значимость этого теста была отмечена на высоком уровне, о чем свидетельствуют значения  $AUC = 0,826$ .



**Рисунок 32 – 95 % доверительные интервалы активности аспартатаминотрансферазы в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период заболевания и ROC-кривая их диагностической значимости**

Возрастание активности аспартатаминотрансферазы (АСТ) в крови не было столь значительным (*рисунок 32*). Критерием возможного развития тяжелого течения ГЛПС служили значения выше 49 ЕД/л, однако прогностическая значимость теста, выраженная величиной AUC, оказалась ниже 0,7 (0,698), то есть не позволяла использовать тест для прогноза тяжелого течения этого заболевания.

Таким образом, среди биохимических показателей прогностическим значением обладали только два параметра – уровень мочевины и активность АЛТ в крови.

Далее оценке с позиций прогностического значения для тяжелого течения ГЛПС подвергался клинический анализ мочи (*таблица 12*).

**Таблица 12 – Показатели клинического анализа мочи у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период заболевания**

Лабораторные показатели	Медиана (минимум; максимум)		Критерий Манна-Уитни p <sub>1</sub> p <sub>2</sub> p <sub>3</sub>
	ГЛПС средней тяжести, n = 15	ГЛПС тяжелого течения, n = 9	
Суточное количество мочи, мл	1050 (750;1050)	1000 (800; 1500)	0,236
Удельный вес мочи г/мл	1,02 (1,02; 1,02)	1,02 (1,0; 1,02)	0,617
pH мочи	5,5 (5,0; 6,5)	5,0 (1,0; 8,0)	0,273
Белок, г/л	0,38 (0; 1,5)	1,75 (1,5; 5,0)	0,048*
Лейкоциты, клеток/поле зрения	0 (0; 0)	50 (25; 100)	0,019*
Эритроциты свежие, клеток/поле зрения	0 (0; 25)	0 (0; 50)	0,468
Эритроциты выщелоченные, клеток/поле зрения	12,5 (0; 50)	50 (50; 50)	0,025*
Лейкоциты по Нечипоренко, *10 <sup>6</sup> клеток/л	1250 (250; 8750)	1750 (275; 9200)	0,108
Эритроциты по Нечипоренко, *10 <sup>6</sup> клеток/л	1500 (820; 1700)	2000 (500; 2350)	0,116

*Примечание:* n - число исследований в группе, p - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения; статистическая значимость различий: \* при p < 0,05; \*\* при p < 0,01; \*\*\* при p < 0,001.

Как видно из таблицы, показатели клинического анализа мочи позволяют выявить отдельные отличия, характерные для тяжелого течения ГЛПС в начальный период. На полуколичественном уровне – это более высокое содержание в моче белка, лейкоцитов и выщелоченных эритроцитов, что можно учитывать в клинической практике, но довольно трудно оценивать количественно со статистической точки зрения.

Таким образом, в процессе анализа клинико-лабораторных признаков ГЛПС, носящих рутинный характер, в начальный период заболевания (2-5-й дни болезни) удалось установить несколько суррогатных маркеров тяжелого течения ГЛПС, прогностическую значимость которых нам удалось доказать в ходе сравнения с показателями при среднетяжелом течении. Речь идет о 3-х признаках: снижение процента моноцитов среди лейкоцитов крови, рост уровня мочевины и активности аланинаминотрансферазы в крови.

#### **4.2 – Иммунологическая характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период**

Лимфоциты – основной предмет исследования в данной работе, и в данном фрагменте работы особое внимание будет уделено влиянию различных популяций и субпопуляций этих клеток в их фенотипическом выражении на развитие тяжелого течения у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в первые дни клинических проявлений заболевания, то есть в начальный период.

Результаты оценки этих показателей в начальный период ГЛПС в зависимости от степени тяжести заболевания представлены в *таблице 13* и на *рисунке 33*. Полученные результаты показывают, что с самого начала развития инфекционного процесса при ГЛПС соотношение основных субпопуляций Т-лимфоцитов (Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, регуляторных Т-клеток) с различными фенотипическими признаками в соответствии с тяжестью течения этого заболевания приобретает противоположную направленность.

В соответствии с данными *таблицы 13* при ГЛПС тяжелого течения в начальный период заболевания статистически достоверные отклонения показателей от аналогичных параметров при среднетяжелом течении включают Т-хелперы ( $CD3^+CD4^+$ ), цитотоксические Т-лимфоциты ( $CD3^+CD8^+$ ), в том числе CTL, экспрессирующие рецептор NKG2D ( $CD3^+CD8^+CD56^+CD314^+$ ),  $CD8^+$  регуляторные Т-клетки ( $CD3^+CD8^+CD25^+FoxP3^+$ ), NK ( $CD3^-CD56^+CD16^+$ ).

**Таблица 13 – Относительные и абсолютные показатели содержания в крови фенотипов лимфоцитов у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом тяжелого течения от показателей среднетяжелого течения в начальный период**

Лимфоциты крови и их фенотипические характеристики		Медиана (минимум; максимум)		Критерий Манна-Уитни
		ГЛПС средней тяжести n = 15	ГЛПС тяжелого течения n = 9	p
1		2	3	4
В-лимфоциты CD19 <sup>+</sup>	%	12,5 (9,0; 12,5)	9,0 (8,5; 15,7)	0,653
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,2 (0,11; 0,29)	0,14 (0,05; 0,19)	0,275
Т-лимфоциты CD3 <sup>+</sup>	%	62,0 (62,0; 73,7)	73,7 (62,0; 87,0)	0,346
	10 <sup>9</sup> клеток/л	1,2 (0,66; 1,25)	1,4 (0,66; 1,43)	0,376
Активированные Т-лимфоциты CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	%	5,9 (3,7; 18,7)	6,6 (5,4; 27,0)	0,275
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,14 (0,08; 0,17)	0,16 (0,09; 0,32)	0,513
Т-хелперы (Th) CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	%	33,0 (23,6; 35,0)	58,7 (46,0; 67,0)	0,046*
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,53 (0,32; 0,74)	0,78 (0,53; 0,80)	0,184
Цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	%	32,0 (25,9; 46,0)	12,6 (10,6; 17,8)	0,041*
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,58 (0,41; 0,74)	0,18 (0,11; 0,22)	0,022*
NKG2D <sup>+</sup> CTL CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD314 <sup>+</sup>	%	25,7 (13,6; 42,3)	11,9 (8,3; 24,3)	0,035*
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,38 (0,22; 0,64)	0,14 (0,14; 0,22)	0,042*

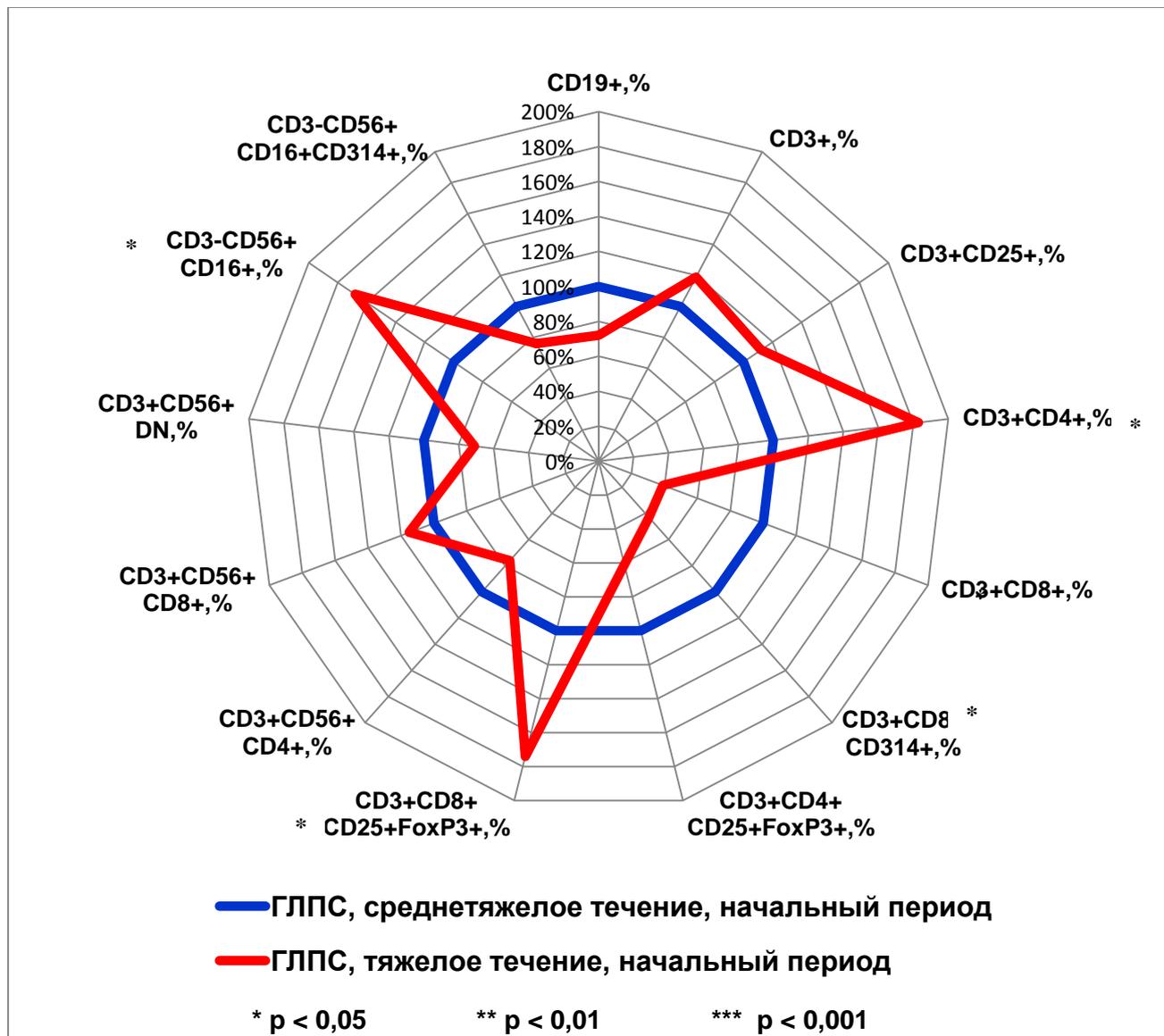
Продолжение таблицы 13

1		2	3	4
CD4 <sup>+</sup> регуляторные Т-клетки (Treg) CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	%	15,0 (6,8; 15,5)	9,2 (4,9; 9,5)	0,278
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,15 (0,14; 0,34)	0,11 (0,07; 0,11)	0,083
CD8 <sup>+</sup> регуляторные Т-клетки (Treg) CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	%	3,8 (2,5; 4,1)	10,4 (8,3; 12,5)	0,017*
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,06 (0,04; 0,09)	0,12 (0,11; 0,14)	0,024*
CD4 <sup>+</sup> NKT CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	%	0,21 (0,15; 0,27)	0,16 (0,13; 0,22)	0,278
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,02 (0,01; 0,05)	0,02 (0,01; 0,04)	0,812
CD8 <sup>+</sup> NKT CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	%	3,04 (2,01; 3,89)	3,5 (2,23; 4,11)	0,083
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,05 (0,02; 0,06)	0,07 (0,04; 0,09)	0,194
Дважды негативные (DN) NKT CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	%	0,41 (0,38; 0,69)	0,29 (0,25; 0,50)	0,246
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,05 (0,01; 0,05)	0,03 (0,01; 0,04)	0,117
Натуральные киллеры (НК) CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	%	13,0 (8,6; 19,4)	17,8 (7,7; 21,6)	0,027*
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,16 (0,16; 0,25)	0,20 (0,13; 0,26)	0,513
NKG2D <sup>+</sup> NK CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD314 <sup>+</sup>	%	3,4 (3,9; 12,7)	2,6 (1,8; 7,2)	0,181
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,05 (0,04; 0,19)	0,04 (0,02; 0,09)	0,124

*Примечание:* n - число исследований в группе, p - вероятность различий между группами ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения; статистическая значимость различий: \* при p < 0,05; \*\* при p < 0,01; \*\*\* при p < 0,001.

Необходимо также подчеркнуть, что, как отмечено и в главе 3, относительные величины показателей, как правило, оказывались более информативными (например, для Т-хелперов), чем абсолютные. В связи с этим, на

рисунке 33 и при дальнейшем статистическом анализе показателей фенотипического состава лимфоцитов нами будут использоваться только относительные величины.



**Рисунок 33 – Проценты отклонения содержания в крови лимфоцитов различных фенотипов у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом тяжелого течения от показателей среднетяжелого течения в начальный период**

Рисунок 33 позволяет наглядно оценить характер отклонения процентного содержания лимфоцитов различных фенотипов среди лейкоцитов крови при тяжелом течении от аналогичных параметров среднетяжелого течения заболевания. Так, помимо отмеченных выше статистически достоверных сдвигов показателей, можно обратить внимание на тенденцию к более низкому содержанию

в крови пациентов, у которых уже в начальный период или впоследствии развивается тяжелое течение ГЛПС, процента В-лимфоцитов ( $CD19^+$ ),  $CD4^+$  регуляторных Т-клеток ( $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ),  $NKG2D^+$  натуральных киллеров ( $CD3^-CD16^+CD56^+CD314^+$ ).

Тем не менее, основного внимания с точки зрения дальнейшей интерпретации данных заслуживают результаты с подтвержденной статистически информативностью.

Во-первых, при тяжелом течении ГЛПС меняется соотношение Th и CTL. Если при среднетяжелом течении заболевания процентное содержание этих клеток примерно соответствует друг другу, то при тяжелом течении процент медианы Т-хелперов в 4,7 раза превышает медиану CTL, то есть развитию тяжелого течения предшествует снижение доли клеточно-опосредованных реакций иммунного ответа, играющих весьма значительную роль в элиминации возбудителя семейства ортохантвирусов, мало представленных в кровотоке в свободном (внеклеточном) состоянии.

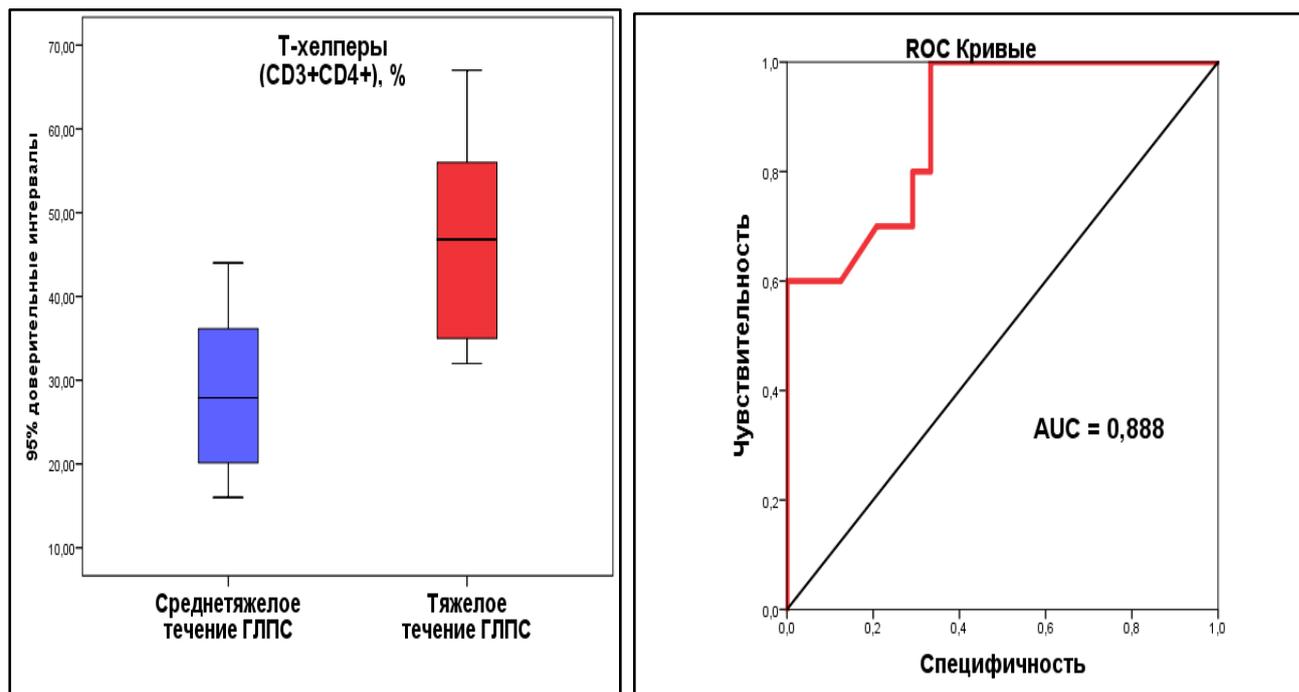
Кроме того, в случае среднетяжелого течения заболевания среди CTL на долю клеток, экспрессирующих  $NKG2D$ , приходилось около 80 %, в то время как при тяжелом течении доля  $NKG2D^+$  CTL поднималась до 94 %, что дает основание считать, что падение числа CTL при тяжелом течении ГЛПС происходило именно за счет клеток, экспрессирующих названный активирующий рецептор.

При этом следует обратить внимание на изменение еще одного соотношения. Как было отмечено, при тяжелом течении ГЛПС и общее число CTL, и число  $NKG2D^+$  CTL статистически достоверно падало (соответственно в 2,5 и в 2,2 раза по сравнению со среднетяжелым течением), параллельно с этим значимо (в 1,4 раза) увеличивалось содержание натуральных киллеров в крови.

В зависимости от тяжести течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом менялось и соотношение  $CD4^+$  и  $CD8^+$  регуляторных Т-клеток. При тяжелом течении заболевания число  $CD4^+$  Treg по сравнению со среднетяжелым снижалось в 1,6 раза, в то время как число  $CD8^+$  Treg возрастало в 2,7 раз. Этот эффект отмечен впервые и нуждается в дальнейшем в детальной интерпретации.

Чтобы оценить диагностическую значимость отмеченных информативных для тяжелого течения ГЛПС фенотипических признаков лимфоцитов, далее проводилось определение 95 %-ных доверительных интервалов показателей при каждом варианте течения заболевания и осуществлялся их ROC-анализ.

На *рисунке 34* показаны результаты определения диагностической значимости нарастания числа Т-хелперов в крови пациентов с тяжелым течением ГЛПС.



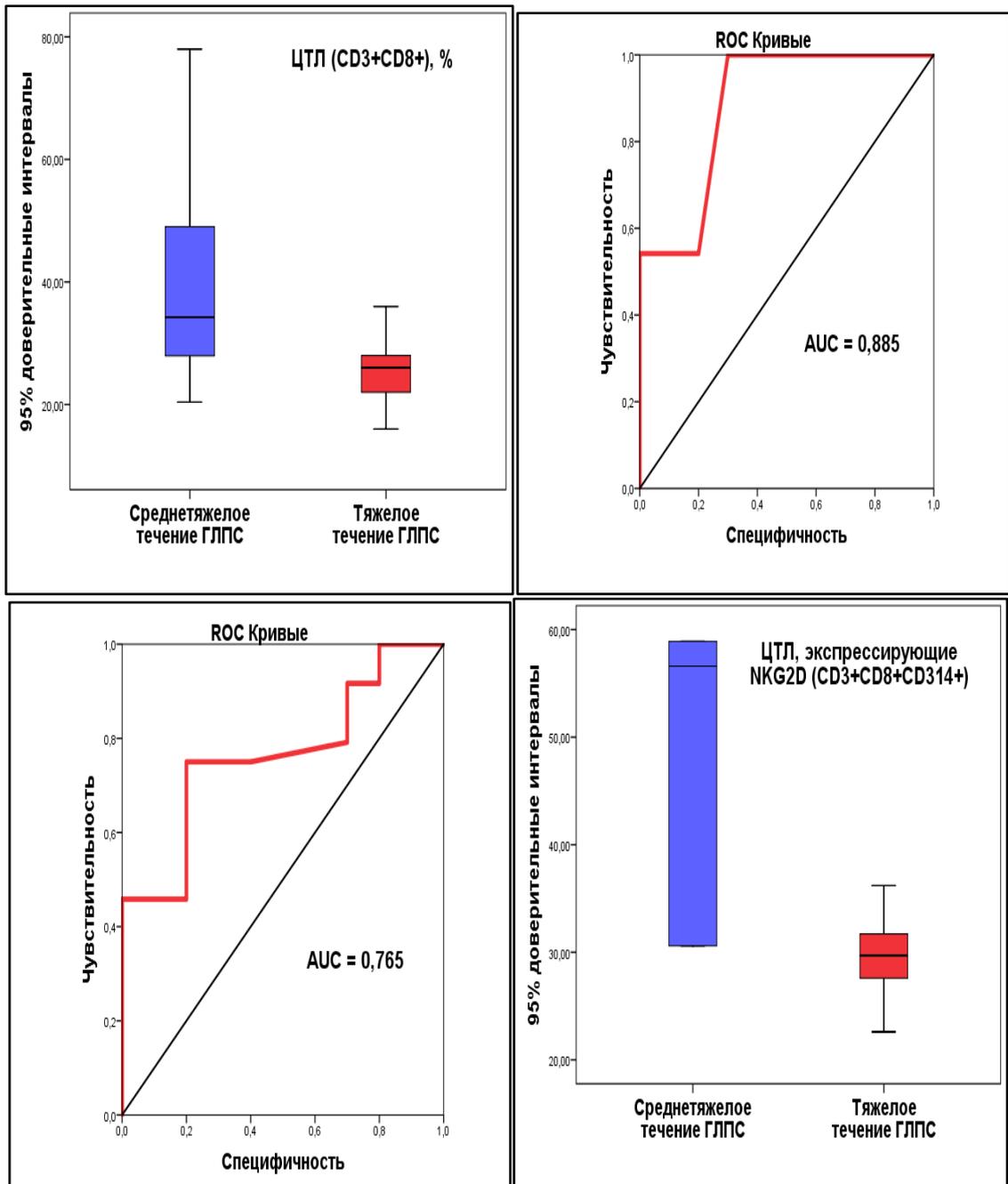
**Рисунок 34 – 95 % доверительные интервалы процента Т-хелперов среди лимфоцитов крови у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период и ROC-кривая их диагностической значимости**

Как следует из рисунка 34, при значениях выше 37 % относительное число Т-хелперов может трактоваться как риск развития тяжелого течения ГЛПС. Диагностическая значимость теста довольно высока, так как AUC при ROC-анализе составляла 0,888.

Очень важным фрагментом этой части исследования является определение диагностической значимости цитотоксических Т-лимфоцитов, в том числе экспрессирующих NKG2D.

На *рисунке 35* показана оценка  $CD3^+CD8^+$  CTL, доля которых среди лимфоцитов крови в начальный период ГЛПС при развитии риска тяжелого

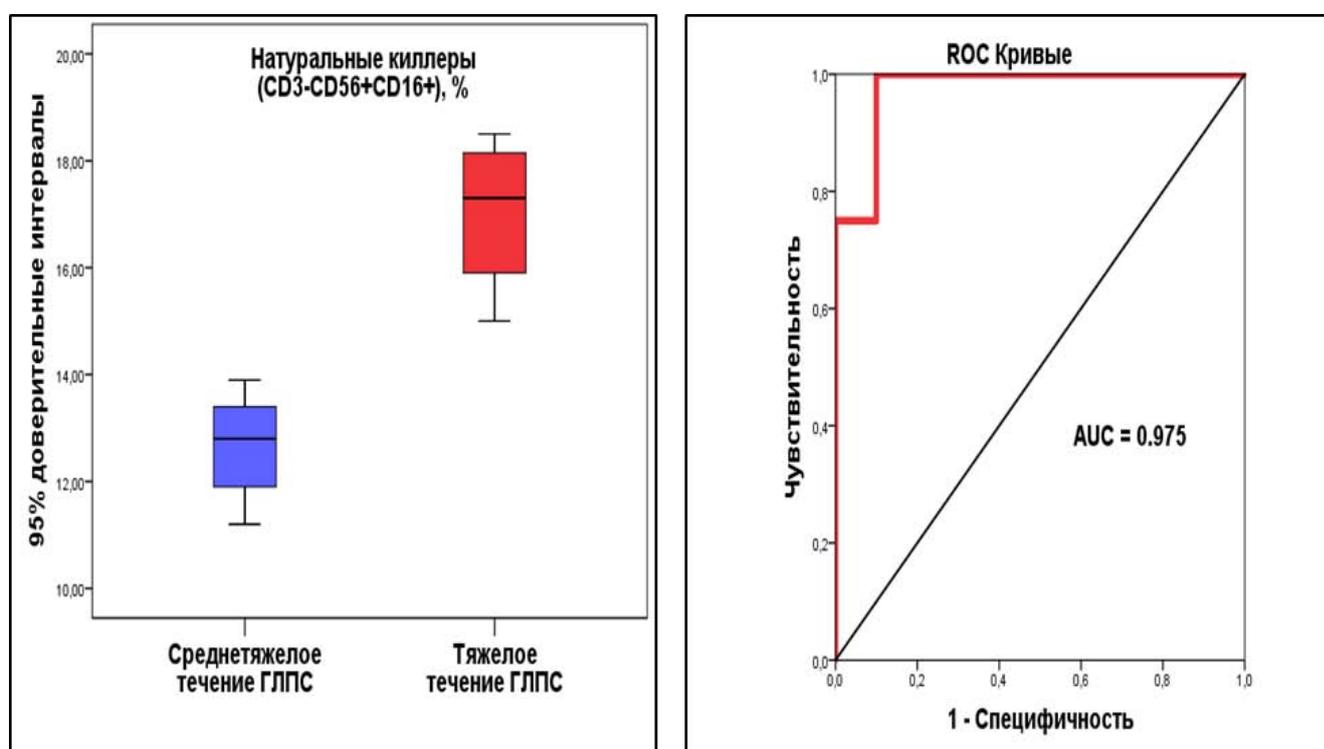
течения ГЛПС статистически значимо падала. Критериальной величиной такого падения служили, по данным определения 95 %-ного доверительного интервала, значения ниже 28 % при умеренной диагностической значимости ( $AUC = 0,765$ ).



**Рисунок 35 – 95 % доверительные интервалы процента цитотоксических лимфоцитов, в том числе  $NKG2D^+$ , среди лимфоцитов крови у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период заболевания и ROC-кривая их диагностической значимости**

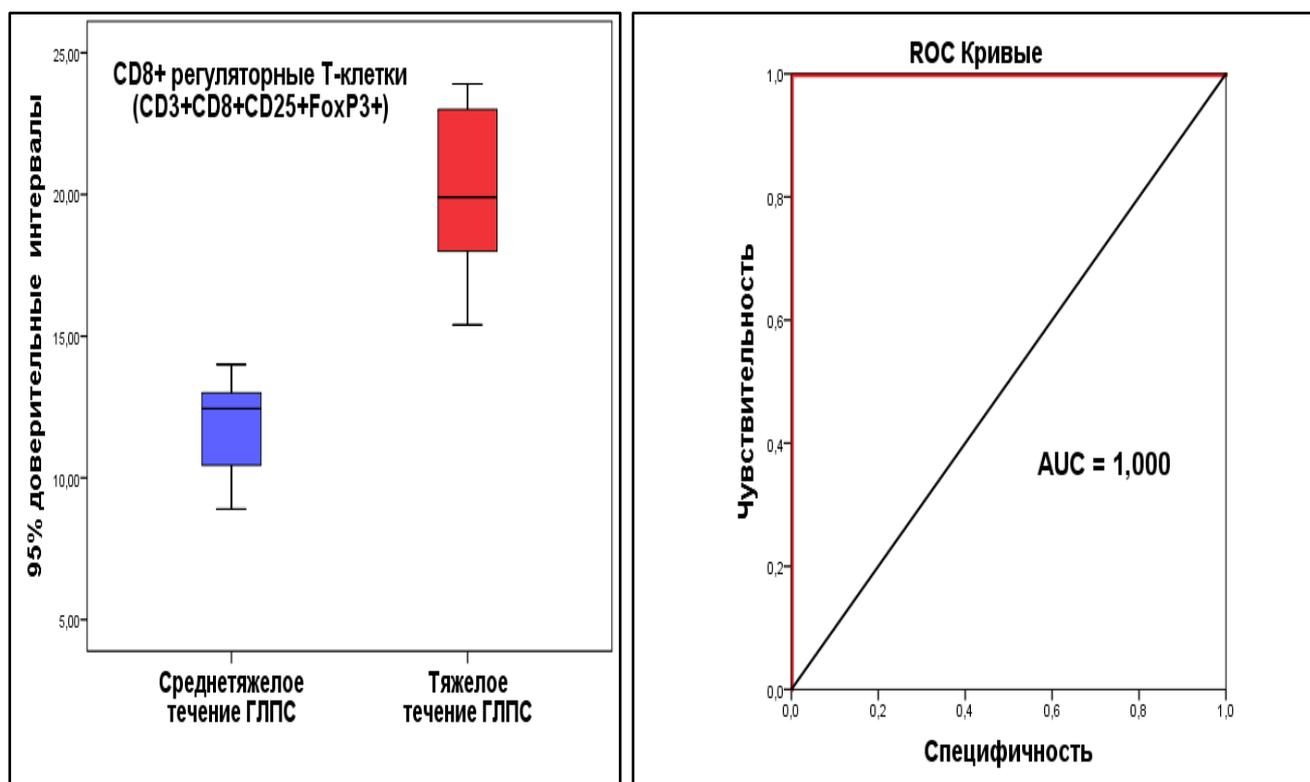
Что касается CTL, экспрессирующих NKG2D, риск тяжелого течения ГЛПС предполагался при значениях ниже 31 %, а диагностическая значимость теста возрастала до уровня высокой при  $AUC = 0,885$ .

Очень высокую диагностическую значимость ( $AUC = 0,975$ ) с точки зрения иммунологических особенностей тяжелого течения ГЛПС демонстрировал рост содержания в крови натуральных киллеров (рисунк 36). Значения НК выше 15,7 % в начальный период ГЛПС позволяют прогнозировать тяжелое течение заболевания.



**Рисунок 36 – 95 % доверительные интервалы процента натуральных киллеров среди лимфоцитов крови у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период заболевания и ROC-кривая их диагностической значимости**

На *рисунке 37* представлены результаты оценки значимости процента  $CD8^+$  регуляторных Т-клеток ( $CD3^+CD8^+CD25^+FoxP3^+$ ) среди лимфоцитов. Значения этого показателя выше 14% с максимальной диагностической значимостью ( $AUC = 1,0$ ) указывали на риск тяжелого течения ГЛПС.



**Рисунок 37 – 95 % доверительные интервалы процента CD8<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток среди лимфоцитов крови у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период заболевания и ROC-кривая их диагностической значимости**

Учитывая связь функциональных свойств лимфоцитов различных фенотипов с их способностью продуцировать и воспринимать в качестве сигнала различные цитокины, далее проводился анализ цитокинового профиля крови при ГЛПС разной степени тяжести в начальный период заболевания. Эти данные представлены в *таблице 14* и на *рисунке 38*.

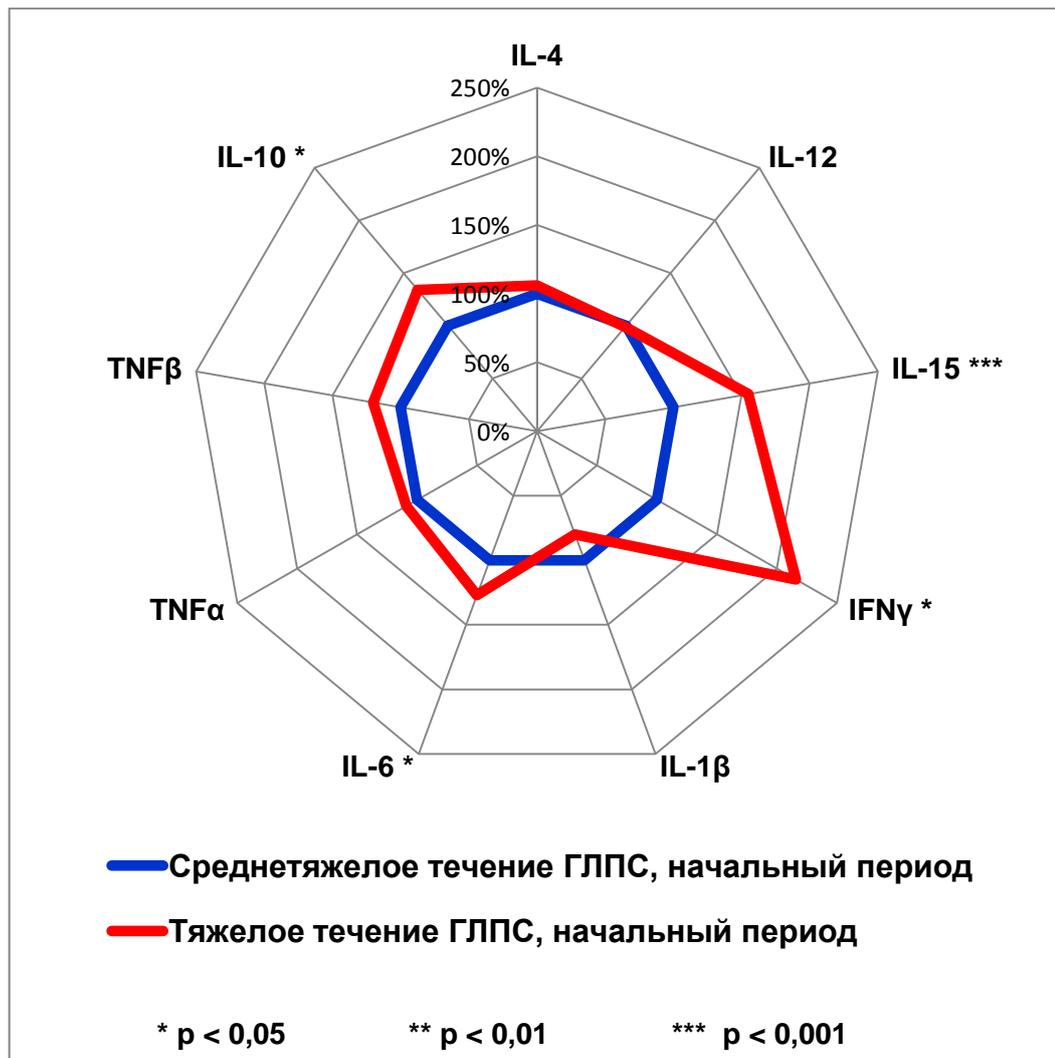
В главе 3 было показано, что в начальный период ГЛПС все без исключения анализируемые цитокины имеют статистически достоверные отклонения по содержанию в крови от показателей здоровых людей. В число статистически значимых различий в зависимости от тяжести течения входило содержание в крови 4-х основных цитокинов.

**Таблица 14 – Уровни цитокинов в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период заболевания**

Цитокины плазмы крови	Медиана (минимум; максимум)		Критерий Манна-Уитни
	ГЛПС средней тяжести, n = 15	ГЛПС тяжелого течения, n = 9	p
Интерлейкин-4 (IL-4), пг/мл	1,7 (1,5; 1,9)	1,8 (1,65; 1,85)	0,999
Интерлейкин-12 (IL-12), пг/мл	12,1 (11,7; 13,7)	12,0 (10,9; 12,9)	0,513
Интерлейкин-15 (IL-15), пг/мл	5,88 (4,92; 6,83)	9,10 (8,68; 9,63)	<0,001***
Интерферон $\gamma$ , (IFN $\gamma$ ), пг/мл	98,6 (79,9; 94,8)	212,6 (185,4; 302,1)	0,033*
Интерлейкин-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), пг/мл	2,86 (2,59; 3,42)	2,3 (2,4; 2,9)	0,513
Интерлейкин-6 (IL-6), пг/мл	12,4 (9,9; 15,8)	15,7 (9,0; 16,4)	0,024*
Фактор некроза опухолей $\alpha$ (TNF $\alpha$ ), пг/мл	7,6 (4,4; 8,9)	8,3 (5,7; 9,8)	0,487
Фактор некроза опухолей $\beta$ (TNF $\beta$ ), пг/мл	29,8 (22,1; 51,1)	35,8 (30,1; 52,3)	0,227
Интерлейкин-10 (IL-10), пг/мл	12,0 (11,2; 32,3)	16,1 (14,8; 40,5)	0,042*

*Примечание:* n - число исследований в группе, p<sub>1</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения; статистическая значимость различий: \* при p<0,05; \*\* при p<0,01; \*\*\* при p<0,001.

При тяжелом течении ГЛПС в крови отмечены более высокие уровни IL-15, IFN $\gamma$ , IL-6 и IL-10, как это наглядно показано на *рисунке 38*. При этом цитокины клеточно-опосредованного иммунного ответа, такие как IL-15 и IFN $\gamma$ , при тяжелом течении ГЛПС показывают наибольшую степень отклонения от среднетяжелого течения.



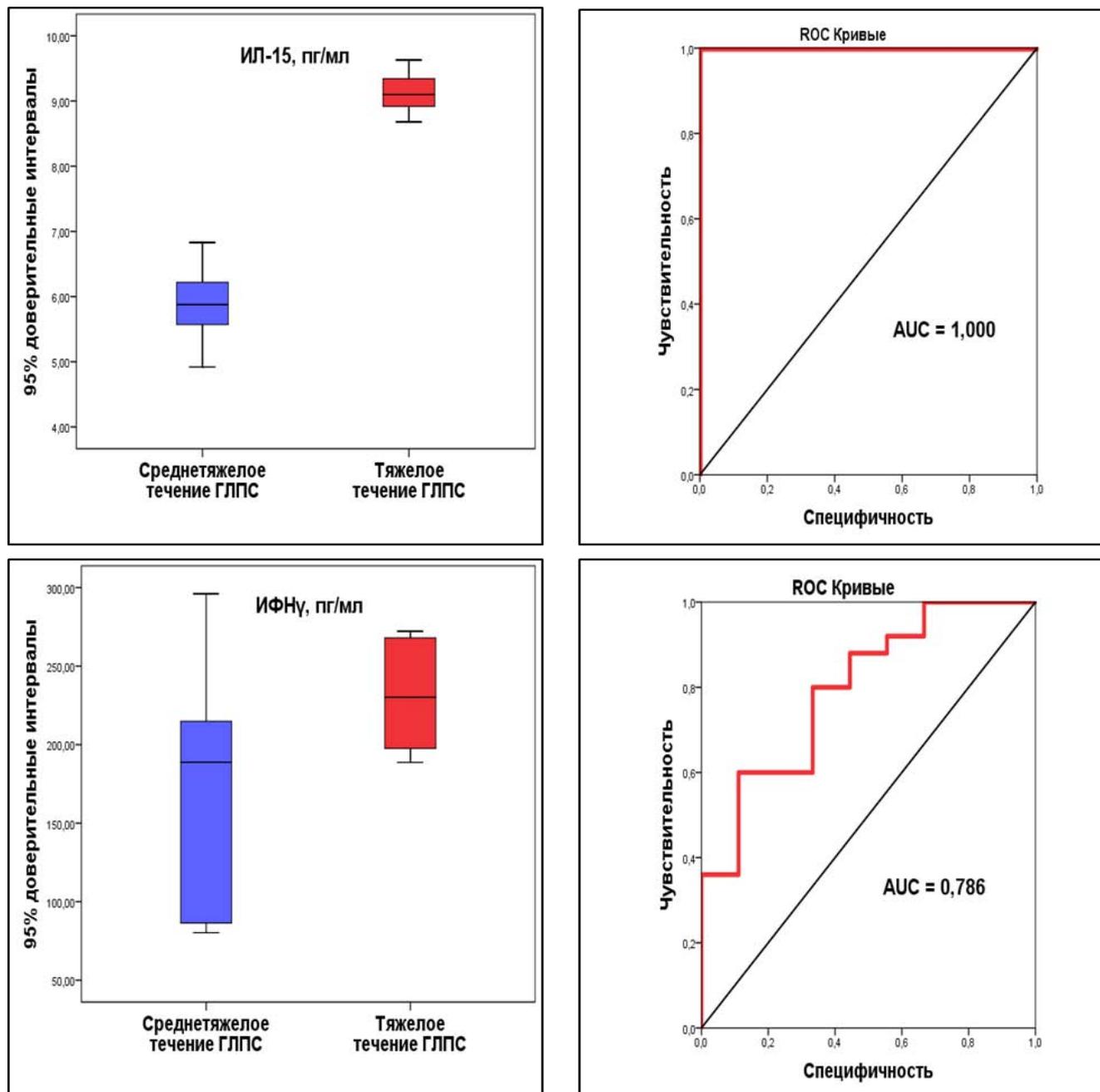
**Рисунок 38 – Проценты отклонения содержания в крови различных цитокинов у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом тяжелого течения от показателей среднетяжелого течения в начальный период заболевания**

Все 4 цитокина (IL-15, IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10) далее рассматривались с точки зрения их диагностической значимости на основе анализа 95 %-ных доверительных интервалов при ГЛПС разной тяжести в начальном периоде, а также путем построения ROC-кривых с последующим расчетом площади под ROC-кривой (AUC).

На *рисунке 39* представлены результаты такого исследования для цитокинов, связанных с развитием клеточно-опосредованного иммунного ответа – IL-15 и IFN $\gamma$ .

Содержание IL-15 в крови пациентов с ГЛПС тяжелого течения с самого начала заболевания было выше, чем при среднетяжелом течении. Более того,

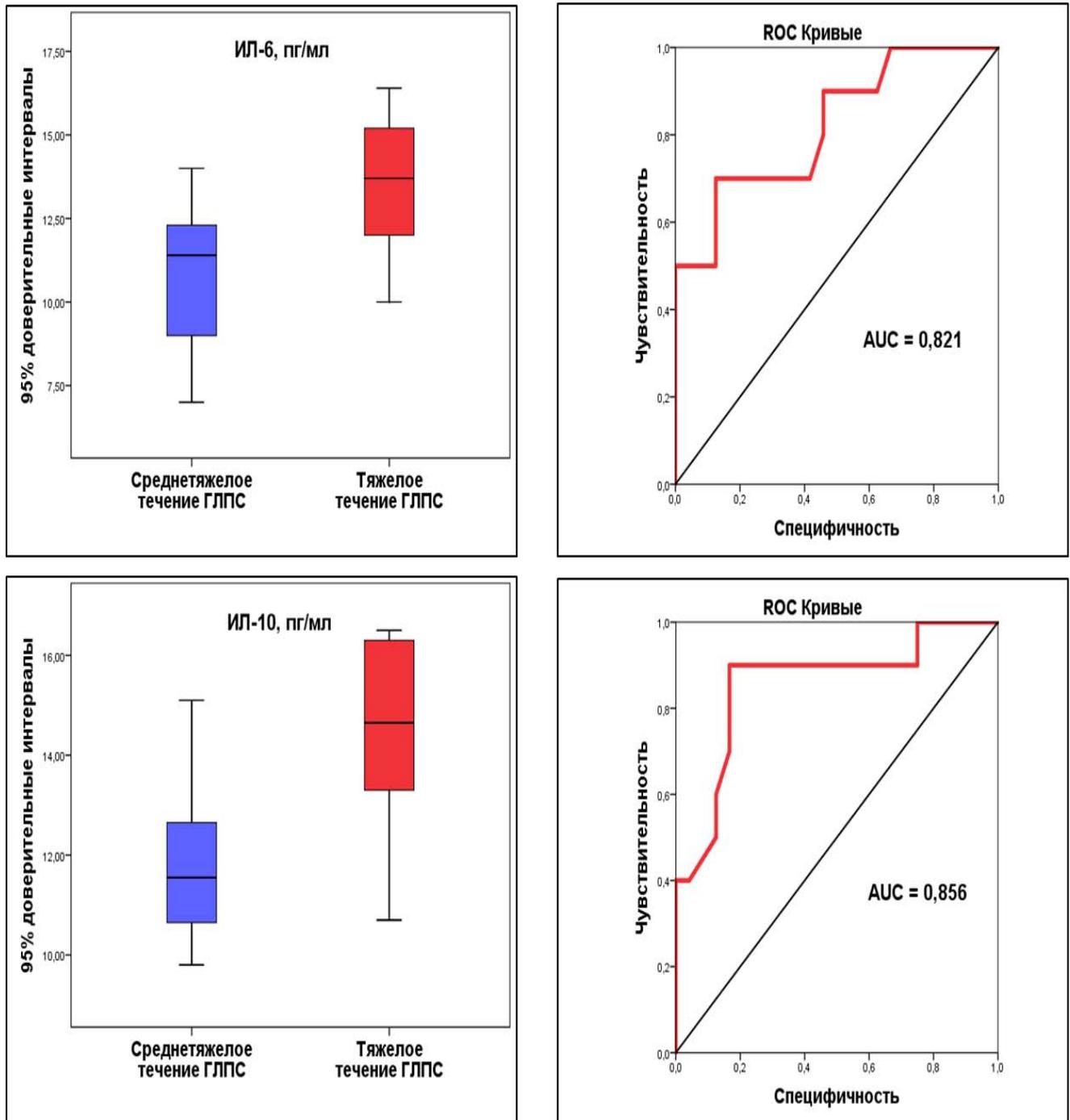
диагностическая значимость этого возрастания уровня ИЛ-15 выше 7 пг/мл была максимальной, поскольку  $AUC = 1,0$ .



**Рисунок 39 – 95 % доверительные интервалы содержания интерлейкина-15 и интерферонау в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период заболевания и ROC-кривая их диагностической значимости**

Высокий уровень в начальном периоде при тяжелом течении ГЛПС наблюдался и со стороны IFN $\gamma$ . При значениях этого цитокина выше 218 пг/мл у

пациентов с ГЛПС можно с умеренной диагностической значимостью ( $AUC = 0,786$ ) предполагать риск развития тяжелого течения.



**Рисунок 40 – 95 % доверительные интервалы содержания интерлейкина-6 и интерлейкина-10 в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в начальный период заболевания и ROC-кривая их диагностической значимости**

На *рисунке 40* представлены результаты оценки диагностической значимости более высоких значений для цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-10 в крови у пациентов с тяжелым течением ГЛПС в начальном периоде.

IL-6 при значениях выше 12 пг/мл и IL-10 при значениях выше 12,8 пг/мл в первые дни заболевания с высокой диагностической значимостью (AUC равна соответственно 0,821 и 0,856) дают основание предполагать риск тяжелого течения ГЛПС.

Таким образом, на основании полученных данных в число лабораторных и иммунологических признаков риска развития тяжелого течения у пациентов с ГЛПС, которые в начальный период заболевания обладают высокой диагностической значимостью, следует включить:

- % моноцитов среди лейкоцитов;
- активность аланинаминотрансферазы (АЛТ);
- уровень мочевины;
- относительное число Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>);
- относительное число цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>);
- относительное число цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих активирующие NKG2D<sup>+</sup> рецепторы (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD314<sup>+</sup>);
- относительное число регуляторных Т-клеток, экспрессирующих молекулы CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>);
- уровень интерлейкина-15;
- уровень интерлейкина-6;
- уровень интерлейкина-10.

#### **4.3 – Интегральный подход к оценке лабораторно-иммунологических показателей в начальный период геморрагической лихорадки с почечным синдромом как способ определения риска тяжелого течения заболевания**

С точки зрения практической значимости проводимых исследований особое значение для клиницистов имела бы возможность прогнозировать тяжелое течение ГЛПС на ранних этапах заболевания, то есть в начальный период.

С этой целью все информативные показатели, способные по их диагностической значимости претендовать на роль количественных критериев риска тяжелого течения ГЛПС, были использованы в качестве независимых переменных для проведения регрессионного анализа, при осуществлении которого

зависимой переменной выступала тяжесть заболевания, а принципом отбора показателей – начальный период ГЛПС.

В результате такого анализа было получено уравнение логистической регрессии следующего вида:

$$\text{ПКТТ ГЛПС} = 2,015 + 0,516 * [\text{мочевина}] - 0,381 * [\text{CD8}^+ \text{Treg}] + 0,364 * [\text{NKG2D}^+ \text{CTL}] + 0,072 * [\text{АЛТ}], \quad (3)$$

где ПКТТ – прогностический критерий тяжелого течения ГЛПС,

\* – знак умножения,

мочевина – уровень мочевины в крови в ммоль/л,

$\text{CD8}^+ \text{Treg}$  – относительное число  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$  лимфоцитов в крови,

$\text{NKG2D}^+ \text{CTL}$  – относительное число  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD56}^-\text{CD314}^+$  лимфоцитов в крови,

АЛТ – активность аланинаминотрансферазы в крови в ЕД/л.

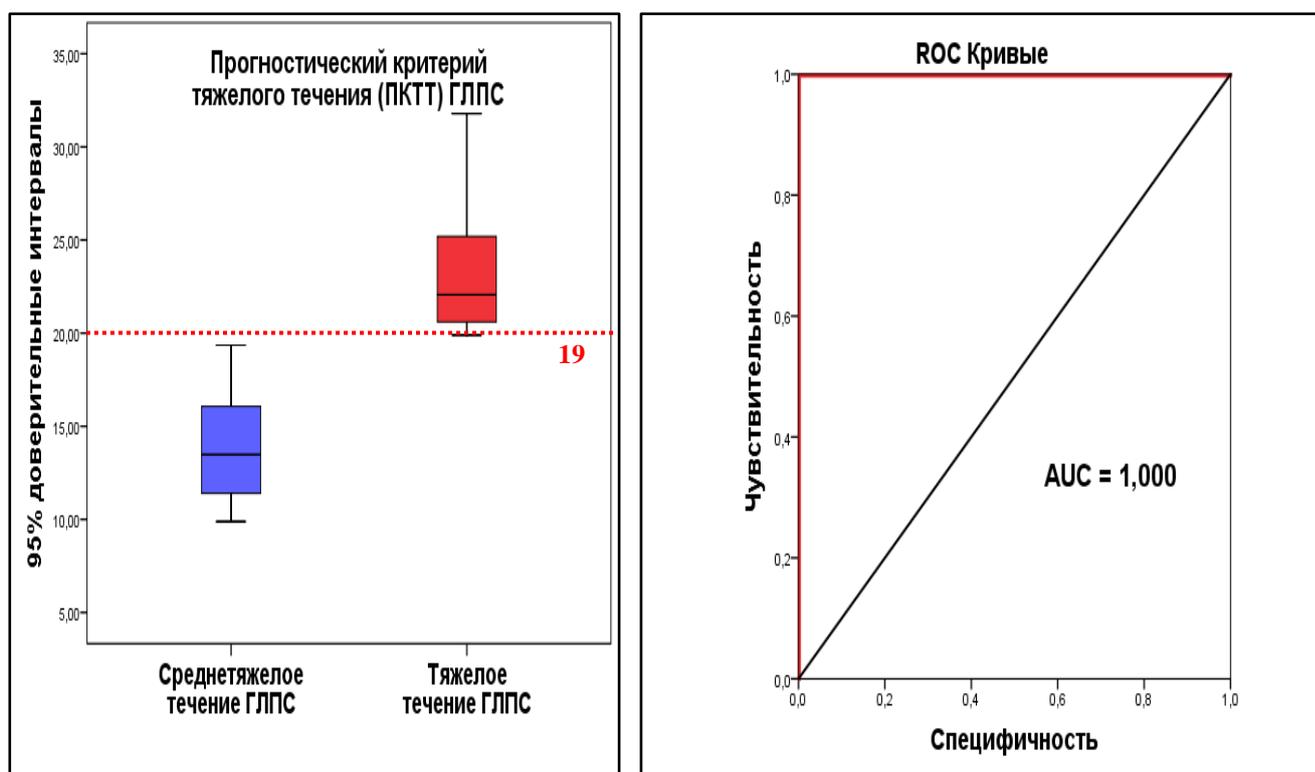
Как следует из полученной формулы, среди 10 использованных информативных параметров статистической программой было отобрано только 4 показателя, которые и вошли в состав уравнения регрессии для расчета прогностического критерия тяжести течения (ПКТТ) ГЛПС. Подставляя в уравнение числовые значения каждого показателя у конкретного больного в лихорадочный период заболевания (первые 2-5 суток от начала появления симптомов), получается числовое значение ПКТТ для данного больного.

Чтобы получить критериальные значения ПКТТ ГЛПС, при которых тяжелое течение заболевания становится наиболее вероятным, проводилось сравнение 95 %-ных доверительных интервалов этого коэффициента при среднетяжелом и тяжелом течении. Прогностическая значимость такого сравнения устанавливалась путем построения ROC-кривой, отражающей соотношение в форме линейной регрессии чувствительности и специфичности теста.

Количественным выражением прогностической значимости служила площадь под ROC-кривой (AUC), рассчитываемая самой статистической программой. Как и в других случаях ROC-анализа, при значениях  $\text{AUC} \leq 0,69$  тест

как прогностически значимый не рассматривается, при значениях AUC 0,7-0,79 прогностическая значимость считается умеренной, при величинах 0,8-0,89 – тест высоко значим, а выше 0,9 – его значимость очень высокая при максимальных значениях AUC = 1,0.

95 %-ные доверительные интервалы критерия ПКТТ ГЛПС при среднетяжелом и тяжелом течении заболевания с обозначением прогностического критерия и ROC-кривая прогностической значимости теста представлены на *рисунке 41*.



**Рисунок 41 – 95 % доверительные интервалы прогностического критерия тяжелого течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом и ROC-кривая прогностической значимости этого коэффициента у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в лихорадочный период**

Как следует из графика, разграничительная величина для 95 % доверительных интервалов ПКТТ у больных со среднетяжелым и тяжелым течением геморрагической лихорадки с почечным синдромом составляет 19 единиц.

Иными словами, при ПКТТ ГЛПС выше/равно 19 у больного можно констатировать риск тяжелого течения заболевания. Прогностическая значимость ПКТТ ГЛПС очень велика, поскольку при построении ROC-кривой AUC составляет 1,0, то есть соответствует максимальному значению площади под ROC-кривой.

Таким образом, с точки зрения прогноза тяжелого течения ГЛПС статистически значимыми оказались только 4 показателя из категории биохимических и иммунологических признаков, которые вошли в состав уравнения логистической регрессии, что позволило получить критерий, который в определенном числовом диапазоне позволял с высокой прогностической точностью определять риск развития тяжелого течения заболевания.

Для более удобного применения на практике, полученное уравнение логической регрессии для определения прогностического критерия тяжести течения ГЛПС, было реализовано в виде компьютерной программы «Калькулятор ранней лабораторной диагностики и прогнозирования тяжелого течения ГЛПС» (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023662769).

Для работы с программой нужно ввести четыре клинико-лабораторных и иммунологических показателя, определенных в начальном периоде заболевания. Результат выдается программой в числовом выражении и в виде оценки вероятности риска развития тяжелого течения заболевания.

Апробация способа прогнозирования тяжести течения ГЛПС с использованием соответствующей компьютерной программы проводилась в 2022 году на первой неделе заболевания у 25 больных, проходивших стационарное лечение в инфекционном отделении № 1 Клиники ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России по поводу геморрагической лихорадки с почечным синдромом. В спектр лабораторных исследований крови этих больных входило обязательное определение в крови активности АЛТ, процента моноцитов среди лейкоцитов, CD314<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов, CD8<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток. Это позволило сделать расчет прогностического критерия тяжелого течения ГЛПС.

У 21 пациента из 25 величина ПКТТ ГЛПС оказалась ниже 19 (в диапазоне от 9,7 до 17,6) и заболевание впоследствии имело среднетяжелое течение. У 4-х пациентов величина прогностического критерия в первые 5 дней заболевания составляла от 19,9 до 35,5 – у всех клинически было подтверждено, что ГЛПС принимала тяжелое течение.

Практическое использование уравнения логической регрессии для определения прогностического критерия тяжести течения ГЛПС, можно показать на следующих клинических примерах.

**Пример 3.** Больная И., 47 лет, в 2019 г. находилась на стационарном лечении в инфекционном отделении № 1 Клиники ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России с диагнозом: «Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом».

