

УДК 616.988 – 06:612.017.11

DOI: 10.14427/jipai.2021.4.28

## Система клеточного иммунитета у больных с постковидным синдромом

Н.С. Асфандиярова, В.Г. Демихов, Е.Ю. Яковлева, Е.П. Акимова

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

### Cell-mediated immunity in patients with post-covid syndrome

N.S. Asfandiayarova, V.G. Demikhov, E.Yu. Yakovleva, E.P. Akimova

Ryazan State Medical University

#### Аннотация

*Цель:* изучить состояние системы клеточного иммунитета при постковидном синдроме.

*Материал и методы:* обследовано 278 больных, перенесших Ковид-19 в легкой, средне-тяжелой или тяжелой форме. Все больные прошли анкетирование, а также, при необходимости, были обследованы у врачей различных специальностей. Больные были разделены на 2 группы в зависимости от степени тяжести течения заболевания в острый период и длительности проявлений постковидных симптомов (до 12 недель и более). Состояние клеточного иммунитета оценивали с помощью реакции бласттрансформации лимфоцитов периферической крови (морфологический метод оценки реакции) в ответ на фитогемагглютинин. Также определялась активность клеток, синтезирующих циклооксигеназу. Контрольная группа включала 200 практически здоровых человек аналогичного пола и возраста, не вакцинированных и не болевших коронавирусной инфекцией.

*Результаты:* установлено снижение пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на фитогемагглютинин у пациентов, перенесших Ковид-19 как в легкой ( $51,4 \pm 1,1\%$ ,  $p < 0,01$ ), так и в тяжелой форме ( $49,3 \pm 1,2\%$ ,  $p < 0,001$ ), более выраженное у последних в первые три месяца после острого периода заболевания ( $p < 0,001$ ). Во всех группах отмечается повышение активности клеток, синтезирующих циклооксигеназу, обуславливающих воспаление, более выраженное у пациентов, перенесших тяжелую форму Ковид-19.

*Заключение:* пролиферативная активность лимфоцитов периферической крови у лиц, перенесших коронавирусную инфекцию, снижена как в период до 12 недель, так и далее. Особенно это выражено у пациентов, перенесших тяжелые формы Ковид-19. Во всех группах отмечено увеличение активности клеток, синтезирующих циклооксигеназу, играющую роль в развитии воспаления и, возможно, определяющих прогрессивность течения.

*Конфликт интересов* отсутствует.

#### Summary

*Aim:* to study the investigate of the cell-mediate immunity in post-COVID syndrome.

*Material and Methods:* 278 patients with mild, moderate or severe Covid-19 in acute period with post-COVID syndrome were examined. All patients were questioned, and, if necessary, were examined by doctors of various specialties. The patients were divided into 2 groups depending on the severity of the course of the disease in the acute period and the duration of manifestations of post-COVID symptoms (up to 12 weeks or more). The state of cell-mediated immunity was assessed using the reaction of blast transformation of peripheral blood lymphocytes (morphological method for evaluating the reaction) in response to PHA. The activity of cells synthesizing cyclooxygenase was also determined. The control group included 200 practically healthy people of the same sex and age, who were not vaccinated and did not have a coronavirus infection.

*Results:* a decrease in the proliferative activity of lymphocytes in response to PHA was found in patients who underwent Covid-19, both in mild ( $51,4 \pm 1,1\%$ ,  $p < 0,01$ ) and severe ( $49,3 \pm 1,2\%$ ,  $p < 0,001$ ), more pronounced in the latter in the first three months after the acute period of the disease ( $p < 0,001$ ). In all groups, there is an increase in the activity of cells synthesizing cyclooxygenase, which causes inflammation, which is more pronounced in patients who have had a severe form of Covid-19.

*Conclusion:* The proliferative activity of peripheral blood lymphocytes in people who have had a coronavirus infection is reduced, both in the period up to 12 weeks and beyond; this is especially pronounced in patients who have had severe forms of Covid-19. In all groups, an increase in the activity of cells synthesizing cyclooxygenase, which plays a role in the development of inflammation, and possibly determines the progression of the course, was noted.

## Ключевые слова

Коронавирусная инфекция, постковидный синдром, клеточный иммунитет, активность клеток, синтезирующих циклооксигеназу.

## Введение

Широкое распространение коронавирусной инфекции (Ковид-19), возникшей в Китае в конце 2019 года, привело к появлению не только медицинских, но и тяжелых социально-экономических проблем. Последствия перенесенного заболевания также создают проблемы пациентам в связи с развитием постковидного синдрома (ПКС), который снижает качество жизни и не позволяет полноценно выполнять свою работу. Высокая частота встречаемости ПКС, его длительность, отсутствие единства взглядов на его патогенез определяют интерес исследователей к проблеме.

