

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ГОРОДА МОСКВЫ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СКОРОЙ ПОМОЩИ ИМ. Н.В. СКЛИФОВСКОГО ДЕПАРТАМЕНТА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ»

На правах рукописи



Квасников Артем Михайлович

**Прогностическая значимость маркеров воспаления и апоптоза
у пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2**

3.1.12. Анестезиология и реаниматология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор РАН

Попугаев Константин Александрович

доктор медицинских наук

Боровкова Наталья Валерьевна

Москва - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ВИРУСНАЯ ПНЕВМОНИЯ У РЕАНИМАЦИОННОГО ПАЦИЕНТА, ВЫЗВАННАЯ ВИРУСОМ SARS-CoV-2 (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	12
1.1 Этиология и патогенез	12
1.2 Запрограммированная гибель клеток и иммунный ответ	17
1.3 Клиническая картина, степени тяжести COVID-19, особенности тяжелого и крайне тяжелого течения заболевания.....	26
1.4 Маркеры вирусного повреждения	30
1.4.1 С-реактивный белок.....	30
1.4.2 Уровень лейкоцитов и лимфоцитов.....	31
1.4.3. Лактатдегидрогеназа.....	33
1.4.4 Ферритин	34
1.4.5 Д-димер	35
1.4.6 Витамин Д.....	37
1.5 Маркеры апоптоза	38
1.5.1 CD14+HLA-DR+ моноциты –	38
1.5.2 Аннексиновый тест (Ранний и поздний апоптоз).....	40
1.5.3 Проапоптотические белки.....	41
1.5.4 N-концевые киназы c-Jun (JNK)	44
1.5.5 Семейство протеинкиназ В и каспаз	45

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	49
2.1 Общая характеристика клинических наблюдений и дизайн исследования.....	49
2.2 Характеристика методов исследования	56
2.2.1 Клинический метод оценки состояния пациентов	56
2.2.2 Инструментальные методы	57
2.2.3 Лабораторные методы обследования пациентов	58
2.2.4 Методы оценки маркеров апоптоза.....	59
2.2.5 Оценка тяжести состояния по шкалам.....	60
2.2.6 Методы интенсивной терапии	61
2.2.7 Методы статистического анализа.....	66
ГЛАВА 3. СИСТЕМНЫЕ МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ У РЕАНИМАЦИОННЫХ ПАЦИЕНТОВ С ВИРУСНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ, ВЫЗВАННОЙ SARS-CoV-2.	68
3.1 Клинические и лабораторные результаты исследования.....	68
3.2 Клинические и лабораторные результаты исследования среди пациентов с осложненным и неосложнённым течением при исследовании, выполненном на этапе «цитокинового шторма».	75
3.3 Клинические и лабораторные результаты исследования среди пациентов с благоприятным и летальным исходом при исследовании, выполненном на этапе «цитокинового шторма».	82
3.4 Лабораторный комплекс маркеров осложнённого течения и летального исхода	91
3.5 Клинические и лабораторные результаты исследования среди пациентов при исследовании, выполненном на этапе разрешения «цитокинового шторма» (вторая точка исследования).....	92

3.6 Клинические и лабораторные результаты исследования среди пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом при исследовании, выполненном на второй точке исследования.....	95
3.7 Клинические наблюдения, иллюстрирующих три группы пациентов....	101
3.8 Корреляционный анализ клинико-инструментальных показателей между группами пациентов.....	121
ГЛАВА 4. МАРКЕРЫ АПОПТОЗА У РЕАНИМАЦИОННЫХ ПАЦИЕНТОВ С ВИРУСНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ, ВЫЗВАННОЙ SARS-CoV-2.	125
4.1 Результаты исследования показателей апоптоза лимфоцитов и лейкоцитов в венозной крови у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2 на пике «цитокинового шторма».	125
4.2. Результаты исследования показателей апоптоза лимфоцитов и лейкоцитов в венозной крови у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2 на пике «цитокинового шторма» среди пациентов с благоприятным и летальным исходом.....	127
4.3 Результаты исследования показателей апоптоза лимфоцитов и лейкоцитов в венозной крови у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2 на пике «цитокинового шторма» среди пациентов с осложненным и не осложнённым течением.	133
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	137
ВЫВОДЫ	150
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	152
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	154
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	157

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В конце 2019 года произошла вспышка новой коронавирусной инфекции. Всемирная организация здравоохранения охарактеризовала принявшее мировой масштаб распространение болезни как пандемию¹[1]. Коронавирусная инфекция COVID-19 - потенциально жизненно угрожающая инфекция, представляющая собой заболевание, протекающее в тяжёлой форме, приблизительно у 15%–25% и возможностью развития летального исхода в 4%–15% наблюдений [2, 3].

Клиническая картина вирусной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2, включает ухудшение состояния пациентов через 5–12 дней после появления первых симптомов и создает гипотезу о том, что это заболевание обусловлено уникальным паттерном иммунной дисфункции который, вероятно, отличается от других известных вариантов вирусного и бактериального воспаления [4]. Иммунная дисфункция характеризуется IL-6-опосредованной низкой экспрессией человеческого лейкоцитарного антигена D (HLA-DR+) на моноцитах CD14+ и лимфопенией, связанной с устойчивой продукцией цитокинов, гипервоспалением и индукцией апоптоза [5]. На сегодняшний день недостаточно полно изучена прогностическая значимость маркеров воспаления и апоптоза у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2. В связи с этим изучение прогностической значимости маркеров апоптоза и воспаления у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, является актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования

Предотвращение развития осложнений при новой коронавирусной инфекции является основной задачей и предметом многочисленных исследований. Несмотря

¹ WHO. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> [Accessed 13.02. 2023.]

на применение разнообразных шкал и маркеров с целью стратификации риска развития осложнений и неблагоприятного исхода у пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, не разработан достоверный прогностический комплекс маркеров, затрагивающих различные системы иммунного ответа. Большинство авторов использовали отдельные маркеры с целью маршрутизации и определению тактики ведения пациентов, с новой коронавирусной инфекцией, однако, мультисистемного прогностического комплекса маркеров, включающего в себя показатели апоптоза, не было разработано. Отличительной чертой тяжелого течения COVID-19 является лимфопения, наблюдаемая у пациентов, вероятной причиной которой является апоптотическая гибель лимфоцитов. С целью выявления причин развития лимфопении, оптимизации маршрутизации, тактики ведения, и улучшения исходов у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, было выполнено настоящее исследование, в результате которого был разработан прогностический комплекс маркеров, включающий в себя уровни маркеров апоптоза и воспаления.

Цель исследования

Определить диагностическую значимость маркеров воспаления и апоптоза в прогнозировании осложненного течения заболевания и летального исхода у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2.

Задачи исследования

1. Выявить структуру клинически значимых осложнений и причин летального исхода у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2.

2. Определить диагностическую значимость маркеров воспаления в прогнозировании осложненного течения и летального исхода заболевания у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2.

3. Определить диагностическую значимость маркеров апоптоза в прогнозировании осложненного течения и летального исхода заболевания у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2.

4. Провести корреляционный анализ между маркерами апоптоза и воспаления, продемонстрировавших высокую прогностическую значимость развития осложненного течения заболевания и летального исхода, у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2.

5. Создать диагностическую модель, которая на основании комбинации маркеров воспаления и апоптоза, позволит достоверно прогнозировать развитие осложненного течения заболевания и летальный исход у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2.

Научная новизна исследования

На основании результатов комплексного клинико-инструментального исследования, выявлена структура клинически значимых осложнений и причин летального исхода у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2.

Впервые продемонстрированы уровни маркеров апоптоза и воспаления, их динамика при осложненном течении и неосложненном течении, благоприятном исходе и летальном исходе у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2.

Впервые установлен прогностический комплекс маркеров, включающий в себя уровни маркеров апоптоза и воспаления у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2.

Теоретическая и практическая значимость

Практическая значимость проведенного исследования состоит в возможности использования маркеров воспаления и апоптоза в качестве ранней

диагностики осложненного течения и летального исхода заболевания у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2.

С целью оптимизации маршрутизации, тактики ведения, и улучшения исходов у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, сформулированы рекомендации, на основании прогностического комплекса маркеров апоптоза и воспаления.

Разработаны и внедрены в клиническую практику показания для госпитализации в отделение реанимации и интенсивной терапии, показания для патогенетической, антибактериальной и терапии направленной на профилактику тромбоэмболических осложнений, направленные на улучшение качества медицинской помощи и исход заболевания у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2.

Методология и методы исследования

Методологической и теоретической основой диссертационного исследования служили работы отечественных и зарубежных авторов в области реаниматологии, иммунологии, инфекционных болезней, пульмонологии, гематологии. При проведении исследования и изложения материала были применены общенаучные подходы. При изучении способов диагностики COVID-19 у реанимационных пациентов применялись системно-структурные, описательные, статистические методы. Применение указанных методов, а также анализ клинического и статистического материала обеспечили объективность полученных результатов и выводов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Клинически значимыми осложнениями являются: тромбозы вен верхних и/или нижних конечностей (19%), ТЭЛА (4%), клинически значимые геморрагические осложнения (5%), острая сердечно-сосудистая дисфункция (3%),

нозокомиальная бактериальная пневмония (21%), сепсис (10%), полиорганная дисфункция (18%). Непосредственной причиной летального исхода у пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, является: сепсис (57%), тромбоэмболия легочной артерии (28%).

2. На этапе «цитокинового шторма» наиболее высокой прогностической значимостью, свидетельствующей о развитии осложненного течения COVID-19 и летального исхода, обладают следующие маркеры воспаления и апоптоза: ЛДГ, Д-димер, СРБ, CD14+HLA-DR+ моноциты, уровень лимфоцитов на ранней стадии апоптоза и уровень проапоптотического белка BAD.

3. Комбинация СРБ 52-66 мг/л, ЛДГ 296-332 Ед/л, Д-димер 1,4-2,65 мкг/л, CD14+HLADR 55-76,3%, лимфоциты на ранней стадии апоптоза 7,21-4,7% во время «цитокинового шторма» достоверно прогнозирует развитие осложненного течения заболевания. Комбинация СРБ >66мг/л, ЛДГ >332 Ед/л, Д-димер >2,65 мкг/л, CD14+HLADR+ < 55%, лимфоциты на ранней стадии апоптоза <4,7% во время «цитокинового шторма» достоверно прогнозирует развитие летального исхода заболевания. На третьей неделе заболевания летальный исход прогнозируется при значениях ЛДГ более 292 Ед/л, д-димера более 1,95 мкг/л., СРБ более 67 мг/л., фибриногена более 5,48 г/л., прокальцитонина более 1,95 нг/мл.

Внедрение результатов работы в практику

В результате проведенного исследования анализ маркеров воспаления и апоптоза внедрен в рутинную клиническую практику в качестве биомаркеров осложнённого течения и летального исхода новой коронавирусной инфекции в ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н. В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов определяется достаточным объемом выборки пациентов, четкой постановкой цели и задач, использованием современных клинических, инструментальных и лабораторных методов исследования, применением корректных методов статистической обработки данных, соответствующих поставленным задачам.

Материалы диссертационной работы были представлены на ежегодной Всероссийской научно-практической конференции « Кардиология на марше 2022» и 62 сессии ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России.

Публикации

По результатам исследования автором опубликовано 5 научных работ, в том числе, 2 статьи в издании, индексируемом в международной базе Scopus, 1 статья в издании, индексируемом в международной базе Web of Science, 2 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Личный вклад автора

Соискатель разработал дизайн исследования, определил критерии включения в исследование, самостоятельно осуществил набор клинического материала. Автор выполнил работу по систематизации и статистической обработке полученных данных, анализу и интерпретации полученных результатов, а также по подготовке материалов к публикациям. На основании полученных результатов исследования были сформулированы выводы и даны практические рекомендации

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

По теме, методам научного исследования, а также предложенным научным положениям представленная научно-исследовательская работа соответствует паспорту научной специальности 3.1.12. Анестезиология и реаниматология.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 170 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: оглавление, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, 2 главы результатов исследования, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы. Работа проиллюстрирована 62 рисунками и 24 таблицами, 3 клиническими наблюдениями. Список литературы содержит 133 литературный источник (36 отечественных и 97 зарубежных).

ГЛАВА 1. ВИРУСНАЯ ПНЕВМОНИЯ У РЕАНИМАЦИОННОГО ПАЦИЕНТА, ВЫЗВАННАЯ ВИРУСОМ SARS-CoV-2 (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Этиология и патогенез

В конце 2019 года произошла вспышка новой коронавирусной инфекции, возбудителем которой явился - одноцепочечный РНК-содержащий вирус SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2). Всемирная организация здравоохранения охарактеризовала принявшее мировой масштаб распространение болезни как пандемию [1, 2]. Коронавирусная инфекция COVID-19, потенциально жизненно угрожающая инфекция представляет собой заболевание, которое может протекать как в форме острой респираторной вирусной инфекции лёгкого течения, так и в тяжёлой форме, приблизительно у 15%–25% пациентов, а летальный исход развивается в 4%–15% наблюдений [3].

Вирус SARS-CoV-2 относится к царству Riboviria, отряду Nidovirales, подотряду Cornidovirineae, семейству Coronaviridae, подсемейству Orthocoronavirinae, роду Betacoronavirus, подроду Sarbecovirus, виду SARS-coronavirus [6]. К тому же роду, подроду и виду относятся вирусы SARS-CoV и MERS-CoV, вызывающие тяжёлый острый респираторный синдром (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) и ближневосточный респираторный синдром (Middle East Respiratory Syndrome, MERS). Коронавирусы имеют геном в виде одноцепочечной плюс-РНК и подразделяются на 4 рода: α , β , γ и δ [6]. Коронавирусы рода α - и β являются патогенами млекопитающих, а вирусы γ - и δ -поражают млекопитающих и птиц. SARS-CoV-2 относится к группе β -коронавирусов. Вирус SARS-CoV-2 — седьмой из известных коронавирусов, которые могут вызывать заболевания у человека. Из них вирусы α -CoVс HCoV-229E, HCoV-NL63, β -CoVс HCoV-NKU1 и HCoV-OC43 обладают, как правило, низкой патогенностью и вызывают в основном легкие или средней тяжести сезонные респираторные заболевания. Однако, иногда могут вызывать и тяжелые

пневмонии. К роду β -коронавирусов также относят вирусы SARS-CoV-1 и MERS-CoV. Вирус SARS-CoV-1 вызвал вспышку атипичной пневмонии в 2002—2003 гг. а вирус MERS-CoV вызвал вспышку ближневосточного респираторного синдрома в 2012 и последующих годах [7, 8].

Геном вируса SARS-CoV-2 состоит из 14 открытых рамок считывания (ORF), две трети из которых кодируют 16 неструктурных белков (nsr 1–16), составляющих комплекс репликазы [9]. Оставшаяся треть кодирует девять дополнительных белков и четыре структурных белка: шип (S), оболочка (E), мембрана (M) и нуклеокапсид (N), из которых S-белок опосредует проникновение SARS-CoV-2 в клетки-хозяина [9]. Для этого SARS-CoV-2 использует рецептор клеток, которые экспрессируют ангиотензин-превращающий фермент-2 (АПФ-2). АПФ-2 экспрессируется в альвеолоцитах, кардиомиоцитах, холангиоцитах печени, колоноцитах толстой кишки, кератиноцитах пищевода, эпителиальных клетках желудка, подвздошной и прямой кишки, проксимальных канальцев почек, мочевого пузыря. После проникновения вируса в клетку происходит его репликация и высвобождение новых вирионов из инфицированной клетки, которые поражают органы мишени и индуцируют развитие местного и системного воспалительного ответа [10].

Связывание вируса SARS-CoV-2 с рецептором АПФ-2 происходит, в первую очередь, на поверхности пневмоцитов 2 типа. В этих клетках происходит синтез сурфактанта и они играют особую роль во врожденном иммунном ответе. Пневмоциты 2 типа экспрессируют толл-подобные рецепторы (TLR), которые активируют передачу воспалительных сигналов ядерного фактора каппа-би (англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)) в ответ на связывание вирусной РНК [9, 10, 11]. Активация NF- κ B запускает выработку цитокинов, которые инициируют каскад воспалительных реакций в резидентных макрофагах и привлекают активированные моноциты и Т-клетки в легкие.

Интерфероны играют ведущую роль в противовирусном иммунитете, обеспечивая эффективное удаление вируса. Интерфероны препятствуют

размножению вируса, формированию вирусных частиц и дальнейшему их распространению. Возможной причиной неадекватного ответа врожденного иммунитета при COVID-19 может быть особенность репликации вируса, происходящая внутри клеточных органелл, что затрудняет распознавание вируса цитоплазматическими рецепторами и приводит к дефициту интерферонов и гипервоспалению. В свою очередь, дефицит интерферонов при COVID-19 может являться одной из наиболее значимых причин избыточного повышения уровня цитокинов и цитокиновых рецепторов.

Еще одним механизмом снижения противовирусной защиты при коронавирусной инфекции являются аутоантитела к интерферонам I типа. Некоторые патологические состояния организма сопровождаются синтезом нейтрализующих аутологичных иммуноглобулинов против собственных интерферонов (ауто-ИНФ-АТ). Ауто-ИНФ-АТ могут быть диагностированы при различных аутоиммунных заболеваниях, таких как системная красная волчанка, периодическая лихорадка, болезнь Бехчета, подагра, анкилозирующий спондилит, псориатический артрит, болезнь Крона; а так же у пациентов, получавших лечение ИНФ- $\alpha 2$ или ИНФ- β , поскольку данные цитокины являются высоко иммуногенными. Аутоантитела к цитокинам блокируют их биологическую функцию и могут вызывать развитие иммунодефицита, схожего с врожденными генетическими нарушениями. В ряде исследований опубликованных недавно были выявлены аутоантитела к интерферонам альфа и омега у больных с угрожающим жизни течением пневмонии, вызванной COVID-19. Однако их клиническое значение неясно [11].

Дизрегуляция передачи сигналов интерферонов также, вероятно, является одной из причин иммунопатологии при тяжелом течении COVID-19 [11]. Имеются данные, что SARS-CoV-2 подавляет передачу сигналов интерферона и ухудшает выведение вируса из пораженных клеток. Неадекватный вирус-специфический ответ, дисфункция вирусного клиренса SARS-CoV-2 из-за антагонизма передачи сигналов интерферона, вызывают непрерывную стимуляцию TLR и стимулируют

апоптоз инфицированных клеток. Гибель клеток приводит к высвобождению цитокинов, таких как IL-1 β , IL-18 и IL-33. В свою очередь, IL-1 β стимулирует высвобождение IFN- γ эффекторными клетками. Поврежденные эндотелиальные и эпителиальные клетки выделяют хемокины, такие, как CCL2, CCL3 и CXCL10, привлекающие иммунные клетки, выделяющие еще больше воспалительных цитокинов, создавая каскад положительной обратной связи. Формируется гиперовоспалительное состояние и запускается «цитокиновый шторм», вызывающий локальное повреждение тканей, а также системные проявления, такие, как полиорганная дисфункция и гемофагоцитоз в ретикулоэндотелиальных органах. Такой сценарий развития событий, характерен для тяжелой формы COVID-19. «Цитокиновый шторм» - клиническое состояние неуправляемого системного гиперовоспаления, вызванное избытком цитокинов, неконтролируемой активацией макрофагов и Т-клеток, и являющееся ведущей причиной тяжелой формы COVID-19 [12].

Истощение Т-клеток является краеугольным камнем «цитокинового шторма» COVID-19, поскольку активность Т-клеток имеет решающее значение для выведения вируса и остановки воспаления врожденного иммунитета [12]. Неспособность уничтожить вирус из-за истощения лимфоцитов является одновременно причиной и следствием сильного антигенного стимула. Этот сценарий способствует постоянной стимуляции миелоидных клеток и гиперовоспалению.

Абсолютное количество лимфоцитов является прогностическим фактором степени тяжести заболевания и смертности. Отмечается снижение периферических CD4 + и CD8 + Т-лимфоцитов при тяжелом течении COVID-19 [12,13,14]. Уровни цитокинов плазмы обратно пропорционально коррелировали с количеством CD4 + и CD8 + Т-клеток. У умерших пациентов с лимфопенией отмечалась обширная гибель лимфоцитов в лимфатических узлах и селезенке. Было обнаружено, что инфицированные SARS-CoV-2 лимфатические узлы сверхэкспрессируют проапоптотический белок Fas [15,16,17] Аналогичным образом, транскриптомный

анализ выявил усиление проапоптотических путей в лимфоцитах периферической крови пациентов с COVID-19 [18,19]. Предполагается роль aberrантно активированных макрофагов в лимфопении. Гемофагоцитарные макрофаги, присутствующие в селезенке и лимфатических узлах, вызывают истощение лимфоцитов. Было обнаружено, что эти макрофаги экспрессируют высокие уровни IL-6, что может способствовать гибели иммунных клеток внутренним и внешним путями апоптоза.

Рекрутирование активированных иммунных клеток может быть вызвано дисфункцией легочных эндотелиальных клеток и повышением сосудистой проницаемости, отеком тканей и эндотелиитом. В совокупности разумно предположить, что прямая вирусная инвазия и рекрутирование клеток увеличивают повреждение эндотелия, ослабляют щелевые контакты, потенцируя капиллярную утечку и системное нарушение кровообращения. Специфическое вирусное и вызванное цитокиновым штормом повреждение эндотелия, получившее название SARS-CoV-2-ассоциированный эндотелиит, – основа характерной для COVID-19 микроангиопатии легких и системного продуктивно-деструктивного тромбоваскулита [1,20,21,22].

У пациентов с тяжелым течением заболевания отмечаются тромбоэмболические осложнения. Комбинация тромбоцитопении, пролонгированного протромбинового времени и повышенного уровня D-димера предполагает наличие ДВС-синдрома. Однако его проявления при COVID-19 отличаются от проявлений ДВС-синдрома при сепсисе, где тромбоцитопения гораздо более выражена, а повышение уровня D-димера не достигает значений, наблюдаемых при COVID-19. Провоспалительные цитокины, такие, как TNF- α и IL-6, индуцируют экспрессию тканевого фактора в моноцитах и инициируют активацию каскада свертывания. Кроме того, эти цитокины также подавляют пути эндогенных антикоагулянтов. Текущие данные свидетельствуют о том, что коагулопатия, связанная с COVID-19, представляет собой комбинацию ДВС-синдрома и микроангиопатии, которая может оказывать значительное влияние на

дисфункцию органов у большинства пациентов с тяжелым течением COVID-19 [23]. Наличие коагулопатии является частым признаком тяжелой формы COVID-19. Примерно у 20% -50% госпитализированных пациентов с COVID-19 наблюдаются гематологические изменения (повышение D-димера, удлинение ПВ, тромбоцитопения и гипофибриногенемия), характеризующиеся скорее тромботическими, чем геморрагическими событиями. Особенно часто встречается венозная тромбоэмболия. Отложение фибрина и тромбина происходит в основном в легочном микроциркуляторном русле, являясь фактором, который способствует развитию острого респираторного дистресс-синдрома и коагулопатии у пациентов с тяжелой и крайне тяжелой формой заболевания COVID-19.

Таким образом, этиопатогенез COVID-19 заключается в специфическом ответе иммунной системы на клеточную инвазию вируса SARS-CoV-2. Исходя из патогенеза COVID-19, наиболее типичными для этого заболевания осложнениями являются иммунотромботические – «цитокиновый шторм» и тромбозы. «Цитокиновый шторм» непосредственно обуславливает повреждение легких, желудочно-кишечного тракта, почек и других органов. Тромбозы при COVID-19 формируются во всех отделах сосудистой системы, являясь причиной острого коронарного синдрома, инсульта, тромбозов артерий и вен конечностей, тромбоэмболических осложнений, а также тромбозов микроциркуляторного русла. Исходя из этого, тяжесть COVID-19 будут отражать лабораторные маркеры тяжести «цитокинового шторма» (С-реактивный белок, лейкоциты, лимфоциты, ЛДГ, ферритин) и тромботических осложнений (Д-димер, фибриноген).

1.2 Запрограммированная гибель клеток и иммунный ответ

Апоптоз, или запрограммированная гибель клетки, является генетически регулируемым процессом, для которого требуется запас энергии и синтез определенных белков [24,25,26]. Результатом апоптоза является постепенное и медленное избавление от клеток, утративших свое функциональное значение. При

нормальном течении запрограммированной гибели клеток не происходит нарушения структуры и функционирования окружающих клеток, что позволяет сохранить анатомическую структуру и функциональную активность органа [27,28]. Это принципиальное отличие апоптоза от некроза. Таким образом, апоптоз играет важнейшую роль в обеспечении гомеостаза тканей.[29]

Процесс апоптоза начинается с взаимодействия специфических внеклеточных лигандов с рецепторами клеточной гибели, экспрессированными на поверхности клеточной мембраны. Рецепторы, воспринимающие сигнал апоптоза, относятся к суперсемейству TNF-рецепторов (tumor necrosis factor receptor или кратко TNFR — «рецептор фактора некроза опухолей») [30]. Наиболее изученными рецепторами смерти, для которых описана и определена роль в апоптозе, являются CD-95 (также известный как Fas или APO-1) и TNFR1 (также называемый p55 или CD120a). К дополнительным относятся CAR1, DR3 (англ. death receptor 3 — «рецептор смерти 3»), DR4 и DR5 [31,32, 33].

Все рецепторы смерти представляют собой трансмембранные белки, характеризующиеся наличием общей последовательности аминокислот в цитоплазматическом домене. Данная последовательность называется доменом смерти (death domain - DD) и является необходимой для трансдукции сигнала апоптоза [31, 34]. Внеклеточные участки рецепторов смерти взаимодействуют с тримерами лигандов (CD95L, TNF, Apo3L, Apo2L и т. п.). Тримеры лигандов в результате взаимодействия тримеризуют рецепторы смерти (то есть «сшивают» 3 молекулы рецептора) [35]. Активированный таким образом рецептор взаимодействует с соответствующим внутриклеточным адаптером (или адаптерами). Для рецептора CD95(Fas/APO-1) адаптером является FADD (Fas-associated DD-protein — «белок, взаимодействующий с доменом смерти Fas-рецептора»). Для рецепторов TNFR1 и DR3 адаптером является TRADD (TNFR1-associated DD-protein — «белок, взаимодействующий с доменом смерти TNFR1-рецептора»). [31, 32, 33]

Адаптер, ассоциированный с рецептором смерти, вступает во взаимодействие с эффекторами — неактивными предшественниками протеаз из семейства инициирующих каспаз — с прокаспазами. В результате цепочки взаимодействия «лиганд-рецептор-адаптер-эффектор» формируются агрегаты, в которых происходит активация каспаз. Данные агрегаты именуются апоптосомами, апоптозными шаперонами или сигнальными комплексами, индуцирующими смерть (DISC — death-inducing signaling complex — «сигнальный комплекс, индуцирующий смерть»). Примером апоптосомы может служить комплекс FasL-Fas-FADD-прокаспаза-8, в котором активируется каспаза-8 [32, 33].

Большинство форм апоптоза реализуется по митохондриальному пути, а не через рецепторы клеточной гибели [36, 37]. Митохондриальный сигнальный путь апоптоза реализуется в результате выхода апоптогенных белков из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму клетки [32, 33]. Высвобождение апоптогенных белков, предположительно, может осуществляться двумя путями: за счёт разрыва митохондриальной мембраны или же путём открытия высокопроницаемых каналов на внешней мембране митохондрий [32, 33, 38].

Ключевым событием митохондриального пути апоптоза является повышение проницаемости наружной мембраны митохондрий (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) [39]. Существенную роль в повышении MOMP играют апоптотические Bcl-2-белки — Bax и Bak [40, 41]. Они встраиваются в наружную мембрану митохондрий и олигомеризуются. При этом, вероятно, нарушается целостность внешней мембраны митохондрий. При повышении MOMP из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль высвобождаются растворимые белки, участвующие в апоптозе: цитохром с — белок с молекулярной массой 15 кДа; прокаспазы -2, -3 и -9; белок AIF (apoptosis inducing factor — «фактор, индуцирующий апоптоз») — флавопротеин с молекулярной массой 57 кДа. Разрыв внешней мембраны митохондрий объясняется увеличением объёма митохондриального матрикса. Данный процесс связывают с раскрытием пор

митохондриальной мембраны, приводящим к снижению мембранного потенциала и высокоамплитудному набуханию митохондрий вследствие осмотического дисбаланса [40, 41]. Раскрытие пор стимулируют следующие факторы: неорганический фосфат, каспазы, гасдермин, SH-реагенты, истощение клеток восстановленным глутатионом, образование активных форм кислорода, разобщение окислительного фосфорилирования протонофорными соединениями, увеличение содержания Ca^{2+} в цитоплазме, воздействие церамида, истощение митохондриального пула АТФ и др. [41, 42].

Цитохром с в цитоплазме клетки участвует в формировании апоптосомы вместе с белком АРАФ-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1 — «активирующий фактор апоптотической протеазы-1») [32]. Предварительно АРАФ-1 претерпевает конформационные изменения в результате реакции, протекающей с затратой энергии АТФ. Предполагается, что трансформированный АРАФ-1 приобретает способность связывать цитохром с. К тому же открывается доступ CARD-домена АРАФ-1 для прокаспазы-9. В итоге происходит олигомеризация субъединиц трансформированного белка АРАФ-1 с участием цитохрома с и прокаспазы-9 [32, 43, 44]. Так образуется апоптосома, активирующая каспазу-9. Зрелая каспаза-9 связывает и активирует прокаспазу-3 с образованием эффекторной каспазы-3 [32, 45, 46]. Высвобождающийся из межмембранного пространства митохондрий флавопротеин АIF является эффектором апоптоза, действующим независимо от каспаз [32, 33, 47].

Важная роль в регуляции апоптоза клеток иммунной системы принадлежит цитокинам. Было обнаружено, что они являются индукторами апоптоза как в здоровых, так и в опухолевых клетках и клеточных линиях. Например, IL12 индуцирует апоптоз натуральных киллеров, IL-4 и IL-10 – периферических моноцитов человека, IL-10 – Т-лимфоцитов. Не менее выраженный эффект цитокинов наблюдается в предотвращении апоптоза. При этом один и тот же интерлейкин может быть как индуктором апоптоза, так и его ингибитором.

Различия в ответе клеток наблюдаются для разных клеток-мишеней и, возможно, зависят от степени их дифференцировки и развития. [29]

Запрограммированная гибель клетки зависит от соотношения факторов, вызывающих и предотвращающих апоптоз, а также от регуляторных внутриклеточных механизмов. К физиологическим ингибиторам апоптоза относятся факторы роста, экстрацеллюлярный матрикс, CD40L, нейтральные аминокислоты, цинк, эстрогены, андрогены. Биохимические изменения при апоптозе включают специфическое расщепление ДНК, рибосомальной РНК и белков, повышение внутриклеточного уровня ионов кальция, потерю митохондриального трансмембранного потенциала и высвобождение из митохондрий цитохрома С, транслокация фосфатидилсерина с внутренней плазматической мембраны. Основываясь на этих и других изменениях, разработаны различные методы для определения и подсчета апоптотических клеток. Традиционными методами являются: определение связывания аннексина V, оценка активации каспаз [29,48].

NF-κB - является одним из главных транскрипционных факторов, отвечающих за адаптивные реакции клеток. NF-κB представляет семейство цитоплазматических белков, которые при стимуляции переходят в свободное состояние, перемещаясь в ядро, где проявляют активность, связываясь с промоторными участками более 100 генов, ответственных за индуктивный гомеостаз. NF-κB представлен пятью белками – p50/105, p52/100, p65, c-Rel и RelB. Несмотря на множество форм, классическим типом NF-κB является гетеродимер p50-p65. Он содержится в большинстве клеток и имеет практически все участки, необходимые для связывания с индуцибельными генами. Гомодимеры p50 неактивны, так как не содержат трансактивационных доменов. Они выступают в роли репрессоров. NF-κB присутствует в цитоплазме в неактивной форме, находясь в комплексе с ингибиторными IκB-белками. Все они имеют несколько так называемых анкириновых повторов (состоят из 30–33 аминокислот), связывающихся с Rel-доменом NF-κB. При стимуляции NF-κB подвергаются

фосфорилированию и убиквитинизации [29]. Это меняет конформационную структуру молекул, определяя их распознавание и разрушение внутри протеосом, что, в свою очередь, приводит к высвобождению NF-κB, который после дополнительного фосфорилирования получает возможность мигрировать в ядро клетки, к месту своего действия. Транскрипционная активность NF-κB проявляется через считанные минуты после стимуляции. Обычно протеолиз происходит в цитоплазме, но возможна и его ядерная деградация. Это характерно для нейтрофилов. После фосфорилирования и убиквитинизации NF-κB подвергается инактивации не только в цитоплазме, но и в ядре, что, по-видимому, способствует более оперативным событиям при остром воспалении. NF-κB принадлежит одна из центральных позиций в регуляции воспалительного процесса. Активация NF-κB повышает экспрессию адгезивных молекул (E-селектин, VCAM-1, ICAM-1), стимулируя трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов. Активированный NF-κB служит одним из важных регуляторов воспалительных генов, повышая синтез цитокинов (TNFα, IL-1β, -6, -8 и др.) и индуцибельных ферментов (циклооксигеназа-2, коллагеназа, NO-синтаза и др.) [29]. В клетках, полученных из очагов воспаления, наблюдается усиление продукции ИКК (прежде всего ИККβ) и ядерной локализации NF-κB. Экспрессия воспалительных генов зависит и от участия других транскрипционных факторов, например членов семейства JNK. NF-κB опосредует воспалительный и иммунный ответ, реакцию на вирусные инфекции, деление клеток и регуляцию апоптоза. Он может служить как анти-, так и как проапоптотический сигнал. Активация NF-κB обычно задерживает апоптоз, продлевая жизнь клеток-эффекторов в очаге воспаления. Примером являются ревматоидный артрит, бронхиальная астма, хронические заболевания нервной системы, кишечника, атеросклероз, септический шок [29].

