

СОСТОЯНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ МОНОЦИТОВ И ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

¹Трусевич М. О., *rita.trusevich@gmail.com*,

¹Картаева А. С., *kartaeva99@mail.ru*,

¹Титов Л. П., д. м. н., профессор, академик НАН Беларуси, *leotit310@gmail.com*,

²Сильванович Е. А., *silvanoviche@gmail.com*,

²Карпов И. А., д. м. н., профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, *vip.kia1957@mail.ru*,

²Анисько Л. А., *luidok@mail.ru*

¹Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», г. Минск, Республика Беларусь,

²Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Коронавирусная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2, стала одной из самых значительных глобальных проблем здравоохранения XXI века. С начала пандемии в 2019 г. вирус вызвал беспокойство не только из-за высокой контагиозности и тяжелых случаев заболевания, но и из-за глубоких социальных, экономических и медицинских последствий, которые он оставил. Актуальность этой темы остается высокой, поскольку новые варианты вируса и неопределенность в прогрессии заболеваемости продолжают оказывать влияние на жизнь людей и системы здравоохранения в большинстве стран мира. Понимание основных механизмов иммунного ответа на коронавирусную инфекцию критически важно для разработки эффективных методов лечения и профилактики.

Адаптивный противовирусный иммунный ответ является ключевым фактором в ликвидации вирусов, который осуществляется с помощью гуморального и клеточного механизмов и направлен на нейтрализацию, освобождение организма от вируса, его антигенов и уничтожение зараженных вирусом клеток [1]. Однако адекватность приобретенного иммунного ответа зависит от реактивности врожденного иммунитета человека.

Система мононуклеарных фагоцитов (далее – СМФ), состоящая из моноцитов, дендритных клеток (далее – ДК) и макрофагов, играет жизненно важную роль во врожденной иммунной защите от патогенов. Моноциты составляют 5–10 % лейкоцитов периферической крови человека и образуются в костном мозге и селезенке. Во время воспаления моноциты могут дифференцироваться в макрофаги и ДК, которые в свою очередь могут представлять антигены Т-клеткам. ДК являются наиболее мощными антигенпрезентирующими клетками (далее – АПК) и единственными АПК, которые могут активировать наивные Т-клетки. Последние исследования показали, что COVID-19 характеризуется системным увеличением количества многочисленных цитокинов, включая IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, фактор некроза опухоли, интерфероны типа I и II, а также воспалительные хемокины CCL2, CCL3 и CCL10. Подобные профили цитокинов, наблюдаемые у пациентов с тяжелой формой COVID-19, имеют сходство с профилями, наблюдаемыми при синдроме активации макрофагов. Данный факт привел к гипотезе о том, что нарушение регуляции активации системы мононуклеарных фагоцитов способствует гипervоспалению, связанному с COVID-19 [2].

Учитывая ключевую роль в защите хозяина и потенциальную опасность, которую представляет нерегулируемое гипervоспаление, опосредованное СМФ, понимание соотношения фенотипов моноцитов и дендритных клеток при COVID-19 является ключом к решению патологических механизмов заболевания.

Цель работы – изучить в динамике изменения относительного и абсолютного содержания субпопуляций моноцитов и дендритных клеток в крови пациентов со среднетяжелой формой течения инфекции COVID-19.

Объектом исследования была кровь от пациентов с диагнозом «инфекция COVID-19» (УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска), полученная в период апрель–июль 2023 г. Обследовано

23 пациента со среднетяжелой формой течения заболевания (9 мужчин и 14 женщин, возраст $69,4 \pm 3,3$ лет). Диагноз был подтвержден положительным ПЦР-тестом. Забор крови у пациентов производился на 1 и 6 суток от установления диагноза. Контрольная группа включала 30 здоровых доноров.