Несмотря на значительное число публикаций, посвященных коронавирусной инфекции, патогенез заболевания и в настоящее время вызывает множество вопросов [1, 2, 3]. Остается неясным, почему одни пациенты переносят заболевание в легкой форме, другие в тяжелой, а порой и умирают. Возможно, это разнообразие клинических проявлений и последствий обусловлено состоянием системы иммунитета. В настоящее время предположена роль клеточного иммунитета в развитии коронавирусной инфекции, и тяжесть течения, возможно, определяется именно им, а не уровнем антител [4, 5]. Доказано, что и в условиях отсутствия сероконверсии возможно выздоровление благодаря участию специфического клеточного иммунитета [6]. Все это доказывает важность клеточного иммунитета в развитии Ковид-19 [7]. Однако, как эти изменения влияют на патогенез ПКС, что происходит с системой иммунитета в этот период, как это сопоставляется с клиническими проявлениями ПКС, и отражается ли тяжесть течения в острый период на течении ПКС остается неясным. Немногочисленные исследования, посвященные изучению системы клеточного иммунитета у больных с ПКС, свидетельствуют о снижении пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови, особенно при тяжелом течении [8], снижении численности основных клеток в ранний период реконвалесценции [9], отсутствии восстановления функции Т-лимфоцитов в этот период [10], дисрегуляции иммунной системы

## Keywords

Coronavirus infection, post-covid syndrome, cell-mediated immunity, activity of cells synthesizing cyclooxygenase.

[11, 12]. Весьма важным является и тот факт, что большинство исследований проведено в период реконвалесценции, при этом не сообщается о наличии ПКС, хотя, учитывая высокий процент его развития, это и не исключается.

Отсутствие единства взглядов на состояние иммунной системы при ПКС, единичные исследования, посвященные данной теме, и определили основную цель настоящего исследования: изучить состояние системы клеточного иммунитета при постковидном синдроме.

## Материал и методы

Согласно поставленной цели были сформулированы основные задачи настоящего исследования: определить состояние системы клеточного иммунитета у пациентов, перенесших Ковид-19 с признаками ПКС, в зависимости от степени тяжести течения заболевания в острый период, а также от времени, прошедшего после перенесенной инфекции, определить причину прогрессивности патологического процесса.

## Дизайн исследования

Для решения поставленных задач с 08.12.2020 г по 17.12.2021 г. было обследовано 278 больных, перенесших Ковид-19 в легкой, средне-тяжелой или тяжелой форме в период с марта 2020 г. по ноябрь 2021 г. Диагноз заболевания в острый период был подтвержден либо обнаружением РНК SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2 – новый коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома-2) при взятии мазка из носоглотки (метод полимеразной цепной реакции), либо обнаружением антител класса IgM в острый период или IgG в период реконвалесценции (метод иммуноферментного анализа). Из них 67 мужчин и 211 женщин в возрасте 18-85 лет. Все больные прошли анкетирование, а также, при необходимости, были обследованы у врачей различных специальностей (кардиологов, пульмонологов, гастроэнтерологов, эндокринологов и пр.).

Вопросы анкеты включали следующие пункты: пол; возраст; срок, прошедший после коронавирусной инфекции; диагноз в острый период заболевания; каким методом был подтвержден

диагноз коронавирусной инфекции в острый период заболевания; проведенное лечение (противовирусные препараты, антибиотики, глюкокортикостероидные гормоны, антикоагулянты, др.); наличие коморбидной патологии; жалобы пациентов, продолжающиеся до трех и более месяцев после заболевания (общая слабость, проблемы с памятью, головная боль, бессонница, одышка, кашель, боль в грудной клетке, температура, сердцебиение, повышение АД, боли в сердце, миалгия, артралгия, проблемы с печенью, почками, алопеция, аносмия/дисгевзия и пр.). Пациенты с ПКС прошли тщательное клиническое, лабораторное и инструментальное исследование у врачей, к которым они обращались по поводу имеющихся жалоб.

Пациенты были разделены на 2 группы по степени тяжести течения Ковид-19 в острый период: с легким течением заболевания (заболевание протекало в виде ОРВИ, большинство пациентов не было госпитализировано, N148) и средне-тяжелым и тяжелым течением заболевания (заболевание протекало в виде пневмонии, результаты компьютерной томографии 25-80% поражения легких, большинство пациентов были госпитализированы, N130).