Дополнительно к рекомендованному стандартом обследованию, при поступлении (4-е сутки болезни) были исследованы отдельные показатели лимфоцитов крови, получены следующие результаты: АЛТ – 46,8 ЕД/л, мочевины – 10,2 ммоль/л,  $CD3^+CD8^+CD56^-CD314^+$  - 29,8%,  $CD3^+CD8^+CD254^+FoxP3^+$  - 4,3% для расчета ПКТТ.

В результате включения данных пациентки И. в уравнение логической регрессии для вычисления ПКТТ, результат составил 19,86, что свидетельствует о высокой вероятности развития у больной тяжелой формы течения ГЛПС. В дальнейшем данный диагноз и прогноз был подтвержден.

**Пример 4.** Больной Л., 36 лет, в 2019 г. находился на стационарном лечении в инфекционном отделении № 1 Клиники ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России с диагнозом: «Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом».

Дополнительно к рекомендованному стандартом обследованию, при поступлении (5-е сутки болезни) были исследованы отдельные показатели лимфоцитов крови, получены следующие результаты: АЛТ – 12,5 ЕД/л, мочевины – 9,9 ммоль/л,  $CD3^+CD8^+CD56^-CD314^+$  - 26,2%,  $CD3^+CD8^+CD25^+FoxP3^+$  - 5,6 % для расчёта ПКТТ.

В результате включения показателей пациента Л. в уравнение логической регрессии для вычисления ПКТТ, результат составил 15,43, что говорит о высокой

вероятности отсутствия риска развития тяжелой формы течения ГЛПС. В дальнейшем у данного пациента был серологически подтвержден диагноз ГЛПС, а клинически определена средняя степень тяжести течения.

#### **Обсуждение главы 4**

Несмотря на то, что в данном разделе исследования, главным образом, обсуждаются вопросы, связанные с прогнозированием риска тяжелого течения ГЛПС и даже разработан такой интегральный показатель как прогностический критерий тяжелого течения (ПКТТ), пока еще не получено достаточно сведений для обсуждения патогенеза неблагоприятного течения инфекционного процесса, которое будет осуществлено нами в последующих разделах. Интерпретация результатов данного фрагмента исследований будет проводиться больше с прикладной точки зрения.

Как сообщается в источниках литературы последних лет, тяжесть течения ГЛПС частично зависит от возбудителя заболевания. Так, ГЛПС, вызванная ортохантавирусами *Hantaan*, *Amur*, *Dobrava*, протекает более тяжело с уровнем смертности от 5 до 15%, тогда как ГЛПС, этиологически связанная с вирусами *Seul*, *Saarema* и исследуемым нами *Puumala*, протекает менее тяжело. При этом патогенез ГЛПС представляет собой сложный многофакторный процесс, включающий вклад иммунных реакций, дисфункции тромбоцитов и нарушения регуляции барьерных функций эндотелиальных клеток. Отмечено значение для тяжести заболевания генетической предрасположенности, связанной с типом HLA [69]. Указывается также на прогностическую важность таких факторов как более старший возраст, мужской пол, состояние гуморального иммунного ответа [182].

В одной из работ последних лет подчеркивается, что знания о патогенезе ГЛПС все еще ограничены, тем не менее, не вызывает сомнений, что иммунная дисфункция и патологические повреждения, вызванные нарушениями иммунной регуляции, играют жизненно важную роль в развитии заболевания, при том, что основной мишенью ортохантавирусов считается эндотелий [417].

*Puumala*-инфекция, исследуемая в данном случае, обычно связана с повышенной проницаемостью сосудов, острым повреждением почек и

тромбоцитопенией [87, 279]. Заболевание нередко требует лечения в отделении интенсивной терапии, включая заместительную почечную терапию на основе гемодиализа [279]. После ГЛПС, вызванной ортохантавирусом *Puumala*, было описано несколько долгосрочных нефрологических, сердечно-сосудистых и эндокринологических последствий [370].

Полученные в данном разделе работы данные позволяют высказать предположение об одном из клеточных иммунных механизмов развития более тяжелого течения ГЛПС. В предыдущей главе нами уже обсуждались неизвестные ранее ключевые механизмы иммунопатогенеза этого заболевания, среди которых наиболее дискуссионным является особенность активации цитотоксических Т-лимфоцитов с участием NKG2D лектинового рецептора, который может быть экспрессирован как CTL, так и NK. В современной литературе есть сведения, что у названных клеток механизм экспрессии этих рецепторов может носить конкурентный характер. Так, в одной из работ Chen T. et al. [98] показано, что при тяжелой апластической анемии NK-клетки способны подавлять эффекторную активность CD8<sup>+</sup> CTL механизмом, связанным с экспрессией на мембране NK рецептора NKG2D. Этому явлению сопутствовало падение пролиферативной активности CTL и их способности к продукции IFN $\gamma$ . С подобным принципом взаимодействия лимфоцитов врожденного (NK) и адаптивного (CTL) иммунитета мы столкнулись и в наших исследованиях. В начальный период ГЛПС нами было установлено, что при тяжелом течении инфекционного процесса отмечено снижение процента NKG2D<sup>+</sup> CTL, ассоциированное с ростом содержания в крови NK.

Заслуживает отдельного обсуждения и тот факт, что при тяжелом течении ГЛПС значительно изменяется соотношение CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток, а именно: по сравнению со среднетяжелым течением содержание CD4<sup>+</sup> Treg снижается в 1,6 раза, а CD8<sup>+</sup> Treg возрастает в 2,7 раза. С нашей точки зрения, этот феномен имеет прямое отношение к механизмам формирования иммунологической памяти, достаточной для надежной защиты организма от хронизации инфекционного процесса, повторного заболевания, развития ряда

осложнений, а одним из проявлений особенностей формирования иммунологической памяти при ГЛПС в наших исследованиях может служить, в частности, цитокиновое обеспечение этого феномена.

В механизмах формирования долговременной иммунологической памяти могут принимать участие как  $CD4^+$ , так и  $CD8^+$  регуляторные Т-клетки. Например, показано, что ИЛ-6 взаимодействует с ИЛ-1 $\beta$ , чтобы блокировать подавляющее действие Treg на  $CD4^+$  Т-клетки, при этом ИЛ-6 выполняет ключевую роль, способствуя участию регуляторных Т-клеток в формировании  $CD4^+$  Т-клеток памяти [284].

Как показывают наши исследования, уровень ИЛ-6 в крови при ГЛПС достоверно возрастает, особенно при тяжелом течении. В то же время не отмечено нарастания еще одного обязательного компонента цитокинового комплекса для описанного выше эффекта – ИЛ-1 $\beta$ , уровень которого при тяжелом течении ГЛПС, наоборот, даже имеет тенденцию к снижению. Иными словами, полученные в работе результаты не подтверждают вероятности активного формирования иммунологической памяти с участием  $CD4^+$  регуляторных Т-клеток, особенно при тяжелом течении заболевания.

При описании патогенетической и/или протективной роли  $CD4^+$  Т-клеток в механизмах иммунологической памяти в одной из работ последних лет Künzli & Masopust [211] подчеркивают, что  $CD4^+$  Т-клетки памяти, будучи расположенными по всему телу, не только защищают ткани от повторного заражения и рака, но также участвуют в механизмах аллергии, аутоиммунитета, отторжении трансплантата и хроническом воспалении, что негативно влияет на их протективный эффект. Определенную долю среди клеток памяти составляют  $CD4^+$  регуляторные Т-клетки. На модели гриппозной инфекции было показано, что Treg-клетки памяти сохраняются в легких, быстро размножаются при повторном инфицировании и мощно подавляют эффекторные  $CD4^+$  Т-клетки, смягчая повреждение тканей без отрицательного влияния на вирусный клиренс [88].

Экстраполируя эти данные на полученные нами результаты, можно предположить, что при тяжелом течении ГЛПС снижение содержания  $CD4^+$  Treg в

крови пациентов уменьшит протективную роль этих клеток и приведет к более выраженному повреждению тканей.

В отличие от CD4<sup>+</sup> Treg, особенности CD8<sup>+</sup> Treg изучены гораздо слабее. В недавно опубликованном обзоре Mishra S. et al. [274] приводятся данные, подтверждающие довольно оригинальную гипотезу относительно роли CD8<sup>+</sup> Treg, суть которой сводится к тому, что подмножество CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти проявляет мощную регуляторную активность посредством подавления или устранения активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В результате CD8<sup>+</sup> Treg являются важными регуляторами иммунной толерантности и предотвращают аутоиммунные реакции.

В связи с этим, следует подчеркнуть, существуют данные о том, что при ГЛПС, этиологически связанной с ортохантавирусом *Puumala*, в исходах заболевания нередко отмечаются различные аутоиммунные проявления [371]. С данной точки зрения, рост содержания CD8<sup>+</sup> Treg в крови, особенно при тяжелом течении ГЛПС, будет выполнять выраженную протективную функцию и может служить ее маркером.

Гораздо чаще в качестве маркеров тяжелого течения ГЛПС, вызванного ортохантавирусами *Puumala*, в источниках литературы указываются молекулярные факторы, причастные к развитию иммуновоспалительного ответа организма человека на подобное инфицирование [293].

В числе маркеров тяжелого течения ГЛПС, пожалуй, чаще всего называют уже упомянутый выше IL-6. Интерлейкин-6 представляет собой многофункциональный цитокин, участвующий в иммунных реакциях и воспалении. Он продуцируется различными типами клеток, такими как моноциты, макрофаги, лимфоциты, эндотелиальные клетки и фибробласты, и играет ключевую роль при переходе от врожденного к приобретенному иммунитету. IL-6 индуцирует выработку в печени белков острой фазы и усиливает воспалительную реакцию, активируя Т-клетки и способствуя пролиферации и дифференцировке В-клеток. Хотя IL-6 в основном рассматривается как провоспалительный цитокин с потенциально нежелательными эффектами, он также выполняет множество регенеративных или противовоспалительных функций благодаря стимулированию

синтеза противовоспалительных цитокинов и последующему ограничению воспаления [331]. Поскольку отличительной чертой ортохантавирусных инфекций является повышение капиллярной проницаемости, вызванное эндотелиальной дисфункцией, интересно, что именно ИЛ-6, как было показано, вызывает дисфункцию эндотелиального барьера через путь протеинкиназы С [108]. Констатируется также, что у пациентов, инфицированных именно вирусом *Puumala*, продукция ИЛ-6 увеличивается, а высокие уровни в плазме связаны с более тяжелым клиническим течением ГЛПС [204, 293]. Эти данные в полной мере подтверждают и наши исследования, хотя в предлагаемый нами ПКТТ как критерий для определения риска тяжелого течения ГЛПС этот показатель не вошел.

Еще один маркер иммуновоспалительной составляющей патогенеза ГЛПС, как и многих других инфекций, – С-реактивный белок (СРБ). СРБ является прототипом белка острой фазы ответа, вырабатываемого в печени при различных воспалительных и инфекционных состояниях, преимущественно в ответ на ИЛ-6. Основными функциями СРБ являются активация классического пути комплемента, индукция продукции цитокинов, а также усиление фагоцитоза, в связи с чем СРБ служит опсоином для инфекционных агентов и поврежденных клеток [378]. В конечном итоге, ингибируя альтернативные и терминальные пути комплемента, С-реактивный белок регулирует избыточное воспаление [244]. Повышение содержания СРБ при ГЛПС отмечено и в нашем исследовании, однако при тяжелом течении заболевания особенности сдвига со стороны этого анализата не отмечены. В источниках литературы также указывается, что СРБ широко используется в клинической практике для оценки тяжести заболевания при различных инфекциях, хотя признается, что его уровни в крови при разной степени тяжести заболеваний нередко перекрывают друг друга [360].

К числу маркеров тяжелого течения ГЛПС относится еще целый ряд растворимых факторов крови, которые не всегда можно отнести к числу прогностических критериев, но диагностическое значение которых при ГЛПС, вызванной ортохантавирусом *Puumala*, доказано. К этим факторам принадлежат:

- Пентраксин-3 (РТХ3), действующий как растворимый образраспознающий рецептор, участвующий во врожденной защите хозяина от определенных патогенов [105]. При PUUV-инфекции уровни РТХ3 в плазме повышаются во время острой фазы и ассоциируются с клинически тяжелым течением заболевания, особенно тяжелым острым повреждением почек (ОПП), тромбоцитопенией и длительной госпитализацией [204], благодаря его участию в перекрестной связи активации системы свертывания крови и комплемента [279].

- Индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), представляющая собой интерферон-индуцируемый фермент, играющий лимитирующую роль в катаболическом обмене незаменимой аминокислоты триптофана [272]. IDO-опосредованное истощение триптофана оказывает ингибирующее влияние на клеточный метаболизм, что сопровождается преимущественно иммуносупрессивным эффектом в отношении Т-клеток [271]. Кроме того, продукты деградации триптофана способствуют образованию и активности регуляторных Т-клеток [272], а высокие уровни IDO связаны с увеличением тяжести заболевания [276, 294].

- Циркулирующая внеклеточная ДНК плазмы (cf-ДНК), то есть фрагменты ДНК в плазме, которые высвобождаются из апоптотических или некротических клеток, хотя секреция живыми клетками также была предложена в качестве их источника [383]. Высокие уровни cf-ДНК, вероятно, отражают апоптоз, происходящий во время острой фазы *Puumala*-инфекции [292].

- Рецептор активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR), представляющий собой многофункциональный гликопротеин, активность которого повышается во время инфекции и воспаления и участвует во многих иммунных функциях [364]. Учитывая известные воздействия uPAR на подоциты почек и механизмы протеинурии, вполне вероятно, что он является не только биомаркером тяжести заболевания, но и играет важную роль в развитии протеинурии при *Puumala*-инфекции [296].

- Адипокины, регулирующие аппетит и энергетический обмен, представляющие собой биологически активные молекулы, которые впервые были обнаружены как секреторные продукты жировой ткани [251]. Один из адипокинов

– резистин – продуцируется преимущественно макрофагами [163]. При ГЛПС, вызванной вирусом *Puumala*, связь резистина с уровнем альбуминурии позволяет предположить, что уровень этого анализита в плазме не только зависит от почечного клиренса, но может играть определенную роль в патогенезе острого повреждения почек [253].

- UKL-40, также известный как хитиназа-3-подобный белок 1, представляющий собой гепарин- и хитин-связывающий воспалительный гликопротеин, секретируемый различными клетками, особенно активированными макрофагами и нейтрофилами, в различных тканях, характеризующихся воспалением. UKL-40 прогнозирует тяжесть ГЛПС, вызванного вирусом *Puumala*, с точки зрения воспаления и острого повреждения почек, но не тромбоцитопении [100, 101].

- Фактор транскрипции цитокина 2 типа (GATA-3), который является необходимым фактором транскрипции для генерации Т-клеток 2 типа и играет множество жизненно важных ролей в гомеостазе многих клеточных линий [159]. Помимо Т-клеток 2 типа, транскрипционный фактор GATA-3 экспрессируется клетками дистальных канальцев почек и клетками собирательных трубочек [287]. При ГЛПС уровень GATA-3 в осадке мочи связан со степенью острого повреждения почек и действует как независимый фактор риска тяжелого ОПП [227].

- HMGB1, или амфотерин, — белок из группы ядерных негистоновых белков HMGB. HMGB1 взаимодействует с ДНК ядра клетки и играет роль в воспалении, являясь его цитокиновым медиатором. HMGB1 секретируется активированными макрофагами и моноцитами, может высвобождаться при повреждении клеток и тканей. После высвобождения из клеток белок может связываться с рецептором TLR4, что приводит к секреции цитокинов макрофагами и последующей воспалительной реакции. При ГЛПС концентрация HMGB1 в сыворотке крови выше у пациентов с тяжелым течением заболевания по сравнению с легким течением, в связи с чем этот белок может быть полезным прогностическим

биомаркером тяжести заболевания при инфекции, вызванной ортохантавирусом *Puumala* [314].

- Липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов (NGAL), представляющий собой повсеместно распространенный гликопротеин, первоначально выделенный из нейтрофилов человека. Он также экспрессируется в почках, печени и эпителиальных клетках при определенных условиях [91]. Было показано, что при ГЛПС, этиологически связанной с ортохантавирусом *Puumala*, NGAL имеет диагностическую ценность для оценки острого повреждения почек [141].

Таким образом, вопрос о клинико-лабораторном определении тяжелого течения ГЛПС довольно активно изучается в последние десятилетия, тем не менее, исследователи отмечают его недостаточную разработку.

Как правило, обозначенные молекулярные маркеры этого состояния лишь констатируют наличие тяжелого течения у пациентов с ГЛПС, в большинстве своем связаны преимущественно с поражением почек, максимально проявляющимся на более поздних этапах инфекционного процесса, но редко позволяют прогнозировать тяжесть течения ГЛПС на самых ранних этапах заболевания. Поиск литературы по проблеме показал, что очень редко при прогнозировании тяжелого течения ГЛПС авторы ориентировались на фенотипические характеристики лимфоцитов, хотя сведения о взаимосвязи лимфопении и тяжелого течения этого заболевания в последние годы обозначены довольно четко [151].

С этой точки зрения следует лишний раз подчеркнуть значение нашей попытки разработать высоко прогностически значимый критерий риска тяжелого течения ГЛПС в начальный период заболевания. Основными особенностями этого маркера, получившего название прогностического критерия тяжелого течения (ПКТТ) ГЛПС, служили: интегрально-регрессионный подход к его разработке, а также включение в его состав не только типовых молекулярных маркеров, но и показателей клеточного состава лейкоцитов крови в виде оригинальных фенотипических характеристик лимфоцитов.

## СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В 4 ГЛАВЕ

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

1. *Иванов, М.Ф.* Иммунопатогенетические особенности и прогностические критерии тяжелого течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом / М.Ф. Иванов, И.П. Балмасова, А.В. Жестков // Вестник РУДН. Серия: Медицина. – 2020. – № 3. – С. 207-217.

2. *Иванов, М.Ф.* Иммунологические признаки геморрагической лихорадки с почечным синдромом разной степени тяжести / М.Ф. Иванов, И.П. Балмасова, А.В. Жестков // Аллергология и иммунология. - 2021. - Т. 22, № 1. - С. 47.

3. Прогностическое значение фенотипических изменений лимфоцитов при геморрагической лихорадке с почечным синдромом / *М.Ф. Иванов, И.П. Балмасова, А.В. Жестков, Д.Ю. Константинов, Е.С. Малова* // Иммунология. – 2023. Т. 44, №2. – С. 181-190. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2023-44-2-181-190>

*Патент:*

4. Патент RU 2790962 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/49. G01N 33/50. G01N 33/573. G01N 33/62. Способ прогнозирования тяжелого течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом на ранних этапах заболевания / М.Ф. Иванов, И.П. Балмасова, А.В. Жестков, Д.Ю. Константинов, С.Н. Чемидронов; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2022116619; заявл. 20.06.22; опубл. 28.02.23, Бюл. № 7. – 3 ил., 1 табл., 2 пр.

*Публикации в других изданиях:*

5. *Ivanov, M.F.* Immunological signs of hemorrhagic fever with renal syndrome of different severity / M. Ivanov, I. Balmasova, A. Zhestkov // Allergy & Asthma, COVID-19 & COPD, Immunophysiology & Immunorehabilitology: Innovative Technologies. Ed. Prof. Revaz Sepiashvili // Filodiritto International Proceedings. – 2021. – P. 129-133.

## **ГЛАВА 5 – КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ИММУНОПАТОГЕНЕЗ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В ОЛИГОУРИЧЕСКИЙ И ПОЛИУРИЧЕСКИЙ ПЕРИОДЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

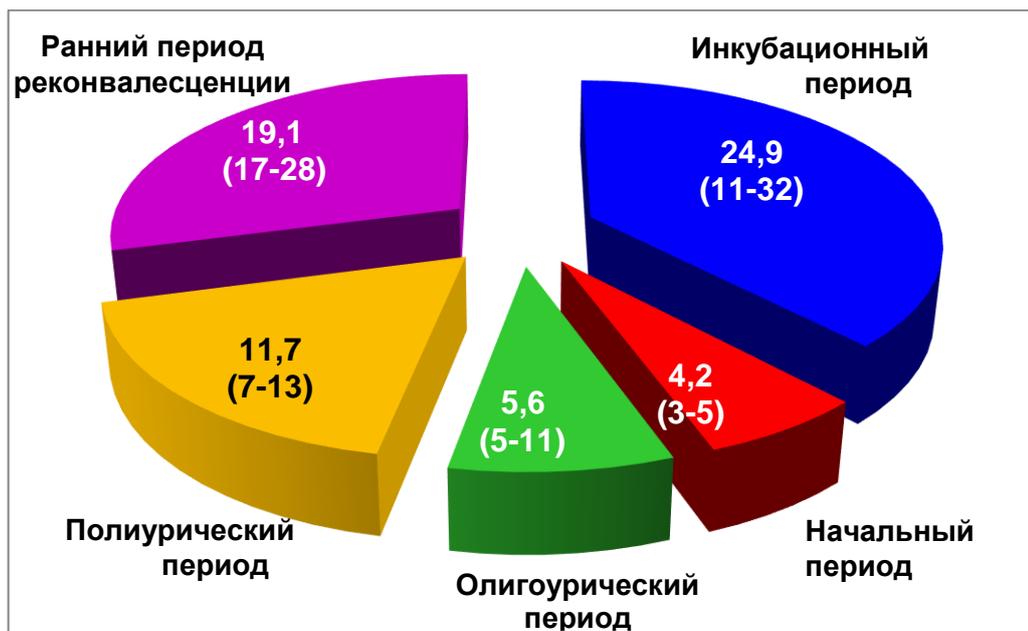
### **5.1 – Общая характеристика пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом и серологический диагноз заболевания**

В главах 3 и 4 анализировались данные пациентов (24 человека), которые поступали на стационарное лечение в начальный период заболевания. В данной главе основной задачей исследования будет служить выявление особенностей иммунопатогенеза ГЛПС разной тяжести течения в разгар заболевания, охватывающего олигоурический и полиурический периоды заболевания.

В группу наблюдения в данном разделе исследования вошли 65 пациентов, которые на протяжении всего заболевания наблюдались в Инфекционном отделении № 1 кафедры инфекционных болезней с эпидемиологией Клиники Самарского государственного медицинского университета. У всех пациентов серологическим методом был верифицирован диагноз геморрагической лихорадки с почечным синдромом.

У 12 пациентов геморрагическая лихорадка с почечным синдромом принимала тяжелое течение, у остальных 53 пациентов заболевание проявлялось как среднетяжелое. При определении тяжести течения заболевания использовались критерии тяжелого течения ГЛПС в соответствии с клиническими рекомендациями по данному заболеванию у взрослых, утвержденных МЗ РФ [21]. Легкое течение ГЛПС из-за слабой выраженности патогенетически значимых сдвигов со стороны клинико-лабораторных и иммунологических признаков входило в критерии невключения в исследование.

Продолжительность различных периодов ГЛПС у наблюдаемых пациентов отражена на *рисунке 42*.



**Рисунок 42 – Продолжительность различных периодов геморрагической лихорадки с почечным синдромом: медиана (минимум-максимум), дни**

Учитывая острое течение ГЛПС, наиболее точно в процессе исследований установлена продолжительность начального, олигоурического и полиурического периодов. Оценка результатов наблюдения в период реконвалесценции была ограничена пребыванием пациентов в стационаре и в ходе настоящего исследования не проводилась.

Серологическая верификация диагноза ГЛПС осуществлялась с использованием реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) с парными сыворотками. Сыворотку получали из венозной крови пациента, начиная с четвертого дня болезни. Забор крови осуществлялся дважды с интервалом в 5-7 дней.

Результаты серологической диагностики ГЛПС в реакциях непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) с парными сыворотками представлены в *таблице 15*. При проведении серодиагностики ГЛПС первый забор сыворотки крови, как правило, приходился на олигоурический период заболевания, а титр, в котором обнаруживались антитела к ортохантавирусам, обычно составлял 1:128 и выше. Лишь у пяти больных подозрение на ГЛПС возникло в начальный период

заболевания, но титр обнаружения антител в этот период у некоторых больных был довольно низким и не превышал 1:16 - 1:64.

**Таблица 15 – Исследование сыворотки крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом с применением реакции непрямой иммунофлюоресценции**

Порядок забора сыворотки крови	Титры сывороток больных	РНИФ-1: число пациентов	РНИФ-2: число пациентов	Нарастание титра в 4 и более раз
Первый забор сыворотки крови n = 65	1:16	5 чел. / 8%	-	-
	1:64	3 чел. / 5%	-	
	1:128	14 чел. / 21%	-	
	1:256	21 чел. / 32%	-	
	1:512	22 чел. / 34%	-	
Второй забор сыворотки крови n = 65	1:256	-	3 чел. / 5%	100%
	1:512	-	7 чел. / 15%	
	1:1024	-	31 чел. / 45%	
	1:2048	-	24 чел. / 35%	

При повторном заборе крови титр антител у больных ГЛПС ни в одном случае не был меньше 1:256, а кратность его возрастания не была ниже 4. Иными словами, у всех 65 больных диагноз ГЛПС был подтвержден серологически.

## **5.2 – Клинико-лабораторная характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом разной степени тяжести в олигоурический период заболевания**

Задачей данного раздела исследований служило определение клинико-лабораторных признаков ГЛПС в олигоурический период заболевания (4-11-й дни болезни) для последующего выявления их соответствия иммунологическим данным, запланированным для анализа в ходе настоящего исследования.

Частота регистрации основных клинических симптомов и результатов объективного обследования в олигоурический период заболевания у пациентов с ГЛПС разной степени тяжести представлена в *таблице 16*.

**Таблица 16 – Клинические признаки у пациентов с разной тяжестью течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом в олигоурический период заболевания**

Клинические признаки		Частота встречаемости признака (человек/%)		ONE WAY ANOVA	
		ГЛПС средней тяжести n = 53	ГЛПС тяжелого течения n = 12	F	p
1		2	3	4	5
Жалобы пациента	Общая слабость	53 чел. / 100%	12 чел. / 100%	-	-
	Тошнота	21 чел. / 40%	12 чел. / 100%	17,723	<0,001***
	Рвота	11 чел. / 20%	9 чел. / 78%	14,853	<0,001***
	Икота	7 чел. / 13%	5 чел. / 44%	5,552	0,022*
	Боли в животе	18 чел. / 33%	11 чел. / 89%	17,583	<0,001***
	Нарушения зрения	49 чел. / 93%	12 чел. / 100%	0,949	0,334
	Носовые кровотечения	39 чел. / 73%	12 чел. / 100%	5,030	0,028*
	Макрогематурия	7 чел. / 13%	9 чел. / 78%	28,271	<0,001***
	Боли в пояснице	53 чел. / 100%	12 чел. / 100%	-	-
Результаты объективного исследования	Лихорадка (38°C и выше)	-	-	-	-
	Гиперемия лица	36 чел. / 67%	8 чел. / 67%	0,007	0,934
	Пастозность лица	53 чел. / 100%	12 чел. / 100%	0,949	0,334
	Артериальная гипотония	7 чел. / 13%	9 чел. / 78%	28,271	<0,001***
	Брадикардия	35 чел. / 67%	11 чел. / 89%	3,162	0,080
	Жесткое дыхание	42 чел. / 80%	11 чел. / 89%	0,987	0,324
	Инъекция сосудов склер	46 чел. / 87%	11 чел. / 89%	0,209	0,649

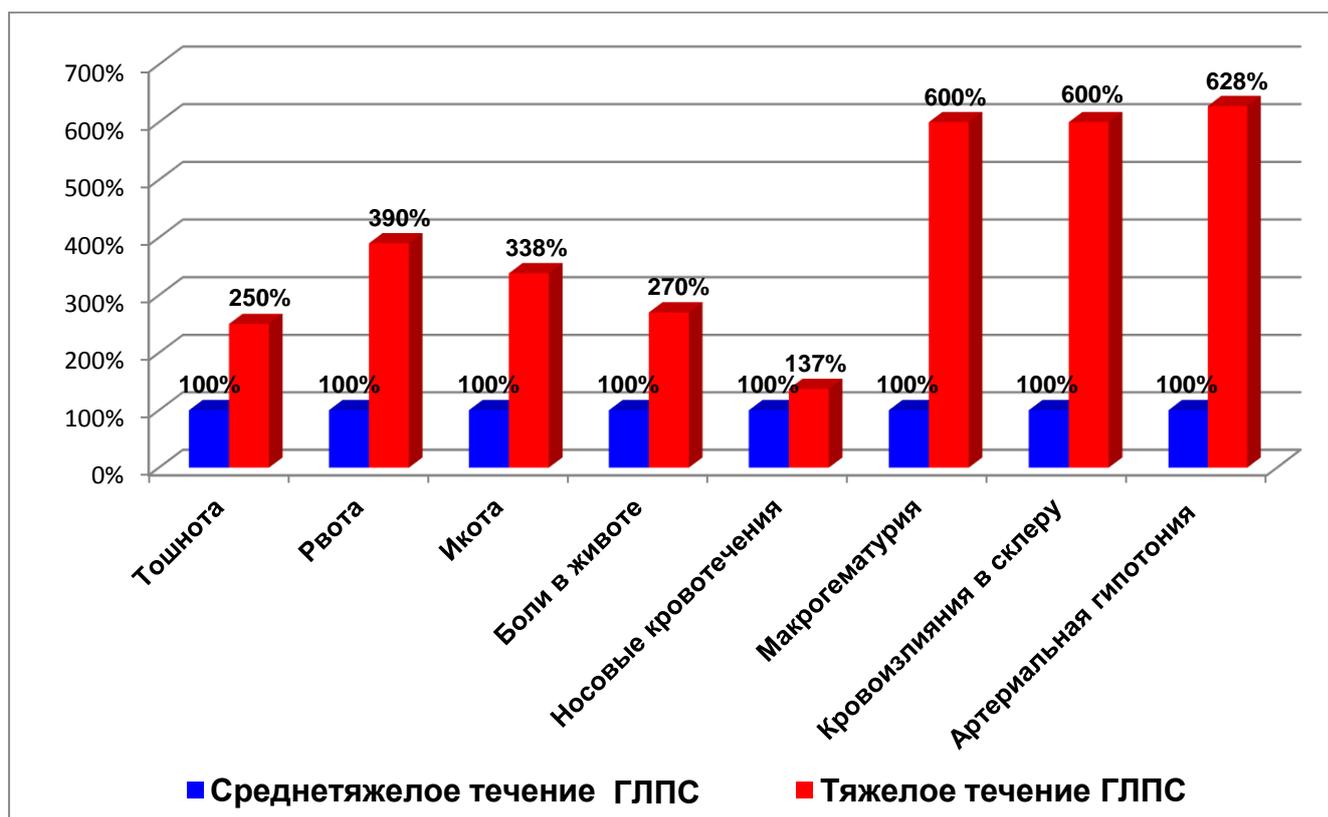
Продолжение таблицы 16

Результаты объективного исследования	1	2	3	4	5
	Кровоизлияния в склере (симптом «вишни»)	4 чел. / 6,7%	5 чел. / 44%	24,036	<0,001***
	Кровоизлияния в кожу	25 чел. / 47%	8 чел. / 67%	1,476	0,229
	Симптом Пастернацкого	53 чел. / 100%	12 чел. / 100%	-	-
	Снижение суточного количества мочи	53 чел. / 100%	12 чел. / 100%	-	-

*Примечание:* n – число пациентов в группе, F – критерий Фишера дисперсии данных, p – вероятность гетерогенности групп исследования, достоверность межгрупповых различий: \* – умеренная, \*\* – высокая, \*\*\* – очень высокая.

Как следует из *таблицы 16*, симптоматика олигоурического периода заболевания, в клинике которого преобладают признаки острого повреждения почек, а также проявления геморрагического синдрома, позволяет во многом довольно четко предполагать тяжелое течение ГЛПС, ориентируясь на клинические критерии, отраженные в методических материалах Минздрава РФ.

В наших исследованиях к этим признакам, характерным для тяжелого течения ГЛПС, относятся высокая частота встречаемости жалоб на общую слабость, тошноту, рвоту, икоту, боли в животе и пояснице, нарушения зрения, носовые кровотечения, кровь в моче. При объективном исследовании отмечается отсутствие лихорадки, гиперемия лица, со временем переходящая в бледность, пастозность лица, артериальная гипотония, более характерная для тяжелого течения, кровоизлияния в склере (симптом «вишни») и кожу (экхимозы). Симптом Пастернацкого настолько выражен, что требует чрезвычайно осторожного воспроизведения врачом. Один из наиболее характерных признаков для этого периода – олигоурия, проявляющаяся значительным снижением суточного количества мочи иногда до полной анурии. Для оценки степени различий между признаками ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения информационно значимые критерии показаны на *рисунке 43*, при этом встречаемость признаков при среднетяжелом течении ГЛПС принята за 100%.



**Рисунок 43 – Проценты отклонения информативных клинических признаков тяжелого течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом от показателей среднетяжелого течения в олигоурический период**

Как следует из *таблицы 16*, по степени отклонения частоты встречаемости клинических признаков при тяжелом течении ГЛПС наиболее выраженные отличия показывают проявления геморрагического и общетоксического синдромов (носовые кровотечения, макрогематурия, артериальная гипотония, рвота, икота). Что касается признаков острого поражения почек (снижение количества суточной мочи, боли в пояснице, симптом Пастернацкого), то они не вошли в перечень информативных показателей по той причине, что регистрировались у всех больных как тяжелого, так и среднетяжелого течения ГЛПС, но степень выраженности этих симптомов, разумеется, преобладала у больных с тяжелым течением заболевания, что на критериальном уровне особенно четко выявлялось при лабораторном исследовании мочи и крови.

В *таблице 17* и на *рисунке 44* представлены показатели клинического анализа крови у пациентов ГЛПС разной степени тяжести в сравнении с аналогичными параметрами здоровых людей.

**Таблица 17 – Показатели клинического анализа крови у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в олигоурический период заболевания**

Лабораторные показатели	Медиана (минимум; максимум)			Критерий Манна-Уитни
	ГЛПС средней тяжести, n = 53	ГЛПС тяжелого течения, n = 12	Здоровые лица n = 15	p <sub>1</sub> p <sub>2</sub> p <sub>3</sub>
Эритроциты (10 <sup>12</sup> клеток/л)	4,9 (3,9; 6,0)	4,8 (4,2; 5,6)	5,0 (3,3; 6,5)	0,194 0,411 0,675
Гемоглобин (г/л)	149 (81; 208)	145 (133; 162)	141 (104; 204)	0,624 0,802 0,547
Гематокрит (%)	42,7 (21,0; 55,1)	41,5 (35,0; 47,7)	39,9 (29,3; 55,7)	0,719 0,594 0,315
Тромбоциты (10 <sup>9</sup> клеток/л)	103 (14; 391)	79,5 (20; 248)	230,0 (187,0; 301,0)	< 0,001*** 0,009** 0,521
Лейкоциты (10 <sup>6</sup> клеток/л)	10,0 (2,5; 35,7)	10,4 (6,9; 27,2)	6,2 (3,4; 7,9)	0,011* 0,005** 0,300
Эозинофилы (%)	0 (0; 6)	1 (1; 1)	0 (0; 2,0)	0,983 0,254 0,673
Палочкоядерные нейтрофилы (%)	6 (0; 22)	8 (1; 22)	2 (1; 5)	0,036* 0,013* 0,634
Сегментоядерные нейтрофилы (%)	59 (40; 73)	55 (47; 73)	64 (42; 74)	0,443 0,237 0,622
Лимфоциты (%)	19,5 (2,0; 39,1)	16,5 (7,1; 22,5)	31,8 (19,2; 45,6)	< 0,001*** < 0,001*** 0,780
Моноциты (%)	11,0 (0,7; 23,0)	10,0 (4,3; 15,0)	5 (4; 10)	< 0,001*** < 0,001*** 0,635
СОЭ мм/час	18 (12; 28)	20,5 (7; 40)	7 (3; 12)	< 0,001*** < 0,001*** 0,747

*Примечание:* n - число исследований в группе, p<sub>1</sub> – вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого течения и здоровых людей; p<sub>2</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС тяжелого течения и здоровых людей; p<sub>3</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения; статистическая значимость различий: \* при p < 0,05; \*\* при p < 0,01; \*\*\* при p < 0,001.



**Рисунок 44 – Проценты отклонения показателей гемограмм тяжелого течения геморрагической лихорадкой с почечным синдромом от показателей среднетяжелого течения в олигоурический период**

Как следует из *таблицы 17* и *рисунка 44*, в олигоурический период ГЛПС большинство показателей клинического анализа крови статистически значимо отличалось от параметров здоровых людей: наблюдались тромбоцитопения и лейкоцитоз, палочкоядерный сдвиг нейтрофилов, лимфопения, моноцитоз, многократно возрастала СОЭ. В то же время статистически достоверных различий между этими показателями в зависимости от тяжести течения заболевания не установлено, при этом на *рисунке 44* наглядно видна однонаправленность сдвигов при среднетяжелом и тяжелом течении ГЛПС. Не входят показатели клинического анализа крови и в существующие количественные критерии тяжелого течения ГЛПС, хотя подчеркивается значение выраженности тромбоцитопении и лейкоцитоза.

Далее статистически оценивались изменения показателей биохимического анализа крови у пациентов с ГЛПС различной степени тяжести по сравнению со здоровыми людьми. Результаты такой оценки представлены в *таблице 18* и на *рисунке 45*.

**Таблица 18 – Показатели биохимического анализа крови у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести в олигоурический период заболевания по сравнению с данными клинически здоровых лиц**

Лабораторные показатели	Медиана (минимум; максимум)			Критерий Манна-Уитни p1 p2 p3
	ГЛПС средней тяжести n = 53	ГЛПС тяжелого течения n = 20	Здоровые лица n = 15	
1	2	3	4	5
Мочевина, ммоль/л	7,8 (3,1; 37,8)	24,9 (19,9; 49,1)	5,3 (2,5; 6,8)	0,039* <0,001*** <0,001***
Креатинин, мкмоль/л	119,6 (67,8; 608,4)	447,0 (217,6; 971,1)	76,0 (54,0; 89,0)	<0,001*** <0,001*** <0,001***
Мочевая кислота, мкмоль/л	313,8 (105,4; 668,0)	345,8 (268,5; 423,0)	299,5 (220,0; 342,0)	0,588 0,462 0,794
Общий белок, г/л	65,5 (48,7; 84,3)	61,8 (55,9; 67,8)	75,0 (60,0; 88,0)	0,053 0,005** 0,376
Альбумин, г/л	36,6 (27,3; 43,5)	31,1 (27,8; 39,2)	49,8 (33,8; 54,3)	0,011* 0,007** 0,262
Общий билирубин, ммоль/л	7,8 (3,8; 58,0)	9,1 (5,3; 18,2)	11,4 (7,0; 18,0)	0,146 0,293 0,552
Холестерин, ммоль/л	3,2 (2,1; 4,0)	3,0 (2,5; 5,8)	5,2 (4,0; 6,3)	<0,001*** <0,001*** 0,625
Амилаза, ЕД/л	51,5 (41,6; 101,4)	56,4 (31,7; 61,8)	55,0 (54,0; 75,0)	0,213 0,714 0,492
Аланинаминотрансфераза (АЛТ), ЕД/л	22,8 (12,0; 52,7)	38,2 (12,5; 128,1)	26,5 (13,0; 51,0)	0,262 0,017* 0,013*
Аспартатаминотрансфераза (АСТ), ЕД/л	26,6 (13,2; 33,2)	43,7 (13,2; 111,0)	18,5 (14,0; 35,0)	0,383 0,041* 0,003**

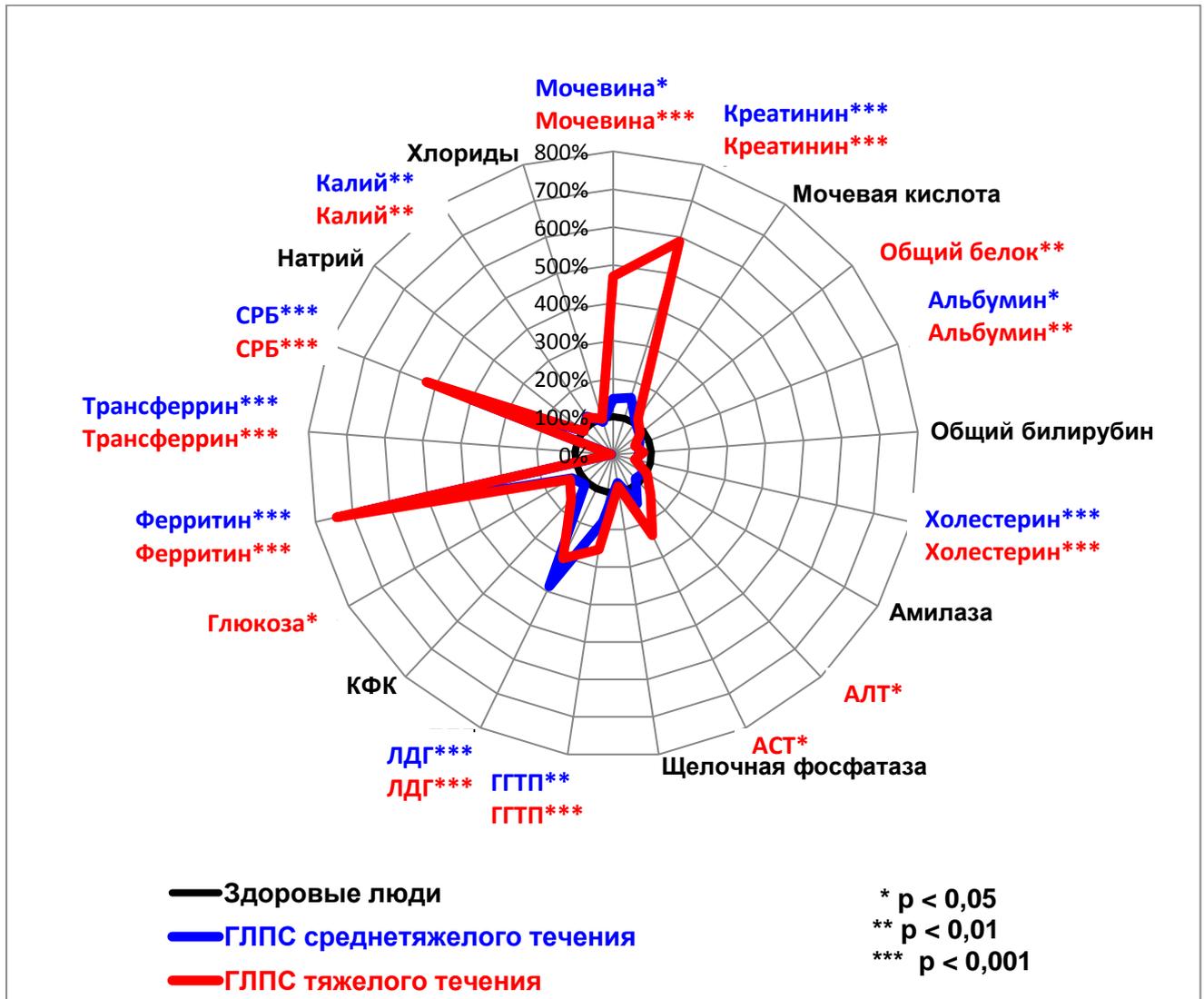
Продолжение таблицы 18

1	2	3	4	5
Щелочная фосфатаза (ЩФ), ЕД/л	54,2 (46,7; 61,8)	61,0 (34,6; 86,1)	72,0 (44,0; 107,0)	0,053 0,186 0,602
γ-глутамилтранспептидаза (ГГТП), ЕД/л	22,2 (19,3; 25,2)	31,4 (7,4; 272,9)	12,4 (8,3; 15,4)	0,001** <0,001*** 0,143
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ), ЕД/л	651,9 (510,0; 840,3)	513,2 (409,1; 985,0)	169,0 (135,0; 200,0)	<0,001*** <0,001*** 0,232
Креатинфосфокиназа (КФК), ЕД/л	72,1 (66,6; 76,7)	106,8 (14,6; 133,8)	66,0 (25,0; 101,0)	0,627 0,106 0,445
Глюкоза, г/л	6,3 (4,1; 8,5)	6,7 (5,7; 7,7)	5,1 (3,5; 8,5)	0,068 0,023* 0,309
Ферритин, мкг/л	864,4 (627,3; 1072)	951,3 (831; 1743)	128,0 (35,0; 174,0)	<0,001*** <0,001*** 0,099
Трансферрин, г/л	2,0 (1,5; 3,7)	2,2 (1,9; 3,9)	38,0 (27,0; 41,0)	<0,001*** <0,001*** 0,602
С-реактивный белок (СРБ), мг/л	32,0 (15,7; 89,2)	64,6 (12,8; 250,0)	0,8 (0,5; 1,1)	<0,001*** <0,001*** 0,440
Натрий, ммоль/л	139,0 (16,0; 147,0)	139,0 (125,0; 148,0)	141,0 (136,0; 146,0)	0,727 0,723 0,321
Калий, ммоль/л	4,5 (3,7; 5,7)	4,4 (3,1; 7,2)	3,7 (3,0; 4,1)	0,001** 0,006** 0,915
Хлор, ммоль/л	92,0 (71,0; 107,0)	99,6 (84,0; 112,7)	101,0 (95,0; 106,0)	0,753 0,862 0,131

*Примечание:* n - число исследований в группе, p<sub>1</sub> – вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого течения и здоровых людей; p<sub>2</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС тяжелого течения и здоровых людей; p<sub>3</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения; статистическая значимость различий: \* при p < 0,05; \*\* при p < 0,01; \*\*\* при p < 0,001.

Среди биохимических показателей крови у пациентов в олигоурический период ГЛПС статистически значимое отклонение от показателей у здоровых людей претерпевает довольно много параметров. Среди них мочевины, креатинин, холестерин, ферментные системы (аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза, γ-глутамил-транспептидаза, лактатдегидрогеназа),

железосодержащие белки (ферритин, трансферрин), С-реактивный белок, ионы калия.

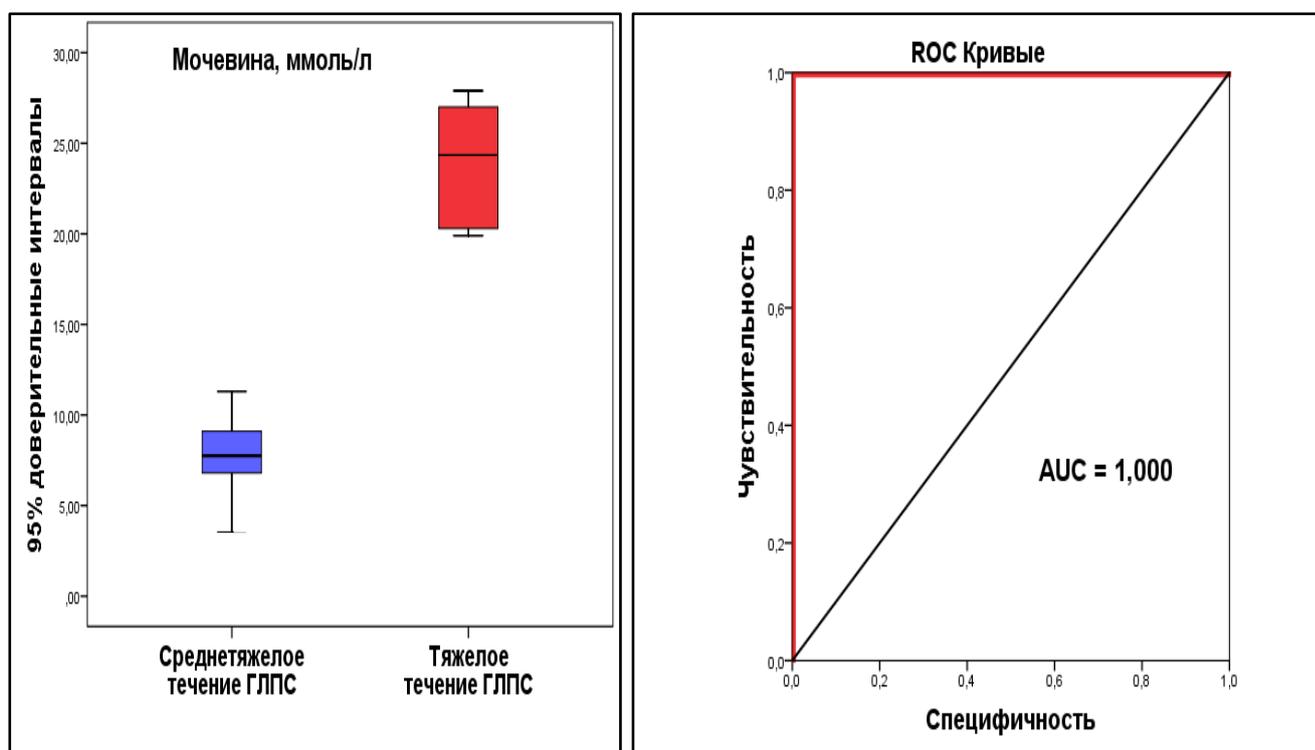


**Рисунок 45 – Проценты отклонения биохимических показателей крови пациентов с тяжелым течением геморрагической лихорадки с почечным синдромом от показателей среднетяжелого течения в олигоурический период**

Гораздо меньший перечень биохимических показателей выявляет статистически достоверные различия между среднетяжелым и тяжелым течением ГЛПС на этом этапе инфекционного процесса. К таким информативным признакам крови относятся значительное нарастание мочевины и креатинина, а также статистически достоверное повышение активности АЛТ и АСТ, характерные для тяжелого течения.

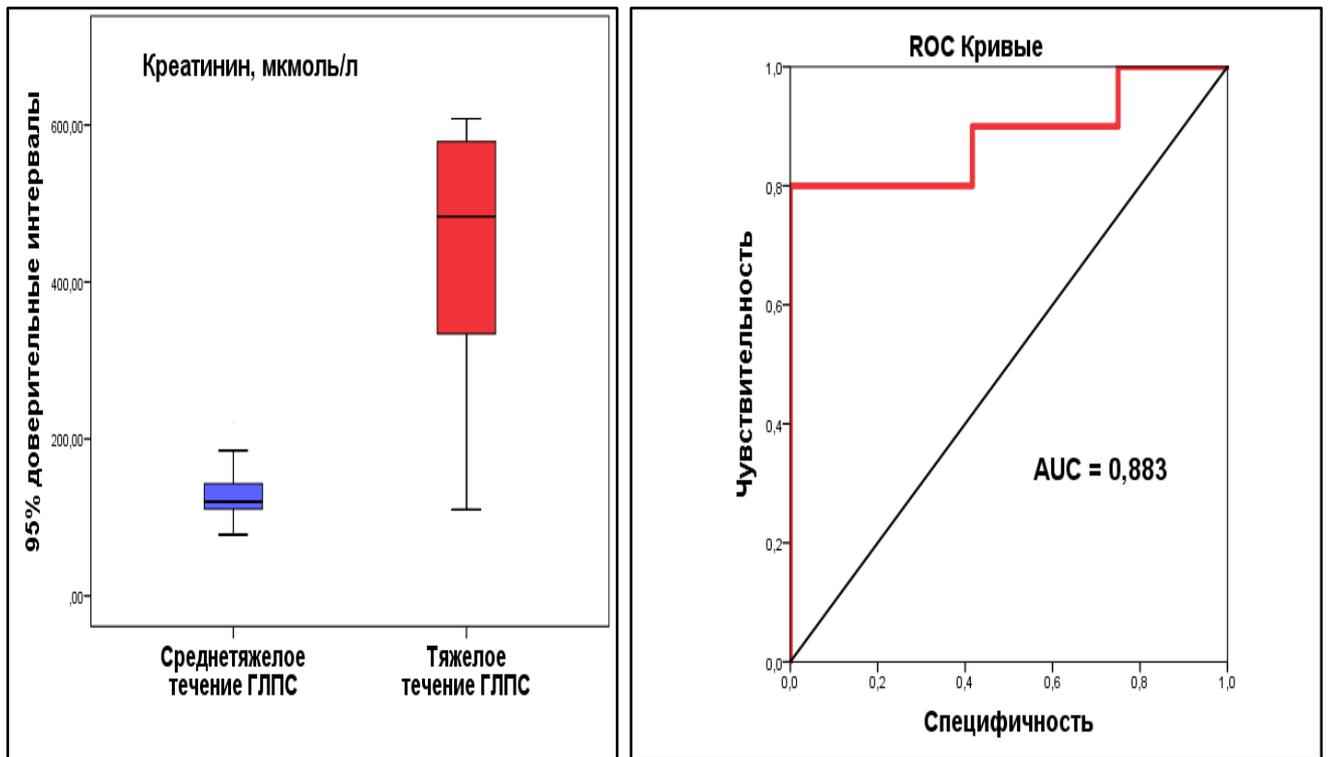
Следует подчеркнуть, что степень нарастания мочевины и креатинина в крови у пациентов с тяжелым течением ГЛПС в полной мере соответствовала существующим критериям тяжелого течения (мочевина выше 20 ммоль/л, креатинин до 600 мкмоль/л).

Все биохимические показатели, информативные в отношении тяжелого течения ГЛПС, далее подвергались анализу на диагностическую значимость путем определения 95%-ных доверительных интервалов и построения ROC-кривых (рисунки 46-49).



**Рисунок 46 – 95 % доверительные интервалы содержания мочевины в крови и ROC-кривые ее диагностической значимости в олигоурический период геморрагической лихорадки с почечным синдромом**

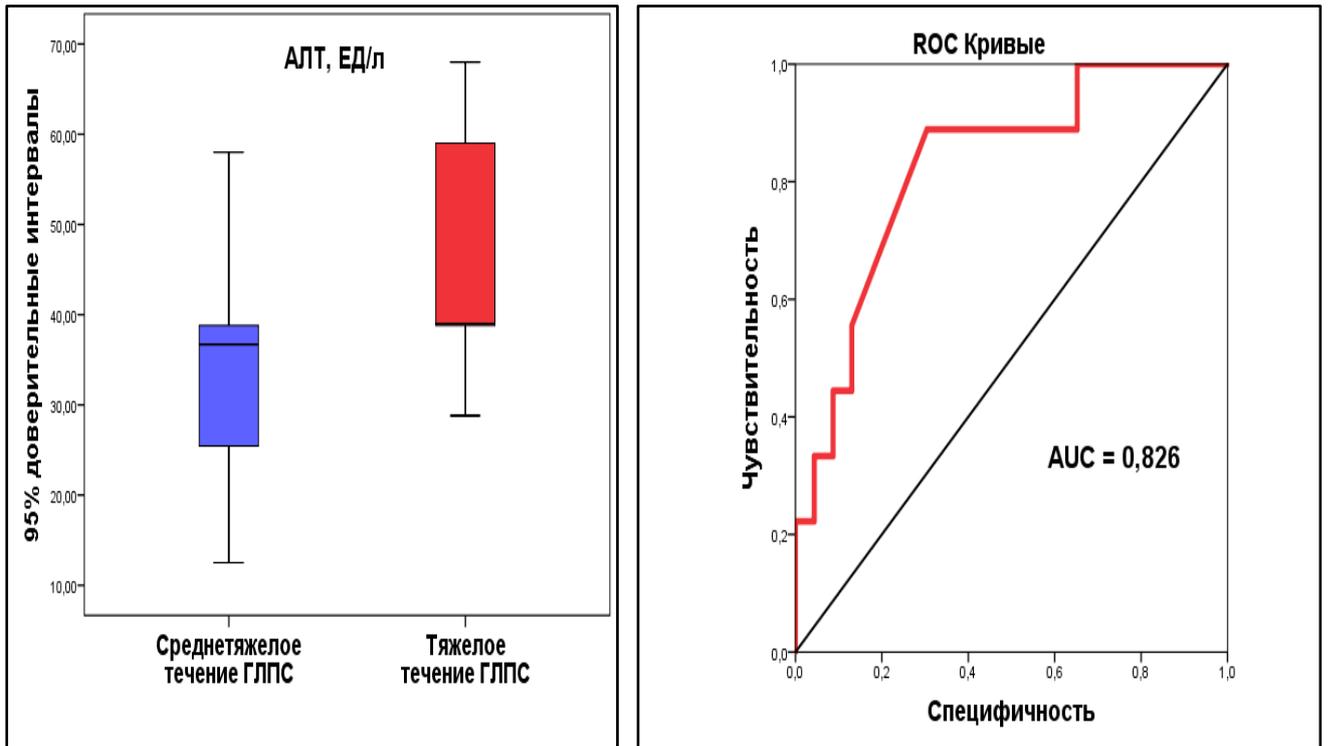
На рисунке 46 показаны результаты исследования уровня мочевины в олигоурический период ГЛПС. Как следует из определения 95% доверительных интервалов, между показателями для среднетяжелого и тяжелого течения заболевания имеется довольно существенное различие, что при построении ROC-кривой оценивается как максимальная диагностическая значимость параметра (AUC = 1,0) при величине выше 20 ммоль/л.