Апоптоз имеет большое значение для нормального функционирования иммунной системы, как в физиологических, так и в патологических условиях при иммунном ответе на инфекционный процесс вне зависимости от его генеза - бактериального или вирусного. В физиологических условиях апоптоз обеспечивает

элиминацию аутореактивных Т-лимфоцитов-киллеров, ограничивая тем самым деструкцию собственных клеток и тканей организма. Апоптоз зрелых лимфоцитов, преимущественно Т-хелперов, является средством регуляции интенсивности и продолжительности иммунного ответа [29]. При сепсисе происходит ускорение апоптоза лимфоцитов, что является основной причиной иммуносупрессии [49]. При септическом шоке выраженность апоптоза Т-лимфоцитов больше, чем при сепсисе. Скорость апоптоза коррелирует с уровнем интерлейкина-6 и экспрессией каспазы-9 [50, 51, 52]. Усиление апоптоза связано с возникновением патологического круга ко-стимуляции Т-клеток, присоединением клеточной гипоксии и депрессией метаболических процессов. В результате возникает дисфункция митохондрий, от которых зависит функциональная активность и жизнеспособность клетки.

Существуют убедительные данные о том, что при гриппе происходит гиперактивация процессов апоптоза [53]. Вирус гриппа стимулирует экспрессию мембранного Fas антигена (CD95) и Fas-лиганда [54]. Роль Fas-антигена в вирусиндуцированном апоптозе заключается в том, что этот белок, взаимодействуя с Fas-лигандом, запускает каскад апоптотических реакций через активацию проапоптотической протеазы - каспазы-8. Белок Fas имеет в своем составе домен смерти, передающий апоптотический сигнал. При мутациях в этом домене или при его отсутствии сигнал смерти не передается, и клетки приобретают устойчивость к индукции апоптоза вирусом гриппа.

Инфильтративные изменения интерстициальной ткани легких являются типичными при COVID-19 [55]. Считается, что до 80% инфильтрирующих клеток составляют CD8⁺ Т-лимфоциты, роль которых заключается в удалении клеток, инфицированных вирусом. При дисбалансе иммунных реакций и недостаточной активности врожденного иммунитета, в первую очередь, по объему выработки эндогенного интерферона, отмечается дизрегуляция апоптоза, синтезируется большее количество цитокинов, вызывающих развитие гипервоспалительной реакции с повреждением ткани легких [56].

Основную роль в дисфункции врожденного иммунитета при COVID-19 играет неадекватный синтез интерферона на ранних стадиях инфекции. При интенсивной репликации вируса происходит гиперактивация синтеза провоспалительных цитокинов, а затем и гиперпродукции самого интерферона, но несвоевременный синтез интерферона приводит к усилению воспалительной реакции. Сбой синтеза интерферона нарушает контроль за вирусной репликацией и приводит к инфильтрации легких активированными нейтрофилами и моноцитами, интенсивному синтезу провоспалительных цитокинов с гиперовоспалительной реакцией, гиперактивацией лейкоцитов и сенсбилизацией Т-лимфоцитов к апоптозу, тем самым еще более выражено ослабляя противовирусную защиту [56].

Вирус SARS-CoV-2 приводит к активации инфламмасом. Инфламмасома - многобелковый олигомерный комплекс, отвечающий за активацию воспалительного ответа. Инфламмасома способствует протеолитическому расщеплению про-ИЛ-1 β до активной формы ИЛ-1 β , а также расщеплению Гасдермина-D на Гасдермин N, образуя поры и вызывая клеточную гибель. Смерть инфицированной клетки высвобождает клеточные и вирусные фрагменты, известные как молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMP), и патогены, ассоциированные с молекулярными паттернами (PAMP), которые могут восприниматься Toll-подобным рецептором (TLR) миелоидных клеток, и приводит к продукции и высвобождению большего количества воспалительных цитокинов [57,58]. Исходя из этого, вероятно участие апоптоза в патогенезе тяжелой формы COVID-19.

Вместе с этим, при вирусных инфекциях может происходить блокирование апоптоза. Вирусы являются облигатными внутриклеточными паразитами, и поэтому гибель клетки-хозяина затрудняет жизнедеятельность вирусов, а поддержание жизнеспособности клеток находится в интересах вируса. Многие вирусы обладают механизмами блокады апоптоза [59]. Как отмечалось, апоптоз регулируется на уровне активации каспаз. Бакуловirus блокируют апоптоз

экспрессируя IAP, который ингибирует эффекторные каспазы. Вместе с тем эти вирусы также экспрессируют другой белок, p35, который связывает и ингибирует активные каспазы. Блокируя активацию каспаз, вирусы поддерживают жизнеспособность клетки до тех пор, пока не образуется достаточное количество вирусных частиц и не произойдет лизис клетки. [60]

Ингибирование каспаз не блокирует повышение МОМР или независимую от каспаз гибель, и может способствовать развитию иммунного ответа на присутствие вируса. Поэтому некоторые вирусы продуцируют антиапоптотические белки, относящиеся к семейству Bcl-2, например E1B19K и белок BHRF вируса Эпштейна-Барра. Другие вирусные Bcl-2 белки функционируют подобно Bcl-2, предотвращая повышение МОМР и апоптоз [60]. Вирусы часто функционируют, предотвращая апоптоз, индуцируемый эффекторными клетками иммунной системы. Например, вирус ветряной оспы продуцирует ингибиторы протеаз, называемые серпины, которые способны блокировать гранзим В и каспазу-8 (но не каспазу-9 или эффекторные каспазы). Блокирование гранзима В позволяет избежать вирусу активации цитотоксических лимфоцитов, которые ведут в организме поиск инфицированных клеток. Аналогичным образом, ингибирование каспазы-8 приводит к блокированию апоптоза, индуцированному связыванием лигандов с рецепторами клеточной гибели. Эти лиганды часто продуцируются цитотоксическими лимфоцитами и другими клетками в ответ вирусную инвазию. Еще один механизм, при помощи которого вирусы блокируют апоптоз с участием рецепторов клеточной гибели, связан с экспрессией молекул, близких к c-FLIP, например v-FLIP белка, продуцируемого вирусом герпеса [32, 33, 60, 61].

Способны ли коронавирусы и, в частности, SARS-CoV-2 подавлять апоптоз остается неизвестным. Таким образом, апоптоз играет важную роль в патогенезе COVID-19. Возможно, выраженность апоптотических реакций обуславливает выраженность «цитокинового шторма» и, следовательно, тяжесть клинического состояния пациента и исход заболевания. Лабораторными маркерами

выраженности апоптоза являются: аннексиновый тест, проапоптические белки/белки семейства Bcl2, семейство протеинкиназ B и каспаз.

1.3 Клиническая картина, степени тяжести COVID-19, особенности тяжелого и крайне тяжелого течения заболевания

Клинически значимые коронавирусы передаются, как правило, воздушно-капельным путем. Однако возможны аэрозольный, контактный и фекально-оральный механизм передачи [58,61,62]. Передача воздушно-капельным путем, обусловлена активной репликацией SARS-CoV-2 как в верхних, так и в нижних дыхательных путях. [62,63,64]. Передача вируса через другие жидкости организма (включая передачу половым путем или через кровь) зарегистрирована не была.[63,64] Вертикальная передача вируса происходит редко, но тем не менее, возможна [65].

Максимальная длительность выделения вируса из верхних дыхательных путей составила 83 дня, 59 дней - из нижних дыхательных путей, из желудочно-кишечного тракта - 126 дней. Длительность вирусывыделения была выше у пациентов с симптомным и тяжелым течением по сравнению с пациентами с бессимптомным и нетяжелым вариантами течения заболевания.[66, 67]

SARS-CoV-2 поражает почти все органы, поскольку рецептор АПФ-2 экспрессируют подавляющее большинство клеток организма. При COVID-19 происходит повреждение головного мозга, почек, печени, кожных покровов. Однако, наибольшее повреждение приходится на респираторную систему. Факторы риска неблагоприятного исхода включают пожилой возраст, наличие сопутствующих заболеваний, таких как артериальная гипертония, ИБС, сахарный диабет, острое и хроническое повреждение почек. [68, 69]

COVID-19 имеет три стадии заболевания, а тяжесть его течения разделяют на 4 степени: легкую, среднетяжелую, тяжелую и критическую. На первой стадии

заболевания происходит инкубация и репликация вируса, которая длится обычно в течение 3–7 суток [70]. Как правило, пациенты переносят этот период легко или бессимптомно, у части больных со среднетяжелым течением отмечаются симптомы ОРВИ, такие, как: кашель (46%–82%), лихорадка (77–98%), боли в горле (12–14%), головная боль (8-10%), ринорея, утомляемость (40-50%), миалгии (11-15%), аносмия и дисгевзия (60-80%). Симптомы со стороны желудочно-кишечного тракта, такие как тошнота и диарея, а также сопутствующие боли в животе могут предшествовать респираторным симптомам у 8-10% пациентов [71]. У 13% - 15% пациентов отмечается тяжелое течение заболевания, и у 5% - 7% пациентов критическое течение заболевания с органной дисфункцией, коагулопатией, тромбозами. Клиническо-лабораторные изменения трудно дифференцировать с полиорганным тромбозом, развивающимся при ДВС и тромботической микроангиопатии [1, 72].

Вторая стадия заболевания развивается на 5-12 сутки. В это время происходит условное разделение пациентов на тех, у кого будет благоприятный исход заболевания и на тех, кому предстоит течение средней тяжести, тяжелое или крайней степени тяжести с неопределенным исходом. Тяжелое и крайне тяжелое течение заболевания ассоциировано с неадекватным и несовершенным ответом неспецифического иммунитета, индукцией апоптоза и цитокиновым штормом. Вторая стадия COVID-19 длится около 6–9 суток.

«Цитокиновый шторм» характеризуется клиническими проявлениями системного воспаления, гиперферритинемией, гемодинамической нестабильностью, полиорганной дисфункцией и развитием респираторного дистресс синдрома [73,74]. При РДС, вызванным SARS-CoV-2 исходы хуже, чем при РДС, вызванным другими причинами. Смертность при классическом РДС составляет 30-55%, а при РДС у пациентов с COVID-19 – 40% - 94%, соответственно [75,76].

Третья стадия заболевания наступает после 14-16 суток с момента начала заболевания. Эта стадия характеризуется выздоровлением пациента при благоприятном течении заболевания или развитием осложнений при

неблагоприятном его течении. Типичными для COVID-19 являются тромбоземболические, геморрагические и нозокомиальные инфекционные осложнения, а также полиорганная дисфункция, развивающаяся в результате вышеперечисленных осложнений [70].

Оценка тяжести состояния у пациентов с COVID-19 является чрезвычайно важной задачей. COVID-19 – новое заболевание, и на данный момент времени отсутствуют шкалы, которые были бы созданы специально для оценки тяжести состояния пациентов с новой коронавирусной инфекцией, были бы валидизированы у этой категории пациентов и являлись бы общепринятыми. При поступлении пациента с COVID-19 рутинно используют шкалу NEWS. Эта шкала была создана в Великобритании, задолго до пандемии коронавирусной инфекции, для оценки тяжести пациента при его поступлении в клинику. Шкала NEWS оценивает, среди прочих показателей, температуру тела и сразу несколько параметров функционирования респираторной системы. Поскольку легкие являются ключевым органом – мишенью при COVID-19, использование шкалы NEWS при этом заболевании оказалось наиболее логичным. Рутинное применение шкалы NEWS у пациентов с коронавирусной инфекцией позволяет оценить состояние пациента при его поступлении, стратифицировать пациентов, правильно их маршрутизировать и помочь принять решение о необходимости использования и модальности применимой патогенетической терапии. Однако, шкала NEWS не подходит, по своей сути, для ежедневной оценки тяжести состояния пациента с COVID-19. Шкала SOFA, используемая с успехом для этой цели в отделении интенсивной терапии, является далеко неоптимальной в группе пациентов с COVID-19. Это связано с тем, что органная дисфункция, которую оценивает шкала SOFA, не характерна для 1 и 2 стадии COVID-19. Органная дисфункция при этой патологии характерна для 3 стадии заболевания при его неблагоприятном течении, когда развиваются стандартные для реанимационных пациентов полиорганные осложнения.

Клиническим комитетом департамента здравоохранения г. Москвы была создана шкала оценки тяжести состояния пациентов с COVID-19 (таблица 1) [70]. Эта шкала включает в себя наиболее достоверные клинико-лабораторные параметры вирусного повреждения. Эту шкалу мы используем как для рутинных клинических задач, так и применяли при проведении настоящего исследования.

Таблица 1 - Шкала оценки тяжести состояния пациентов с COVID-19 [70]

	Легкая	Средняя	Тяжелая	Крайне тяжелая
Т, °С	N	<37,8	37,8–39	> 39
SpO ₂ , %	N	<95	<90 на ИВЛ, ВПО	<90 на ИВЛ, ЭКМО
КТ	N	1–2	3	4
С-рб, мг/л	N	20–50	50–100	> 100
Фибриноген	N	<4	4–6	> 6
Ддимер	N	1,5–2N	2–4N	> 4N
Ферритин	N	1,5–3N	3–6N	> 6N
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	N	> 0,9	0,5–0,9	< 0,5
ЛДГ	N	1,5–2N	2–4N	> 4N

Таким образом, как и любое другое инфекционное заболевание, COVID-19 имеет свои стадии и степени тяжести. Анализ лабораторных маркеров вирусного повреждения (С-реактивный белок, лейкоциты, лимфоциты, ЛДГ, ферритин, Д-димер, фибриноген) позволяют сделать суждение о тяжести COVID-19. Анализ маркеров апоптоза (уровень HLA-DR⁺ лимфоцитов, анекиновый тест, проапоптотические белки/белки семейства Bcl2, семейство протеинкиназ B и каспаз) позволяет, вероятно, определить тяжесть SARS-CoV-2 опосредованного повреждения иммунной системы. Вместе с точным определением тяжести уже случившегося вирусного повреждения, важным аспектом ведения пациента с любым инфекционным заболеванием, в том числе, и с COVID-19, является правильное определение прогноза этого заболевания. Это необходимо, во-первых, для правильного формирования тактики и стратегии ведения пациента. Во-вторых,

понимание прогноза позволяет адекватно выстраивать общение с семьей пациента, что является чрезвычайно важным аспектом работы медицинского персонала. Наиболее надежными прогностическими критериями у пациентов с COVID-19, вероятно, должны стать лабораторные маркеры вирусного повреждения и апоптоза. Определение прогностической значимости каждого из маркеров вирусного повреждения и апоптоза стали целью представленной работы.

1.4 Маркеры вирусного повреждения

1.4.1 С-реактивный белок

С-реактивный белок (СРБ) известен с 1930 года. Он принадлежит к семейству белков-пентраксинов, состоит из 5 субъединиц, связанных между собой [77]. В пространстве СРБ ориентирован таким образом, что один из его полюсов распознает чужеродный агент, а другой полюс связывается с рецептором С1q комплемента [78, 79]. Синтез СРБ происходит в печени под действием цитокинов. СРБ является белком острой фазы воспаления, тем инициируя фагоцитоз и участвуя в регуляции других звеньев иммунного ответа. Уровень СРБ в плазме ниже 5 мг/л является нормальным, он повышается в ответ как на инфекционные (полисахариды, гликолипиды микроорганизмов), так и на различные неинфекционные агенты [80]. При развитии воспалительного ответа уровень СРБ в плазме возрастает очень быстро, в течение первых 6-8 часов, пик значений СРБ достигает через 12-24 часа, повышаясь в 20 - 100 раз, пропорционально выраженности воспаления [81]. При вирусных инфекциях, онкологических заболеваниях с метастатическим поражением и некоторых ревматических заболеваниях СРБ повышается в среднем до 10 - 30 мг/л [82,83], при бактериальных инфекциях и после хирургических вмешательств - до 40 - 100 мг/л, а иногда и до 200 мг/л . В послеоперационном периоде уровень СРБ пропорционален тяжести и обширности проведенной операции, он может оставаться высоким в течение

несколько дней после операции с последующим достаточно быстрым снижением [84]. Если уровень СРБ остается повышенным на 4-5 послеоперационные сутки или продолжает увеличиваться, то это указывает на развитие инфекционных осложнений – системных или локальных. Выше 300 мг/л СРБ возрастает при сепсисе, септическом шоке, и тяжелой ожоговой травме. При присоединении нозокомиальной бактериальной инфекции СРБ будет выше 100 мг/л [85]. Уровень СРБ снижается достаточно быстро в случае адекватно начатой эффективной антибактериальной терапии.

Уровень С-реактивного белка (СРБ) повышаются у пациентов с COVID-19, и было показано, что среднее значение СРБ во время госпитализации составляло 130 мг /л (82–191 мг / л), а среднее значение CRP при поступлении в ОРИТ составляло 169 (111–234) [86,87]. Медиана СРБ в течение всей госпитализации была значительно выше среди умерших пациентов, по сравнению с выжившими 206 мг/л (157–288 мг/) против 114 мг/л (72–160 мг/л). Уровни СРБ линейно увеличиваются в течение первой недели госпитализации и достигают пика во время «цитокинового шторма» на 5-12 сутки заболевания. По сравнению с умершими пациентами, у выживших были более низкие пиковые уровни CRP и его более раннее снижение [86, 87, 88].

Таким образом, вероятно, уровень СРБ можно использовать в качестве прогностического маркера у пациентов с COVID-19. Уточнение прогностической роли СРБ была одной из задач настоящего исследования.

1.4.2 Уровень лейкоцитов и лимфоцитов

Лейкоцитоз – повышение количества лейкоцитов в крови вследствие усиления лейкопоза или увеличения поступления лейкоцитов из депо костного мозга в кровотоки. При стафилококковой и стрептококковой инфекции отмечается увеличение нейтрофилов (стимуляция миелопоэза и выброс в кровь гранулоцитов). При вирусе коклюша, гепатита, а также при туберкулезе, сифилисе и бруцеллезе

отмечается стимуляция лимфопоэза, увеличение числа лимфоцитов. При инфекционном мононуклеозе, краснухе, бруцеллёзе, малярии, септическом миокардите и коллагенозах отмечается лейкоцитоз. Таким образом, интерпритация лейкоцитоза и повышение уровней отдельных видов лейкоцитов имеет диагностическое значение.

Снижение лимфоцитов в крови называется лимфопенией. К основным причинам развития лимфопении относят угнетение лимфоцитопоэза, ускоренную гибель лимфоцитов, нарушение их миграции или сочетание этих факторов. Ускоренная гибель лимфоцитов наблюдается при различных инфекциях, как вирусных, так и бактериальных. В первую очередь, лимфопения развивается под воздействием лимфотропных вирусов, к которым относится респираторный синцитиальный вирус, вирус кори, гриппа. При гриппе лимфопения развивается в ранние сроки заболевания, особенно в случае его тяжелого течения. Выраженность лимфопении коррелирует со степенью тяжести заболевания [89,90]. При гепатите С лимфопения также наблюдается. Многочисленные проапоптотические молекулы, такие, как FasL, TNF- α и TRAIL активируются при этом заболевании, что приводит к индукции апоптоза и гибели иммунных клеток.

Массивная гибель лимфоцитов характерна и для сепсиса. Снижение числа В- и Т-лимфоцитов в периферической крови объясняется цитокин-индуцированным нарушением пролиферации Т-клеток, изменением соотношения субпопуляций Т-клеток, уменьшению способности представлять антиген в главном комплексе гистосовместимости и индукцией апоптоза иммунокомпетентных клеток.

При вирусной инфекции, как правило, отмечается развитие лимфоцитоза, что обусловлено особенностями иммунного ответа, необходимостью инактивации вируса и элиминации зараженных клеток путем апоптоза, реализуемого через Т-цитотоксические лимфоциты. При COVID-19 в тяжелых случаях, напротив, развивается лимфопения, коррелирующая с тяжестью состояния пациентов на фоне неконтролируемой воспалительной реакции. Одной из причин развития глубокой лимфопении при COVID-19 является усиленный апоптоз иммунокомпетентных

клеток [91]. Для пациентов с COVID-19 характерна лимфопения с функциональным истощением оставшегося пула лимфоцитов. Нарастание выраженности лимфопении на фоне «цитокинового шторма» при COVID-19 указывает на прогрессирование заболевания и ассоциировано с неблагоприятным исходом [92]. Таким образом, определение динамики уровней лейкоцитов и лимфоцитов являлось одной из задач настоящего исследования. Это позволит персонализировать подход к лечению и прогнозировать исход заболевания.

1.4.3 Лактатдегидрогеназа

Лактатдегидрогеназа (L-лактат: NAD-оксидоредуктаза (ЛДГ)) — фермент, принимающий участие в реакциях гликолиза. Лактатдегидрогеназа катализирует превращение лактата в пируват, при этом образуется NADH. Изоферменты лактатдегидрогеназы имеют разный состав субъединиц М (muscle) и Н (heart). Нумерация идет в зависимости от подвижности молекул в геле при электрофорезе. ЛДГ-1 изофермент, обладающий наибольшей подвижностью. Он содержится преимущественно в миокарде. ЛДГ-2 преимущественно локализован в эритроцитах и почках, ЛДГ-3 преимущественно в легких, ЛДГ-4 локализован в скелетных мышцах и отчасти в гепатоцитах. ЛДГ-5 изофермент, обладающий наименьшей подвижностью, преимущественно содержится в гепатоцитах [93].

При заболеваниях, сопровождающихся повреждением тканей и деструкцией клеток, активность ЛДГ в крови повышается. В связи с этим, ЛДГ является одним из прогностических биомаркеров при различных бактериальных и вирусных заболеваниях [92-94]. Уровень ЛДГ при бактериальной пневмонии колеблется на уровне 334–517 Ед/л, у пациентов инфицированных вирусом гриппа H1N1 значения ЛДГ при тяжелом течении находятся в диапазоне 373 - 971Ед/л с медианой 470 Ед/л. Повышение уровня провоспалительных цитокинов ассоциировано с увеличением концентрации ЛДГ [94]. Повышение уровня ЛДГ является типичным для пациентов с COVID-19. Проведенные исследования

продемонстрировали корреляцию уровней ЛДГ с тяжестью течения COVID-19 и исходом заболевания. Показатели нормы ЛДГ находится в пределах 130–230 Ед/л. По литературным данным, значения ЛДГ свыше 250 Ед/л, ассоциированы с неблагоприятным течением заболевания.

Таким образом, определение характерной для пациентов с COVID-19 динамики ЛДГ и прогностической значимости этого маркера являлось одной из задач настоящего исследования.

1.4.4 Ферритин

Ферритин — сложный белковый комплекс (*железопротеид*), выполняющий роль основного внутриклеточного депо железа у человека и животных. Структурно состоит из белка апоферритина и атома трёхвалентного железа в составе фосфатного гидроксида. Одна молекула ферритина может содержать до 4000 атомов железа. Содержится практически во всех органах и тканях и является донором железа в клетках, которые в нём нуждаются. Ферритин сыворотки является также острофазовым регулирующим протеином, концентрация которого увеличивается в ответ на инфекцию в организме. В норме референсные значения ферритина составляют: 21–250 мкг/л.

Регуляция синтеза ферритина происходит при помощи IRE/IRP-зависимых механизмов (*IRE, iron-responsive element - железочувствительный элемент* и *IRP, iron-responsive element-binding proteins - белок, связывающийся с железочувствительным элементом*). На синтез ферритина влияют цитокины (ИЛ-1, ФНО- α), это происходит как на транскрипционном, так и на трансляционном уровне [95]. Также, при активации макрофагов отмечается увеличение синтеза ферритина. [96]. Таким образом, воспаление приводит к повышению уровня ферритина в плазме крови.

Предполагается, что повышение концентрации ферритина на фоне инфекционной патологии является защитным механизмом, поскольку при этом

снижается биодоступность железа для патогенов и уменьшается уровень свободных радикалов, образующихся при окислении железа. Исследования динамики уровня ферритина при сепсисе показывают, что циркулирующая легкая цепь ферритина защищает органы и ткани подавляя активацию NF-κB [97].

Синдром активации макрофагов, болезнь Стилла, катастрофический антифосфолипидный синдром, септический шок, объединены под термином - гиперферритинемические синдромы. Все они характеризуются высоким уровнем ферритина в плазме крови. COVID-19 особенно при тяжелом и крайне тяжелом течении заболевания, также представляет собой гиперферритинемический синдром. Повышение уровня ферритина, по данным исследований, было ассоциировано с тяжелым течением заболевания и неблагоприятным исходом. При тяжелой форме COVID-19 значения ферритина, по литературным данным, в диапазоне от 500 до 5000 нг/мл. [98,99]. Показатели ферритина при септическом шоке отмечаются на уровне 300–5000 нг/мл, при болезни Стилла у взрослых на уровне 300–5000 нг/мл, синдроме активации макрофагов около 5000 нг/мл. Уровень ферритина повышается при вирусе Эпштейна-Барра (≈ 430 нг/мл), вирусе иммунодефицита человека (≈ 480 нг/мл), вирусах гриппа (≈ 500 нг/мл) [100].

Таким образом, определение характерной для пациентов с COVID-19 динамики ферритина и прогностической значимости этого маркера являлось одной из задач настоящего исследования.

1.4.5 Д-димер

Д-димер представляет собой фрагменты молекулы фибрина, образующиеся при его распаде под действием пламина [101]. Процесс образования Д-димера состоит из нескольких этапов: 1) протеолитическая деградация фибриногена под действием тромбина, отщепление от него фибринопептидов А и В и образование фибрин-мономеров; 2) полимеризация фибрин-мономеров в растворимый фибрин-полимер; 3) стабилизация растворимого фибрин-полимера в нерастворимый тромб

под действием фактора XIIIa, образующего ковалентные связи между находящимися рядом D-доменами фибрин-мономеров в присутствии ионов Ca^{2+} ;

4) деградация нерастворимого поперечно-сшитого фибрина под действием активного плазмина [101]. Действие фибринолитической системы направлено на лизис фибрина. В результате образуется смесь продуктов деградации фибрина (ПДФ).

Продуктами деградации фибрина являются крупные фрагменты – D-димеры и другие молекулы, содержащие ковалентные связи, не разрушаемые плазмином. Повышение D-димера в плазме наблюдается примерно через 2 ч после начала тромбообразования [101]. D-димер метаболизируется в почках, время его полувыведения при сохранной функции почек составляет 6–8 часов.

Уровень D-димера повышается у пациентов с сепсисом, особенно при развитии ДВС-синдрома. При этом D-димер является маркером неблагоприятного исхода [102]. У пациентов с внебольничной бактериальной пневмонией средний уровень D-димера в плазме отмечается на уровне $0,691 \pm 0,185$ мкг/мл, среди пациентов нуждавшихся в госпитализации в ОРИТ $1,363 \pm 0,33$ мкг/мл, у умерших пациентов $1,429 \pm 0,511$ мкг/л. У пациентов с вирусом гриппа H1N1 с тяжелым течением заболевания, средний уровень D-димера отмечается на уровне $2,8 \pm 0,453$ мкг/л [103, 104].

У пациентов с COVID-19 при тяжелом течении заболевания отмечается ДВС синдром, синдром системного воспалительного ответа (ССВО), а также «цитокиновый шторм» с острым респираторным дистресс-синдромом, это дает основание полагать, что у них имеет место развитие коагулопатии с нарушением микроциркуляции и перфузии органов, а также с развитием полиорганной дисфункции. Проведенные ранее исследования выявили, что повышенный уровень D-димера достоверно ассоциирован с летальным исходом. Средний уровень D-димера при благоприятном исходе составил $0,8$ мкг/мл и $3,78$ мкг/мл у пациентов с летальным исходом [105].

Таким образом, Д-димер, по-видимому, можно использовать в качестве прогностического маркера у пациентов с COVID-19. В настоящем исследовании было уточнено прогностическое значение Д-димера у пациентов с COVID-19.

1.4.6 Витамин D

В научных исследованиях, посвященных COVID-19, часто поднимается вопрос о влиянии различных патологических состояний и хронических заболеваний. Схожие исследования проводятся относительно витамина D, активная форма которого, 1 α , 25-дигидроксивитамин D, является модулятором врожденного и приобретенного иммунитета [106]. Множество исследований посвящено изучению влияния дефицита витамина D на вероятность заражения вирусом SARS-CoV-2, а также на вероятность развития тяжелого течения заболевания. Ведутся споры о целесообразности приема препаратов витамина D в различных дозах с целью предотвращения инфицирования новой коронавирусной инфекцией. По результатам опубликованных исследований, однозначный вывод о влиянии дефицита витамина D на течение новой коронавирусной инфекции сделать не представляется возможным [106]. В связи с этим, нами было проведено исследование, целью которого было уточнение влияния концентрации витамина D на течение заболевания и исходы у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2.

В проведенное нами исследование на основании критериев включения и исключения вошли 43 пациента, находящиеся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии инфекционного корпуса НИИ им. Н.В. Склифосовского с подтвержденным диагнозом COVID-19. У 63% пациентов был выявлен дефицит витамина D (менее 20 нг/мл) и у 25% отмечалась недостаточность витамина D (от 20 до 30 нг/мл при нормальных значения более 30 нг/мл) [107]. У пациентов с пониженным содержанием витамина D (недостаточность + дефицит) на пике «цитокинового шторма» уровень СРБ был достоверно выше, а лимфоциты

достоверно ниже по сравнению с пациентами с нормальным уровнем витамина D. В связи с этим, был сделан вывод, что у больных с дефицитом витамина D отмечается более выраженный воспалительный ответ на начальных этапах заболевания и более тяжелое повреждение легких на этапе цитокинового шторма [106]. Однако это не приводит ни к увеличению агрессивности и длительности респираторной поддержки, ни к увеличению сроков пребывания пациентов в ОРИТ и в стационаре, ни к ухудшению исходов заболевания [106]. В этой связи нами был сделан вывод об отсутствии необходимости рутинного использования витамина D у пациентов с COVID-19.

1.5 Маркеры апоптоза

1.5.1 CD14+HLA-DR+ моноциты

CD14+HLA-DR+ моноциты маркер активации моноцитов, принадлежащий к главному комплексу гистосовместимости II класса. CD14+HLA-DR+ моноциты циркулируют в крови, а экспрессия этого маркера наиболее полно отражает активационное состояние клеток. CD14+HLA-DR+ моноциты, ответственны за представление антигена Т-клеткам. Моноциты у здоровых индивидуумов экспрессируют на своей поверхности молекулы CD14+HLA-DR+ в высокой плотности и легко определяются при помощи метода проточной цитометрии [108]. Однако моноциты с угнетенной экспрессией молекул CD14+HLA-DR+ не могут выполнять свою антигенпредставляющую функцию и не обладают способностью продуцировать воспалительные медиаторы в ответ на соответствующие стимулы [108, 109]. В свою очередь уменьшение экспрессии CD14+HLA-DR+ на моноцитах коррелирует с увеличением риска инфекционных и других осложнений для пациентов с травмой или серьезными ожогами [108, 110]. Аналогичный эффект наблюдали при панкреатите, при осложнениях в сердечно-сосудистой хирургии,

нейрохирургии, после трансплантации органов и тканей [110]. Значительное снижение экспрессии CD14+HLA-DR+на моноцитах может служить тестом для идентификации временной иммунодепрессии у пациентов, которая является весьма опасной в связи с возможностью инфекционных осложнений. Кроме всего перечисленного выше, уменьшение экспрессии CD14+HLA-DR+на моноцитах коррелирует с клиническими результатами у пациентов с сепсисом [108, 111]. У пациентов с быстрым восстановлением после серьезной травмы или операции уровень экспрессии CD14+HLA-DR+на моноцитах падал в течение нескольких часов после травмы или операции, но восстанавливался до нормального уровня в течение недели. Тогда как в тех наблюдениях, когда развивалась инфекция, возвращение экспрессии CD14+HLA-DR+к норме занимало 3 и более недель. С другой стороны, у пациентов с инфекцией и последующим сепсисом, приведшим к смерти, экспрессия CD14+HLA-DR+резко снижалась и никогда не возвращалась к нормальному уровню [108, 112]. Отмечается, что экспрессия CD14+HLA-DR+на моноцитах и их ответ на липополисахарид значительно снижены в результате хирургического стресса во время операции. Эти результаты могут объяснить ухудшение механизмов защиты пациента [112]. Некоторые авторы связывают процесс снижения экспрессии CD14+HLA-DR+с усилением продукции IL-10, IL 6, поскольку сыворотка пациентов с сепсисом снижает экспрессию CD14+HLA-DR+, а моноклональные антитела к IL-10, IL - 6 блокируют этот эффект. Активно влияют на снижение экспрессии CD14+HLA-DR+антигенов и глюкокортикоиды [113]. Таким образом, снижение экспрессии моноцитами CD14+HLA-DR+антигенов, которые играют критическую роль в представлении антигена Т-хелперам, является показателем развивающейся инфекции. [108]

Известно, что IL-6 ингибирует экспрессию CD14+HLA-DR+ [114], это приводит к гипотезе о том, что избыточная продукция IL-6 опосредует низкую экспрессию HLA-DR на моноцитах пациентов с COVID-19 [91]. По данным исследований была обнаружена обратная зависимость между количеством IL-6 в

сыворотке и абсолютным количеством молекул CD14+HLA-DR+на моноцитах пациентов с COVID-19.