Субпопуляции моноцитов и дендритных клеток определяли методом проточной цитометрии, используя следующие моноклональные антитела: lin (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56), CD11c (клон BU15), CD14 (клон MEM-15), CD16 (клон CB16), CD45 (клон HI30), CD123 (клон 6H6) и HLA-DR (клон L243). Для этого цельную кровь окрашивали соответствующими моноклональными антителами. После инкубации в течение 15 мин образцы лизировали лизирующим раствором RBC Lysis Buffer (BioLegend, США). Оставшиеся лейкоциты промывали после лизиса фосфатно-солевым буфером (ФСБ), pH 7,2 (Capricorn Scientific GmbH, Германия). После восстановления в ФСБ клетки анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Гейтирование проводили согласно общепринятым методикам. Для корректной настройки параметров компенсации для каждой группы образцов готовили single-stained контроли. Данные анализировали при помощи программы FACSDiva версии 7.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica версии 10. Значения показателей представлены в виде медианы 25-го и 75-го процентилей – Me (25–75). Для сравнения двух независимых выборок применяли U-критерий Манна – Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Изменения в профиле субпопуляций дендритных клеток. Роль дендритных клеток при COVID-19 лишь недавно начала привлекать внимание исследователей. Термин «дендритная клетка» используется для описания функционально сходных клеток различного происхождения, способных как активировать Т-клетки, так и индуцировать адаптивный иммунный ответ. CD11c – плазмоцитоидные дендритные клетки (далее – пДК) происходят из лимфоидных предшественников, тогда как CD11c+ миелоидные дендритные клетки (далее – мДК) тесно связаны с моноцитами и происходят из миелоидных клеток-предшественников. Дендритные клетки можно рассматривать как связующее звено между врожденной и адаптивной иммунной системой [3].

Данные, полученные в ходе исследования относительного и абсолютного содержания ДК в периферической крови пациентов с инфекцией COVID-19, представлены в таблице 1. На 1 сутки заболевания отмечено снижение содержания как плазмоцитоидных, так и миелоидных ДК по сравнению с группой контроля. В дальнейшем (на 6 сутки) наблюдали статистически значимое снижение как относительного, так и абсолютного содержания только мДК в сравнении с контрольной группой. Также выявлено достоверно значимое снижение относительного содержания мДК ($p < 0,05$) у пациентов на 6 сутки терапии в сравнении с показателями начала заболевания.

Таблица 1 – Относительное и абсолютное содержание субпопуляций дендритных клеток в периферической крови доноров и пациентов с COVID-19, Me (25–75)

Параметр	Здоровые доноры n = 30	Пациенты с COVID-19 на 1 сутки n = 23	Пациенты с COVID-19 на 6 сутки n = 20
пДК CD123+CD11c-: % от числа лейкоцитов $\times 10^6/\text{мл}$	0,162 (0,137–0,197) 0,01 (0,008–0,011)	0,107 (0,060–0,197) 0,007 (0,005–0,013)	0,108 (0,055–0,215) 0,010 (0,006–0,018)
мДК CD123-CD11c+: % от числа лейкоцитов $\times 10^6/\text{мл}$	0,290 (0,241–0,386) 0,018 (0,013–0,024)	0,277 (0,136–0,383) 0,016 (0,011–0,028)	0,148 (0,043–0,253)* 0,011 (0,007–0,020)*
* достоверные различия ($p < 0,05$) между донорами и пациентами; ** достоверные различия ($p < 0,05$) у пациентов на 1 и 6 сутки заболевания.			

Полученные данные могут свидетельствовать о затрудненном восстановлении количества ДК при инфекции COVID-19. Borchering L. с коллегами [3] в своих работах показали, что при коронавирусной инфекции происходит нарушение созревания ДК. Хотя незрелые дендритные клетки продолжают рекрутироваться, они в конечном итоге не могут выполнить свою основную роль – добраться до лимфатических узлов и активировать Т-лимфоциты. Это приводит к заметному накоплению дендритных клеток в легких и предотвращает эффективный Т-клеточный ответ. Таким образом, дендритные клетки, неспособные адекватно вызвать адаптивную иммунную реакцию, могут быть еще одним компонентом неправильно управляемого иммунного ответа в тяжелых случаях COVID-19.