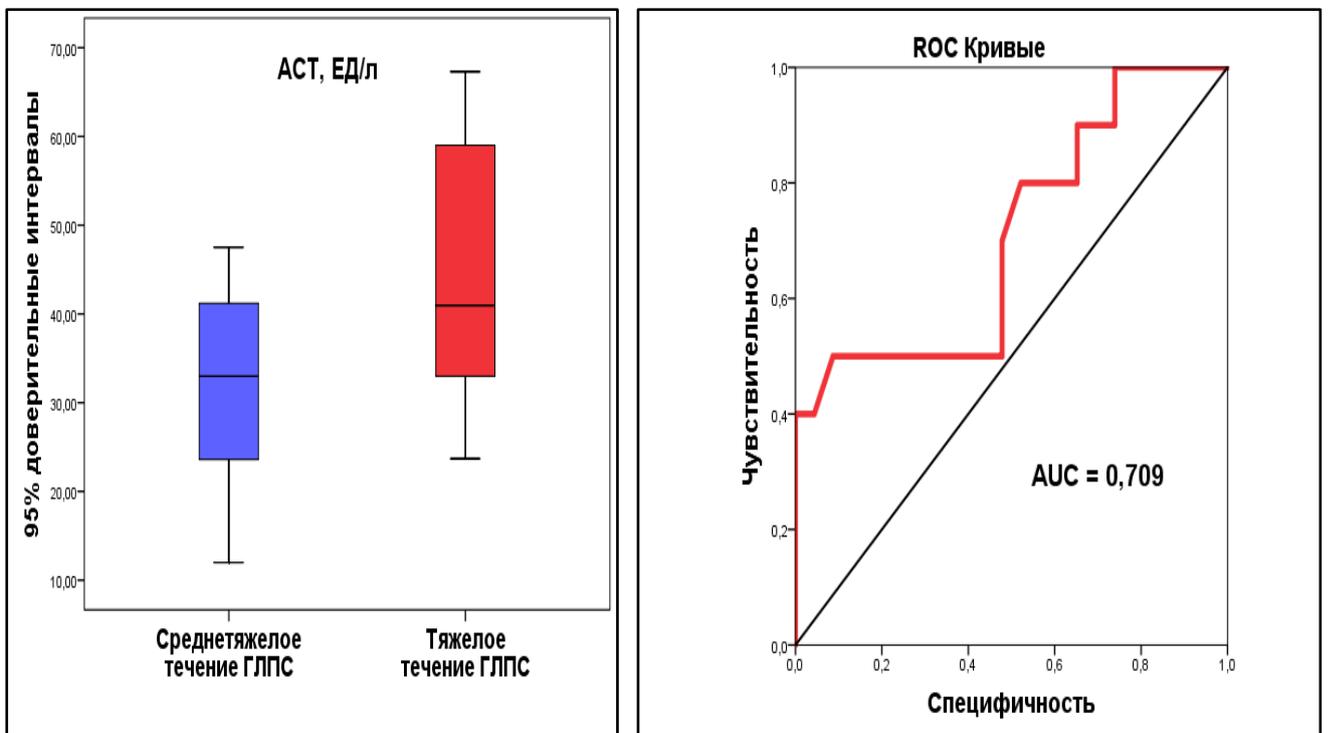
**Рисунок 47 – 95 % доверительные интервалы содержания креатинина в крови и ROC-кривые ее диагностической значимости в олигоурический период геморрагической лихорадки с почечным синдромом**

Высокая степень различия показателей выявляется и при определении уровня креатинина у пациентов с ГЛПС разной степени тяжести в олигоурический период. AUC при ROC-анализе в этом случае составила 0,883, что подтверждает высокий уровень диагностической значимости показателя при величине выше 340 мкмоль/л, как представлено на *рисунке 47*, при полном соответствии этих данных критериальным значениям этого параметра, обозначенным в клинических рекомендациях, утвержденных Минздравом РФ.

Активность аланинаминотрансферазы также входила в число информативных признаков тяжелого течения ГЛПС в олигоурический период. Этот параметр при тяжелом течении заболевания показывал более высокие значения, чем при среднетяжелом течении. При величине выше 40 ЕД/л активность АЛТ проявляла высокую диагностическую значимость при AUC, равной 0,826, и свидетельствовала в пользу тяжелого течения ГЛПС (*рисунок 48*).

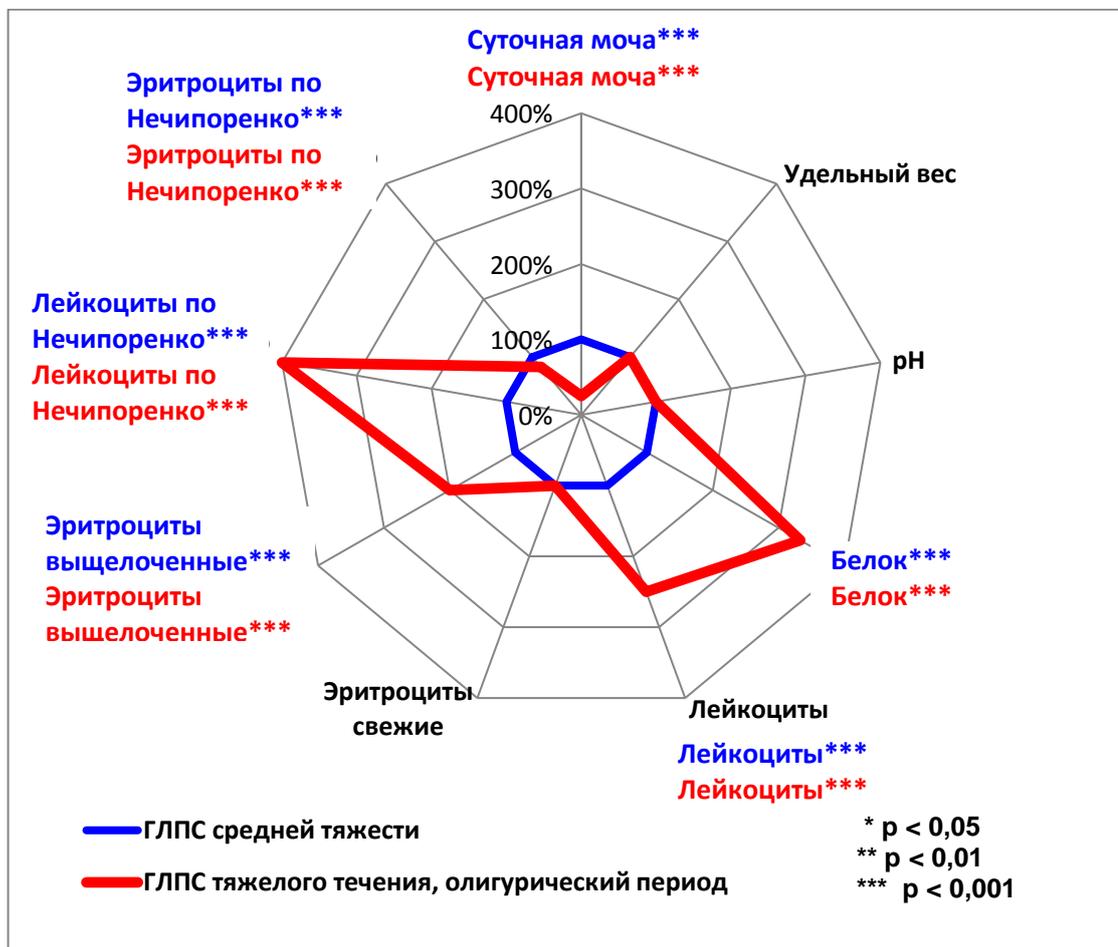


**Рисунок 48 – 95 % доверительные интервалы активности аланинаминотрансферазы в крови и ROC-кривые ее диагностической значимости в олигоурический период геморрагической лихорадки с почечным синдромом**



**Рисунок 49 – 95 % доверительные интервалы активности аспаратаминотрансферазы в крови и ROC-кривые ее диагностической значимости в олигоурический период геморрагической лихорадки с почечным синдромом**

Несколько меньшей информативностью обладала активность АСТ (рисунк 49). При значениях выше 42 ЕД/л этот показатель подтверждал тяжелое течение ГЛПС, но диагностическая значимость этого теста была умеренной, поскольку  $AUC = 0,709$ . Поскольку наблюдаемые высокоинформативные биохимические сдвиги обусловлены, прежде всего, острым поражением почек, являющимся основным патогенетически значимым признаком патологического процесса в олигоурический период, особого внимания заслуживает такое лабораторное исследование как клинический анализ мочи, дополненный пробой по Нечипоренко. Результаты представлены в *таблице 19* и на *рисунке 50*.



**Рисунок 50 – Показатели клинического анализа мочи у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в олигоурический период по сравнению с данными клинически здоровых лиц**

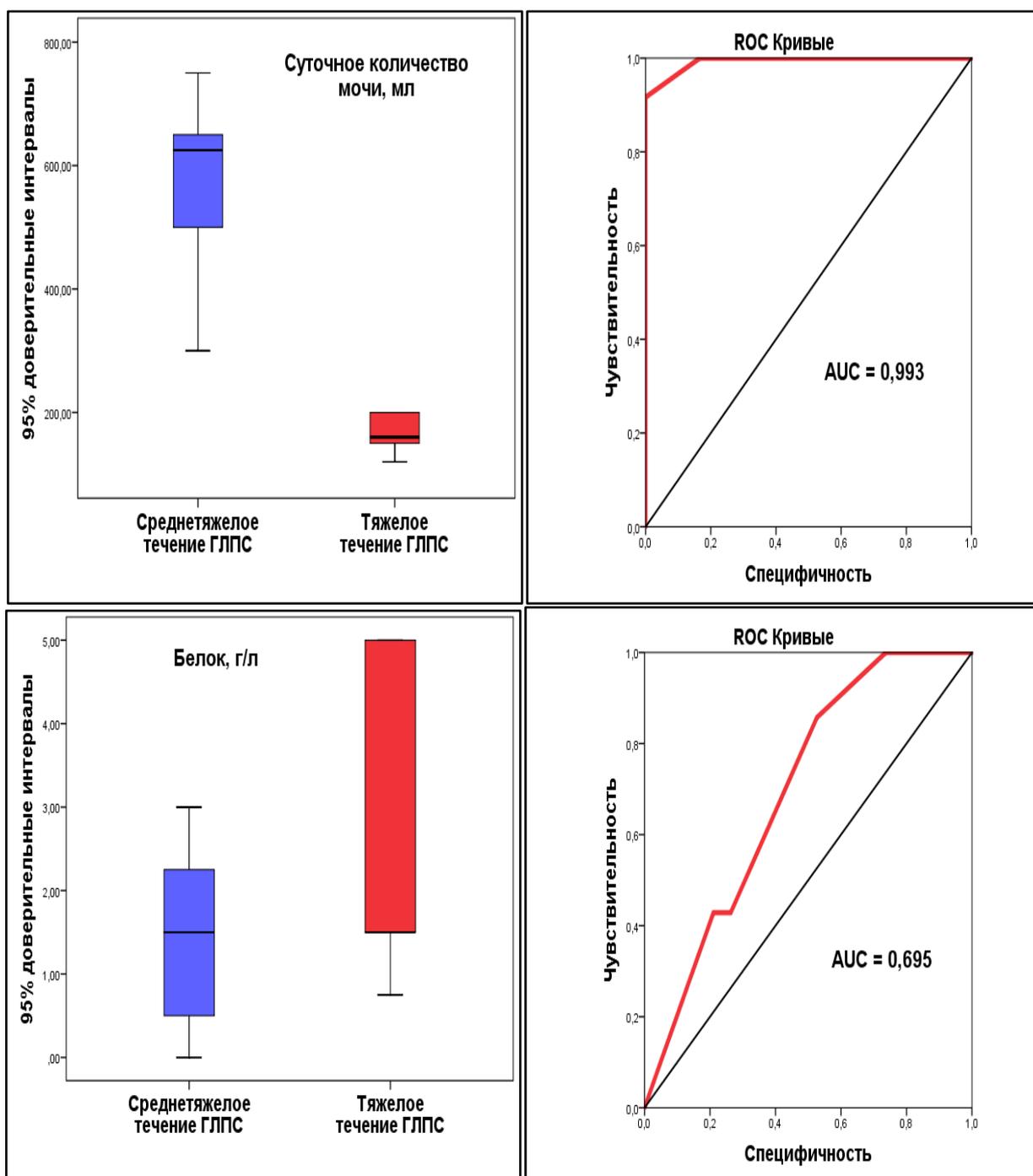
**Таблица 19 – Показатели клинического анализа мочи у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в олигоурический период по сравнению с данными клинически здоровых лиц**

Лабораторные показатели	Медиана (минимум; максимум)			Критерий Манна-Уитни
	ГЛПС средней тяжести n = 53	ГЛПС тяжелого течения n = 12	Здоровые лица n = 15	p <sub>1</sub> p <sub>2</sub> p <sub>3</sub>
1	2	3	4	5
Суточное количество мочи, мл	600 (100; 850)	150 (0; 280)	1050 (850; 1600)	<0,001*** <0,001*** 0,002**
Удельный вес мочи г/мл	1,02 (1,00; 1,04)	1,02 (1,01; 1,02)	1,013 (1,01; 1,02)	0,524 0,539 0,692
pH мочи	5 (5; 8)	5 (5; 8)	5 (5; 6,5)	0,423 0,219 0,822
Белок, г/л	1,5 (0,25; 5)	5 (0; 5)	0 (0; 0,3)	<0,001*** <0,001*** 0,045*
Лейкоциты, клеток/поле зрения	12 (0; 500)	25 (0; 100)	0 (0; 6)	<0,001*** <0,001*** 0,249
Эритроциты свежие, клеток/поле зрения	0 (0; 25)	0 (0; 0)	0 (0; 5)	0,425 0,949 0,664
Эритроциты выщелоченные, клеток/поле зрения	25 (0; 250)	50 (10; 250)	0 (0; 0)	<0,001*** <0,001*** 0,029*
Лейкоциты по Нечипоренко, *10 <sup>6</sup> клеток/л	2000 (250; 3000)	3000 (1000; 3375)	300 (0; 500)	<0,001*** <0,001*** 0,036*
Эритроциты по Нечипоренко, *10 <sup>6</sup> клеток/л	1500 (250; 4000)	1250 (250; 1500)	250 (0; 400)	<0,001*** <0,001*** 0,116

*Примечание:* n - число исследований в группе, p<sub>1</sub> – вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого течения и здоровых людей; p<sub>2</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС тяжелого течения и здоровых людей; p<sub>3</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения; статистическая значимость различий: \* при p < 0,05; \*\* при p < 0,01; \*\*\* при p < 0,001.

Результаты клинического исследования мочи и пробы по Нечипоренко показали следующие статистически значимые различия между параметрами у

пациентов с ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения: падение суточного количества мочи, высокое содержания в моче белка, рост числа выщелоченных эритроцитов, а также лейкоцитов, в том числе и в пробе по Нечипоренко. Содержание в моче белка, а также суточное количество мочи являются количественными критериями и могут быть оценены с позиций диагностической значимости.



**Рисунок 51 – 95 % доверительные интервалы показателей клинического анализа мочи и ROC-кривые ее диагностической значимости в олигоурический период больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом**

Как следует из *рисунка 51*, суточное количество мочи в олигоурический период ГЛПС является надежным критерием, позволяющим при значениях ниже 200 мл определять тяжелое течение ГЛПС с очень высокой диагностической значимостью (AUC = 0,993). В то же время уровень белка в моче при всем известном ориентировочном значении в качестве маркера тяжелого течения ГЛПС достаточную диагностическую значимость при ROC-анализе в наших исследованиях не продемонстрировал.

Таким образом, данный раздел исследования показал адекватность формирования группы тяжелого течения ГЛПС, по большинству параметров соответствующую критериям, отмеченным в клинических рекомендациях, принятых в нашей стране. Это создает основу для обогащения этого набора критериев иммунологическими данными, что позволило бы оценить набор иммунопатогенетически значимых механизмов, представляющих угрозу для качества жизни и самой жизни пациента с ГЛПС.

### **5.3 – Иммунологическая характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом разной степени тяжести в олигоурический период заболевания**

Для выполнения задач исследования на данном этапе изучался фенотипический состав лимфоцитов крови у пациентов с ГЛПС разной степени тяжести в олигоурический период по сравнению с показателями у здоровых людей (*таблица 20, рисунок 52*).

Как и в предыдущих разделах исследования, абсолютные значения представительства различных фенотипов лимфоцитов в крови при сравнении показателей пациентов с ГЛПС разной степени тяжести в олигоурический период заболевания и здоровых лиц были гораздо менее информативными, чем относительные, и выявляли меньше различий при сравнении данных. В связи с этим на *рисунке 52* результаты сравнительных исследований включали только процентные соотношения в крови лимфоцитов с изучаемыми фенотипическими характеристиками.

**Таблица 20 – Относительные и абсолютные показатели содержания в крови лимфоцитов разных фенотипов у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом среднетяжелого и тяжелого течения в олигоурический период по сравнению с данными клинически здоровых лиц**

Лимфоциты крови и их фенотипические характеристики		Медиана (минимум; максимум)			Критерий Манна-Уитни
		ГЛПС средней тяжести, n=53	ГЛПС тяжелого течения, n = 12	Здоровые лица, n = 15	p1 p2 p3
1		2	3	4	5
В-лимфоциты CD19 <sup>+</sup>	%	13,70 (5,00; 25,00)	9,00 (7,00; 17,00)	10,5 (2,5; 15,7)	0,039* 0,644 0,009*
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,23 (0,07; 0,57)	0,10 (0,05; 1,82)	0,18 (0,08; 0,30)	0,047* 0,009** 0,007**
Т-лимфоциты CD3 <sup>+</sup>	%	67,7 (50,0; 81,4)	82,0 (62,2; 85,3)	75 (62; 87,0)	0,138 0,123 0,063
	10 <sup>9</sup> клеток/л	1,3 (0,6; 3,5)	1,4 (0,6; 4,1)	1,2 (0,7; 3,1)	0,695 0,816 0,459
Активированные Т-лимфоциты CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	%	4,2 (1,1; 8,9)	2,9 (1,9; 6,2)	7,5 (2,6; 7,8)	0,076 0,004** 0,314
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,11 (0,04; 0,21)	0,05 (0,01; 0,33)	0,11 (0,03; 0,20)	0,999 0,230 0,172
Т-хелперы Th CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	%	36,0 (19,5; 46,8)	37,7 (28,8; 51,4)	41 (14; 57)	0,594 0,737 0,889
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,76 (0,38; 1,50)	0,64 (0,33; 1,20)	0,7 (0,4; 1,4)	0,859 0,698 0,571
Цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	%	34,7 (17,2; 58,9)	45,2 (23,2; 47,0)	28 (16; 71)	0,018* <0,001*** <0,001***
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,57 (0,23; 2,70)	0,77 (0,51; 2,30)	0,4 (0,2; 2,6)	0,594 0,009** 0,123
NKG2D <sup>+</sup> CTL CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD314 <sup>+</sup>	%	26,0 (19,6; 78,0)	33,8 (16,9; 47,1)	12,6 (9,6; 27,0)	<0,001*** <0,001*** 0,004**
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,71 (0,23; 2,10)	0,57 (0,26; 1,93)	0,24 (0,14; 0,40)	<0,001*** <0,001*** 0,653
CD4 <sup>+</sup> регуляторные Т-клетки (Treg) CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	%	11,2 (6,6; 18,4)	10,7 (5,2; 16,3)	3,05 (2,30; 8,10)	<0,001*** <0,001*** 0,654
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,24 (0,07; 0,28)	0,22 (0,10; 0,32)	0,05 (0,02; 0,20)	<0,001*** <0,001*** 0,874

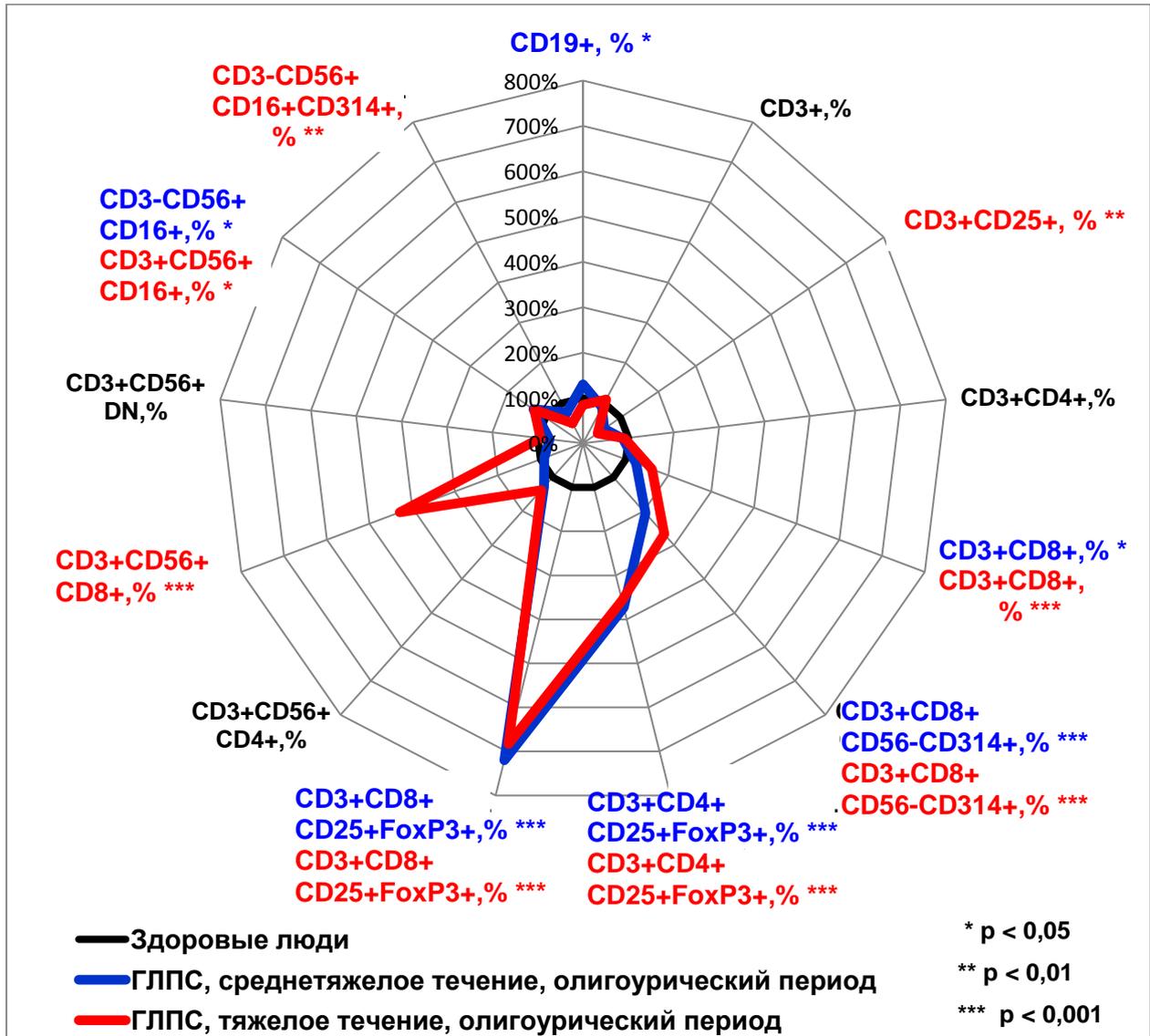
Продолжение таблицы 20

1		2	3	4	5
CD8 <sup>+</sup> регуляторные Т-клетки (Treg) CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	%	14,8 (3,5; 23,9)	9,9 (3,8; 19,9)	1,45 (0,1; 4,4)	<0,001*** <0,001*** 0,036*
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,28 (0,12; 0,72)	0,18 (0,14; 0,59)	0,01 (0; 0,07)	<0,001*** <0,001*** 0,071
CD4 <sup>+</sup> NKT CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	%	0,25 (0,17; 0,34)	0,29 (0,16; 0,46)	0,18 (0,13; 0,22)	0,119 0,051 0,163
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,06 (0,02; 1,00)	0,07 (0,03; 0,90)	0,03 (0,01; 0,04)	0,354 0,094 0,173
CD8 <sup>+</sup> NKT CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	%	2,73 (2,07; 3,89)	11,6 (5,62; 18,6)	2,67 (1,94; 3,28)	0,705 <0,001*** <0,001***
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,26 (0,20; 0,48)	0,36 (0,22; 0,57)	0,15 (0,13; 0,18)	0,587 0,008** 0,325
Дважды негативные (DN) NKT CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	%	0,41 (0,38; 0,69)	0,62 (0,37; 0,66)	0,55 (0,42; 0,71)	0,461 0,222 0,403
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,06 (0,01; 0,05)	0,05 (0,02; 0,07)	0,04 (0,01; 0,05)	0,144 0,254 0,325
Натуральные киллеры (NK) CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	%	17 (9; 53)	16,8 (10,1; 39,0)	12,9 (9,5; 27,7)	0,039* 0,027* 0,953
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,36 (0,13; 1,75)	0,28 (0,12; 1,33)	0,26 (0,14; 0,42)	0,458 0,892 0,806
NKG2D <sup>+</sup> NK CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD314 <sup>+</sup>	%	7,4 (1,0; 16,3)	4,8 (1,2; 7,4)	9,6 (7,7; 21,6)	0,144 0,008** 0,036*
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,18 (0,02; 0,44)	0,08 (0,01; 0,26)	0,19 (0,11; 0,32)	0,798 0,104 0,032*

*Примечание:* n - число исследований в группе, p<sub>1</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого течения и здоровых лиц, p<sub>2</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС тяжелого течения и здоровых лиц, p<sub>3</sub> - вероятность различий между группами ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения; статистическая значимость различий: \* при p < 0,05; \*\* при p < 0,01; \*\*\* при p < 0,001.

Прежде всего, необходимо отметить, что на протяжении олигоурического периода ГЛПС статистически значимо отклонялись от показателей у здоровых людей в той или иной степени следующие параметры: в сторону повышения – В-лимфоциты, СТЛ, в том числе и экспрессирующие NKG2D, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>

регуляторные Т-клетки, CD8<sup>+</sup> NKT, NK; в сторону снижения – CD25<sup>+</sup> Т-клетки, NKG2D<sup>+</sup> натуральные киллеры.



**Рисунок 52 – Проценты отклонения лимфоцитов различных фенотипов в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом среднетяжелого и тяжелого течения от показателей здоровых людей в олигоурический период**

Часть из этих фенотипов выявляла статистически достоверные количественные различия по содержанию в крови между среднетяжелым и тяжелым течением ГЛПС.

Так, нарастание доли В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>) в условиях олигоурии наблюдалось только у пациентов со среднетяжелым течением заболевания.

Процентное содержание CTL ( $CD3^+CD8^+$ ) среди лейкоцитов крови было в 1,2 раза выше показателей здоровых людей у пациентов со среднетяжелым течением ГЛПС и в 1,7 выше при тяжелом течении. Более значительный рост доли этих клеток среди лимфоцитов крови как при среднетяжелом, так и при тяжелом течении, по всей вероятности, происходил за счет пула CTL, экспрессирующих рецептор NKG2D, которые составляли среди всех лимфоцитов соответственно 26% и 33,8%, а среди CTL – 75% независимо от тяжести течения заболевания.

Относительное содержание в крови регуляторных T-клеток  $CD4^+$  фенотипа увеличивалось в 3,5-3,7 раза, то есть примерно одинаково при тяжелом и среднетяжелом течении, а процент  $CD8^+$  Treg при среднетяжелом течении ГЛПС возрастал статистически гораздо более значимо, чем при тяжелом течении.

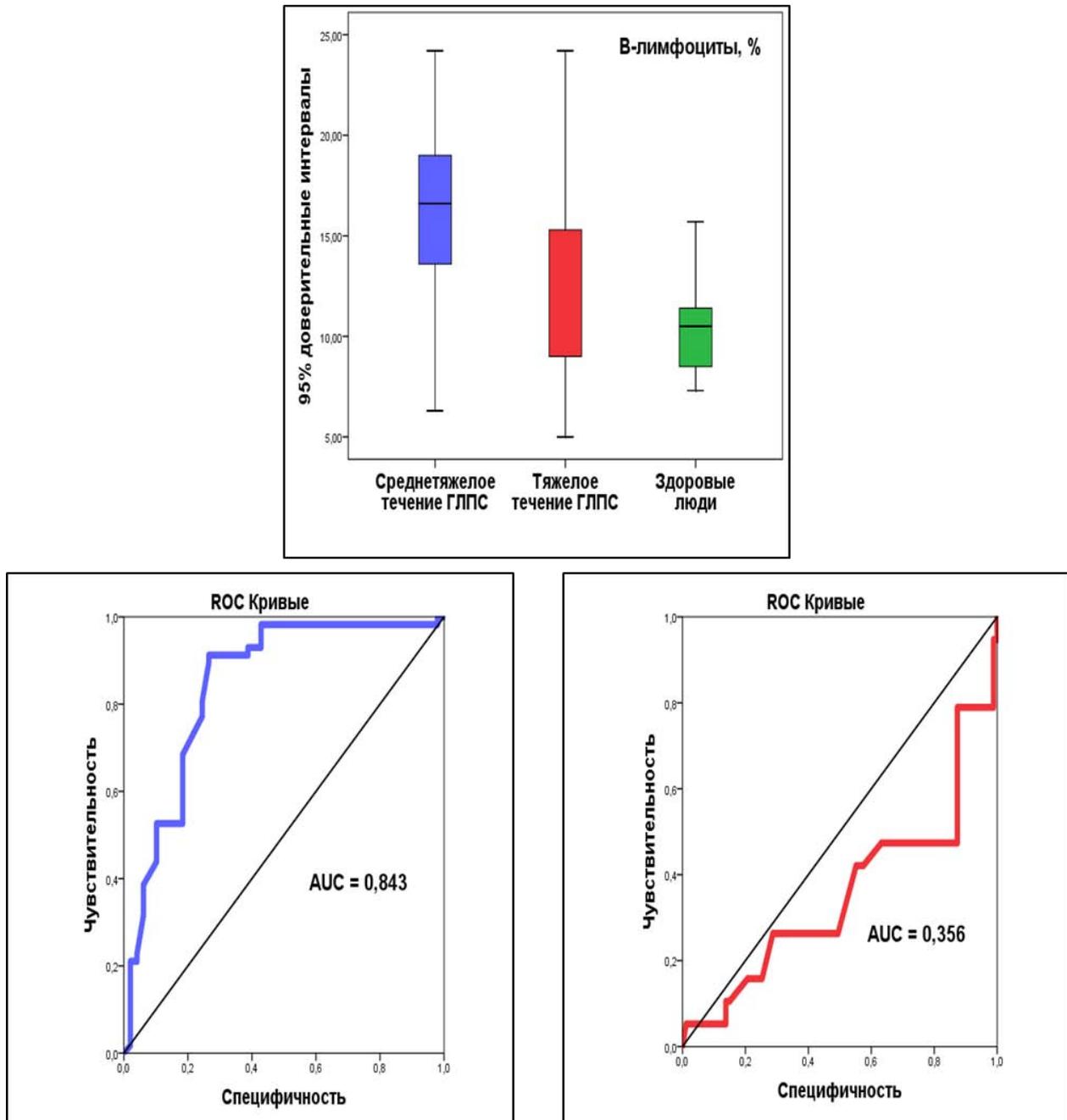
В олигоурический период ГЛПС проявились сдвиги со стороны еще одного фенотипа лимфоцитов, реакция которых не была отмечена в начальный период. Речь идет об NKT, содержание которых в крови пациентов практически не менялось по сравнению со здоровыми людьми при среднетяжелом течении, а при тяжелом течении возрастало в 3,4 раза. Рост числа этих клеток происходил исключительно за счет  $CD3^+CD56^+CD8^+$  субпопуляции.

Следует отметить и такое статистически значимое отклонение в группе пациентов с тяжелым течением ГЛПС как снижение числа натуральных киллеров, экспрессирующих активирующий рецептор NKG2D. У здоровых людей доля таких клеток среди натуральных киллеров составляла 74%, у пациентов со среднетяжелым течением ГЛПС уже значительно меньше – 44%, а у пациентов с тяжелым течением – всего 28%, в то время как у CTL, как отмечено выше, экспрессия этих рецепторов, наоборот, возрастала.

Все указанные показатели, обладающие статистически подтвержденной информативностью, подвергались далее анализу для оценки их диагностической значимости.

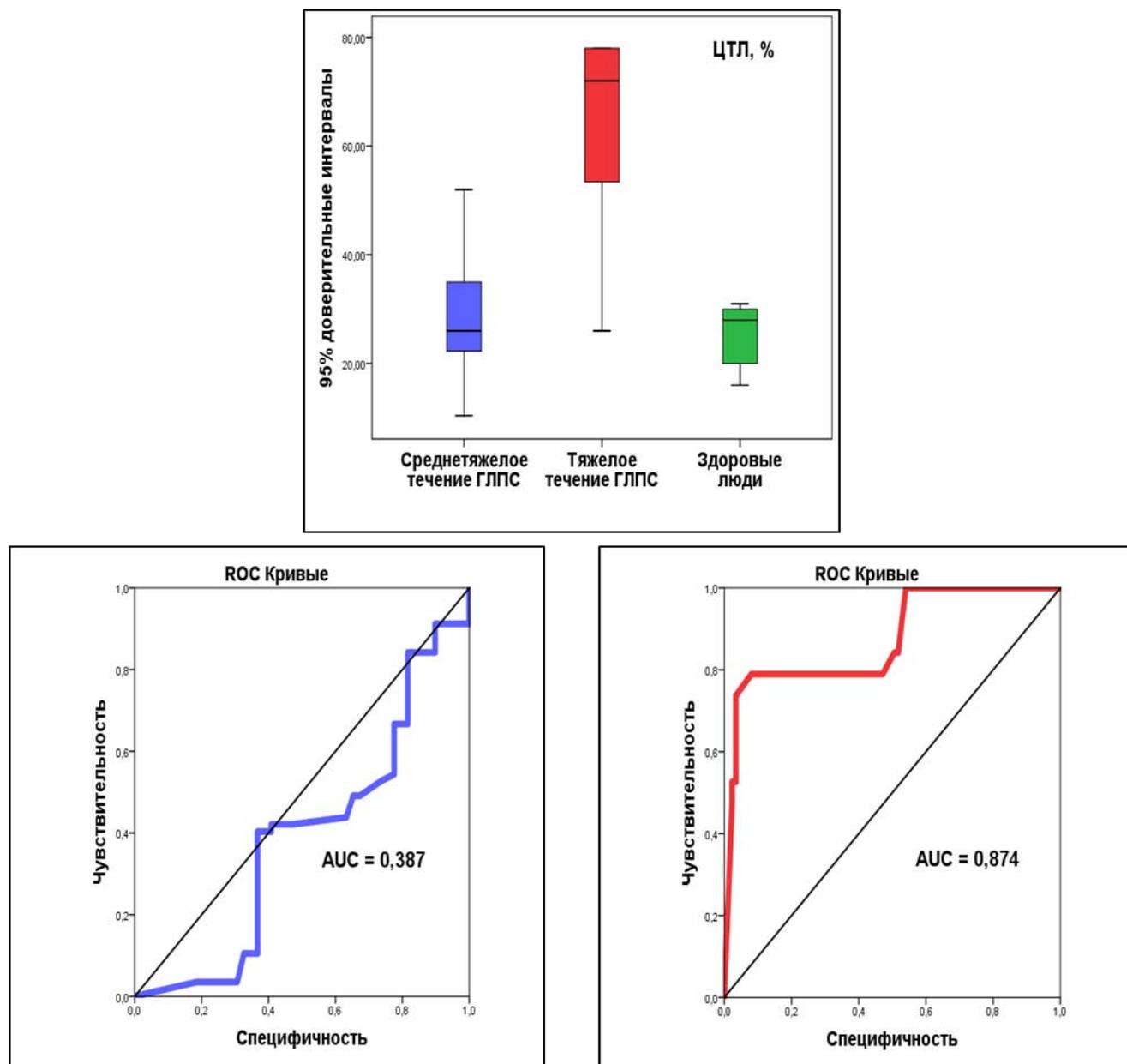
На *рисунке 53* показаны 95%-ные доверительные интервалы процента В-лимфоцитов среди лимфоцитов крови. Число этих клеток при среднетяжелом течении заболевания статистически значимо выше, чем при тяжелом течении. В

первом случае при значениях выше 15% можно с высокой диагностической значимостью ( $AUC = 0,843$ ) констатировать у пациента развитие среднетяжелого течения. Что касается тяжелого течения, то относительное число В-лимфоцитов примерно соответствует показателям у здоровых людей и диагностического значения в этом случае не имеет ( $AUC = 0,356$ ).



**Рисунок 53 – 95 % доверительные интервалы процента В-лимфоцитов в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести и ROC-кривые их диагностической значимости в олигоурический период**

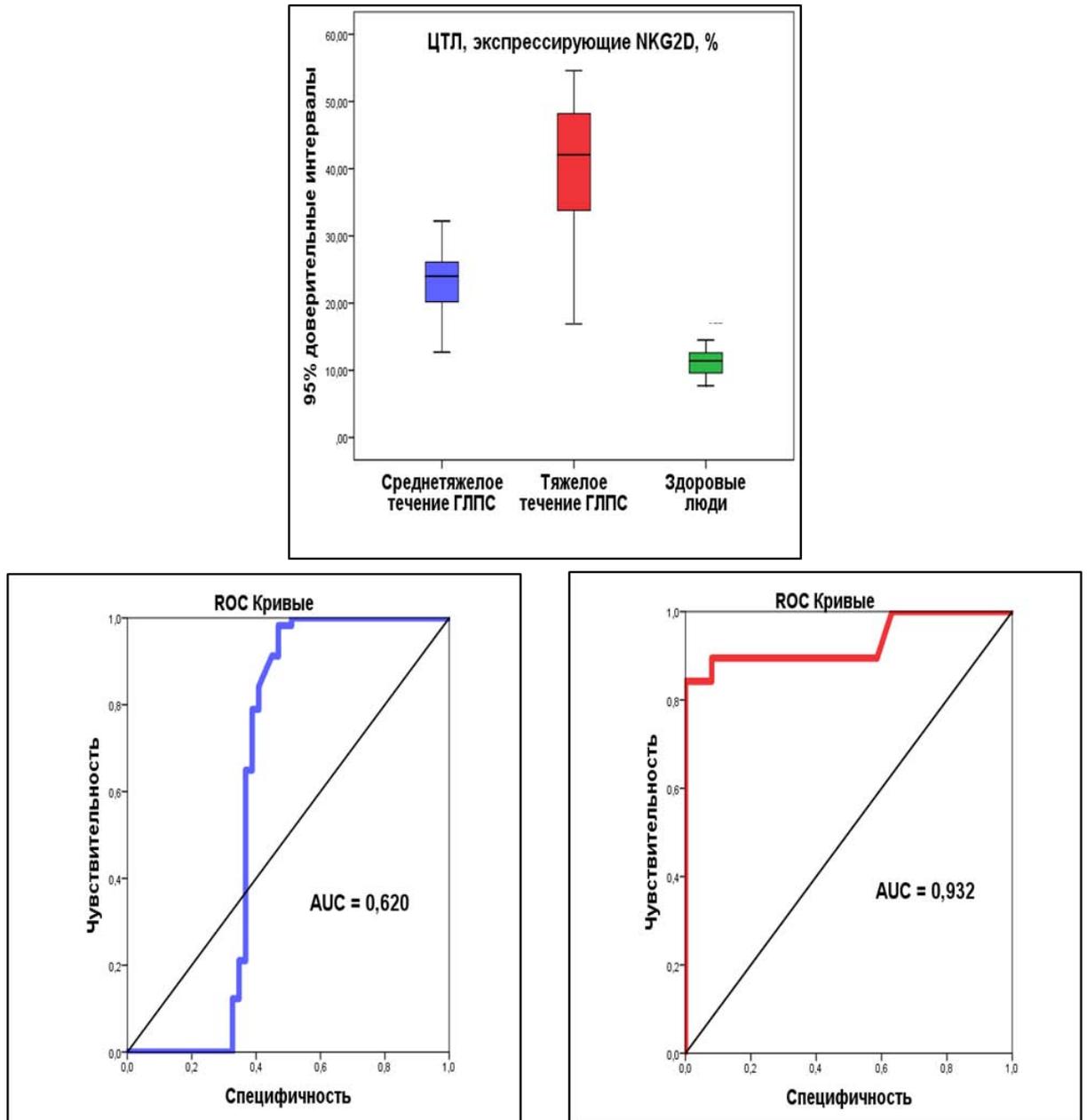
Поскольку олигоурический период соответствует разгару болезни, то можно предположить, что в случае тяжелого течения такой вирусной инфекции как ГЛПС будет преобладать клеточно-опосредованный иммунный ответ. Высказанное предположение подтверждает оценка числа цитотоксических Т-лимфоцитов, как это показано на *рисунке 54*.



**Рисунок 54 – 95 % доверительные интервалы процента цитотоксических лимфоцитов в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести и ROC-кривые их диагностической значимости в олигоурический период**

У пациентов с тяжелым течением ГЛПС процент CTL среди лимфоцитов крови был достоверно выше, чем у больных со среднетяжелым течением. Доля этих клеток в крови в олигоурический период выше 36% указывала на тяжелое течение

с высокой диагностической значимостью ( $AUC = 0,874$ ) в отличие от среднетяжелого течения ( $AUC = 0,387$ ). В то же время диагностическая значимость возрастала, если определялась для числа CTL, экспрессирующих NKG2D активирующий рецептор (рисунок 55).



**Рисунок 55 – 95 % доверительные интервалы процента цитотоксических лимфоцитов с фенотипом  $CD3^+CD8^+CD56^-CD314^+$  в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести и ROC-кривые их диагностической значимости в олигоурический период**

Про предполагаемое патогенетическое значение этих клеток при ГЛПС уже говорилось выше: в начальный период заболевания их число двукратно повышалось, но только при среднетяжелом течении, а при тяжелом течении ГЛПС

оно оставалось неизменным. В олигоурический период число  $\text{NKG2D}^+$  CTL при среднетяжелом течении сохраняло повышенный уровень значений, в то время как при тяжелом течении ГЛПС резко увеличивалось – примерно в 2,7 раза.

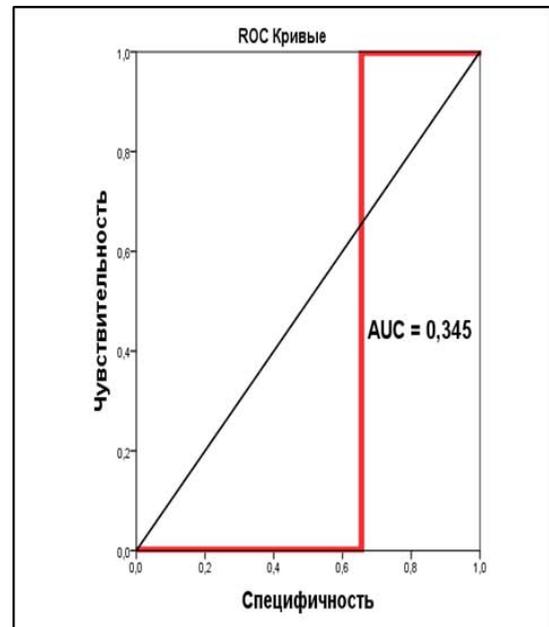
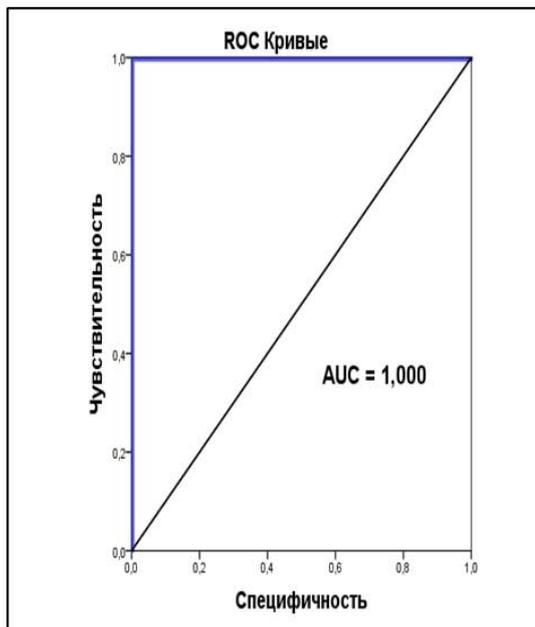
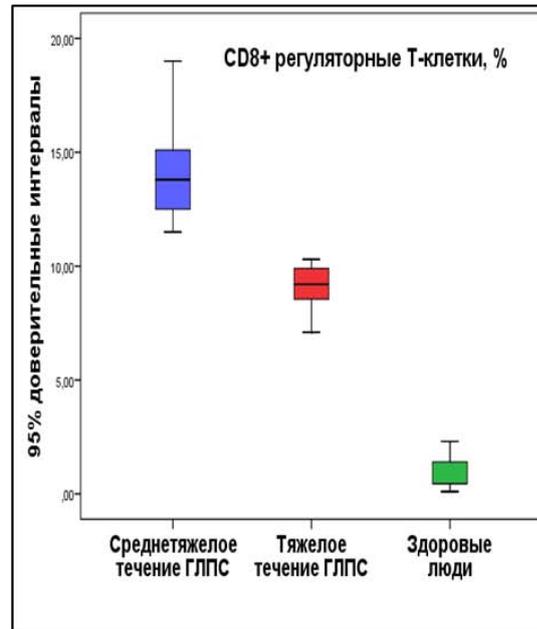
В соответствии с этим при значениях выше 27% числа  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD56}^-\text{CD314}^+$  клеток можно было предполагать наличие у пациента ГЛПС тяжелого течения с очень высокой диагностической значимостью при  $\text{AUC} = 0,932$ .

Число регуляторных Т-клеток при ГЛПС тяжелого течения в олигоурический период было достоверно ниже, но только в случае, если эти клетки имели фенотип  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$  (рисунок 56).

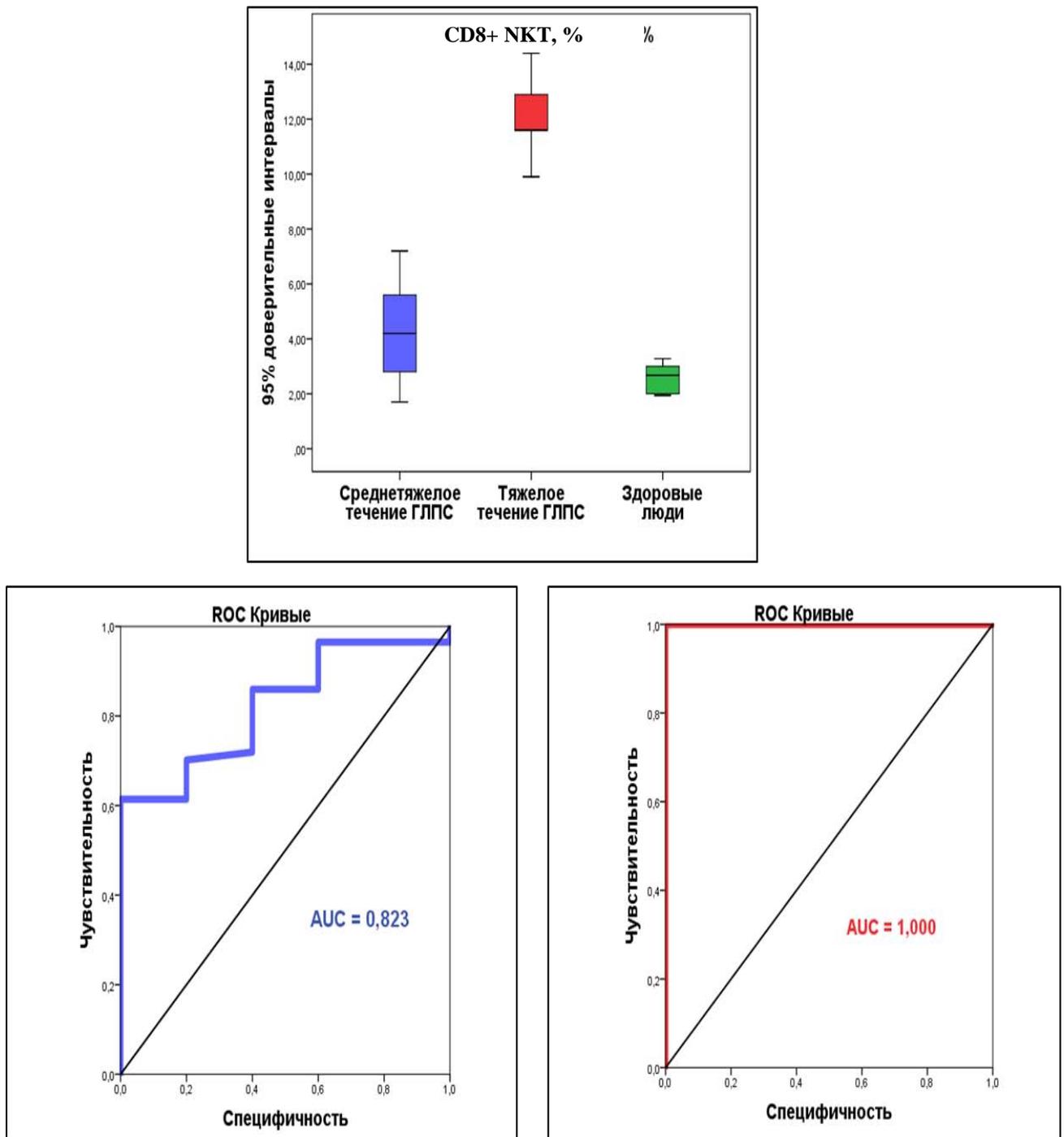
При значениях выше 11% этот показатель указывал на среднетяжелое течение ГЛПС, при этом его диагностическая значимость оценивалась как максимальная ( $\text{AUC} = 1,0$ ). При тяжелом течении ГЛПС отклонение величин этого показателя диагностического значения не имело, поскольку площадь под ROC-кривой ( $\text{AUC}$ ) составляла всего 0,345.

Число регуляторных Т-клеток с фенотипом  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ , повышенное в начальный период ГЛПС не зависело от тяжести течения заболевания и оставалось в олигоурический период на том же уровне.

Нами уже отмечалось, что, начиная с олигоурического периода, было установлено очень значительное возрастание процентного содержания в крови пациентов с ГЛПС НКТ (рисунок 57), обладающих одновременно фенотипическими признаками Т-лимфоцитов и натуральных киллеров ( $\text{CD3}^+\text{CD56}^+$ ). Наблюдаемый рост на статистически достоверном уровне затрагивал только одну субпопуляцию этих клеток – с фенотипом  $\text{CD3}^+\text{CD56}^+\text{CD8}^+$ . При числе этих клеток выше 11% среди лимфоцитов крови можно было с уверенностью говорить о тяжелом течении ГЛПС. Столь высокий уровень содержания НКТ в крови обладал высокой диагностической значимостью при среднетяжелом течении ( $\text{AUC} = 0,823$ ) и максимальной значимостью ( $\text{AUC} = 1,0$ ) при тяжелом течении ГЛПС.

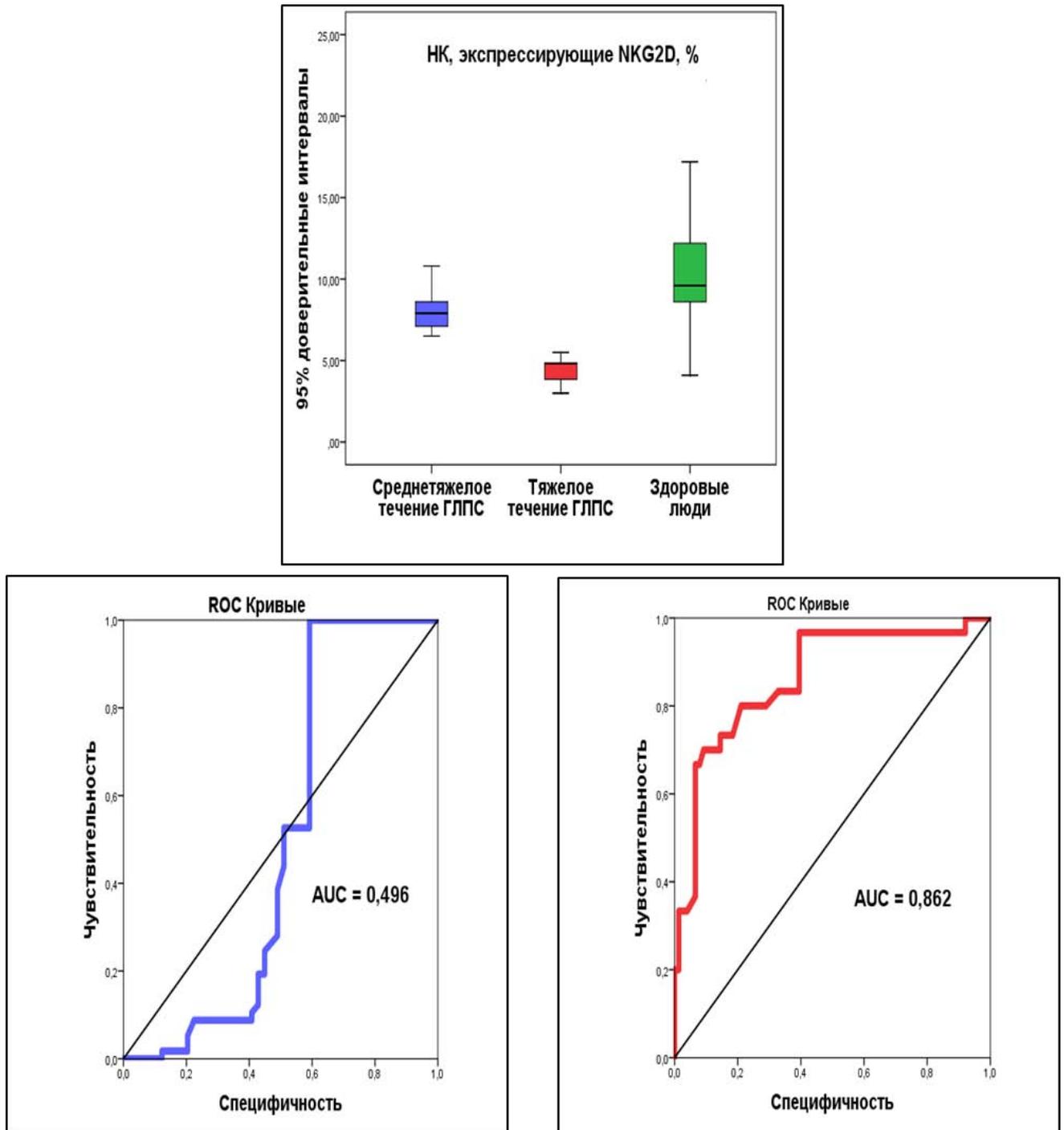


**Рисунок 56 – 95 % доверительные интервалы процента CD8<sup>+</sup> Т-регуляторных лимфоцитов в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести и ROC-кривые их диагностической значимости в олигоурический период**



**Рисунок 57 – 95 % доверительные интервалы процента NKT лимфоцитов в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести и ROC-кривые их диагностической значимости в олигоурический период**

Наконец, еще одна категория лимфоцитов, проявляющая статистически достоверные различия по количественному содержанию в крови при среднетяжелом и тяжелом течении ГЛПС – натуральные киллеры, экспрессирующие активирующий рецептор NKG2D (рисунок 58).