Таким образом, уточнение прогностической роли CD14+HLA-DR+является одной из задач настоящего исследования.

1.5.2 Аннексиновый тест (ранний и поздний апоптоз)

Флуоресцентные методы исследования обладают одним из самых широких спектров возможностей в диагностике апоптоза. Для оценки используют метод, основанный на двойном флуоресцентном окрашивании клеток аннексином и йодистым пропидием. Аннексин V специфично и с высокой афинностью связывается с фосфатидилсеринем, который появляется на поверхности апоптотических и некротических клеток. Йодистый пропидий проникает только в клетки с поврежденной мембраной. Апоптотические клетки окрашиваются только аннексином V, поскольку они сохраняют целостность мембраны на ранних стадиях апоптоза, в то время как некротические клетки окрашиваются обоими реагентами [115]. Такой подход позволяет проводить количественный учет живых, некротизированных и подвергающихся апоптозу клеток.

Окрашивание клеток аннексином и пропидий йодом позволяет различать 3 категории клеток:

1. живые неокрашенные клетки (А-П).
2. связывающих только аннексин (А+П-), что соответствует ранней стадии апоптоза, когда не нарушена клеточная мембрана;
3. меченые аннексином и пропидием (А+П+) поздняя стадия, которая наступает при дефекте клеточной мембраны;

Развитие апоптоза при вирусных заболеваниях было подтверждено исследованиями по регистрации аннексин положительных апоптотических клеток. По литературным данным, штаммы вируса гриппа и их поверхностный белок нейраминидаза вызывают развитие апоптоза на ранних сроках инфицирования (4–

8 часов), что регистрировалось по появлению аннексин положительных клеток. Изучения апоптоза на разных стадиях процесса, является необходимой задачей при COVID-19.

Процент лимфоцитов, CD4 + и CD8 + Т-клеток был снижен у пациентов с COVID-19 по сравнению с контрольной группой. Что касается клинической тяжести, количество лимфоцитов, CD4 +, CD8 + Т-клеток и NK-клеток также снижалось в тяжелых случаях по сравнению с нетяжелым течением заболевания. Имеются данные, указывающие на увеличение апоптотических клеток у пациентов с COVID-19, которое было более значительным в тяжелых клинических случаях. Вызванная вирусной инфекцией гиперцитокинемия, может способствовать апоптозу и ингибированию роста гемопоэтических клеток, что может уменьшать образование и дифференцировку Т-клеток и других лимфоцитов. Согласно литературным данным, SARS-CoV-2 может имеет способность к индуцированию внутренних и внешних путей апоптоза иммунных клеток, что также особенно часто наблюдается при тяжелом течении COVID-19. Это может объяснять значительную лимфопению. Данные о апоптозе иммунных клеток - полезный индикатор для прогнозирования тяжести и исхода заболевания у пациентов с COVID-19. Результаты настоящего исследования могут помочь объяснить иммунопатогенез SARS-CoV-2, способствовать введению новых биомаркеров и терапевтических стратегий.

1.5.3 Проапоптотические белки

За внутренний путь апоптоза отвечают белки семейства Bcl2. Они контролируют выход проапоптотических белков из митохондрий [116]. В это семейство входят более 20 белков, которые могут быть разделены в три группы на основании их функций и количестве гомологичных доменов (Bcl2 Homology). Первая группа — проапоптотические белки, которые увеличивают выход митохондриальных белков и запуск апоптоза. Вторая группа —

антиапоптотические белки, которые подавляют апоптоз, блокируя выход митохондриальных белков. Оба вида могут связываться друг с другом в различных комбинациях, проявляя свои функции. Баланс между активностью двух видов белков определяет, выживет ли клетка или погибнет [116]. Антиапоптотическая группа представлена белками Bcl2 и BclXL, которые имеют четыре ВН домена (ВН1-4). Эти белки находятся на наружной мембране митохондрий и сохраняют ее непроницаемость. Таким образом это предотвращает утечку цитохрома с и других белков. Проапоптотические белки — Bax и Bak. У них есть три ВН домена (ВН1-3). После своей активации Bax и Bak повышают проницаемость внешней мембраны митохондрий. Возможно, это происходит путем образования канала, что позволяет белкам выходить из межмембранного пространства в цитоплазму. Bak даже в отсутствие апоптотического сигнала связан с наружной мембраной митохондрий, а Bax локализован в цитозоле и транспортируется к митохондрии только после апоптотического сигнала. Третья группа содержит проапоптотические белки Bad, Bim, Bid, Puma и Noxa. Они имеют домен ВН3, третий из четырех доменов ВН. Белки ВН3 играют ключевую роль в регулировании и стимулировании апоптоза и, таким образом, служат привлекательной целью терапевтического вмешательства. Следует отметить, что ВН3 домен является единственным общим доменом для всех членов семейства Bcl2. Он опосредует взаимодействия между проапоптотическими и антиапоптотическими белками [29, 32, 116, 117].

Белок p53 является продуктом гена-супрессора опухоли p53 и экспрессируется во всех клетках организма. При отсутствии повреждений генетического аппарата белок p53 находится в неактивном состоянии, а при появлении повреждений ДНК активируется. Активация состоит в приобретении способности связываться с ДНК и активировать транскрипцию генов. При превышении физиологически допустимого уровня повреждений задачей p53 становится избавление от генетически опасных дефектных клеток, что достигается либо путем активации апоптоза, либо за счет терминального выхода клеток из процесса деления, что является формой генетической смерти.

Факторы роста и другие сигналы выживания стимулируют выработку антиапоптотических белков. Они ингибируют апоптоз путем связывания проапоптотических белков на митохондриальной мембране. BH3-only белки, напротив, нейтрализуют активность антиапоптотических белков, таким образом способствуя собиранию проапоптотических белков Bax и Bak на поверхности митохондрии. Это приводит к выходу митохондриальных белков наружу [116]. Белок p53 в ответ на повреждение ДНК запускает апоптоз. Если повреждения не могут быть исправлены, белок p53 накапливается в клетке и активирует транскрипцию генов, кодирующих BH3-only белки Puma и Noxa. Также p53 действует на митохондрии и взаимодействует с антиапоптотическим белком Bcl-xL [116].

Регуляторный белок p53 участвует в большом количестве клеточных явлений, таких как клеточный цикл, апоптоз или старение, а также в иммунном и воспалительном ответе.

В случае вирусов гриппа отмечается, что между этими вирусами и p53 существует множество функциональных взаимодействий. Вирусы гриппа способны модулировать эндогенную экспрессию и транскрипционную активность p53 во время инфекции, помогая поддерживать клеточное состояние, благоприятное для репликации вируса

Полногеномный микроматричный анализ показал, что p53 регулируется экспрессией большого набора интерферон-индуцируемых генов, среди которых интерферон-индуцированные трансмембранные белки семейства IFITM1, IFITM2 и IFITM3. Они наиболее значимо подавляют экспрессию p53. Сбой активации интерферон-индуцированных трансмембранных белков (IFITM) увеличивал репликационную способность вируса гриппа, поскольку они утратили экспрессию белка p53, что значимо проявляется пониженной активностью каспаз и устойчивостью клеток к гибели.

Практически все вирусы разработали молекулярные инструменты для обхода клеточных механизмов, которые могут препятствовать их репликации,

распространению или сохранению. Среди них p53, ключевой белок для деления и выживания клеток, который также регулирует врожденные иммунные реакции.

Информация о том, как SARS-CoV-2 нацелен на путь p53 и манипулирует им, все еще скудна и ограничена. Однако для SARS-CoV-1 доступна более подробная информация. Поскольку два вируса имеют примерно 89% общей гомологии генома и демонстрируют много общих черт в механизмах инфицирования и патогенеза, разумно предположить, что оба вируса могут использовать сходные молекулярные механизмы для обхода белка p53. Данные экспериментальных исследований *in vitro* и внутриклеточных модельных систем показали, что белки nsp3 усиливают деградацию p53 [118]. Исследования, сравнивающие репликацию и рост SARS-CoV-1 показали, что титры вируса были до 1000 раз выше в отсутствие функционального p53 [118]. Таким образом, деградация p53, может представлять собой эффективный механизм устранения естественного барьера для вирусной репликации и распространения вируса SARS-CoV-2.

1.5.4 N-концевые киназы c-Jun (JNK)

JNK - стресс-активируемые протеинкиназы, участвующие в ответе на действие цитокинов, ультрафиолетовое облучение, тепловой и осмотический шок, в дифференцировке и апоптозе Т-лимфоцитов. Впервые идентифицированы по связыванию и фосфорилированию серина 63 и серина 73 транскрипционно активационного домена белка c-Jun.

JNK относится к семейству митоген-активируемых серин-треониновых протеинкиназ (поэтому JNK также называются MAPK8, MAPK9, MAPK10). JNK киназы имеют 10 изоформ, происходящих из 3 генов JNK1, JNK2 и JNK3. JNK1 и JNK2 обнаружены во всех клетках и тканях. JNK через фосфорилирование модифицируют активность некоторых белков, которые находятся в митохондриях или в ядре. Таким образом JNK регулируют различные функции клетки.

Воспаление, изменения уровня активных форм кислорода, ингибиторы синтеза белков и различные стрессовые факторы могут активировать JNK [119].

JNK - еще один важный патогенетический путь новой коронавирусной инфекции. При COVID-19 происходит гиперпродукция провоспалительных факторов и цитокинов, что приводит к активации N-концевых киназ c-Jun, критическому повреждению клеток и активации апоптоза [120,121].

Существует два основных нисходящих сигнальных пути JNK. Первый путь индуцирует передачу сигналов апоптоза. К этим сигналам относится активация белков BAD, BAX, Fas- лиганда и фактора некроза опухоли-альфа, которые запускают апоптоз. Этот Путь также включает активную транскрипцию белка p53. Результатом активации p53 является остановка клеточного цикла, репликации ДНК и запуск апоптоза.

Второй путь состоит в блокировании передачи сигналов выживания клеток. Однако подробные механизмы активации JNK во время коронавирусной инфекции и его участие в апоптозе, вызванном SARS-CoV-2, в значительной степени неизвестны.

1.5.5 Семейство протеинкиназ В и каспаз

Семейство включает в себя три внутриклеточных белка, кодируемых генами АКТ1, АКТ2, АКТ3. PKB присоединяют к разнообразным цитозольным белкам остатки фосфорной кислоты, регулируя таким образом их активность. Белки семейства протеинкиназ-В играют важную роль в регуляции клеточного цикла и апоптоза.

Альфа серин-треониновая протеинкиназа (PKB/Akt) участвует в путях, которые обеспечивают выживание клеток, путём ингибирования апоптоза. Также отмечается способность индуцировать биосинтез белка, таким образом, косвенно участвуя в гипертрофии скелетных мышц и общем росте тканей. При ее

ингибировании происходит сбой апоптоза, это является одной из причин онкологических заболеваний, и одним из механизмов усиления вирусной репликации.

Каспаза 8 — протеолитический фермент, кодируется одноимённым геном CASP8, который у человека локализован на коротком плече (p-плече) 2-ой хромосомы. Последовательная активация каспаз играет центральную роль в апоптотическом каскаде. Каспазы существуют в виде неактивных проферментов, состоящих из продомена, большой субъединицы протеазы и небольшой субъединицы. Активация каспаз требует протеолитического процессинга на внутренних аспарагиновых остатках для генерации гетеродимерного фермента, состоящего из больших и малых субъединиц. Каспаза-8 участвует в запрограммированной гибели клеток, вызванного активацией Fas-рецептора и различными проапоптотическими стимулами.

Каспаза-8 – иницирующая каспаза при передаче сигнала от всех типов рецепторов клеточной гибели [122]. Формирование апоптосомы FasL–Fas–FADD–прокаспаза-8 вызывает аутокаталитическую активацию каспазы-8 [123]. Активированная каспаза-8 может инициировать апоптоз двумя путями. Первый из них – непосредственная активация эффекторной каспазы-3. Вторым путём – обходной – запускается, если уровень каспазы-8 в апоптосоме недостаточен для активации каспазы-3. Каспаза-8 расщепляет белок Bid семейства Bcl-2, что приводит к высвобождению из митохондрий цитохрома c и к запуску митохондриального пути апоптоза.

Каспаза-9 — одна из каспаз человека, кодируемая геном CASP9 на 1-й хромосоме. Каспаза 9 играет важную роль в сигнальной цепочке апоптоза, вероятно, представляя наиболее «верхний» узел протеазного каскада апоптоза после сборки апоптосомы. Каспаза-9 активируется в апоптосомном комплексе, чтобы сохранить каталитический статус. После активации каспаза-9 непосредственно активирует каспазу-3 и каспазу-7. Дисфункция в активации каспазы-9 имеет

серьезные физиологические и патофизиологические последствия, ведущие к нарушению апоптоза.

Апоптоз является типом запрограммированной гибели клеток, запускаемой митохондриально-опосредованным (внутренним) или опосредованным активацией рецепторов смерти на поверхности клетки (внешним) процессом, включающим активацию группы каспаз [33, 124]. Активированные рецепторы смерти запускают внешний путь, что приводит к активации нижестоящих инициаторных каспаз-8,10 и эффекторных каспаз-3,7 [116]. Внутренний путь, активируемый внутриклеточными сигналами, приводит к накоплению цитохрома с в цитозоле и индуцирует образование апоптосомы с активацией каспазы-9 которая ответственна за стимуляцию эффекторных каспаз-3 и 7 [124].

Физиологические роли апоптоза в патогенезе инфекционного процесса сложны. С одной стороны, апоптоз считается эффективной противовирусной защитой, поскольку он уничтожает инфицированные и поврежденные клетки. С другой стороны, индуцированный патогенами апоптоз может способствовать инфицированию клеток и вносить вклад в вирусную патогенность. Многие вирусы эволюционировали, чтобы кодировать проапоптотические белки, которые нацелены на важнейшие компоненты апоптотического каскада.

Путь передачи сигналов PDK1-РКВ/Akt (протеинкиназа В) играет важную антиапоптотическую роль [101, 102]. РКВ / Akt представляет собой серин-треониновую киназу, которая может фосфорилироваться и активироваться с помощью PDK1 (3-фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа-1) и, в свою очередь, фосфорилировать и ингибировать его нижележащие субстраты, включая FKHRL1 (фактор транскрипции вилки). Фосфорилированная форма FKHRL1 сохраняется в цитоплазме, но, когда киназная активность РКВ/Akt нарушается, FKHRL1 перемещается в ядро и впоследствии способствует экспрессии проапоптотического гена Fas-L, который вызывает активацию каспазы-8. нарушенная активность РКВ / Akt также приводит к активации каспазы-9[125]. Таким образом, нарушение передачи сигналов PDK1-РКВ/Akt приводит к апоптозу через активацию каспаз.

Имеются данные о том, что кодируемый SARS-CoV-2 мембранный гликопротеин М может вызывать каспазозависимый апоптоз, посредством взаимодействия с PDK1 ингибируя активацию передачи сигналов PDK1-ПКВ/Akt. Гликопротеин М мембраны SARS-CoV-2 ослабляет уровни фосфорилирования ПКВ/Akt, FKHRL1, взаимодействуя с PDK1, подавляет передачу сигналов антиапоптотического каскада, запуская апоптоз. Передача сигналов PDK1-ПКВ/Akt является важным антиапоптотическим путем, который ингибирует каспазы-8 и -9. Это показывает, что вирус SARS-CoV-2 индуцирует апоптоз посредством ослабления передачи сигналов PDK1-ПКВ / Akt.

Таким образом, приблизительно у 70% пациентов с COVID-19 заболевание протекает в легкой или бессимптомной форме. Неблагоприятное течение заболевания обусловлено тяжестью вирусного повреждения, или, другими словами - патологической гиперактивацией иммунной системы в ответ на вирусную инвазию, проявляющейся в виде, прежде всего, «цитокинового шторма». «Цитокиновый шторм» приводит к развитию РДС и повреждению других органов, а также к формированию артериальных, венозных и микроциркуляторных тромбозов. Правильное определение текущей тяжести состояния и прогноза имеют первостепенное значение как для своевременного определения корректной тактики и стратегии ведения пациента, так для точного прогнозирования течения и исхода COVID-19. Для достижения этих целей необходимо проведение тщательного динамического анализа лабораторных маркеров вирусного повреждения и апоптоза. Представленное исследование посвящено изучению типичной для COVID-19 динамики и прогностической значимости С-реактивного белка, лейкоцитов, лимфоцитов, ЛДГ, ферритина, Д-димера, фибриногена, уровня HLA-DR⁺ лимфоцитов, анекинового теста, проапоптотических белков/белков семейства Bcl2, семейства протеинкиназ В и каспаз.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Общая характеристика клинических наблюдений и дизайн исследования

Научное исследование Квасникова Артема Михайлович на тему «Прогностическая значимость маркеров воспаления и апоптоза у пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2» одобрена локальным этическим комитетом. Протокол № 12-20 от 29.07.2020 года. Представленное исследование было проведено на базе ГБУЗ «НИИ СП им Н.В. Склифосовского ДЗМ» в период с июня 2020 г. по ноябрь 2020 г. В исследование включили 93 пациента (42 мужчины, 51 женщина) в возрасте от 28 до 91 года, медиана - 58 лет (рисунок 1; таблицы 2, 3), находившихся на лечении в реанимационных инфекционного корпуса института.

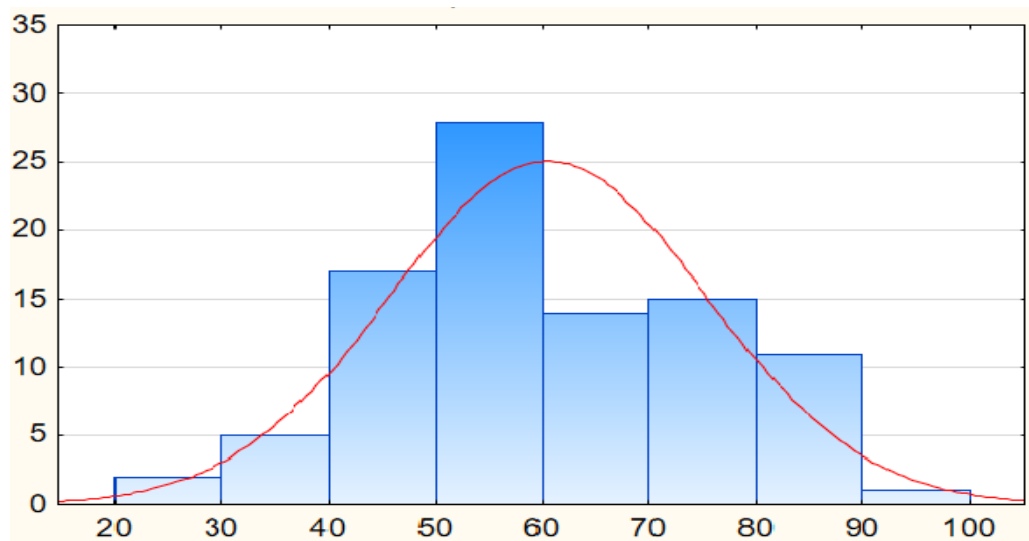


Рисунок 1 - Распределение пациентов по возрасту

Таблица 2 - Распределение пациентов по возрасту

критерий	Число пациентов	пол	
		мужчины	женщины
Количество пациентов, n (%)	93(100%)	42(45%)	51(55%)
Возраст, лет, медиана	58	57	65
Возраст, лет, Q1	50	47	55
Возраст, лет, Q3	72	63	76
Возраст, лет. Q3-Q1	22	16	21

Примечание: n-число наблюдений; Q1; Q3 - 1 и 3 квартиль; Q3-Q1- межквартильный диапазон.

Таблица 3 - Критерии нормального распределения пациентов по возрасту

Критерий Шапиро-Уилка		
Возраст	W	p
	0.98	0.74

При распределении пациентов по возрасту $p > 0,05$. Гипотеза о нормальности распределения пациентов по возрасту не отклоняется.

Критерии включения

Критериями включения являлись:

1. Возраст пациентов старше 18 лет;
2. Подтвержденная вирусная инфекция, вызванная SARS-CoV-2 (ПЦР, результаты анализа IgM, IgG или характерная КТ-картина),
3. Наличие пневмонии
4. Необходимость пребывания в ОРИТ более 48 часов.

Критериями исключения являлись:

1. Возраст менее 18 лет;
2. Онкологические и онкогематологические заболевания.

Группы пациентов в зависимости от степени тяжести и исхода заболевания

В зависимости от тяжести течения заболевания и его исхода пациенты были разделены на три группы:

группа 1 – неосложненное течение заболевания, благоприятный исход (n=53);

группа 2 – осложненное течение заболевания, благоприятный исход (n=26);

группа 3 – осложненное течение заболевания и неблагоприятный (летальный) исход (n=14).

Под неосложненным течением COVID-19 понимали пациентов с 3-х фазным течением COVID-19. Первая стадия заболевания - это инкубационный период с минимальными проявлениями ОРВИ. Вторая стадия (соответствует 2 неделе заболевания) – период разгара заболевания и стадия «цитокинового шторма», обусловленная реакцией иммунной системы на инвазию вируса SARS-CoV-2. На этой стадии может развиваться тяжелое состояние пациента, требующее госпитализации в отделение ОРИТ, вследствие вирусного повреждения легких. При неосложненном течении заболевания проводимая антицитокиновая терапия успешно блокирует «цитокиновый шторм», антитромботическая терапия позволяет избежать развития тромботических и тромбоэмболических осложнений. На третьей стадии заболевания (соответствует 3 неделе заболевания) при неосложненном течении состояние пациента стабилизируется, что позволяет перевести пациента из ОРИТ в госпитальное отделение и затем развивается благоприятный исход.

Под осложненным течением заболевания мы понимали развитие клинически значимых осложнений, напрямую не связанных с инвазией вируса SARS-CoV-2 или с реакцией на него иммунной системы пациента. Также под осложненным течением COVID-19 мы понимаем ситуации, когда терапия, направленная на профилактику типичных осложнений, главным образом, тромбоэмболических, оказывалась неэффективной. Осложнения COVID-19 следует разделить на

клинически значимые и незначимые. В группу 1 могли войти пациенты с клинически незначимыми осложнениями, которые не требовали изменения тактики лечения и не влияли на исход заболевания, например, нефлотирующий окклюзионный тромбоз суральных вен, выявленный при плановом ультразвуковом исследовании сосудов нижних конечностей, или незначимое носовое кровотечение, не требующее ни тампонады носа, ни трансфузии компонентов крови. Напротив, клинически значимые осложнения изменяют тактику лечения пациентов, влияют на исход заболевания. Именно такие пациенты с клинически значимыми осложнениями составили вторую и третью группы.

Клинически значимые осложнения:

1. Геморрагические осложнения (кровотечение вследствие которого наблюдается снижение уровня гемоглобина не более чем на 20 г/л, но вызывающее необходимость в проведении эндоскопического или хирургического гемостаза или выполнения задней тампонады носа при носовых кровотечениях; Массивное кровотечение - кровотечение при котором наблюдается снижение гемоглобина более чем на 20 г/л возникает необходимость в эндоскопическом, хирургическом, эндоваскулярном гемостазе [126]. Интракраниальное кровоизлияние, кровоизлияние в забрюшинное пространство).

2. Тромбоэмболические и тромботические осложнения

- ОКС
- Ишемический инсульт
- Ишемия нижних конечностей в следствии тромбоза магистральных артерий

- Мезентриальный тромбоз

- Флотирующий тромбоз крупных вен нижних конечностей

3. Острая почечная недостаточность

4. Острая печеночная дисфункция

5. Нозокомиальная бактериальная пневмония с необходимостью проведения респираторной поддержки

6. Нозокомиальная бактериальная инфекция мочевыводящей системы
7. Бактериальный эндокардит
8. Сепсис

Характеристика пациентов по группам

Первая группа пациентов

1 группу с неосложненным течением заболевания, благоприятным исходом заболевания, составили 53 пациента. (Рисунок 2, Таблицы. 4, 5)

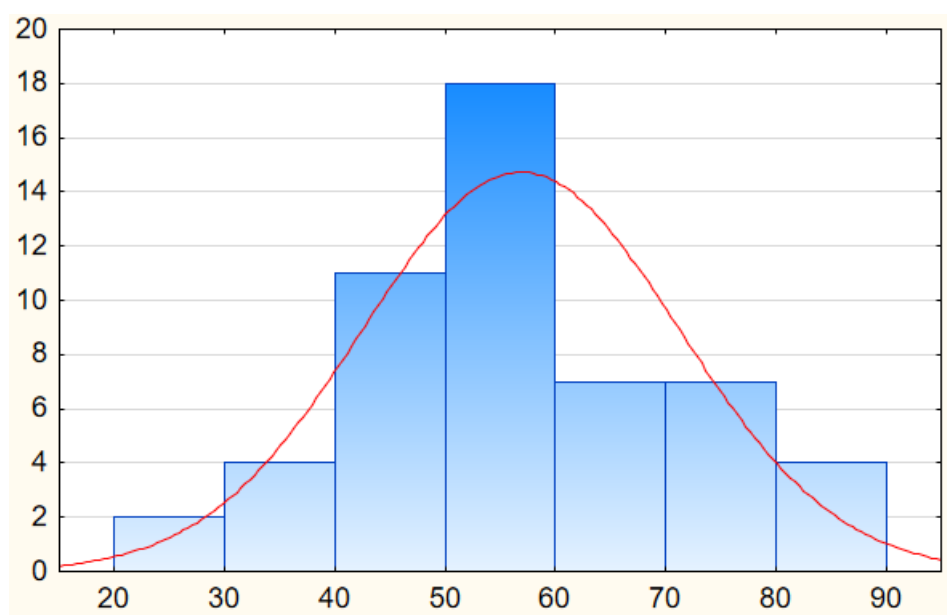


Рисунок 2 - Распределение пациентов первой группы по возрасту

Таблица 4 - Распределение пациентов первой группы по полу и возрасту

критерий	Число пациентов	пол	
		мужчины	женщины
Количество пациентов, n(%)	53(100%)	29(55%)	24(45%)
Возраст, лет, медиана	55	52	58
Возраст, лет, Q1	49	47	52,5
Возраст, лет, Q3	65	58	69,5
Возраст, лет. Q3-Q1	16	11	21

Примечание: n-число наблюдений; Q1; Q3 - 1 и 3 квартиль; Q3-Q1- межквартильный диапазон

Таблица 5 - Критерии нормального распределения пациентов первой группы по возрасту

Критерий Шапиро-Уилка		
Возраст	W	p
	0.976	0.37

При распределении пациентов по возрасту $p > 0.05$, данный критерий имеет нормальное распределение.

Вторая группа пациентов

Во 2 группу с осложненным течением, благоприятным исходом заболевания включили 26 пациентов. (Рисунок.3, Таблицы 6, 7)

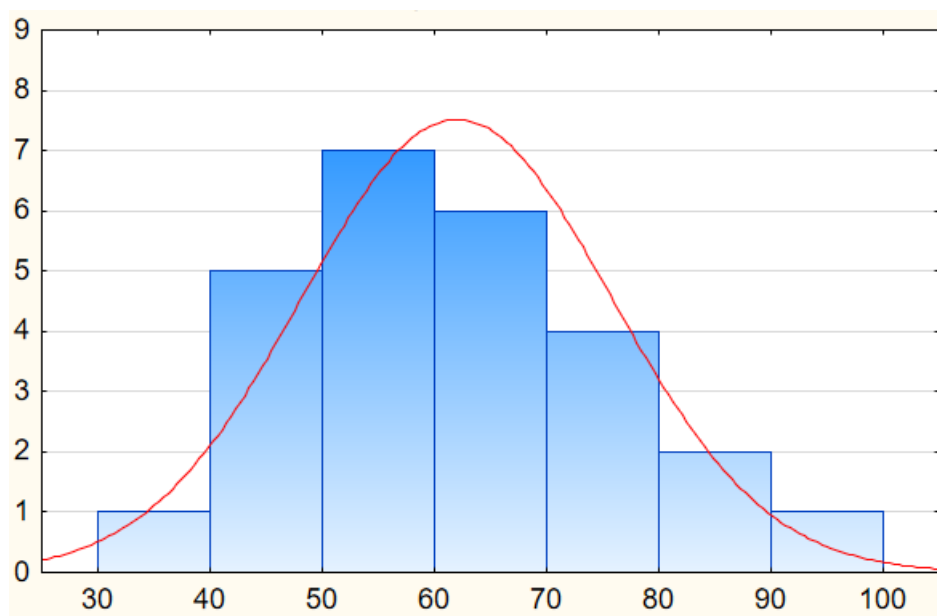


Рисунок 3 - Распределение пациентов второй группы по возрасту

Таблица 6 - Распределение пациентов второй группы по полу и возрасту

критерий	Число пациентов	пол	
		мужчины	женщины
Количество пациентов, n(%)	26(100%)	7(27%)	19(73%)
Возраст, лет, медиана	61,5	54	67
Возраст, лет, Q1	53	43	56

Продолжение таблицы 6

Возраст, лет, Q3	72	60	74
Возраст, лет. Q3-Q1	19	17	18

Примечание: n-число наблюдений; Q1; Q3 - 1 и 3 квартиль; Q3-Q1-межквартильный диапазон

Таблица 7 - Критерии нормального распределения пациентов второй группы по возрасту

Возраст	Критерий Шапиро-Уилка	
	W	p
	0.977	0.8

При распределении пациентов по возрасту $p > 0.05$, данный критерий имеет нормальное распределение.

Третья группа пациентов

В 3 группу с осложненным течением, неблагоприятным исходом заболевания включили 14 пациентов. (Рисунок.5, Таблицы. 11-13)

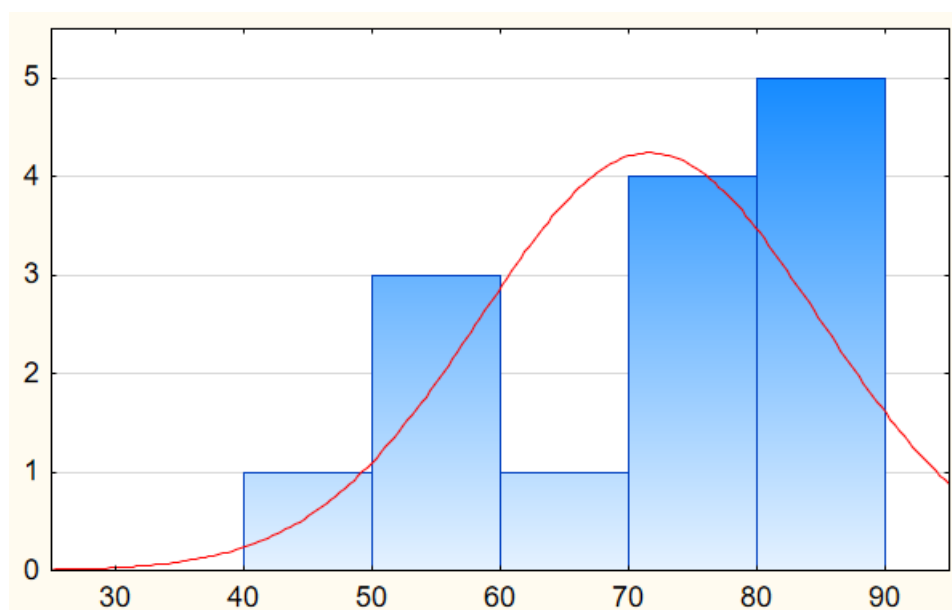


Рисунок 4 - Распределение пациентов третьей группы по возрасту

Таблица 8 - Распределение пациентов третьей группы по полу и возрасту

критерий	Число пациентов	пол	
		мужчины	женщины
Количество пациентов, n(%)	14(100%)	6 (42%)	8(57%)
Возраст, лет, медиана	76	68,5	80,5
Возраст, лет, Q1	60	56	66
Возраст, лет, Q3	82	77	83
Возраст, лет. Q3-Q1	22	21	17

Примечание: n-число наблюдений; Q1;Q3 - 1 и 3 квартиль; Q3-Q1-межквартильный диапазон

Таблица 9 - Критерии нормального распределения пациентов третьей группы по возрасту

Возраст	Критерий Шапиро-Уилка	
	W	p
	0.9	0.15

При распределении пациентов по возрасту $p > 0,05$, данный критерий имеет нормальное распределение.

