

УДК 616.2-022:616-071

АНАЛИЗ ЛАБОРАТОРНЫХ ФАКТОРОВ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ИСХОДОВ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19

Голюченко О. А.¹, Скребло Е. И.¹, Жильцов И. В.¹, Головки Е. С.¹,
Скребло В. Э.², Колядко Е. И.¹

¹Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь;

²Учреждение здравоохранения «Витебский областной клинический центр пульмонологии и фтизиатрии», г. Витебск, Республика Беларусь

Реферат. Лабораторная диагностика играет важную роль не только в диагностике COVID-19, но и в оценке прогрессирования и тяжести состояния пациентов. Кроме того, оценка лабораторных параметров во многих случаях позволяет выявить органную дисфункцию на ранней стадии. Нами определена взаимосвязь некоторых лабораторных показателей пациентов с COVID-19 с развитием неблагоприятных исходов данного заболевания. Проводилось исследование показателей иммунограммы, С-реактивного белка, циркулирующих иммунных комплексов, ферритина и показателей общего анализа крови. Показано значение таких факторов риска неблагоприятного исхода COVID-19, как повышение содержания в крови ферритина, С-реактивного белка, нейтрофильных лейкоцитов, а также снижения количества лимфоцитов и моноцитов. Результаты анализа корреляций ряда лабораторных показателей пациентов с исходами заболевания позволяют предположить, что неблагоприятный исход COVID-19 связан с нарушением регуляции иммунно-воспалительного ответа.

Ключевые слова: COVID-19, исходы, лабораторные показатели, ферритин, общий анализ крови.

Введение. Коронавирусная инфекция — COVID-19 (от англ. COrona VIrus Disease 2019) — потенциально тяжелая острая респираторная инфекция, вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2.

COVID-19 представляет собой системное заболевание, поражающее широкий спектр тканей и органов. У инфицированных пациентов наблюдается чрезвычайно вариабельное клиническое течение. Заболевание протекает главным образом в форме легкой формы острой респираторной вирусной инфекции, но может протекать и в тяжелой форме, специфические осложнения которой могут включать вирусную пневмонию, влекущую за собой острый респираторный дистресс-синдром или дыхательную недостаточность с риском фатального исхода. Септический шок и вторичные бактериальные инфекции являются частыми осложнениями у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии [1].

Лабораторные методы играют важную роль не только в диагностике заболевания, но и в оценке прогрессирования и тяжести состояния этих больных. Кроме того, лабораторная диагностика во многих случаях позволяет выявить органную дисфункцию на ранней стадии.

Новая коронавирусная инфекция все еще является предметом пристального внимания.

Важное и активно разрабатываемое направление связано с изучением роли различных биологических маркеров в оценке тяжести и вероятности неблагоприятного течения и прогноза заболевания [2]. Данная информация важна не только для определения показаний к госпитализации пациентов в учреждение здравоохранения или в отделения реанимации и интенсивной терапии, но и для выработки лечебной тактики и оценки ее эффективности.

Цель работы — выявление взаимосвязи некоторых лабораторных показателей пациентов с COVID-19 с развитием неблагоприятных исходов данного заболевания.

Материалы и методы. Нами ретроспективно проанализированы некоторые результаты лабораторного обследования пациентов с COVID-19, находившихся на лечении в ГУЗ «Витебская городская центральная клиническая больница» с апреля по ноябрь 2020 г. Всего обследовано 132 пациента (58 мужчин, 74 женщины) с установленным диагнозом «COVID-19, внегоспитальная интерстициальная пневмония», подтвержденным положительным результатом тестирования в ПЦР и данными компьютерной томографии органов грудной клетки. Степень тяжести пневмонии варьировала от средней до тяжелой. Средний возраст обследованных составил $60,3 \pm 13,1$ лет.

Проводилось исследование показателей иммунограммы, С-реактивного белка (СРБ), циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), ферритина и показателей общего анализа крови. Материалом для исследования служила периферическая венозная кровь, полученная натощак. Функциональную активность нейтрофилов оценивали по способности к поглощению микроорганизмов и продукции активных форм кислорода. Выработку нейтрофилами активных форм кислорода изучали в реакции базального и стимулированного зимозаном теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ_б и НСТ_с соответственно) с микроскопической оценкой в окрашенных мазках процентного содержания диформазан-положительных гранулоцитов. Для характеристики функционального резерва лейкоцитов рассчитывали индекс респираторного резерва (ИРР) по формуле $ИРР = (НСТ_с - НСТ_б) / НСТ_с$.