**Рисунок 58 – 95 % доверительные интервалы процента НК лимфоцитов, экспрессирующих NKG2D, в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести и ROC-кривые их диагностической значимости в олигоурический период**

Эти клетки с фенотипом  $CD3^+CD16^+CD56^+CD314^+$  при тяжелом течении ГЛПС показывали очень низкие значения и при величине ниже 7,5% могли свидетельствовать в пользу тяжелого течения заболевания. Диагностическая значимость такого снижения была очень высокой и даже близка к максимальной,

поскольку при выполнении ROC-анализа площадь под ROC-кривой (AUC) составляла 0,862, как это наглядно представлено на *рисунке 58*.

Таким образом, при анализе фенотипических характеристик лимфоцитов крови многие показатели их относительного содержания в крови статистически значимо отличались от показателей здоровых людей. Более того, многие из этих фенотипов позволяли даже дифференцировать среднетяжелое и тяжелое течение ГЛПС.

Более высокие значения при тяжелом течении ГЛПС с высокой (AUC 0,8-0,9) или очень высокой (AUC > 0,9) диагностической значимостью принимали такие показатели, как CTL, в том числе экспрессирующие NKG2D, NKT. Наиболее низкие значения при тяжелом течении ГЛПС (при среднетяжелом течении более высокие значения) приобретали: В-лимфоциты; CD8<sup>+</sup> регуляторные Т-клетки; натуральные киллеры, экспрессирующие NKG2D.

Далее в олигоурический период геморрагической лихорадки с почечным синдромом анализировались уровни цитокинов крови у пациентов с разной тяжестью течения заболевания, а также у клинически здоровых людей. Результаты такого анализа представлены в *таблице 21* и в виде процентного отклонения показателей при тяжелом течении геморрагической лихорадки с почечным синдромом от параметров при среднетяжелом течении – на *рисунке 59*.

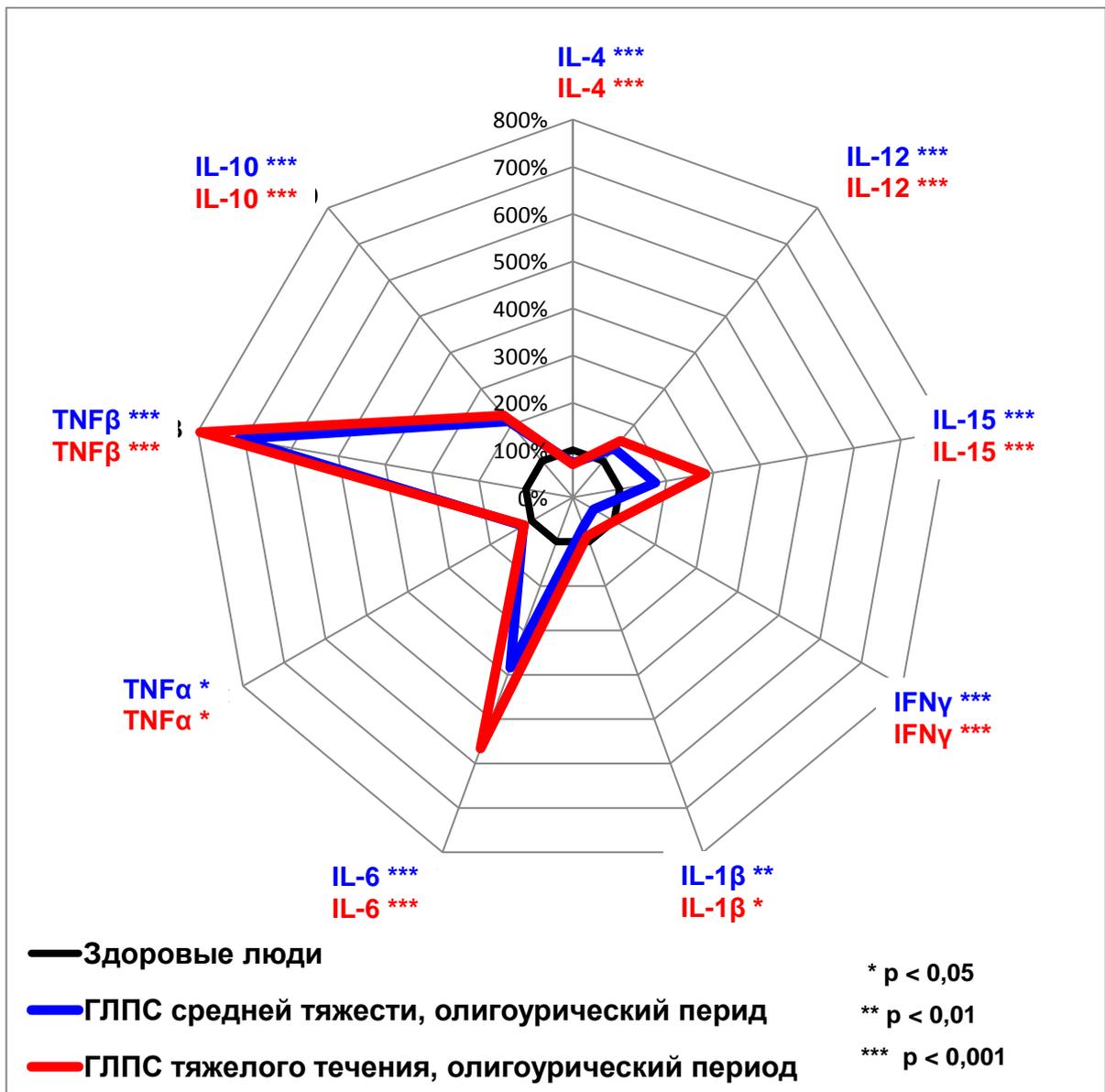
Как видно из таблицы 21, среди определяемых цитокинов нет ни одного, который бы не отличался по содержанию в крови пациентов с ГЛПС от показателей здоровых людей. К цитокинам, показывающим наибольшую степень таких отклонений, принадлежат IL-15, IL-6, TNF $\beta$ , IL-10.

Особого внимания заслуживает нарастание в 11-12 раз у пациентов с ГЛПС содержания в крови TNF $\beta$ . Этот цитокин вырабатывается Т-лимфоцитами и обычно оказывает локальный эффект, который проявляется пролиферацией клеток и их апоптозом.

**Таблица 21 – Уровни цитокинов в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в олигоурический период по сравнению с данными клинически здоровых лиц**

Цитокины плазмы крови	Медиана (минимум; максимум)			Критерий Манна-Уитни
	ГЛПС средней тяжести n = 53	ГЛПС тяжелого течения n = 12	Здоровые лица n = 15	p <sub>1</sub> p <sub>2</sub> p <sub>3</sub>
Интерлейкин-4 (IL-4), пг/мл	1,60 (1,50; 1,80)	1,55 (1,50; 1,70)	2,2 (1,3; 4,2)	<0,001*** <0,001*** 0,834
Интерлейкин-12 (IL-12), пг/мл	12,3 (10,9; 13,7)	14,2 (12,3; 14,3)	9,1 (7,8; 14,4)	<0,001*** 0,001*** 0,069
Интерлейкин-15 (IL-15), пг/мл	5,80 (5,21; 6,28)	9,32 (6,92; 9,88)	3,29 (1,79; 4,03)	<0,001*** <0,001*** <0,001***
Интерферон $\gamma$ , (IFN $\gamma$ ), пг/мл	86,5 (64,4; 102,8)	171,7 (80,2; 302,1)	169,3 (127,6; 208,6)	<0,001*** <0,001*** 0,511
Интерлейкин-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), пг/мл	2,49 (2,07; 3,19)	3,35 (3,22; 3,72)	3,8 (2,5; 5,2)	0,002** 0,015* 0,064
Интерлейкин-6 (IL-6), пг/мл	23,8 (17,0; 32,3)	35,1 (30,4; 39,4)	6,2 (2,7; 9,2)	<0,001*** <0,001*** 0,006**
Фактор некроза опухолей $\alpha$ (TNF $\alpha$ ), пг/мл	3,0 (2,74; 3,87)	2,94 (2,87; 3,33)	2,5 (1,8; 3,5)	0,011* 0,023* 0,392
Фактор некроза опухолей $\beta$ (TNF $\beta$ ), пг/мл	52,3 (48,5; 82,1)	56,2 (51,0; 71,7)	4,7 (2,6; 5,95)	<0,001*** <0,001*** 0,556
Интерлейкин-10 (IL-10), пг/мл	14,3 (11,2; 100,5)	15,4 (13,9; 163,0)	6,8 (3,4; 9,1)	<0,001*** <0,001*** 0,432

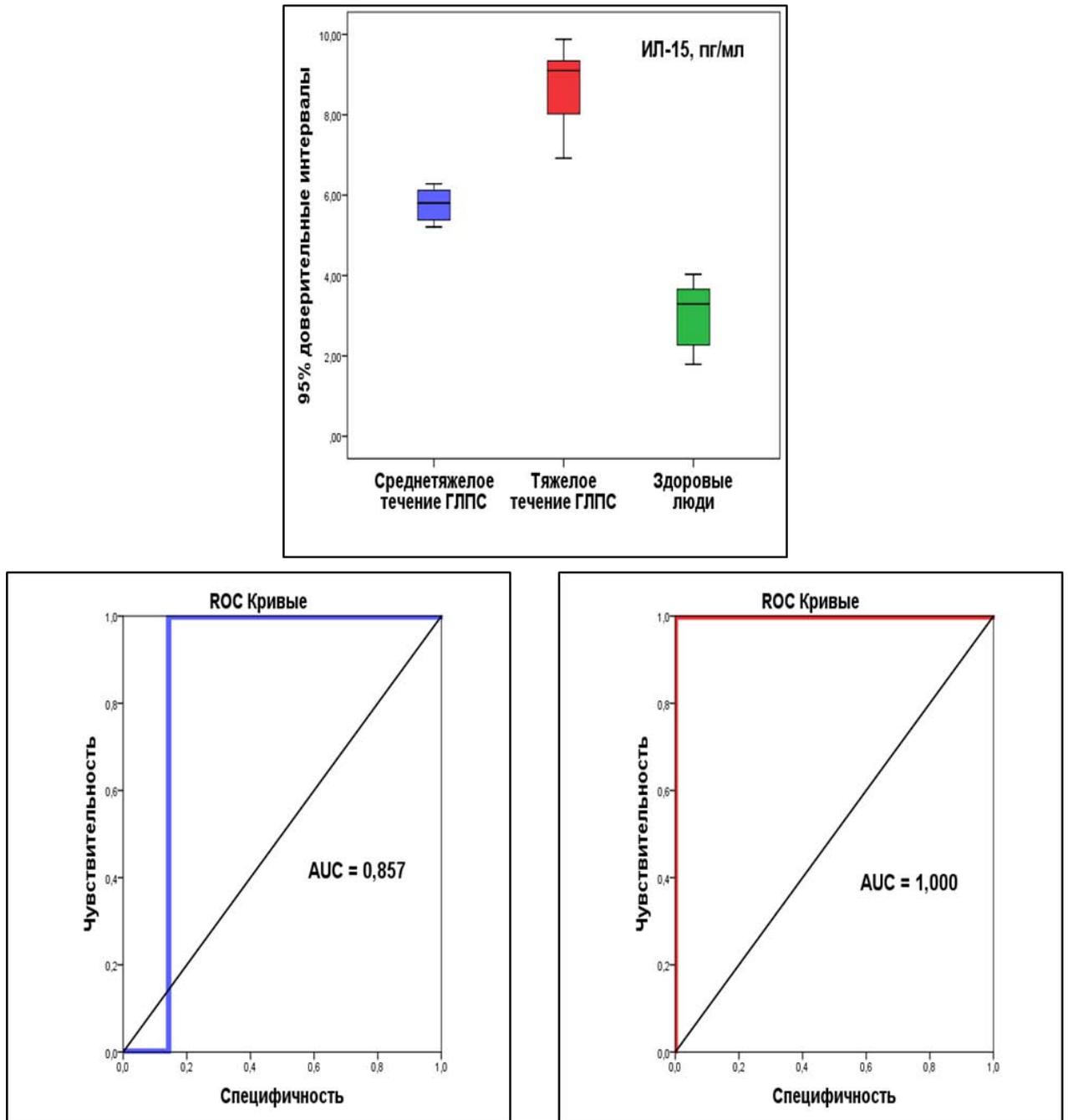
*Примечание:* n - число исследований в группе, p<sub>1</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС и здоровых лиц, p<sub>2</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ОРВИ и здоровых лиц, p<sub>3</sub> - вероятность различий между группами ГЛПС и ОРВИ; статистическая значимость различий: \* при p<0,05; \*\* при p<0,01; \*\*\* при p<0,001.



**Рисунок 59 – Проценты отклонения содержания цитокинов в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом среднетяжелого и тяжелого течения от показателей клинически здоровых людей в олигоурический период**

При ГЛПС основными клетками-мишенями служат эндотелиальные клетки, по этой причине, по всей вероятности, и наблюдается рост этого цитокина в крови. Степень роста  $TNF\beta$  в крови при ГЛПС наиболее значительна, хотя различий между тяжелым и среднетяжелым течением не выявляет.

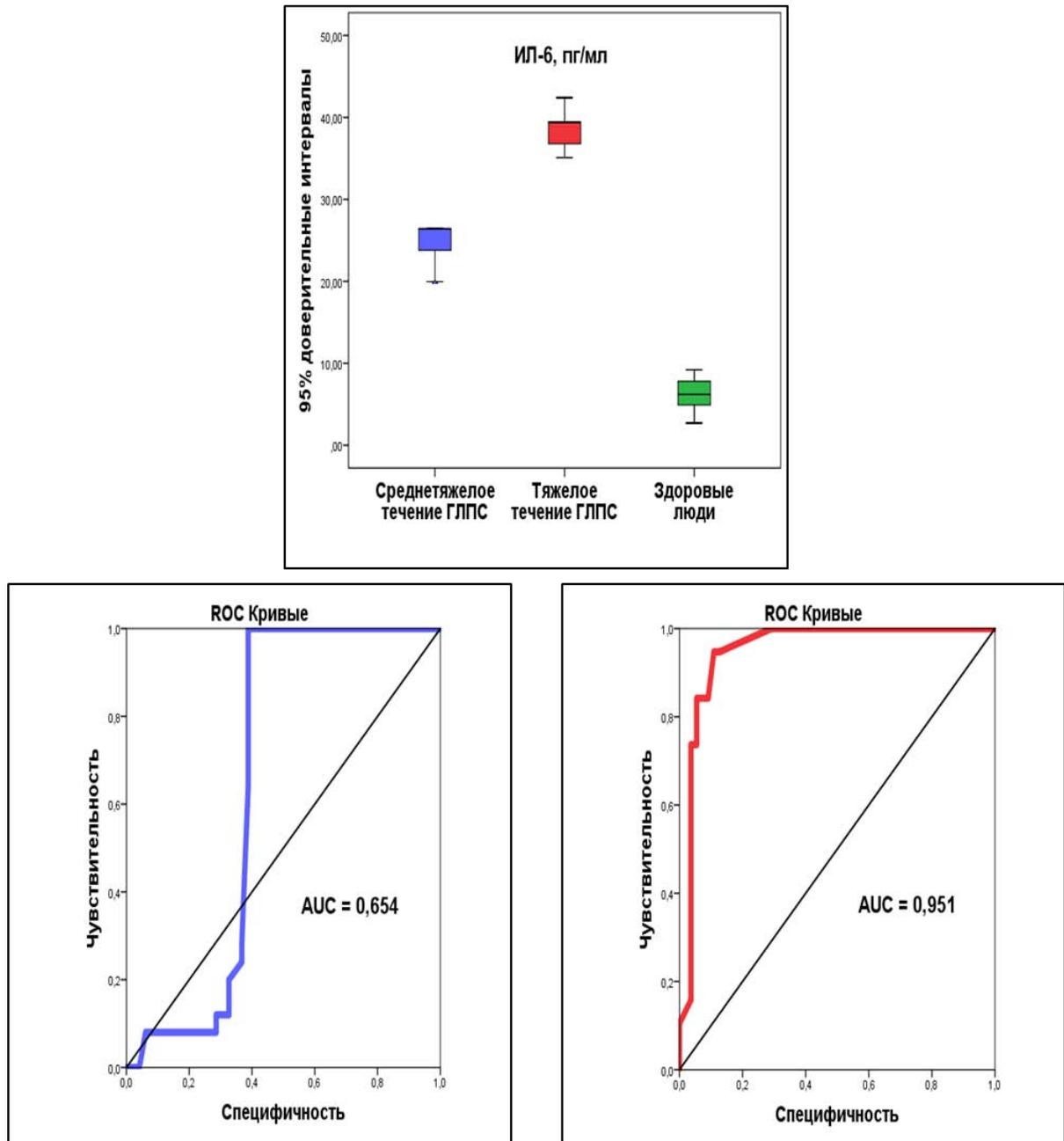
И из таблицы, и из рисунка следует, что различия цитокиновых профилей при ГЛПС тяжелого и среднетяжелого течения выявлялись только на уровне только 2-х цитокинов: IL-15 и IL-6. Именно эти цитокины анализировались далее на определение диагностической значимости.



**Рисунок 60 – 95 % доверительные интервалы интерлейкина-15 в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести и ROC-кривые их диагностической значимости в олигоурический период**

Как следует из *рисунка 60*, уровни ИЛ-15 обладали высокой диагностической значимостью ( $AUC = 0,857$ ) при среднетяжелом течении ГЛПС в диапазоне значений от 4,0 до 6,5 пг/мл, а также максимальной диагностической значимостью ( $AUC = 1,0$ ) при тяжелом течении заболевания, если содержание в крови было выше 6,5 пг/мл.

IL-6, как показывает *рисунок 61*, тоже обладал очень высокой диагностической значимостью ( $AUC = 0,951$ ) при значениях выше 37 пг/мл, но только при тяжелом течении ГЛПС, поскольку при среднетяжелом течении площадь под ROC-кривой ( $AUC$ ) для этого цитокина составляла 0,654, что свидетельствовало об отсутствии диагностической значимости.



**Рисунок 61 – 95 % доверительные интервалы интерлейкина-6 в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести и ROC-кривые их диагностической значимости в олигоурический период**

Таким образом, в олигоурический период геморрагической лихорадки с почечным синдромом преобладала симптоматика острого повреждения почек, имелись проявления геморрагического синдрома.

Суррогатные признаки ГЛПС в этот период довольно хорошо описаны в современной литературе, в наших исследованиях к ним принадлежали отклонения со стороны таких показателей крови как мочевины, креатинина, холестерина, ферментные системы (аланинаминотрансфераза, аспартат-аминотрансфераза,  $\gamma$ -глутамил-транспептидаза, лактатдегидрогеназа), железосодержащие белки (ферритин, трансферрин), С-реактивный белок, ионы калия.

Резко снижалось суточное количество мочи, наблюдались тромбоцитопения и лейкоцитоз, палочкоядерный сдвиг нейтрофилов, лимфопения, моноцитоз, многократно возрастала СОЭ. Среди этих показателей особого внимания заслуживают лабораторные критерии тяжелого течения этого заболевания, к которым принадлежат наиболее выраженные сдвиги в виде роста содержания в крови мочевины, креатинина, активности АЛТ, падения суточного количества мочи.

Новым аспектом является определение доли наиболее информативных фенотипов лимфоцитов и содержания цитокинов в крови пациентов с ГЛПС в олигоурический период, к числу которых принадлежат обладающие высокой и очень высокой диагностической значимостью:

- при среднетяжелом течении рост доли В-лимфоцитов, CD8<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток, уровня IL-15;

- при тяжелом течении рост доли CTL, NKG2D<sup>+</sup> CTL, NKT, падение доли NKG2D<sup>+</sup> NK, рост уровней IL-15 и IL-6.

#### **5.4 – Клинико-лабораторная характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом разной степени тяжести в полиурический период заболевания**

В данном разделе исследований анализируются клинико-лабораторные признаки ГЛПС разной степени тяжести в полиурический период заболевания (12-30 дни болезни).

Переход к полиурии, как отмечено в наших исследованиях и подтверждается данными литературы, проявляется улучшением общего состояния больных. Прекращается рвота, постепенно исчезают боли в пояснице и животе, нормализуются сон и аппетит, увеличивается суточное количество мочи до 3-10 л в сутки, характерна никтурия. Сохраняется слабость, сухость во рту, появляется жажда. Длительность полиурии и изогипостенурии в зависимости от тяжести клинического течения болезни может колебаться от нескольких дней до нескольких недель. Состояние больного прогрессивно улучшается. Однако темп улучшения состояния не всегда идет параллельно нарастанию диуреза. Сохраняются некоторые сдвиги со стороны клинического и биохимического анализа крови и мочи.

В *таблице 22* и на *рисунке 62* представлены результаты клинического анализа крови пациентов с ГЛПС разной степени тяжести в полиурический период в сравнении с показателями здоровых людей.

**Таблица 22 – Показатели клинического анализа крови у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в полиурический период заболевания в сравнении с показателями клинически здоровых людей**

Лабораторные показатели	Медиана (минимум; максимум)			Критерий Манна-Уитни
	ГЛПС средней тяжести, n = 53	ГЛПС тяжелого течения, n = 12	Здоровые лица n = 15	
1	2	3	4	5
Эритроциты (10 <sup>12</sup> клеток/л)	4,7 (3,6; 5,2)	4,7 (4,0; 6,0)	5,0 (3,3; 6,5)	0,194 0,411 0,474
Гемоглобин (г/л)	131,5 (98,0; 161,0)	132,5 (92,0; 190,0)	141 (104; 204)	0,624 0,802 0,698
Гематокрит (%)	41,6 (32,5; 46,0)	42,0 (28,0; 53,5)	39,9 (29,3; 55,7)	0,719 0,594 0,552
Тромбоциты (10 <sup>9</sup> клеток/л)	271,0 (56,4; 484,0)	181,5 (89,0; 309,0)	230,0 (187,0; 301,0)	0,088 0,009** < 0,001***

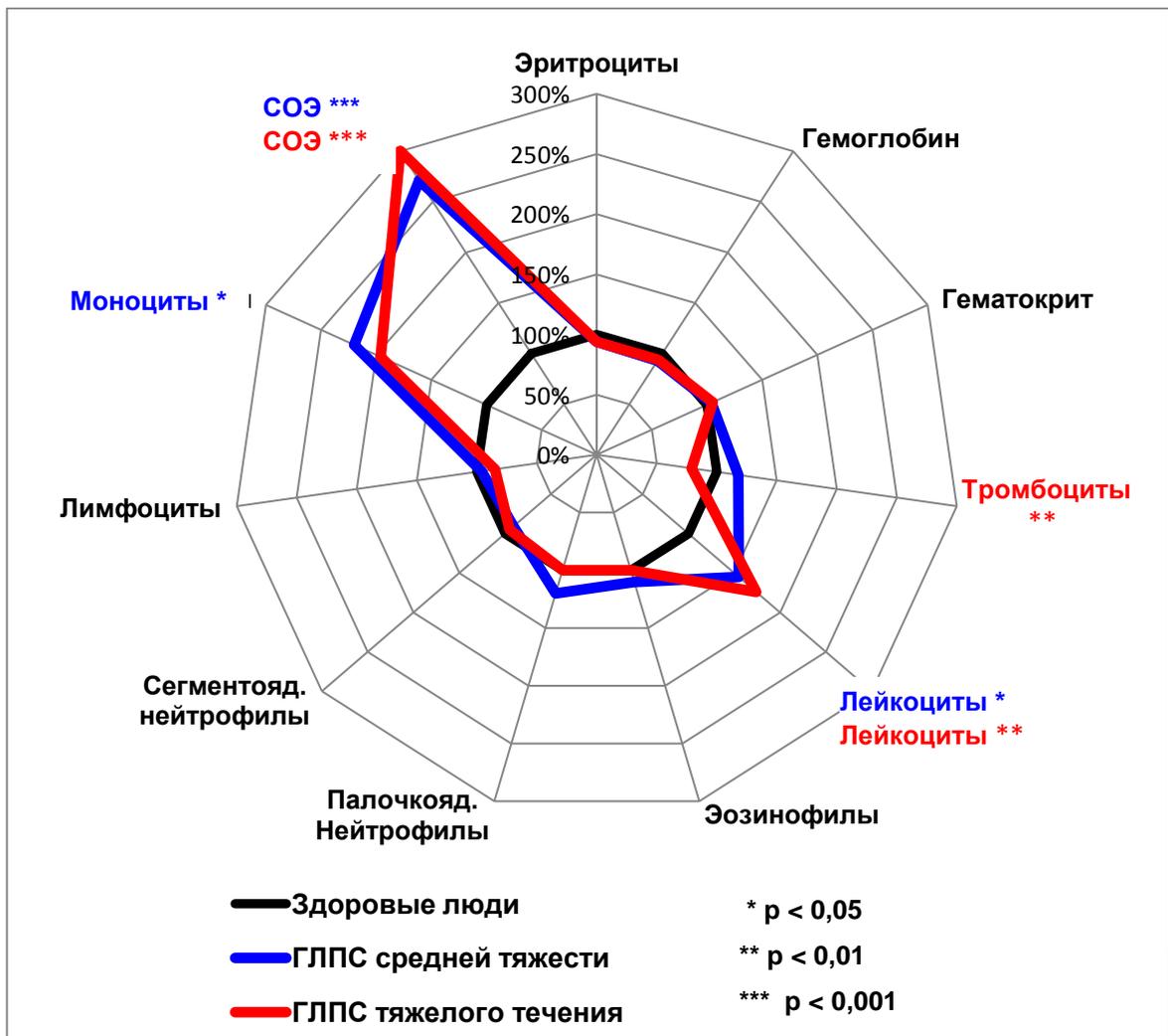
Продолжение таблицы 22

1	2	3	4	5
Лейкоциты (10 <sup>6</sup> клеток/л)	9,6 (4,0; 19,5)	10,8 (6,9; 36,0)	6,2 (3,4; 7,9)	0,011* 0,005** 0,300
Эозинофилы (%)	0 (0; 9,1)	1,0 (0; 1,6)	0 (0; 2,0)	0,983 0,254 0,673
Палочкоядерные нейтрофилы (%)	3,0 (0; 20,0)	2,0 (1,0; 4,0)	2 (1; 5)	0,336 0,813 0,234
Сегментоядерные нейтрофилы (%)	58,0 (37,0; 70,0)	61,0 (55,0; 73,0)	64 (42; 74)	0,443 0,237 0,522
Лимфоциты (%)	30,4 (10,0; 50,0)	27,0 (10,9; 42,0)	31,8 (19,2; 45,6)	0,780 0,492 0,146
Моноциты (%)	11,0 (4,0; 23,0)	9,8 (5,0; 16,0)	5 (4; 10)	0,041* 0,097 0,076
СОЭ мм/час	19,0 (5,0; 45,0)	21,0 (5,0; 47,0)	7 (3; 12)	< 0,001*** < 0,001*** 0,067

*Примечание:* n - число исследований в группе, p<sub>1</sub> – вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого течения и здоровых людей; p<sub>2</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС тяжелого течения и здоровых людей; p<sub>3</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения; статистическая значимость различий: \* при p < 0,05; \*\* при p < 0,01; \*\*\* при p < 0,001.

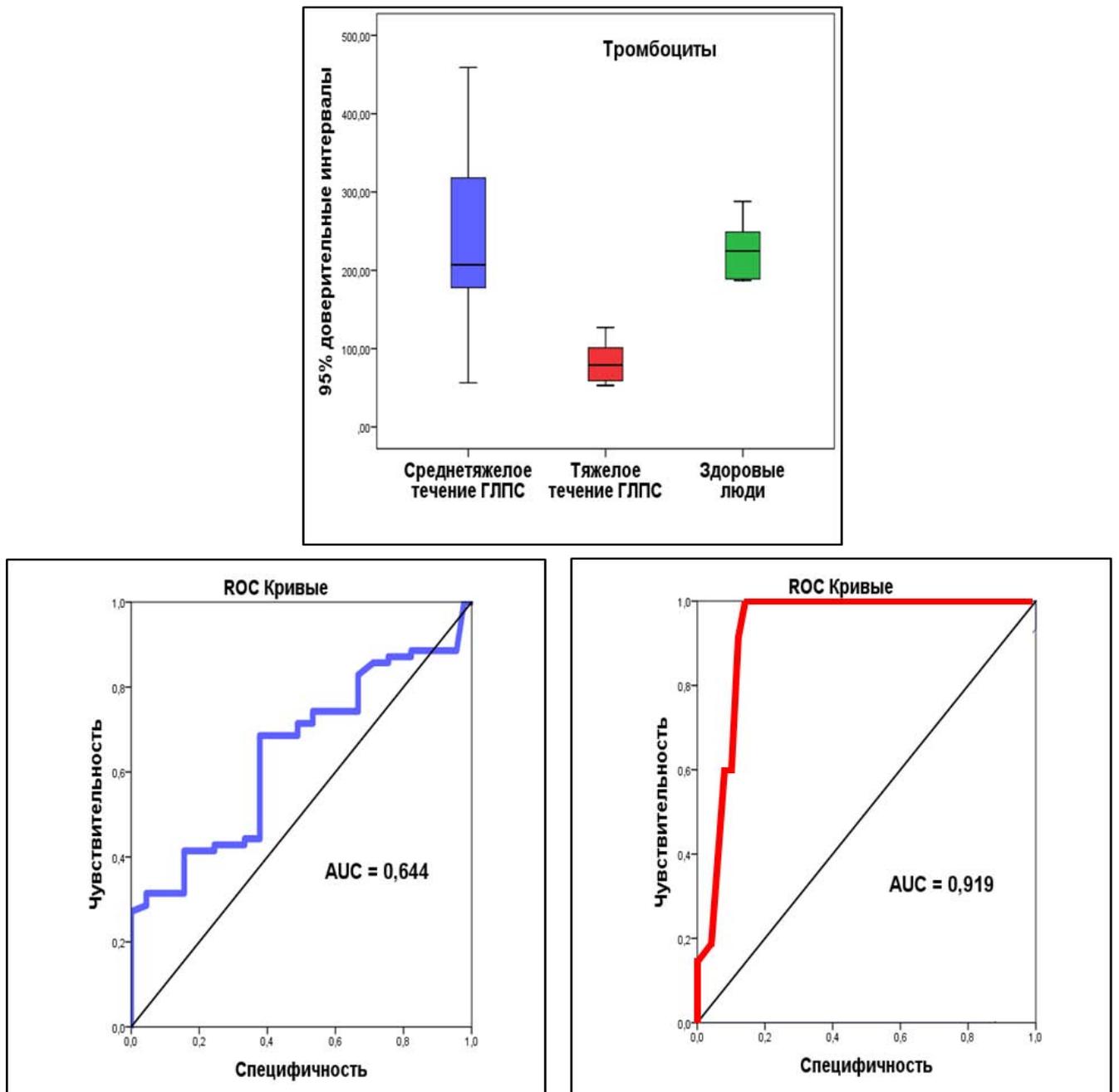
Как следует из *таблицы 22 и рисунка б2*, спектр отклонений от показателей здоровых людей у пациентов с ГЛПС в полиурический период от контроля значительно снизился.

Среди статистически достоверных сдвигов продолжала отмечаться тромбоцитопения, но только при тяжелом течении заболевания. Регистрировались также лейкоцитоз, моноцитоз, рост СОЭ, однако степень этих отклонений была относительно невелика. Кроме того, все эти сдвиги не выявляли статистически значимых различий у пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением ГЛПС.



**Рисунок 62 – Проценты отклонения показателей гемограмм у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в полиурический период от показателей у здоровых людей**

Определение диагностической значимости тромбоцитопении как единственного показателя гемограмм, выявляющего различия между среднетяжелым и тяжелым течением ГЛПС в полиурический период, проводилось путем анализа данных, представленных на *рисунке 63*. Как показывает рисунок, диагностическая значимость числа тромбоцитов в крови пациентов с ГЛПС в полиурический период проявлялась только при тяжелом течении заболевания. Значения этого показателя ниже  $110 \cdot 10^9$  клеток/л с очень высокой диагностической значимостью ( $AUC = 0,919$ ) при полиурии свидетельствовали в пользу тяжелого течения.



**Рисунок 63 – 95 % доверительные интервалы числа тромбоцитов в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести и ROC-кривые их диагностической значимости в полиурический период**

Далее анализировались особенности биохимических сдвигов в крови пациентов с ГЛПС разной степени тяжести в полиурическом периоде по сравнению с показателями здоровых людей. Эти данные представлены в *таблице 23* и на *рисунке 64*.

**Таблица 23 – Показатели биохимического анализа крови у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести в полиурический период по сравнению с данными клинически здоровых лиц**

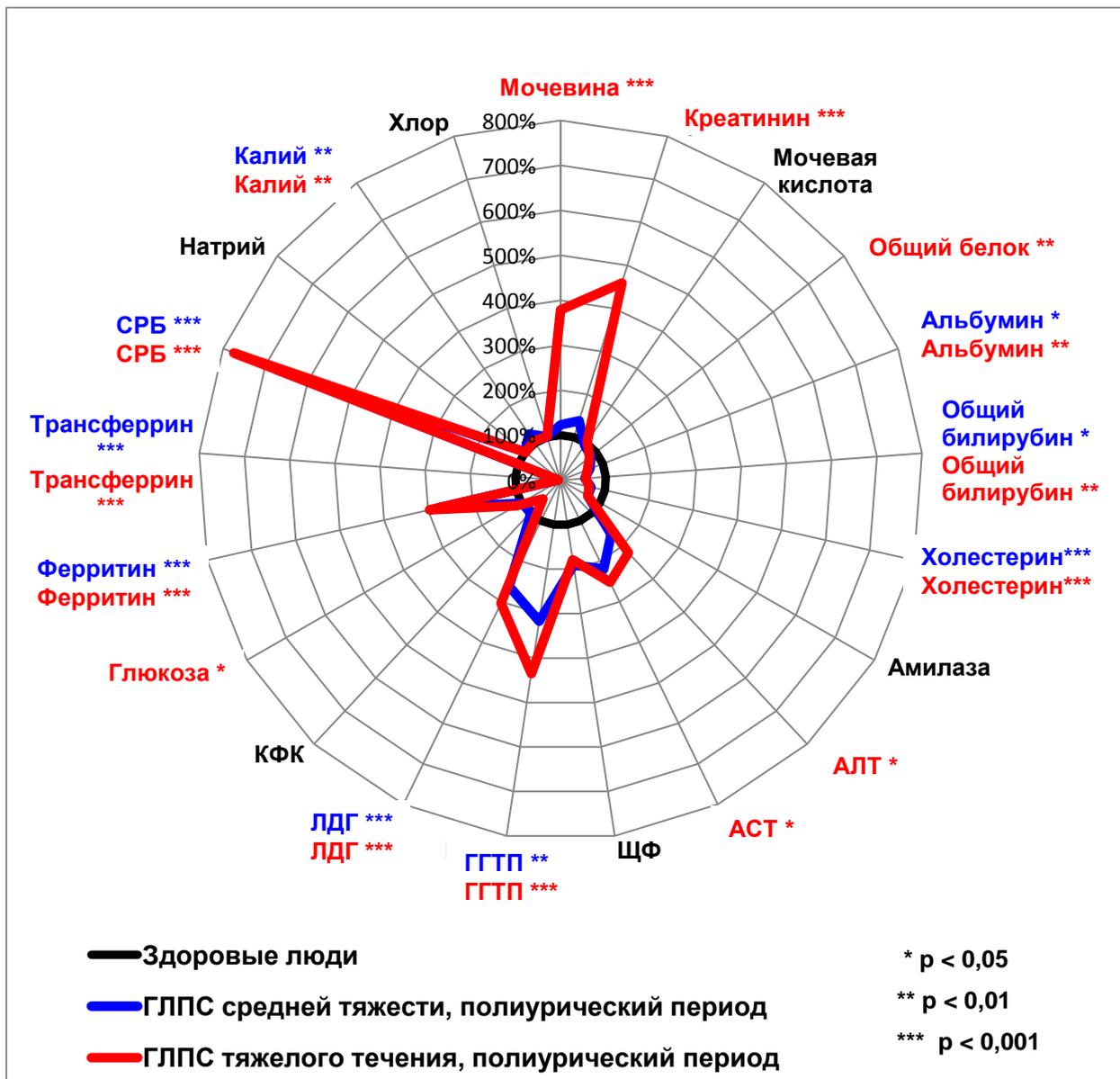
Лабораторные показатели	Медиана (минимум; максимум)			Критерий Манна-Уитни
	ГЛПС средней тяжести n = 53	ГЛПС тяжелого течения n = 20	Здоровые лица n = 15	p1 p2 p3
1	2	3	4	5
Мочевина, ммоль/л	6,5 (1,6; 28,0)	20,1 (4,4; 32,8)	5,3 (2,5; 6,8)	0,349 <0,001*** 0,003**
Креатинин, мкмоль/л	104,6 (47,4; 490,5)	348,9 (70,2; 711,6)	76,0 (54,0; 89,0)	0,068 <0,001*** 0,019*
Мочевая кислота, мкмоль/л	280,4 (98,5; 575,9)	310,8 (105,4; 668,0)	299,5 (220,0; 342,0)	0,588 0,462 0,487
Общий белок, г/л	64,3 (50,9; 91,5)	61,3 (45,6; 72,7)	75,0 (60,0; 88,0)	0,053 0,005** 0,283
Альбумин, г/л	34,2 (29,2; 42,1)	32,0 (25,5; 36,6)	49,8 (33,8; 54,3)	0,011* 0,007** 0,133
Общий билирубин, ммоль/л	6,2 (3,1; 18,7)	6,3 (3,9; 9,4)	11,4 (7,0; 18,0)	0,046* 0,003** 0,972
Холестерин, ммоль/л	3,6 (2,5; 11,6)	3,4 (1,9; 4,2)	5,2 (4,0; 6,3)	<0,001*** <0,001*** 0,441
Амилаза, ЕД/л	38,1 (30,3; 91,4)	37,8 (31,7; 61,8)	55,0 (54,0; 75,0)	0,213 0,714 0,802
Аланинаминотрансфераза (АЛТ), ЕД/л	43,5 (8,4; 148,6)	58,4 (34,6; 167,9)	26,5 (13,0; 51,0)	0,262 0,017* 0,183
Аспаратаминотрансфераза (АСТ), ЕД/л	40,6 (21,7; 84,2)	46,7 (19,5; 72,7)	18,5 (14,0; 35,0)	0,383 0,041* 0,943
Щелочная фосфатаза (ЩФ), ЕД/л	137,4 (74,5; 141,0)	129,2 (34,6; 141,0)	72,0 (44,0; 107,0)	0,053 0,186 0,594
γ-глутамилтранспептидаза (ГГТП), ЕД/л	39,3 (26,5; 151,6)	54,0 (43,7; 104,3)	12,4 (8,3; 15,4)	0,001** <0,001*** 0,313

Продолжение таблицы 23

1	2	3	4	5
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ), ЕД/л	443,2 (61,6; 1902,0)	513,2 (320,0; 770,9)	169,0 (135,0; 200,0)	<0,001*** <0,001*** 0,757
Креатинфосфокиназа (КФК), ЕД/л	62,6 (16,4; 507,7)	37,8 (25,6; 49,9)	66,0 (25,0; 101,0)	0,627 0,106 0,353
Глюкоза, г/л	5,2 (4,0; 6,7)	5,8 (4,5; 6,9)	5,1 (3,5; 8,5)	0,068 0,023* 0,234
Ферритин, мкг/л	348,9 (344,7; 537,0)	380,0 (379,5; 674,0)	128,0 (35,0; 174,0)	<0,001*** <0,001*** 0,608
Трансферрин, г/л	2,2 (1,8; 2,6)	2,0 (2,0; 2,1)	38,0 (27,0; 41,0)	<0,001*** <0,001*** 0,731
С-реактивный белок (СРБ), мг/л	13,4 (5,0; 28,5)	18,2 (12,8; 33,6)	0,8 (0,5; 1,1)	<0,001*** <0,001*** 0,595
Натрий, ммоль/л	142,4 (131,6; 151,0)	140,0 (125,0; 147,0)	141,0 (136,0; 146,0)	0,727 0,723 0,322
Калий, ммоль/л	4,6 (3,1; 14,1)	3,9 (3,1; 5,7)	3,7 (3,0; 4,1)	0,001** 0,006** 0,183
Хлор, ммоль/л	102,0 (97,7; 110,0)	102,7 (91,0; 103,2)	101,0 (95,0; 106,0)	0,753 0,862 0,307

*Примечание:* n - число исследований в группе,  $p_1$  – вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого течения и здоровых людей;  $p_2$  - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС тяжелого течения и здоровых людей;  $p_3$  - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения; статистическая значимость различий: \* при  $p < 0,05$ ; \*\* при  $p < 0,01$ ; \*\*\* при  $p < 0,001$ .

В полиурический период ГЛПС многие биохимические показатели уже показывали тенденции к нормализации, тем не менее, такие параметры как мочевина, креатинин, некоторые ферментные системы крови, железосодержащие белки, С-реактивный белок продолжали выявлять статистически достоверные отклонения от показателей здоровых людей. Некоторые из этих параметров позволяли установить различия между среднетяжелым и тяжелым течением ГЛПС в полиурический период, но к ним относятся только мочевина и креатинин.

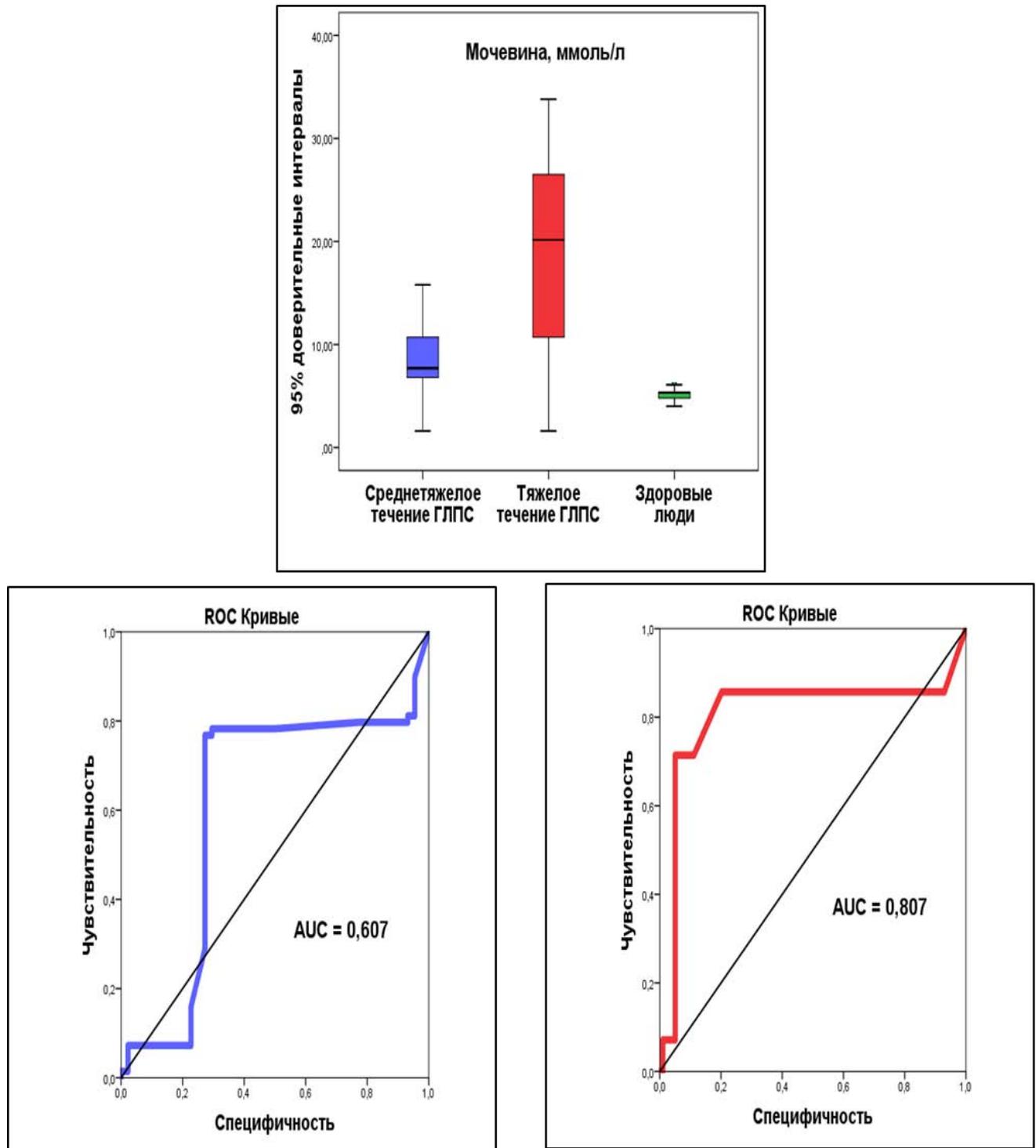


**Рисунок 64 – Проценты отклонения биохимических показателей гемограмм у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в полиурический период от показателей у здоровых людей**

Уровни мочевины и креатинина далее исследовались на наличие диагностической значимости путем анализа 95%-ных доверительных интервалов и построения ROC-кривых.

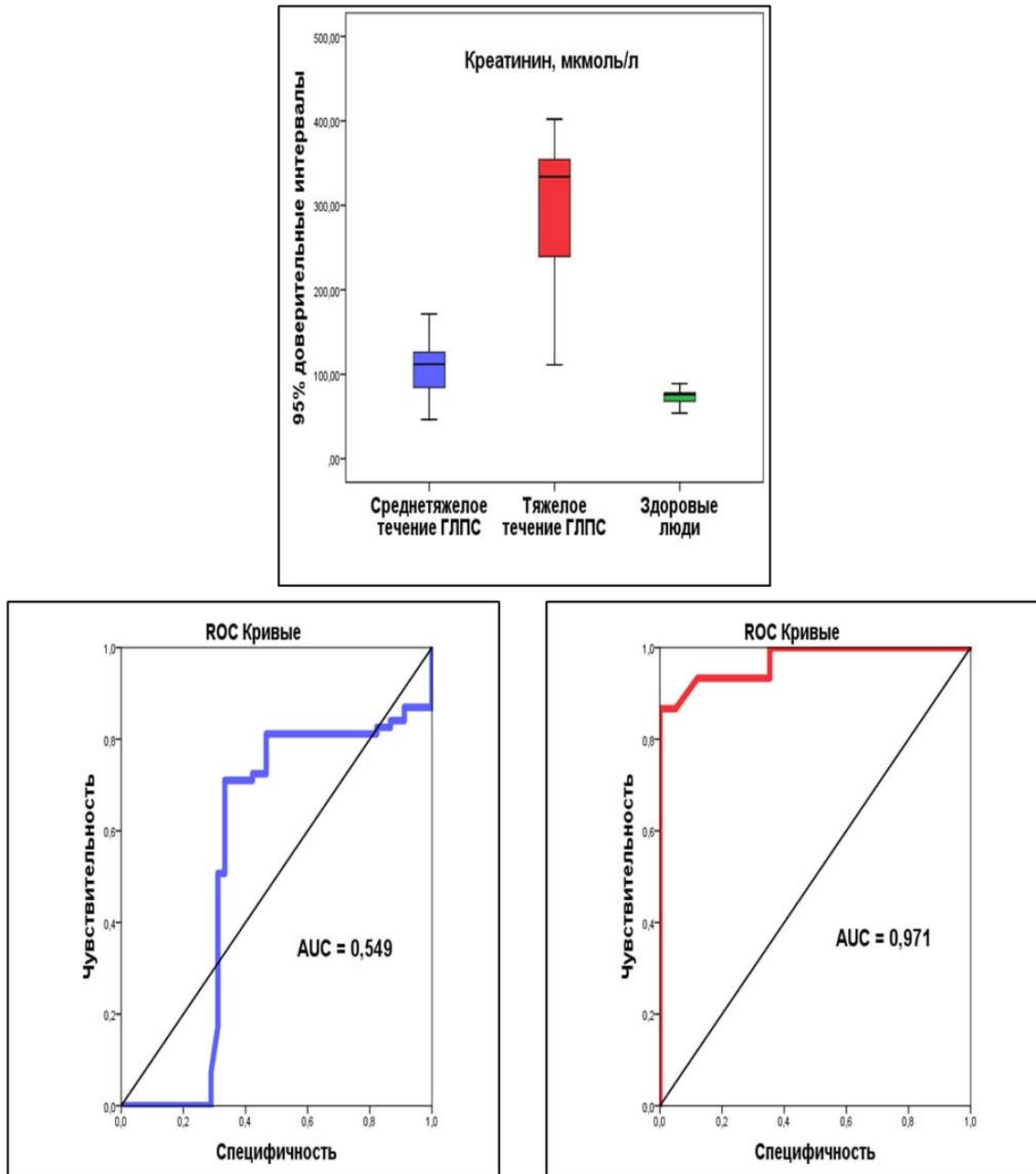
Как следует из *рисунка 65*, уровень мочевины в крови пациентов с ГЛПС оставался высоким в полиурический период заболевания. Особенно высокого уровня этот анализ достигал при тяжелом течении ГЛПС. Судя по величине  $AUC=0,607$ , рост уровня мочевины в крови при среднетяжелом течении заболевания не является диагностически значимым. Если же уровень мочевины

крови превышает 11 ммоль/л, то эти величины, как правило, указывают на тяжелое течение ГЛПС с высокой диагностической значимостью ( $AUC = 0,807$ ).



**Рисунок 65 – 95 % доверительные интервалы уровня мочевины в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести и ROC-кривые их диагностической значимости в полиурический период**

Что касается креатинина (рисунок 66), то его диагностическое значение было еще выше. Как и мочевина, уровень креатинина не был диагностически значим при среднетяжелом течении ( $AUC = 0,549$ ) в полиурический период, но в случаях тяжелого течения ГЛПС значения креатинина выше 123 мкмоль/л в крови свидетельствовали в пользу этого варианта течения заболевания с очень высокой диагностической значимостью ( $AUC = 0,971$ ).



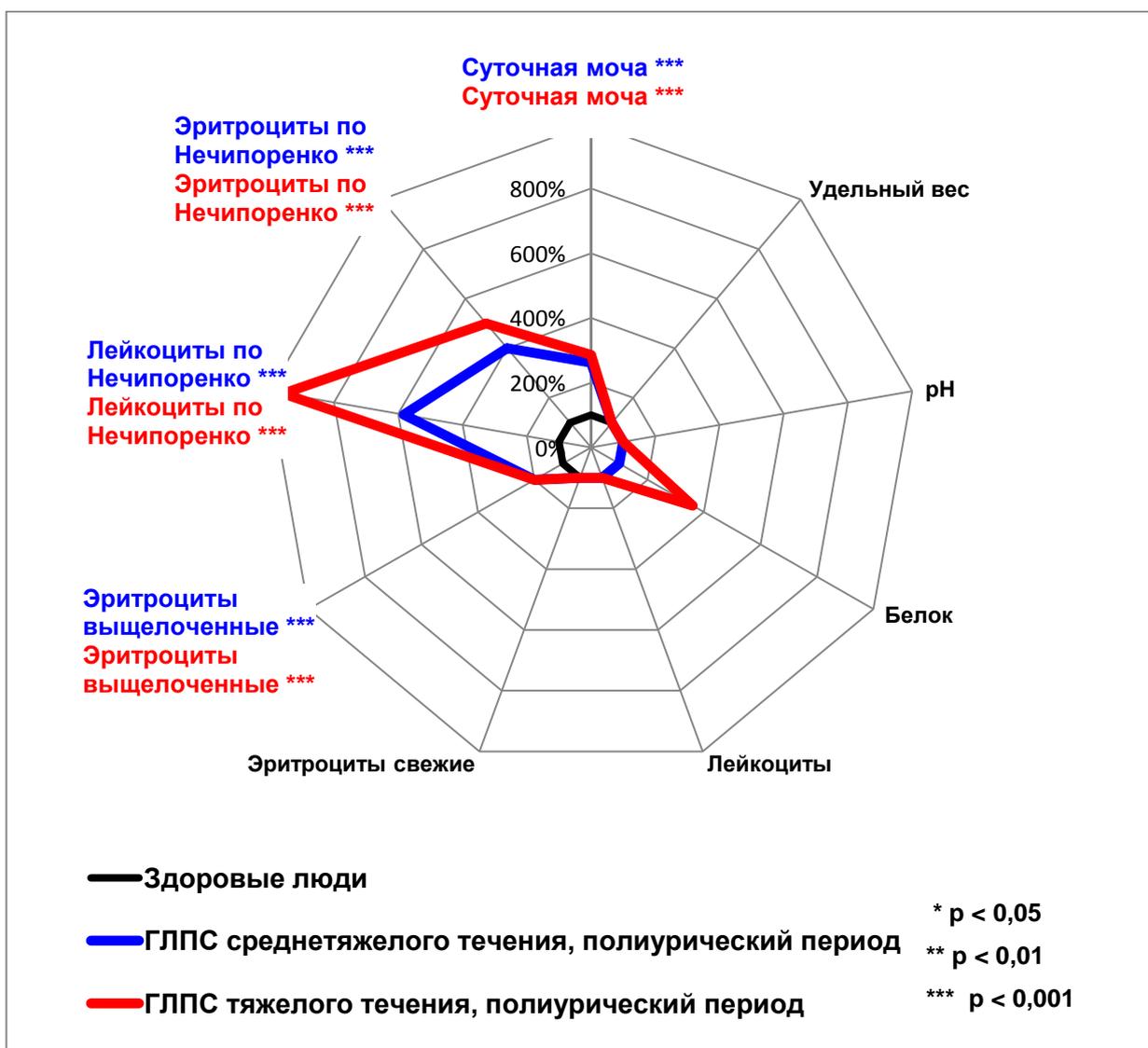
**Рисунок 66 – 95 % доверительные интервалы уровня креатинина в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести и ROC-кривые их диагностической значимости в полиурический период**

Далее анализировались отклонения показателей мочи при клиническом анализе и пробе Нечипоренко, результаты которых представлены в *таблице 24* и на *рисунке 67*.

**Таблица 24 – Показатели клинического анализа мочи у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в олигоурический период по сравнению с данными клинически здоровых лиц**

Лабораторные показатели	Медиана (минимум; максимум)			Критерий Манна-Уитни p <sub>1</sub> p <sub>2</sub> p <sub>3</sub>
	ГЛПС средней тяжести n = 53	ГЛПС тяжелого течения n = 12	Здоровые лица n = 15	
Суточное количество мочи, мл	2750 (1000; 4000)	3000 (1800; 3800)	1050 (850; 1600)	<0,001*** <0,001*** 0,865
Удельный вес мочи г/мл	1,01 (1,01; 1,01)	1,01 (1,01; 1,01)	1,013 (1,01; 1,02)	0,524 0,539 0,670
pH мочи	5,0 (5,0; 7,0)	5,0 (5,0; 6,5)	5 (5; 6,5)	0,423 0,219 0,978
Белок, г/л	0 (0; 5,0)	2,6 (0; 5,0)	0 (0; 0,3)	0,984 0,061 0,043*
Лейкоциты, клеток/поле зрения	0 (0; 25,0)	0 (0; 50,0)	0 (0; 6)	0,824 0,648 0,398
Эритроциты свежие, клеток/поле зрения	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 5)	0,425 0,749 0,999
Эритроциты выщелоченные, клеток/поле зрения	10,0 (0; 50,0)	10,0 (0; 50,0)	0 (0; 0)	<0,001*** <0,001*** 0,954
Лейкоциты по Нечипоренко, *10 <sup>6</sup> клеток/л	1750 (500; 5750)	2875 (2250; 3500)	300 (0; 500)	<0,001*** <0,001*** 0,017**
Эритроциты по Нечипоренко, *10 <sup>6</sup> клеток/л	1000 (250; 2000)	1250 (2000; 4000)	250 (0; 400)	<0,001*** <0,001*** 0106

*Примечание:* n - число исследований в группе, p<sub>1</sub> – вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого течения и здоровых людей; p<sub>2</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС тяжелого течения и здоровых людей; p<sub>3</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения; статистическая значимость различий: \* при p < 0,05; \*\* при p < 0,01; \*\*\* при p < 0,001.