2.2 Характеристика методов исследования

2.2.1 Клинический метод оценки состояния пациентов

Клиническую оценку состояния пациента производили ежедневно. Оценивался неврологический статус пациента. Исследование неврологического статуса включало оценку уровня сознания по шкале FOUR и шкале RASS при использовании седации, сегментарностоловых рефлексов, мышечной силы и мышечного тонуса, сухожильных и патологических стопных рефлексов. Оценивали состояние и цвет кожных покровов и слизистых оболочек, участие

вспомогательной мускулатуры в акте дыхания, втяжение уступчивых мест грудной клетки при дыхании [1].

2.2.2 Инструментальные методы

Осуществляли дискретное измерение температуры тела в подмышечной впадине у пациентов с благоприятным течением заболевания. Для непрерывного мониторинга температуры тела использовались прикроватные мониторы CARESCAPE B650 (GE, США).

Уровень насыщения крови кислородом (SpO₂%) измеряли неинвазивно, методом пульсоксиметрии с помощью прикроватных мониторов. CARESCAPE B650 (GE, США).

Для мониторинга гемодинамики использовали прикроватные мониторы CARESCAPE B650 (GE, США). Проводился мониторинг основных параметров гемодинамики: частота сердечных сокращений (ЧСС), артериальное давление (АД). Пациентам проводили неинвазивный мониторинг АД по методу Короткова. При развитии гемодинамической нестабильности и возникновении потребности в постоянной инфузии симпатомиметических и кардиотонических препаратов использовали инвазивный мониторинг АД. С целью инвазивного мониторинга АД проводили катетеризацию лучевой артерии или бедренной артерии. Применяли канюли Arterofix 22–24 G (Bbraun, Германия).

Компьютерную томографию (КТ) органов грудной клетки проводили при госпитализации пациента с подозрением на COVID-19, в динамическом режиме через сутки после проведения патогенетической терапии и далее не реже 1 раза в неделю в течение пребывания пациента в ОРИТ, а также в экстренном режиме при прогрессировании клинической картины. Компьютерная томография выполнялась при помощи томографов (Toshiba, Япония).

Рентгенологические исследования выполняли на передвижном рентгенологическом аппарате (Shimadzu, Япония).

Ультразвуковую диагностику проводили на аппарате Sonosite (Fujifilm, Япония).

2.2.3 Лабораторные методы обследования пациентов

Исследовали: клинический анализ крови, биохимический анализ крови, коагулогический анализ, иммунологический анализ. В клинический анализ крови входили следующие параметры: содержание гемоглобина (130-175 г/л), общее число лейкоцитов ($4-9 \cdot 10^9/\text{л}$), относительное и абсолютное содержание лимфоцитов (19-37%, $1.1-4.5 \cdot 10^9/\text{л}$), относительное содержание нейтрофилов (47-72%), содержание тромбоцитов ($150-370 \cdot 10^9/\text{л}$). Клинический анализ крови определяли на гематологическом анализаторе Advia 2120 (Siemens, Германия). В биохимическом анализе определяли следующие показатели: мочевины (2,5-6,4 ммоль/л), креатинин (72-127 мкмоль/л), альбумин (33-50 г/л), общий белок (66-82 г/л), уровень аланинаминотрансферазы (0-65 Ед/л) и аспартатаминотрансферазы (0-37 Ед/л) (АЛТ, АСТ), уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (81-236 Ед/л), прямой билирубин (0-5 мкмоль/л), непрямой билирубин (5-17,6 мкмоль/л). Биохимический анализ крови исследовали на аппарате Olympus AU640 (Olympus, Япония). Коагулогический анализ включал в себя: международное нормализованное отношение (МНО) (0,8–1,2 нмоль/мл), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) (25–31,3 с), протромбин по Квику (70–130%), протромбиновое время (9,4-12,5 с), концентрацию фибриногена (1,8-3,5 г/л), уровень Д-димера ($<0,5 \text{ мкг/мл}$). Коагулогический анализ определяли на анализаторе ACL TOP 700 (IL Werfen, США). Иммунологический анализ, включающий в себя определение С-реактивного белка (СРБ) (0,8–3 мг/л), прокальцитонина (ПКТ) (0,05–0,1 нг/мл). СРБ определяли на автоматическом анализаторе Atellica Neph 630 (Siemens, Германия). Прокальцитонин исследовали на иммунохемилюминесцентном анализаторе VIDAS (BioMérieux, Франция).

Кислотно-основное состояние, глюкоза плазмы крови и электролиты определялись при помощи аппарата ABL 800 (Radiometer Medical, Дания).

2.2.4 Методы оценки маркеров апоптоза

Забор крови для исследования маркеров апоптоза проводился на 5–12, и на 14–18 сутки от момента начала заболевания. Первая точка ассоциирована с временным интервалом развития пика «цитокинового шторма» и результаты лабораторных исследований совместно с клиническими данными на момент забора биологического материала характеризовали исходную тяжесть состояния пациента. Вторая точка исследования представляет собой период стихания клинико-лабораторной картины «цитокинового шторма» и выздоровление пациента, а в случае неблагоприятного течения, отмечается прогрессирование заболевания, также в этот период отмечается присоединение гнойно-септических осложнений и дальнейшее ухудшение состояния пациента.

Методом проточной цитометрии оценивали количество лимфоцитов крови, экспрессирующих CD95 (Fas-рецептор) (норма 37,3–45,4%), число лимфоцитов на ранней (Annexin V+/7AAD–) и поздней (Annexin V+/7AAD+) стадиях апоптоза (норма 1,9–5,5% и 0,01–0,06% соответственно), число антигенпрезентирующих моноцитов с фенотипом CD14+HLA-DR+ (норма $\geq 80\%$). Регуляторные белки апоптоза (фосфорилированную АКТ, JNK, BAD, Bcl-2, p-53, активную каспазу 8 и 9) определяли в лизате лимфоцитов периферической крови с помощью наборов Milliplex map Kit Early Apoptosis 7-plex Magnetic Bead Kit на платформе Luminex. Значение каждого параметра было представлено в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI, у. е.). Базовый уровень свечения составил: АКТ - 124, JNK – 190, BAD – 141, BCL2 – 18,6, Каспаза 8–82,4, Каспаза 9–29,0, p53 – 350 у.е.

2.2.5 Оценка тяжести состояния по шкалам

Состояние пациентов с COVID-19 при поступлении оценивали по шкале NEWS (National Early Warning Score) [70].

Таблица 10 - Шкала NEWS [127]

параметр	Баллы						
	3	2	1	0	1	2	3
Частота дыханий в минуту	≤8		9-11	12-20		21-24	≥ 25
SpO2%	≤91	92-93	94-95	≥ 96			
Потребность в оксигенации		Да		Нет			
САД (мм.рт.ст)	≤90	91-100	101-110	111-219			≥ 220
ЧСС	≤40		41-50	51-90	91-110	111-130	≥ 131
Нарушение сознания				Нет			да
Температура	≤35		35,1-36,0	36,1-39	38,1	≥ 39,1	

Интерпретация результатов по Шкале NEWS-2 0–2 – удовлетворительное состояние, 3–4 – средняя тяжесть, 5-7 – тяжелое состояние, > 7 – крайне тяжелое состояние.

Тяжесть органной дисфункции оценивали по шкале SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) [128]. Индекс SOFA равен сумме шести показателей. Чем выше показатель, тем более выражена дисфункция оцениваемой системы. Чем больше индекс в целом, тем больше степень полиорганной дисфункции. При сумме баллов более 12 предполагаются множественные органные дисфункции, сумма баллов более 20 указывает на крайне высокую вероятность летального исхода.

2.2.6 Методы интенсивной терапии

Все реанимационные пациенты получали терапию в строгом соответствии с российскими и международными рекомендациями, в том числе с актуальными временными клиническими рекомендациями министерства здравоохранения Российской Федерации.

Респираторная поддержка и искусственная вентиляция легких

Компенсировать гипоксемию и острую дыхательную дисфункцию начинали при помощи неинвазивных методов – респираторной поддержки оксигенотерапией потоком до 10-15 л/мин, высокопоточной оксигенацией (ВПО) потоком 30–60 л/мин, неинвазивной ИВЛ (НИВЛ) в режиме CPAP или PSV [129]. При нарастании явлений дыхательной дисфункции, угнетении уровня бодрствования, психомоторном возбуждении и невозможности проведения НИВЛ, мышечной слабости (дисфункция диафрагмы при полинейромиопатии критических состояний), нестабильности гемодинамики, нарушении биомеханики дыхания, ведущих к повышенной работе дыхания проводили интубацию трахеи и ИВЛ аппаратами Mindray SV300 (Mindray, Китай), Puritan Bennett 840 (Medtronic, Ирландия), Hamilton G-5 (Hamilton Medical, Швейцария) с протективными параметрами (ДО 6–8 мл/кг, Pplat < 30 см вод. ст) в сочетании с прон-позицией и с целевыми показателями газообмена pCO₂ 35–45 мм.рт.ст., PaO₂ 90–105 мм рт.ст. или SpO₂ 95–98% [1]. В зависимости от клинической картины использовались различные режимы ИВЛ: SIMV, BILEVEL, PSV, APRV, PRVC. На фоне проведения респираторной поддержки вне зависимости от ее агрессивности использовали прон-позицию, в которой пациент проводил не менее 12-16 часов в сутки.

Медикаментозная седация и миоплегия

При проведении ИВЛ пациентам с индексом PaO₂/FiO₂ >200 мм рт.ст. использовали седацию с целевыми значениями 0 -2 балла по шкале RASS [1]. Преимущественно седацию осуществляли пропофолом в дозе 1–2 мг/кг/ч. В

зависимости от клинической ситуации использовали дексамедетомидин, тиопентал натрия, морфин. Также с целью седации или для купирования психомоторного возбуждения применяли типичные или атипичные нейролептические препараты. У пациентов с $PaO_2/FiO_2 < 100$ мм. рт. ст. облигатно использовали нейромышечную блокаду в первые 24-48 ч после интубации.

Ввиду необходимости в длительной респираторной терапии, в первые трое суток после интубации выполняли трахеостомю пункционно-дилатационным или открытым методом.

В случае неэффективности ИВЛ, пром-позиционирования и достижения 3х и более при суммировании следующих критериев: Полисегментарная пневмония КТ 3-4, (1 балл); $PO_2/FiO_2 < 100$ более 12 часов (1 балл); $PO_2/FiO_2 < 80$ более 6 часов (2 балла); $PCO_2 > 60$ мм рт. ст. более 12 часов (2 балла) инициировали вено-венозную ЭКМО [1].

Поддержка кровообращения и инфузионная терапия

В качестве начальной инфузионной терапии использовали введение кристаллоидных растворов с предпочтительным введением сбалансированных кристаллоидных препаратов. Тактика инфузионной терапии заключалась в ведении пациентов в нулевом или отрицательном балансе жидкости с контролем диуреза и суточного гидробаланса [1]. У пациентов с артериальной гипотензией проводили инфузия вазопрессорных и/или инотропных препаратов с целью поддержания среднего АД в пределах 65–75 мм.рт.ст. [1]. В качестве вазопрессорного препарата первой линии использовали норэпинефрин. При снижении сердечного выброса, по данным ЭХО-КГ, присоединяли инфузию инотропных препаратов (Добутамин, Дофамин). При сохранении гемодинамической нестабильности, адекватной сократимости миокарда, отсутствии гиповолемии и у пациентов с рефрактерным шоком (потребность в инфузии норэпинефрина дозе $> 0,5$ мкг/кг/мин для поддержания среднего АД в диапазоне 65-75 мм.рт.ст к терапии добавляли низкие дозы глюкокортикоидов (гидрокортизон в дозе 150–200 мг/сут). [1]

Экстракорпоральная детоксикация и гемокоррекция

У пациентов с тяжелым и крайне тяжелым течением COVID-19 показанием к экстракорпоральному лечению являлись:

1. Прогрессирующая дыхательная недостаточность и/или полиорганная недостаточность.
2. ОПП 3 стадии по KDIGO
3. 3-кратное повышение уровня креатинина от исходного или повышение креатинина ≥ 350 ммоль/л;
4. Уровня диуреза $< 0,3$ мл/кг/час ≥ 24 часов или анурия ≥ 12 часов.
5. Уровень мочевины более 35 ммоль/л.
6. Уровень калия $> 6,5$ ммоль/л или ≥ 6 ммоль/л с признаками гиперкалиемии по данным ЭКГ.
7. Септический шок [70].

При наличии клиники бактериального сепсиса и септического шока, подтвержденных данными микробиологического исследования, применяли методы сорбции цитокинов с адсорберами CytoSorb (Cytosorbents Corp., США)

Нутриционная поддержка

Раннее энтеральное питание (ЭП) проводили пациентам с COVID-19, при отсутствии противопоказаний. Суточной потребностью в энергии считали 25–30 ккал/кг, суточной потребностью в белке - 1,2–1,5 г/кг. При высоком риске аспирации или непереносимости ЭП начинали парентеральное питание [1].

Гастропротективная терапия.

Все пациенты получали блокаторы протонной помпы (Омепразол в дозе 40–120 мг в сутки перорально или внутривенно в зависимости от клинической ситуации).

Патогенетическая терапия

У пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 и факторами риска тяжелого течения при наличии патологических изменений в легких, соответствующих КТ 1-2, в сочетании с двумя и более критериями:

1. SpO₂ - 97 и выше, без признаков одышки;
2. $3N \leq \text{уровень СРБ} \leq 6N$;
3. температура тела 37,5–37,9 °С в течение 3–5 дней;
4. число лейкоцитов - $3,5-4,0 \times 10^9$ /л; • абсолютное число лимфоцитов - $1,5-2,0 \times 10^9$

Использовали антагонисты рецептора ИЛ-6 - Левилимаб (подкожно) или блокатора ИЛ-6 Олокизумаба (подкожно) [1].

При патологических изменениях в легких, соответствующих КТ1-2 в сочетании с двумя и более критериями:

1. SpO₂ 94–97% одышка при физической нагрузке;
2. $6N \leq \text{уровень СРБ} < 9N$;
3. температура тела $\geq 38^\circ\text{C}$ в течение 3–5 дней;
4. число лейкоцитов - $3,0-3,5 \times 10^9$ /л;
5. абсолютное число лимфоцитов - $1,0-1,5 \times 10^9$ /л –

Назначали внутривенно антагонисты рецептора ИЛ-6 – Тоцилизумаб, Левилимаб, или блокатора ИЛ-6 Олокизумаб [1].

При тяжелом и крайне тяжелом течении применяли Тоцилизумаб в дозировке 4–8 мг на кг массы тела внутривенно. Антагонисты рецептора ИЛ-6 (Тоцилизумаб, Левилимаб), блокаторы ИЛ-6 (Олокизумаб) у пациентов со среднетяжелым, тяжелым и критическим течением COVID-19 назначали в сочетании с глюкокортикостероидами (ГКС) [1]. Применяли Дексаметазон 16–20 мг/сутки внутривенно в 2–3 введения. Максимальную дозировку применяли в течение 3–4 суток. Далее дозировку ГКС сокращали на 20–25% каждые 1–2 суток, далее на 50% каждые 1–2 суток до полной отмены [1]. При недостаточном эффекте Тоцилизумаба, Левилимаба, Олокизумаба для купирования «цитокинового шторма», повторное введение производили через 12 часов.

Антибактериальная и антимикотическая терапия

Антибактериальная терапия при наличии убедительных данных присоединения бактериальной инфекции (повышение ПКТ более 0,5 нг/мл,

появление гнойной мокроты, лейкоцитурии, лейкоцитоз $> 12 \times 10^9$ /л, повышение числа палочкоядерных нейтрофилов более 10%) [1].

У пациентов с нетяжелой пневмонией без сопутствующих заболеваний, не принимавших антибактериальные препараты за последние 3 месяца и не имеющих других факторов риска, применяли Амоксициллин/клавулановая кислота и другие ингибиторозащищенные аминопенициллины [1]. У пациентов с нетяжелой пневмонией с сопутствующими заболеваниями и/или принимавших за последние 3 месяца и/или имеющих другие факторы риска - Амоксициллин/клавулановая кислота и другие (ИЗП) в/в, в/м или цефалоспорины III поколения (Цефтриаксон, Цефтриаксон+сульбактам,) в/в, в/м или респираторные фторхинолоны (Левифлоксацин). У пациентов с тяжелой пневмонией и с факторами риска инфицирования *P. Aeruginosa* режим антибактериальной терапии составлял: Меропенем или имипенем или Пиперациллин/тазобактам или Цефепим или + Ципрофлоксацин или Левифлоксацин или Цефепим/сульбактам или Цефоперазон/сульбактам. Альтернативным режимом являлся: Пиперациллин/тазобактам или Цефепим или Меропенем или Имипенем + Азитромицин или Кларитромицин +/- Амикацин или Цефепим/сульбактам или Цефоперазон/сульбактам. У пациентов с факторами риска инфицирования энтеробактериями, и с факторами риска наличия бета-лактамаз с расширенным спектром (БЛРС) применяли: Имипенем или Меропенем или Эртапенем или цефепим/сульбактам или Цефоперазон/сульбактам + Азитромицин или Кларитромицин. Альтернативный режимом являлся: Имипенем или Меропенем или Эртапенем + Моксифлоксацин или Левифлоксацин [1, 70,].

В зависимости от данных диагностики чувствительности возбудителей нозокомиальных инфекций и результатов микробиологического исследования у пациентов использовались следующие антибактериальные препараты: Имипенем/циластатин, Линезолид, Меропенем, Полимиксин В, Тигециклин, Фосфомицин, Цефтазидим/авибактам, Цефоперазон/сульбактам.

Препаратами выбора для лечения инвазивного аспергиллеза являлся– Вориконазол (внутривенно 6 мг/кг 2 раза в 1-е сутки, затем 2 раза по 4 мг/кг), Амфотерицин В (0.5-0.7 мг/кг мг/кг в сутки) [1]. При выявлении *Candida spp.* Использовали триазольные препараты (Вориконазол внутривенно 6 мг/кг 2 раза в 1-е сутки, затем по 4 мг/кг 2 раза в сутки, флуконазол в/в 12 мг/кг в 1-е сутки, затем по 6 мг/кг/с) [1].

Антитромботическая терапия

Низкомолекулярные гепарины, в профилактических и лечебных дозах применяли у всех пациентов, находящихся в госпитальном отделении. Терапию продолжали до выписки. В отделении реанимации проводили терапию нефракционированным гепарином под контролем АЧТВ (с целевыми параметрами 35-50 сек.) в комбинации с антиагрегантной терапией ацетилсалициловой кислотой в дозе 100 мг в сутки. При наличии у пациентов сосудистых явлений (ОКС, ишемический инсульт) или постоянно принимавших антиагреганты проводили двойную антиагрегантную терапию (ацетилсалициловая кислота+клопидогрел, ацетилсалициловая кислота+тикагрелол)

Противовирусная терапия

Исследование проводили с июня 2020 года по ноябрь 2020 года. В соответствии с актуальными на тот период времени рекомендациями МЗ РФ и ДЗМ в качестве противовирусной терапии использовали азитромицин 250 мг/сут и гидроксихлорохин 800 мг/сут в 1 й день, далее 400 мг/сут.

2.2.7 Методы статистического анализа

В ходе статистической обработки данных для непрерывных и дискретных величин были рассчитаны средние, медианы, квантили уровней 25% и 75%, а также минимальные и максимальные значения. Для поиска различий между первой и второй точками был использован тест Вилкоксона для данных по пациентам с измерениями по обеим точкам. Поиск различий между группами пациентов

производился при помощи следующих тестов: попарного теста Манна-Уитни и теста Крускала-Уоллиса. Корреляционный анализ основан на ранговом методе Спирмена, также были рассчитаны доверительные интервалы для коэффициента корреляции. Прогностическая значимость потенциального предиктора устанавливалась двумя способами: тест Каплан-Майера и ROC-анализ. При сравнении кривых выживаемости был использован логарифмический ранговый тест. ROC-анализ (receiver operating characteristic) - один из способов оценки точности бинарной классификации путем построения графика в координатах (чувствительность; 1-специфичность). По данному графику рассчитывается показатель AUC (area under curve), который характеризует диагностическую и прогностическую ценность потенциального предиктора. При идеальной классификации AUC равен 1, а при случайной 0,5. По этому AUC 0,9-1 - отличная классификация, 0,8-0,9 - очень хорошая, 0,7-0,8 - хорошая, 0,6-0,7 - средняя, 0,5-0,6 - плохая. В ситуациях, когда AUC был меньше 0,5, классы объектов менялись на противоположные. Точка cut-off выбиралась при помощи максимизации индекса Юдена - максимизации разницы между чувствительностью и специфичностью. Уровень значимости был зафиксирован на уровне 0,05. Были использованы поправки на множественное тестирование методом Холма. Все вычисления производились при помощи следующих библиотек языка программирования python 3.10.6: pandas 1.4.4, numpy 1.23.2, sklearn 1.0.2, scipy 1.9.1, statsmodels 0.13.2, lifelines 0.27.3.

ГЛАВА 3. СИСТЕМНЫЕ МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ У РЕАНИМАЦИОННЫХ ПАЦИЕНТОВ С ВИРУСНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ, ВЫЗВАННОЙ SARS-CoV-2

3.1 Клинические и лабораторные результаты исследования

В исследование вошло 93 пациента. В разделе материалы и методы представлены демографические данные и основные характеристики. В зависимости от тяжести течения заболевания и его исхода, пациенты были разделены на три группы: группа 1 – неосложненное течение заболевания, благоприятный исход (n=53); группа 2 – осложненное течение заболевания, благоприятный исход (n=26); группа 3 – осложненное течение заболевания и неблагоприятный (летальный) исход (n=14).

В таблице 11 приведены данные о длительности пребывания пациентов в ОРИТ, в клинике, частоте НИВЛ, ИВЛ, ЭКМО и их длительности.

Таблица 11 - Длительность пребывания пациентов в ОРИТ, в клинике, частота НИВЛ, ИВЛ, ЭКМО и их длительность

Показатели	1 группа (n=53)	2 группа (n=26)	3 группа (n=14)	p
Частота НИВЛ (количество, %)	24 (45%)	23 (88%)	12 (86%)	<0.05
Частота ИВЛ	0	3 (11%)	14 (100%)	<0.05
Частота ЭКМО	0	0	1 (7%)	<0.05
Длительность НИВЛ суток (медиана, ст. откл)	3,5 ± 0,91	10 ± 4,08	12,75 ± 8,04	<0.05

Продолжение таблицы 11

Длительность ИВЛ суток (медиана, ст. откл)	0	45,33 ± 43,11	14,64 ± 10,11	<0,05
Длительность ЭКМО суток (медиана, ст. откл)	0	0	32	<0,05
Длительность пребывания в ОРИТ, суток, (медиана, ст. откл)	6,62 ± 3,27	21,28 ± 13,46	24,07 ± 10,79	<0,05
Длительность пребывания в клинике, суток, (медиана, ст. откл)	15,25 ± 7,85	30,54 ± 28,83	24,07 ± 10,79	<0,05

Таким образом, группы отличались по необходимости проведения респираторной поддержки. Все пациенты с осложненным течением заболевания и благоприятным исходом нуждались в проведении респираторной поддержки, преимущественно в неинвазивной вентиляции легких, тогда как пациенты с осложненным течением и неблагоприятным исходом требовали проведения инвазивной вентиляции легких, а большинство пациентов с неосложненным течением заболевания не нуждались в респираторной поддержке. У пациентов с осложненным течением и благоприятным исходом отмечается наибольшая длительность проведения респираторной поддержки и наибольшая длительность пребывания в стационаре. В связи с этим отмечается необходимость в определении лабораторных маркеров, которые позволяют прогнозировать осложненное течение заболевания и его исход. В таблице 12. приведена структура развившихся осложнений.

Таблица 12 - Структура развившихся осложнений

Тромботические осложнения				
	1 группа (n=53)	2 группа (n=26)	3 группа (n=14)	p
Тромбозы вен верхних и/или нижних конечностей	0	10 (38%)	9 (64%)	<0,05
ТЭЛА	0	1(3,84%)	4 (28%)	<0,05
Острая сердечно-сосудистая дисфункция	0	2(7,69%)	1(7,14%)	>0,05
Геморрагические осложнения				
Клинически значимые геморрагические осложнения	0	2 (8%)	3 (21%)	<0,05
Инфекционные осложнения				
Нозокомиальная бактериальная пневмония	0	7 (26,92%)	13 (92%)	<0,05
Сепсис	0	2 (7,69%)	8 (57,14%)	<0,05
Полиорганная дисфункция	0	4(15,38%)	13 (92%)	<0,05

Таким образом, у пациентов с неблагоприятным исходом отмечается наивысшая частота развития осложнений. Наиболее частыми осложнениями являлись тромбозы вен верхних и/или нижних конечностей, ТЭЛА, клинически значимые геморрагические осложнения нозокомиальная бактериальная пневмония, сепсис и, как следствие, этого полиорганная дисфункция.

Структура летальности представлена на рисунке 5. Наиболее частой причиной смерти пациентов с COVID-19 был сепсис, второй по частоте причиной летальных исходов являлась тромбоэмболия легочной артерии.

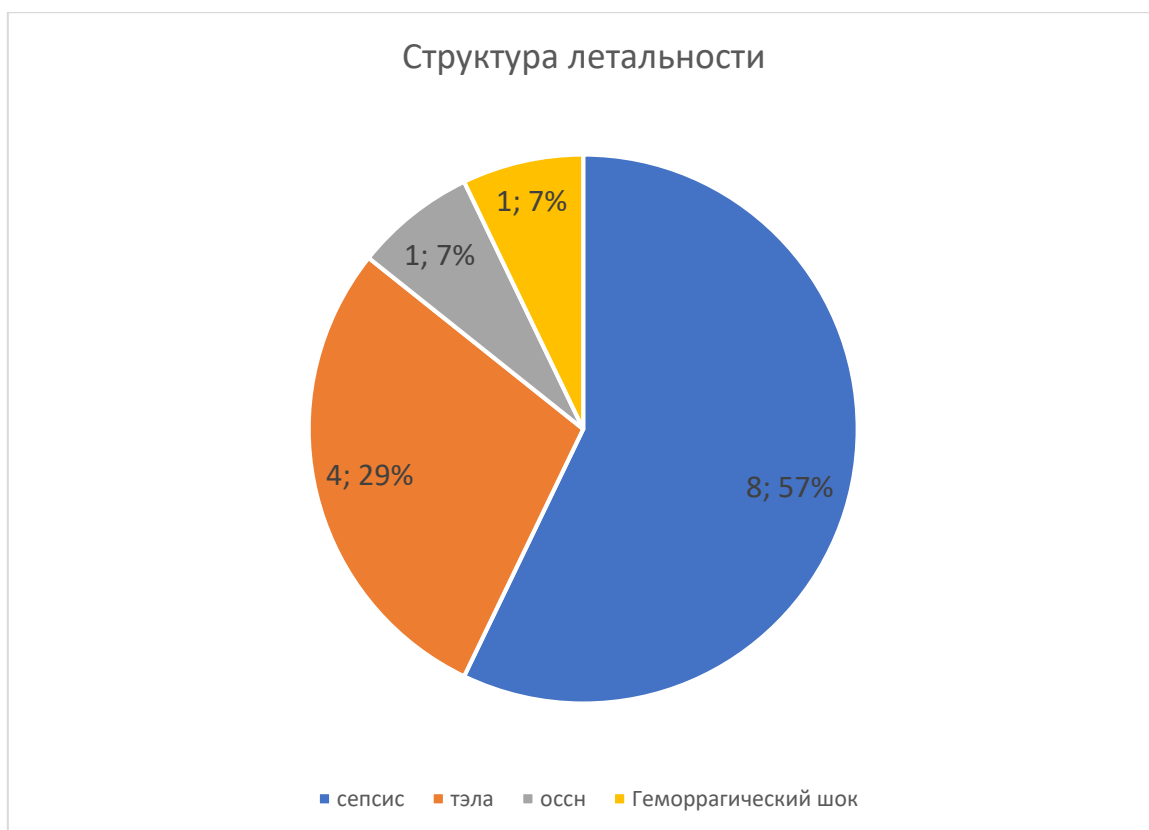


Рисунок 5 - Структура летальности пациентов с COVID-19 (n=14)

В соответствии с целью исследования и поставленными задачами сравнение групп проводили в двух исследовательских точках: исследовательская точка 1- на пике «цитокинового шторма» (5-12 сутки с момента начала заболевания). Исследовательская точка 2 – третья неделя с заболевания (14-18 сутки), когда завершается стадия «цитокинового шторма» и пациент выздоравливает и наступает благоприятный исход заболевания (группа 1), или на фоне развившихся осложнений наблюдается осложненное течение заболевания, которое может иметь благоприятный исход (группа 2) или неблагоприятный исход, летальный исход (группа 3). Ниже приведены наихудшие значения исследуемых показателей, которые были у пациентов в течение вышеуказанных временных интервалов (5-12 и 14-18 сутки) для все трех групп пациентов. Результатом исследования явилось определение референсных интервалов исследуемых лабораторных показателей, которые позволяют прогнозировать тяжесть течения заболевания и его исход. С этой целью в первой исследовательской точке (на пике «цитокинового шторма»)

провели сравнение группы 1 (неосложненное течение заболевания) с группами 2+3, пациенты которых имели осложненное течение заболевания. Осложнения манифестировали в исходе «цитокинового шторма». В начале развития «цитокинового шторма» и на его пике невозможно прогнозировать развитие осложнений на следующей стадии заболевания. Анализ, выполненный таким образом, позволяет выделить лабораторные данные, способные прогнозировать развитие осложненного течения заболевания на основании достоверности межгрупповых отличий (группа 1 в сравнении с группой 2+3) ($p < 0.05$). Дальнейшее построение ROC-кривых с расчетом чувствительности и специфичности тех показателей которые, продемонстрировали межгрупповые отличия, позволяет выделить параметры, которые способны достоверно прогнозировать развитие осложненного течения COVID-19 на следующей стадии заболевания (14-18 сутки).

Летальный исход у пациентов с COVID-19 может быть обусловлен тяжестью «цитокинового шторма» или осложнениями, развившимися уже после успешной коррекции ЦШ. При проведении межгруппового анализа полученных данных, когда происходит сравнение группы 1+2 и 3 в части касающейся умерших и выживших пациентов, можно сделать вывод о прогностической значимости анализируемых параметров для вероятности развития летального исхода вследствие тяжести «цитокинового шторма».

Целью сравнения групп на второй исследовательской точке было, во-первых, выявление лабораторных показателей, которые на этой стадии могли бы прогнозировать неблагоприятный исход заболевания (смерть пациента). Для этого пациенты были перегруппированы следующим образом: сравнение производили между пациентами с благоприятным исходом (группа 1+2) и пациентами с летальным исходом (группа 3). Для лабораторных показателей, показавших достоверные отличия ($p < 0,05$) были построены ROC-кривые и рассчитана чувствительность и специфичность. Такой анализ позволяет утверждать, что определенные лабораторные показатели с рассчитанной чувствительностью и

специфичностью будут прогнозировать летальный исход вследствие развития различных осложнений, но не вследствие «цитокинового шторма».