Поглотительную способность нейтрофилов определяли в реакции фагоцитоза с использованием суспензии окрашенного зимозана с последующим приготовлением мазков и оценкой фагоцитарного индекса (ФИ) и фагоцитарного числа (ФЧ). Иммуноглобулины (IgA, IgM, IgG) в сыворотке крови определяли иммунотурбидиметрическим методом ($CV < 2\%$). Содержание ЦИК оценивали методом преципитации полиэтиленгликолем. Уровень ферритина и СРБ определяли методом иммунотурбидиметрии с использованием реактивов ООО «Арвитмедика» и биохимического анализатора BS-300.

Количество лейкоцитов, процентное и абсолютное содержание лимфоцитов определяли в стандартном общем анализе крови с помощью гематологического анализатора Sysmex 350 и визуального подсчета лейкоцитарной формулы в препарате с окрашиванием по Паппенгейму.

Статистический анализ проводился с использованием программы Statistica 12. Исполь-

зованы методы непараметрической статистики (U-тест Манна — Уитни для выявления статистической значимости различий количественных признаков, тест по критерию хи-квадрат для выявления статистической значимости различий долей, частот и отношений, а также корреляционный анализ Спирмена). Центральная тенденция и разброс значений анализируемых показателей выражены в виде медианы, первого и третьего квартилей.

Результаты и их обсуждение. При оценке исследуемых показателей нами установлены статистически значимые различия у умерших и выживших пациентов в значениях СРБ, ферритина, относительного содержания нейтрофильных (палочкоядерных и сегментоядерных) лейкоцитов, моноцитов и лимфоцитов, а также абсолютного содержания моноцитов и лимфоцитов крови (таблица 1). Всего за период наблюдения от COVID-19 умерло 10 пациентов (6 мужчин и 4 женщины), средний возраст умерших составил $66,1 \pm 13,3$ лет.

Выявленные различия (более высокие уровни ферритина, СРБ, нейтрофильных лейкоцитов, более низкие — лимфоцитов и моноцитов у умерших пациентов) согласуются с литературными данными о факторах неблагоприятного прогноза COVID-19.

COVID-19 — системная инфекция, оказывающая значительное влияние на кроветворную систему и систему гемостаза. У пациентов с COVID-19 количество лейкоцитов может варьировать между лейкопенией, лейкоцитозом и лимфопенией, хотя лимфопения встречается чаще [3]. Лимфопения является одним из самых показательных проявлений этой инфекции и обладает прогностическим потенциалом.

Нами установлено, что как абсолютное, так и относительное количество лимфоцитов у умерших пациентов было статистически значимо ниже по сравнению с выжившими, что

Таблица 1 — Значения некоторых лабораторных показателей у умерших и выживших пациентов с COVID-19

Показатель	Умершие ($n = 10$)	Выжившие ($n = 122$)	p^*
СРБ (мг/л)	130,3 (74,4; 175,9)	35,0 (7,15; 117)	0,005
Ферритин (мкг/л)	1656 (787; 2897,5)	305 (131; 756)	0,001
Сегментоядерные лейкоциты (%)	86 (75; 87)	70,5 (62; 79,5)	0,02
Моноциты (%)	2 (1; 3)	4 (2; 6,5)	0,03
Моноциты, абс. ($10^9/л$)	0,202 (0,098; 0,28)	0,32 (0,24; 0,41)	0,025
Нейтрофильные лейкоциты (%)	94 (88; 95)	84 (77; 90)	0,004
Лимфоциты (%)	5 (3; 7)	11 (5,5; 16)	0,025
Лимфоциты, абс. ($10^9/л$)	0,42 (0,3; 0,62)	0,85 (0,48; 1,54)	0,007

* Указан уровень статистической значимости различий соответствующих признаков.

согласуется с данными литературы. Также могут иметь прогностическую ценность при выявлении тяжелого течения заболевания отношение нейтрофилов к лимфоцитам и пиковое отношение тромбоцитов к лимфоцитам.