**Рисунок 67 – Проценты отклонения показателей анализа мочи у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в полиурический период от показателей у здоровых людей**

Как следует из данных таблицы и рисунка, в полиурический период ГЛПС на статистически достоверном уровне регистрировались: примерно 3-х кратный рост суточного количества мочи, наличие в моче выщелоченных эритроцитов, рост числа эритроцитов и лейкоцитов в пробе по Нечипоренко. Два из этих показателей – наличие белка в моче и число лейкоцитов в пробе по Нечипоренко – выявляли достоверные различия между показателями при ГЛПС тяжелого и среднетяжелого течения в полиурический период в пользу более высоких значений при тяжелой форме.

### 5.5 – Иммунологическая характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом разной степени тяжести в полиурический период заболевания

Первым этапом данного раздела исследований служил анализ особенностей фенотипического состава лимфоцитов у пациентов с ГЛПС разной степени тяжести в полиурический период в сравнении со здоровыми людьми, как это показано в *таблице 25* и на *рисунке 68*.

**Таблица 25 – Относительные и абсолютные показатели содержания в крови лимфоцитов разных фенотипов у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом среднетяжелого и тяжелого течения в полиурический период по сравнению с данными клинически здоровых лиц**

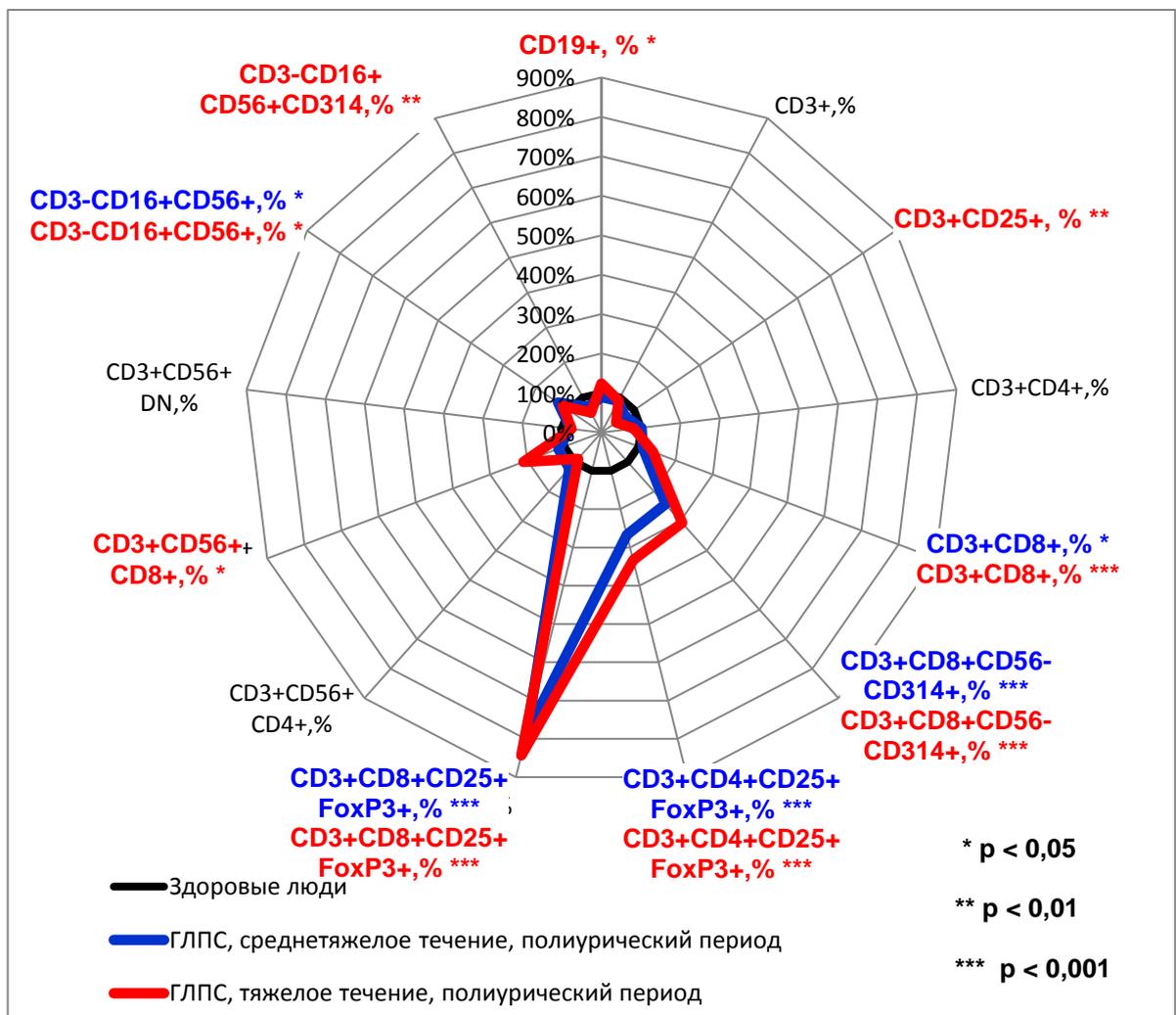
Лимфоциты крови и их фенотипические характеристики		Медиана (минимум; максимум)			Критерий Манна-Уитни
		ГЛПС средней тяжести n = 53	ГЛПС тяжелого течения n = 12	Здоровые лица n = 15	
1		2	3	4	5
В-лимфоциты CD19 <sup>+</sup>	%	9,5 (6,4; 16,8)	13,0 (5,0; 24,2)	10,5 (2,5; 15,7)	0,644 0,039* 0,620
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,18 (0,08; 0,33)	0,33 (0,04; 0,51)	0,18 (0,08; 0,30)	0,047* 0,009** 0,184
Т-лимфоциты CD3 <sup>+</sup>	%	67,5 (65,9; 79,3)	68,8 (44,4; 86,0)	75 (62; 87,0)	0,138 0,123 0,804
	10 <sup>9</sup> клеток/л	1,55 (1,26; 1,83)	1,85 (0,90; 4,16)	1,2 (0,7; 3,1)	0,695 0,816 0,302
Активированные Т-лимфоциты CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	%	5,4 (5,2; 9,1)	3,4 (1,5; 9,5)	7,5 (2,6; 7,8)	0,076 0,004** 0,063
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,12 (0,10; 0,18)	0,09 (0,04; 0,33)	0,11 (0,03; 0,20)	0,999 0,230 0,199
Т-хелперы (Th) CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	%	41,5 (30,6; 45,4)	33,6 (5,5; 46,6)	41 (14; 57)	0,594 0,737 0,215
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,85 (0,60; 0,95)	0,73 (0,35; 1,95)	0,7 (0,4; 1,4)	0,859 0,698 0,869
Цитотоксические Т-лимфоциты	%	31,4 (23,5; 34,9)	38,8 (10,4; 51,3)	28 (16; 71)	0,018* <0,001*** 0,047*

Продолжение таблицы 25

1		2	3	4	5
CTL CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,62 (0,50; 0,76)	0,95 (0,19; 2,40)	0,4 (0,2; 2,6)	0,594 0,009** 0,039*
NKG2D <sup>+</sup> CTL CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup> CD314 <sup>+</sup>	%	30,6 (19,1; 33,5)	38,5 (14,5; 46,1)	12,6 (9,6; 27,0)	<0,001*** <0,001*** 0,049*
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,56 (0,52; 1,0)	1,01 (0,09; 2,92)	0,24 (0,14; 0,40)	<0,001*** <0,001*** 0,083
CD4 <sup>+</sup> регуля- торные Т- клетки (Treg) CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	%	8,0 (6,9; 16,7)	10,0 (4,0; 19,0)	3,05 (2,3; 8,1)	<0,001*** <0,001*** 0,053
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,19 (0,14; 0,32)	0,26 (0,11; 1,80)	0,05 (0,02; 0,20)	<0,001*** <0,001*** 0,083
CD8 <sup>+</sup> регуля- торные Т- клетки (Treg) CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	%	11,0 (7,6; 13,3)	11,8 (4,6; 26,1)	1,45 (0,1; 4,4)	<0,001*** <0,001*** 0,457
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,22 (0,17; 0,26)	0,28 (0,11; 0,75)	0,01 (0; 0,07)	<0,001*** <0,001*** 0,057
CD4 <sup>+</sup> НКТ CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	%	0,22 (0,15; 0,40)	0,16 (0,12; 0,20)	0,18 (0,13; 0,22)	0,419 0,141 0,264
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,08 (0,02; 0,10)	0,07 (0,01; 0,09)	0,03 (0,01; 0,04)	0,354 0,094 0,063
CD8 <sup>+</sup> НКТ CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	%	3,1 (1,0; 8,4)	5,6 (2,5; 17,5)	2,67 (1,94; 3,28)	0,219 0,014* 0,264
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,11 (0,12; 0,16)	0,29 (0,19; 0,40)	0,15 (0,13; 0,18)	0,354 0,094 0,063
Дважды нега- тивные (DN) НКТ CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	%	0,43 (0,38; 0,66)	0,42 (0,37; 0,66)	0,55 (0,42; 0,71)	0,283 0,301 0,728
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,06 (0,01; 0,05)	0,05 (0,02; 0,07)	0,04 (0,01; 0,05)	0,354 0,266 0,198
Натуральные киллеры (NK) CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	%	17,2 (12,4; 24,9)	15,2 (8,7; 28,5)	12,9 (9,5; 27,7)	0,039* 0,027* 0,342
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,45 (0,28; 0,49)	0,44 (0,19; 1,03)	0,26 (0,14; 0,42)	0,458 0,892 0,934

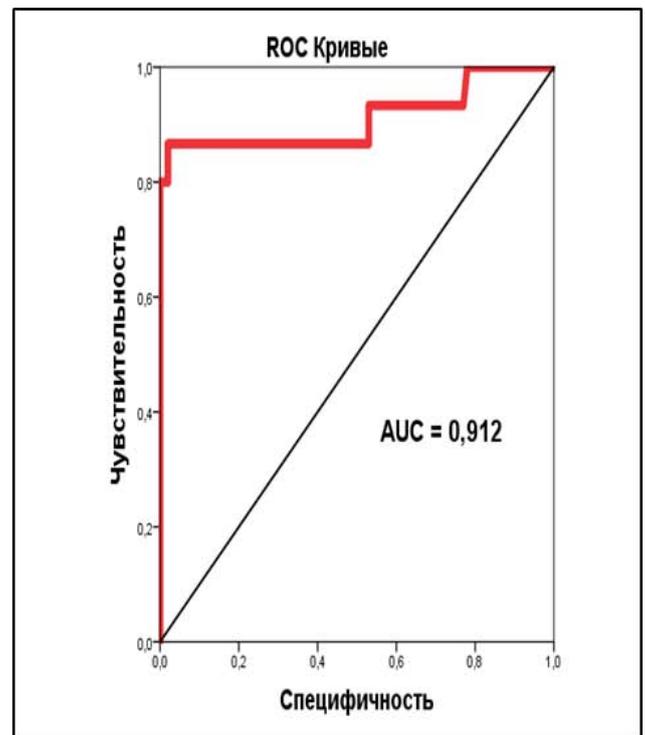
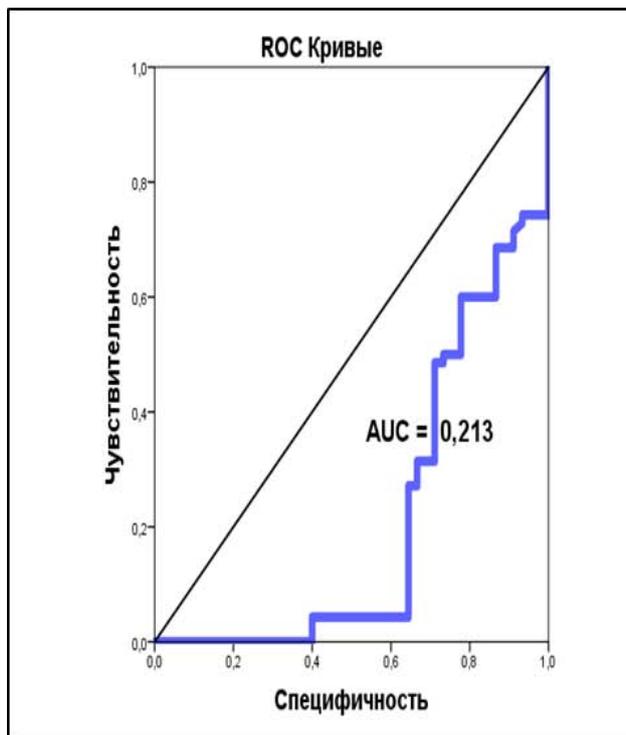
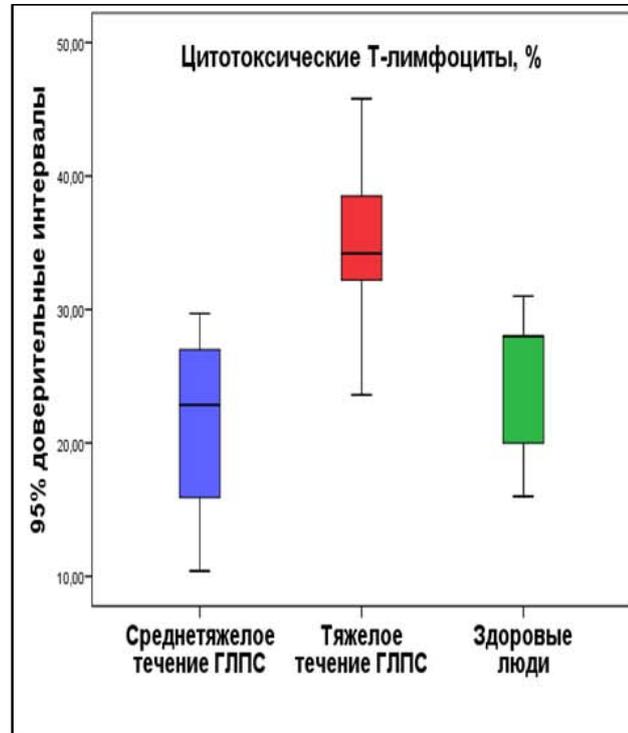
1		2	3	4	5
NKG2D <sup>+</sup> NK CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD314 <sup>+</sup>	%	7,0 (1,2; 7,5)	5,5 (1,2; 16,0)	9,6 (7,7; 21,6)	0,144 0,008** 0,710
	10 <sup>9</sup> клеток/л	0,15 (0,02; 0,16)	0,17 (0,03; 0,46)	0,19 (0,11; 0,32)	0,798 0,104 0,457

*Примечание:* n - число исследований в группе, p<sub>1</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС среднетяжелого течения и здоровых лиц, p<sub>2</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС тяжелого течения и здоровых лиц, p<sub>3</sub> - вероятность различий между группами ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения; статистическая значимость различий: \* при p < 0,05; \*\* при p < 0,01; \*\*\* при p < 0,001.



**Рисунок 68 – Проценты отклонения содержания в крови лимфоцитов различных фенотипов у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в полиурический период от показателей у здоровых людей**

Как и в другие периоды ГЛПС, в полиурический период относительное содержание лимфоцитов различных фенотипов выявляет больше отклонений, чем абсолютные величины, то есть является более информативным (рисунки 69-71).



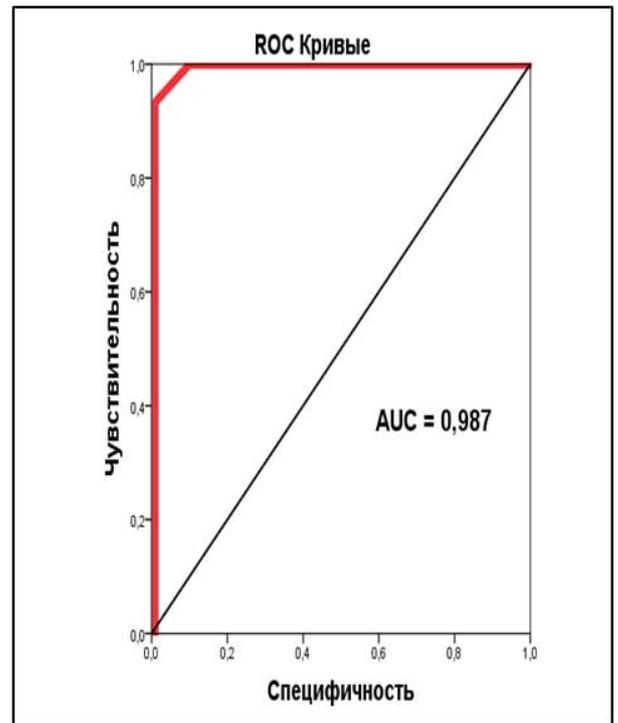
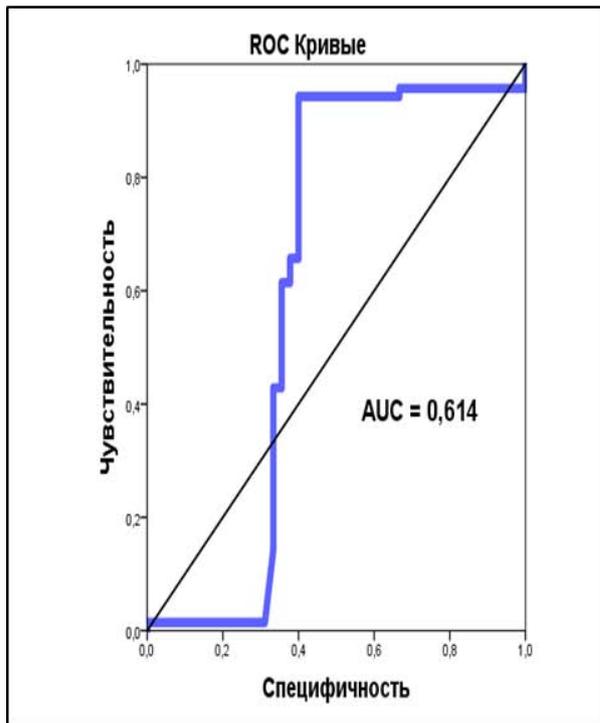
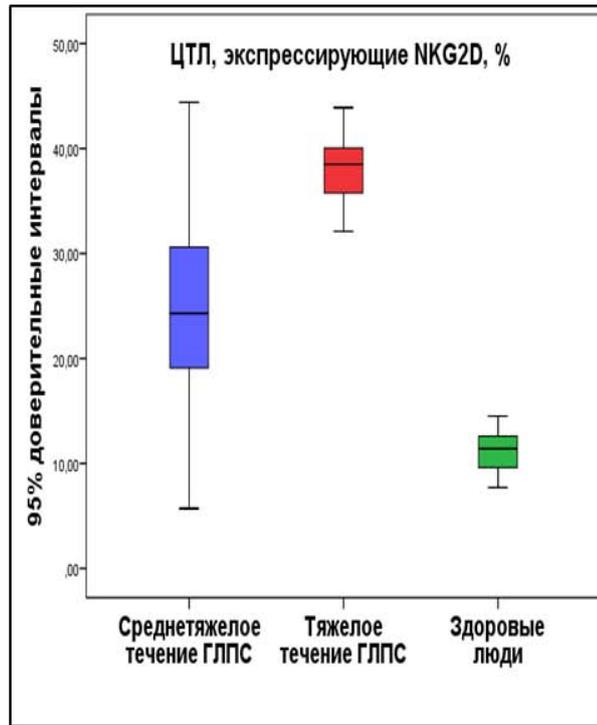
**Рисунок 69 – 95 % доверительные интервалы процента CTL среди лимфоцитов крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести и ROC-кривые их диагностической значимости в полиурический период**

К числу статистически значимых сдвигов относятся: нарастание доли В-лимфоцитов, снижение процента  $CD25^+$  (активированных) Т-лимфоцитов, значительный рост содержания цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), в том числе экспрессирующих рецептор NKG2D, процентного содержания как  $CD4^+$ , так и  $CD8^+$  Т-клеток, умеренное повышение процента  $CD8^+$  НКТ, НК на фоне снижения последними экспрессии NRG2D. Из этого перечня к числу дифференциальных признаков среднетяжелого и тяжелого течения ГЛПС относятся процентное содержание в крови CTL и  $NKG2D^+$  CTL. В частности, на *рисунке 69* представлены 95% доверительные интервалы и ROC-анализ процента CTL.

По этим данным, процент CTL среди лимфоцитов крови в полиурический период ГЛПС в наибольшей степени возрастал при тяжелом течении заболевания, что можно констатировать при значениях выше 27% с очень высокой диагностической значимостью ( $AUC = 0,912$ ), которая не обозначалась при среднетяжелом течении ( $AUC = 0,213$ ). В полиурический период на долю CTL, экспрессирующих NKG2D, приходилось 97%-100%. Тем не менее, диагностическое значение  $NKG2D^+$  CTL с очень высокой диагностической значимостью ( $AUC = 0,987$ ) проявлялись при значениях выше 32% среди лимфоцитов крови только при тяжелом течении ГЛПС, как это показывает *рисунок 70*.

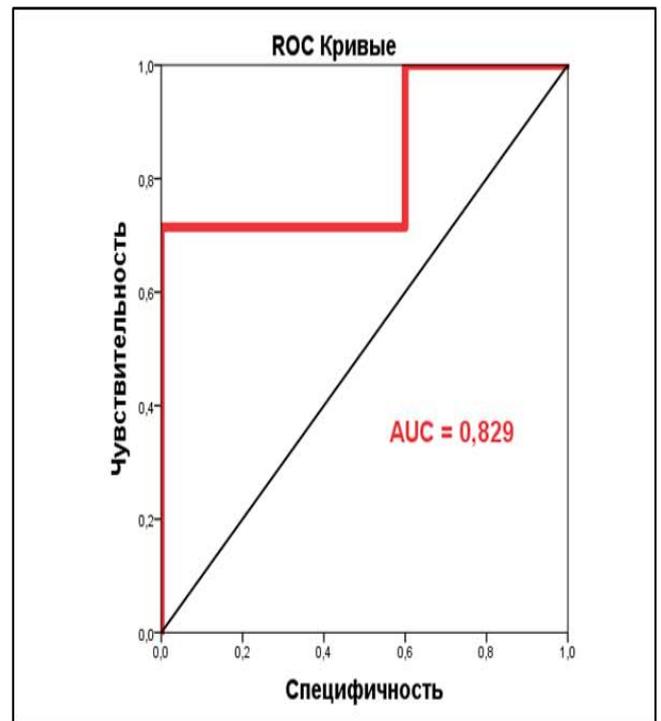
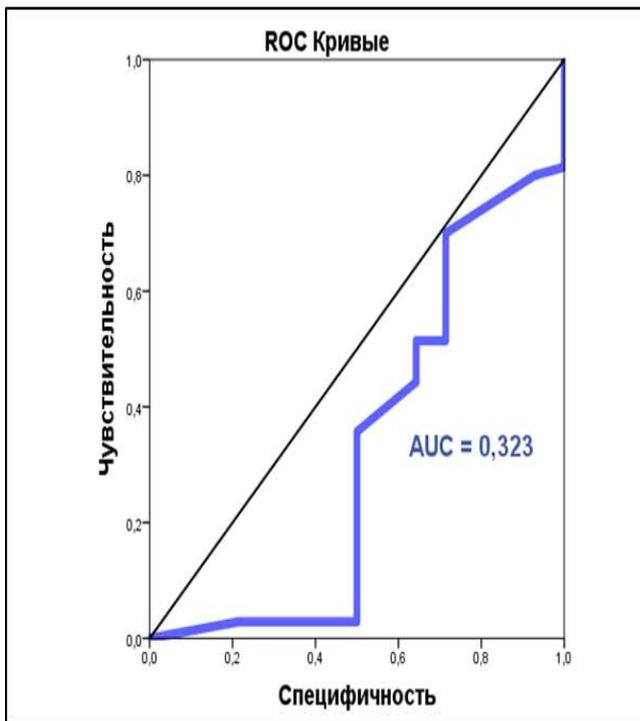
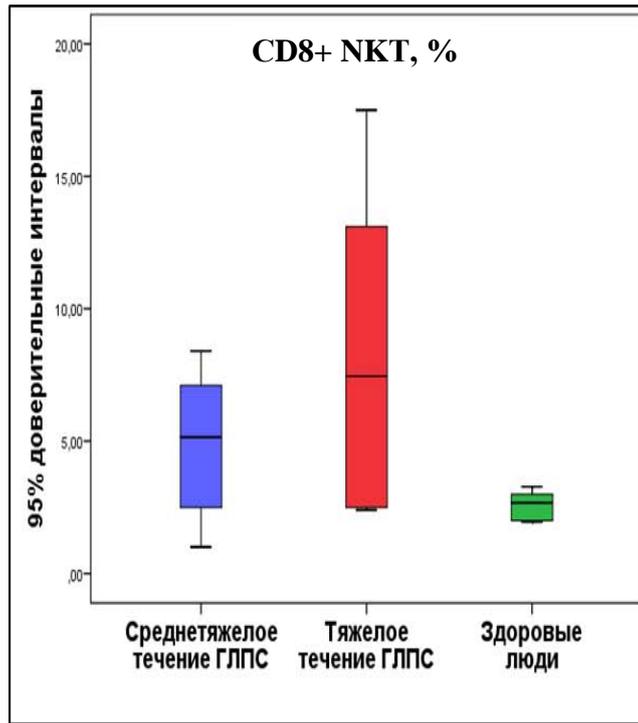
В полиурический же период геморрагической лихорадки с почечным синдромом продолжало отмечаться нарастание в крови и числа  $CD8^+$  НКТ, однако этот рост отмечался только для одной субпопуляции этих клеток –  $CD3^+CD56^+CD8^+$ . При этом степень нарастания этих клеток в крови снижалась по сравнению с олигоурическим периодом, что подтверждает *рисунок 71*.

Так, если при среднетяжелом течении заболевания процентное содержание этих клеток в крови диагностического значения не имело ( $AUC = 0,323$ ), то при тяжелом течении ГЛПС данный показатель как маркер этого варианта течения при значениях выше 8% обладал высокой диагностической значимостью ( $AUC = 0,829$ ).



**Рисунок 70 – 95 % доверительные интервалы процента NKG2D<sup>+</sup> CTL среди лимфоцитов в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести и ROC-кривые их диагностической значимости в полиурический период**

Далее в полиурический период ГЛПС сравнительному анализу с учетом тяжести течения заболевания подвергались особенности цитокинового профиля пациентов, а также клинически здоровых людей (таблица 26, рисунок 72).



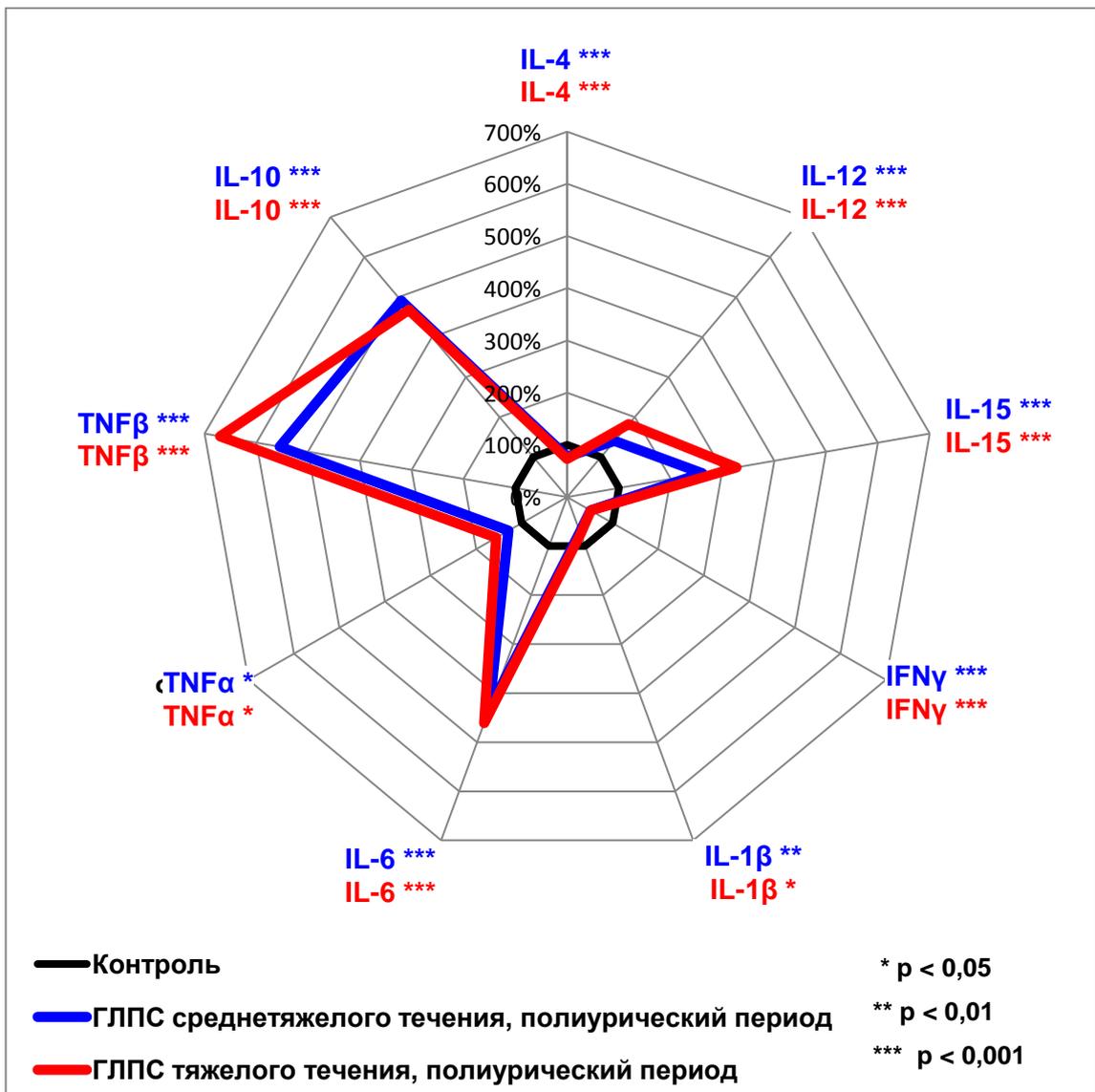
**Рисунок 71 – 95 % доверительные интервалы процента CD8<sup>+</sup> NKT среди лимфоцитов в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести и ROC-кривые их диагностической значимости в полиурический период**

**Таблица 26 – Уровни цитокинов в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в полиурический период по сравнению с данными клинически здоровых лиц**

Цитокины плазмы крови	Медиана (минимум; максимум)			Критерий Манна-Уитни
	ГЛПС средней тяжести n = 53	ГПС тяжелого течения n = 12	Здоровые лица n = 15	p <sub>1</sub> p <sub>2</sub> p <sub>3</sub>
Интерлейкин-4 (IL-4), пг/мл	1,7 (1,6; 1,8)	1,6 (1,5; 1,7)	2,2 (1,3; 4,2)	<0,001*** <0,001*** 0,834
Интерлейкин-12 (IL-12), пг/мл	12,7 (11,7; 13,5)	16,6 (16,0; 17,8)	9,1 (7,8; 14,4)	<0,001*** 0,001*** 0,069
Интерлейкин-15 (IL-15), пг/мл	8,60 (6,53; 9,86)	12,24 (7,98; 13,93)	3,29 (1,79; 4,03)	<0,001*** <0,001*** <0,001***
Интерферон $\gamma$ , (IFN $\gamma$ ), пг/мл	86,2 (81,7; 88,6)	88,6 (80,3; 90,6)	169,3 (127,6; 208,6)	<0,001*** <0,001*** 0,511
Интерлейкин-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), пг/мл	2,68 (2,36; 2,94)	2,86 (2,62; 3,10)	3,8 (2,5; 5,2)	0,002** 0,015* 0,064
Интерлейкин-6 (IL-6), пг/мл	26,9 (17,7; 45,1)	28,6 (23,5; 31,7)	6,2 (2,7; 9,2)	<0,001*** <0,001*** 0,066
Фактор некроза опухоли $\alpha$ (TNF $\alpha$ ), пг/мл	3,22 (3,00; 3,47)	3,89 (3,43; 4,51)	2,5 (1,8; 3,5)	0,011* 0,023* 0,392
Фактор некроза опухоли $\beta$ (TNF $\beta$ ), пг/мл	54,3 (46,8; 60,1)	69,1 (59,1; 71,9)	4,7 (2,6; 5,95)	<0,001*** <0,001*** 0,556
Интерлейкин-10 (IL-10), пг/мл	33,4 (12,6; 215,9)	31,8 (30,5; 35,1)	6,8 (3,4; 9,1)	<0,001*** <0,001*** 0,432

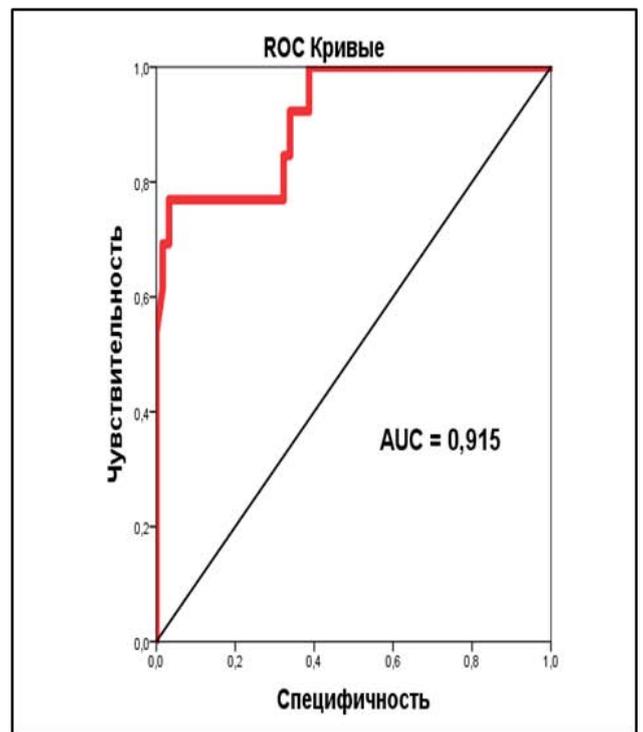
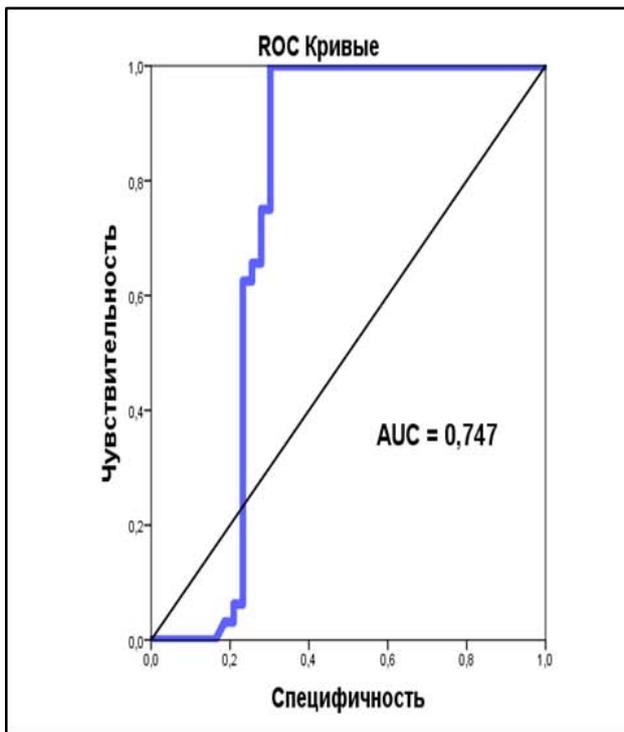
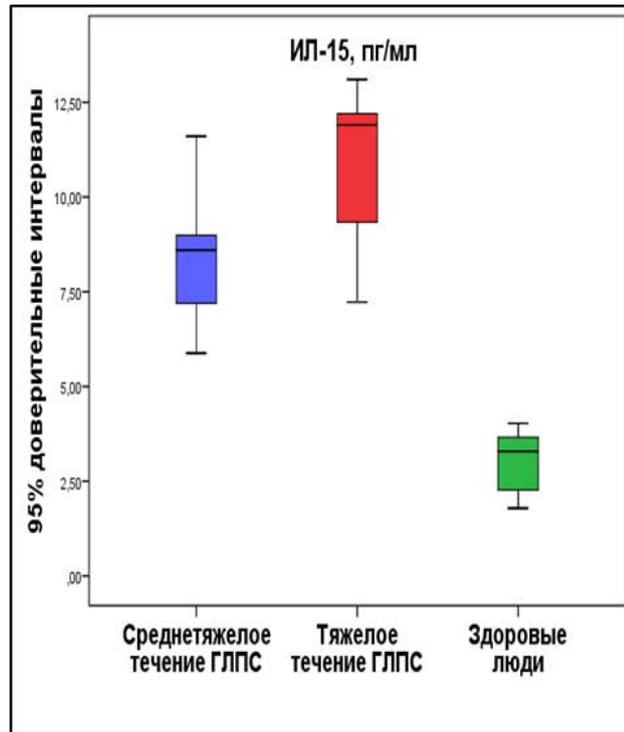
*Примечание:* n - число исследований в группе, p<sub>1</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ГЛПС и здоровых лиц, p<sub>2</sub> - вероятность различий между группами пациентов с ОРВИ и здоровых лиц, p<sub>3</sub> - вероятность различий между группами ГЛПС и ОРВИ; статистическая значимость различий: \* при p<0,05; \*\* при p<0,01; \*\*\* при p<0,001.

В полиурический период все тестируемые цитокины продолжали показывать отклонения от показателей здоровых людей, при этом возрастало содержание в крови IL-12, IL-15, IL-6, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IL-10, а уровень IL-4, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  падал.



**Рисунок 72 – Проценты отклонения цитокинового профиля крови у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом разной степени тяжести в полиурический период от показателей у здоровых людей**

Только один показатель выявлял различия между среднетяжелым и тяжелым течением – это интерлейкин-15, уровень которого был статистически значимо выше при тяжелом течении. Именно у этого цитокина далее определялась диагностическая значимость в зависимости от тяжести течения (рисунок 73). Значения уровня IL-15 в сыворотке крови выше 9 пг/мл подтверждают наличие у пациента тяжелого течения ГЛПС с умеренной диагностической значимостью по сравнению со среднетяжелым течением (AUC = 0,747) и с очень высокой диагностической значимостью (AUC = 0,915) по сравнению со здоровыми людьми.



**Рисунок 73 – 95 % доверительные интервалы содержания интерлейкина-15 в крови пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом различной степени тяжести и ROC-кривые их диагностической значимости в полиурический период**

Полученные данные позволяют высказать целый ряд предположений об особенностях иммунологических механизмов, лежащих в основе иммунопатогенеза ГЛПС и базирующихся на интерпретации отклонений

иммунного статуса, наблюдаемых при среднетяжелом течении заболевания, как преобладание протективной составляющей иммунных реакций, в то время как иммунологические сдвиги, более характерные для тяжелого течения ГЛПС, будут трактоваться нами как механизмы патогенеза, усугубляющие развитие инфекционного процесса. Эти подходы будут положены в основу обсуждения результатов исследований, представленных в данной главе.

### **Обсуждение главы 5**

Иммунопатогенез ГЛПС, как любого инфекционного заболевания с системным компонентом, довольно сложен, имеет целый ряд особенностей и составляющих и во многом зависит от вида вызывающего это заболевание ортохантавируса. В данном исследовании речь идет о ГЛПС, этиологически связанной с ортохантавирусом вида *Puumala* и называемой еще эпидемической нефропатией [190].

В предыдущих главах нами были довольно детально охарактеризованы неизвестные ранее особенности иммунопатогенеза ГЛПС в начальный период заболевания, к числу которых принадлежат:

- начало активационного процесса в Т-системе лимфоцитов не с активации Т-хелперов IL-2-зависимым механизмом (через CD25), а с активации CTL NKG2D-зависимым путем, поскольку в лихорадочный период этого заболевания число Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD25 (CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), не изменялось или даже падало, в то время как число лимфоцитов, экспрессирующих NKG2D (CD314), то есть с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD314<sup>+</sup>, статистически значимо возрастало;

- характерным признаком начального периода ГЛПС является не только рост числа CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, экспрессирующих активирующий рецептор NKG2D, но и коррелирующее с числом этих клеток нарастание в крови уровня IL-15;

- зависящее от тяжести течения ГЛПС изменение соотношения CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток: при тяжелом течении заболевания число Treg с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> по сравнению со среднетяжелым течением статистически значимо падало, в то время как число Treg с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> достоверно возрастало.

В данной главе основной задачей исследования было определение и расшифровка особенностей иммунопатогенеза ГЛПС в разгар заболевания, то есть в олигоурический и полиурический периоды, обобщенных в виде схемы на *рисунке 74*.

Как следует из схемы, основные тенденции иммунологических сдвигов, отмеченных в начальный период ГЛПС, сохранялись и в олигоурический и полиурический периоды, хотя определенные особенности в эти периоды отмечались.

Каждый из уже отмеченных ранее иммунных механизмов в процессе представленного выше обсуждения получил определенную трактовку с позиций возможного патогенетического значения.

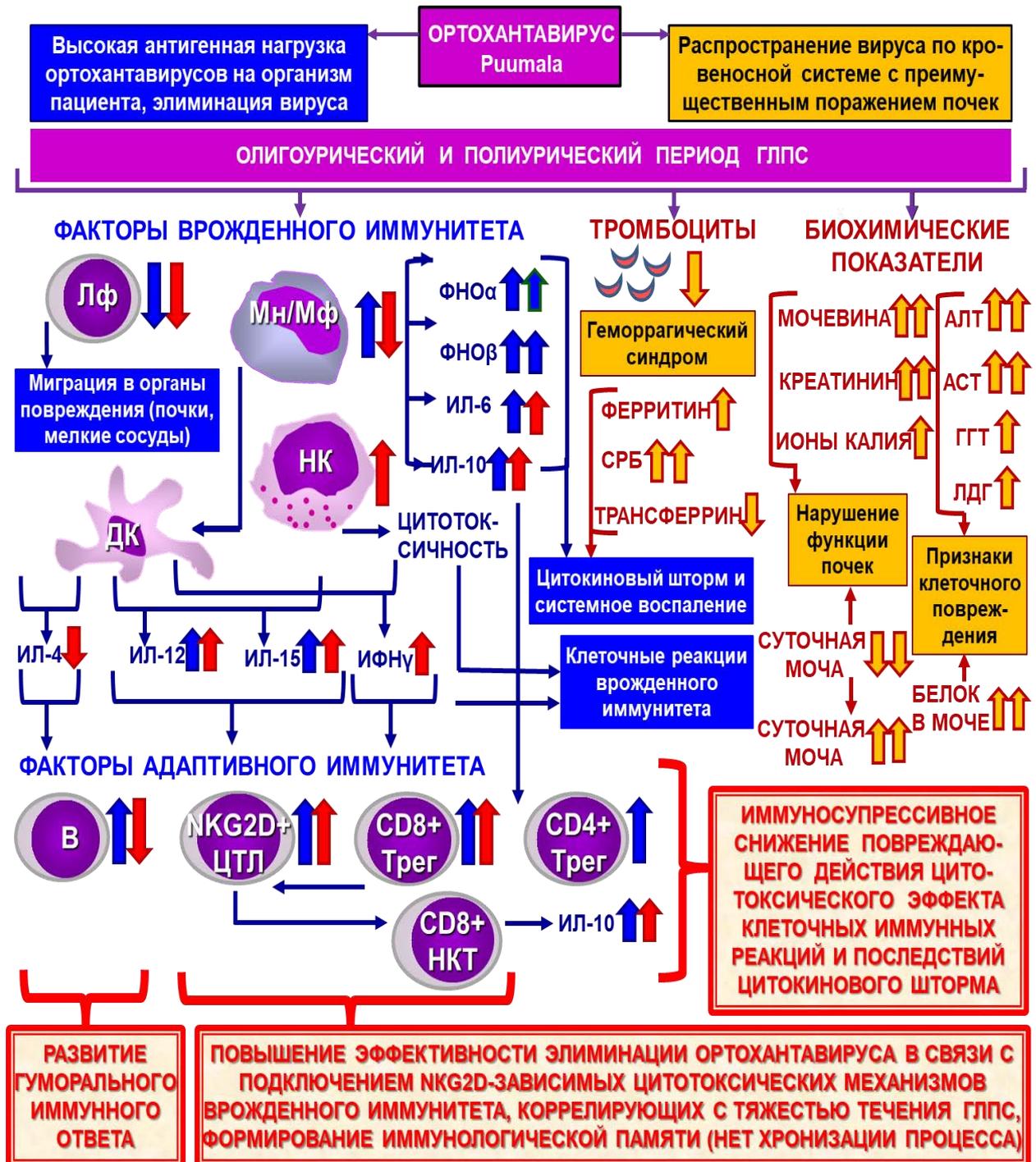
Первый из отмеченных нами феноменов касался характерной для вирусных инфекций ведущей роли в элиминации вирусного возбудителя цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), активация которых осуществлялась довольно нетипичным механизмом – с участием NKG2D-рецептора, связанного со специфическим рецептором (TCR) CTL.

Как подсказывают данные литературы и уже обсуждалось нами ранее, NKG2D-рецептор (CD314) чаще описывают как молекулы, активирующие натуральные киллеры в ответ на контакт с клетками, находящимися в состоянии стресса от воздействия повреждающих агентов, в том числе вирусов.

При ГЛПС, как установлено нами, эти молекулы выполняют указанные функции не на мембране натуральных киллеров, а на поверхности цитотоксических Т-клеток с регуляторным участием IL-15.

При большинстве вирусных заболеваний в процессе активации CTL ведущую роль обычно выполняет TCR как специфический рецептор, например, к микробным антигенам в комплексе с молекулами HLA I класса на поверхности клеток-мишеней. Экспрессия этими клетками рецептора NKG2D, который активирует CTL только после того, как у них активирован TCR, позволяет CTL осуществлять цитотоксическое поражение клеток-мишеней, презентующих не только

ортохантавирусные антигены, что в случае ГЛПС, как уже обсуждалось, не очень эффективно, но и стресс-индуцированные молекулы.



**Рисунок 74 -** Гипотетическая схема иммунопатогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом в олигоурический и полиурический периоды по результатам диссертационной работы

В результате цитотоксические реакции становятся менее специфичным, но широко распространенным в организме и высоко эффективным инструментом

элиминации возбудителя через поражение клеток, в которых он потенциально может реплицироваться. При этом сохранение высокого уровня продукции моноцитами IL-15 способствует формированию из NKG2D<sup>+</sup> CTL CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти, относительно раннее образование которых переводит ГЛПС в разряд всегда остро протекающих инфекций.

Описанные иммунопатогенетические особенности ГЛПС, судя по результатам наших исследований, имеют свой контролирующий механизм с участием регуляторных Т-клеток. Достоверный рост числа регуляторных Т-клеток отмечается многими исследователями, изучающими иммунопатогенез ГЛПС, в наших исследованиях удалось получить новые сведения благодаря дифференцированному подходу к исследованию роли этих клеток путем выделения среди них CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> фенотипов. Нарастание содержания в крови обоих фенотипов наблюдалось уже с начального периода ГЛПС, однако более высокий процент в крови CD4<sup>+</sup> клеток был характерен для среднетяжелого течения заболевания, а CD8<sup>+</sup> Treg – для тяжелого. Нами уже обсуждалось ранее возможное патогенетическое значение регуляторных Т-клеток с их иммуносупрессорным эффектом как фактора контроля степени цитотоксического повреждения клеток, а также интенсивности цитокинового шторма. Кроме того, отмечена способность Treg CD8<sup>+</sup> фенотипа осуществлять поддержку формирования пула CD8<sup>+</sup> клеток памяти.

Следующий период заболевания - олигоурический - служит характерным признаком ГЛПС, поскольку в его течении на первое место у пациентов выходят симптомы острого поражения почек. Резко снижается количество суточной мочи вплоть до полной анурии, в моче появляется белок и выщелоченные эритроциты, значительно увеличивается число лейкоцитов и эритроцитов в пробе Нечипоренко.

При ГЛПС в олигоурический период ключевое значение приобретает патогенетический механизм, поддерживающий в организме человека поражение почек. Почки - фильтрующий орган, а ведущую роль в процессе фильтрации играют эндотелий почечных клубочков и эпителий почечных канальцев. Поражая эти клетки, ортохантавирус, не обладая цитопатическим

эффектом, активирует их, инициируя агрегацию тромбоцитов и свертывание крови, что может приводить в конечном итоге к развитию диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдрома). Это способствует увеличению концентрации возбудителя, особенно в почках, фильтрующая функция которых определяет особые условия для кровотока. Скопление возбудителя в почечных клубочках, в свою очередь, обеспечивает привлечение антител и формирование иммунных комплексов с их последующим оседанием в этих почечных образованиях. Установлена также способность ортохантавирусов прямо активировать калликреин-кининовую систему с высвобождением брадикинина как потенциального индуктора сосудистой проницаемости [335, 339]. Постепенно в патологический процесс вовлекается тубуло-интерстициальная ткань почек [52, 335]. Более того, анализ результатов биопсии почек при ГЛПС показал, что у таких пациентов в значительной степени нарушена экспрессия белка ZO-1, определяющего плотные межклеточные контакты, благодаря чему клетки почечных клубочков максимально приближены и "сшиты" друг с другом. В настоящее время нарушение экспрессия белка ZO-1 признается исследователями как основной механизм повреждения почек при ГЛПС [197].

Именно эти изменения, помимо свойств самого возбудителя, исследователи часто связывают со сдвигами со стороны иммунного статуса человеческой популяции в целом вследствие ухудшения экологической обстановки и увеличения доли иммунокомпроментированных лиц [1]. Однако более конкретная роль иммунных механизмов в патогенезе ГЛПС полностью не установлена и на уровне их реализации в системе общего кровотока входила в предмет изучения в данной работе.

Нам удалось установить одно характерное для ГЛПС проявление иммунного процесса – особое значение повышения IL-6 при отсутствии подобного повышения со стороны еще одного важного провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , что вошло, по нашим данным, в число выявленных регрессионным анализом признаков на первой неделе клинических проявлений ГЛПС, характерных для данного заболевания и отличающих его от инфекционных процессов другой этиологии.

Многие из наблюдаемых эффектов могут быть прямо связаны с высоким уровнем IL-6 в крови и специально отмеченным нами его значением при ГЛПС. Другими авторами показана способность IL-6 снижать секрецию TNF $\alpha$  и, особенно, IL-1 [313], активировать продукцию печенью белков острой фазы воспаления [140] и стимулировать гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему [359], увеличивая восприимчивость организма к стрессовым реакциям [353]. Более того, IL-6 может вызывать повышение уровня антидиуретического гормона в крови [252] и влиять таким образом на время наступления олигоурического периода ГЛПС.

Выраженный подъем уровня экспрессии IL-6 в олигоурический период вполне объясним. В научной литературе давно отмечена способность эпителиальных клеток почечных канальцев к продукции этого цитокина, которая значительно усиливается при поражении почек и служит одним из механизмов такого повреждения [120].

С точки зрения рассматриваемых нами особенностей иммунных механизмов у больных ГЛПС заслуживает внимания участие IL-6 в дифференцировке и функционировании регуляторных T-клеток. Например, описано, что IL-6 является супрессором FoxP3 и других основных генов регуляторных T-клеток, но фактором дифференцировки T-хелперов-17 как индукторов системного воспаления [77, 116]. В то же время необходимо подчеркнуть, что в реальных условиях взаимодействие IL-6 с рецепторами T-клеток их действие на клетки не столь однозначно и зависит от очень многих обстоятельств.

Например, в настоящее время исследователи обращают внимание на такую особенность регуляторного действия IL-6 как участие в индукции и поддержке T-клеток памяти [203] – важного фактора иммунных процессов, предполагаемые особенности которого при ГЛПС детально обсуждались нами на примере начального периода заболевания.

В целом олигоурический период остается самым тяжелым в течении ГЛПС, однако накопленный опыт ведения таких пациентов в случае наших наблюдений

ни в одном случае не привел к летальному исходу, а олигурия постепенно переходила в стадию полиурии.

В полиурический период у больных ГЛПС резко увеличивается выделительная функция почек. Механизм полиурии связан с повышением в почках клубочковой фильтрации. При этом в условиях поврежденного тубулярного аппарата даже небольшое повышение фильтрации способствует увеличению осмотического диуреза. Азотистые шлаки, накопившиеся в организме за время олигурии, с восстановлением функциональной способности почек проявляют свое осмодиуретическое действие, причем количество выделяемой мочи не зависит от состояния гидратации организма. Чрезмерная потеря жидкости с мочой при недостаточном ее восполнении может привести к обезвоживанию, гиповолемии и повторному развитию олигурии [11]. В то же время во время полиурии реализуются и защитные функции, поскольку вместе с мочой из организма идет удаление ортохантавирусов и многих других, особенно низкомолекулярных, патогенетически значимых компонентов.

Несмотря на удаление с мочой свободно циркулирующих вирусных частиц, ортохантавирусы, находящиеся внутриклеточно, продолжают оставаться в организме и служат прямым или опосредованным через паттерны клеточного повреждения сигналом для клеток с цитотоксической активностью. В результате еще резче изменяется соотношение Th/CTL, которое начинает регистрироваться на статистически значимом уровне: число  $CD3^+CD4^+$  лимфоцитов в крови падает, а число  $CD3^+CD8^+$  лимфоцитов возрастает. Сведения об этом феномене имеются и в других источниках научной литературы [93, 226].

Среди клеток с цитотоксической активностью (CTL и NK) по-прежнему наибольшую долю составляют цитотоксические Т-лимфоциты, экспрессирующие рецептор NKG2D и способствующие как вирус-специфическому, так и неспецифическому удалению инфицированных клеток. Сохраняется в полиурический период ГЛПС и высокое содержание в крови регуляторных Т-клеток с фенотипами  $CD4^+$  и  $CD8^+$ , реализующих иммуносупрессорные эффекты, поддерживаемые высоким уровнем IL-10.

Все эти описанные выше особенности патогенеза ГЛПС сказываются на состоянии иммунного ответа, начиная с олигоурического периода и при переходе в полиурический период – стадии инфекционного процесса, на которой резко снижается антигенная нагрузка.

С этой точки зрения следует особо подчеркнуть, что все указанные выше и уже обсужденные в предыдущих главах собственных исследований особенности иммунных реакций на ортохантавирус при ГЛПС заключаются в особой грани взаимодействия между собой реакций врожденного и адаптивного иммунного ответа. С этой точки зрения отдельного обсуждения заслуживает еще один несколько необычный феномен, зарегистрированный нами в олигоурический и полиурический периоды этого заболевания – довольно значительный рост содержания в крови НКТ ( $CD3^+CD56^+$ ) – Т-лимфоцитов, несущих одновременно еще и маркер натуральных киллеров (NK) и принадлежащих к субпопуляции этих клеток  $CD8^+$ .

Дело в том, что эта уникальная небольшая подгруппа Т-лимфоцитов в настоящее время оценивается как иммунный компонент, осуществляющий важную связь между врожденными и адаптивными иммунными реакциями [177]. В периферической крови человека в норме содержится до 3% НКТ от общего количества лимфоцитов [76]. Они принадлежат к подгруппе Т-клеток, которые могут осуществлять свои функции через секрецию огромного количества  $Th1$  и  $Th2$  цитокинов [189]. НКТ могут активироваться как антиген-зависимыми, так и независимыми способами и проявлять удивительную функциональную пластичность как с провоспалительными, так и с иммунорегуляторными характеристиками [78, 177].