Изменения в профиле субпопуляций моноцитов. В ходе исследования определяли общее содержание и основные субпопуляции моноцитов периферической крови пациентов: «классические» моноциты

с фенотипом CD14++CD16-, «промежуточные» моноциты с фенотипом CD14++CD16+ и «неклассические» моноциты с фенотипом CD14+/-CD16+. Средние значения относительного и абсолютного содержания субпопуляций моноцитов у пациентов обследуемых групп в динамике заболевания, полученные в ходе исследования, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Относительное и абсолютное содержание субпопуляций моноцитов периферической крови доноров и пациентов с COVID-19, Ме (25–75)

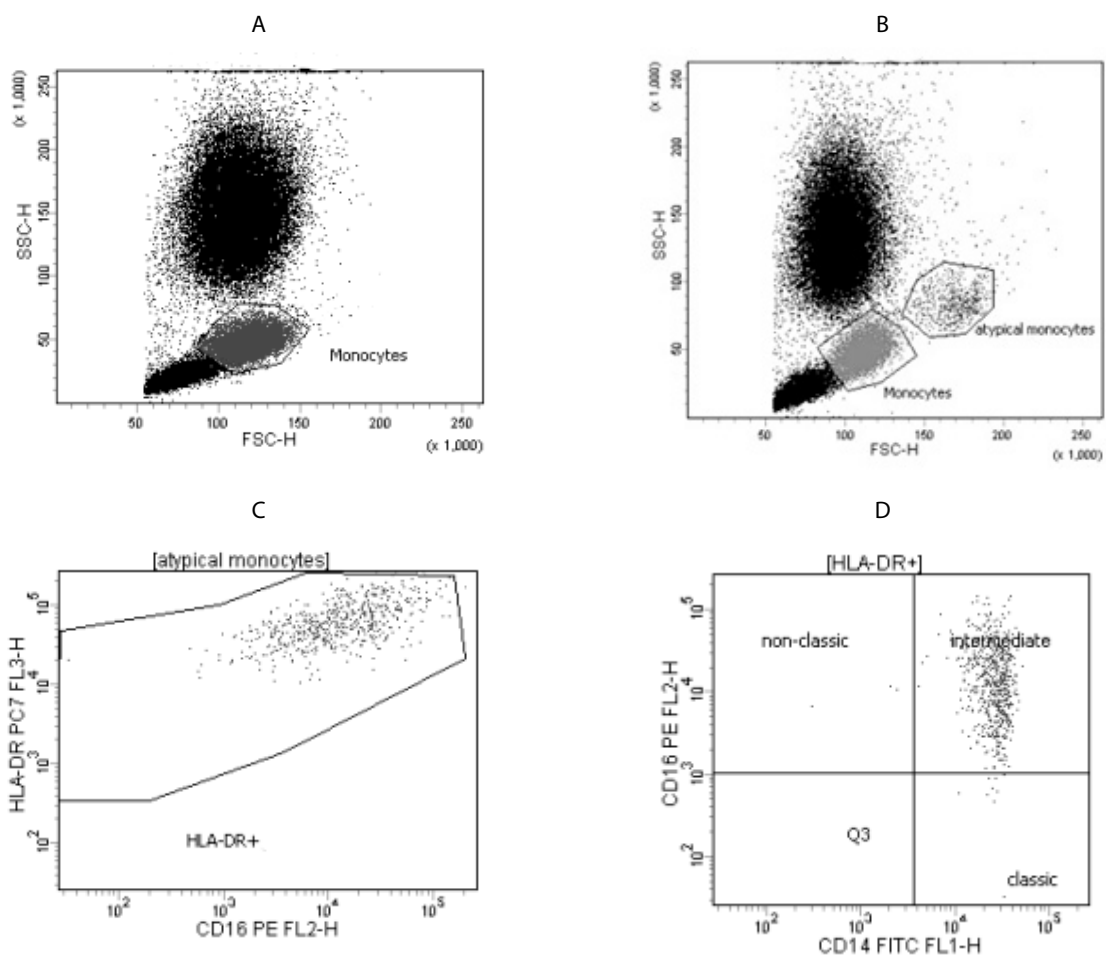
Параметр	Здоровые доноры n = 30	Пациенты с COVID-19 на 1 сутки n = 23	Пациенты с COVID-19 на 6 суток n = 20
Моноциты: % × 10 ⁶ /мл	6,85 (6,01–7,99) 0,40 (0,34–0,48)	11,6 (6,9–14,6)* 0,68 (0,48–0,93)*	7,75 (6,25–9,80)** 0,74 (0,54–0,92)*
HLA-DR+ моноцитов: % от числа моноцитов × 10 ⁶ /мл	85,58 (82,86–88,68) 0,34 (0,29–0,42)	95,7 (92,5–97,7)* 0,66 (0,45–0,88)*	96,9 (93,8–98,1)* 0,66 (0,53–0,86)*
CD14++CD16- классические: % от числа моноцитов × 10 ⁶ /мл	82,53 (80,60–84,15) 0,33 (0,27–0,40)	61,5 (50,1–72,2)* 0,40 (0,26–0,56)	71,2 (66,18–78,53)*, ** 0,50 (0,38–0,71)*
CD14++CD16+ промежуточные: % от числа моноцитов × 10 ⁶ /мл	10,08 (8,33–11,37) 0,04 (0,03–0,05)	29,5 (19,6–38,4)* 0,20 (0,11–0,31)*	23,85 (16,93–30,3)*, ** 0,16 (0,11–0,25)*
CD14+/-CD16+ неклассические: % от числа моноцитов × 10 ⁶ /мл	6,01 (5,18–7,27) 0,02 (0,02–0,03)	4,8 (1,4–9,4) 0,04 (0,01–0,08)	2,45 (0,88–5,13)* 0,02 (0,01–0,04)
* достоверные различия (p < 0,05) между донорами и пациентами; ** достоверные различия (p < 0,05) у пациентов на 1 и 6 сутки заболевания.			