На пике «цитокинового шторма» (5-12 сутки с момента начала заболевания) группы пациентов отличались по следующим параметрам: Температура, КТ, NEWS, SOFA, Лимфоциты, С-реактивный белок, Ферритин, ЛДГ, Д-димер, Фибриноген, CD14+HLADR+

Таблица 13 - Сравнение групп пациентов на пике «цитокинового шторма» (5-12 сутки с момента начала заболевания)

Клинические показатели				
Показатель, Медиана (Q1; Q3)	1 группа (n=53)	2 группа (n=26)	3 группа (n=14)	p
Температура	37,8 (37,88;38,3)	38,87 (38,42;39,3)	38,9 (38,92;39,28)	0,0002*
КТ	1,65(1;2)	2,88(2,25;3)	3,43(3;4)	0,0001*
NEWS	3,58(2;4)	7,96(5;9)	10,86(10;14)	0,0001*
SOFA	0,96(0;1,25)	3,27(3;4)	4,86(5;5)	0,0003*
Лабораторные показатели				
Лейкоциты (*10 ⁹ /л)	5,19 (3,86;5,89)	6,66 (3,8;9,29)	8,56 (4,06;11,95)	1,0
Лимфоциты (*10 ⁹ /л)	1,16 (0,73;1,45)	1,09 (0,68;1,38)	0,56 (0,34;0,7)	0,002*
С-реактивный белок(мг/л)	44,99 (5,8;56,7)	93,2 (30,17;152,25)	127,37 (70,75;181,25)	0,001*
Прокальци тонин (Нг/мл)	0,07 (0,05;0,05)	0,17 (0,05;0,1)	0,1 (0,05;0,1)	0,09
Ферритин (мкг/л)	464,52 (129,5;707,0)	977,38 (475,0;1320,0)	1451,36 (961,0;1497,5)	0,001*
ЛДГ (ед./л)	264,88 (209,0;297,0)	356,58 (299,75;409,0)	394,45 (332,5;475)	0,0003*
Д-димер (Мкг/мл)	0,77 (0,43;0,96)	1,51(0,64;1,79)	5,39 (2,82;5,4)	0,0001*
Фибриноген (г/л)	4,62 (3,24;5,82)	5,13 (3,85;6,57)	6,99 (5,83;8,79)	0,04*
CD14+HLADR+ (%)	87,52 (82,6;97,0)	76,17 (64,88;92,72)	43,09 (16,65;73,9)	0,0001*

Примечание: Q1; Q3 - 1 и 3 квартили; * - статистически различающиеся показатели (критерий Краскела-Уоллиса)

Клинические показатели, такие как температура тела, степень поражения легких по данным компьютерной томографии, тяжесть состояния пациентов по шкале NEWS и тяжесть органной дисфункции по шкале SOFA достоверно отличались между группами. Пациенты первой группы характеризовались легким течением по шкале NEWS, не имели органной дисфункции и отличались меньшей площадью поражения легких по данным компьютерной томографии. У пациентов третьей группы отмечался значительный подъем температуры тела, выраженное поражение легких вплоть до критического, тяжелое состояние по шкале NEWS и наличие полиорганной дисфункции согласно шкале SOFA.

Лабораторные показатели, отражающие тяжесть состояния реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2 у пациентов 1 группы характеризовались отсутствием лейкоцитоза, отсутствием лимфопении, подъемом уровней С-реактивного белка, ферритина, ЛДГ - 264,88 ед./л (Q1; Q3 (209,0;297,0), Д-димера - 0,77 мкг/мл (Q1; Q3 0,43;0,96), фибриногена. Не значительным снижением процентного количества CD14+HLADR+ - 87.52 % (Q1; Q3 82.6;97,0). У пациентов второй группы с осложненным течением COVID-19 отмечалась лимфопения, у части пациентов отмечался лейкоцитоз. Наблюдалось значительное повышение уровня С-реактивного белка, ферритина, ЛДГ - 356,58 ед./л (Q1; Q3 299,75;409,0), д-димера 1,51 мкг/мл (Q1; Q3 0,64;1,79), фибриногена. Значительно снижался уровень CD14+HLADR+ 76,17% (Q1; Q3 64,88;92,72). Наивысшие показатели уровня С-реактивного белка - 127,37 мг/л (Q1; Q3 70,75;181,25), ферритина 1451,36 мкг/мл (Q1; Q3 961,0;1497,5), ЛДГ - 394,45 ед.л (Q1; Q3 332,5;475), д-димера 5,39 мкг/мл (Q1; Q3 2,82;5,4), фибриногена - 6,99 г/л (Q1; Q3 5,83;8,79), максимальное снижение уровня CD14+HLADR+ 43,09% (Q1; Q3 16,65;73,9) и лимфоцитов $0,56 \cdot 10^9$ /л (Q1; Q3 0,34;0,7) регистрировались у пациентов 3 группы с осложненным течением заболевания и летальным исходом.

Статистически достоверно группы отличались по следующим показателям: температура, КТ, NEWS, SOFA, уровень лимфоцитов, С-реактивного белка, ферритина, ЛДГ, Д-димера, фибриногена, CD14+HLADR+. Различий между

группами при исследовании уровня лейкоцитов и прокальцитонина не было выявлено.

3.2 Клинические и лабораторные результаты исследования среди пациентов с осложненным и неосложненным течением при исследовании, выполненном на этапе «цитокинового шторма»

В таблице 14 приведены сравнительные данные пациентов на пике «цитокинового шторма» у которых данное заболевание протекало как неосложненное (группа 1) и осложненное (группа 2+ группа 3). Этот анализ необходим для определения маркеров прогноза осложненного течения заболевания. Выявленные маркеры будут прогнозировать вероятность развития осложненного течения на следующем после «цитокинового шторма» этапе заболевания.

Таблица 14 - Сравнение клинико-лабораторных показатели пациентов на пике «цитокинового шторма» в соответствии с тяжестью течения заболевания

Клинические показатели			
Показатель, Медиана (Q1; Q3)	Неосложненное течение (1 группа; n=53)	Осложненное течение (2 группа + 3 группа; n=40)	p
Температура	37,88(37,38;38,3)	38,88(38,65;39,3)	0,0001*
КТ	1,65(1,0;2,0)	3,08(3,0;4,0)	0,0001*
NEWS	3,58(2,0;4,0)	8,98(5,0;12,5)	0,0001*
SOFA	0,96(0,0;1,25)	3,82(3,0;5,0)	0,0001*
Лабораторные показатели			
Лейкоциты (*10 ⁹ /л)	5,19(3,86;5,89)	7,32(3,83;9,55)	0,8
Лимфоциты (*10 ⁹ /л)	1,16(0,73;1,45)	0,9(0,54;1,13)	0,46
С-реактивный белок (мг/л)	44,99(5,8;56,7)	105,16(48,25;159,25)	0,0007*
Прокальцитонин (Нг/мл)	0,07(0,05;0,05)	0,14(0,05;0,1)	0,02*

Продолжение таблицы 14

Ферритин (мкг/л)	464,52(129,5;707,0)	1163,59(540,25;1423,0)	0,01*
ЛДГ (ед./л)	264,88(209,0;297,0)	368,49(314,5;409,5)	0,0001*
Д-димер (Мкг/мл)	0,77(0,43;0,96)	2,87(0,84;3,35)	0,0001*
Фибриноген (г/л)	4,62(3,24;5,82)	5,78(4,29;7,33)	0,1
CD14+HLADR+ (%)	87,52(82,6;97,0)	36,59(50,12;87,72)	0,0001*

Примечание: Q1; Q3 - 1 и 3 квартили; * - статистически различающиеся показатели (U-критерий Манна — Уитни)

У пациентов в исследуемых группах отмечался подъем температуры, с более высокими цифрами лихорадки при осложненном течении заболевания. Среди пациентов с вирусной пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, находящихся в отделении реанимации, рентгенологически отмечалась тяжелая пневмония с поражением легочной ткани от 25% до 50% легочной ткани у пациентов с неосложненным течением и от 50% до тотального поражения легочной ткани у пациентов с осложненным течением заболевания. Тяжесть состояния по шкале NEWS характеризовалась как средней тяжести 3,58 баллов (Q1; Q3 2,0; 4,0) у пациентов с неосложненным течением заболевания. У пациентов с осложненным течением заболевания тяжесть состояния по шкале NEWS оценивалась как крайне тяжелое 8,98 баллов (Q1; Q3 5,0; 12,5). Среди пациентов с осложненным течением заболевания при оценке по шкале SOFA наблюдалась органная дисфункция 3,82 баллов (Q1; Q3 3,0; 5,0) в сравнении с пациентами с неосложненным течением заболевания 0,96 баллов (Q1; Q3 0,0; 1,25) у которых отмечалось изолированное поражение респираторной системы. Клинические показатели такие, как температура, КТ, NEWS, SOFA достоверно различались между группами пациентов ($p < 0,05$).

На пике «цитокинового шторма» были выявлены достоверные отличия в группах пациентов, у которых в дальнейшем разовьется осложненное течение и у которых течение заболевания будет неосложненным. Группы различались по следующим лабораторным параметрам. Значения уровня СРБ у пациентов с

неосложненным течением заболевания были выше нормы, у пациентов с осложненным течением заболевания уровень СРБ характеризовался значительно более высоким подъемом и составлял 105,16 мг/л (Q1; Q3 48,25; 159,25). Значения ферритина были значительно выше у пациентов с осложненным течением заболевания 1163,59 мкг/л (Q1; Q3 540,25; 1423,0). Вне зависимости от того, какое будет течение заболевания уровень фибриногена был выше нормы. Этот показатель отражает тяжесть «цитокинового шторма», но не прогнозирует развитие осложненного течения заболевания на следующем этапе. Увеличение описанных показателей свидетельствует о развитии системного воспалительного ответа у пациентов с неосложненным течением заболевания. Среди пациентов с осложненным течением заболевания в следствии гиперактивации и дисрегуляции иммунного ответа развивался «цитокиновый шторм» и как следствие этого отмечается значительный подъем маркеров воспалительного ответа. СРБ и ферритин, ЛДГ, Д-димер, CD14+HLADR+ клетки, имели статистически значимые отличия между группами пациентов ($p < 0,05$). Лейкоциты не имели различий между группами ($p > 0,05$). Уровень прокальцитонина был выше у пациентов с осложненным течением заболевания 0,14 нг/мл (Q1; Q3 0,05; 0,1). Для этих параметров за исключение прокальцитонина ниже приведен ROC-анализ. Прокальцитонин стал исключением, поскольку как у пациентов с осложненным течением, так и с неосложненным течением он был менее 0,5 нг/мл, что свидетельствует о вирусном генезе воспаления и отсутствии бактериального компонента. Нормальный уровень параметра как при осложненном, так и при неосложненном течении заболевания не может обладать прогностической значимостью даже, если его отличия были достоверны.

Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень СРБ более 52 мг/л на пике «цитокинового шторма» свидетельствует о развитии клинически значимых осложнений (осложненного течения заболевания) на следующем этапе (14-18 сутки) заболевания с чувствительностью 75% и специфичностью 69%. Значение AUC ROC – 0.75 (рисунок 6).

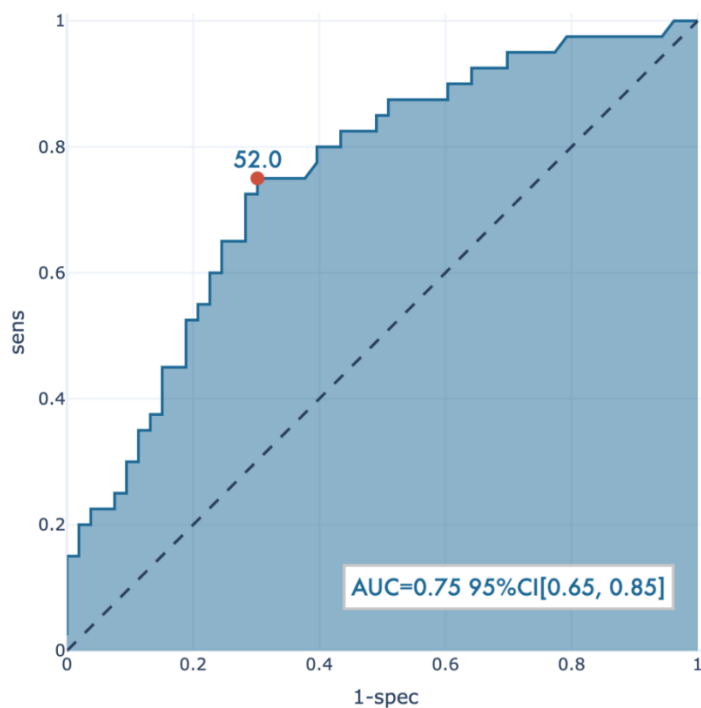


Рисунок 6 - Чувствительность и специфичность уровня СРБ для прогнозирования тяжести течения заболевания у пациентов во время «цитокинового шторма» (ROC-анализ)

Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень ЛДГ более 296 Ед/л на пике «цитокинового шторма» свидетельствует о развитии клинически значимых осложнений (осложненного течения заболевания) на следующем этапе (14-18 сутки) заболевания с чувствительностью 78% и специфичностью 87%. Значение AUC ROC – 0.78. (Рисунок 7).

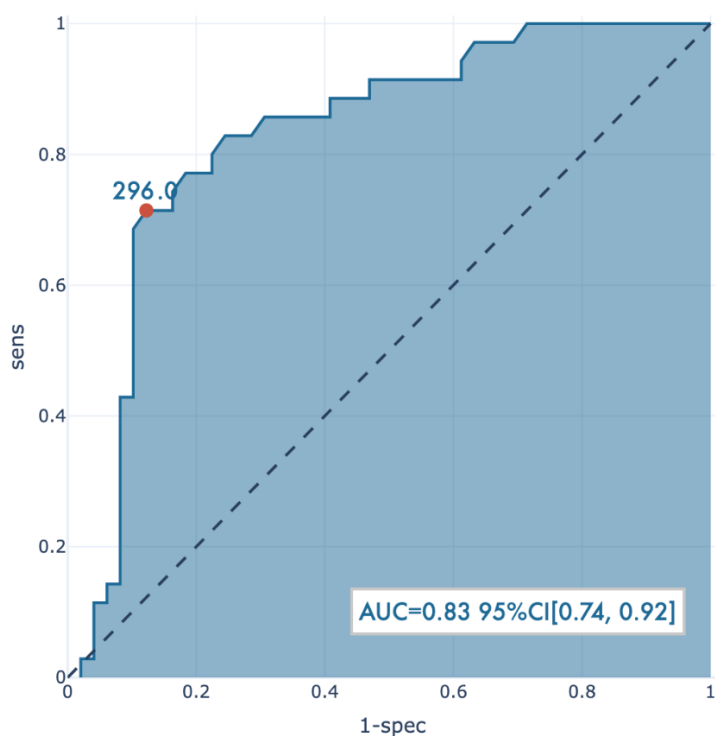


Рисунок 7 - Чувствительность и специфичность уровня ЛДГ для прогнозирования тяжести течения заболевания у пациентов во время «цитокинового шторма» (ROC-анализ)

Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень Д-димера более 1.37 мкг/мл на пике «цитокинового шторма» свидетельствует о развитии клинически значимых осложнений (осложненного течения заболевания) на следующем этапе (14-18 сутки) заболевания с чувствительностью 62% и специфичностью 87%. Значение AUC ROC – 0.77. (Рисунок 8).

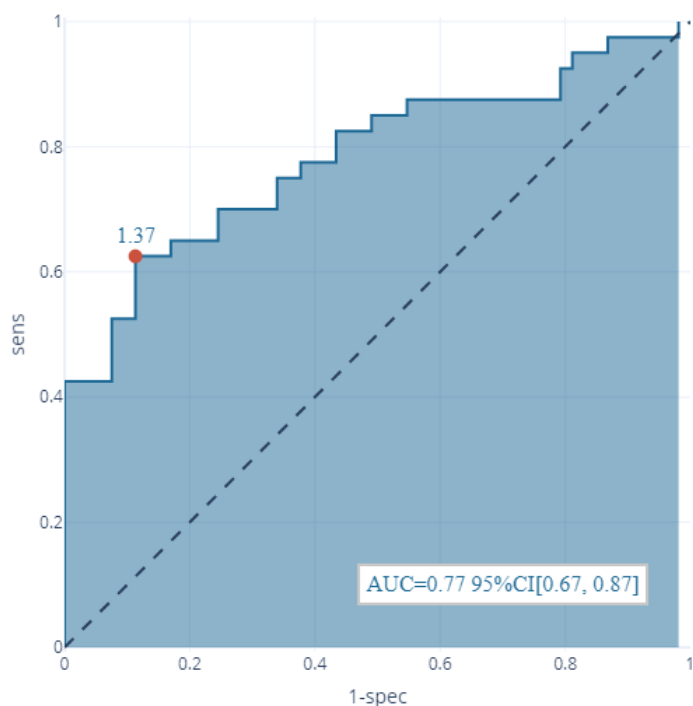


Рисунок 8 - Чувствительность и специфичность уровня д-димера для прогнозирования тяжести течения заболевания у пациентов во время «цитокинового шторма» (ROC-анализ)

Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень CD14+HLADR+ менее 76,3% на пике «цитокинового шторма» свидетельствует о развитии тех или иных клинически значимых осложнений (осложненного течения заболевания) на следующем этапе (14-18 сутки) заболевания с чувствительностью 88% и специфичностью 57%. Значение AUC ROC – 0.76 (рисунок 9).

Количество CD14+HLADR+ моноцитов, связанных с выполнением функции специфического распознавания антигена, выражено снижается в группе с осложненным течением заболевания, что, характеризует иммуносупрессивное воздействие вируса SARS-CoV-2.

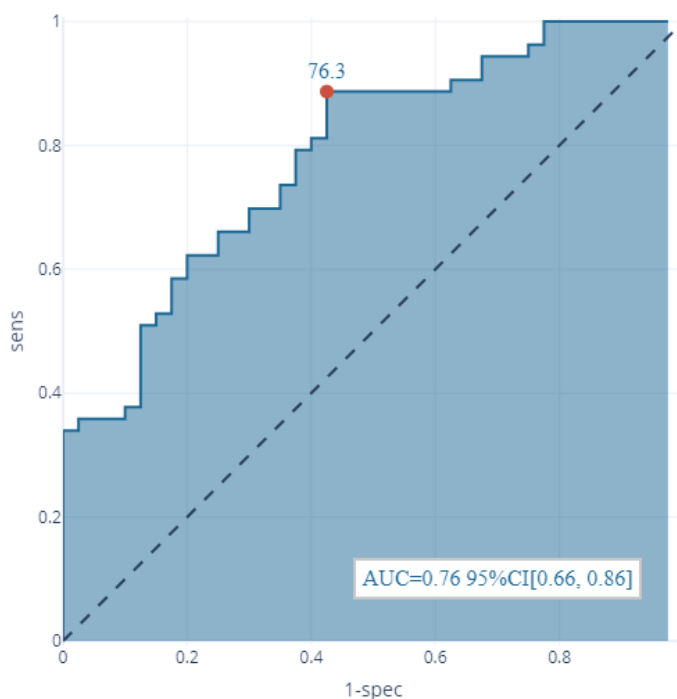


Рисунок 9 - Чувствительность и специфичность уровня CD14+HLADR+ для прогнозирования тяжести течения заболевания у пациентов во время «цитокинового шторма» (ROC-анализ)

Таким образом, выявлен диапазон значений таких маркеров как СРБ, ЛДГ, д-димер и CD14+HLADR+, при котором возможно прогнозировать тяжесть течения заболевания и его исход. При значениях СРБ менее 52 мг/л предполагается неосложненное течение заболевания, при значениях свыше 52 мг/л прогнозируется осложненное течение. При значениях ЛДГ менее 296 Ед/л предполагается неосложненное течение заболевания, при значениях свыше 296 Ед/л прогнозируется осложненное течение. При значениях д-димера менее 1.37 мкг/л предполагается неосложненное течение заболевания, при значениях свыше 1.37 мкг/л прогнозируется осложненное течение. При значениях CD14+HLADR+ более 76,3% прогнозируется неосложненное течение заболевания, при значениях менее 76,3% предполагается осложненное течение заболевания.

3.3 Клинические и лабораторные результаты исследования среди пациентов с благоприятным и летальным исходом при исследовании, выполненном на этапе «цитокинового шторма»

Разделение пациентов на пике «цитокинового шторма» на группы в зависимости от исхода заболевания – благоприятный исход (группа 1+ группа 2) или летальный исход (группа 3) позволяет выявить лабораторные параметры, с помощью которых можно прогнозировать развитие летального исхода. Вероятно, эти показатели будут свидетельствовать о развитии летального исхода вследствие тяжести самой коронавирусной инфекции и выраженности дисбаланса иммунного ответа на инвазию вируса SARS-CoV-2, а именно тяжести «цитокинового шторма». ROC-анализ продемонстрирует чувствительность и специфичность, достоверно отличающихся параметров, которые прогностически значимы в отношении развития летального исхода.

Таблица 15 - Сравнение групп пациентов на пике «цитокинового шторма» в соответствии с исходом заболевания

Клинические показатели			
Показатель, Медиана (Q1; Q3)	Благоприятный исход (1 группа + 2 группа; n=79)	Летальный исход (3 группа; n=14)	p
Температура	38,21(37,52;38,88)	38,9(38,92;39,28)	0,04*
КТ	2,06(1,0;3,0)	3,43(3,0;4,0)	0,0006*
NEWS	5,04(3,0;6,0)	10,86(10,0;14,0)	0,0003*
SOFA	1,73(1,0;3,0)	4,86(5,0;5,0)	0,0001*
Лабораторные показатели			
Лейкоциты (*10 ⁹ /л)	5,61(3,82;6,3)	8,56(4,06;11,95)	1,0
Лимфоциты (*10 ⁹ /л)	1,14(0,7;1,42)	0,56(0,34;0,7)	0,005*
С-реактивный белок (мг/л)	60,86(13,45;80,1)	127,37(70,75;181,25)	0,002*
Прокальцитонин (Нг/мл)	0,1(0,05;0,07)	0,1(0,05;0,1)	0,9
Ферритин (мкг/л)	682,48(192,0;804,5)	1451,36(961,0;1497,5)	0,04*

Продолжение таблицы 15

ЛДГ (ед./л)	295,03(217,0;360,0)	394,45(332,5;470,5)	0,04*
Д-димер (мкг/мл)	1,01(0,45;1,22)	5,39(2,82;5,4)	0,0001*
Фибриноген (г/л)	4,79(3,44;6,2)	6,99(5,83;8,79)	0,003*
CD14+HLADR+(%)	83,78(77,75;96,0)	43,09(16,65;73,9)	0,0002*

Примечание: Q1; Q3 - 1 и 3 квартили; * - статистически различающиеся показатели (U-критерий Манна — Уитни)

Среди пациентов изучаемых групп отмечался подъем температуры, наиболее значимый при неблагоприятном исходе заболевания. У реанимационных пациентов с COVID-19 обеих групп рентгенологическая картина характеризовалась тяжелой пневмонией с поражением от 25% до 75% легочной ткани у пациентов с неосложненным исходом и от 50% до тотального поражения легочной ткани у пациентов с летальным исходом. Тяжесть состояния по шкале NEWS характеризовалась как тяжелое 5,04 баллов (Q1; Q3 3,0; 6,0) у пациентов с благоприятным исходом. У пациентов с неблагоприятным исходом тяжесть состояния по шкале NEWS оценивалась как крайне тяжелое 10,86 баллов (Q1; Q3 10,0; 14,0). Пациенты с летальным исходом при оценке по шкале SOFA имели более высокую бальную оценку в сравнении с пациентами с благоприятным исходом заболевания (4,86 и 1,73 баллов соответственно).

Среди лабораторных показателей, отражающих тяжесть состояния реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS – CoV- 2 прослеживались значительные отличия. Среди маркеров воспаления у пациентов с летальным исходом отмечался лейкоцитоз $8.56 \cdot 10^9$ /л (Q1; Q3 4.06;11,95), тогда как у пациентов с благоприятным исходом уровень лейкоцитов оставался в пределах референсных значений. Уровень СРБ у пациентов с благоприятным исходом был значительно выше нормы и составлял 60,86 мг/л (Q1; Q3 13,45;80,1), у пациентов с летальным исходом значения СРБ были в два раза выше в сравнении с выжившими пациентами и составляли 127,37 мг/л (Q1; Q3 70,75; 181,25). Уровень ферритина и фибриногена как маркеров острой фазы воспаления был значительно выше у пациентов с летальным исходом. Фибриноген отражает тяжесть

«цитокинового шторма», его повышение отмечается как при осложненном, так и при неосложненном течении. Факт повышения фибриногена не свидетельствует о развитии осложненного течения, однако, существенное повышение фибриногена ($>6,99$ г/л) достоверно прогнозирует летального исхода. Значения данных показателей характеризовали наиболее выраженный воспалительный ответ в группе пациентов с летальным исходом. Лимфоциты, СРБ, ферретин, ЛДГ, Д-димер, фибриноген, CD14+HLADR+ клетки, имели статистически значимые отличия между группами пациентов ($p < 0,05$). Группы не имели различий между лейкоцитами ($p > 0,05$). Уровень прокальцитонина как маркера бактериального компонента воспаления достоверно не различался между группами пациентов.

Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень лимфоцитов менее $0.87 \cdot 10^9$ /л на пике «цитокинового шторма» свидетельствует о развитии летального исхода на следующем этапе (14-18 сутки) заболевания с чувствительностью 65% и специфичностью 85%. Значение AUC ROC – 0.74. (Рисунок 10).

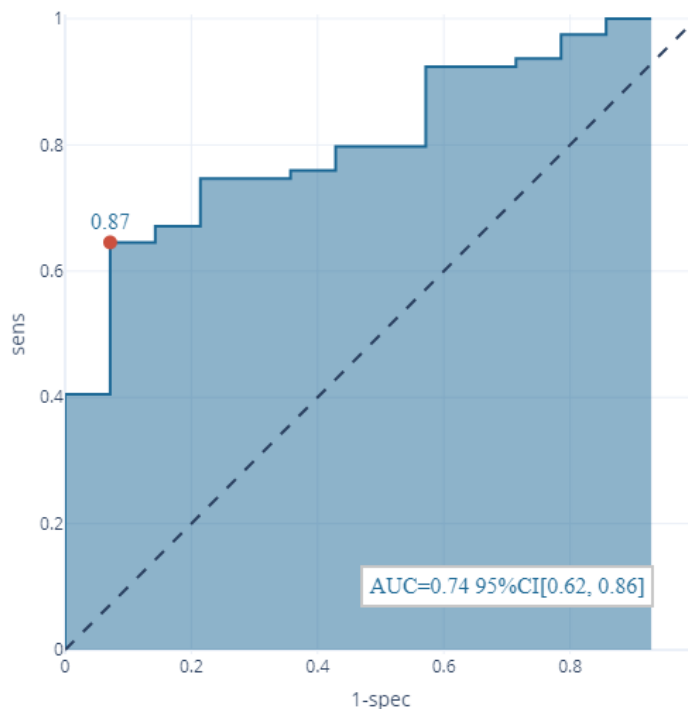


Рисунок 10 - Чувствительность и специфичность уровня лимфоцитов для прогнозирования исхода заболевания у пациентов с COVID-19 (ROC-анализ)

Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень СРБ более 66 мг/л на пике «цитокинового шторма» свидетельствует о развитии летального исхода на следующем этапе (14-18 сутки) заболевания с чувствительностью 86% и специфичностью 67%. Значение AUC ROC – 0.78. (Рисунок 11).

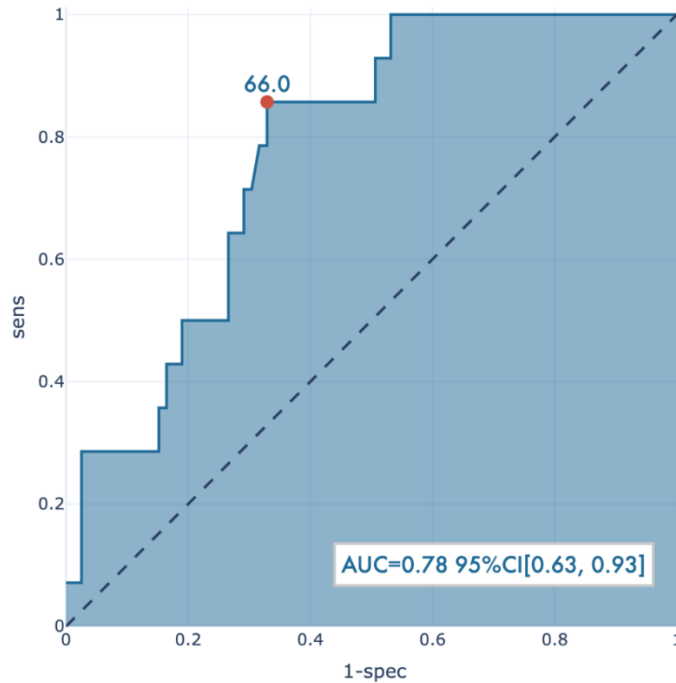


Рисунок 11 - Чувствительность и специфичность уровня СРБ для прогнозирования исхода заболевания у пациентов с COVID-19 (ROC-анализ)

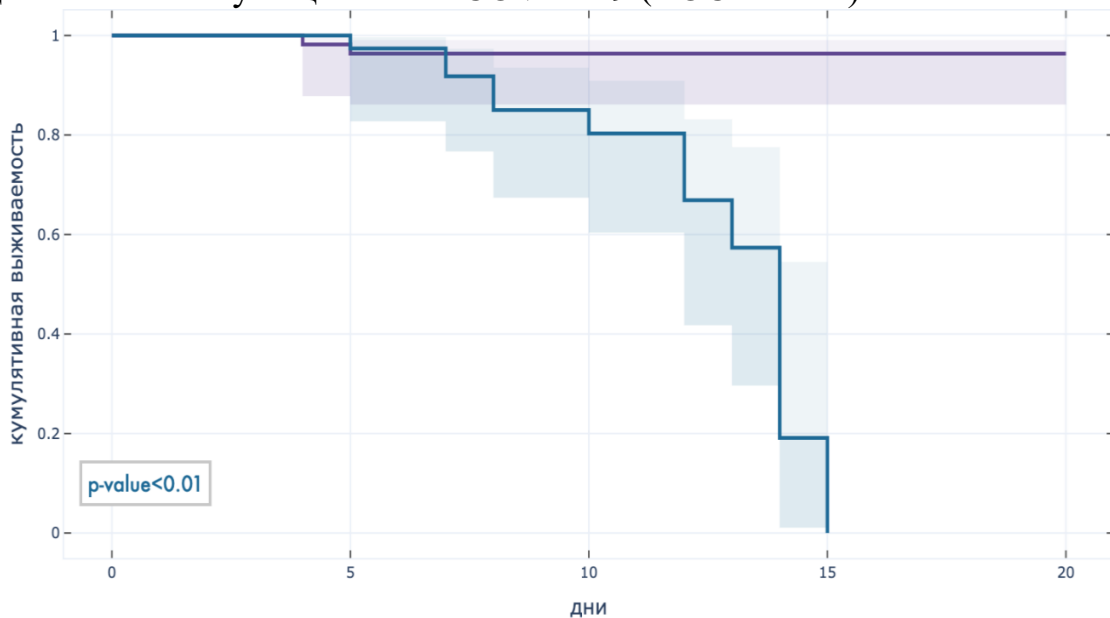


Рисунок 12 - Кривые оценки выживания Каплан-Мейера. Сравнения кривых при помощи лог-ранк теста. Синяя кривая - уровень СРБ больше 66 мг/л, фиолетовая – уровень СРБ менее 66 мг/л

Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень ферритина более 773.0 мкг/л на пике «цитокинового шторма» свидетельствует о развитии летального исхода на следующем этапе (14-18 сутки) заболевания с чувствительностью 81% и специфичностью 73%. Значение AUC ROC – 0.81 (Рисунок 13).