НКТ – довольно гетерогенная популяция лимфоцитов и с функциональной и с фенотипической точек зрения. Большая часть НКТ, называемых инвариантными (iNKТ) или НКТ типа I, имеет специфическую перестройку  $\alpha$ -цепи TCR ( $V\alpha24-J\alpha18$  у людей), связанную с очень ограниченным разнообразием цепей  $V\beta$  ( $V\beta11$  у людей) [189]. Фенотипически инвариантные НКТ у людей могут быть  $CD3^+CD56^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD56^+CD8^+$ , а также  $CD4$  и  $CD8$  дважды негативными (DN)

– CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> [277]. В отличие от них, НКТ типа II, также называемые неклассическими НКТ, более разнообразны по структуре  $\alpha$ -цепи TCR (V $\alpha$ 3.2- J $\alpha$ 9) [189].

НКТ типа I и II обладают способностью распознавать липидные или гликолипидные антигены, которые представляются антиген-презентирующими клетками с участием неклассических молекул CD1, подобных по структуре молекулам главного комплекса гистосовместимости I класса. К числу профессиональных антигенпрезентирующих клеток (АПК), экспрессирующих молекулы CD1, относятся макрофаги, В-клетки и дендритные клетки. В процессе презентации эти молекулы находятся во взаимосвязи со своими специфическими лигандами (липидными и гликолипидными антигенами), что и приводит к активации НКТ [75]. Активация НКТ проявляется секрецией цитокинов Th1 и Th2. В частности, презентация липидных антигенов с участием CD1d сопровождается секрецией IFN $\gamma$  и IL-4. IFN $\gamma$  активирует Т-клетки и макрофаги, которые играют важную роль в клеточном иммунном ответе, тогда как IL-4 действует на В-клетки и способствует развитию гуморального иммунитета [189].

В отличие от НКТ типа I и II, существуют НКТ-подобные клетки с базовым фенотипом CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, которые не зависят от CD1d. НКТ-подобные клетки экспрессируют разнообразные цепи TCR- $\alpha$  и TCR- $\beta$ . В отличие от НКТ типа I и II, они не реагируют на  $\alpha$ -галактозилцерамид и секретируют только цитокины Th1. НКТ-подобные клетки не обнаруживаются у новорожденных, тогда как у пожилых людей их количество увеличивается [302]. Terrazzano G. et al. [363] считают, что эти клетки играют регуляторную роль, контролируя эффекторную функцию CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

Пожалуй, лучше всего к настоящему времени охарактеризованы инвариантные НКТ. Так, установлено, что эти клетки в ответ на липидные антигены, помимо секреции Th1 и Th2 цитокинов, по принципу обратной связи подавляют экспрессию CD1d, то есть способны к самоограничению своих функций [189]. Как CD4, так и CD8 экспрессируются на тимических инвариантных НКТ, но

подгруппа CD4<sup>+</sup> клеток при этом преобладает. В то же время в периферической крови наблюдается увеличение доли CD8<sup>+</sup>/DN клеток данной группы [70].

Отличительной чертой активации инвариантных НКТ является быстрая продукция широкого спектра цитокинов и хемокинов, включая IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, RANTES, эотаксин, MIP-1 $\alpha$  и MIP-1 $\beta$  [126, 265]. CD4<sup>+</sup> клетки продуцируют как Th1, так и Th2 цитокины, в то время как CD8<sup>+</sup> клетки обычно продуцируют только Th1 цитокины [191]. Другие эффекторные функции инвариантных НКТ включают высвобождение перфорина/гранзима и проявления цитотоксичности, опосредованной Fas/FasL [126, 265].

Есть еще одна особенность инвариантных НКТ у человека, довольно детально обсужденная в обзоре Lanier [218] – способность iNKТ экспрессировать рецептор NKG2D, при этом отмечается, что данное свойство, помимо НК, присуще практически всем CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам. Именно в связи с этим обстоятельством НКТ в наших исследованиях изучались с учетом их субпопуляционной принадлежности (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, или DN).

Роль инвариантных НКТ в борьбе с вирусными инфекциями в настоящее время сомнений не вызывает. При этом, учитывая отсутствие вирусных липидных антигенов, доступных для презентации с участием CD1d, способность инвариантных НКТ участвовать в защите от вирусных инфекций реализуется благодаря их свойству активироваться только под влиянием цитокинов антигенпрезентирующих клеток [110, 385], в том числе IL-12 и IL-18 [392]. Следует подчеркнуть, что зрелым инвариантным НКТ для поддержания функциональной активности требуется IL-15 [133]. В этом контексте можно еще раз подчеркнуть, что у CD8<sup>+</sup> инвариантных НКТ отмечена способность к экспрессии NKG2D [191], благодаря чему они могут активироваться путем распознавания стрессовых клеток через молекулы, подобные МНС, такие как МICA и MICB [212].

Известно, что НКТ обладают противовирусным потенциалом против вируса гепатита В [179], респираторно-синцитиального вируса [173], вируса простого герпеса-1 [236], вируса Коксаки В [401], вируса гриппа А [156], ВИЧ [346]. В

реализации противовирусного эффекта подчеркивается значение способности инвариантных НКТ через цитокиновую продукцию потенцировать размножение CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-клеток и усиливать противовирусные эффекты иммунных реакций [173].

Возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом в перечне вирусов, способных индуцировать противовирусную активность НКТ, в доступной литературе мы не обнаружили. Тем не менее, в наших исследованиях в олигоурический и полиурический периоды заболевания было установлено многократное нарастание в крови количества НКТ с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Судя по представленным выше данным литературы, НКТ названного фенотипа могут подвергаться пролиферации под действием сигналов, полученных через рецептор NKG2D при поддержке IL-15, отвечая на эти сигнал продукцией цитокинов Th1 типа, а также цитотоксическим воздействием на клетки-мишени (клетки в состоянии стресса), что способствует росту эффективности клеточных реакций противовирусного иммунного ответа.

Таким образом, в олигоурический и полиурический периоды ГЛПС в организме пациента реализуется целый ряд иммунологических процессов довольно необычного сценария. Сформированная на этой основе гипотеза предполагает следующее.

- Цитотоксические Т-лимфоциты участвуют в элиминации вирусного возбудителя, разрушая не только клетки, презентующие конкретные вирусные антигены, но и любые клетки, вовлеченные в патологический процесс и находящиеся в состоянии стресса. Это достигается включением у CTL механизма NKG2D-зависимой активации, реализующейся в виде сочетания антиген-зависимой и стресс-индуцированной цитотоксичности.

- Описанный выше механизм сопровождается включением дополнительных механизмов клеточного контроля распространенности цитотоксического поражения клеток, вовлеченных в патологический процесс, как и явлений системного воспаления (цитокинового шторма), характерных для ГЛПС. Этот механизм реализуется благодаря иммуносупрессорным эффектам регуляторных Т-

клеток, при этом Treg с фенотипом  $CD3^+CD8^+CD25^+FoxP3^+$  способствуют еще и IL-15-зависимому формированию на базе  $NKG2D^+$  CTL пула  $CD8^+$  Т-клеток памяти. Реализация этих иммунных реакций обеспечивает острое течение ГЛПС, но чревата осложнениями в виде ограничения эффективности элиминации ортохантавирусов в случае истощения клеток иммунной системы, участвующих в развитии описанных механизмов иммунного контроля.

- По мере избыточного накопления в организме клеток, находящихся в состоянии стресса, и при наличии соответствующего цитокинового сопровождения (IL-12, IL-15) в разгар ГЛПС включается еще один механизм, способствующий их элиминации и, соответственно, элиминации вирусного возбудителя – антиген-независимая активация  $CD8^+$  НКТ в крови. Будучи активированными, НКТ данного фенотипа продуцируют цитокины Th1 типа, стимулируя в организме цитотоксические реакции врожденного и адаптивного иммунного ответа, а также сами проявляют цитотоксические свойства в отношении клеток-мишеней.

Суммируя высказанные предположения, можно заключить, что наиболее характерной особенностью иммунопатогенеза ГЛПС на протяжении всего заболевания является развитие уникального механизма эффективного сочетания реакций врожденного и адаптивного иммунитета.

**СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ,  
ИЗЛОЖЕННЫМ В 5 ГЛАВЕ**

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

1. Балмасова, И.П. Клинико-иммунологические особенности геморрагической лихорадки с почечным синдромом / И.П. Балмасова, М.Ф. Иванов, Е.С. Малова, Р.И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология. – 2016. – Т. 17, № 4. - С. 270-271.

2. Иванов, М.Ф. Фенотипические особенности лимфоцитов при геморрагической лихорадке с почечным синдромом / М.Ф. Иванов, И.П. Балмасова, Ж.П.Васнева // Georgian Medical News. – 2017. – № 5 (266). – P. 104- 110.

3. Иванов, М.Ф. Иммунный ответ при геморрагической лихорадке с почечным синдромом различной степени тяжести / М.Ф. Иванов, Е.П. Ефратова, И.П. Балмасова // Аллергология и иммунология. – 2017. – Т. 18, № 3. – С. 147-151.

4. Balmasova, I.P. Clinical-immunological features of hemorrhagic fever with renal syndrome / I.P. Balmasova, M.F. Ivanov, E.S. Malova, R.I. Sepiashvili // International Journal on Immunorehabilitation. – 2018. - Vol. 20, № 1. - P. 27-29.

5. Ivanov, M.F. Immunological features of hemorrhagic fever with renal syndrome / M.F. Ivanov, I.P. Balmasova, R.I. Sepiashvili // International Journal on Immunorehabilitation. – 2018. – Vol. 20, No 2. – P. 84-86.

6. Ivanov, M.F. Immunologic signs of hemorrhagic fever with renal syndrome / M.F. Ivanov, I.P. Balmasova, R.I. Sepiashvili // International Journal on Immunorehabilitation. – 2018. – Vol. 20, No 2. – P. 89.

7. Иванов, М.Ф. Иммунологические признаки геморрагической лихорадки с почечным синдромом / М.Ф. Иванов, И.П. Балмасова, Р.И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология. – 2018. – Т. 19, № 1. – С. 40.

8. Иванов, М.Ф. Иммунопатогенез геморрагической лихорадки с почечным синдромом в динамике инфекционного процесса / М.Ф. Иванов, А.В. Жестков,

А.А. Суздальцев, Л.Л. Попова, И.П. Балмасова // Аллергология и иммунология. – 2019. – Т. 20, № 1. – С. 24.

9. Иванов, М.Ф. Иммунопатогенетические особенности геморрагической лихорадки с почечным синдромом в динамике инфекционного процесса / М.Ф. Иванов, А.В. Жестков, А.А. Суздальцев, Л.Л. Попова, И.П. Балмасова // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т. 13 (22), № 2. – С. 281-283.

10. Иванов, М.Ф. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом: гуморальный иммунный ответ / М.Ф. Иванов, И.П. Балмасова, Е.С. Малова, Р.И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология. – 2020. – Т. 21, № 1. – С. 5-11.

11. Иванов, М.Ф. Патогенетическая роль цитокинов при геморрагической лихорадке с почечным синдромом в динамике и при различной степени тяжести / М.Ф. Иванов, И.П. Балмасова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2023. – Т. 100, № 3. – С. 176-185. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-381>

12. Иванов М.Ф. Цитокины как регуляторы системного воспаления при геморрагической лихорадке с почечным синдромом / М.Ф. Иванов, Д.Ю. Константинов, И.П. Балмасова [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. — 2023. — №8 (134). — URL: <https://research-journal.org/archive/8-134-2023-august/10.23670/IRJ.2023.134.36> (дата обращения: 07.09.2023). — <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.134.36>

13. Иванов М.Ф. Патогенетическое значение CD3+CD56+ Т-лимфоцитов при геморрагической лихорадке с почечным синдромом / М.Ф. Иванов Д.Ю. Константинов, И.П. Балмасова [и др.] // Наука и инновации в медицине. – 2023. –Т. 8, № 3. – С. 176-180. <https://doi.org/10.35693/2500-1388-2023-8-3-176-180>

*Публикации в других изданиях:*

14. Balmasova, I.P. Clinical and immunological features of hemorrhagic fever with renal syndrome / I.P. Balmasova, M.F. Ivanov, E.S. Malova, R.I. Sepiashvili // In: Allergy, Asthma, COPD, Immunophysiology & Rehabilitology: Innovative Technologies / Ed. Prof. R. Sepiashvili // Filodiritto International Proceedings. – 2017. - P. 189-194.

15. Иванов, М.Ф. Реакция лимфоцитов различных фенотипов на поражение почек при геморрагической лихорадке с почечным синдромом / М.Ф. Иванов, Е.П. Ефратова, И.П. Балмасова // *Материалы международной научной конференции "Медицина, фармацевтика, здоровье - 2017"*. – Москва, 10 ноября 2017 г. – С. 58-64.

16. Ivanov, M.F. The role of innate and adaptive immune response lymphocytes in pathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome / M.F. Ivanov, I.P. Balmasova, A.V. Zhestkov, L.A. Rogozina // *Acta Scientific Medical Sciences*. – 2019. – Vol. 3, No 8. – P. 120-125.

17. Ivanov, M.F. Immune pathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome at various stages of the infection / M.F. Ivanov, A.V. Zhestkov, A.A. Suzdal'cev, L.L. Popova, I.P. Balmasova // In: *Allergy, Asthma, COPD, Immunophysiology & Immunorehabilitology: Innovative Technologies* / Ed. professor Revas Sepiashvili // *Filodiritto International Proceedings*. – 2019. – P. 315-321.

18. Ivanov, M.F. Immune component of kidney injury in hemorrhagic fever with renal syndrome / M. Ivanov, I. Balmasova, R. Sepiashvili / In: *Allergy & Asthma, COVID-19 & COPD, Immunophysiology & Immunorehabilitology: Innovative Technologies*. Ed. Prof. Revaz Sepiashvili // *Filodiritto International Proceedings*. – 2021. – P. 123-128.

19. Иванов, М.Ф. Особенности противовирусного иммунного ответа на ранних стадиях геморрагической лихорадки с почечным синдромом / М.Ф. Иванов, А.В. Жестков, И.П. Балмасова // *III объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов: VII Съезд биохимиков России, X Российский симпозиум «Белки и пептиды», VII Съезд физиологов СНГ: научные труды (Сочи, Дагомыс, 3–8 октября 2021). Том 1.* – М.: Издательство «Перо», 2021. – С. 67.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предпосылками для выполнения данной работы послужили следующие данные научной литературы:

- Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) - острое вирусное природно-очаговое заболевание, проявляющееся геморрагическим синдромом, гемодинамическими расстройствами и острым поражением почек по типу интерстициального гломерулонефрита [10, 13, 14, 42, 45, 53]. Природно-очаговый характер ГЛПС делает проблему этой тяжело протекающей вирусной инфекции актуальной для России [11, 51], а в число эндемичных районов входит Самарская область, где выполнялось данное исследование [1, 13, 19, 42, 53, 57].

- В настоящее время известно более 80 серологически и генетически отличающихся друг от друга типов ортохантавирусов, к числу которых принадлежит возбудитель ГЛПС [10, 100]. Выделяют 24 вида ортохантавирусов, патогенных для человека, среди них - *Puumala*, эндемичный для Самарской области [13, 42, 53], основным природным резервуаром которого служит рыжая полевка [1, 19].

- Наибольшую чувствительность к ортохантавирусам проявляют эндотелий венул [127, 286] при отсутствии прямого цитопатического воздействия на них самого вируса [286, 329, 337] и наличии его влияния на свертывающую систему крови [335]. В то же время вирус обладает пантропностью, в частности, в клетках почек он нарушает экспрессию белка, определяющего плотные межклеточные контакты, что признается как основной механизм повреждения этих органов при ГЛПС [197].

- ГЛПС характеризуется циклическим течением и многообразием клинических вариантов от abortивных лихорадочных до тяжелых форм с выраженным геморрагическим синдромом и острым поражением почек [10].

Клинически различают следующие периоды болезни: инкубационный, начальный, олигоурический, полиурический, период реконвалесценции [45, 123, 167].

- Ортохантавирусная инфекция приводит к чрезмерной активации иммунитета, включая массивные цитокиновые реакции и активацию цитотоксических лимфоцитов [79, 117, 226, 338, 343, 351], при этом у пациентов наблюдается также повышенная инфильтрация органов (в частности, почек) клетками иммунной системы [194, 224, 297, 321, 322].

- Ортохантавирусы как возбудители ГЛПС обладают как прямым, так и опосредованным воздействием на иммунную систему, в число клеток, чувствительных к этим вирусным возбудителям, входят не только эндотелиальные и эпителиальные клетки, но и макрофаги, дендритные клетки, лимфоциты, нейтрофилы, а также тромбоциты [16, 103, 181, 226].

- ГЛПС присуще развитие системного воспаления, сопровождающегося «цитокиновым штормом». При этом сведения об иммунопатогенезе ГЛПС в настоящее время носят отрывочный и противоречивый характер, содержат много нерешенных вопросов и подчас плохо сопоставляются друг с другом, что нарушает целостность представлений о том, что происходит с иммунным ответом при данном заболевании [184, 195, 344].

- Учитывая, что возможность постановки диагноза ГЛПС наиболее востребованным серологическим методом отсрочена сроками накопления антител к возбудителю, возникает проблема ранней диагностики ГЛПС, которая осложнена наличием атипичных, стертых форм заболевания, преобладанием в первые дни болезни общетоксического синдрома без патогномоничных проявлений болезни [31].

- Помимо проблемы ранней диагностики ГЛПС, для назначения адекватного лечения очень важное значение имеет прогнозирование тяжести течения заболевания [10, 29, 43]. Кроме использования для этой цели отдельных рутинных показателей, создаются комплексы тестов и шкалы для их оценки: например, SAPS II, SOFA, H-SOFA, что значительно повышает эффективность прогноза [376]. В последние годы к числу суррогатных маркеров тяжести течения

ГЛПС относят такие иммунологические показатели как высокий уровень экспрессии моноцитами CD163 и CD206 [218], обнаружение растворимой формы маркера плазматических клеток (В-лимфоцитов) sCD138 в крови [1].

В соответствии с названными предпосылками была определена цель данной работы, которая предусматривала расшифровку неизвестных сторон иммунопатогенеза ГЛПС, вызванной ортохантавирусом *Puumala*, с последующей разработкой приемов ранней иммунодиагностики и иммунопрогнозирования тяжести течения данного заболевания.

Для реализации поставленной цели под постоянным стационарным наблюдением в инфекционном отделении №1 Клиники ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России находились 100 человек, разделенные на 3 группы исследования. При этом дизайн исследования предусматривал клиничко-лабораторное и иммунологическое наблюдение 65 пациентов с серологически верифицированным диагнозом ГЛПС, вызванной ортохантавирусом *Puumala*, относящихся к основной группе, а также 20 больных, у которых впоследствии была подтверждена острая респираторная вирусная инфекция (группа сравнения 1), и 15 здоровых людей из числа доноров крови (группа сравнения 2).

Кроме того, с целью тестирования вновь разработанной нами программы для расчета раннего неспецифического интегрального показателя ГЛПС (РНИП ГЛПС) из 36 пациентов, поступавших в разное время в то же инфекционное отделение с клиническими признаками, регистрируемыми в том числе и при ГЛПС, была сформирована группа, в которой определялся РНИП ГЛПС, а впоследствии был верифицирован диагноз как ГЛПС, так и ОРВИ.

Аналогичным образом проводилась апробация вновь разработанного способа прогнозирования тяжести течения ГЛПС с использованием созданной нами компьютерной программы для расчета прогностического критерия тяжелого течения ГЛПС (ПКТТ ГПС), в которой участвовали 25 пациентов, получавших стационарное лечение по поводу геморрагической лихорадки с почечным синдромом.

Методы исследования включали:

(1) серологическое подтверждение диагноза ГЛПС на основании исследования в парных сыворотках, а также серотипирование с использованием культуральных моновалентных антигенных препаратов, приготовленных на основе вируса *Puumala*;

(2) клиническую оценку с выделением отдельных периодов ГЛПС и степени тяжести течения заболевания в соответствии с клиническими рекомендациями, утвержденными Министерством здравоохранения РФ;

(3) проведение рутинных лабораторных исследований (клинический и биохимический анализ крови, клинический анализ мочи и проба Нечипоренко) при ГЛПС в разные периоды болезни у больных с различной степенью тяжести, в том числе путем сравнения их результатов на начальных этапах заболевания с острыми респираторными вирусными инфекциями другой этиологии;

(4) проточную цитофлуориметрию крови в исследуемых группах с целью получения традиционных и оригинальных фенотипических характеристик лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунного ответа;

(5) иммуноферментный анализ для изучения цитокинового профиля крови в исследуемых группах.

Полученные данные анализировались статистически методами описательной и сравнительной непараметрической статистики, корреляционного и регрессионного анализа, путем определения 95% доверительного интервала показателей и построения ROC-кривых их диагностической значимости на основе пакета статистических программ SPSS, версия 23.

В процессе исследования решался целый ряд задач.

Первая задача исследования предусматривала характеристику особенностей пусковых механизмов иммунного процесса с участием оригинального фенотипического набора лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунитета и его цитокинового сопровождения при ГЛПС в сравнении с острыми респираторными вирусными инфекциями.

В процессе реализации данной задачи, как и всех остальных задач, использовались кинические, клинико-лабораторные, биохимические и иммунологические методы. Продолжительность инкубационного периода, по данным анамнеза, составляла в среднем  $24,9 \pm 9,8$  дней, начальный период протекал в течение  $4,2 \pm 2,4$  дня, олигоурический период продолжался  $5,6 \pm 2,1$  дней, полиурический -  $11,7 \pm 6,2$  дней, период реконвалесценции -  $19,1 \pm 5,3$  дней. При этом в начальный период заболевания, в ходе которого до развития явлений сероконверсии специфический диагноз ГЛПС затруднен, в связи с тем, что ПЦР далеко не всегда позволяет обнаружить и идентифицировать возбудителя, как никогда возникает необходимость в дополнительных методах ранней диагностики.

В начальный период ГЛПС у больных наблюдалось статистически значимое снижение числа тромбоцитов и лимфоцитов в крови на фоне роста общего числа лейкоцитов, процента среди них моноцитов, палочкоядерного сдвига нейтрофильных гранулоцитов. Среди биохимических сдвигов в этот период выявлялся рост активности ферментов крови - АЛТ, АСТ,  $\gamma$ ГТП, ЛДГ, сдвиги в содержании острофазных белков - ферритина, трансферрина, С-реактивного белка, некоторое повышение содержания мочевины, креатинина, ионов калия в крови. Со стороны клинического анализа мочи сдвиги были не очень значительными - снижался удельный вес и появлялись выщелоченные эритроциты, в пробе мочи по Нечипоренко нарастало содержание лейкоцитов и эритроцитов.

Таким образом, полученные рутинными лабораторными методами данные в начальный период свидетельствовали в пользу развития воспалительных изменений в организме и в сочетании с клиническими признаками общетоксического синдрома без учета эпидемиологических данных не позволяли заподозрить ГЛПС.

Иммунологические сдвиги у больных ГЛПС в начальный период оказались, хотя и немногочисленными, но гораздо более информативными. Был отмечен почти двукратный рост содержания в крови  $\text{NKG2D}^+$  цитотоксических Т-лимфоцитов с фенотипом  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CB56}^-\text{CD314}^+$ , а также очень значительное увеличение числа регуляторных Т-клеток с фенотипами  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$  и

CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. Эти сдвиги были настолько специфичными, что их можно было оценивать как маркеры ГЛПС.

Изменялся в начальный период ГЛПС и цитокиновый профиль крови. Эти отклонения включали рост в крови уровней цитокинов клеточного иммунного ответа (IL-12, IL-15, IFN $\gamma$ ), провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ), иммуносупрессорного цитокина IL-10 на фоне снижения уровней IL-4 и IL-1 $\beta$ . Такой профиль свидетельствовал о преобладании клеточных иммунных реакций и развитии контролируемого воспаления.

Уже в начальный период заболевания выявлялись и неизвестные ранее особенности иммунопатогенеза ГЛПС, к числу которых принадлежали:

- начало активационного процесса в Т-системе лимфоцитов не с активации Т-хелперов IL-2-зависимым механизмом (через CD25), а с активации CTL NKG2D-зависимым путем, поскольку в лихорадочный период этого заболевания число Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD25 (CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), не изменялось или даже падало, в то время как число Т-лимфоцитов, экспрессирующих NKG2D (CD314), то есть с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD314<sup>+</sup>, статистически значимо возрастало;

- характерным признаком начального периода ГЛПС является не только рост числа CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, экспрессирующих активирующий рецептор NKG2D, но и коррелирующее с числом этих клеток нарастание в крови уровня IL-15;

- зависящее от тяжести течения ГЛПС изменение соотношения CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток: при тяжелом течении заболевания число Treg с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> по сравнению со среднетяжелым течением статистически значимо падало, в то время как число Treg с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> достоверно возрастало.

Следующая задача заключалась в разработке системы ранних маркеров ГЛПС на основе особенностей клинико-лабораторной и иммунологической оценки этого заболевания в начальный период при дифференциальной диагностике с острыми респираторными вирусными инфекциями.

Дело в том, что целый ряд лабораторных и иммунологических признаков в начальный период ГЛПС оказался довольно характерным для ГЛПС, что удалось

установить при его сравнении с острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ) в первые 4 дня заболевания. В частности, они проявились в форме тромбоцитопении и моноцитоза, по содержанию в крови мочевины  $> 6,8$  ммоль/л, креатинина  $> 97$  мкмоль/л, активности лактатдегидрогеназы  $> 420$  ЕД/л; В-лимфоцитов ( $CD19^+$ )  $> 12,6\%$ ;  $NKG2D^+$  цитотоксических Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD8^+CD314^+$ )  $> 25\%$ ,  $CD4^+$  регуляторных Т-клеток ( $CD3^+CD4^+FoxP3^+$ )  $> 7,8\%$ ;  $CD8^+$  регуляторных Т-клеток ( $CD3^+CD4^+FoxP3^+$ )  $> 9,5\%$ :  $IL-15 > 4$  пг/мл,  $IL-6 > 24$  пг/мл,  $TNF\beta > 55$  пг/мл,  $IL-10 > 21$  пг/мл.

Указанные выше показатели, валидные для ГЛПС, были использованы в качестве независимых переменных для проведения регрессионного анализа, при выполнении которого зависимой переменной выступала принадлежность больного к разным группам исследования, а принципом отбора показателей - первые дни заболевания. В результате проведенного анализа было получено уравнение линейной регрессии следующего вида:

$$\text{РНИП ГЛПС} = 1,65 - 0,785*[\text{АСТ}] + 0,531*[\text{АЛТ}] + 0,395*[\text{тромбоциты}] - 0,209*[\text{моноциты}] + 0,156*[\text{CD4}^+ \text{Treg}] + 0,145*[\text{NK}] - 0,142*[\text{В}] - 0,13*[\text{IL-15}] + 0,128*[\text{креатинин}] + 0,127*[\text{NKG2D}^+ \text{CTL}] + 0,114*[\text{ГГТП}],$$

где РНИП - ранний неспецифический интегральный показатель ГЛПС, \* - знак умножения, АСТ - активность аспаратаминотрансферазы в крови в ЕД/л, АЛТ - активность аланинаминотрансферазы в крови в ЕД/л, тромбоциты - число тромбоцитов в 1л крови/ $10^9$ , моноциты - процент моноцитов среди лейкоцитов крови,  $CD4^+$  Treg - процент  $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$  клеток среди лимфоцитов крови, NK - процент натуральных киллеров среди лимфоцитов крови, В - процент В-лимфоцитов среди лимфоцитов крови, IL-15 - уровень IL-15 в крови в пг/мл, креатинин - уровень креатинина в крови в ммоль/л,  $NKG2D^+$  CTL - процент  $CD3^+CD8^+CD56^+CD314^+$  клеток среди лимфоцитов крови, ГГТП - активность  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы в крови в ЕД/л.

В целом среди 19 использованных параметров статистической программой было отобрано 11 показателей, которые вошли в состав уравнения регрессии для расчета раннего неспецифического интегрального показателя

(РНИП) ГЛПС. Дополнительный ROC-анализ показал, что при значениях ниже 91,5 РНИП ГЛПС в первые дни заболевания свидетельствует в пользу ГЛПС с очень высокой диагностической значимостью, поскольку площадь под ROC-кривой (AUC) составляла 0,939 при максимуме 1,0.

Было проведено тестирование разработанного раннего неспецифического интегрального показателя (РНИП) у 36 пациентов, поступавших в последнее время в инфекционное отделение №1 Клиники ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России с подозрением на ГЛПС в сроки, не позволяющие еще прибегнуть к серодиагностике этого заболевания. Всем больным были выполнены лабораторные исследования, позволяющие выполнить расчет РНИП. Среди 36 пациентов у 24 человек значения РНИП ГЛПС колебались в пределах от 48,7 до 65,2, а впоследствии серологически был подтвержден диагноз ГЛПС. У 12 человек РНИП ГЛПС показывал значения в диапазоне от 95,4 до 167,2, а по данным метода ПЦР в слизи из носоглотки были обнаружены возбудители аденовирусной инфекции (4 человека), гриппа (5 человек), смешанной гриппозной и респираторно-синтициальной вирусной инфекции (3 человека).

Третьей задачей исследования было выявление особенности пусковых механизмов иммунного процесса с участием оригинального фенотипического набора лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунитета и его цитокинового сопровождения, влияющие на тяжесть течения ГЛПС.

Рутинные лабораторные исследования крови и мочи в динамике у больных ГЛПС разной степени тяжести помогают установить некоторые особенности заболевания тяжелого течения, особенно по биохимическим показателям крови. Наиболее информативными с точки зрения характеристики тяжести течения ГЛПС следует считать такие признаки как число тромбоцитов в крови, уровни мочевины, креатинина, глюкозы, активность АЛТ, АСТ,  $\gamma$ ГТП, ЛДГ, КФК, содержание С-реактивного белка в крови, суточное количество мочи.

Роль лимфоцитов с различными фенотипическими характеристиками по-разному проявлялась у больных ГЛПС тяжелого и среднетяжелого течения. Эти различия в наибольшей степени проявлялись в лихорадочный и

полиурический периоды заболевания, были связаны с механизмами активации клеток иммунной системы и количественным соотношением различных популяций/субпопуляций лимфоцитов в крови. Наибольшее информативное значение у пациентов с ГЛПС имели такие иммунологические показатели как число CTL, экспрессирующих NKG2D, Т-хелперов, натуральных киллеров, В-лимфоцитов, регуляторных Т-клеток.

Сдвиги со стороны цитокинового профиля крови у больных при тяжелом течении ГЛПС несколько запаздывали по сравнению со сдвигами со стороны лимфоцитов крови различных популяций/субпопуляций и были относительно немногочисленными при наибольшем информативном значении IL-15, соотношения провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-1 $\beta$ . Это соотношение определялось высоким уровнем IL-6 при статистически значимом снижении IL-1 $\beta$ .

Анализ всех тестированных показателей у больных ГЛПС разной степени тяжести на протяжении всего заболевания показал наибольшее число выявленных особенностей в начальные периоды заболевания, что позволило приступить к разработке прогностических критериев тяжелого течения.

Четвертая задача была посвящена определению прогностических критериев тяжелого течения ГЛПС с учетом иммунологических сдвигов в начальный период заболевания на основе анализа рутинных лабораторных показателей, фенотипических характеристик лимфоцитов крови, цитокинового профиля пациентов.

Для решения этой задачи был проведен регрессионный анализ 17 статистически значимых лабораторных и иммунологических сдвигов, наблюдаемых в лихорадочный период ГЛПС. Это позволило получить уравнение логистической регрессии, включившего только 4 показателя из 17. Уравнение имело вид:

ПКТТ ГЛПС = 2,015 + 0,516 \* [мочевина] - 0,381 \* [CD8<sup>+</sup> Treg] + 0,364 \* [NKG2D<sup>+</sup> CTL] + 0,072 \* [АЛТ], где ПКТТ - прогностический критерий тяжелого течения ГЛПС, \* - знак умножения, мочевины - уровень мочевины в крови в ммоль/л, CD8<sup>+</sup> Treg - относительное число CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> лимфоцитов в

крови, NKG2D<sup>+</sup> CTL - относительное число CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD314<sup>+</sup> лимфоцитов в крови, АЛТ - активность аланинаминотрансферазы в крови в ЕД/л.

Разграничительная величина для 95% доверительных интервалов ПКТТ у больных со среднетяжелым и тяжелым течением геморрагической лихорадки с почечным синдромом составляла 19, то есть при ПКТТ ГЛПС  $\geq 19$  у больного можно констатировать риск тяжелого течения заболевания. Прогностическая значимость ПКТТ ГЛПС была очень велика, поскольку при построении ROC-кривой AUC составляла 1,0, то есть соответствовала максимальному значению площади под ROC-кривой.

Апробация описанного способа прогнозирования тяжести течения ГЛПС с использованием соответствующей компьютерной программы проводилась в 2022 году на первой неделе заболевания у 25 больных, получавших стационарное лечение в инфекционном отделении №1 Клиники ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России по поводу геморрагической лихорадки с почечным синдромом. В спектр лабораторных исследований крови этих больных входило обязательное определение в крови активности АЛТ, процента моноцитов среди лейкоцитов, CD314<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов, CD8<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток. Это позволило сделать расчет прогностического критерия тяжелого течения ГЛПС. У 21 пациента из 25 величина ПКТТ ГЛПС оказалась ниже 19 (в диапазоне от 9,7 до 17,6) и заболевание впоследствии имело среднетяжелое течение. У 4-х пациентов величина прогностического критерия в первые 4 дня заболевания составляла от 19,9 до 35,5 – у всех клинически было подтверждено, что ГЛПС впоследствии принимала тяжелое течение.

Пятая задача исследования предполагала установить особенности иммунного реагирования пациентов на возбудителей ГЛПС в разгар заболевания с участием оригинального фенотипического набора лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунитета и его цитокинового сопровождения.

Разгар такого инфекционного процесса как ГЛПС приходится на олигоурический и полиурический периоды заболевания.

Наиболее широкий спектр изменений наблюдался у больных в олигоурический период ГЛПС. В клиническом анализе крови сохранились отклонения, отмеченные для предыдущего периода, но они стали более выраженными и сопровождалась ускорением СОЭ. К числу биохимических сдвигов добавились признаки выраженного нарушения функции почек - рост уровней мочевины и креатинина в крови на фоне падения общего белка и альбумина. Имелись признаки вовлечения в патологический процесс и других органов - падало содержание билирубина и холестерина. Наиболее значительными при воспроизводстве общеклинических лабораторных методов в олигоурический период были сдвиги со стороны мочи - резко падало суточное количество мочи, в моче появлялся белок, количественно нарастали изменения, отмеченные в начальный период.

В иммунограмме крови тоже добавились сдвиги: возросло число В-лимфоцитов и натуральных киллеров, снизилось число Т-лимфоцитов, в том числе активированных ( $CD3^+CD25^+$ ), появился довольно значительный рост числа регуляторных Т-клеток с фенотипом  $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ . Изменения цитокинового профиля остались прежними.

В полиурический период у пациентов с ГЛПС среди общеклинических лабораторных сдвигов остались лейкоцитоз, моноцитоз, высокая СОЭ, все обозначенные ранее биохимические сдвиги; в анализе мочи принципиально изменилось суточное количество мочи - оно резко увеличилось (от 1л до 4л), белок не определялся, но остальные отклонения остались в силе.

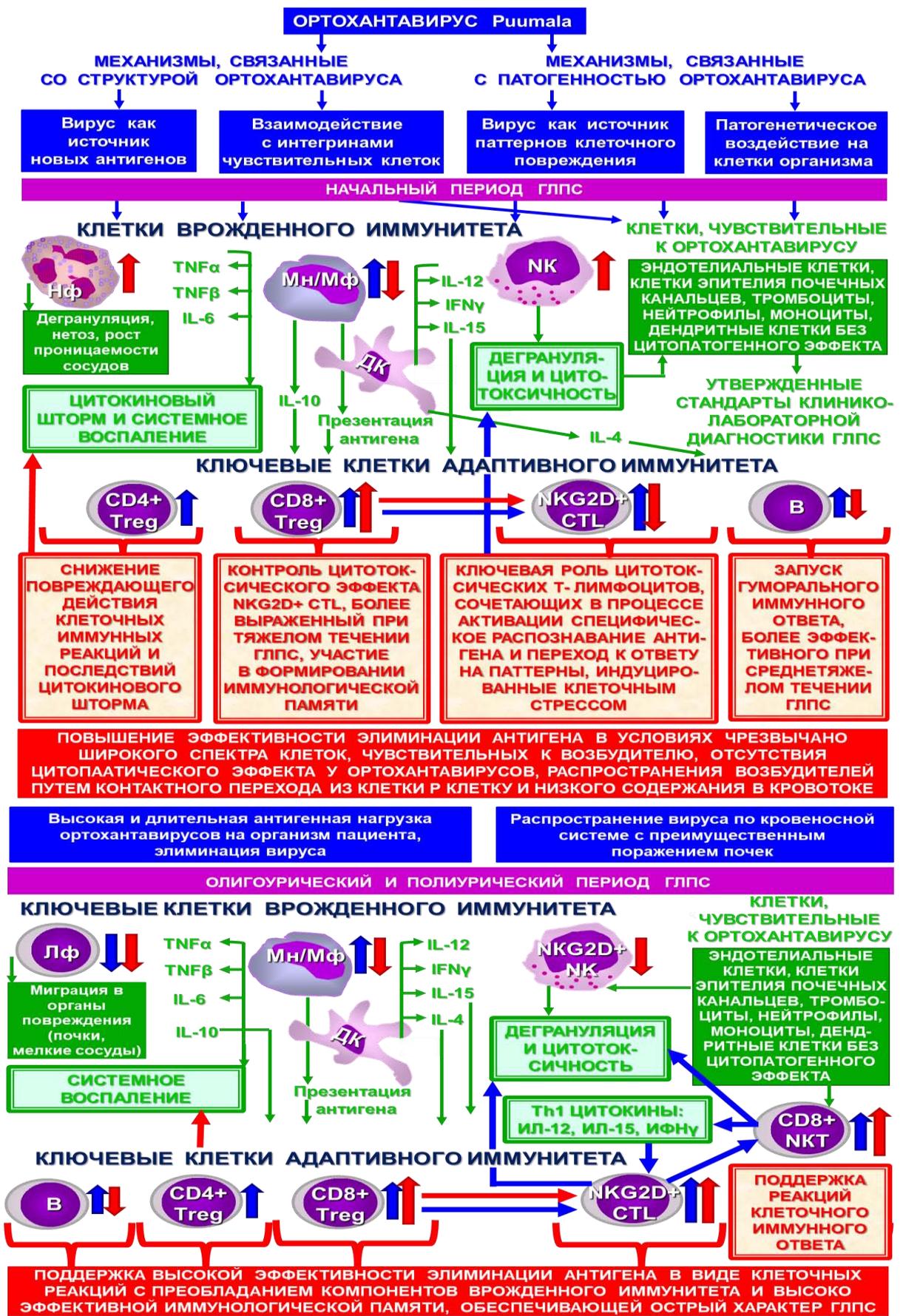
Иммунологические сдвиги также были аналогичны таковым в олигоурический период, но стало статистически значимым соотношение Т-хелперов ( $CD3^+CD4^+$ ) и цитотоксических Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD8^+$ ) в пользу последних, а также в 3 раза упало число натуральных киллеров, экспрессирующих рецептор NKG2D. Определялось статистически значимое повышение в крови числа  $CD3^+CD56^+$  Т-лимфоцитов. Изменения цитокинового профиля остались прежними.

Наблюдаемые отклонения по большинству иммунологических показателей зависели от тяжести течения ГЛПС. Так, при среднетяжелом течении отмечался рост доли В-лимфоцитов,  $CD8^+$  регуляторных Т-клеток, уровня ИЛ-15, а при тяжелом течении – рост доли CTL,  $NKG2D^+$  CTL, NKT, падение доли  $NKG2D^+$  NK, рост уровней ИЛ-15 и ИЛ-6.

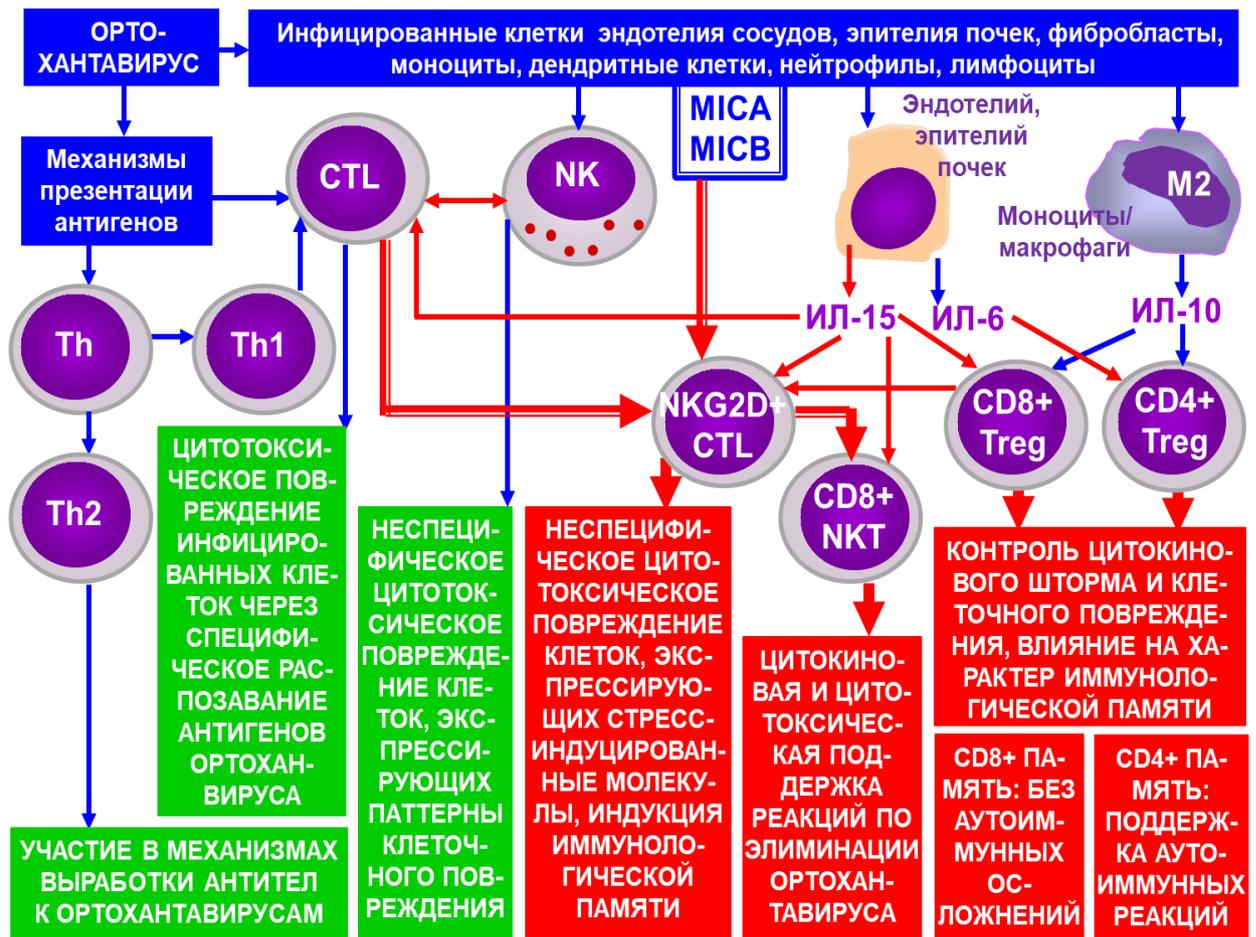
Начиная с олигоурического периода, было установлено также очень значительное возрастание процентного содержания в крови пациентов с ГЛПС NKT, обладающих одновременно фенотипическими признаками Т-лимфоцитов и натуральных киллеров ( $CD3^+CD56^+$ ). Наблюдаемый рост на статистически достоверном уровне затрагивал только одну субпопуляцию этих клеток – с фенотипом  $CD3^+CD56^+CD8^+$ . При числе этих клеток выше 11% среди лимфоцитов крови можно было с уверенностью говорить о тяжелом течении ГЛПС. Столь высокий уровень содержания NKT в крови обладал высокой диагностической значимостью при среднетяжелом течении ( $AUC = 0,823$ ) и максимальной значимостью ( $AUC = 1,0$ ) при тяжелом течении ГЛПС.

Наконец, последняя задача исследования посвящена разработке схемы иммунопатогенеза ГЛПС на разных стадиях инфекционного процесса с учетом данных по оценке патогенетической и протективной роли оригинального фенотипического набора лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунитета и его цитокинового сопровождения (*рисунки 75 -76*).

Данные из современных научных источников и результаты, полученные при выполнении данной работы и обобщенные в виде схем патогенеза по каждому периоду заболевания, показывают, что основные механизмы иммунопатогенеза ГЛПС направлены не только на элиминацию ортохантавируса, но и на ограничение системных реакций, проявляющихся как следствие функциональных изменений со стороны эндотелиальных клеток и клеток иммунной системы, инфицированных возбудителем.



**Рисунок 75 - Гипотетическая схема иммунопатогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом**



**Рисунок 76 - Блок-схема, отражающая новизну полученных данных и их интерпретацию с позиций иммунопатогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом (красный цвет – вновь полученные данные)**

В процессе выполнения исследований нами установлен целый ряд новых научных фактов, которые могут быть сгруппированы и интерпретированы, как это показано на *рисунке 75*, отражающем схему патогенеза ГЛПС с учетом всей совокупности данных, полученных в процессе исследования.

В представленной схеме целесообразно выявить блок механизмов, входящих в предлагаемую нами гипотезу и характеризующих тот элемент новизны, который позволяет получить более детальные представления об иммунопатогенезе ГЛПС, создать перспективу и направления дальнейших исследований (*рисунок 76*).

На рисунке зеленым цветом обозначен блок иммунных реакций с участием Т-лимфоцитов и натуральных киллеров, характерный для любых вирусных инфекций. В то же время каждая вирусная инфекция несет и индивидуальные черты, обусловленные особенностями вирусного возбудителя.

Особенностями ортохантавирусов как возбудителей ГЛПС является широкий спектр мишеней, в первую очередь в кровеносной системе, что требует от иммунной системы огромной нагрузки по элиминации вируса. При этом инфицированные клетки не погибают, поскольку ортохантавирусы цитопатическим действием не обладают, но меняют свои свойства, что, например, у моноцитов проявляется дифференцировкой после активации не только в М2, но и в М1 фенотип, различающихся, в частности, продукцией цитокинов. Кроме того, поражая эндотелий сосудов, ортохантавирусы часто не выходят в кровоток, а переходят из одной клетки в другую в местах межклеточных контактов, что затрудняет своевременное специфическое распознавание инфицированных клеток.

Это дает основание считать ключевой такую особенность иммунопатогенеза ГЛПС как приобретение цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL) особого механизма активации, благодаря высокому уровню экспрессии особого активирующего рецептора NKG2D (см. Обсуждение к главе 3). Судя по данным литературы, условиями для повышения экспрессии этих рецепторов на мембране CTL служат сигналы от натуральных киллеров, нарастание которых зарегистрировано нами в начальный период ГЛПС, при этом сам характер сигналов от НК пока не расшифрован. Второй очень важный сигнал – интерлейкин-15, который, может продуцироваться и НК.

В результате NKG2D<sup>+</sup> CTL изначально распознают клетки, презентующие вирусные антигены, с помощью своего специфического рецептора (TCR), что является сигналом для запуска активации NKG2D. Лигандом для NKG2D служат стресс-индуцированные молекулы, которых находятся на поверхности клеток-мишеней, если они поражены вирусом. В результате возможности CTL по распознаванию и повреждению инфицированных клеток и, следовательно, элиминации вирусного возбудителя, значительно возрастают.

Описанный механизм, сопровождающийся потерей большого числа клеток-мишеней из числа эндотелиальных клеток, эпителиальных клеток почечных канальцев, моноцитов, дендритных клеток, нуждается в ограничении. В литературе

широко обсуждается вопрос о протективной роли такого ограничения, как и подавления реакций системного воспаления, с участием регуляторных Т-клеток.

В отличие от данных других авторов, в наших исследованиях оценивалось содержание в крови регуляторных клеток двух субпопуляций –  $CD4^+$  и  $CD8^+$ , содержание обеих субпопуляций в крови поддерживается интерлейкином-10 и возрастает с начала клинических проявлений, особенно это касается  $CD8^+$  Treg. Обе субпопуляции выполняют такую функцию как супрессия реакций врожденного и адаптивного иммунитета. В формировании этих субпопуляций принимают участие цитокины как макрофагов, так и эндотелиальных клеток мелких сосудов и даже эпителиальные клетки канальцев почек.

Но есть еще одна функция Treg, которая стала активно обсуждаться только в последние годы (см. Обсуждение к главе 4). Эти клетки, несмотря на различия в фенотипе, участвуют в механизмах формирования иммунологической памяти, а точнее,  $CD4^+$  Т-памяти.

Значение иммунологической памяти в иммунопатогенезе ГЛПС очень велико, поскольку это заболевание всегда имеет только острое течение, и примерно 11 лет человек остается защищенным от повторного развития ГЛПС. Однако, довольно много проблем и осложнений дает тяжелое течение заболевания, а среди осложнений при заболеваниях, вызванных ортохантавирусом *Puumala*, в исходах ГЛПС особо подчеркивается значение высокой частоты развития аутоиммунных проявлений.

Безотносительно к ГЛПС в источниках литературы встречаются следующие сведения. В формировании  $CD4^+$  Treg памяти отмечено особое значение интерлейкина-6, в составе Т-клеток памяти  $CD4^+$  Treg подавляют преимущественно Т-хелперную субпопуляцию, в составе которой довольно значительную долю составляют клетки, обладающие аутореактивностью, и на которые иммуносупрессивный эффект более специфичных к антигену  $CD4^+$  Treg не распространяется.  $CD8^+$  Treg памяти подавляют CTL, практически не содержащие аутореактивные клоны, что снижает возможность аутоиммунных проявлений. Не случайно в наших исследованиях отмечено, что тяжелое течение

ГЛПС сопровождается достоверным нарастанием в крови  $CD8^{+}Treg$  при одновременном снижении общего числа CTL, в том числе и экспрессирующих NKG2D,

Не случайно, при тяжелом течении ГЛПС в разгар заболевания наблюдается гораздо больший подъем в крови числа NKT, принадлежащих к субпопуляции  $CD8^{+}$  (единственной среди NKT экспрессирующей NKG2D) и поддерживающих наиболее эффективный механизм элиминации ортохантавирусов (см. Обсуждение к главе 5).

## ВЫВОДЫ

1. Пусковые механизмы иммунного процесса в ответ на ортохантавирус *Puumala* при развитии геморрагической лихорадки с почечным синдромом включают ключевую роль цитотоксических Т-лимфоцитов с высоким уровнем экспрессии рецептора NKG2D и фенотипом  $CD3^+CD8^+CD56^-CD314^+$  при регуляторном значении ИЛ-15 и контроле со стороны регуляторных Т-клеток с фенотипом  $CD3^+CD8^+CD25^+FoxP3^+$ .

2. Эффективность системы ранних маркеров геморрагической лихорадки с почечным синдромом при дифференциальной диагностике с острыми респираторными вирусными инфекциями значительно возрастает при использовании «раннего неспецифического интегрального показателя» геморрагической лихорадки с почечным синдромом, значения которого  $<91,5$  с высокой диагностической значимостью свидетельствуют в пользу геморрагической лихорадки с почечным синдромом.

3. В особенности пусковых механизмов иммунного ответа при геморрагической лихорадке с почечным синдромом, влияющих на тяжесть течения заболевания, входит изменение соотношения Т-лимфоцитов следующих фенотипов:  $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$  в пользу  $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^-CD16^+CD56^+/CD3^+CD8^+CD56^-$  в пользу  $CD3^-CD16^+CD56^+$ ,  $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+/CD3^+CD8^+CD25^+FoxP3^+$  в пользу  $CD3^+CD8^+CD25^+FoxP3^+$ .

4. Для прогнозирования риска тяжелого течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом в начальный период заболевания высоко эффективен «прогностический критерий тяжелого течения» геморрагической лихорадки с почечным синдромом, значения которого  $\geq 19$  оцениваются как критерий риска тяжелого течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом.

5. Особенностью иммунного реагирования пациентов на возбудителей

геморрагической лихорадки с почечным синдромом в разгар заболевания является значительный рост НКТ с фенотипом  $CD3^+CD56^+CD8^+$ , поддерживающих реакции врожденного иммунитета через цитотоксическое воздействие и продукцию цитокинов клеточного иммунного ответа.

6. Вновь разработанная схема иммунопатогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом в качестве ключевого механизма развития иммунного процесса рассматривает значительный рост NKG2D-зависимого реагирования со стороны цитотоксических Т-лимфоцитов с фенотипом  $CD3^+CD8^+CD56^-CD314^+$ , поддерживаемого высоким уровнем ИЛ-15 с его способностью к стимуляции пула  $CD8^+$  клеток с функциями иммунологической памяти, и при контроле функций этих лимфоцитов со стороны регуляторных Т-клеток с фенотипом  $CD3^+CD8^+CD25^+FoxP3^+$ .

7. В соответствии с вновь разработанной схемой иммунопатогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом отмечено влияние на протективные функции иммунной системы соотношения регуляторных Т-клеток с фенотипами  $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$  и  $CD3^+CD8^+CD25^+FoxP3^+$ , благодаря их дифференцированному участию в механизмах формирования иммунологической памяти, а также поддержки реакций по элиминации вируса с участием НКТ с фенотипом  $CD3^+CD8^+CD56^+$ , экспрессирующих NKG2D.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Больным с подозрением на ГЛПС (первая неделя заболевания) целесообразно включать в программу обследования кроме рутинных лабораторных показателей исследование крови с определением следующих иммунологических показателей: процент натуральных киллеров среди лимфоцитов крови, процент В-лимфоцитов среди лимфоцитов крови, процент и относительное число  $CD3^+CD8^+CD56^-CD314^+$  клеток среди лимфоцитов крови, процент  $CD3^+CD4^+FoxP3^+$  клеток среди лимфоцитов крови, относительное число  $CD3^+CD8^+FoxP3^+$  лимфоцитов в крови, уровень в крови IL-15. Выявленные нарушения в полученных данных являются дополнительным основанием к проведению оценки прогноза степени тяжести ГЛПС.

2. При проведении ранней лабораторной диагностики ГЛПС (на первой неделе заболевания до наступления сероконверсии) пациентам рекомендуется определять ранний неспецифический интегральный показатель с помощью следующей формулы:

$$\text{РНИП ГЛПС} = 1,65 + 0,395 * [\text{тромбоциты}] - 0,209 * [\text{моноциты}] + 0,531 * [\text{АЛТ}] - 0,785 * [\text{АСТ}] + 0,114 * [\gamma\text{ГТП}] + 0,128 * [\text{креатинин}] + 0,145 * [\text{НК}] - 0,142 * [\text{В-лф}] + 0,127 * [\text{NKG2D}^+ \text{CTL}] + 0,156 * [\text{CD4}^+ \text{Treg}] - 0,13 * [\text{IL-15}],$$

где РНИП - ранний неспецифический интегральный показатель ГЛПС, \* - знак умножения, тромбоциты - число тромбоцитов в 1л крови/ $10^9$ , моноциты - процент моноцитов среди лейкоцитов крови, АЛТ - активность аланинаминотрансферазы в крови в ЕД/л, АСТ - активность аспарат-аминотрансферазы в крови в ЕД/л,  $\gamma$ ГТП - активность  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы в крови в ЕД/л, креатинин - уровень креатинина в крови в ммоль/л, НК - процент натуральных киллеров среди лимфоцитов крови, В-лф - процент В-лимфоцитов среди лимфоцитов крови,  $NKG2D^+$  CTL - процент  $CD3^+CD8^+CD314^+$  клеток среди

лимфоцитов крови, CD4<sup>+</sup> Treg - процент CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> клеток среди лимфоцитов крови, IL-6 - уровень IL-6 в крови в пг/мл.