Выявлено достоверное увеличение относительного и абсолютного содержания моноцитов у пациентов в начале заболевания COVID-19. На 6 сутки терапии процентное содержание моноцитов пришло в норму, соответствующую референсным значениям у 15 человек из 20 (75 %).

У пациентов с инфекцией COVID-19 отмечено статистически значимое изменение в структуре перераспределения процентного содержания основных субпопуляций моноцитов. А именно, у пациентов на начальной стадии течения заболевания отмечен пониженный уровень процентного содержания классических моноцитов и повышенный уровень промежуточных моноцитов в сравнении со здоровыми донорами. На 6 сутки уровень классических моноцитов достоверно увеличивается, но все еще статистически ниже референсных значений, а уровень промежуточных моноцитов снижается, но достоверно выше в сравнении с контрольной группой. Уровень неклассических моноцитов характеризовался тенденцией к снижению в начале заболевания и на 6 сутки снижение уровня было достоверно значимым (p < 0,05). Данные результаты согласуются с данными других исследований и указывают на то, что фенотип циркулирующих моноцитов у пациентов со среднетяжелой формой течения заболевания в основном состоит из CD14+ и субпопуляции воспалительных моноцитов CD16+, которая может проявлять воспалительную активность и продуцировать IL-6.

Выявленное достоверно высокое содержание молекул HLA-DR на моноцитах может свидетельствовать о том, что моноциты пациентов с COVID-19 способны не только выполнять свою антигенпрезентирующую функцию, но и обладают способностью продуцировать воспалительные медиаторы, что может провоцировать цитокиновый шторм.