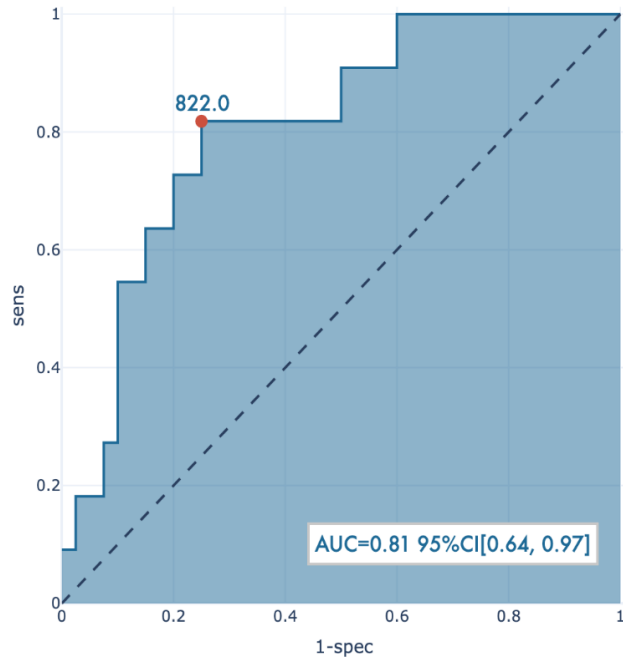


Рисунок 13 - Чувствительность и специфичность уровня ферритина для прогнозирования исхода заболевания у пациентов с COVID-19 (ROC-анализ)

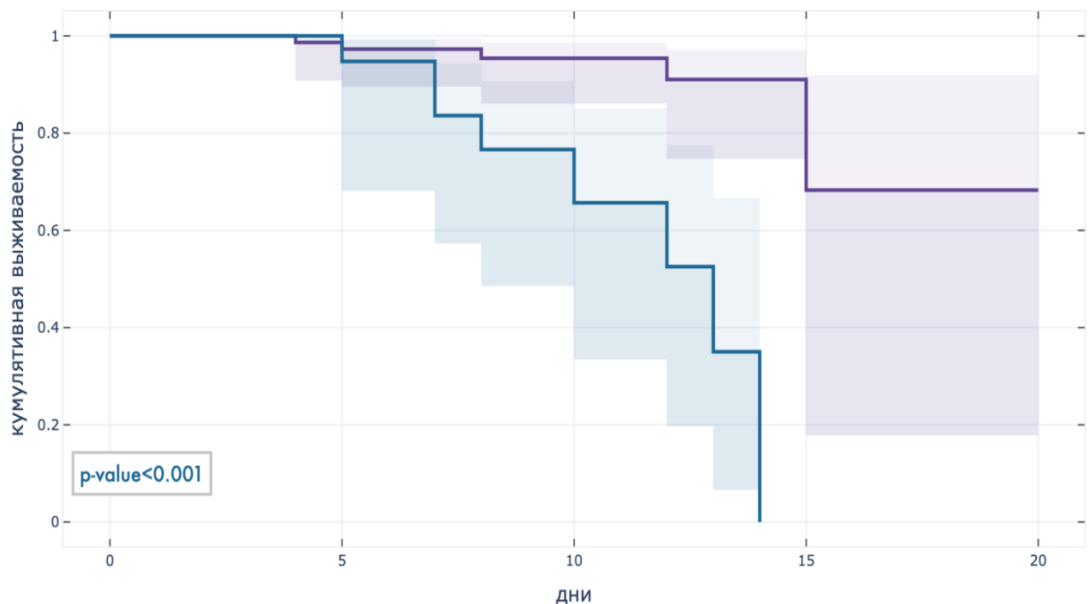


Рисунок 14 - Кривые оценки выживания Каплан-Мейера. Сравнения кривых при помощи лог-ранк теста. Синяя кривая - уровень ферритина более 822.0 мкг/л, фиолетовая – уровень ферритина менее 822.0 мкг/л

Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень фибриногена более 6.69 г/л на пике «цитокинового шторма» свидетельствует о развитии летального исхода на следующем этапе (14-18 сутки) заболевания с чувствительностью 72% и специфичностью 85%. Значение AUC ROC – 0.76 (Рисунок 15).

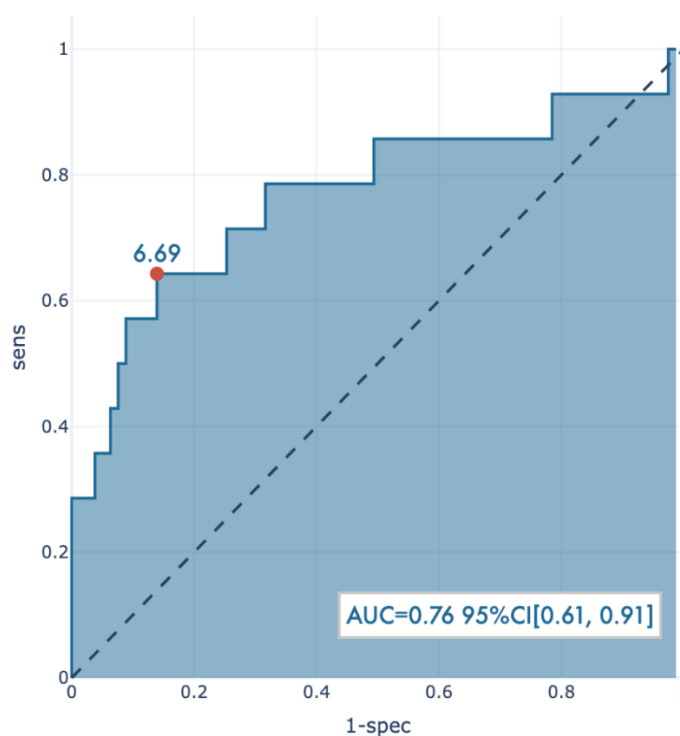


Рисунок 15 - Чувствительность и специфичность уровня фибриногена для прогнозирования исхода заболевания у пациентов с COVID-19 (ROC-анализ)

Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень ЛДГ более 332.0 ед./л на пике «цитокинового шторма» свидетельствует о развитии летального исхода на следующем этапе заболевания с чувствительностью 90% и специфичностью 71%. Значение AUC ROC – 0.77 (Рисунок 16).

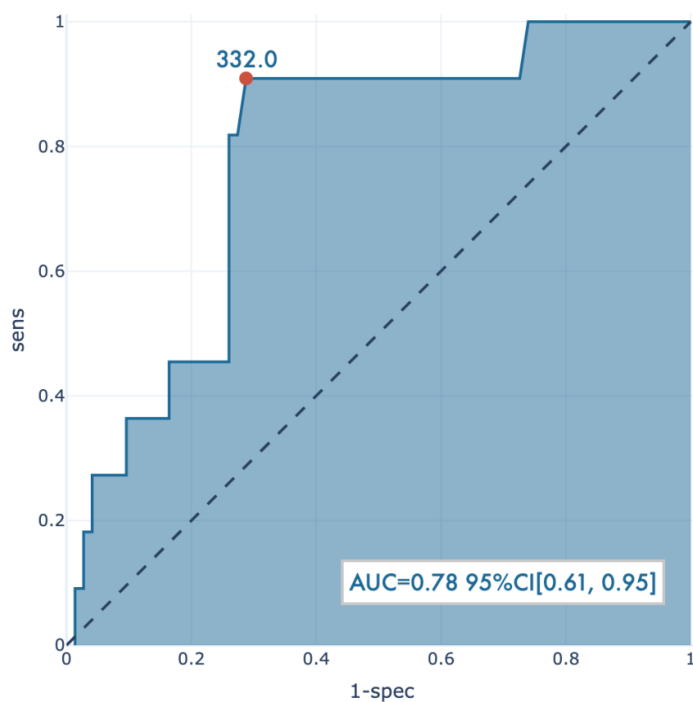


Рисунок 16 - Чувствительность и специфичность уровня ЛДГ для прогнозирования исхода заболевания у пациентов с COVID-19 (ROC-анализ)

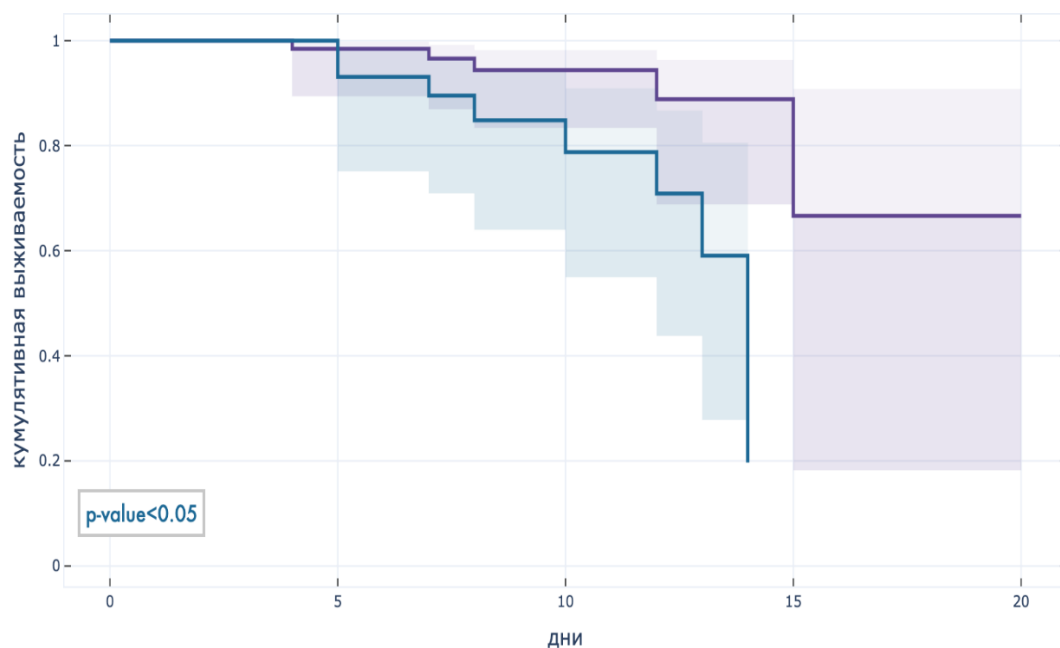


Рисунок 17 - Кривые оценки выживания Каплан-Мейера. Сравнения кривых при помощи лог-ранк теста. Синяя кривая - уровень ЛДГ больше 332 ед./л, фиолетовая – уровень ЛДГ менее 332 ед./л

Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень д-димера более 2.65 мкг/мл на пике «цитокинового шторма» свидетельствует о развитии летального исхода на

следующем этапе заболевания с чувствительностью 92% и специфичностью 96%.
Значение AUC ROC – 0.96 (Рисунок 18).

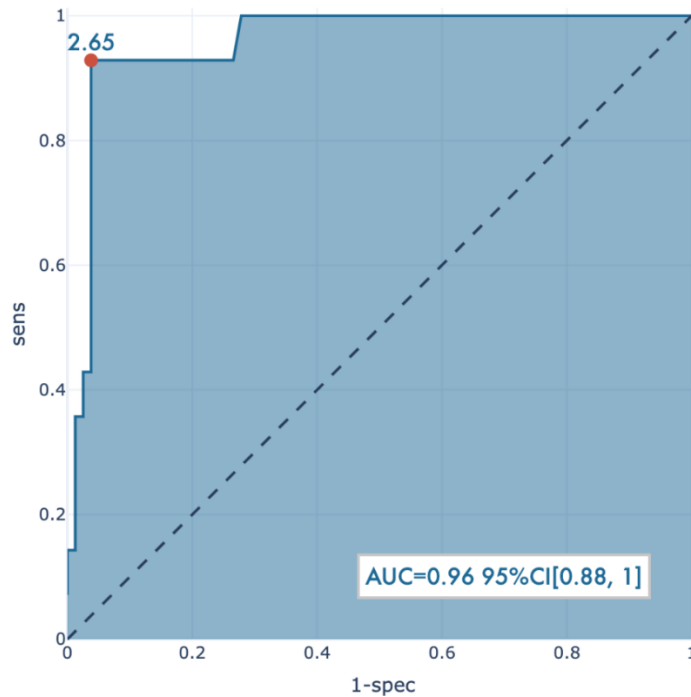


Рисунок 18 - Чувствительность и специфичность уровня Д-димера для прогнозирования исхода заболевания у пациентов с COVID-19 (ROC-анализ)

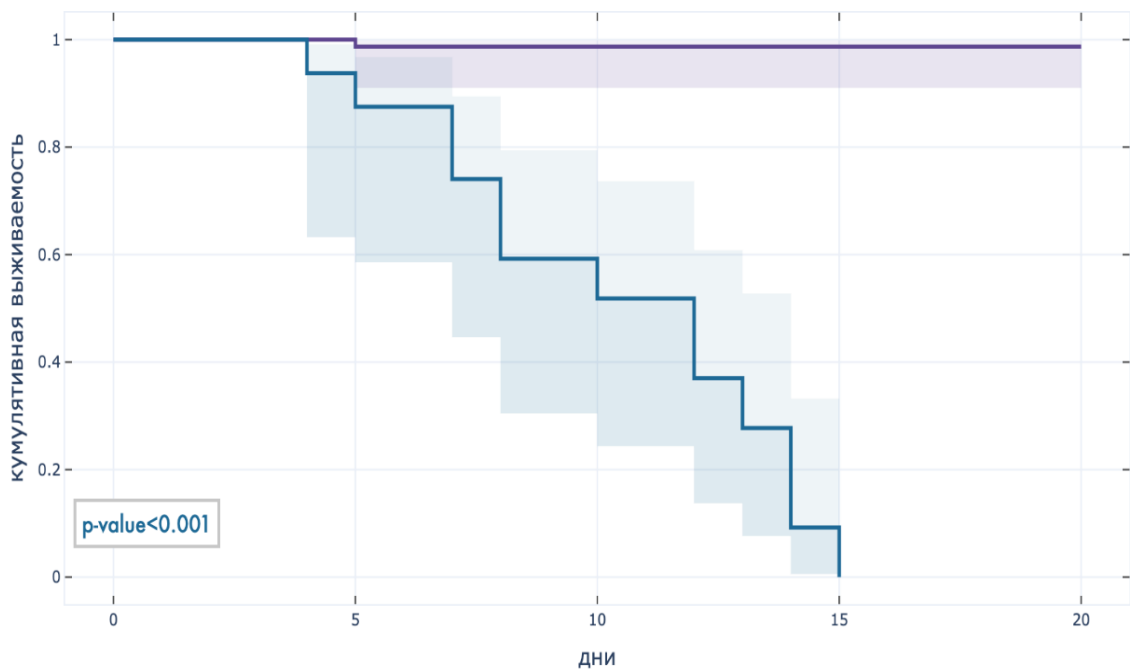


Рисунок 19 - Кривые оценки выживания Каплан-Мейера. Сравнения кривых при помощи лог-ранк теста. Синяя кривая - уровень Д-димера больше 2,65 мкг/мл, фиолетовая – уровень Д-димера менее 2,65 мкг/мл

Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень CD14+HLADR+ менее 55% на пике «цитокинового шторма» свидетельствует о развитии летального исхода на следующем этапе заболевания с чувствительностью 92% и специфичностью 71%. Значение AUC ROC – 0.8 (Рисунок 20).

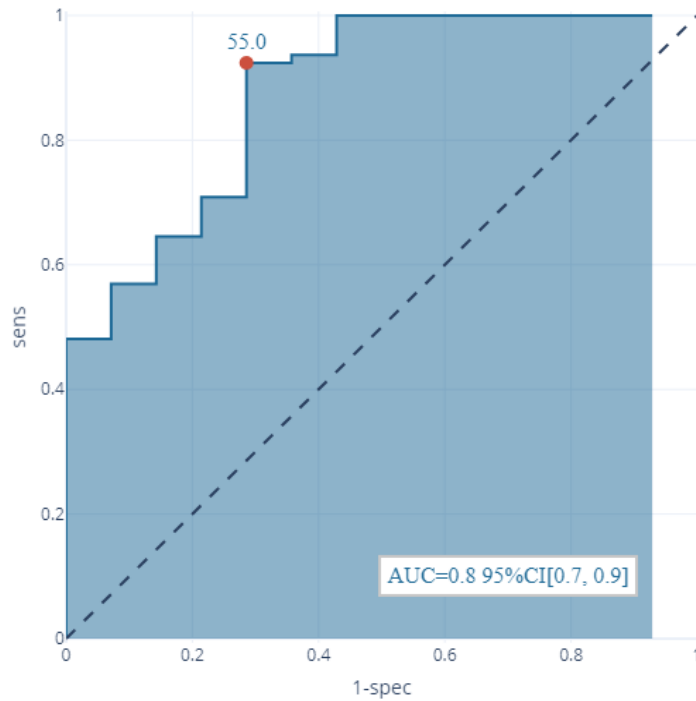


Рисунок 20 - Чувствительность и специфичность уровня CD14+HLADR+ для прогнозирования исхода заболевания у пациентов с COVID-19 (ROC-анализ)

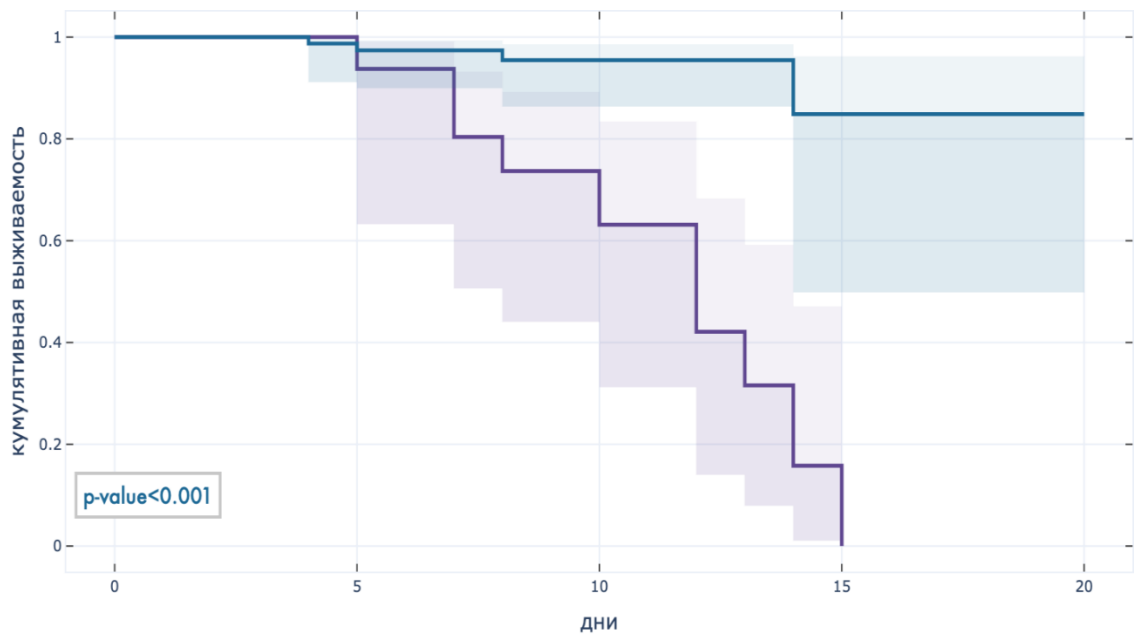


Рисунок 21 - Кривые оценки выживания Каплан-Мейера. Сравнения кривых при помощи лог-ранк теста. Синяя кривая - уровень CD14+HLADR+ больше 55%, фиолетовая – уровень CD14+HLADR+ менее 55%

3.4 Лабораторный комплекс маркеров осложнённого течения и летального исхода

Для целого ряда лабораторных параметров оцениваемых на пике «цитокинового шторма», показана возможность достоверного прогнозирования течения заболевания и его исход, были определены уровни характерные для неосложненного течения заболевания с благоприятным исходом, осложненного течения заболевания с благоприятным исходом и осложненного течения заболевания с летальным исходом. При значениях ЛДГ менее 296 Ед/л предполагается неосложненное течение заболевания, при значениях свыше 296 Ед/л прогнозируется осложненное течение, при достижении уровня в 332 Ед/л и более летальный исход. При значениях д-димера менее 1.37 мкг/л предполагается неосложненное течение заболевания, при значениях свыше 1.37 мкг/л прогнозируется осложненное течение, при достижении уровня в 2,65 мкг/л и более летальный исход. При значениях СРБ менее 52 мг/л прогнозируется неосложненное течение заболевания, при значениях более 52 мг/л прогнозируется осложненное течение заболевания, при значениях более 66мг/л летальный исход. При значениях CD14+HLADR+ более 76,3% прогнозируется неосложненное течение заболевания, при значениях менее 76,3% предполагается осложненное течение заболевания, при снижении уровня CD14+HLADR+ менее 55% летальный исход.

Таблица 16 - Прогностический диапазон значений маркеров воспалительного ответа

Прогностический диапазон значений маркеров воспалительного ответа			
Показатель	Неосложненное течение, благоприятный исход	Осложненное течение, благоприятный исход	Летальный исход
ЛДГ Ед/л	<296	296-332	>332
Д-димер мкг/л	<1,4	1,4-2,65	>2,65
CD14+HLADR%	>76,3	55-76,3	<55
СРБ мг/л	<52	52-66	>66

3.5 Клинические и лабораторные результаты исследования среди пациентов при исследовании, выполненном на этапе разрешения «цитокинового шторма» (вторая точка исследования)

Вторая точка (14-18сутки) исследования является периодом нормализации клинико-лабораторных показателей маркеров воспалительного ответа и иммунной дисфункции, ассоциированных с развитием «цитокинового шторма» при неосложненном течении COVID-19. При осложненном течении COVID-19 в этот период заболевания развиваются осложнения, в том числе и клинически значимые (группа 2 и группа 3). Это нозокомиальные инфекционные осложнения, тромбоземболические, геморрагические осложнения, развитие органной дисфункции, чаще всего, на фоне сепсиса. Исход заболевания при неосложненном течении благоприятный (группа 1). При осложненном течении COVID-19 исход может быть благоприятным (группа 2) при условии успешной коррекции развившихся осложнений или неблагоприятным – летальным (группа 3). Уровни изучаемых параметров в группах во второй исследовательской точке представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Уровни изучаемых параметров в группах во второй исследовательской точке (14-18 сутки)

Клинические параметры				
Показатели Медиана (Q1; Q3)	1 группа (n=53)	2 группа (n=26)	3 группа (n=14)	p
Температура	37,07 (36,7; 37,15)	37,42 (37,1;37,6)	37,95 (37,75;38,35)	0,16
КТ	2,04 (2,0; 2,0)	2,88 (2,0;3,0)	3,5 (3,0;4,0)	0,0042*
NEWS	2,91 (1,0; 4,0)	5,84 (4,0;8,0)	7,75 (5,0;9,75)	0,0006*
SOFA	1,0 (0,0; 20)	2,48 (2,0;3,0)	4,0 (2,75;4,75)	0,0003*

Продолжение таблицы 17

Лабораторные параметры				
Лейкоциты (*10 ⁹ /л)	5,19 (4,42;5,9)	6,68 (4,68; 7,53)	6,2 (4,85;7,92)	1,0
Лимфоциты (*10 ⁹ /л)	1,39 (0,91;1,86)	1,29 (0,88; 1,5)	0,75 (0,61;0,89)	1,0
С-реактивный белок (мг/л)	18,62 (4,42; 24,18)	23,15 (2,9; 18,0)	100,5 (54,25;128,75)	0,95
Прокальцитонин (Нг/мл)	0,05 (0,05;0,05)	0,13 (0,05; 0,09)	12,51 (0,09;12,58)	0,28
Ферритин (мкг/л)	302,18 (302,0;323,0)	521,69 (122,0; 792,0)	1278,0 (989,5;1566,5)	1,0
ЛДГ (ед./л)	263,0 (216,0;282,5)	366,23 (237,5; 374,75)	402,75 (358,75;460,5)	0,44
Д-димер (Мкг/мл)	0,9 (0,38;1,15)	2,01 (0,42; 1,93)	3,24 (2,19;4,26)	0,85
Фибриноген (г/л)	4,34 (3,01;5,63)	3,85 (2,82; 4,5)	6,62 (5,34;8,12)	1,0
CD14+HLADR+ (%)	85,27 (78,38; 96,28)	77,54 (63,1; 91,9)	65,78 (56,28;69,65)	1,0

Примечание: Q1; Q3 - 1 и 3 квартили; * - статистически различающиеся показатели (критерий Краскела-Уоллиса)

Клиническо-инструментальные показатели, такие, как поражение легких по данным компьютерной томографии, тяжесть состояния пациентов по шкале NEWS и тяжесть органной дисфункции по шкале SOFA достоверно отличались между группами. Пациенты первой группы характеризовались легким течением по шкале NEWS, не имели органной дисфункции и отличались меньшей площадью поражения легких по данным компьютерной томографии. У пациентов третьей группы тяжесть поражения легочной ткани не имела тенденции к разрешению, сохранялось выраженное поражение легких вплоть до критического, отмечалось тяжелое состояние по шкале NEWS и не разрешалась полиорганная дисфункция согласно шкале SOFA.

Лабораторные показатели, отражающие тяжесть состояния реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2 у пациентов 1,2,3

группы характеризовались отсутствием лейкоцитоза, отсутствием лимфопении в первой группе пациентов - $1,39 \cdot 10^9$ /л (Q1; Q3 0,91; 1,86), подъемом уровня лимфоцитов у пациентов второй группы $1,29 \cdot 10^9$ /л (Q1; Q3 0,88; 1,5), отсутствием нормализации у пациентов третьей группы $0,75 \cdot 10^9$ /л (Q1; Q3 0,61; 0,89). Снижением уровня С-реактивного белка у пациентов первой и второй группы и сохраняющимся высоким уровнем у пациентов третьей группы - 100,5 мг/л (Q1; Q3 54,25; 128,75). Уровень ферритина снизился у пациентов первой и второй группы, однако у пациентов третьей группы не имел тенденции к снижению 1278,0 мкг/л (Q1; Q3 989,5; 1566,5). Уровень ЛДГ оставался на прежних уровнях у пациентов первой 263,0 ед./л (Q1; Q3 216,0; 282,5), второй 366,23 ед./л (Q1; Q3 237,5; 374,75) и третьей группы 402,75 ед./л (Q1; Q3 358,75; 460,5). Показатели Д-димера имели тенденцию к повышению у пациентов первой - 0,9 мкг/мл (Q1; Q3 0,38; 1,15) и второй группы пациентов - 2,01 мкг/мл (Q1; Q3 0,42; 1,93), у третьей группы пациентов отмечалось снижение уровня Д-димера 3,24 мкг/мл (Q1; Q3 2,19; 4,26) относительно первой точки исследования. Уровень фибриногена незначительно снизился у пациентов первой группы 4,34 г/л (Q1; Q3 3,01; 5,63), значительно снизился у пациентов второй группы 3,85 г/л (Q1; Q3 2,82; 4,5) и характеризовался отсутствием снижения у пациентов третьей группы 6,62 г/л (Q1; Q3 5,34; 8,12). Роста процентного количества CD14+HLADR+ клеток не отмечалось у пациентов первой и второй группы, у пациентов третьей группы отмечался подъем процентного количества CD14+HLADR+ клеток - 65,78% (Q1; Q3 56,28; 69,65), однако показатели были значительно ниже нормальных значений, что ассоциировано с глубокой иммунной дисфункцией у пациентов с осложненным течением и осложненным исходом заболевания. Отсутствие нормализации уровня экспрессии моноцитами HLADR+ в третьей группе возможно, ассоциированно с персистирующей гипоксией, на фоне дисрегуляции воспалительного ответа, усугубляя специфическую антигенпрезентирующую способность моноцитов и стимулируя прогрессирование иммунной дисфункции.

Исходя из полученных клинико-лабораторных данных тяжесть состояния пациентов и воспалительный ответ стремились к нормализации, однако у пациентов третьей группы прогрессировала полиорганная дисфункция в связи с присоединением бактериального компонента воспаления на фоне сохраняющейся иммунной дисфункции, что подтверждалось выраженным ростом прокальцитонина 12,51 нг/мл (Q1; Q3 0,09; 12,58). Статистически достоверных различий среди пациентов не выявлено, что является следствием малого количества измерений во второй точке исследования.

3.6. Клинические и лабораторные результаты исследования среди пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом при исследовании, выполненном на второй точке исследования

Пациенты были разделены на тех, у кого исход был благоприятный (группа 2+ группа 3) и тех, у кого исход был неблагоприятный (группа 3). Сравнение этих групп пациентов во второй исследовательской точке (14-18 сутки заболевания) позволяет определить прогностически значимые маркеры. Это необходимо для выявления тех маркеров, которые позволяют прогнозировать развитие летального исхода у пациентов с COVID-19 на третьей неделе заболевания. Таблица №18. Дальнейшее построение ROC-кривых для параметров, продемонстрировавших достоверные отличия, определяет чувствительность и специфичность для каждого из анализируемых параметров.

Таблица 18 - Сравнение групп пациентов на 3 неделе заболевания (14-18 сутки; вторая точка) в соответствии с исходом заболевания

Клинические показатели			
Показатель, Медиана (Q1; Q3)	Благоприятный исход (1 группа + 2 группа; n=79)	Летальный исход (3 группа; n=14)	p

Продолжение таблицы 18

Температура	37,25(36,78;37,42)	37,95(37,75;38,35)	0,162
КТ	2,48(2,0;3,0)	3,5(3,0;4,0)	0,012*
NEWS	4,44(3,0;5,25)	7,75(5,0;9,75)	0,035*
SOFA	1,77(1,0;2,0)	4,0(2,75;4,75)	0,019*
Лабораторные показатели			
Лейкоциты (*10 ⁹ /л)	6,02(4,52;6,62)	6,2(4,85;7,92)	0,604
Лимфоциты (*10 ⁹ /л)	1,34(0,87;1,74)	0,75(0,61;0,89)	0,034*
С-реактивный белок (мг/л)	20,94(3,1;18,06)	100,5(54,25;128,75)	0,013*
Прокальцитонин(Нг/мл)	0,08(0,05;0,05)	12,51 (0,09;12,58)	0,007*
Ферритин (мкг/л)	460,72(130,5;576,5)	1278,0(989,5;1566,5)	0,115
ЛДГ (ед./л)	317,07(225,25;333;75)	402,75(358,75;460,5)	0,031*
Д-димер (Мкг/мл)	5,86(0,38;1,64)	3,24(2,19;4,26)	0,015*
Фибриноген (г/л)	4,08(2,82;4,93)	6,62(5,34;8,12)	0,025*
CD14+HLADR+ (%)	81,11(75,15;95,3)	65,78(56,28;69,65)	0,117

Примечание: Q1; Q3 - 1 и 3 квартили; * - статистически различающиеся показатели (U-критерий Манна — Уитни)

У пациентов в этой точке исследования сохранялась лихорадка, с более высокими цифрами температуры при летальном исходе заболевания. Рентгенологически сохранялась картина тяжелой пневмонии с тенденцией к восстановлению у пациентов с неосложненным исходом и сохранением объема поражения у пациентов с летальным исходом. Тяжесть состояния по шкале NEWS характеризовалась как средней степени тяжести со снижением общего балла, в сравнении с первой точкой исследования у пациентов с благоприятным исходом заболевания и сохранением крайне тяжелой степени тяжести у пациентов с летальным исходом в сравнении с первой точкой исследования. Среди пациентов с летальным исходом при оценке по шкале SOFA сохранялась органная дисфункция

без тенденции к разрешению в сравнении с пациентами с неосложненным исходом. Показатели такие, как КТ, NEWS, SOFA достоверно различались между группами пациентов ($p < 0,05$). Показатели температуры не имели статистически значимых различий.

У пациентов обеих групп отсутствовал лейкоцитоз. Значения уровня СРБ и ферритина у пациентов с благоприятным исходом заболевания сохранялись выше нормы, однако, со значительным снижением в сравнении с первой точкой исследования. У пациентов с летальным исходом заболевания уровень СРБ и ферритина не стремился к нормализации. Показатели фибриногена и Д-димера не имели тенденции к снижению у пациентов с осложненным исходом и значительно нарастали у пациентов с неосложненным исходом. Отмечалось нарастание уровня ЛДГ в группе и с неосложненным и с осложненным исходом заболевания. Уровень CD14+HLADR+ и лимфоцитов возрастал у пациентов с осложненным исходом, но сохранялся уровне значительно ниже нормальных показателей. Отмечалось выраженное повышение уровня прокальцитонина у пациентов с осложненным исходом заболевания в сравнении с первой точкой исследования 12,51 (0,09;12,58). Лимфоциты, СРБ, прокальцитонин, ЛДГ, Д-димер, фибриноген достоверно различались между группами ($p < 0.05$)

Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень СРБ более 67 мг/л свидетельствует о развитии летального исхода заболевания с чувствительностью 75% и специфичностью 93%. Значение AUC ROC – 0.88 (Рисунок 22).

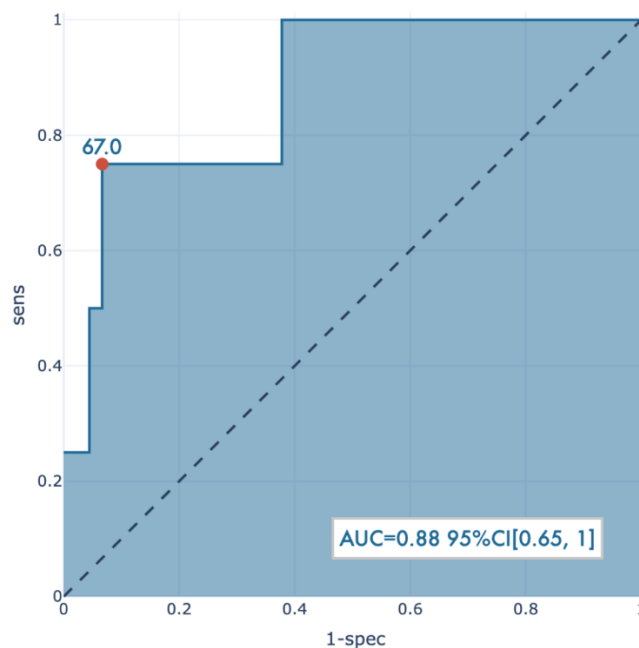


Рисунок 22 - Чувствительность и специфичность уровня СРБ для прогнозирования исхода заболевания у пациентов с COVID-19 (ROC-анализ)

Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень прокальцитонина более 1,95 нг/мл свидетельствует о развитии летального исхода заболевания с чувствительностью 97% и специфичностью 78%. Значение AUC ROC – 0.88 (Рисунок 23).