Значения РНИП ГЛПС  $\leq 91,5$  на первой неделе заболевания свидетельствует в пользу ГЛПС с очень высокой диагностической значимостью, площадь под ROC-кривой AUC = 0,939 при максимуме 1.

3. Больным ГЛПС рекомендуется проводить оценку прогноза тяжелого течения ГЛПС в лихорадочный период заболевания по формуле:

ПКТТ ГЛПС =  $2,015 + 0,072 * [\text{АЛТ}] + 0,516 * [\text{мочевина}] + 0,364 * [\text{NKG2D}^+ \text{ CTL}] - 0,381 * [\text{CD8}^+ \text{ регуляторные Т-клетки}]$ ,

где ПКТТ - прогностический критерий тяжелого течения, \* - знак умножения, АЛТ - активность аланинаминотрансферазы в крови в ЕД/л, мочевины - уровень мочевины в крови в ммоль/л, NKG2D<sup>+</sup> CTL - относительное число CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD314<sup>+</sup> лимфоцитов в крови, CD8<sup>+</sup> регуляторные Т-клетки - относительное число CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> лимфоцитов в крови.

При значениях ПКТТ ГЛПС  $\geq 19$  у больного прогнозируют развитие тяжелого течения заболевания с практически абсолютной прогностической значимостью, площадь под ROC-кривой AUC = 1,0 при максимуме 1.

4. На первой неделе заболевания у больных с подозрением на ГЛПС для ранней лабораторной диагностики, а также у больных с установленным диагнозом ГЛПС для прогнозирования тяжелого течения болезни рекомендуется использовать программу для ЭВМ «Калькулятор ранней лабораторной диагностики и прогнозирования тяжелого течения ГЛПС».

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АЛТ	аланинаминотрансфераза
АСТ	аспартатаминотрансфераза
ГЛПС	геморрагическая лихорадка с почечным синдромом
γГТП	гамма-глутамилтранспептидаза
ДВС	синдром диссеминированного свертывания крови
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА	иммуноферментный анализ
КФК	креатининфосфокиназа
ЛДГ	лактатдегидрогеназа
МКАТ	моноклональные антитела
ОПП	острое повреждение почек
ОРВИ	острые респираторные вирусные инфекции
ПКТТ	прогностический критерий тяжести течения
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНИП	ранний неспецифический интегральный показатель
РНИФ	реакция непрямой иммунофлуоресценции
РНК	рибонуклеиновая кислота
СОЭ	скорость оседания эритроцитов
ТФР	трансформирующий фактор роста
ХЛС	хантавирусный легочный синдром
ЦИК	циркулирующие иммунные комплексы
ЩФ	щелочная фосфатаза
AUC	площадь под ROC-кривой
CD	маркеры лимфоцитов системы "Cluster differentiation"
CTL	цитотоксические Т-лимфоциты
FoxP3	внутриклеточный маркер регуляторных Т-клеток

HLA-DR	антигены гистосовместимости человека II класса
HLA-E	антигены гистосовместимости человека I класса неклассические
Ig	иммуноглобулин
IFN	интерферон
IL	интерлейкин
ILC	лимфоциты врожденного иммунитета
NET	нейтрофильная внеклеточная ловушка
NK	натуральные киллеры
NKT	T-лимфоциты, несущие маркер натуральных киллеров CD56 <sup>+</sup>
NO	оксид азота
NOS	синтаза оксида азота
PD-1	клеточный рецептор, защищающий клетку от сверхактивной иммунной системы
RIG	индуцибельный ген ретиноидной кислоты
ROC	кривая, отражающая соотношение чувствительности и специфичности диагностического теста
SAPS	шкала тяжести состояния больного
SOFA	шкала оценки органной недостаточности
TLR	паттернраспознающие Toll-подобные рецепторы
TNF	фактор некроза опухоли
Treg	регуляторные T-клетки
VEGF	ростовый фактор эндотелия сосудов

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Алехин, Е.К. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом [Текст] / Е.К.Алехин, Ф.Х.Камилов, Д.Х.Хунафина и др. // Медицинский вестник Башкортостана, 2013. - № 5. - С. 24-31.
2. Байгильдина, А.А. Вазомодулирующая функция эндотелия при геморрагической лихорадке с почечным синдромом [Текст] / А.А.Байгильдина // Казанский медицинский журнал, 2012. - Т. 93, № 3. - С. 421-426.
3. Байгильдина, А.А. Современные представления о патогенезе геморрагической лихорадки с почечным синдромом [Текст] / А.А.Байгильдина // Медицинский вестник Башкортостана, 2014. - Т. 9, № 1. - С. 98-109.
4. Балмасова, И.П. Современная лабораторная диагностика и биомаркеры инфекционных болезней [Текст] / И.П.Балмасова // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение, 2015. - № 2. - С. 18-25.
5. Балмасова, И.П. Структурно-функциональная организация иммунной системы [Текст] / И.П.Балмасова, И.В.Нестерова, Е.С.Малова, Р.И.Сепиашвили // М.: Практическая медицина, 2019. - 72 с.
6. Бархалева, О.А. Вакцина против геморрагической лихорадки с почечным синдромом [Текст] / О.А.Бархалева, М.С.Воробьева, И.П.Ладыженская и др. // Биопрепараты, 2011. - № 1. - С. 27-30.
7. Бойцова, Е.А. Интерлейкин 4. Биологические функции и клиническое значение в развитии аллергии (научный обзор) [Текст] / Е.А.Бойцова, Г.О. Азимуродова, Т.В.Косенкова // Профилактическая и клиническая медицина. – 2020. – № 2. – С. 70-79.
8. Бородина, Ж.И. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом – проблема современности [Текст] / Ж.И.Бородина, О.Е.Царенко, К.М.Монахов, Л.И.Багаутдинова // Архив внутренней медицины, 2019. - № 6. – С. 419-427.

9. Валишин, Д.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом [Текст] / В кн: Инфекционные болезни. Национальное руководство. 2-е издание, переработанное и дополненное. Под ред. Н.Д.Ющука, Ю.Я.Венгерова / М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. - С. 894-904.
10. Валишин, Д.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом у взрослых. Клинические рекомендации [Текст] / Д.А.Валишин, И.В.Шестакова, Р.Т.Мурзабаева и др. // Некоммерческое партнерство «Национальное научное общество инфекционистов», 2016. - 49 с.
11. Валишин, Д.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом: клиника, диагностика и лечение: учебное пособие для врачей [Текст] / Д.А.Валишин, Р.Т.Мурзабаева, А.П.Мамон и др. // Уфа, Изд-во ГБОУ ВПО БГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. - 51 с.
12. Васильев, С.А. Тромбоцитопении [Текст] / С.А.Васильев, В.Л.Виноградов, А.В.Мазуров, М.Л.Маркова // Акушерство, гинекология и репродукция, 2014. - Т. 8, № 2. - С. 112-125.
13. Гареев, И.Ф. Потенциальная роль микрорнк в патогенезе геморрагической лихорадки с почечным синдромом [Текст] / И.Ф.Гареев, О.А.Бейлерли, В.Н.Павлов и др. // Урология, 2021. – № 1. – С. 112-119.
14. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом: актуальные проблемы эпидемиологии, патогенеза, диагностики, лечения и профилактики [Текст] / Под ред. акад. АН РБ Р.Ш. Магазова // Уфа, 2006. - 240 с.
15. Гусев, Е.Ю. Методология изучения системного воспаления [Текст] / Е.Ю.Гусев, Л.Н.Юрченко, В.А.Черешнев, Н.В.Зотова // Цитокины и воспаление, 2008. - Т. 7, № 1. - С. 15-23.
16. Дзагурова, Т.К. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (этиология, специфическая лабораторная диагностика, разработка диагностических и вакцинных препаратов) [Текст] / Т.К.Дзагурова // Дисс. ... докт. мед. наук, Внуково, 2014. - 235 с.

17. Зурочка, А.В. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях [Текст] / А.В. Зурочка, С.В. Хайдуков, И.В. Кудрявцев, А.В.Черешнев // Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018. – 720 с.
18. Иванис, В.А. Современные представления о патогенезе хантавирусной инфекции [Текст] / В.А. Иванис // Тихоокеанский медицинский журнал, 2008. - № 2. - С. 15-19.
19. Иванова, А.В. Обзор эпидемиологической ситуации с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в Российской Федерации в 1990-2015 гг. [Текст] / А.В.Иванова, Н.В.Попов, Е.В.Куклев и др. // ЖМЭИ, 2017. - № 2. - С. 16-21.
20. Калмыков, А.А. Эпидемиологический анализ причин роста заболеваемости геморрагической лихорадкой с почечным синдромом военнослужащих в центральном военном округе в 2011 году [Текст] / А.А. Калмыков, Р.Н. Аминев, А.Г. Корнеев, В.С. Поляков // Медицинский альманах, 2012. - №3. - С. 97.
21. Клинические рекомендации: Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом у взрослых (КР347). Разработаны Международной ассоциацией специалистов в области инфекций (МАСОИ). Утверждены Научным советом Министерства Здравоохранения Российской Федерации [Текст] // – 2016. – 49 с.
22. Ковальчук, Л.В. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии [Текст] / Л.В.Ковальчук, Л.В.Ганковская, Р.Я. Мешкова // М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. - 640 с.
23. Кузнецов, И.А. Роль ферритина в биологических средах человека [Текст] / И.А.Кузнецов, В.И.Потиевская, И.В.Качанов, О.О.Куралева // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 5. ;URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27102> (дата обращения: 15.04.2023).
24. Любушкина, А.В. Особенности гематологических изменений у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в зависимости от степени тяжести и периода заболевания [Текст] / А.В.Любушкина // Аспирантский вестник Поволжья, 2019. – Том 19, № 5-6. – С. 72-80.

25. Любушкина, А.В. Прогнозирование тяжести течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом [Текст] / А.В. Любушкина, Л.Л. Попова, Г.В. Недугов и др. // Журнал инфектологии. – 2019. – Т. 11, № 2. – С. 35-39.
26. Максема, И.Г. Характеристика заболеваемости геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в Приморском крае в 1999-2008 гг. [Текст] / И.Г.Максема, Г.Г.Компанец, О.В.Иунихина и др. // Тихоокеанский медицинский журнал, 2010. - № 3. - С. 43-45.
27. Малашенкова, И.К. Интерлейкин-15: строение, сигналинг и роль в иммунной защите / И.К. Малашенкова, Г.В. Казанова, Н.А. Дидковский // Молекулярная медицина. – 2014. – № 3. – С. 9-20.
28. Мельников, В.Л. Клинико-эпидемиологическая характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Пензенской области и городе Пензе [Текст] / В.Л.Мельников, Л.Н.Афтаева, Н.Н.Митрофанова, Н.О.Цыплихин // Современные проблемы науки и образования, 2022. – № 6 (часть 1). URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=32267> (дата обращения: 26.04.2023).
29. Мингазова, Э.М. Современные аспекты этиотропной терапии геморрагической лихорадки с почечным синдромом [Текст] / Э.М.Мингазова, Л.Р.Шайхуллина, Д.А.Валишин, Д.Х.Хунафина // Медицинский вестник Башкортостана, 2015. - Т. 10, № 1. - С. 108-113.
30. Митрофанова, Н.Н. Анализ клинико-эпидемиологических и эпизоотических особенностей заболеваемости геморрагической лихорадкой с почечным синдромом на территории Пензенской области [Текст] / Н.Н. Митрофанова, В.Л. Мельников, Н.Ф. Золина, Е.Д. Скороходова // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – №3 (11). – С. 109-116.
31. Морозов, В.Г. Клинические особенности геморрагической лихорадки с почечным синдромом в России [Текст] / В.Г. Морозов, А.А. Ишмухаметов, Т.К. Дзагурова, Е.А. Ткаченко // Инфекционные болезни, 2017. - № 5. - С. 156-161.
32. Морозов, В.Г. Сравнительная характеристика геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вызываемой хантавирусами пуумула и добрава

[Текст] / В.Г. Морозов, Ю.В.Юничева, А.Ф.Брюханов и др. // Медицинский вестник Среднего Кавказа, 2007. - Т. 2, № 6. - С. 38-44.

33. Мухамадеева, Н.Р. Случаи ложноположительного результата серологических реакций у больных онкопатологией с предварительным диагнозом ГЛПС [Текст] / Н.Р.Мухамадеева, З.Р.Ахмадеев, Э.М.Балягутдинов, А.Т.Галиева // Материалы национального молодежного медицинского форума "Творческий потенциал молодежи в развитие медицинской науки", Якутск, 2016. - Раздел 5.2. - С. 337-344.

34. Нехаев, С.Г. Актуальные аспекты геморрагической лихорадки с почечным синдромом (обзор литературы) [Текст] / С.Г.Нехаев, Л.В.Мельник // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2018, №1, 7-4. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-1/7-4.pdf>

35. Никольская, М.В. ГЛПС: эпидемиологическая характеристика и динамика лабораторных показателей [Текст] / М.В.Никольская, В.Л. Мельников, Н.Н.Митрофанова и др. // Материалы XII международной научно-практической конференции «Инновационная наука». М.: МЦНО, 2018. - С. 19-25.

36. Образцов, Ю.Г. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом у военнослужащих в Приморском крае (клинико-эпидемиологическая характеристика и возможности этиотропной терапии) [Текст] / Ю.Г.Образцов // Дис. ... канд. мед. наук: СПб., 2006. - 153 с.

37. Паевская, О.А. Нарушение зрения как основная жалоба у пациента с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (клиническое наблюдение) [Текст] / О.А. Паевская, О.Ф. Белая, Е.А. Немилостива Е.А. и др. // РМЖ. – 2024; – № 5. – С. 32-36.

38. Перевертень, Л.Ю. Оценка активности ИЛ-12 у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, ассоциированной с серотипом Сеул [Текст] / Л.Ю.Перевертень, Е.В.Маркелова // Медицинская иммунология, 2005. - Т. 7, № 1. - С. 89-92.

39. Петри, А. Наглядная медицинская статистика. 2-е издание [Текст] / А. Петри, К. Сэбин // Москва, «ГЭОТАР-МЕДИА». – 2009. – 168 с.

40. Плехова, Н.Г. Метаболическая активность макрофагов, зараженных Hantaviruses - возбудителями геморрагической лихорадки с почечным синдромом [Текст] / Н.Г.Плехова, Л.М.Сомова, Р.А.Слонова и др. // Биохимия, 2005. - Т. 70, N 9. - С. 1198-1208.

41. Поздеева, О.С. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом у детей [Текст] / О.С.Поздеева, О.Г.Мохова, М.Н.Канкасова и др. // Практическая медицина, 2016. - № 8 (100). - С. 53-58.

42. Рабинович, В.И. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (патогенез и пути оптимизации интенсивной терапии) [Текст] / В.И.Рабинович // Автореферат дисс. ... докт. меднаук: С-Пб, 2007. - 42 с.

43. Савицкая, Т.А. Анализ эпидемиологической ситуации по геморрагической лихорадке с почечным синдромом в Российской Федерации в 2022 г. и прогноз ее развития на 2023 г. [Текст] / Т.А.Савицкая, А.В.Иванова, Г.Ш.Исаева и др. // Проблемы особо опасных инфекций, 2023. - № 1. – С. 85-95.

44. Сепиашвили, Р.И. Естественные киллеры и их рецепторы, специфичные к МНС-I [Текст] / Р.И.Сепиашвили, И.П.Балмасова // Иммунология, 2007. - Т. 27, № 1. - С. 46-51.

45. Сергеева, И.В. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) в Красноярске [Текст] / И.В.Сергеева, С.В.Липнягова, А.И.Шульгина и др. // Современные проблемы науки и образования, 2015. - № 5. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=21937>

46. Сиротин, Б.З. Очерки изучения геморрагической лихорадки с почечным синдромом [Текст] / Б.З.Сиротин // Хабаровск: «РИОТИП», 2005. - 194 с.

47. Слонова, Р.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (современные аспекты экологии, этиологии, эпидемиологии, иммунопатогенеза, диагностики, клиники и лечения) [Текст] / Р.А.Слонова, Е.А.Ткаченко, В.А.Иванис и др. // Владивосток: Изд-во ОАО «Примполиграфкомбинат», 2006. - 237 с.

48. Суздальцев, А.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (Пуумала) в природных очагах на территории Среднего Поволжья: динамика

клинико-лабораторных проявлений в 1997-2012 гг. [Текст] / А.А.Суздальцев, В.Г.Морозов, Р.Р.Лукаев, Е.А.Ткаченко // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение 2014. - Т. 4, № 9. - С. 44-50.

49. Супотницкий М.В. Вирусные геморрагические лихорадки [Текст] / М.В. Супотницкий // В кн.: Биологическая война. Введение в эпидемиологию искусственных эпидемических процессов и биологических поражений. М.: Кафедра, Русская панорама. – 2013. – С. 887–927.

50. Сыртланова, Г.Р. Патогенетическое значение гипергомоцистеинемии у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом [Текст] / Г.Р.Сыртланова, Д.Х.Хунафина, Ф.Х.Камилов // Медицинский вестник Башкортостана, 2012. - Т. 7, № 1. - С. 84-86.

51. Ткаченко, Е.А. Разработка вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом [Текст] / Е.А. Ткаченко, Т.К.Дзагурова, П.А.Набатников и др. // Инфекция и иммунитет, 2012. - Т. 2, № 1-2. - С.202-202.

52. Ткаченко, Е.А. Эпизоотологические и вирусологические особенности природного очага хантавирусной инфекции в субтропической зоне Краснодарского края [Текст] / Е.А. Ткаченко, Н.М. Окулова, С.П. Морзунов и др. // Вопросы вирусологии, 2005. - №3. - С. 14-19.

53. Фазлыева, Р.М. Интерстициальное поражение почек при геморрагической лихорадке с почечным синдромом [Текст] / Р.М. Фазлыева, Г.Х. Мирсаева, Г.А. Мухетдинова // Медицинский вестник Башкортостана, 2007. - № 5. - С. 46-50.

54. Фазылова, Л.И. Ишемический инсульт у пациента с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (клиническое наблюдение) [Текст] / Л.И.Фазылова, Т.Д.Юнусов, Э.Н.Закирова и др. // Южно-Российский журнал терапевтической практики, 2023. – Т. 4, № 1. – С. 113-116.

55. Хаитов, Р.М. Иммунология: структура и функции иммунной системы [Текст] / Р. М. Хаитов // М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 280 с.

56. Хунафина, Д.Х. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. Обзор литературы [Текст] / Д.Х.Хунафина, Д.А.Валишин, Л.Р.Шайхуллина,

А.Т.Галиева // Международный журнал экспериментального образования, 2014. – № 8-1. – С. 14-17.

57. Хорошун, Е.В. Современные подходы к вопросам диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом [Текст] / Е.В.Хорошун, А.А.Шульдяков, А.Н.Куличенко, А.А.Решетников // Фундаментальные исследования, 2005. - № 4 - С. 16-18.

58. Хунафина, Д.Х. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. Современная эпидемиология [Текст] / Д.Х.Хунафина, А.Т.Галиева, Л.Р.Шайхуллина // Медицинский альманах, 2009. - №2. - С.154-156.

59. Хунафина, Д.Х. Связь полиморфизмов генов IL1B и IL1RN с предрасположенностью к геморрагической лихорадке с почечным синдромом и особенностями ее течения [Текст] / Д.Х. Хунафина, Т.А. Хабелова, О.И. Кутуев // Эпидемиология и инфекционные болезни, 2010. - № 1. - С. 49-53.

60. Юрова, К.А. Эффекты  $\gamma$ C-цитокинов (IL-2, IL-7 И IL-15) на созревание и дифференцировку CD45RO+CD4+/CD8+Т-лимфоцитов *in vitro* [Текст] / К.А.Юрова, О.Г.Хазиахматова, Н.М.Тодосенко, Л.С.Литвинова // Медицинская иммунология, 2018. – Т. 20, № 1. – С. 45-52.

61. Ярец, Ю.И. Специфические белки: практическое пособие для врачей: в 2 частях. – Часть II. Клинико-диагностическое значение определения специфических белков [Текст] / Ю.И. Ярец // Гомель, 2015. – 47 с.

62. Ярилин, А.А. Иммунология: учебник [Текст] / А.А.Ярилин / – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 752 с.

63. Acuna, R. Hantavirus Gn and Gc glycoproteins self-assemble into virus-like particles [Text] / R.Acuna, N.Cifuentes-Munoz, C.L.Marquez et al. // J Virol, 2014. – Vol. 88, N 4. – P. 2344–2348.

64. Agle, K. Bim regulates the survival and suppressive capability of CD8(+) FOXP3(+) regulatory T cells during murine GVHD [Text] / K. Agle, B.G. Vincent, C. Piper et al. // Blood. – 2018. – Vol. 132. – P. 435–447.

65. Akira, S. Pathogen recognition and innate immunity [Текст] / S.Akira, S.Uematsu, O.Takeuchi // Cell, 2006. - Vol. 124, N 4. - P. 783-801.

66. Andre, M.C. Impaired tumor rejection by memory CD8 T cells in mice with NKG2D dysfunction [Text] / M.C.André, D.Sigurdardottir, S.Kuttruff et al. // *Int J Cancer*, 2012. – Vol. 131, N 7. – P. 1601–1610.
67. Antoine, M. Imported haemorrhagic fever with renal syndrome caused by Dobrava-Belgrade hantavirus in France [Text] / M.Antoine, M.E.Langlois, E.Bres et al. // *Clin Kidney J*, 2021. – Vol. 14, N 3. – P. 1014–1016.
68. Araki, K. Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping Hantaan, Seoul, and Dobrava hantavirus infections [Text] / K.Araki, K.Yoshimatsu, M.Ogino et al. // *J Clin Microbiol*, 2001. - Vol. 39, N 7. - P. 2397-2404.
69. Avsic-Zupanc, T. Hantavirus Infections [Text] / T.Avsic-Zupanc, A.Saksida, M.Korva // *Clin Microbiol Infect*, 2019. – Vol. 21. – P. 6–16.
70. Baev, D.V. Distinct homeostatic requirements of CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> subsets of Valpha24-invariant natural killer T cells in humans [Text] / D.V. Baev, X.H. Peng, L. Song et al. // *Blood*. – 2004. – Vol. 104. – P. 4150–4156.
71. Barbosa, R.R. Monocyte activation is a feature of common variable immunodeficiency irrespective of plasma lipopolysaccharide levels [Text] / R.R.Barbosa, S.P.Silva, S.L.Silva et al. // *Clin Exp Immunol*, 2012. - Vol. 169, N 3. - P. 263-272.
72. Battisti, A.J. Structural studies of hantaan virus [Text] / A.J.Battisti, Y.K.Chu, P.R.Chipman et al. // *J Virol*, 2010. - V. 85, N 2. - P. 835-841.
73. Becker, T.C. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells [Text] / T.C.Becker, E.J.Wherry, D.Boone et al. // *J Exp Med*, 2002. – Vol. 195, N 12. – P. 1541–1548.
74. Belkaid, Y. Natural regulatory T cells in infectious disease [Text] / Y.Belkaid, B.T.Rouse // *Nat Immunol*, 2005. - Vol. 6, N 4. - P. 353-360.
75. Bendelac, A. The biology of NKT cells [Text] / A. Bendelac, P.B. Savage, L. Teyton // *Annu Rev Immunol*. – 2007. – Vol. 25. – P. 297–336.
76. Berzins S.P. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease [Text] / S.P. Berzins, M.J. Smyth, A.G. Baxter // *Nat Rev Immunol*. – 2011. – Vol. 11. – P. 131–142.

77. Bettelli E. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells [Text] / E.Bettelli, Y.Carrier, W.Gao et al. // *Nature*, 2006. – Vol. 441, N 7090. – P. 235–238.
78. Beutler, B.A. TLRs and innate immunity [Text] / B.A. Beutler // *Blood*, 2009. - Vol. 113, N 7. - P. 1399-1407.
79. Bezie, S. IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance [Text] / S.Bezie, E.Picarda, J.Ossart et al. // *J Clin Invest*, 2015. – Vol. 125, N 10. – P. 3952-3964.
80. Bjorkstrom, N.K. Emerging insights into natural killer cells in human peripheral tissues [Text] / N.K.Bjorkstrom, H.-G.Ljunggren, J.Michaelsson // *Nat Rev Immunol*, 2016. - Vol. 16, N 5. - P. 310-320.
81. Bjorkstrom, N.K. Rapid expansion and long term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus [Text] / N.K.Bjorkstrom, T.Lindgren, M.Stoltz et al. // *J Exp Med*, 2011. - Vol. 208, N 1. - P. 13–21.
82. Bluestone, J.A. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells [Text] / J.A. Bluestone, J.H. Buckner, M. Fitch et al. // *Sci Transl Med.* – 2015. – Vol. 7, N 315. – 315ra189.
83. Borges, A.A. Role of mixed Th1 and Th2 serum cytokines on pathogenesis and prognosis of hantavirus pulmonary syndrome [Text] / A.A.Borges, G.M.Campos, M.L.Moreli et al. // *Microbes Infect*, 2008. - Vol. 10, N 10-11. - P. 1150-1157.
84. Bossi, F. Platelet-activation factor and kinin-dependent vascular leakage as a novel functional activity of the soluble terminal complement complex [Text] / F.Bossi, F.Fischetti, V.Pellis et al. // *J Immunol*, 2004. - Vol. 173, N 11. - P. 6921-6927.
85. Boudreau, E. Phase 1 clinical study on the safety, tolerability and immunogenicity of Hantaan and Puumala DNA vaccines [Text] / E.Boudreau, K.Sellers, J.Rusnak et al. // *Abstracts of the VIII International Conference on HFRS HPS and Hantavirus*, Athens, Greece. 2010. - P. 83.
86. Braun, M. NK cell activation in human hantavirus infection explained by virus-induced IL-15/IL15R $\alpha$  expression [Text] / M.Braun, N.K.Bjorkstrom, S.Gupta et al. // *PLoS Pathol*, 2014. - Vol. 10, N 11. - P. e1004521.

87. Braun, N. Characterization and outcome following Puumala virus infection: A retrospective analysis of 75 cases [Text] / N. Braun, M. Haap, D. Overkamp et al. // *Nephrol Dial Transpl.* – 2010. – Vol. 25, N 9. – P. 2997–3003.
88. Brincks, E.L. Antigen-specific memory regulatory CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells control memory responses to influenza virus infection [Text] / E.L. Brincks, A.D. Roberts, T. Cookenham et al. // *J Immunol.* – 2013. – Vol. 190. – P. 3438–3446.
89. Brinkmann, V. Neutrophil extracellular traps kill bacteria [Text] / V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann et al. // *Science*, 2004. - Vol. 303, N 5663. - P. 1532-1535.
90. Bronze M.S. Viral agents as biological weapons and agents of bioterrorism [Text] / M.S. Bronze, M.M. Huycke, L.J. Machado et al. // *Am J Med Sci.* – 2002. – Vol. 323, N 6. – P. 316-325.
91. Cai, L. The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL [Text] / L. Cai, J. Rubin, W. Han et al. // *Clin J Am Soc Nephrol.* – 2010. – Vol. 5, N 12. – P. 2229–2235.
92. Carapito, R. Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands [Text] / R. Carapito, S. Bahram // *Immunol Rev.* – 2015. – Vol. 267, N 1. – P. 88-116.
93. Casapia, M. Hantavirus pulmonary syndrome (Rio Mamore virus) in the Peruvian Amazon region [Text] / M. Casapia, E. Mamani, M.P. García et al. // *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 2013. - Vol. 29, N 3. - P. 390-395.
94. Cassetta, L. Macrophage polarization in health and disease [Text] / L. Cassetta, E. Cassol, G. Poli // *Scientific World Journal*, 2011. - Vol. 11. - P. 2391-2402.
95. Cadrillier, A. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury [Text] / A. Cadrillier, K. Kessenbrock, B.M. Gilliss et al. // *J Clin Invest*, 2012. - Vol. 122, N 7. - P. 2661-2671.
96. Centers for Disease Control and Prevention Technical/Clinical Information: HPS Treatment—Hantavirus, 2022. [(accessed on 12 July 2022)]; [Text] Available online: <https://www.cdc.gov/hantavirus/technical/hps/treatment.html>.

97. Centers for Disease Control and Prevention Facts about Hantaviruses What You Need to Know to Prevent the Disease Pulmonary Syndrome (HPS), 2022 [(accessed on 23 August 2022)]; [Text] Available online: [https://www.cdc.gov/hantavirus/pdf/hps\\_brochure.pdf](https://www.cdc.gov/hantavirus/pdf/hps_brochure.pdf).

98. Chen, T. NK cells suppress CD8<sup>+</sup> T cell immunity via NKG2D in severe aplastic anemia / T. Chen, T. Zhang, C. Liu et al. // *Cell Immunol*, 2019. – Vol. 335. – P. 6-14.

99. Clark, S.R. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood [Text] / S.R.Clark, A.C.Ma, S.A.Tavener et al. // *Nat Med*, 2007. - Vol. 13, N 4. - P. 463-469.

100. Clement, J. Acute hantavirus infection presenting as haemolytic-uraemic syndrome (HUS): the importance of early clinical diagnosis [Text] / J.Clement, A.P.K.Lee, G.A.Verpooten et al. // *EUR J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018. - Vol. 37, N 1. - P. 135-140.

101. Connolly-Andersen, A.M. Endothelial activation and repair during hantavirus infection: association with disease outcome [Text] / A.M.Connolly-Andersen, T.Thunberg, C.Ahlm et al. // *Open Forum Infect Dis*, 2014. - Vol. 1, N 1. - P. ofu027.

102. Connor, S.D. Regulated portals of entry into the cells [Text] / S.D.Connor, S.L.Schimid // *Nature*, 2003. - Vol. 422, N 6927. - P. 37-44.

103. Correia, M.P. IL-15 induces CD8<sup>+</sup> T cells to acquire functional NK receptors capable of modulating cytotoxicity and cytokine secretion [Text] / M.P.Correia, A.V.Costa, M.Uhrberg et al. // *Immunobiolog*, 2011. – Vol. 216, N 5. – P. 604-612.

104. da Costa, A.C. Decreased expression of CD314 by NK cells correlates with their ability to respond by producing IFN-gamma after BCG Moscow vaccination and is associated with distinct early immune responses [Text] / A.C. da Costa, L.C. de Souza Barbosa, A. Kipnis, A.P. Junqueira-Kipnis // *Vaccines (Basel)*. – 2023. – Vol. 11, N 8. – P. 1297.

105. Daigo, K. Host-protective effect of circulating pentraxin 3 (PTX3) and complex formation with neutrophil extracellular traps [Text] / K. Daigo, T. Hamakubo // *Front Immunol*. – 2012. – Vol. 3. – P. 378.

106. de Oliveira, R.C. Hantavirus reservoirs: current status with an emphasis on data from Brazil [Text] / R.C.de Oliveira, A.Guterres, J.Fernandes et al. // *Viruses*, 2014. - Vol. 6, N 5. - P. 1929-1973.

107. Denecke, B. Hantavirus infection: a neglected diagnosis in thrombocytopenia and fever? [Text] / B.Denecke, B.Bigalke, M.Haap et al. // *Mayo Clin Proc*, 2010. Vol. 85, N 11. - P. 1016-1020.

108. Desai, T.R. Interleukin-6 causes endothelial barrier dysfunction via the protein kinase C pathway [Text] / T.R. Desai, N.J. Leeper, K.L. Hynes, B.L. Gewertz // *J Surg Res*. – 2002. – Vol. 104. – P. 118–123.

109. Dheersekara, K. Hantavirus infections — treatment and prevention [Text] / K.Dheersekara, S.Sumathipala, R.Muthugala // *Curr Treat Options Infect Dis*, 2020. – Vol. 12. – P. 410–421.

110. Diana, J. NKT cell-plasmacytoid dendritic cell cooperation via OX40 controls viral infection in a tissue-specific manner [Text] / J. Diana, T. Griseri, S. Lagaye et al. // *Immunity*. – 2009. – Vol. 30. – P. 289–299.

111. Dieterle, M.E. Genetic depletion studies inform receptor usage by virulent hantaviruses in human endothelial cells [Text] / M.E.Dieterle, C.Solà-Riera, C.Ye et al. // *Elife*, 2021. – Vol. 10. - e69708.

112. Dong, Y. Incorporation of CD40 ligand or granulocyte-macrophage colony stimulating factor into hantaan virus (HTNV) virus-like particles significantly enhances the long-term immunity potency against HTNV infection [Text] / Y.Dong, T.Ma, X.Zhang et al. // *J Med Microbiol*, 2019. – Vol. 68. – P. 480–492.

113. Du, H. Clinical study of critical patients with hemorrhagic fever with renal syndrome complicated by acute respiratory distress syndrome [Text] / H. Du, J. Li, W. Jiang et al. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, N 2. – e89740.

114. Dzagurova, T.K. Pre-clinical studies of inactivated polyvalent HFRS vaccine [Text] / T.K.Dzagurova, A.A.Siniugina, A.A.Ishmukhametov et al. // *Front Cell Infect Microbiol*, 2020. – Vol. 10. – P. 545372.

115. Easterbrook, J.D. Regulatory T cells enhance persistence of the zoonotic pathogen Seoul virus in its reservoir host [Text] / J.D.Easterbrook, M.C.Zink, S.L.Klein // Proc Natl Acad Sci USA, 2007. - Vol. 104, N 39. - P. 15502-15507.

116. Essig, K. Roquin suppresses the PI3K-mTOR signaling pathway to inhibit T helper cell differentiation and conversion of treg to Tfr cells [Text] / K.Essig, D.Hu, J.C.Guimaraes et al. // Immunity, 2017. – Vol. 47, N 6. – P. 1067–1082. e12.

117. Fan, X. Platelet distribution width at first day of hospital admission in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome caused by Hantaan virus may predict disease severity and critical patients' survival [Text] / X.Fan, Z.Liu, S.Fu et al. // Dis Markers, 2018. - Vol. 2018. - P. 9701619.

118. Flippe, L. Future prospects for CD8+ regulatory T cells in immune tolerance [Text] / L.Flippe, S.Bézie, I.Anegon, C.Guillonnet // Immunol Rev, 2019. – Vol. 292, N 1. – P. 209-224.

119. Fougeroux, C. Capsid-like particles decorated with the SARS-CoV-2 receptor-binding domain elicit strong virus neutralization activity [Text] / C.Fougeroux, L.Goksoyr, M.Idorn et al. // Nat Commun, 2021. – Vol. 12, N 1. – P. 324.

120. Frank, J. Human renal tubular cells as a cytokine source: PDGF-B, GM-CSF and IL-6 mRNA expression in vitro [Text] / J.Frank, G.Engler-Blum, H.P.Rodemann, G.A.Müller // Exp Nephrol, 1993. – Vol. 1, N 1. – P. 26-35.

121. Fukuda, M. Influenza A with hemorrhagic shock and encephalopathy syndrome in an adult: A case report [Text] / M. Fukuda, T. Yoshida, M. Moroki et al. // Medicine (Baltimore). – 2019. – Vol. 98, N 14. – e15012.

122. Furuta, Y. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections [Text] / Y.Furuta, K.Takahashi. K.Shiraki et al. // Antiviral Res, 2009. Vol. 82, N 3. - P. 95-102.

123. García, M. Massive plasmablast response elicited in the acute phase of hantavirus pulmonary syndrome [Text] / M.García, A.Iglesias, V.I.Landoni et al. // Immunology, 2017. - Vol. 151, N 1. - P. 122-135.

124. Gavrilovskaya, I.N. Hantaviruses direct endothelial cell permeability by sensitizing cells to the vascular permeability factor VEGF, while angiopoietin 1 and

sphingosine 1-phosphate inhibit hantavirus-directed permeability [Text] / I.N.Gavrilovskaya, E.E.Gorbunova, N.A.Mackow, E.R.Mackow // J Virol, 2008. - Vol. 82, N 12. - P. 5797-5806.

125. Gizzi, M. Another case of “European hantavirus pulmonary syndrome” with severe lung, prior to kidney, involvement, and diagnosed by viral inclusions in lung macrophages [Text] / M.Gizzi, B.Delaere, B.Weynand et al. // Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013. - Vol. 32, N 10. - P. 1341-1345.

126. Godfrey, D.I. New ways to turn on NKT cells [Text] / D.I. Godfrey, J. Rossjohn // J Exp Med. – 2011. – Vol. 208. – P. 1121–1125.

127. Goeijenbier, M. Seoul hantavirus in brown rats in the Netherlands: implications for physicians--Epidemiology, clinical aspects, treatment and diagnostics [Text] / M.Goeijenbier, J.Verner-Carlsson, E.C.van Gorp et al. // Neth J Med, 2015. - Vol. 73, N 4. - P. 155-160.

128. Goeijenbier, M. Rodent-borne hemorrhagic fevers: under-recognized, widely spread and preventable – epidemiology, diagnostics and treatment [Text] / M.Goeijenbier, J.Wagenaar, M.Goris et al. // Crit Rev Microbiol, 2013. - Vol. 39, N 1. - P. 26-42.

129. Golden, J.W. Animal models for the study of rodent-borne hemorrhagic fever viruses: arenaviruses and hantaviruses [Text] / J.W.Golden, C.D.Hammerbeck, E.M.Mucker, R.L.Brocato // Biomed Res Int. – 2015. – Vol. 2015. – P. 793257.

130. Gonzalez, J.P. Immunophenotypic pattern of de novo malignancy after liver transplantation [Text] / J.P. Gonzalez, A. Zabaleta, P. Sangro et al. // Transplant Proc. – 2019. – Vol. 51, N 1. – P. 77-79.

131. Gorbunova, E.E. Pathogenic Hantaviruses Andes virus and Hantaan virus induce adherens junction disassembly by directing vascular endothelial cadherin internalization in human endothelial cells [Text] / E.E.Gorbunova, I.N.Gavrilovskaya, E.R.Mackow // J Virol, 2010. - Vol. 84, N 14. - P. 7405-7411.

132. Gorbunova, E.E. VEGFR2 and Src kinase inhibitors suppress Andes Virus-induced endothelial cell permeability [Text] / E.E.Gorbunova, I.N.Gavrilovskaya, T.Pepini, E.R.Mackow // J Virol, 2011. - Vol. 85, N 5. - P. 2296-2303.

133. Gordy, L.E. IL-15 regulates homeostasis and terminal maturation of NKT cells [Text] / L.E. Gordy, J.S. Bezbradica, A.I. Flyak et al. // J Immunol. – 2011. – Vol. 187. – P. 6335–6345.

134. Gowen, B.B. In vitro and in vivo activities of T-705 against arenavirus and bunyavirus infections [Text] / B.B.Gowen, M.H.Wong, K.H.Jung at al. // Antimicrobial agents and chemotherap, 2008. - Vol. 51. - P. 3168-3176.

135. Grover, S.P. Tissue factor: an essential mediator of hemostasis and trigger of thrombosis [Text] / S.P.Grover, N.Mackman // Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018. – Vol. 38. – P. 709–725.

136. Guhl, S. Infection of *in vivo* differentiated human mast cells with hantaviruses [Text] / S.Guhl, R.Franke, A.Schielke et al. // J Gen Virol, 2010. - Vol. 91, Pt 5. - P. 1256-1261.

137. Guo, J. Cytokine response to Hantaan virus infection in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome [Text] / J.Guo, X.Guo, Y.Wang et al. // J Med Virol, 2017. - Vol. 89, N 7. - P. 1139-1145.

138. Gupta, S. Hantavirus-infection confers resistance to cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis [Text] / S.Gupta, M.Braun, N.D.Tischler et al. // PLoS Pathol, 2013. - Vol. 9, N 3. - P. e1003272.

139. Gupta, A.K. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death [Text] / A.K.Gupta, M.B.Joshi, M.Philippova et al. // FEBS Lett, 2010. - Vol. 584, N 14. - P. 3193-3197.

140. Guterres, A. The mystery of the phylogeographic structural pattern in rodent-borne hantaviruses [Text] / A.Guterres, C.R.de Oliveira, J.Fernandes, R.S.E.de Lemos // Mol Phylogenet Evol, 2019. - Vol. 136. - P. 35-43.

141. Haase, M. NGAL meta-analysis investigator group accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis [Text] / M. Haase, R. Bellomo, P. Devarajan et al. // Am J Kidney Dis. – 2009. – Vol. 54, N 6. – P. 1012–1024.

142. Hägele, S. Cells of the human respiratory tract support the replication of pathogenic old world orthohantavirus Puumala [Text] / S.Hägele, C.Nusshag, A.Müller et al. // *Virology*, 2021. – Vol. 18. – P. 169.
143. Hall, P.R. Multivalent presentation of antihantavirus peptides on nanoparticles enhances infection blockade [Text] / P.R.Hall, B.Hjelle, D.C.Brown et al. // *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. – Vol. 52, N 6. – P. 2079–2088.
144. Hall, P. Small molecule inhibitors of hantavirus infection [Text] / P.Hall, A.Leitao, C.Ye et al. // *Bioorg Med Chem Lett*, 2010. – Vol. 20, N 23. – P. 7085–7091.
145. Hassouna, M.M. The putative role of natural killer cells in patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma [Text] / M.M. Hassouna, E.M. Radwan, E. Abdelsameea et al. // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2021. – Vol. 22, N 8. – P. 2559-2567.
146. Hatscher, L. Select hyperactivating NLRP3 ligands enhance the TH1-and TH17-inducing potential of human type 2 conventional dendritic cells [Text] / L.Hatscher, C.H.K.Lehmann, A.Purbojo et al. // *Sci Signal*, 2021. – Vol. 14. - eabe1757.
147. Hammerbeck, C.D. Hantavirus [Text] / C.D.Hammerbeck, V.Wahl-Jensen, J.W.Hooper et al. // In: *Vaccines for biodefense and emerging and neglected diseases/ Barrett ADT, Stanberry LR, editors. London: Academic Press/Elsevier, 2009. - P. 379-412.*
148. Handke, W. Hantaan virus triggers TLR3-dependent innate immune responses [Text] / W.Handke, R.Oelschlegel, R.Franke et al. // *J Immunol*, 2009. - Vol. 182, N 5. - P. 2849-2858.
149. Harris, K.M. Monocytes differentiated with GM-CSF and IL-15 initiate Th17 and Th1 responses that are contact-dependent and mediated by IL-15 [Text] / K.M. Harris // *J Leukoc Biol.* – 2011. – Vol. 90, N 4. – P. 727-734.
150. Hart, C.A. Hantavirus infections: epidemiology and pathogenesis [Text] / C.A.Hart, M.Bennett // *Microbes Infect*, 1999. - Vol. 1, N 14. - P. 1229-1237.
151. Hatzl, S. Poor prognosis for Puumala virus infections predicted by lymphopenia and dyspnea [Text] / S. Hatzl, F. Posch, M. Linhofer et al. // *Emerg Infect Dis.* – 2023. – Vol. 29 (5). – P. 1038-1041.

152. Hayasaka, D. Increased permeability of human endothelial cell line EA.hy926 induced by hantavirus-specific cytotoxic T lymphocytes [Text] / D.Hayasaka, K.Maeda, F.A.Ennis, M.Terajima // *Virus Res*, 2007. - Vol. 123, N 2. - P. 120-127.

153. He, S.W. IL-6 alters migration capacity of CD4+Foxp3+ regulatory T cells in systemic lupus erythematosus [Text] / S.W.He, M.H.Xue, G.Cai // *Scand J Immunol*, 2021. – Vol. 94, N 5. – e13099.

154. Hentzien, M. Bioclinical test to predict nephropathia epidemica severity at hospital admission [Text] / M.Hentzien, S.Mestrallet, P.Halin et al. // *Emerg Infect Dis*, 2018. - Vol. 24, N 6. - P. 1045-1054.

155. Hjertqvist, M. Mortality rate patterns for hemorrhagic fever with renal syndrome caused by Puumala virus [Text] / M.Hjertqvist, S.L.Klein, C.Ahlm et al. // *Emerg Infect Dis*, 2010. - Vol. 16, N 10. - P. 1584-1586.

156. Ho, L. Activation of invariant NKT cells enhances the innate immune response and improves the disease course in influenza A virus infection [Text] / L. Ho, L. Denney, K. Luhn et al. // *Eur J Immunol*. – 2008. – Vol. 38. – P. 1913–1922.

157. Holderried, T.A.W. Genetic disruption of CD8+ Treg activity enhances the immune response to viral infection [Text] / T.A.W. Holderried, P.A. Lang, H.-J. Kim, H. Cantor // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2013. – Vol. 110, N 52. – P. 21089–21094.

158. Holmes, E.C. The evolution and emergence of hantaviruses [Text] / E.C.Holmes, Y.Z.Zhang // *Curr Opin Virol*, 2015. - Vol. 10. - P. 27-33.

159. Hosoya, T. From the cradle to the grave: Activities of GATA-3 throughout T-cell development and differentiation [Text] / T. Hosoya, I. Maillard., J.D. Engel // *Immunol Rev*. – 2010. – Vol. 238, N 1. – P. 110–125.

160. Hunofina, D.H. Interferon inducers: application in hemorrhagic fever with renal syndrome patients [Text] / D.H.Hunofina, E.K.Alekhin, R.T.Murzobaeva et al. // *The Fifth International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS) Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) and Hantaviruses*, Annecy, France, 2001. - P. 139.

161. Hussein, I.T., Mir M.A. How hantaviruses modulate cellular pathways for efficient replication? [Text] / I.T.Hussein, M.A.Mir // *Front Biosci (Elite)*, 2013. - Vol. 5. - P. 154-166.
162. ICTV Current ICTV Taxonomy Release. [(accessed on 8 August 2022)]. [Text] // Available online: <https://ictv.global/taxonomy>
163. Jamaluddin, M.S. Resistin: Functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease [Text] / M.S. Jamaluddin, S.M. Weakley, Q. Yao, C. Chen // *Br J Pharmacol.* – 2012. – Vol. 165. – P. 622–632.
164. Jangra, R.K. Protocadherin-1 is essential for cell entry by new world hantaviruses [Text] / R.K.Jangra, A.S.Herbert, R.Li et al. // *Nature*, 2018. – Vol. 563. – P. 559–563.
165. Jeeva, S. Endothelial activation and repair during hantavirus infection: association with disease outcome [Text] / S.Jeeva, S.Mir, A.Velasquez et al. // *Open Forum Infect Dis*, 2014. - Vol. 1, N 1. - P. ofu027.
166. Jenne, C.N. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps [Text] / C.N.Jenne, C.H.Wong, F.Zemp et al. // *J Cell Host Microbe*, 2013. - Vol. 13, N 2. - P. 169-180.
167. Jiang, H. Hemorrhagic fever with renal syndrome: pathogenesis and clinical picture [Text] / H.Jiang, L.M.Wang, P.Z.Wang, X.F.Bai // *Front Cell Infect Microbiol*, 2016. - Vol. 6. - P. 1-14.
168. Jiang, W. Development of a SYBR Green I based one-step real-time PCR assay for the detection of Hantaan virus [Text] / W.Jiang, P.Z.Wang, H.T.Yu et al. // *J Virol Methods*, 2014. - Vol. 196. - P. 145-151.
169. Jiang, H. Hantaan virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha [Text] / H.Jiang, P.Z.Wang, Y.Zhang et al. // *Virology*, 2008. - Vol. 380, N 1. - P. 52–59.
170. Jiang, D.B. Hantavirus Gc induces long-term immune protection via LAMP-targeting DNA vaccine strategy [Text] / D.B.Jiang, J.P.Zhang, L.F.Cheng et al. // *Antiviral Res*, 2018. - Vol. 150. - P. 174-182.

171. Jiang, H. Hantavirus infection: A global zoonotic challenge [Text] / H.Jiang, X.Zheng, L.Wang et al. // *Virol Sin*, 2017. – Vol. 32, N 1. – P. 32–43.
172. Jin, M. Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis [Text] / M.Jin, J.Park, S.Lee et al. // *Virol*, 2002. - Vol. 294, N 1. - P. 60-69.
173. Johnson, T.R. NK T cells contribute to expansion of CD8 + T cells and amplification of antiviral immune responses to respiratory syncytial virus [Text] / T.R. Johnson, S. Hong, L. Van Kaer et al. // *J Virol*. – 2002. – Vol. 76. – P. 4294–4303.
174. Jonsson, C.B. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease [Text] / C.B.Jonsson, L.T.Figueiredo, O.Vapalahti // *Clin. Microbiol Rev*, 2010. - Vol. 23. - P. 412-441.
175. Jonsson, C.B. Replication of hantaviruses [Text] / C.B.Jonsson, C.S.Schmaljohn // *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001. - Vol. 256. - P. 15-32.
176. Jung, J. Protective effectiveness of inactivated hantavirus vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome [Text] / J.Jung, S.J.Ko, H.S.Oh et al. // *J Infect Dis*, 2018. - Vol. 217, N 9. - P. 1417-1420.
177. Juno, J. A. Invariant NKT cells: Regulation and function during viral infection [Text] / J.A. Juno, Y. Keynan, K.R. Fowke // *PLoS Pathog*. – 2012. – Vo. 8, N 8. – e1002838.
178. Kabwe, E. Orthohantaviruses, emerging zoonotic pathogens [Text] / E. Kabwe, Y. Davidyuk, A. Shamsutdinov et al. // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9, N 9. – P. 775.
179. Kakimi, K., Guidotti L.G., Koezuka Y., Chisari F. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo [Text] / K. Kakimi, L.G. Guidotti, Y.J. Koezuka // *Exp Med*. – 2000. – Vol. 192. – P. 921–930.
180. Kanerva, M. Pulmonary involvement in nephropathia epidemica: radiological findings and their clinical correlations [Text] / M. Kanerva, A. Paakkala, J. Mustonen et al. // *Clin Nephrol*. – 1996. – Vol. 46, N 6. – P. 369-378.
181. Kariwa, H. A comparative epidemiological study of hantavirus infection in Japan and Far East Russia [Text] / H.Kariwa, K.Lokugamage, N.Lokugamage et al. // *Jpn J Vet Res*, 2007. - Vol. 54, N 4. - P. 145-161.

182. Kaya, S. Prognostic factors in hantavirus infections [Text] / S. Kaya // Mikrobiyol Bul. – 2014. – Vol. 48, N 1. – P. 179-187.
183. Keynan, Y. The role of regulatory T cells in chronic and acute viral infections [Text] / Y.Keynan, C.M.Card, P.McLaren et al. // J Clin Infect Dis, 2008. - Vol. 46, N 7. - P. 1046-1052.
184. Khaiboullina, S.F. Hantavirus immunology [Text] / S.F.Khaiboullina, S.C.St.Jeor // Viral Immunol, 2002. - Vol. 15. - P. 609-625.
185. Khaiboullina, S.F. Hantavirus: molecular biology, evolution and pathogenesis [Text] / S.F.Khaiboullina, S.P.Morzunov, S.C.St Jeor // Curr Mol Med, 2005. - Vol. 5, N 8. - P. 773-790.
186. Khaiboullina, S.F. Effects of tumor necrosis factor alpha on sin nombre virus infection in vitro [Text] / S.F.Khaiboullina, D.M.Netski, P.Krumpe, S.C.St Jeor // J Virol, 2000. - Vol. 74, N 24. - P. 11966–11971.
187. Khaiboullina, S.F. Andes virus stimulates interferon-inducible MxA protein expression in endothelial cells [Text] / S.F.Khaiboullina, A.A.Rizvanov, V.M.Deyde, S.C.St. Jeor // J Med Virol, 2005. - Vol. 75, N 2. - P. 267-275.
188. Khaiboullina, S.F. Andes-virus-induced cytokine storm is partially suppressed by ribavirin [Text] / S.F.Khaiboullina, A.A.Rizvanov, V.C.Lombardi et al. // Antivir Ther, 2013. - Vol. 18, N 4. - P. 575-584.
189. Khan, M.A. Role of NKT cells during viral infection and the development of NKT cell-based nanovaccines [Text] / M.A. Khan, A. Khan // Vaccines (Basel). – 2021. – Vol. 9, N 9. – P. 949.
190. Kilpatrick, E.D. Role of specific CD8+ T cells in the severity of a fulminant zoonotic viral hemorrhagic fever, hantavirus pulmonary syndrome [Text] / E.D.Kilpatrick, M.Terajima, F.T.Koster et al. // J Immunol, 2004. - Vol. 172, N 5. - P. 3297-3304.
191. Kim, C.H. Distinct subsets of human V $\alpha$ 24-invariant NKT cells: cytokine responses and chemokine receptor expression [Text] / C.H. Kim, E.C. Butcher, B. Johnston // Trends Immunol. – 2002. – Vol. 23. – P. 516–519.

192. Kim Y.-J., Han M.-K., Broxmeyer H.E. 4-1BB regulates NKG2D costimulation in human cord blood CD8<sup>+</sup> T cells [Text] / Y.-J.Kim, M.-K.Han, H.E.Broxmeyer // *Blood*, 2008. – Vol. 111, N 3. – P. 1378-1386.

193. Kim, H.C. Hantavirus surveillance and genetic diversity targeting small mammals at Camp Humphreys, a US military installation and new expansion site, Republic of Korea [Text] / H.C.Kim, W.K.Lim, T.A.Klein et al. // *PLoS One*, 2017. - Vol. 12, N 4. - P. e0176514.

194. Kim, S. A case report of crescentic glomerulonephritis associated with hantaan virus infection [Text] / S.Kim, S.H.Sung, H.R.An et al. // *Nephrol Dial Transplant*, 2010. - Vol. 25, N 8. - P. 2790-2792.

195. Klempa, B. Serological evidence of human hantavirus infections in Guinea, West Africa [Text] / B.Klempa, L.Koivogui, O.Sylla et al. // *J Infect Dis*, 2010. - Vol. 201, N 7. - P. 1031-1034.

196. Klempa, B. Occurrence of renal and pulmonary syndrome in a region of northeast Germany where Tula hantavirus circulates [Text] / B.Klempa, H.Meisel, S.Rath et al. // *J Clin Microbiol*, 2003. - Vol. 41, N 10. - P. 4894-4897.

197. Klingström J, Ahlm C. Hantavirus protein interactions regulate cellular functions and signaling responses [Text] / J.Klingstrom, C.Ahlm // *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011. - Vol. 9, N 1. - P. 33-47.

198. Klingström, J. Loss of cell membrane integrity in puumala hantavirus-infected patients correlates with levels of epithelial cell apoptosis and perforin [Text] / J.Klingström, J.Hardestam, M.Stoltz et al. // *J Virol*, 2006. - Vol. 80, N 16. - P. 8279-8282.

199. Klingstrom, J. Sex-dependent differences in plasma cytokine responses to hantavirus infection [Text] / J.Klingstrom, T.Lindgren, C.Ahlm et al. // *Clin Vaccine Immunol*, 2008. - Vol. 15, N 5. - P. 885-887.

200. Klingstrom, J. Innate and adaptive immune responses against human Puumala virus infection: immunopathogenesis and suggestions for novel treatment strategies for severe hantavirus-associated syndromes [Text] / J.Klingstrom, A.Smed-Sörensen, K.T.Maleki et al. // *J Intern Med*, 2019. - Vol. 285, N 5. - P. 510-523.