По предложению ВОЗ, постковидный синдром определяется как симптомокомплекс, развившийся во время или после заболевания, вызванного новой коронавирусной инфекцией, продолжающийся более 12 недель и не являющийся следствием альтернативного диагноза. Больных с клиническими проявлениями, у которых симптомы продолжались до 12 недель, были отнесены к группе с так называемым «post-acute COVID-19 syndrome». Данный термин был предложен рядом авторов для больных, у которых проявления, характерные для ПКС, продолжались менее 12 недель [13]. Не исключено, что эти больные составляют группу больных с так называемыми остаточными явлениями после перенесенного заболевания, развитие которых характерно для большинства инфекционных заболеваний.

В связи с вышеизложенным, больных разделили на 2 группы по длительности проявлений ПКС: 105 пациентов были обследованы с клиническими проявлениями до 12 недель после острого периода заболевания (ОРВИ – 58 больных, пневмония – 47 больных) и 173 пациента исследовали через 12 недель после заболевания (от 3 мес до года после перенесенной инфекции) (ОРВИ – 90 больных, пневмония – 83 пациента).

Контрольная группа включала 200 практически здоровых человек аналогичного пола и возраста, не вакцинированных и не болевших коронавирусной инфекцией.

Для оценки состояния системы клеточного иммунитета использовали реакцию бласттрансформации лимфоцитов. Проводился подсчет морфологически измененных клеток под влиянием неспецифического митогена фитогемагглютинаина (ФГА П, ООО НПП «ПанЭко», М022, Серия 91/1). Одновременное добавление к культуре клеток ФГА и индометацина (SOPHARMA AD, Болгария), являющегося ингибитором синтеза циклооксигеназы, позволяла оценить активность клеток, подавляющих пролиферативную реакцию лимфоцитов в ответ на ФГА и дающую информацию о наличии воспаления [14]. В качестве контроля использовали физиологический раствор и индометацин. Клетки культивировались при температуре 37° в течение 72 час. Отношение процента переходных и бластных клеток в культуре с ФГА и индометацином к культуре клеток без индометацина свидетельствовало об активности клеток, синтезирующих циклооксигеназу (КС ЦОГ). У практически здоровых лиц этот показатель находится в пределах  $1,0 \pm 0,2$ .

Антитела (IgM, IgG) к коронавирусной инфекции определяли методом иммунофлуоресцентного анализа.

Исследование было двойным, слепым, рандомизированным. Статистическая обработка результатов (структурный анализ, корреляционный анализ, t-тест) проводилась с использованием пакета программ Statistica 8.0. Различия в группах считали достоверными при уровне значимости менее 5% ( $p < 0,05$ ). Результаты исследования представлены в виде их средних значений  $\pm$  ошибка среднеквадратичного отклонения.

## Результаты и обсуждение

Результаты полученных исследований представлены в таблице 1.

Исследование пролиферативной активности лимфоцитов в первые три месяца после перенесенного заболевания свидетельствуют о более выраженных нарушениях у пациентов, перенесших пневмонию, однако и у больных, перенесших легкую форму, отмечается снижение показателей клеточного иммунитета (табл. 1). Трактовать эти результаты можно двояко: с одной стороны, незначительное снижение показателей клеточного иммунитета у пациентов с ОРВИ, возможно, и определяют более легкое

**Таблица 1. Показатели системы клеточного иммунитета больных, перенесших коронавирусную инфекцию (M±m)**

	ОРВИ		Пневмония	
	post-acute COVID-19 syndrome <3 мес	Постковидный синдром >3 мес	post-acute COVID-19 syndrome <3 мес	Постковидный синдром >3 мес
Реакция бласттрансформации лимфоцитов периферической крови на ФГА у пациентов, перенесших Ковид-19 (%)	53,3±1,2*	51,4±1,1***	46,5±1,5***	49,3±1,2***
Реакция бласттрансформации лимфоцитов периферической крови на ФГА у лиц контрольной группы (%)	56,6±1,1			
Индекс стимуляции КС ЦОГ пациентов, перенесших Ковид-19	1,1±0,01***	1,1±0,03**	1,2±0,03***	1,2±0,02***
Индекс стимуляции КС ЦОГ лиц контрольной группы	1,0±0,02			

Примечание: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 при сравнении с контрольной группой.