Этиология и механизмы лимфопении у пациентов с COVID-19 неизвестны, но вирусные частицы, подобные SARS, и РНК SARS-CoV2, были обнаружены в Т-лимфоцитах, что свидетельствует о прямом воздействии вируса на Т-клетки, возможно, посредством апоптоза.

Цитотоксические Т-лимфоциты и естественные клетки-киллеры (NK) важны для контроля над вирусной инфекцией, а функциональное истощение цитотоксических лимфоцитов может увеличить тяжесть заболевания. У пациентов с COVID-19 общее количество NK и цитотоксических Т-лимфоцитов снижается параллельно с истощением их функции и усилением регуляции NK-ингибирующего рецептора CD94/NK-группы 2 члена А (NKG2A). После успешного выздоровления пациентов с COVID-19 количество NK и CD8+ Т-клеток восстанавливалось при сниженной экспрессии NKG2A. Кроме того, у пациентов с COVID-19 наблюдается более низкий процент CD107a + NK, IFN- γ + NK, IL-2+ NK и TNF- α + NK-клеток [4].

Согласно литературным данным лимфопения сопровождается клинические проявления заболеваний с выраженным системным повышением провоспалительных цитокинов, которое также можно назвать «цитокиновым штормом» [3].

Одним из привлекающих к себе внимание биомаркеров является ферритин, концентрация которого в крови при тяжелом течении COVID-19 значительно повышается. Хорошо известно, что в организме человека ферритину присущи специфические физиологические функции: с одной стороны, он обеспечивает депонирование железа, а с другой — его, наряду с СРБ, рассматривают в качестве острофазового белка воспаления. Ферритин вырабатывается в клетках различных органов, поэтому деструкция тканей при воспалении может явиться одной из причин роста уровня сывороточного ферритина.

В качестве отличительного признака «гиперферритинемических синдромов» высокий уровень циркулирующего ферритина обнаруживается при четырех заболеваниях, включая синдром активации макрофагов, болезнь Стилла у взрослых, катастрофический антифосфолипидный синдром и септический шок. В не-

которых источниках указано, что ферритин является независимым фактором риска тяжести заболевания у пациентов с COVID-19. Однако связь ферритина и смертности у пациентов на настоящий момент не ясна.

Как и многие провоспалительные цитокины, ферритин секретируется и высвобождается макрофагами *in vivo*. В клетках ферритин может стимулировать провоспалительные пути, что приводит к активации фактора транскрипции ядерного фактора каппа-В, что может повышать экспрессию нижестоящих провоспалительных медиаторов и других белков-мишеней. Кроме того, тяжелая субъединица ферритина может непосредственно увеличивать экспрессию генов некоторых провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкины IL-1 β , IL-6, IL-12, фактор некроза опухоли α и NOD-подобный рецептор 3. В этом отношении существует порочный круг между ферритином и цитокинами [5].

Нами установлено, что у пациентов, умерших от COVID-19, уровень ферритина был в 5,4 раза выше по сравнению с выжившими ($p = 0,001$), что может свидетельствовать о том, что ферритин играет значимую роль в патогенезе инфекции SARS-CoV-2 и может служить ценным прогностическим маркером для прогнозирования исходов заболевания.

СРБ, вырабатываемый в печени, является основным лабораторным маркером активности воспалительного процесса, в том числе в легочной ткани, коррелируя с объемом поражения и тяжестью течения заболевания. Так, отмечено, что концентрация СРБ увеличивается одновременно с повышением уровней интерлейкина-6 (ИЛ-6) и скорости оседания эритроцитов (СОЭ), но в разной степени. Кроме того, хорошо известно, что уровни СРБ намного выше при бактериальных инфекциях, чем при вирусных.

При анализе полученных нами данных выявлено повышение содержания СРБ в 3,7 раза у пациентов, умерших от COVID-19, в сравнении с выжившими, что подтверждается литературными данными, указывающими на предиктивную роль данного биомаркера (отражает тяжесть и распространенность воспалительного процесса, может рассматриваться как фактор риска прогрессирования COVID-19), а также его взаимосвязь с исходами (описано 10-кратное повышение СРБ у умерших пациентов) [6].