201. Koivula, T.T. Regulatory T cell response correlates with the severity of human hantavirus infection [Text] / T.T.Koivula, A.Tuulasvaara, L.Hetemäki et al. // *J Infec*, 2014. - Vol. 68, N 4. - P. 387-394.
202. Komori, Y. Successful outcome in an adult patient with influenza-associated hemorrhagic shock and encephalopathy syndrome [Text] / Y. Komori, N. Uchida, N. Soejima et al. // *Intern Med.* – 2020. – Vol. 59, N 18. – P. 2321-2326.
203. Korn, T. Role of IL-6 in the commitment of T cell subsets [Text] / T.Korn, M.Hiltensperger // *Cytokine*, 2021. – Vol. 146. – P. 155654.
204. Korva, M. Characterization of biomarker levels in crimean-congo hemorrhagic fever and hantavirus fever with renal syndrome [Text] / M. Korva, K.R. Rus, M. Pavletic et al. // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11. – P. 686.
205. Koskela, S. Coagulopathy in acute Puumala hantavirus infection [Text] / S.Koskela, S.Mäkelä, T.Strandin et al. // *Viruses*, 2021. – Vol. 13. – P. 1553.
206. Krautkramer, E. Pathogenic old world hantaviruses infect renal glomerular and tubular cells and induce disassembling of cell-to-cell contacts [Text] / E.Krautkrämer, S.Grouls, N.Stein et al. // *J Virol*, 2011. - Vol. 85, N 19. - P. 9811-9823.
207. Kruger, D.H. Hantaviruses - globally emerging pathogens [Text] / D.H.Krüger, L.T.Figueiredo, J.W.Song, B.Klempa // *J Clin Virol*, 2015. - Vol. 64. - P. 128–136.
208. Kruger, D.H. Human pathogenic hantaviruses and prevention of infection [Text] / D.H.Krüger, G.Schonrich, B.Klempa et al. // *Hum Vaccin*, 2011. - Vol. 7, N 6. - P. 685-693.
209. Kruger, D.H. Hantaviruses as zoonotic pathogens in Germany [Text] / D.H.Kruger, R.G.Ulrich, J.Hofmann // *Dtsch Arztebl Int*, 2013. - Vol. 110, N 27-28. - P. 461-467.
210. Kumanogoh, A. Requirement for the lymphocyte semaphorin, CD100, in the induction of antigen-specific T cells and the maturation of dendritic cells [Text] / A.Kumanogoh, K.Suzuki, E.Ch'ng et al. // *J Immunol*, 2002. - Vol. 169, N 3. - P. 1175-1181.

211. Künzli, M. CD4+ T cell memory [Text] / M. Künzli, D. Masopust // *Nat Immunol.* – 2023. – Vol. 24, N 6. – P. 903-914.
212. Kuylenstierna, C. NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: Direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d [Text] / C. Kuylenstierna, N.K. Björkström, S.K. Andersson et al. // *Eur J Immunol.* – 2011. – Vol. 41. – P. 1913–1923.
213. Kyriakidis, I. Serum TNF- $\alpha$ , sTNFR1, IL-6, IL-8 and IL-10 levels in hemorrhagic fever with renal syndrome [Text] / I.Kyriakidis, A.Papa // *Virus Res*, 2013. - Vol. 175, N 1. - P. 91-94.
214. Laenen, L. Hantaviridae: Current classification and future perspectives [Text] / L.Laenen, V.Vergote, C.H.Calisher et al. // *Viruses*, 2019. – Vol. 11, N 9. – P. 788.
215. Laine, O. Polymorphisms of PAI-1 and platelet GP Ia may associate with impairment of renal function and thrombocytopenia in Puumala hantavirus infection [Text] / O.Laine, L. Joutsu-Korhonen, S. Mäkelä et al. // *Thromb Res.* – 2012. – Vol. 129, N 5. – P. 611–615.
216. Laine, O. Platelet ligands and ADAMTS13 during Puumala hantavirus infection and associated thrombocytopenia [Text] / O.Laine, S.Mäkelä, J.Mustonen et al. // *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2011. – Vol. 22. – P. 468–472.
217. Lambrecht, B.N. Lung dendritic cells and host immunity to infection [Text] / B.N.Lambrecht, J.B.Prins, H.C.Hoogsteden // *Eur Respir J*, 2001. - Vol. 18, N 4. - P. 692-704.
218. Lanier, L.L. NKG2D receptor and its ligands in host defense [Text] / L.L.Lanier // *Cancer Immunol Res*, 2015. – Vol. 3, N 6. – P. 575-582.
219. Latus, J. Clinical course and long-term outcome of hantavirus-associated nephropathia epidemica, Germany [Text] / J.Latus, M.Schwab, E.Tacconelli et al. // *Emerg Infect Dis*, 2015. - Vol. 21, N 1. - P. 76-83.
220. Lee, H.W. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever [Text] / H.W.Lee, P.W.Lee, K.M.Johnson // *J Infect Dis*, 1978. - Vol. 137. - P. 298–308.

221. Lerret, N.M. Donor-specific CD8<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells protect skin allografts and facilitate induction of conventional CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells [Text] / N.M. Lerret, J.L. Houlihan, T. Kheradmand et al. // *Am J Transplant.* – 2012. – Vol. 12. – P. 2335–2347.
222. Li, D. Trends of HFRS epidemiology and the expanded program on immunization with hantavirus vaccines in China [Text] / D.Li // *Abstracts of the VIII International Conference on HFRS HPS and Hantavirus, Athens, Greece, 2010.* - P. 82.
223. Li, Z. Serologic diagnosis of Hantaan Virus infection based on a peptide antigen [Text] / Z.Li, X.Bai, H.Bian // *Clin Chem*, 2002. - Vol 48, N 4. - P. 645-647.
224. Li, J. Study on expression of plasma sCD138 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome [Text] / J.Li, H.Du, X.F.Bai et al. // *BMC Infect Dis*, 2018. - Vol. 18, N 1. - P. 100.
225. Li, X. Expression of CD206 and CD163 on intermediate CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes are increased in hemorrhagic fever with renal syndrome and are correlated with disease severity [Text] / X.Li, N.Du, G.Xu et al. // *Virus Res*, 2018. - Vol. 253. - P. 92-102.
226. Li, G. Characterization of truncated hantavirus nucleocapsid proteins and their application for serotyping [Text] / G.Li, L.Pan, D.Mou et al. // *J Med Virol*, 2006. - Vol. 78, N 7. - P. 926-932.
227. Libraty, D.H. The degree of leukocytosis and urine GATA-3 mRNA levels are risk factors for severe acute kidney injury in Puumala virus nephropathia epidemica [Text] / D.H.Libraty, D.Makela, J.Vlk et al. // *PLoS ONE*, 2012. - Vol. 7, N 4. - P. e35402.
228. Ligocki, A.J. Advances on non-CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells: CD8<sup>+</sup>, type 1, and double negative T regulatory cells in organ transplantation [Text] / A.J.Ligocki, J.Y.Niederhorn // *Transplantation*, 2015. – Vol. 99. – P. 1553-1559.
229. Lin, X.D. Migration of Norway rats resulted in the worldwide distribution of Seoul hantavirus today [Text] / X.D.Lin, W.P.Guo, W.Wang et al. // *J Virol*, 2012. - Vol. 86, N 2. - P. 972-981.

230. Linderholm, M. Local host response in the lower respiratory tract in nephropathia epidemica [Text] / M. Linderholm, L. Bjermer, P. Juto et al. // Scand J Infect Dis. – 1993. – Vol. 25, N 5. – P. 639-646.

231. Linderholm, M. Clinical characteristics of hantavirus infections on the Eurasian continent [Text] / M.Linderholm, F.Elgh // Curr Top Microbiol Immunol, 2001. - Vol. 256. - P. 135-151.

232. Lindgern, T. Longitudinal analysis of the human T cell response during acute hantavirus infection [Text] / T.Lindgern, C.Ahlm, N.Mohamed et al. // J Virol, 2011. - Vol. 85, N 19. - P. 10252-10260.

233. Ling, J. Genetic analyses of Seoul hantavirus genome recovered from rats (*Rattus norvegicus*) in the Netherlands unveils diverse routes of spread into Europe [Text] / J.Ling, J.Verner-Carlsson, P.Eriksson et al. // J Med Virol, 2019. – Vol. 91. – P. 724–730.

234. Liu, Y.J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity [Text] / Y.J.Liu // Cell, 2001. - Vol. 106, N 3. - P. 259-262.

235. Liu, Y.X. Key differentiating features between scrub typhus and hemorrhagic fever with renal syndrome in northern China [Text] / Y.X.Liu, D.Feng, Q.Zhang et al. // Am J Trop Med Hyg, 2007. - Vol. 76, N 5. - P. 801-805.

236. Liu, J. A Thr/Ser dual residue motif in the cytoplasmic tail of human CD1d is important for the down-regulation of antigen presentation following a herpes simplex virus 1 infection [Text] / J. Liu, N.L. Glosson, W. Du et al. // Immunology. – 2013. – Vol. 140. – P. 191–201.

237. Liu, R. Vaccines and therapeutics against hantaviruses [Text] / R.Liu, H.Ma, J.Shu et al. // Front Microbiol, 2020. – Vol. 10. – P. 2989.

238. Liu, B. Elevated plasma soluble Sema4D/CD100 levels are associated with disease severity in patients of hemorrhagic fever with renal syndrome [Text] / B.Liu, Y.Ma, J.Yi et al. / PLoS One, 2013. – Vol. 8, N 9. - e73958.

239. Liu, B. CD8<sup>low</sup> CD100<sup>-</sup> T cells identify a novel CD8 T cell subset associated with viral control during human Hantaan virus infection [Text] / B.Liu, Y.Ma, Y.Zhang et al. // J Virol, 2015. - Vol. 89, N 23. - P. 11834-11844.

240. Liu, Q. Human mesenchymal stromal cells enhance the immunomodulatory function of CD8(+)CD28(-) regulatory T cells [Text] / Q.Liu, H.Zheng, X.Chen et al. // Cell Mol Immunol, 2015. – Vol. 12, N 6. – P. 708-718.

241. Liu, J.-M. Dynamic changes of apoptosis-inducing ligands and Th1/Th2 like subpopulations in Hantaan virus-induced hemorrhagic fever with renal syndrome [Text] / J.-M.Liu, Y.Zhu, Z.-W.Xu et al. // Clin Immunol, 2006. - Vol. 119, N 3. - P. 245-251.

242. Lohoff, M. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation [Text] / M.Lohoff, T.W.Mark // Nat Rev Immunol, 2005. - Vol. 5, N 2. - P. 125–135.

243. Lopez, N. New hantaviruses causing hantavirus pulmonary syndrome in central Argentina [Text] / N.Lopez, P.Padula, C.Rossi et al. // Virology, 1997. - Vol. 349. - P. 998-999.

244. Lu, J. Structural recognition and functional activation of Fcγ<sub>3</sub> by innate pentraxins [Text] / J. Lu, L.L. Marnell, K.D. Marjon et al. // Nature. – 2008. – Vol. 456. – P. 989–992.

245. Lundkvist, A. Immunoglobulin G subclass against the structural components of Puumala virus [Text] / A.Lundkvist, S.Bjorsten, B.Niklasson // J Clin Microbiol, 1993. - Vol. 31, N 2. - P. 368–372.

246. Ma, Y. Hantaan virus infection induces both Th1 and ThGranzyme B<sup>+</sup> cell immune responses associated with viral control and clinical outcome in humans [Text] / Y.Ma, B.Yuan, R.Zhuang et al. // PLoS Pathol, 2015. - Vol. 11, N 4. - e1004788.

247. Mackow, E.R. Hantavirus regulation of endothelial cell functions [Text] / E.R.Mackow, I.N.Gavrilovskaya // Thromb Haemost, 2009. - Vol. 102, N 6. - P. 1030-1041.

248. Maes, P. Hantaviruses: immunology, treatment and prevention [Text] / P.Maes, J.Clement, I.Gavrilovskaya, M.van Ranst // Viral Immunol, 2004. -Vol. 17, № 4. - P. 481-497.

249. Maes, P. Tumor necrosis factor- $\alpha$  genetic predisposing factors can influence clinical severity in nephropathia epidemica [Text] / P.Maes, J.Clement, P.H.Groeneveld et al. // Viral Immunol, 2006. - Vol. 19, N 3. - P. 558-564.

250. Malinin, O.V. Insufficient efficacy and safety of intravenous ribavirin in treatment of haemorrhagic fever with renal syndrome caused by Puumala virus [Text] / O.V.Malinin, A.E.Platonov // *Infect Dis (Lond)*, 2017. - Vol. 49, N 7. - P. 514-520.

251. Mancuso, P. The role of adipokines in chronic inflammation [Text] / P. Mancuso // *Immunotargets Ther.* – 2016. – Vol. 5. – P. 47–56.

252. Manigold, T. Human hantavirus infections: epidemiology, clinical features, pathogenesis and immunology [Text] / T.Manigold, P.Vial // *Swiss Med Wkly*, 2014. - Vol. 144. - P. 13937-13955.

253. Mantula, P.S. High plasma resistin associates with severe acute kidney injury in Puumala hantavirus infection [Text] / P.S. Mantula, T.K. Outinen, P. Jaatinen et al. // *PLoS ONE*. – 2018. – Vol. 13. – e0208017.

254. Markotic, A. Immunopathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome [Text] / A. Markotic // *Acta Med Croatica*, 2003. - Vol. 57, № 5. - P. 407-414.

255. Markotic, A. Role of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) phenotype changes in the pathogenesis of haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) [Text] / A. Markotic, G.Dasic, A.Gagro et al. // *Clin Exp Immunol*, 1999. – Vol. 115, N 2. – P. 329-234.

256. Markotic, A. Pathogenic hantaviruses elicit different immunoreactions in THP-1 cells and primary monocytes and induce differentiation of human monocytes to dendritic-like cells [Text] / A.Markotic, L.Hensley, K.Daddario et al. // *Coll Antropol*, 2007. - Vol. 31, N 4. - P. 1159-1167.

257. Marquardt, N. Human lung natural killer cells are predominantly comprised of highly differentiated hypofunctional CD69<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup> cells [Text] / N.Marquardt, E.Kekäläinen, P.Chen et al. // *J Allergy Clin Immunol*, 2017. - Vol. 139, N 4. - P. 1321-1330.

258. Marsac, D. Infection of human monocyte-derived dendritic cells by ANDES Hantavirus enhances pro-inflammatory state, the secretion of active MMP-9 and indirectly enhances endothelial permeability [Text] / D.Marsac, S.Garcia, A.Fournet et al. // *Virology*, 2011. - Vol. 8. - P. 223-231.

259. Martinez-Valdebenito, C. A single-nucleotide polymorphism of  $\alpha_v\beta_3$  integrin Is associated with the Andes virus infection susceptibility [Text] / C.Martinez-Valdebenito, J.Angulo, N.Le Corre et al. // *Viruses*, 2019. - Vol. 11, N 2. - E169.

260. Martinez-Valdebenito, C. Person-to-person household and nosocomial transmission of andes hantavirus, Southern Chile, 2011 [Text] / C.Martinez-Valdebenito, M.Calvo, C.Vial et al. // *Emerg Infect Dis*, 2014. - Vol. 20. - P. 1629–1636.

261. Martynova, E. Cytokine, chemokine, and metalloprotease activation in the serum of patients with nephropathia epidemica from the Republic of Tatarstan and the Republic of Mordovia, Russia [Text] / E.Martynova, Y.Davidyuk, E.Kabwe et al. // *Pathogens*, 2021. – Vol. 10. – P. 527.

262. Martynova, E.V. Urinary clusterin is upregulated in nephropathia epidemica [Text] / E.V.Martynova, A.N.Maksudova, V.G.Shakirova et al. // *Dis Markers*, 2018. - Vol. 2018. - P. 8658507.

263. Mascalzo, E.R. Hantavirus regulation of endothelial cell function [Text] / E.R.Mascalzo, I.N.Gavrilovskaya // *Thromb Haemost*, 2009. - Vol. 102. - P. 1030-1041.

264. Mathieu, C. IL-2 and IL-15 regulate CD8+ memory T-cell differentiation but are dispensable for protective recall responses [Text] / C.Mathieu, J.-C.Beltra, T.Charpentier et al. // *Eur J Immunol*, 2015. – Vol. 45, N 12. – P. 3324–3338.

265. Matsuda, J.L. CD1d-restricted iNKT cells, the ‘Swiss-Army knife’ of the immune system [Text] / J.L. Matsuda, T. Mallewaey, J. Scott-Browne, L. Gapin // *Curr Opin Immunol*. – 2008. – Vol. 20. – P. 358–368.

266. Mattar, S. Diagnosis of hantavirus infection in humans [Text] / S.Mattar, C.Guzman, L.T.Figueiredo // *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2015. - Vol. 13, N 8. - P. 939-946.

267. Mayor, J. Antiviral efficacy of ribavirin and favipiravir against hantaan virus [Text] / J.Mayor, O.Engler, S.Rothenberger // *Microorganisms*, 2021. – Vol. 9. – P. 1306.

268. McDonald B. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis [Text] / B.McDonald, R.Urrutia, B.G.Yipp et al. // *Cell Host Microbe*, 2012. - Vol. 12, N 3. - P. 324–333.

269. Medina, R.A. Ribavirin, human convalescent plasma and anti-beta3 integrin antibody inhibit infection by sin nombre virus in the deer mouse model [Text] / R.A.Medina, K.Mirowsky-Garcia, J.Hutt, B.Hjelle // *J Gen Virol*, 2007. - Vol. 88. - P. 493-505.

270. Meier, M. Proteinuria and the clinical course of Dobrava-Belgrade Hantavirus infection [Text] / M.Meier, J.Kramer, W.J.Jabs et al. // *Nephron Extra*, 2018. - Vol. 8, N 1. - P. 1-10.

271. Mellor, A. Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity [Text] / A. Mellor // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2005. – Vol. 338. – P. 20–24.

272. Mellor, A.L. IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism [Text] / A.L. Mellor, D.H. Munn // *Nat Rev Immunol.* – 2004. – Vol. 4. – P. 762–774.

273. Mertens, M. Seroprevalence study in forestry workers of a non-endemic region in eastern Germany reveals infections by Tula and Dobrava-Belgrade hantaviruses [Text] / M.Mertens, J.Hofmann, R.Petraityte-Burneikiene et al. // *Med Microbiol Immunol*, 2011. - Vol. 200, N 4. - P. 263-268.

274. Mishra, S. CD8+ regulatory T cell - A mystery to be revealed [Text] / S. Mishra, S. Srinivasan, C. Ma, N. Zhang // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 708874.

275. Miyamoto, H. Serological analysis of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) patients in Far Eastern Russia and identification of the causative hantavirus genotype [Text] / H.Miyamoto, H.Kariwa, K.Araki et al. // *Arch Virol*, 2003. - Vol. 148, N 8. - P. 1543-1556.

276. Mohib, K. Proapoptotic activity of indoleamine 2,3-dioxygenase expressed in renal tubular epithelial cells [Text] / K. Mohib, Q. Guan, H. Diao et al. // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2007. – Vol. 293. – P. 801–812.

277. Montoya, C.J. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11 [Text] / C.J. Montoya, D. Pollard, J. Martinson et al. // *Immunology.* – 2007. – Vol. 122, N 1. – P. 1–14.

278. Morimoto, N. Inflammasomes in teleosts: Structures and mechanisms that induce pyroptosis during bacterial infection [Text] / N. Morimoto, T. Kono, M. Sakai, J.-I. Hikima // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, N 9. – P. 4389.

279. Mustonen, J. The pathogenesis of nephropathia epidemica: new knowledge and unanswered questions [Text] / J. Mustonen, S. Makela, T. Outinen et al. // *Antiviral Res.*, 2013. - Vol. 100. - P. 589-604.

280. Mustonen, J. Genetic susceptibility to severe course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus [Text] / J. Mustonen, J. Partanen, M. Kanerva et al. // *Kidney Int.*, 1996. - Vol. 49, N 1. - P. 217-221.

281. Nicacio, C.C. Immunoglobulin A response to Puumala Hantavirus [Text] / C.C. Nicacio, E. Bjorling, A. Lundkvist // *J Gen Virol.*, 2000. - Vol. 81, Pt 6. - P. 1453–1461.

282. Nichol, S.T. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness [Text] / S.T. Nichol, C.F. Spiropoulou, S. Morzunov et al. // *Science*, 1993. - Vol. 262. - P. 914-917.

283. Niikura, M. Modification of endothelial cell functions by Hantaan virus infection: prolonged hyper-permeability induced by TNF- $\alpha$  of hantaan virus-infected endothelial cell monolayers [Text] / M. Niikura, A. Maeda, T. Ikegami et al. // *Arch Virol.*, 2004. - Vol. 149, N 7. - P. 1279-1292.

284. Nish, S.A. T cell-intrinsic role of IL-6 signaling in primary and memory responses [Text] / S.A. Nish, D. Schenten, F.T. Wunderlich et al. // *Elife.* – 2014. – Vol. 3. – e01949.

285. Noack, D. Orthohantavirus pathogenesis and cell tropism [Text] / D. Noack, M. Goeijenbier, C.B.E.M. Reusken et al. // *Front Cell Infect Microbiol.*, 2020. – Vol. 10. – P. 399.

286. Noh, J.Y. Clinical and molecular epidemiological features of hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea over a 10-year period [Text] / J.Y. Noh, H.J. Cheong, J.Y. Song et al. // *J Clin Virol.*, 2013. - Vol. 58, N 1. - P. 11-17.

287. Obara, N. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression [Text] N. Obara, N. Suzuki, K. Kim et al. // *Blood*. – 2008. – Vol. 111, N 10. – P. 5223–5232.

288. Oelschlegel, R. MxA-independent inhibition of Hantaan virus replication induced by type I and type II interferon *in vitro* [Text] / R.Oelschlegel, D.H.Kruger, A.Rang // *Vir Res*, 2007. - Vol. 127, N 1. - P. 100-105.

289. Olal, D. Structure of the hantavirus nucleoprotein provides insights into the mechanism of RNA encapsidation [Text] / D.Olal, O.Daumke // *Cell Rep*, 2016. - Vol. 14, N 9. - P. 2092-2099.

290. Oldenhove, G. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells *in vivo* [Text] / G.Oldenhove, M.de Heusch, G.Urbain-Vansanten et al. // *J Exp Med*, 2003. – Vol. 198, N 2. – P. 259–266.

291. Ontiveros, S.J. Modulation of apoptosis and immune signaling pathways by the Hantaan virus nucleocapsid protein [Text] / S.J.Ontiveros, Q.Li, C.B.Jonsson // *Virology*, 2010. - Vol. 401, N 2. - P. 165-178.

292. Outinen, T.K. Plasma cell-free DNA levels are elevated in acute Puumala hantavirus infection [Text] / T.K. Outinen, T. Kuparinen, J. Jylhava et al. // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – e31455.

293. Outinen, T.K. The severity of Puumala hantavirus induced nephropathia epidemica can be better evaluated using plasma interleukin-6 than C-reactive protein determinations [Text] / T.K.Outinen, S.M.Makela, I.O.Ala-Houhala et al. // *BMC Infect Dis*, 2010. - Vol. 10. - P. 132-139.

294. Outinen, T.K. High activity of indoleamine 2,3-dioxygenase is associated with renal insufficiency in Puumala hantavirus induced nephropathia epidemica [Text] / T.K. Outinen, S.M. Mäkelä, I.O. Ala-Houhala et al. // *J Med Virol*. – 2011. – Vol. 83. – P. 731–737.

295. Outinen, T.K. High pentraxin-3 plasma levels associate with thrombocytopenia in acute Puumala hantavirus-induced nephropathia epidemica [Text] /

T.K.Outinen, S.Makela, H.Huhtala et al. // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012. - Vol. 31, N 6. - P. 957-963.

296. Outinen, T.K. Severity biomarkers in Puumala hantavirus infection [Text] / T.K. Outinen, S. Mäkelä, I. Pörsti et al. // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, N 1. – P. 45.

297. Padula, P.J. Genetic Diversity, Distribution, and Serological Features of Hantavirus Infection in Five Countries in South America [Text] / P.J.Padula, S.B.Colavecchia, V.P.Martínez et al. // *J Clin Microbiol*, 2000. - Vol. 38. - P. 3029-3035.

298. PAHO/WHO Hantavirus. [(accessed on 13 October 2022)]. [Text] Available online: [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=14911:hantavirus&Itemid=40721&lang=en#:~:text=Hantavirus%20\(HV\)%20is%20an%20emerging,of%20respiratory%20distress%20and%20hypotension](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14911:hantavirus&Itemid=40721&lang=en#:~:text=Hantavirus%20(HV)%20is%20an%20emerging,of%20respiratory%20distress%20and%20hypotension)

299. Papa A. Meeting report: Tenth international conference on hantaviruses [Text] / A. Papa, A. Vaheri, J.W. LeDuc et al. // *Antivir Res*. – 2016. – Vol. 133. – P. 234–241.

300. Park, K. A novel genotype of Hantaan orthohantavirus harbored by *Apodemus Agrarius Chejuensis* as a potential etiologic agent of hemorrhagic fever with renal syndrome in Republic of Korea [Text] / K.Park, W.K.Kim, S.H.Lee et al. // *PLoS Negl Trop Dis*, 2021. – Vol. 15. - e0009400.

301. Peebles, R.S.,Jr. Viruses, dendritic cells and the lung [Text] / R.S.Peebles, Jr., B.S.Graham // *Respir Res*, 2001. - Vol. 2, N 4. - P. 245-249.

302. Peralbo, E. Invariant NKT and NKT-like lymphocytes: Two different T cell subsets that are differentially affected by ageing [Text] / E. Peralbo, C. Alonso, R. Solana // *Exp Gerontol*. – 2007. – Vol. 42. – P. 703–708.

303. Perez C., Prajapati K., Burke B. et al. NKG2D signaling certifies effector CD8 T cells for memory formation [Text] / C.Perez, K.Prajapati, B.Burke et al. // *J Immunother Cancer*, 2019. – Vol. 7. – P. 48.

304. Peters, C. J. Hantavirus pulmonary syndrome: the new American hemorrhagic fever [Text] / C.J.Peters, A.S.Khan // *Clin Infect Dis*, 2002. - Vol. 34, N 9. - P. 1224-1231.

305. Pettersson, L. Viral load and humoral immune response in association with disease severity in Puumala hantavirus-infected patients-implications for treatment [Text] / L.Pettersson, T.Thunberg, J.Rocklöv et al. // Clin Microbiol Infect, 2014. – Vol. 20. – P. 235–241.

306. Plyusnin, A. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts [Text] / A.Plyusnin, S.P.Morzunov // Curr Top Microbiol Immunol, 2001. - Vol. 256. - P. 47-75.

307. Prajapati, K. Functions of NKG2D in CD8<sup>+</sup> T cells: an opportunity for immunotherapy [Text] / K.Prajapati, C.Perez, L.B.P.Rojas et al. // Cell Mol Immunol, 2018. – Vol. 15, N 5. – P. 470-479.

308. Puerta, H. The New-World Hantaviruses. Ecology and epidemiology of an emerging virus in Latin America [Text] / H.Puerta, C.Cantillo, J.Mills et al. // Med Aires, 2006. - Vol. 66. - P. 343-356.

309. Radi, R. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide [Text] / R.Radi, J.S.Beckman, K.M.Bush, B.A.Freeman // Arch Biochem Biophys, 1991. - Vol. 288. - P. 481-487.

310. Raftery, M.J. Hantavirus infection of dendritic cells [Text] / M.J.Raftery, A.A.Kraus, R.Ulrich et al. // J Virol, 2002. - Vol. 76, N 21. - P. 10724-10733.

311. Raftery, M.J. Integrin mediates hantavirus-induced release of neutrophil extracellular traps [Text] / M.J.Raftery, P.Lalwani, E.Krautkrämer et al. // J Exp Med, 2014. - Vol. 211, N 7. - P. 1485-1497.

312. Raftery, M. J. Targeting of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy [Text] / M.J.Raftery, M.Schwab, S.Eibert et al. // Immunity, 2001. - Vol. 15, N 6. - P. 997-1009.

313. Rasmuson, J. Presence of activated airway T lymphocytes in human puumala hantavirus disease [Text] / J. Rasmuson, J.Pourazar, M.Linderholm et al. // Chest, 2011. - Vol. 140, N 3. - P. 715-722.

314. Resman Rus, K. HMGB1 is a potential biomarker for severe viral hemorrhagic fevers [Text] / K.Resman Rus, L.Fajs, M.Korva, T.Avsic-Zupanc // PLoS Negl Trop Dis, 2016. – Vol. 10, N 6. – P. e0004804.

315. Reusken, C. Factors driving hantavirus emergence in Europe [Text] / C.Reusken, P.Heyman // *Curr Opin Virol*, 2013. - Vol. 3, N 1. - P. 92-99.
316. Riquelme, R. Hantavirus [Text] / R. Riquelme // *Semin Respir Crit Care Med.* – 2021. – Vol. 42, N 6. – P. 822-827.
317. Rissanen, I. Structural basis for a neutralizing antibody response elicited by a recombinant Hantaan virus Gn immunogen [Text] / I.Rissanen, S.A.Krumm, R.Stass et al. // *mBio*, 2021. – Vol. 12. - e02531-20.
318. Rista, E. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Albania. Focus on predictors of acute kidney injury in HFRS [Text] / E.Rista, A.Pilaca, I.Akshija et al. // *J Clin Virol*, 2017. - Vol. 91. - P. 25-30.
319. Rong, X. Phase I evaluation of the safety and pharmacokinetics of a single-dose intravenous injection of a murine monoclonal antibody against Hantaan virus in healthy volunteers [Text] / X.Rong, Y.Y.Xiao, F.Y.Dao et al. // *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. – Vol. 53, N 12. – P. 5055–5059.
320. Rouse, B.T. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? [Text] / B.T.Rouse, S.Sehrawat // *Nat Rev Immunol*, 2010. - Vol. 10, N 7. - P. 514-526.
321. Rusnak, J.M. Experience with intravenous ribavirin in the treatment of hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea [Text] / J.M.Rusnak, W.R.Byrne, K.N.Chung et al. // *Antiviral Res*, 2009. - Vol. 81, N 1. - P. 68-76.
322. Sadeghi, M. Cytokine expression during early and late phase of acute Puumala hantavirus infection [Text] / M.Sadeghi, I.Eckerle, V.Daniel et al. // *BMC Immunol*, 2011. - Vol. 12. - P. 65-74.
323. Sadeghi, M. Association of low serum TGF- $\beta$  level in hantavirus infected patients with severe disease [Text] / M.Sadeghi, I.Lahdou, J.Ettinger et al. // *BMC Immunol*, 2015. – Vol. 16. – P. 19.
324. Saffarzadeh, M. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones [Text] / M.Saffarzadeh, C.Juenemann, M.A.Queisser et al. // *PLoS ONE*, 2012. - Vol. 7, N 2. - P. e32366.

325. Sakaguchi, S. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance [Text] / S.Sakaguchi, N.Sakaguchi, J.Shimizu et al. // *Immunol Rev*, 2001. – Vol. 182. – P. 18–32.

326. Saksida, A. Dobrava virus RNA load in patients who have hemorrhagic fever with renal syndrome [Text] / A.Saksida, D.Duh, M.Korva, T.Avsic-Zupanc // *J Infect Dis*, 2008. - Vol. 197, N 5. - P. 681-685.

327. Saksida, A. Serum levels of inflammatory and regulatory cytokines in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome [Text] / A.Saksida, B.Wraber, T.Avsic-Zupanc // *BMC Infect Dis*, 2011. - Vol. 11. - P. 142-149.

328. Sane, J. Complement activation in Puumala hantavirus infection correlates with disease severity [Text] / J.Sane, O.Laine, S.Makela et al. // *Ann Med*, 2012. - Vol. 44, N 5. - P. 468-475.

329. Sane, J. Human hantavirus infections in the Netherlands [Text] / J.Sane, J.Reimerink, M.Harms et al. // *Emerg Infect Dis*, 2014. - Vol. 20, N 12. - P. 2107-2110.

330. Saxton, R.A. Structure-based decoupling of the pro- and anti-inflammatory functions of interleukin-10 [Text] / R.A. Saxton, N. Tsutsumi, L.L. Su et al. // *Science*. – 2021. – Vol. 371, N 6535. – eabc8433.

331. Scheller, J. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 [Text] / J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, S. Rose-John // *Biochim Biophys Acta* // – 2011. – Vol. 1813. – P. 878–888.

332. Schmaljohn, C. Vaccines for hantaviruses [Text] / C.Schmaljohn // *Vaccine*, 2009. - Vol. 27, N 4. - P. 61–64.

333. Schmaljohn, C.S. “Bunyaviridae,” in *Fields Virology*, eds Knipe D. M., Howley P. M., editors [Text] / C.S.Schmaljohn, S.T.Nichol // Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. - P. 1741–1789.

334. Schmedes, C.M. Circulating extracellular vesicle tissue factor activity during orthohantavirus infection is associated with intravascular coagulation [Text] / C.M.Schmedes, S.P.Grover, Y.M.Hisada et al. // *J Infect Dis*, 2020. – Vol. 222. – P. 1392–1399.

335. Scholz, S. Human hantavirus infection elicits pronounced redistribution of mononuclear phagocytes in peripheral blood and airways [Text] / S.Scholz, F.Baharom, G.Rankin et al. // PLoS Pathog, 2017. - Vol. 13, N 6. - e1006462.

336. Schönrich, G. Hantavirus-induced immunity in rodent reservoirs and humans [Text] / G.Schönrich, A.Rang, N.Lütteke et al. // Immunol Rev, 2008. - Vol. 225. - P. 163-189.

337. Schountz, T. Regulatory T cell-like responses in deer mice persistently infected with Sin Nombre virus [Text] / T.Schountz, J.Prescott, A.C.Cogswell et al. // Proc Natl Acad Sci USA, 2007. - Vol. 104, N 39. - P. 15496-15501.

338. Schultze, D. Tula virus infection associated with fever and exanthema after a wild rodent bite [Text] / D.Schultze, A.Lundkvist, U.Blauenstein et al. // Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002. - Vol. 21, N 4. - P. 304-306.

339. Sehgal, A. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Asia: History, pathogenesis, diagnosis, treatment, and prevention [Text] / A.Sehgal, S.Mehta, K.Sahay et al. // Viruses, 2023. – Vol. 15, N 2. – P. 561.

340. Settergren, B. Clinical aspects of nephropathia epidemica (Puumala virus infection) in Europe: a review [Text] / B.Settergren // Scand J Infect Dis, 2000. - Vol. 32, N 2. - P. 125-132.

341. Shevach, E.M. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers [Text] / E.M.Shevach // Nat Rev Immunol, 2002. – Vol. 2, N 6. – P. 389–400.

342. Shevyrev, D. Regulatory T cells fail to suppress fast homeostatic proliferation in vitro [Text] / D. Shevyrev, V. Tereshchenko, E. Blinova et al. // Life (Basel). – 2021. – Vol. 11, N 3. – P. 245.

343. Shimizu, K. Involvement of CD8<sup>+</sup> T cells in the development of renal hemorrhage in a mouse model of hemorrhagic fever with renal syndrome [Text] / K.Shimizu, K.Yoshimatsu, M.Taruishi et al. // Arch Virol, 2018. - Vol. 163. N 6. - P. 1577-1584.

344. Shin, O.S. Distinct innate immune responses in human macrophages and endothelial cells infected with shrew-borne hantaviruses [Text] / O.S.Shin, R.Yanagihara, J.W.Song // Virology, 2012. - Vol. 434, N 1. - P. 43-49.

345. Shkair, L. Immunogenic properties of MVs containing structural hantaviral proteins: An original study [Text] / L.Shkair, E.Garanina, E.Martynova, A.I.Kolesnikova // *Pharmaceutics*, 2022. – Vol. 1. – P. 93.

346. Singh, D. Functional invariant natural killer T cells secreting cytokines are associated with non-progressive human immunodeficiency virus-1 infection but not with suppressive anti-retroviral treatment [Text] / D. Singh, M. Ghate, S. Godbole et al. // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1152.

347. Skartsis, N. IL-6 and TNF $\alpha$  drive extensive proliferation of human Tregs without compromising their lineage stability or function [Text] / N.Skartsis, Y.Peng, L.M.R.Ferreira et al. // *Front Immunol*, 2021. – Vol. 12. – P. 783282.

348. Smadel, J.E. Epidemic hemorrhagic fever [Text] / J.E.Smadel // *Am J Public Health Nations Health*, 1953. - Vol. 43, N 10. - P. 1327-1330.

349. Song, J.Y. Immunogenicity and safety of a modified three-dose priming and booster schedule for the Hantaan virus vaccine (Hantavax): A multi-center phase III clinical trial in healthy adults [Text] / J.Y.Song, H.W.Jeong, J.W.Yun et al. // *Vaccine*, 2020. – Vol. 38. – P. 8016–8023.

350. Song, J.-W. In vivo characterization of the integrin B3 as a receptor for Hantaan virus cellular entry [Text] / J.-W.Song, K.-J.Song, L.-J.Baek et al. // *Exp Mol Med*, 2005. – Vol. 37, N 2. – P. 121–127.

351. Strandin, T. Neutrophil activation in acute hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by Hantavirus-infected microvascular endothelial cells [Text] / T,Strandin, S,Makela, J.Mustonen, A.Vaheri // *Front Immunol*, 2018. - Vol. 9. - P. 2098-2111.

352. Sugita, J. Differential effects of interleukin-12 and interleukin-15 on expansion of NK cell receptor-expressing CD8<sup>+</sup> T cells [Text] / J.Sugita, J.Tanaka, A.Yasumoto et al. // *Ann Hematol*, 2010. – Vol. 89, N 2. – P. 115-120.

353. Sundstrom, J.B. Hantavirus infection induces the expression of RANTES and IP-10 without causing increased permeability in human lung microvascular endothelial cells [Text] / J.B.Sundstrom, L.K.McMullan, C.F.Spiropoulou et al. // *J Virol*, 2001. - Vol. 75, N 13. - P. 6070-6085.

354. Szabo, C. Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages using a manganese mesoporphyrin superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger [Text] / C. Szabo, B. J. Day, A. L. Salzman // FEBS Lett, 1996. - Vol. 381. - P. 82-86.

355. Tang, X. Advances in the study of CD8<sup>+</sup> regulatory T cells [Text] / X. Tang, V. Kumar // Crit Rev Immunol. – 2019. – Vol. 39, N 6. – P. 409–421.

356. Taruishi, M. Analysis of the immune response of Hantaan virus nucleocapsid protein-specific CD8<sup>+</sup> T cells in mice [Text] / M.Taruishi, K.Yoshimatsu, K.Araki et al. // Virology, 2007. - Vol. 365, N 2. - P. 292–301.

357. Taylor, S.L. Hantaan virus nucleocapsid protein binds to importin  $\alpha$  proteins and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced activation of nuclear factor kappa B [Text] / S.L.Taylor, N.Frias-Staheli, A.Garcia-Sastre, C.S.Schmaljohn // J Virol, 2009. - Vol. 83, N 3. - P. 1271-1279.

358. Taylor, S.L. Endothelial cell permeability during hantavirus infection involves factor XII-dependent increased activation of the kallikrein–kinin system [Text] / S.L.Taylor, V.Wahl-Jensen, A.M.Copeland et al. // PLoS Pathog, 2013. - Vol. 9, N 7. - P. e1003470.

359. Temonen, M. Cytokines, adhesion molecules, and cellular infiltration in nephropathia epidemica kidneys: an immunohistochemical study [Text] / M.Temonen, J.Mustonen, H.Helin et al. // Clin Immunol Immunopathol, 1996. - Vol. 78, N 1. - P. 47-55.

360. Ten Oever, J. Combination of biomarkers for the discrimination between bacterial and viral lower respiratory tract infections [Text] / J. Ten Oever, M. Tromp, C.P. Bleeker-Rovers et al. // J Infect. – 2012. – Vol. 65. – P. 490–495.

361. Terajima, M. T cells and pathogenesis of hantavirus cardiopulmonary syndrome and hemorrhagic fever renal syndrome [Text] / M.Terajima, F.A.Ennis // Viruses, 2011. - Vol. 3, N 7. - P. 1059-1073.

362. Terajima, M. Immune responses to Puumala virus infection and pathogenesis of nephropathia epidemica [Text] / M.Terajima, O.Vipalahti, H.I.van Epps et al. // *Microbes Infect*, 2004. - Vol. 6, № 2. - P. 238-245.

363. Terrazzano, G. T1D progression is associated with loss of CD3+CD56+ regulatory T cells that control CD8+ T cell effector functions [Text] / G. Terrazzano, S. Bruzzaniti, V. Rubino et al. // *Nat Metab.* – 2020. – Vol. 2. – P. 142–152.

364. Thuno, M. suPAR: The molecular crystal ball [Text] / M. Thuno, B. Macho, J. Eugen-Olsen // *Dis Markers.* – 2009. – Vol. 27, N 3. – P. 157–172.

365. Tian, H. The ecological dynamics of hantavirus diseases: From environmental variability to disease prevention largely based on data from China [Text] / H.Tian, N.C.Stenseth // *PLoS Negl Trop Dis*, 2019. - Vol. 13, N 2. - P. e0006901.

366. Tkachenko, E.A. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia [Text] / E.A.Tkachenko, A.A.Ishmukhametov, T.K.Dzagurova et al. // *Emerg Infect Dis*, 2019. – Vol. 25, N 12. – P. 2325-2328.

367. Tsergouli, K. Immune response in Dobrava-Belgrade virus infections [Text] / K.Tsergouli, A.Papa // *Arch Virol*, 2016. - Vol. 161, N 12. - P. 3413-3420.

368. Tuuminen, T. Human CD8+ T cell memory generation in Puumala hantavirus infection occurs after the acute phase and is associated with boosting of EBV-specific CD8+ memory T cells [Text] / T.Tuuminen, E.Kekäläinen, S.Mäkelä et al. // *J Immunol*, 2007. - Vol. 179, N 3. - P. 1988-1995.

369. Vaheri, A. Hantavirus infections in Europe and their impact on public health [Text] / A.Vaheri, H.Henttonen, L.Voutilainen et al. // *Rev Med Virol*, 2013. - Vol. 23, N 1. - P. 35-49.

370. Vaheri. A. Hantavirus infections in Europe and their impact on public health [Text] / A. Vaheri, H. Henttonen, L. Voutilainen et al. // *Rev Med Virol.* – 2013. – Vol. 23, N 1. – P. 35–49.

371. Vaheri, A. Puumala hantavirus infections show extensive variation in clinical outcome [Text] / A. Vaheri, T. Smura, H. Vauhkonen et al. // *Viruses.* – 2023. – Vol. 15, N 3. – P. 805.

372. Vaheri, A. Uncovering the mysteries of hantavirus infections [Text] / A.Vaheri, T.Strandin, J.Hepojoki et al. // Nat Rev, 2013. - Vol. 11, N 8. - P. 539-550.

373. van Epps, H.L. Long-lived memory T lymphocyte responses after hantavirus infection [Text] / H.L.Van Epps, M.Terajima, J.Mustonen et al. // J Exp Med, 2002. - Vol. 196, N 5. - P. 579-588.

374. van Niel, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles [Text] / G.van Niel, G.D'Angelo, G.Raposo // Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. – Vol. 19. – P. 213–228.

375. Verbist, K.C. Functions of IL-15 in anti-viral immunity: multiplicity and variety [Text] / K.C. Verbist, K.D. Klonowski // Cytokine. – 2012. – Vol. 59, N 3. – P. 467–478.

376. Verneris, M.R. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells [Text] / M.R.Verneris, M.Karami, J.Baker et al. // Blood, 2004. – Vol. 103, N 8. – P. 3065–3072.

377. Vial, P.A. A non-randomized multicentre trial of human immune plasma for treatment of hantavirus cardiopulmonary syndrome caused by Andes virus [Text] / P.A.Vial, F.Valdivieso, M.Calvo et al. // Antivir Ther, 2015. – Vol. 20, N 4. – P. 377–386.

378. Volanakis, J.E. Human C-reactive protein: Expression, structure, and function [Text] / J.E. Volanakis // Mol Immunol. – 2001. – Vol. 38. – P. 189–197.

379. Villanueva, E. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus [Text] / E.Villanueva, S.Yalavarthi, C.C.Berthier et al. // J Immunol, 2011. - Vol. 187, N 1. - P. 538-552.

380. Vincent, M.J. Hantavirus pulmonary syndrome in Panama: identification of novel hantaviruses and their likely reservoirs [Text] / M.J.Vincent, E.Quiroz, F.Gracia et al. // Virology, 2000. - Vol. 277. - P. 14-19.

381. Voutilainen, L. Temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in cyclic populations of bank voles [Text] / L. Voutilainen, E.R. Kallio, J. Niemimaa et al. // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 1–15.

382. Wagenknecht, H.-A. Book Review [Text] / H.-A.Wagenknecht // Protein Sci, 2009. – Vol. 13, N 12. – P. 3331–3332.
383. Wagner, J. Free DNA—New potential analyte in clinical laboratory diagnostics? [Text] / J. Wagner // Biochem Med. – 2012. – Vol. 22. – P. 24–38.
384. Walsh, K.B. NKG2D receptor signaling enhances cytolytic activity by virus-specific CD8+ T cells: evidence for a protective role in virus-induced encephalitis [Text] / K.B.Walsh, L.L.Lanier, T.E.Lane // J Virol, 2008. - Vol. 82, N 6. - P. 3031-3044.
385. Wang, X. Human invariant natural killer T cells acquire transient innate responsiveness via histone H4 acetylation induced by weak TCR stimulation [Text] / X. Wang, K.A. Bishop, S Hegde et al. // J Exp Med. – 2012. – Vol. 209. – P. 987–1000.
386. Wang, J. Elevated soluble CD163 plasma levels are associated with disease severity in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome [Text] / J.Wang, W.Guo, H.Du et al. // PLoS One, 2014. - Vol. 9, N 11. - P. e112127.
387. Wang, P.Z. Analysis of the immune response to Hantaan virus nucleocapsid protein C-terminal-specific CD8(+) T cells in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome [Text] / P.Z.Wang, C.X.Huang, Y.Zhang et al. // Viral Immunol, 2009. - Vol. 22, N 4. - P. 253-260.
388. Wang, P.Z. Elevated serum concentrations of inflammatory cytokines and chemokines in patients with haemorrhagic fever with renal syndrome [Text] / P.Z.Wang, Z.D.Li, H.T.Yu et al. // J Int Med Res, 2012. - Vol. 40, N 2. - P. 648-656.
389. Wang, J. Identification of cuproptosis-related subtypes, construction of a prognosis model, and tumor microenvironment landscape in gastric cancer [Text] / J. Wang, D. Qin, Z. Tao et al. // Front Immunol. – 2022. – Vol. 3. – P. 1056932.
390. Wang, M. Kinetics and immunodominance of virus-specific T cell responses during Hantaan virus infection [Text] / M.Wang, J.Wang, Z.Kang et al. // Viral Immunol, 2015. - Vol. 28, N 5. - P. 265-271.
391. Wang, M. Thrombocytopenia as a predictor of severe acute kidney injury in patients with Hantaan virus infections [Text] / M.Wang, J.Wang, T.Wang et al. // PLoS ONE, 2013. - Vol. 8, N 1. - P. e53236.

392. Wang, M. Cellular immune response to Hantaan virus nucleocapsid protein in the acute phase of hemorrhagic fever with renal syndrome: correlation with disease severity [Text] / M.Wang, J.Wang, Y.Zhu et al. // J Infect Dis, 2009. - Vol. 199, N 2. - P. 188-195.
393. Wang, N. [Epidemic process and influencing factors of hemorrhagic fever with renal syndrome: a review] [Text] / N.Wang, J.X.Yin // Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi, 2021. – Vol. 34, N 2. – P. 200-203.
394. Wang, W. Dysregulation of the  $\beta 3$  integrin-VEGFR2 complex in Hantaan virus-directed hyperpermeability upon treatment with VEGF [Text] / W.Wang, Y.Zhang, Y.Li et al. // Arch Virol, 2012. - Vol. 157, N 6. - P. 1051-1061.
395. Wang, M. Identification of three novel CTL Epitopes within nucleocapsid protein of hantaan virus [Text] / M.Wang, Y.Zhu, J.Wang et al. // Vir Immunol, – 2011. - Vol. 24, N 6. - P. 449-454.
396. Weiler, M. CD40 ligation enhances IL-15 production by tubular epithelial cells / M. Weiler, L. Kachko, C. Chaimovitz et al. // J Am Soc Nephrol. – 2001. – Vol. 12, N 1. – P. 80-87.
397. Weng, N.-P. IL-15 is a growth factor and an activator of CD8 memory T cells [Text] / N.-P.Weng, K.Liu, M.Catalfamo et al. // Ann N Y Acad Sci, 2002. – Vol. 975. – P. 46-56.
398. Wiechmann, A. CD107a+ (LAMP-1) cytotoxic CD8+ T-cells in lupus nephritis patients [Text] / A. Wiechmann, B. Wilde, B. Tyczynski et al. // Front Med (Lausanne). – 2021. – Vol. 8. – P. 556776.
399. Wigren Bystrom, J. Quantification and kinetics of viral RNA transcripts produced in Orthohantavirus infected cells [Text] / J.Wigren Bystrom, J.Naslund, F.Trulsson et al. // Virol J, 2018. - Vol. 15, N 1. - P. 18.
400. Wing, J.B. Human FOXP3(+) regulatory T cell heterogeneity and function in autoimmunity and cancer [Text] / J.B. Wing, A. Tanaka, S. Sakaguchi // Immunity. – 2019. – Vol. 50, N 2. – P. 302- 316.

401. Wu, C.Y.  $\alpha$ -Galactosylceramide protects mice from lethal Coxsackievirus B3 infection and subsequent myocarditis [Text] / C.Y. Wu, Y. Feng, G.C. Qian et al. // Clin Exp Immunol. – 2010. – Vol. 162. – P. 178–187.

402. Xie, M. Levels of HTNV-specific CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in PBMC from the patients with hemorrhagic fever with renal syndrome [Text] / M.Xie, Y.Dong, Y.Zhou et al. // Intern Emerg Med, 2013. - Vol. 8, N 6. - P. 503-508.

403. Xu, Z. The *in vitro* and *in vivo* protective activity of monoclonal antibodies directed against Hantaan virus: potential application for immunotherapy and passive immunization [Text] / Z.Xu, L.Weil, L.Wang et al. // Biochem Biophys Res Commun, 2002. - Vol. 298, N 4. - P. 552-558.

404. Yang, J. Targeted inhibition of hantavirus replication and intracranial pathogenesis by a chimeric protein-delivered siRNA [Text] / J.Yang, J.F.Sun, T.T.Wang et al. // Antiviral Res, 2017. - Vol. 147. - P. 107-115.

405. Yang, Z.Q. Interruption study of viremia of patients with hemorrhagic fever with renal syndrome in the febrile phase [Text] / Z.Q.Yang, T.M.Zhang, M.V.Zhang et al. // Chin Med J, 1991. - Vol. 104, N 2. - P. 149-153.

406. Yashina, L.N. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Vladivostok city, Russia. [Text] / L.N.Yashina, J.Hay, N.A.Smetannikova et al. // Front Public Health, 2021. – Vol. 9. – P. 620279.

407. Yi, Y.J. Association between haemorrhagic fever with renal syndrome and cancers [Text] / Y.J.Yi, M.Kang, W.-K.Kim et al. // Int J Infect Dis, 2021. – Vol. 113. – P. 127-135.

408. Yi, J. Hantaan virus RNA load in patients having hemorrhagic fever with renal syndrome: correlation with disease severity [Text] / J.Yi, Z.Xu, R.Zhuang et al. // J Infect Dis, 2013. - Vol. 207, N 9. - P. 1457-1461.

409. Ying, X. Continuous renal replacement therapy rescues severe haemorrhagic fever with renal syndrome in pregnancy: A case report [Text] / X.Ying, X.Lai, X.Jin et al. // BMC Infect Dis, 2020. – Vol. 20. – P. 920.

410. Yu, H.T. Involvement of the Akt/NF- $\kappa$ B pathways in the HTNV-mediated increase of IL-6, CCL5, ICAM-1, and VCAM-1 in HUVECs [Text] / H.T.Yu, W.Jiang, H.Du et al. // PLoS ONE, 2014. – Vol. 9. – e93810.

411. Yu, Z. Performance assessment of the SAPS II and SOFA scoring systems in Hanta virus Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome [Text] / Z.Yu, N.Zhou, A.Li et al. // Int J Infect Dis, 2017. - Vol. 63. - P. 88-94.

412. Zaki, S.R. Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease [Text] / S.R.Zaki, P.W.Greer, L.M.Coffield et al. // Am J Pathol, 1995. - Vol. 146, N 3. - P. 552-579.

413. Zapata, J.C. The role of platelets in the pathogenesis of viral hemorrhagic fevers [Text] / J.C.Zapata, D.Cox, M.S.Salvato // PLoS Negl Trop Dis, 2014. - Vol. 8, N 6. - P. e2858.

414. Zelena, H. Tula hantavirus infection in immunocompromised host, Czech Republic [Text] / H.Zelena, J.Mrazek, T.Kuhn // Emerg Infect Dis, 2013. - Vol. 19, N 11. - P. 1873-1875.

415. Zhao, H.-D. Potential clinical biomarkers in monitoring the severity of Hantaan virus infection [Text] H.-D. Zhao, J.-J. Sun, H.-L. Liu // Cytokine. – 2023. – Vol. 170. – P. 156340.

416. Zhang, X. Comparison of Hantaan and Seoul viral infections among patients with hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Heilongjiang, China [Text] / X.Zhang, H.Y.Chen, L.Y.Zhu et al. // Scand J Infect Dis, 2011. - Vol. 43, N 8. - P. 632-641.

417. Zhang, Y.Z. Seoul virus and hantavirus disease, Shenyang, People's Republic of China [Text] / Y.Z.Zhang, X.Dong, X.Li et al. // Emerg Infect Dis, 2009. - Vol. 15, N 2. - P. 200-206.

418. Zhang, Y. Expression of L protein of Hantaan virus 84FLi strain and its application for recovery of minigenomes [Text] / Y.Zhang, X.H.Li, H.Jiang et al. // APMIS, 2008. – Vol. 116. – P. 1089–1096.

419. Zhang, Y. Hantaan virus infection induces CXCL10 expression through TLR3, RIG-I, and MDA-5 pathways correlated with the disease severity [Text] / Y.Zhang, B.Liu, Y.Ma et al. // *Med Inflamm*, 2014. - Vol. 2014. - P. 697837-697847.
420. Zhang, J. The immune potential of decidua-resident CD16+CD56+ NK cells in human pregnancy [Text] / J. Zhang, S.J. Lye // *Hum Immunol*. – 2021. – Vol. 82, N 5. – P. 332-339.
421. Zhang, Y. Viruses run: The evasion mechanisms of the antiviral innate immunity by hantavirus [Text] / Y. Zhang, R. Ma, Y. Wang et al. // *Front Microbiol*. – 2021. – Vol. 12. – P. 759198.
422. Zhang, X.K. Characteristics of passive immunity against hantavirus infection in rats [Text] / X.K.Zhang, I.Takashima, N.Hashimoto // *Arch Virol*, 1989. – Vol. 105, N 3-4. – P. 235–246.
423. Zhang, Y.Z. Hantavirus infections in humans and animals, China [Text] / Y.Z.Zhang, Y.Zou, Z.F.Fu, A.Plyusnin // *Emerg Infect Dis*, 2010. - Vol. 16, N 8. - P. 1195-1203.
424. Zheng, S.G. , Wang J, Horwitz DA. Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6 [Text] / S.G.Zheng, J.Wang, D.A.Horwitz // *J Immunol*, 2008. – Vol. 180, N 11. – P. 7112–7116.
425. Zheng, Y. Persistence of immune responses to vaccine against haemorrhagic fever with renal syndrome in healthy adults aged 16-60 years: results from an open-label 2-year follow-up study [Text] / Y.Zheng, B.Y.Zhou, J.Wei et al. // *Infect Dis (Lond)*, 2018. - Vol. 50, N 1. - P. 21-26.
426. Zhou X., Obuchowski N., McClish D. *Statistical Methods in Diagnostic Medicine* [Text] / John Wiley & Sons, New York. – 2002.
427. Zou, L.-X. Analysis of hemorrhagic fever with renal syndrome using wavelet tools in mainland China, 2004–2019 [Text] / L.-X.Zou, L.Sun // *Front Public Health*, 2020. – Vol. 8. – P. 571984.

428. Zuo, S.Q. Seoul virus in patients and rodents from Beijing, China [Text] / S.Q.Zuo, P.H.Zhang, J.F.Jiang et al. // Am J Trop Med Hyg, 2008. - Vol. 78, N 5. - P. 833-837.