течение в острый период, а более выраженные изменения у пациентов с пневмонией привели к более тяжелому течению заболевания. Но, с другой стороны, тяжелое течение заболевания привело к использованию и более агрессивного лечения (глюкокортикостероидных гормонов, антибиотиков, способствующих развитию дисбактериоза кишечника, оказывающих иммунодепрессивный эффект); не следует исключать и наличие гипоксемии, сопровождающей пневмонию, а также депрессивного состояния этих пациентов, влияющего на иммунную систему [3]. Мы полагаем, что оба фактора играют роль как в определении тяжести течения заболевания в острый период, так и в определении тяжести развития последствий. Частота клинических проявлений постковидного состояния также более выражена у больных с пневмонией. Отмечается и четко выраженная прямая связь между количеством симптомов, составляющих ПКС, и уровнем пролиферации лимфоцитов периферической крови: чем ниже клеточный иммунитет, тем тяжелее течение ПКС.

Rank et al. [15] сообщают об отсутствии иммунодефицита у пациентов, перенесших легкую форму Ковид-19, однако авторы не проводили дифференциации пациентов по наличию остаточных явлений или т.н. «post-acute COVID-19 syndrome» у реконвалесцентов. Различия результатов может быть обусловлено и тем, что в настоящем исследовании использовался метод оценки функциональной активности лимфоцитов, а он более достоверно оценивает состояние клеточного иммунитета, чем количественный

метод. У пациентов, перенесших более тяжелые формы, как и в нашем исследовании, отмечаются более выраженные изменения клеточного иммунитета [8, 16].

Учитывая более высокие показатели клеток, синтезирующих ЦОГ и определяющих наличие воспаления, можно предположить, что именно это и является причиной развития остаточных явлений у пациентов с ПКС через три и более месяца после перенесенного острого заболевания. При этом у больных, перенесших пневмонию, активность этих клеток выше, чем у больных после ОРВИ. Вызывает интерес тот факт, что и через 3 мес и более активность КС ЦОГ в обеих группах не снижается, что, возможно, и определяет прогрессивность течения ПКС. При этом, несмотря на некоторый рост пролиферативной активности лимфоцитов у больных с ПКС после пневмонии, она не достигает показателей контрольной группы. Высокая активность клеток, синтезирующих ЦОГ, сохраняется и у пациентов, перенесших ОРВИ. Kennedy A.E. et al. [17] отмечают увеличение уровня СРБ у пациентов через 1-3 мес после легкой формы Ковид-19. Продолжающееся воспаление, возможно, обусловлено увеличением количества провоспалительных цитокинов [8]. Однако, авторы наблюдали за больными только 2 недели после коронавирусной инфекции, поэтому возможно только предположение, что и в дальнейшем провоспалительные цитокины определяют воспаление.

Снижение пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови ассоциируется



с более тяжелым течением постковидного синдрома: отмечается увеличение числа симптомов, составляющих ПКС, поэтому возникает вопрос, а что же определяет иммунодепрессию клеточного иммунитета? Учитывая значение наличия полиморбидной патологии, обуславливающей тяжесть течения патологического процесса [18], больные были разделены на группы без полиморбидной патологии и с наличием полиморбидной патологии. Исследование пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови свидетельствует, что именно при полиморбидной патологии, где системе иммунитета принадлежит важная роль в генезе патологического процесса, наблюдается иммунодепрессия, при этом снижение пролиферативной активности лимфоцитов более выражено у больных, перенесших пневмонию. Таким образом, полиморбидная патология, в генезе которой в той или иной мере принимает участие система иммунитета, определяет тяжесть развития остаточных явлений и постковидного синдрома и обусловлена наличием иммуноде-

фицита по клеточному типу, что проявляется в снижении пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови.

### Выводы

1. Пролиферативная активность лимфоцитов периферической крови у лиц, перенесших коронавирусную инфекцию, снижена как в период до 12 недель, так и далее; особенно это выражено у пациентов, перенесших тяжелые формы Ковид-19 (средне-тяжелая и тяжелая пневмония). Отмечается прямая зависимость между тяжестью проявления постковидного синдрома и снижением реакций клеточного иммунитета.
2. Вне зависимости от тяжести течения заболевания в острый период и времени, прошедшего после него, при постковидном синдроме отмечается увеличение активности клеток, синтезирующих циклооксигеназу, играющую роль в развитии воспаления и, возможно, определяющую прогредиентность течения.