Кроме того, нами проведен корреляционный анализ с вычислением коэффициентов корреляции Спирмена для ряда лабораторных пока-

зателей. Выявлено, что у умерших и выживших пациентов имелись существенные различия. Так, у выздоровевших пациентов сывороточные концентрации IgG статистически значимо ($p < 0,05$) коррелировали с абсолютным и относительным содержанием моноцитов крови ($r = 0,53$ и $0,52$ соответственно). У умерших таких взаимосвязей не наблюдалось, сывороточные концентрации IgG статистически значимо ($p < 0,05$) коррелировали с содержанием лейкоцитов крови, абсолютным и относительным содержанием сегментоядерных нейтрофилов, а также с абсолютным содержанием нейтрофильных (палочко- и сегментоядерных) лейкоцитов крови ($r = 0,81, 0,93, 0,87$ и $0,82$ соответственно). Выявленные различия, как и более низкие значения абсолютного количества моноцитов крови могут свидетельствовать о более длительном сохранении остроты воспалительного процесса у пациентов с неблагоприятным исходом, поскольку нарастание уровня IgG происходит позже, чем IgM.

Помимо этого, у выживших пациентов имелись статистически значимые ($p < 0,05$) корреляции средней силы между уровнями СРБ и ферритина ($r = 0,5$), СРБ и абсолютного числа палочкоядерных лейкоцитов крови ($r = 0,5$), т. е. факторы, отражающие выраженность воспаления, были взаимосвязаны и менялись однонаправленно. У умерших пациентов не выявлено статистически значимых корреляций маркеров воспаления друг с другом и с количеством клеток крови. Это может свидетельствовать о разбалансировке регуляции воспалительного процесса. Кроме того, можно сделать вывод, что у пациентов с неблагоприятным исходом показатели общего анализа крови, в том числе лейкоцитарной формулы, не отражают тяжесть воспалительного процесса.

У умерших IgM статистически значимо ($p < 0,05$) обратно коррелировал с уровнем ферритина ($r = -0,89$), что может быть обусловлено подавлением гуморального иммунного ответа на фоне выраженной воспалительной реакции при тяжелом течении COVID-19: низкие уровни IgM у пациентов с тяжелым течением данного заболевания были описаны некоторыми авторами, причем согласно источнику [7] снижение концентрации IgM у пациентов с тяжелыми формами COVID-19 может быть врожденной особенностью их иммунного ответа и сильным независимым предиктором неблагоприятного исхода.

У умерших пациентов при корреляционном анализе выявлены средней силы отрицательные взаимосвязи показателя бактерицидной активности фагоцитирующих клеток (НСТ-спонтанный) и абсолютных, и относи-

тельных значений эозинофильных лейкоцитов крови ($r = -0,74$), а также прямые корреляции средней силы между функциональным резервом нейтрофилов и показателями фагоцитоза (ФИ и ФЧ) ($r = 0,71$ и $0,68$ соответственно). Наблюдалась также сильная корреляция показателя функционального резерва нейтрофилов и уровня тромбоцитов крови ($r = 0,81$). Данные изменения могут указывать на большую интенсивность воспаления, в том числе вызванного присоединением бактериальной инфекции, а также об истощении системы фагоцитоза, и могут рассматриваться как предикторы неблагоприятного исхода у пациентов с COVID-19.

При оценке взаимосвязи клеток иммунной системы с другими показателями крови выявлено, что у выживших пациентов наблюдалась лишь средней силы статистически значимая обратная корреляция относительного содержания В-лимфоцитов и тромбоцитов крови ($r = -0,6$). Умершие пациенты характеризовались сильными обратными корреляциями уровней В-лимфоцитов с абсолютным содержанием лимфоцитов крови ($r = -0,79$), что может свидетельствовать о выходе в периферическую кровь CD 19+ (незрелых, наивных) В-лимфоцитов за счет раздражения лимфоцитарного ростка. Выявлены также сильные прямые корреляции В-лимфоцитов и показателей спонтанного и индуцированного НСТ-теста ($r = 0,77$ и $0,76$ соответственно).

Интересным представляется тот факт, что у умерших пациентов, в отличие от выживших ($r = 0,8$), теряется прямая корреляция показателей гемоглобина и эритроцитов на фоне отсутствия статистически значимых различий этих лабораторных показателей в группах сравнения.