В ходе исследования у 35 % (8 из 23) пациентов с инфекцией COVID-19 была выявлена субпопуляция атипичных моноцитов с фенотипом промежуточных моноцитов HLA-DR+CD14+CD16+, которая при анализе прямого светорассеяния (далее – FSC) и бокового светорассеяния (далее – SSC) проточной цитометрии характеризовалась высоким FSC/SSC. Атипичные моноциты составляли приблизительно 1 % от лейкоцитов периферической крови. На 6 сутки заболевания эта популяция клеток в количестве 0,3–0,4 % сохранялась только у 3 пациентов с инфекцией COVID-19. На рисунке 1 показано изображение параметров FSC/SSC проточной цитометрии, а также распределение маркеров дифференциации атипичных моноцитов. В ряде последних работ было отмечено, что морфологически эти атипичные моноциты характеризуются более крупным размером клеток за счет большого количества вакуолей.



лейкоциты визуализировали на цитограмме прямого и бокового светорассеяния FSC/SS
 А – здоровый донор, В – пациент с COVID-19; С – регион атипичных моноцитов проецировали на цитограмму CD16/HLA-DR, выделяя HLA-DR+ атипичные моноциты; D – после гейтирования данного региона, анализировали экспрессию молекул CD14 и CD16 на атипичных HLA-DR+ моноцитах

Рисунок 1 – Схема гейтирования атипичных моноцитов

Исследователи Dan Zhang с коллегами [4] показали, что при более детальном анализе эти моноциты с высоким содержанием CD14+CD16+ и FSC демонстрируют признаки смешанной поляризации макрофагов M1/M2 с более высокой экспрессией CD80+ и CD206+ по сравнению с остальными моноцитами и секрецией более высоких уровней IL-6, IL-10 и TNF- α по сравнению с контролем. Данной группой исследователей было сделано заключение, что периферические моноциты у пациентов с COVID-19 воспаляются и начинают дифференцироваться в макрофаги.

В прикладном аспекте выявление наличия атипичных промежуточных моноцитов у пациентов с COVID-19 в дальнейшем может служить диагностическим и/или прогностическим маркером заболевания, так как по данным литературы не описаны случаи обнаружения данных моноцитов при других вирусных заболеваниях.

Полученные данные свидетельствуют о статистически значимых изменениях в процентном перераспределении основных субпопуляций моноцитов, снижении количества дендритных клеток миелоидного происхождения в динамике заболевания. Эти сдвиги в составе популяций системы мононуклеарных фагоцитов, а также обнаружение атипичной популяции промежуточных моноцитов (около 1 % от всех лейкоцитов) приводят к выводу о неспособности этих клеток адекватно вызывать адаптивный иммунный ответ при инфекции COVID-19.

В прикладном аспекте выявление атипичных промежуточных моноцитов с фенотипом HLA-DR+CD14+CD16+ и высоким FSC/SSC при анализе прямого и бокового светорассеяния проточной цитометрии может служить диагностическим и/или прогностическим маркером заболевания COVID-19.

Литература

1. Соловьева, А. С. Противовирусный иммунитет / А. С. Соловьева // Бюлл. Физиологии и патологии дыхания. – 2015. – Вып. 56. – С. 113–118.
2. Merad, M. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages / M. Merad, J. C. Martin // Nat. Rev. Immunol. – 2020. – Vol. 20, iss. 6. – P. 355–362.
3. Impaired dendritic cell homing in COVID-19 / L. Borchering [et al.] // Front. Med. (Lausanne). – 2021. – Vol. 8. – Art. № 761372.
4. Frontline Science: COVID-19 infection induces readily detectable morphologic and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes / D. Zhang [et al.] // J. Leukoc. Biol. – 2021. – Vol. 109, iss. 1. – P. 13–22.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГИГИЕНЫ, ТОКСИКОЛОГИИ,
ЭПИДЕМИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ
И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ» (НИИ ГТ ЭВМ РЦГЭиОЗ)
ОБЩЕСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ
«НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ГИГИЕНИСТОВ»

**СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ
МЕЖДУНАРОДНОЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
«ЗДОРОВЬЕ И ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА»**

5–6 декабря 2024 года, г. Минск

Гомель
Редакция газеты «Гомельская праўда»
2024