### Литература

1. Бородина И.А., Селезнева И.А., Борисова О.В., и соавт. Группы крови и секреторное состояние при COVID-19. Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2021; 9(4):589-596. Режим доступа: <https://doi.org/10.23888/HMJ202194589-596>.
2. Guihot A., Litvinova E., rigitte Autran B et al. Cell-Mediated Immune Responses to COVID-19 Infection. *Front. Immunol.*, 03 July 2020. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01662>.
3. Lin L., Lu L., Cao W., Li T. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection-a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerg Microbes. Infect.* 2020; 9:727–32. doi: 10.1080/22221751.2020.1746199.
4. Iqbal H. The importance of cell-mediated immunity in COVID-19 – An opinion. *Med Hypotheses*. 2020 Oct; 143: 110152 Published online 2020, Jul 31. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110152
5. Ni L., Cheng M.L., Feng Y. et al. Impaired Cellular Immunity to SARS-CoV-2 in Severe COVID-19 Patients. *Front. Immunol.*, 02 February 2021. Available from: | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.603563>.
6. Kilpeläinen A., Jimenez-Moyano E., Blanch-Lombarte O. et al. Highly functional Cellular Immunity in SARS-CoV-2 Non-Seroconvertors is associated with immune protection bioRxiv. The preprint server for biology. Available from: doi: <https://doi.org/10.1101/2021.05.04.438781>.
7. Montes N., Domènech È., Guerrero S. et al. Analysis of cell-mediated immunity in people with long COVID medRxiv 2021.06.09.21258553. Available from: doi: <https://doi.org/10.1101/2021.06.09.21258553>.
8. Riou C., du Bruyn E., Stek C. et al. Relationship of SARS-CoV-2-specific CD4 response to COVID-19 severity and impact of HIV-1 and tuberculosis coinfection *J Clin Invest.* 2021;131(12):e149125. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI149125>.
9. Hasichaolu X.Z., Xin L. Circulating Cytokines and Lymphocyte Subsets in Patients Who Have Recovered from COVID-19. *BioMed Research International Volume 2020, Article ID 7570981*. Available from: <https://doi.org/10.1155/2020/7570981>.
10. Shuha H.A., Shaw T.N., Knight S.B. et al. Alterations in T and B cell function persist in convalescent COVID-19 patients. *Med (N Y)*. 2021;2(6):720–735.e4 doi: 10.1016/j.medj.2021.03.013.
11. Files J.K., Boppana S., Perez M.D. et al. Sustained cellular immune dysregulation in individuals recovering from SARS-CoV-2 infection. *J. Clin. Invest.* 2021;131(1):e140491. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI140491>.
12. Liu J., Yang X., Wang H. et al. Analysis of the Long-Term Impact on Cellular Immunity in COVID-19-Recovered Individuals Reveals a Profound NKT Cell Impairment. *ASM Journals* 2021;12 (2). DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00085-21>.
13. Nalbandian A., Sehgal K., Gupta A. et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med* 2021;27:601-615. (Electronic resource). Available from: URL: <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01283-z>.
14. Goodwin J.S., Bankhurst A.D., Messner R.P. Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. *J Clin Med.* 1977;146:1719-1734.
15. Rank A., Löhr P., Hoffmann R. et al. Sustained cellular immunity in adults recovered from mild COVID-19. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/348935275\\_Sustained\\_cellular\\_immunity\\_in\\_adults\\_recovered\\_from\\_mild\\_COVID-19](https://www.researchgate.net/publication/348935275_Sustained_cellular_immunity_in_adults_recovered_from_mild_COVID-19) [accessed Jan 06 2022].
16. Kalpakci Y., Hacibekiroglu T., Trak G. et al. Comparative evaluation of memory T cells in COVID-19 patients and the predictive role of CD4+CD8+ double positive T lymphocytes as a new marker *Rev. Assoc. Med. Bras.*

2020.66 (12). Available from: <https://doi.org/10.1590/1806-9282.66.12.1666>.

17. Kennedy A.E., Cook L., Breznik J.A. et al. Lasting Changes to Circulating Leukocytes in People with Mild SARS-Cov-2 Infections. medRxiv. 2021. Available from: doi:10.1101/2021.09.25.21264117.

18. Асфандиярова Н.С., Филиппов Е.В., Дашкевич О.В. и др. Преимущества и недостатки режима самоизоляции в период первой волны коронавирусной инфекции для пациентов с полиморбидной патологией. Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. 2021;29 (3):363-368.

### Сведения об авторах

Асфандиярова Н.С. - доктор медицинских наук, ст. научный сотрудник, доцент кафедры поликлинической терапии, профилактической медицины и общей врачебной практики ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. 390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

Демихов В.Г. - доктор медицинских наук, профессор, директор НКЦ ГОИ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Яковлева Е.Ю. - НКЦ ГОИ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, зав. лабораторией НКЦ ГОИ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Акимова Е.П. - зав. лабораторией ГБУ РО ОКБ (подразделение ГКБ №10).

Поступила 24.12.2021 г.