Вероятно, возраст умерших пациентов также явился фактором, существенно повлиявшим на регуляцию иммунного ответа. Так, в отличие от выживших пациентов, у умерших наблюдались корреляции возраста и уровня Тх ($r = 0,7$), Тс ($r = -0,76$), ИРИ ($r = 0,79$), ЦИК ($r = 0,65$), концентрации ферритина ($r = -0,72$), количества тромбоцитов ($r = -0,84$).

Заключение. Таким образом, оценка лабораторных параметров у пациентов с пневмонией, ассоциированной с COVID-19, является чрезвычайно важной и необходимой составляющей лечебно-диагностического процесса, поскольку позволяет оценить не только тяжесть заболевания, но и его прогноз.

Исходя из результатов проведенного исследования, можно сформулировать следующие выводы:

1. Значимыми факторами риска неблагоприятного исхода COVID-19 являются такие лабораторные сдвиги, как повышение содержания ферритина, СРБ, нейтрофильных лейкоцитов в крови, а также падение количества лимфоцитов и моноцитов.

2. Неблагоприятный исход COVID-19, вероятно, связан с нарушением регуляции иммуно-воспалительного ответа, что подтверждается разнонаправленными сдвигами лабораторных показателей пациентов и особенностями корреляций этих показателей с исходом заболевания.

Список цитированных источников

1. Marini, J. J. Management of COVID-19 respiratory distress / J. J. Marini, L. Gattinoni // JAMA. — 2020. — Vol. 323. — P. 2329–2330.
2. Immunogenetic Predictors of Severe COVID-19 / A. Malkova [et al.] // Vaccines. — 2021. — №9. — P. 211.
3. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study / X. Yang [et al.] // Lancet Respir Med. — 2020. — Vol. 8. — P. 475–481. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5.
4. Visualizing priming of virus-specific CD8+ T cells by infected dendritic cells in vivo / C. C. Norbury [et al.] // Nat. Immunol. — 2002. — Vol. 3. — P. 265–271. DOI: 10.1038/ni762.
5. Colafrancesco, S. COVID-19 gone bad: a new character in the spectrum of the hyperferritinemic syndrome? // S. Colafrancesco, C. Alessandri, F. Conti, R. Priori // Autoimmun Rev. — 2020. — Vol. 19. — P. 102573. DOI: 10.1016/j.autrev.2020.102573.
6. C-reactive protein correlates with computed tomographic findings and predicts severe COVID-19 early / C. Tan [et al.] // J. Med. Virol. — 2020. — Vol. 92(7). — P. 856–862.
7. Assessment of severity and mortality of COVID-19 with anti-A1 and anti-B IgM isohaemagglutinins, a reflection of the innate immune status / F. Ozcelik [et al.] // Int. J. Clin. Pract. — 2021. — Vol. 75 (11). — P. e14624.

Analysis of laboratory factors of adverse outcomes in patients with COVID-19

*Haliuchenka V. A.¹, Screblo Ye. I.¹, Zhyltsou I. V.¹, Golovko Ye. S.¹,
Screblo V. E.², Kalyadka Ye. I.¹*

¹*Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus;*
²*Health Care Institution "Vitebsk Regional Clinical Center for Pulmonology and Phthisiology",
Vitebsk, Republic of Belarus*

Laboratory diagnostics plays an important role not only in the diagnosis of COVID-19, but also in assessing the progression and severity of the patient's condition. In addition, the assessment of laboratory parameters in many cases makes it possible to detect organ dysfunction at an early stage. We have determined the relationship of some laboratory parameters of patients with COVID-19 with the development of adverse outcomes of this disease. Immunogram parameters, C-reactive protein, circulating immune complexes, ferritin and parameters of the common blood test were studied. The significance of such risk factors for an unfavorable outcome of COVID-19 as an increase in the content of ferritin, C-reactive protein, neutrophilic leukocytes in the blood, as well as a decrease in the number of lymphocytes and monocytes has been shown. Conducting a correlation analysis for a number of laboratory parameters of patients allowed us to suggest that the unfavorable outcome of COVID-19 is associated with a dysregulation of the immune-inflammatory response.

Keywords: COVID-19, outcomes, laboratory tests, ferritin, common blood test.

Поступила 02.06.2022