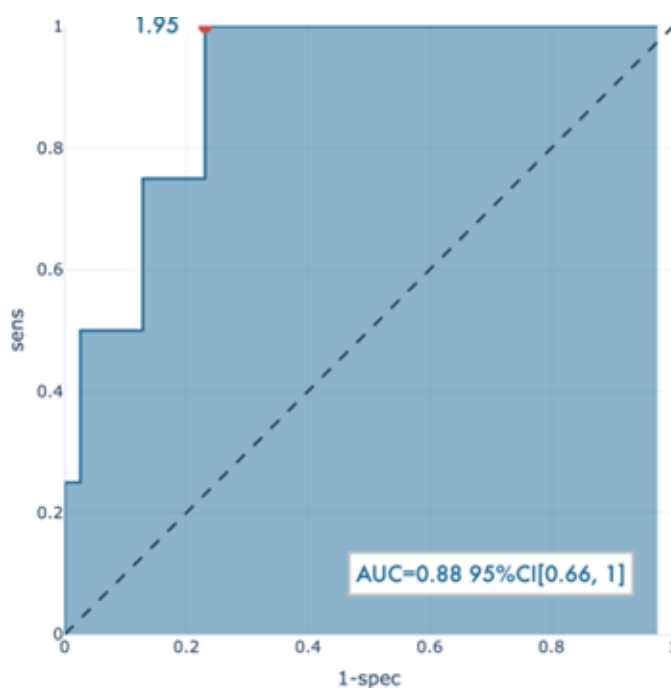


Рисунок 23 - Чувствительность и специфичность уровня ПКТ для прогнозирования исхода заболевания у пациентов с COVID-19 (ROC-анализ)

Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень ЛДГ более 292 Ед/л свидетельствует о развитии летального исхода заболевания с чувствительностью 97% и специфичностью 67%. Значение AUC ROC – 0.81 (Рисунок 24).

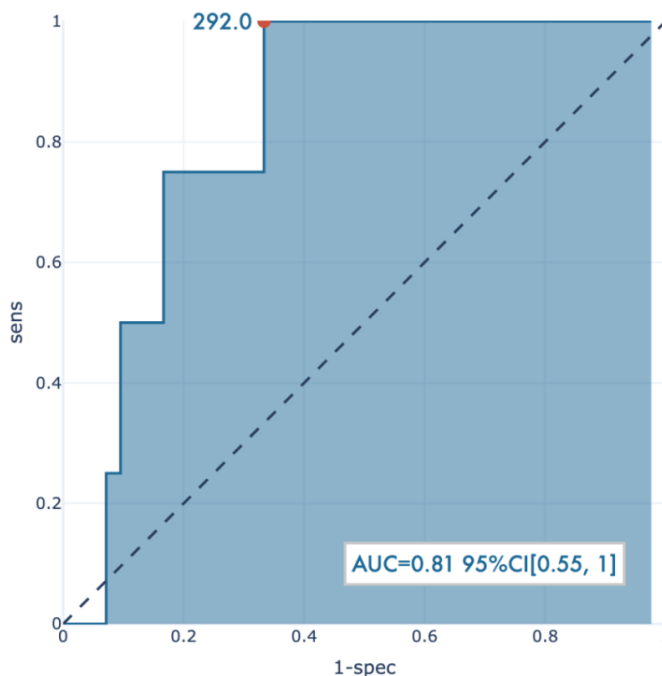


Рисунок 24 - Чувствительность и специфичность уровня ЛДГ для прогнозирования исхода заболевания у пациентов с COVID-19 (ROC-анализ)

Проведенный ROC-анализ уровня Д-димера выявил, что уровень более 1,95 мкг/мл свидетельствует о развитии летального исхода заболевания с чувствительностью 98% и специфичностью 83%. Значение AUC ROC – 0.87 (Рисунок 25).

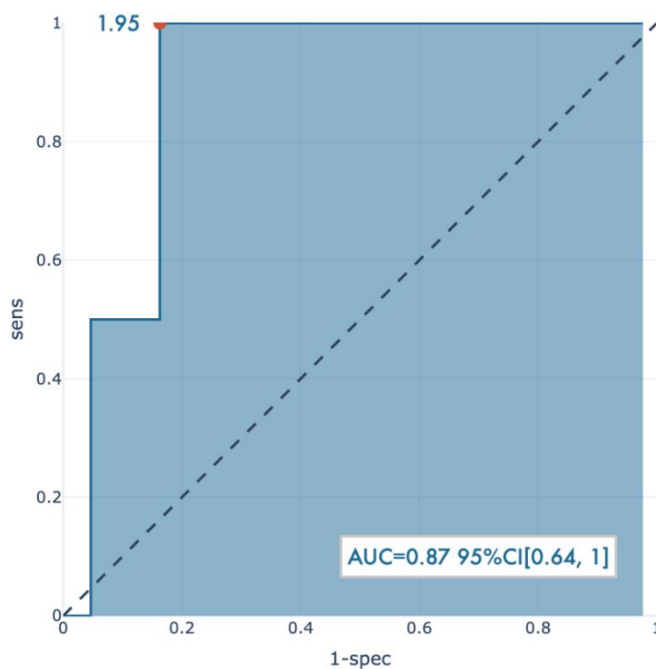


Рисунок 25 - Чувствительность и специфичность уровня Д-димера для прогнозирования исхода заболевания у пациентов с COVID-19 (ROC-анализ)

Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень фибриногена более 5,48 г/л свидетельствует о развитии летального исхода заболевания с чувствительностью 77% и специфичностью 80%. Значение AUC ROC – 0.78 (Рисунок 26).

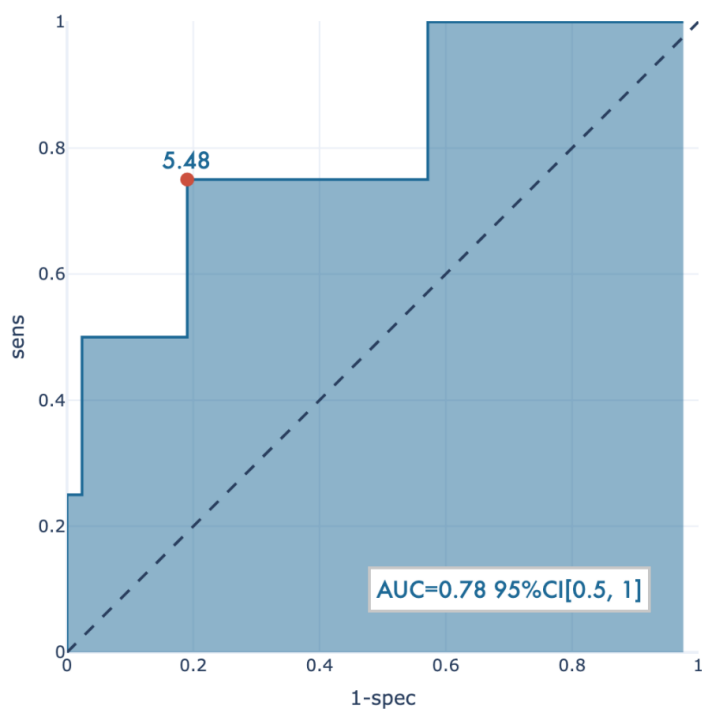


Рисунок 26 - Чувствительность и специфичность уровня фибриногена для прогнозирования исхода заболевания у пациентов с COVID-19 (ROC-анализ)

Таким образом, для ряда лабораторных параметров, оцениваемых на второй точке исследования, показана возможность достоверно прогнозировать летальный исход заболевания. Были определены уровни характерные для летального исхода. При значениях ЛДГ более 292 Ед/л предполагается летальный исход. При значениях д-димера более 1,95 мкг/л предполагается летальный исход. При значениях СРБ более 67 мг/л прогнозируется летальный исход. При значениях фибриногена более 5,48 г/л прогнозируется летальный исход. При значениях прокальцитонина более 0,05 нг/мл прогнозируется летальный исход заболевания.

3.7 Клинические наблюдения, иллюстрирующие три группы пациентов

Ниже приведены три клинических наблюдения, иллюстрирующие три группы пациентов: (1) пациент с тяжелым течением COVID-19 без развития осложнений и с неосложненным исходом (тяжелое течение COVID-19 с необходимостью пребывания пациента в ОРИТ было обусловлено цитокиновым штормом в результате проявления ответа иммунной системы пациента на вирус SARS-CoV-2). (2) Пациент с осложненным течением и с неосложненным исходом; (3) пациент с осложненным течением и с летальным исходом.

Клиническое наблюдение 1

(тяжелое течение COVID-19 без развития осложнений).

Пациент П. 51 год. Заболел остро. В течение 8 суток было недомогание, лихорадка до 38С°. Затем появилась и стала нарастать одышка при минимальной физической нагрузке. По каналу СМП доставлен в инфекционный корпус НИИ СП, госпитализирован в реанимационное отделение.

При поступлении состояние пациента – тяжелое. Сознание ясное, ориентация в пространстве, времени и собственной личности сохранена. Кожные покровы физиологической окраски и влажности, цианоз отсутствует. Дыхание

самостоятельное, сатурация на воздухе 92%, при инсуффляции увлажненного кислорода потоком 3-5 л/мин сатурация достигает 97%. Гемодинамические показатели стабильные. Состояние по шкале NEWS соответствовало 4 баллам, шкале SOFA 1 баллу

По данным КТ- исследования грудной клетки определялись признаки инфильтративно-воспалительных изменений среднетяжелой степени тяжести (КТ-2), с высокой степенью вероятности вирусной этиологии. Изменения по типу: «матовое стекло»; единичные участки консолидации. Процент вовлечения легочной паренхимы: правого легкого - 25-50%, левого легкого – 25-50%. (Рисунок 27).

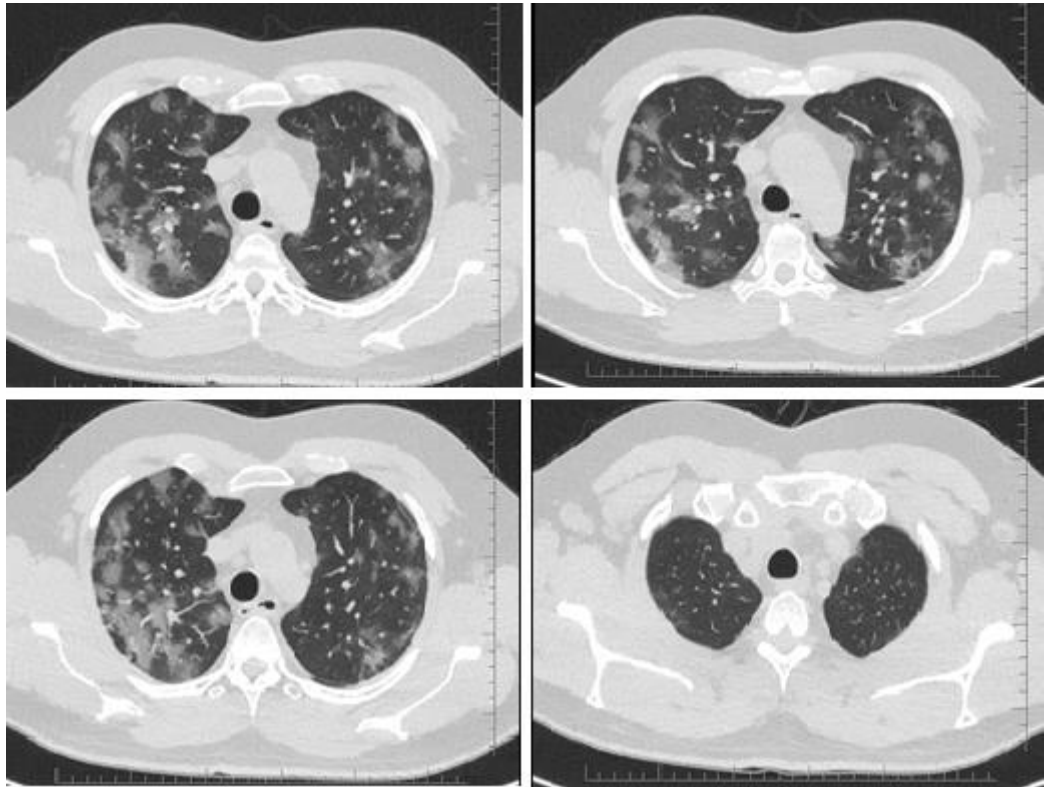


Рисунок 27 - КТ-картина инфильтративно-воспалительных изменений среднетяжелой степени тяжести (КТ-2)

По данным лабораторной диагностики было выявлено повышение маркеров воспаления и лимфопения: лейкоциты $4,3 \cdot 10^9/\text{л}$. лимфоциты $0,7 \cdot 10^9/\text{л}$., СРБ 47,2 мг/л, прокальцитонин $<0,05$ нг/мл, ферритин 565 мкг/л, ЛДГ 277 ел/л. фибриноген 5,21 г/л. Д-димер 0,5 мкг/мл

На фоне проводимой терапии в объеме: антиагрегантной, антикоагулянтной, противовирусной терапии, состояние пациента сохраняется тяжелым, сохранялась одышка, усиливающаяся при минимальной физической нагрузке в пределах кровати. Пациент нуждался в проведении высокопоточной оксигенотерапии с потоком 35-50 л/мин и FiO₂ – 45-60%. Кроме того, пациенту проводилось prone-позиционирование в течение 10-15 часов в сутки на протяжении 4 суток.

Учитывая клиническую и инструментальную картину коронавирусной инфекции, осложненную двухсторонней пневмонией, принято решение о трансфузии плазмы реконвалесцентов, и введение ингибитора рецепторов интерлейкина 6 – Тоцилизумаба в дозировке 8 мг/кг.

На фоне проводимой терапии состояние пациента имело положительную динамику. По данным компьютерной томографии отмечена трансформация очагов в виде увеличения зон консолидации и уменьшения зон «матового стекла». Рисунок 28.

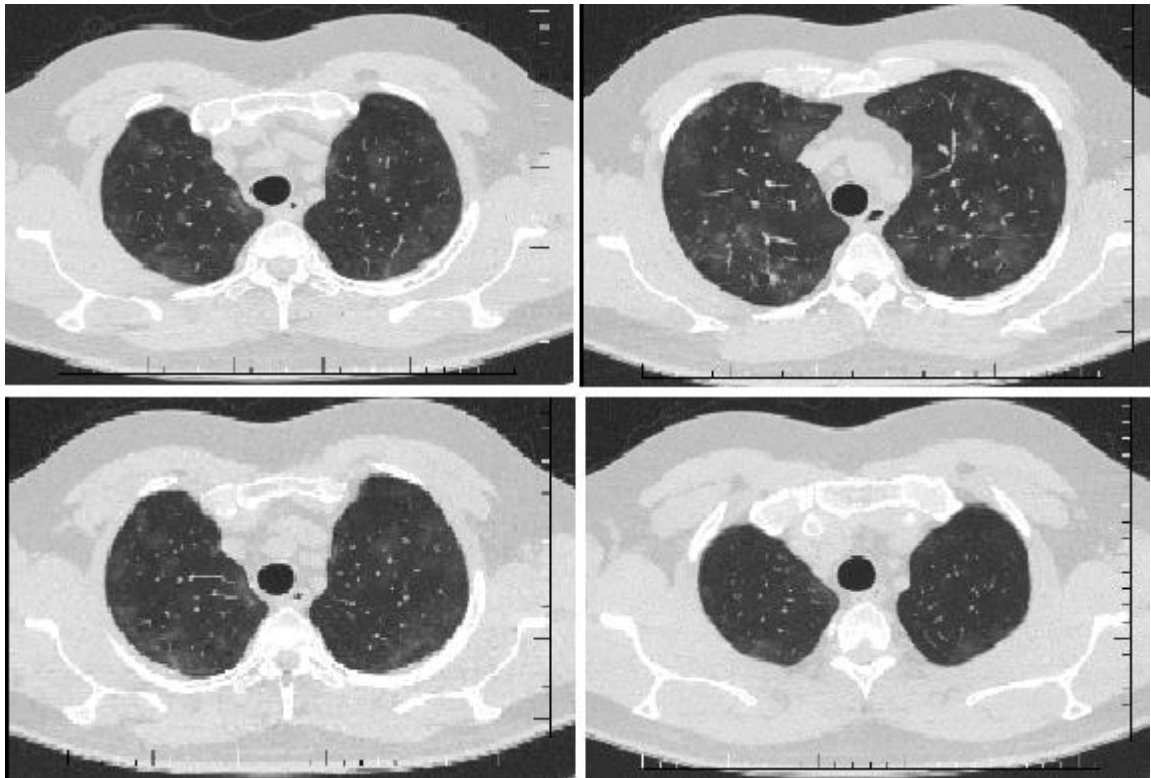


Рисунок 28 - КТ-признаки инфильтративно-воспалительных изменений средней степени тяжести на стадии разрешения

По данным лабораторной диагностики в динамике было отмечено снижение маркеров воспалительного ответа и разрешение лимфопении: лейкоциты $5,2 \cdot 10^9/\text{л}$, лимфоциты $1,1 \cdot 10^9/\text{л}$, СРБ 35 мг/л, прокальцитонин $<0,05$ нг/мл, ферритин 335 мкг, ЛДГ 121 ел/л, фибриноген 3,7 г/л. Д-димер 0,44 мкг/мл. Уровень CD14+HLADR+ 85% на пике «цитокинового шторма» и 94% в период разрешения. На рисунке №29-37 представлена динамика маркеров воспаления.

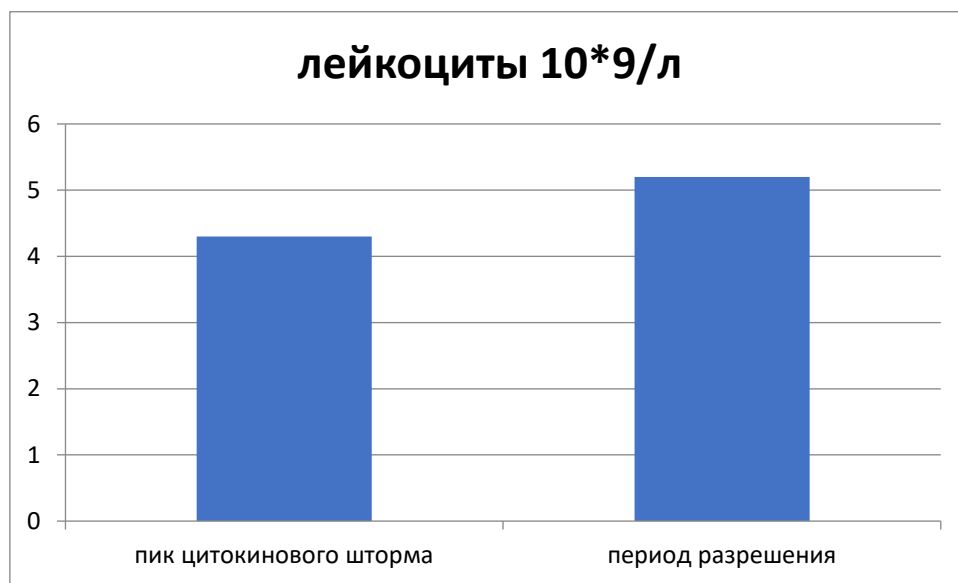


Рисунок 29 - Динамик лейкоцитов

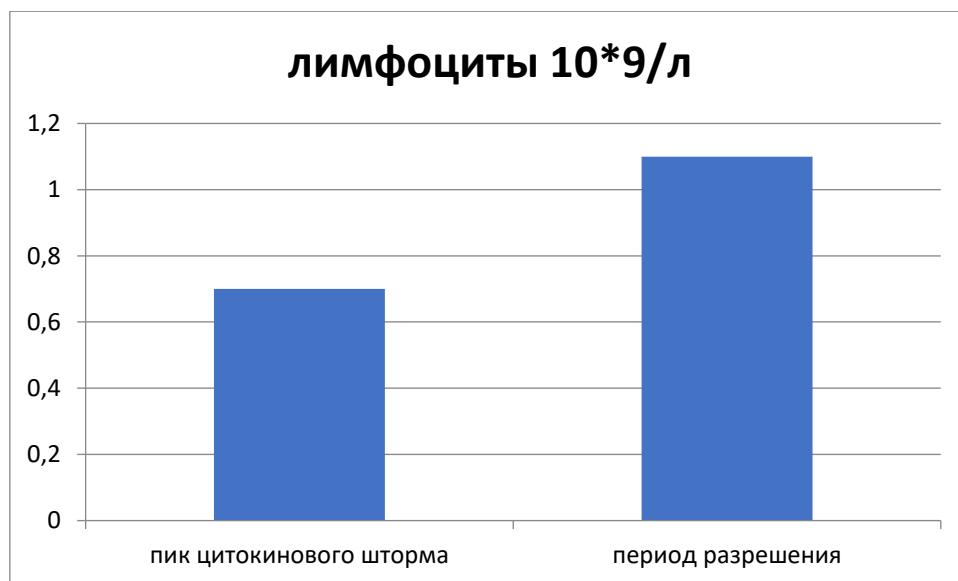


Рисунок 30 - Динамика лимфоцитов

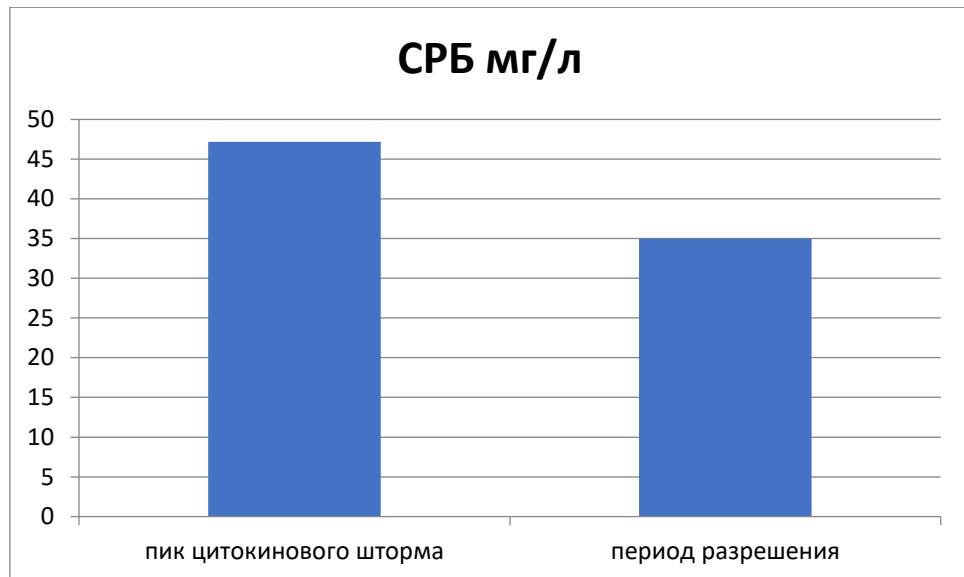


Рисунок 31 - Динамика СРБ

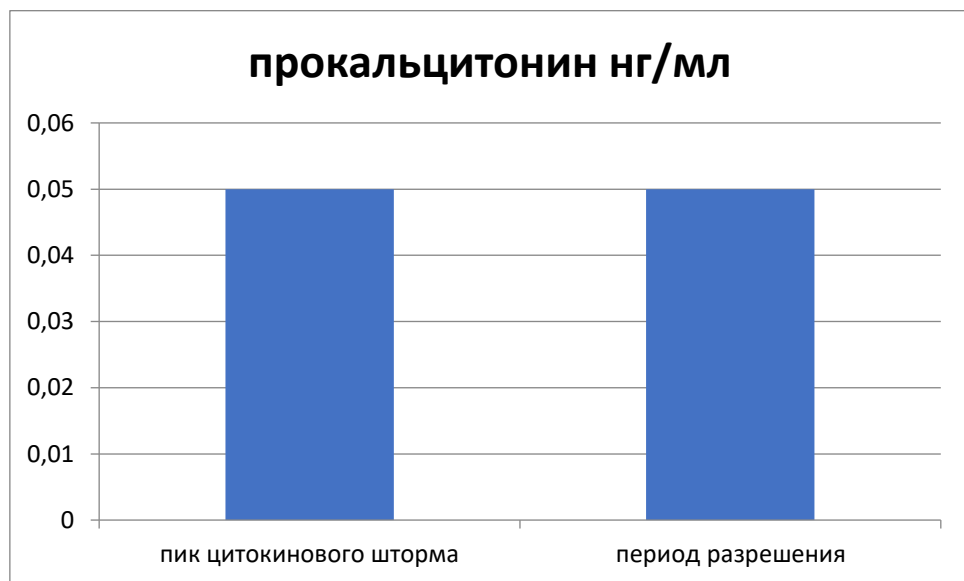


Рисунок 32 - Динамика прокальцитонина

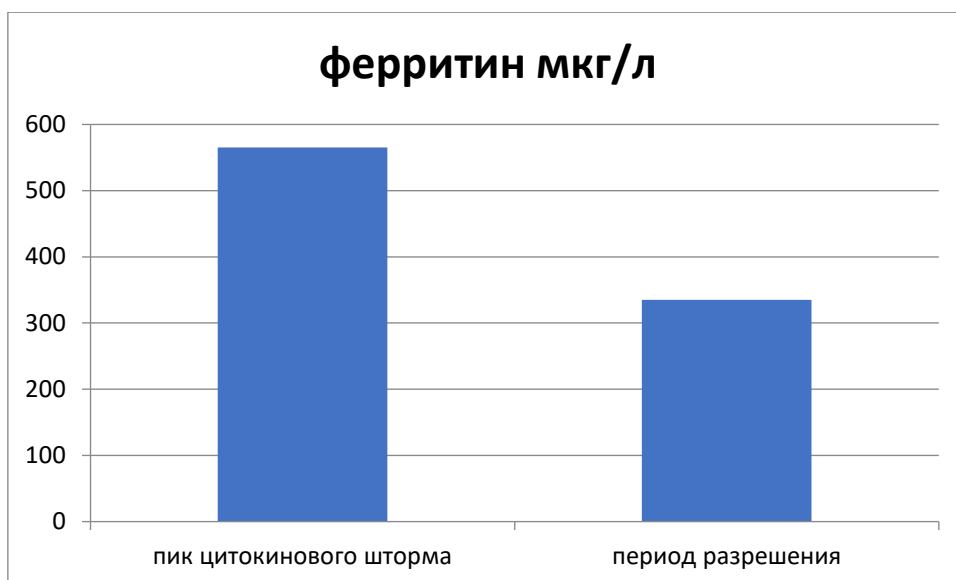


Рисунок 33 - Динамика Ферритина

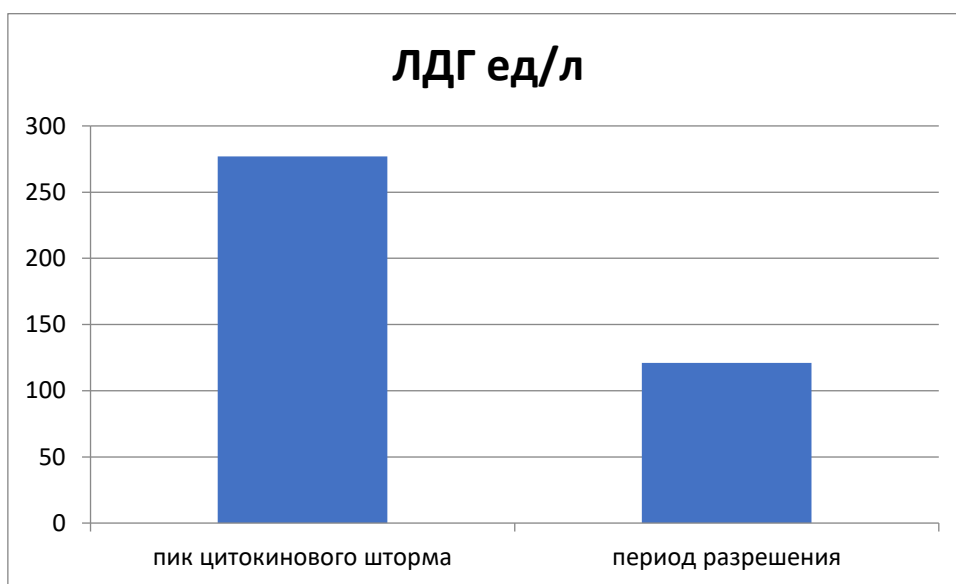


Рисунок 34 - Динамика ЛДГ

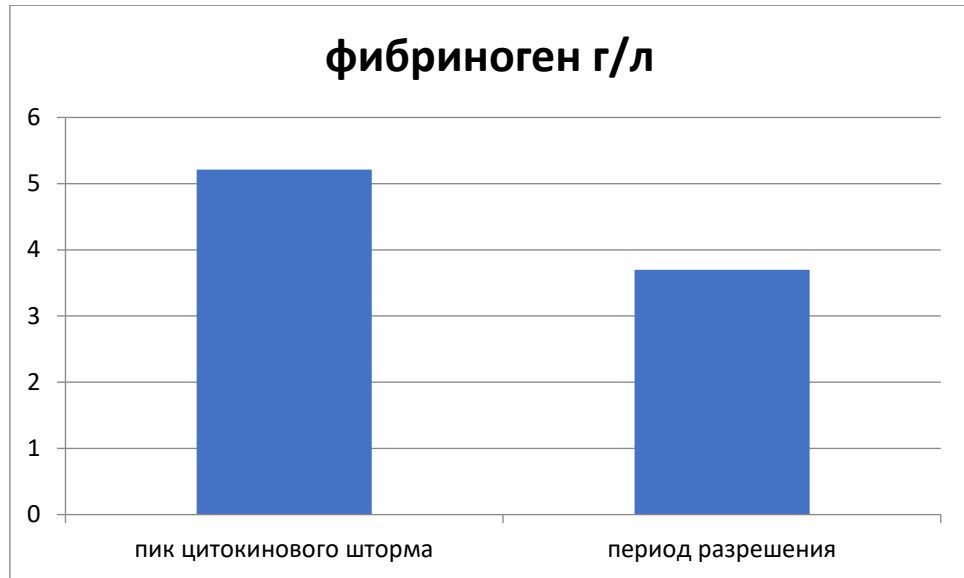


Рисунок 35 - Динамика фибриногена

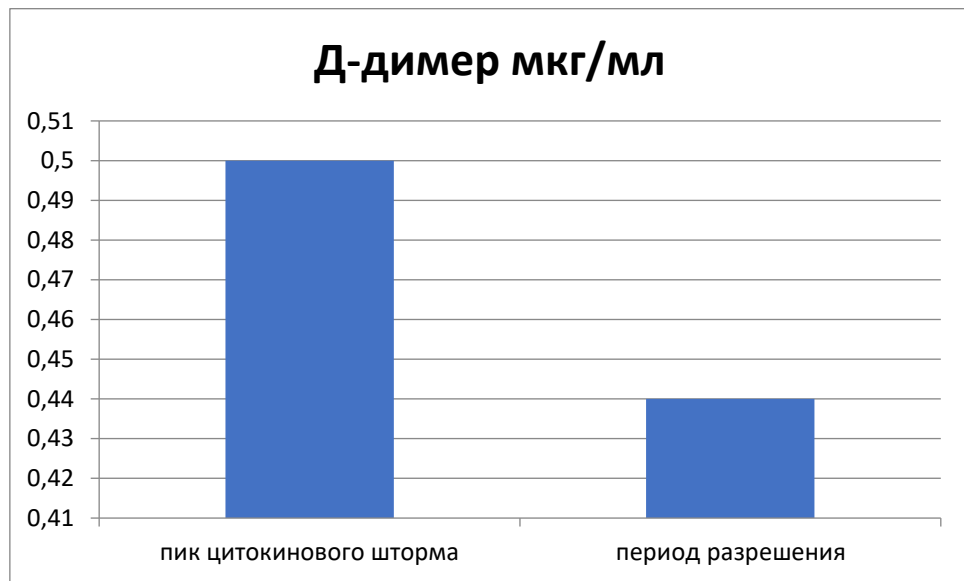


Рисунок 36 - Динамика Д-димера

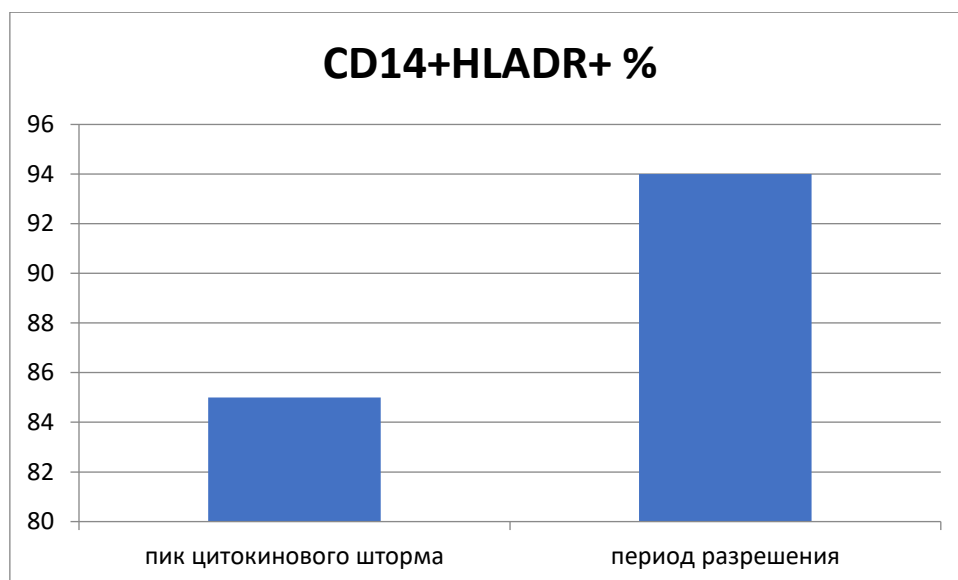


Рисунок 37 - Динамика CD14+HLADR+

К 16 суткам с момента начала заболевания регрессировали признаки дыхательной дисфункции, и пациент был переведен в клиническое отделение. Отмечалась устойчивая нормотермия. Тромбоэмболических, геморрагических, инфекционных осложнений не было. На 24 сутки от момента начала заболевания и 14 сутки с момента поступления в стационар с улучшением был выписан из стационара.

Приведенное клиническое наблюдение иллюстрирует вариант тяжелого, но неосложненного течения заболевания с благоприятным исходом. У пациента отмечалось выраженное повреждение легких с необходимостью проведения НИВЛ и прон-позиционирования, с подъемом маркеров воспаления и развитием «цитокинового шторма», который был эффективно купирован иммунобиологической терапией Тоцилизумабом и свежезамороженной плазмой реконвалесцентов. Вместе с иммунобиологической терапией пациенту проводилась антитромботическая, противовирусная терапия. Все это позволяет избежать развития осложнений, в том числе, и клинически значимых. Удалось добиться благоприятного исхода.

Описанный клинический случай иллюстрирует типичный для пациентов с неосложненным течением и благоприятным исходом уровень маркеров воспаления

на пике «цитокинового шторма» и на второй исследовательской точке. Значения лабораторных маркеров такие, как: СРБ менее 49 мг/л, Д- димера менее 1,4 мкг/мл, CD14+HLADR+ более 76,3 % на пике «цитокинового шторма», и значения СРБ <67 мг/л, ЛДГ <292 Ед/л, Д-димера <1,95 мкг/л, фибриногена <5,48 г/л на второй исследовательской точке позволяют прогнозировать неосложненное течение заболевания и его благоприятный исход как на этапе «цитокинового шторма», так и на 3 неделе заболевания.

Клиническое наблюдение №2. Осложненное течение заболевания,
благоприятный исход.

Пациент Н. 62 года. Заболел остро, в течение недели была слабость, лихорадка до 38°C. Обратился в поликлинику на 5 сутки с момента начала заболевания. На догоспитальном этапе, выполнена КТ ОГК, выявлена вирусная пневмония с повреждением 25% площади легочной ткани (КТ-1). С 5 суток заболевания принимал гидроксихлорохин и азитромицин, нестероидные противовоспалительные препараты. С 8 суток с момента начала заболевания отметил ухудшение состояния в виде нарастания слабости, одышки, лихорадки до 39°C. По каналу СМП доставлен в инфекционный корпус института и госпитализирован в реанимационное отделение.

При поступлении состояние пациента тяжелое. Сознание ясное, правильно ориентирован в пространстве, времени и собственной личности. Кожные покровы физиологической окраски и влажности, цианоз отсутствует, температура тела 39,3 гр.С. Дыхание самостоятельное, сатурация на воздухе 87%, при инсуффляции увлажненного кислорода потоком 5-7 л/мин сатурация составляет 90%, на фоне проведения НИВЛ в режиме ВПО со скоростью потока 45 л/мин и фракцией кислорода 60% сатурация достигает 93-95%. Гемодинамические показатели стабильные: ЧСС - 121 в минуту, АД- 123/67 мм.рт. ст. Состояние по шкале NEWS соответствовало 11 баллам, по шкале SOFA трем баллам.

По данным КТ исследования грудной клетки определялись признаки КТ-признаки интерстициальных и инфильтративно-воспалительных изменений, тяжелой степени тяжести (КТ-3), с высокой степенью вероятности вирусной этиологии - изменения по типу: «матового стекла». Рисунок 38.

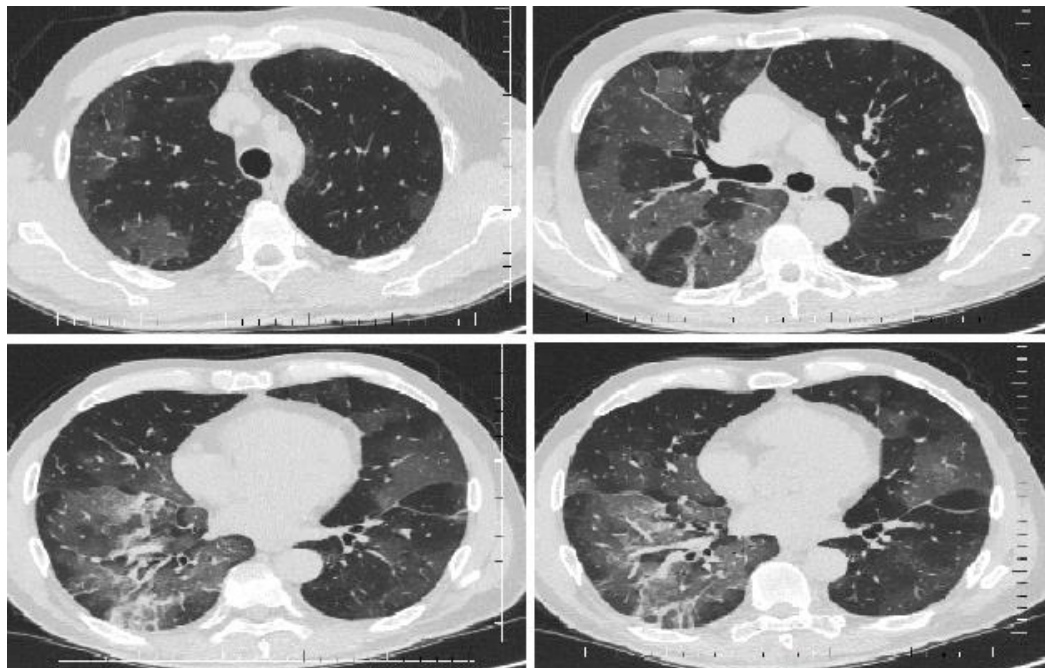


Рисунок 38 - КТ картина интерстициальных и инфильтративно-воспалительных изменений, тяжелой степени тяжести (КТ-3)

По данным лабораторной диагностики, было выявлено повышение маркеров воспаления и лимфопения: лейкоциты $9,9 \cdot 10^9/\text{л}$. лимфоциты $0,37 \cdot 10^9/\text{л}$., СРБ 57,5 мг/л, прокальцитонин $<0,05$ нг/мл, ферритин 1210 мкг/л, ЛДГ 328 ел/л. фибриноген 5,34 г/л. Д-димер 1.82 мкг/мл, CD14+HLADR+ 74,3%.

На фоне проводимой терапии в объеме: антиагрегантной и антикоагулянтной терапии, противовирусной терапии, состояние пациента оставалось тяжелым, сохранялась респираторная дисфункция, требующая проведения НИВЛ с параметрами PS 14 мбар, РЕЕР 5 мбар., прон-позиционирования пациента. На 12 сутки с момента начала заболевания, учитывая клиническую и инструментальную картину коронавирусной инфекции, осложненной двухсторонней пневмонией, принято решение о трансфузии свежезамороженной плазмы реконвалесцентов, и введение ингибитора интерлейкина 6 – Тоцилизумаба в дозировке 8 мг/кг. После проведения специфической терапии COVID-19 состояние пациента не претерпело

существенных изменений. По данным КТ-исследования, были выявлены двусторонне инфильтративно-воспалительные, интерстициальные изменения, соответствующих тяжелой-критической степени (КТ-4) поражения с высокой степенью вероятности вирусной этиологии – отрицательная динамика. Процент вовлечения легочной паренхимы: Правого легкого - 75% Левого легкого – 50-75%. КТ картина представлена на рисунке 39.

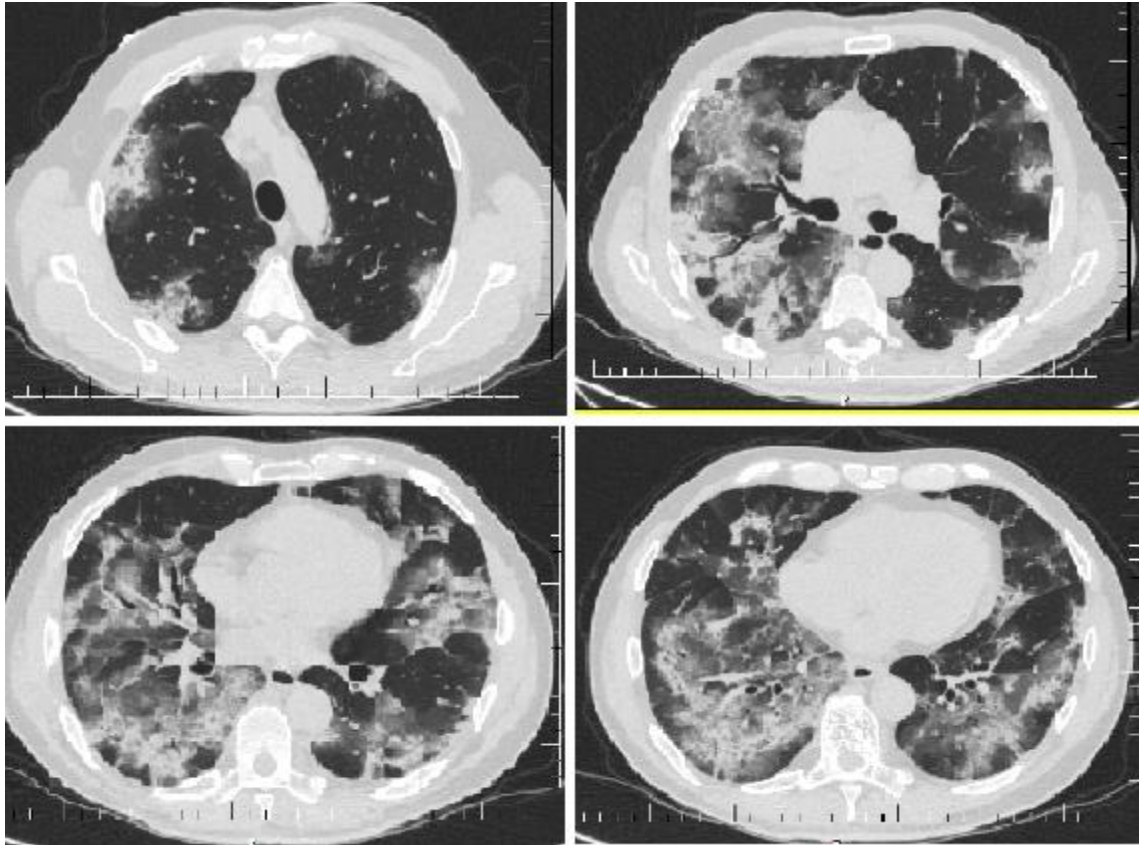


Рисунок 39 - КТ картина интерстициальных и инфильтративно-воспалительных изменений, тяжелой-критической степени (КТ-4)

На 14 сутки с момента начала заболевания в связи с нарастанием явлений дыхательной дисфункции, снижении уровня бодрствования до поверхностного огушения, невозможности проведения нИВЛ вследствие отсутствия сотрудничества, было принято решение об интубации трахеи и переводе пациента на ИВЛ. После интубации была выполнена трахеостомия с целью продленного проведения искусственной вентиляции легких. ИВЛ в режиме SIMV проводилась со следующими параметрами: FiO₂ 55%, объем вдоха: 450 мл, частота принудительных вдохов: 15 1/мин; давление поддержки (PS, ASB): 22 mbar; ПДКВ

(PEEP): 10 mbar; Общая частота дыхательных движений: 19 1/мин; МОД: 8,5 л/мин. На фоне проведения ИВЛ в прон-позиции с указанными параметрами сатурация достигала 97%. На фоне инфузии пропофола 100 мг/ч по шкале возбуждения-седации Ричмонда отмечалось -2 балла. Гемодинамические показатели были стабильными, диурез адекватным волемической нагрузке. При санации трахеобронхиального дерева отмечалось значительное количество гнойной мокроты. В динамике выявлено нарастание лейкоцитоза со сдвигом лейкоцитарной формулы влево, сохранение воспалительных маркеров на высоком уровне: лейкоциты $14 \cdot 10^9$ /л. лимфоциты $0,5 \cdot 10^9$ /л., палочкоядерные лейкоциты 10%, СРБ 177 мг/л, прокальцитонин 0,1 нг/мл, ферритин 1900 мкг/л, ЛДГ 433 ел/л. фибриноген 6,14 г/л. Д-димер 1,7 мкг/мл. На основании клинико-лабораторной картины ситуация расценена, как присоединение нозокомиальной, бактериальной пневмонии. Начата антибактериальная терапия Меропенемом 2000 мг каждые 8 часов, Линезолидом 600 мг каждые 12 часов. Антибактериальная терапия продолжалась в течение двух недель. Респираторная поддержка проводилась 11 суток. Спустя 15 суток произведена деканюляция трахеостомической трубки. На 19 сутки с момента поступления в отделение реанимации и 27 сутки с момента начала заболевания на фоне разрешения явлений дыхательной дисфункции, нормализации клинико-инструментальных показателей пациент бы переведен в госпитальное отделение. При этом лабораторные данные были следующие: лейкоциты $6,7 \cdot 10^9$ /л. лимфоциты $1,33 \cdot 10^9$ /л., СРБ 13 мг/л, прокальцитонин $<0,05$ нг/мл, ферритин 340 мкг/л, ЛДГ 155 ел/л. фибриноген 4,2 г/л. Д-димер 0,35 мкг/мл. CD14+HLADR+ 91%. Динамика маркеров воспаления представлена на рисунке №40-48.

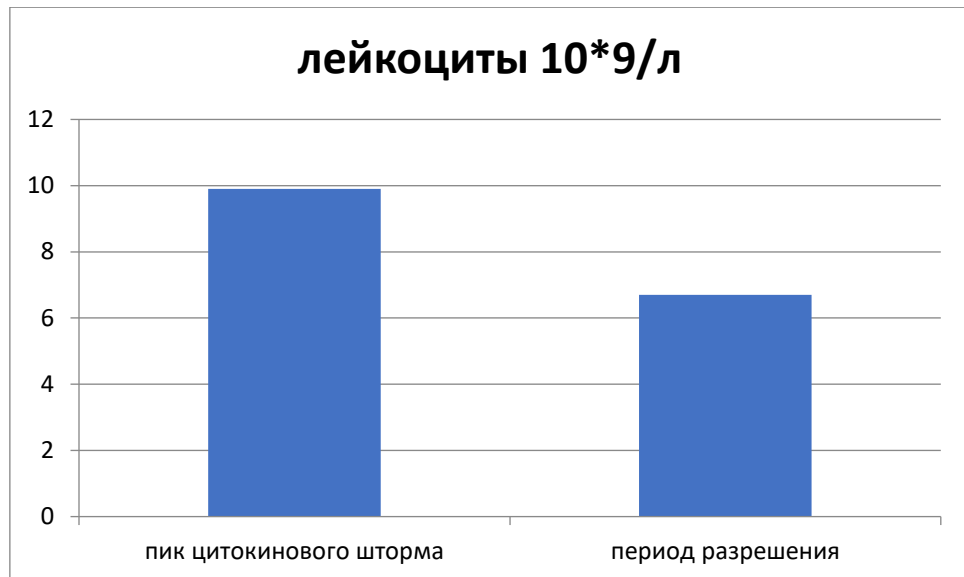


Рисунок 40 - Динамика лейкоцитов

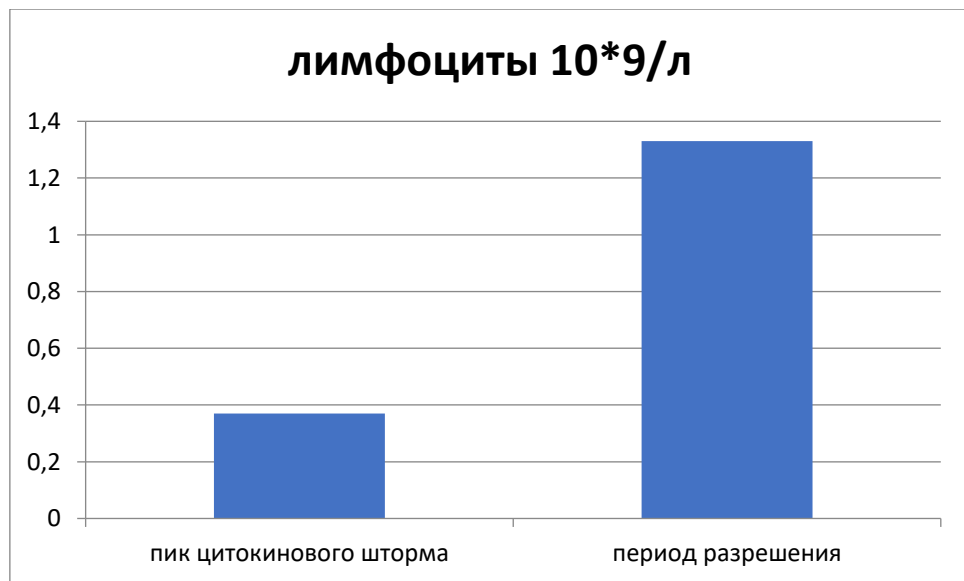


Рисунок 41 - Динамика лимфоцитов

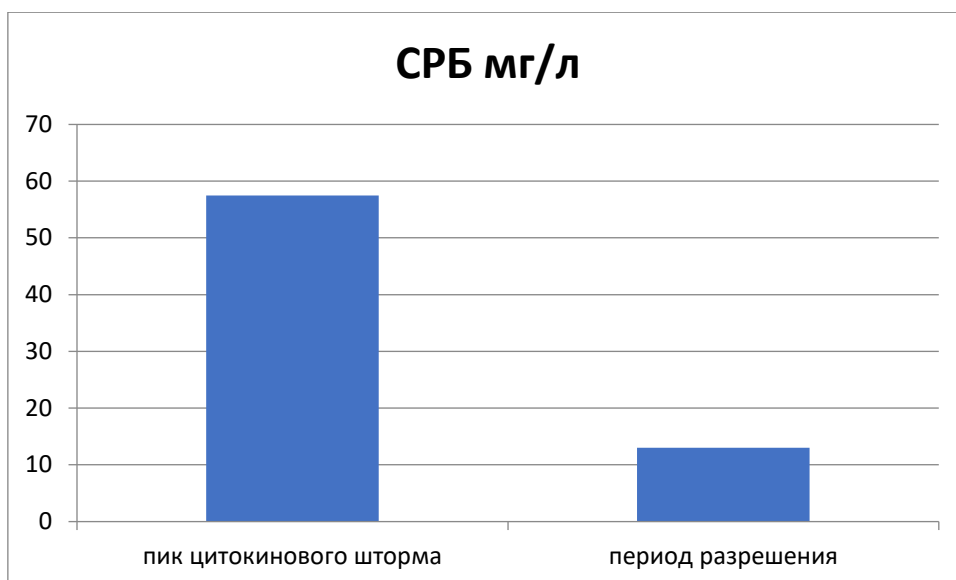


Рисунок 42 - Динамика СРБ

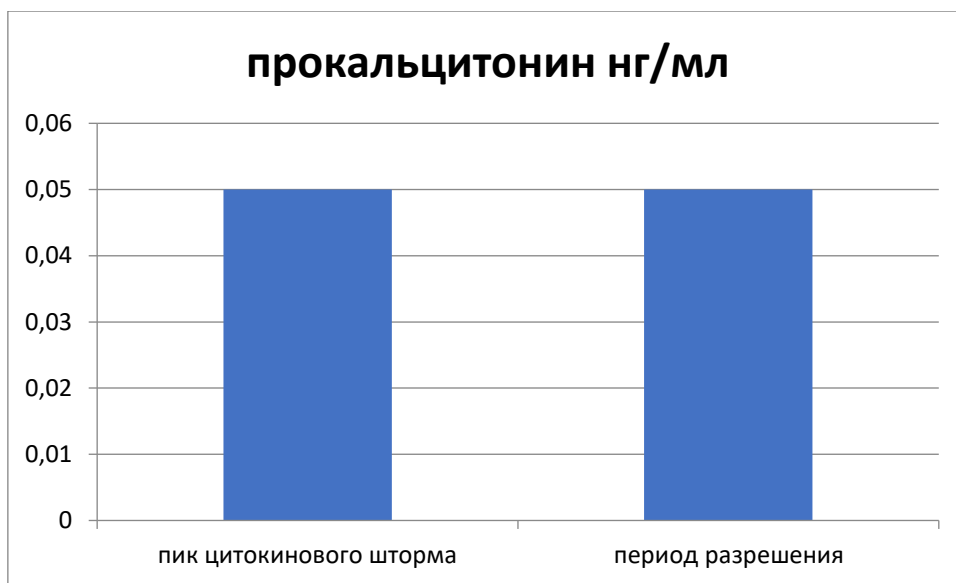


Рисунок 43 - Динамика прокальцитонина

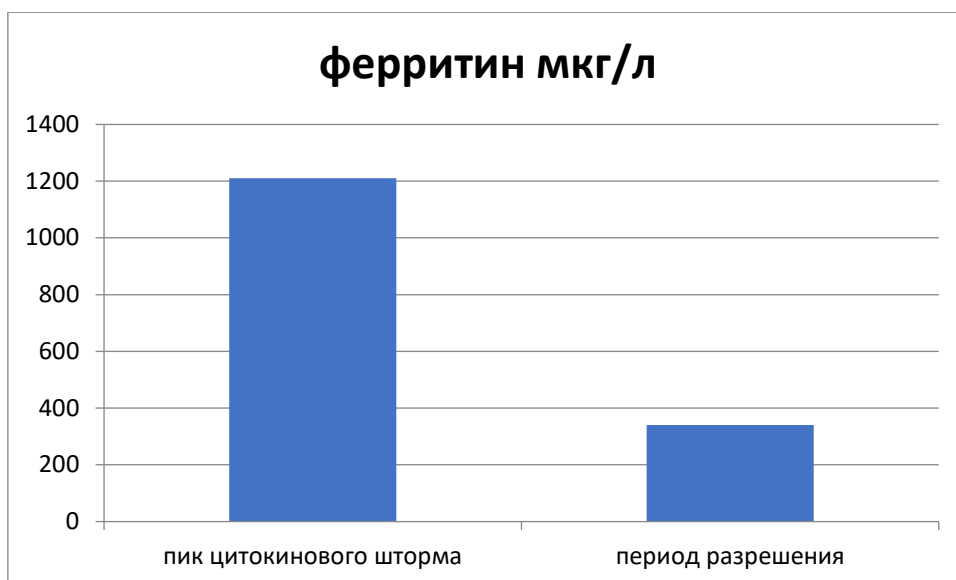


Рисунок 44 - Динамика ферритина

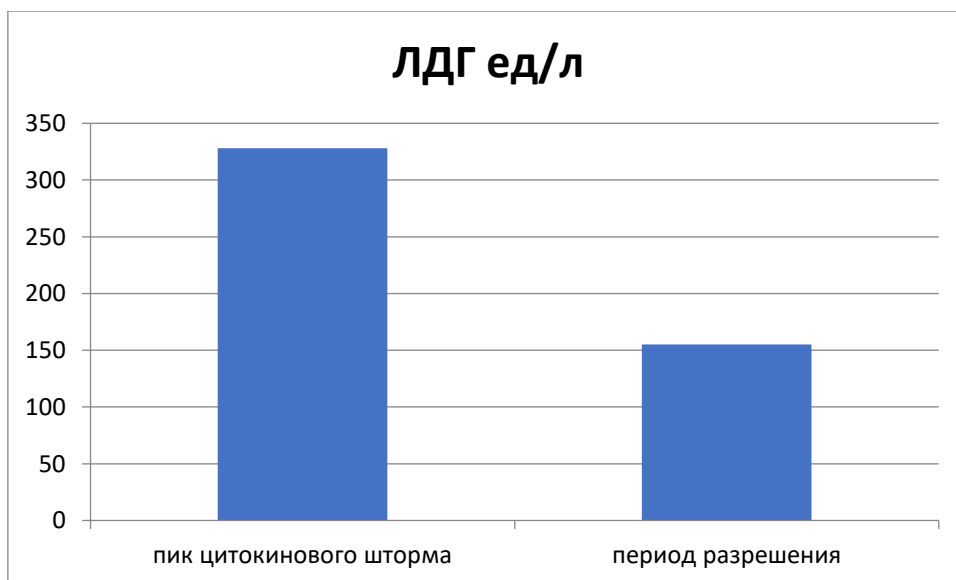


Рисунок 45 - Динамика ЛДГ

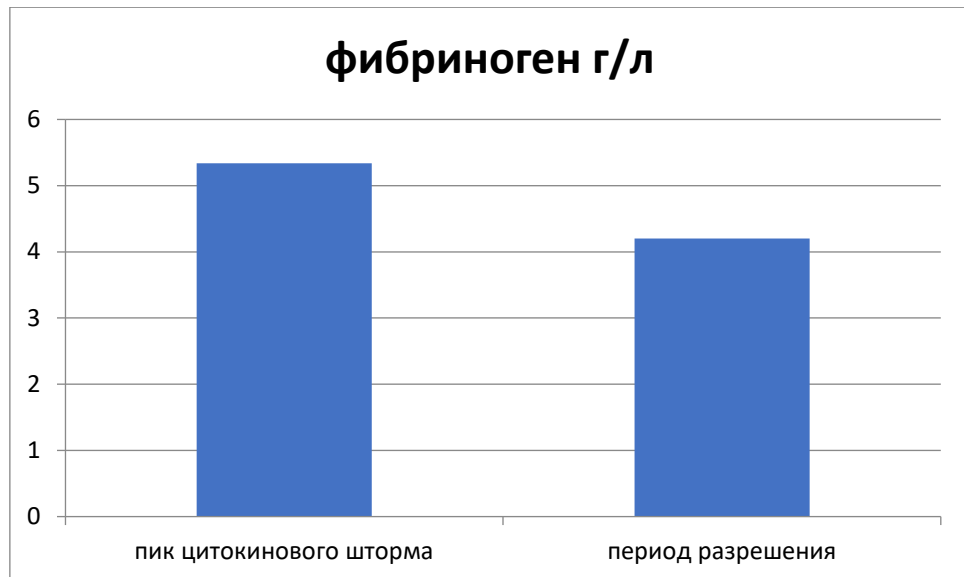


Рисунок 46 - Динамика фибриногена



Рисунок 47 - Динамика Д-димера

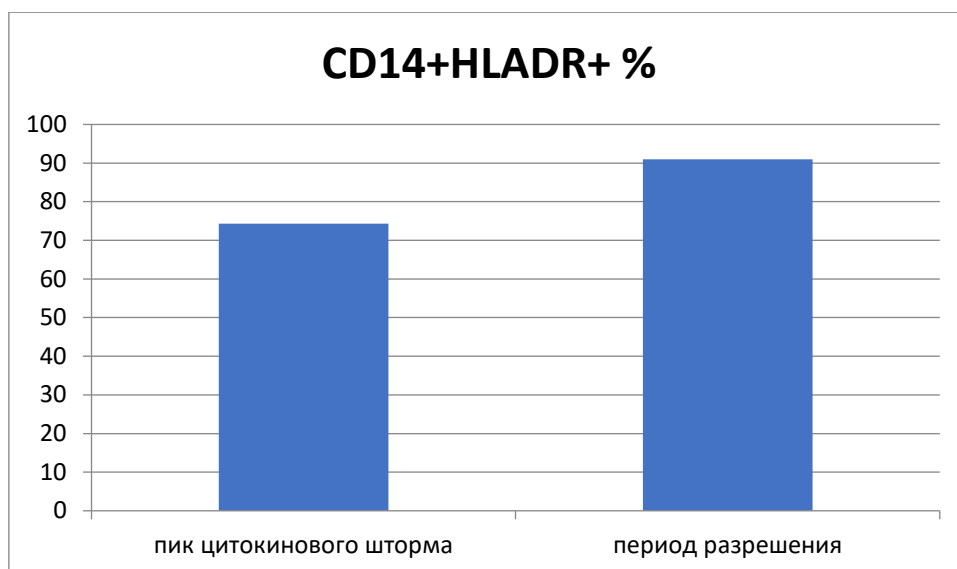


Рисунок 48 - Динамика CD14+HLADR+

По данным КТ- исследования грудной клетки отмечалась положительная динамика в виде регресса участков консолидации и уменьшения объема поражения лёгочной ткани. (рисунок 49).

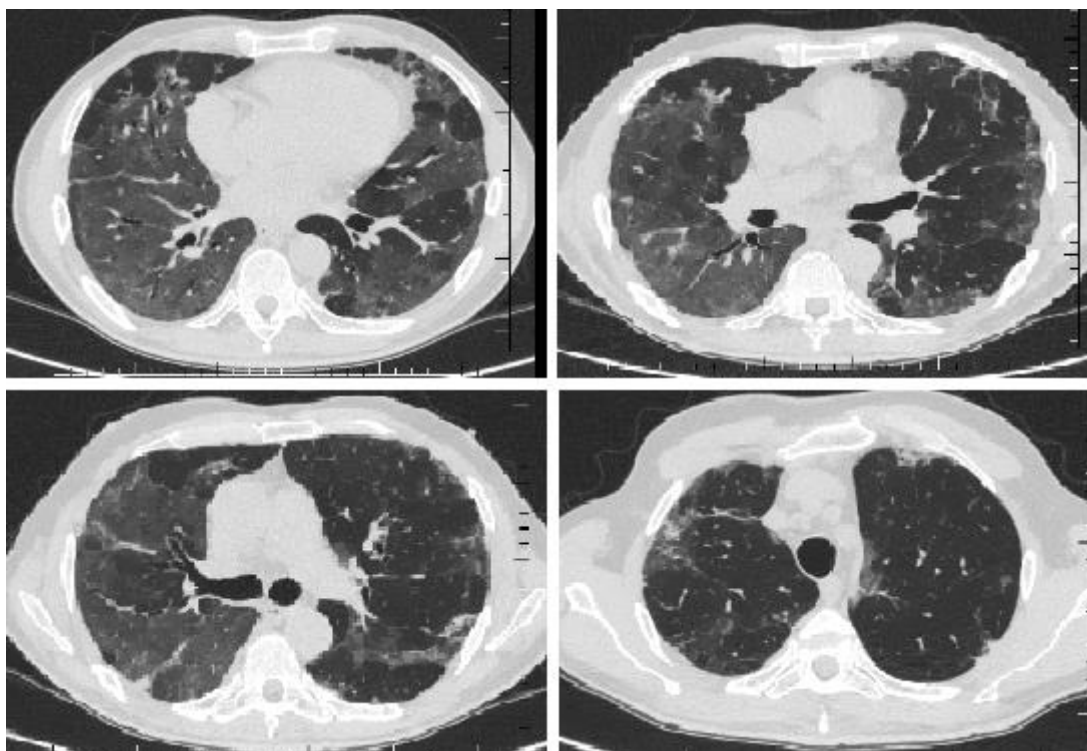


Рисунок 49 - КТ картина интерстициальных и инфильтративно-воспалительных изменений, средне-тяжёлой степени тяжести (КТ-2)

Описанный клинический случай иллюстрирует типичный для пациентов с осложненным течением и благоприятным исходом уровень маркеров воспаления на пике «цитокинового шторма» и на второй исследовательской точке. Значения лабораторных маркеров такие, как: СРБ от 49 мг/л до 66 мг/л, Д- димера от 1,4 мкг/мл до 2,65 мкг/мл, CD14+HLADR+ от 76,3 % до 55% на пике «цитокинового шторма», и значения СРБ <67 мг/л, ЛДГ <292 Ед/л, Д-димера <1,95 мкг/л, фибриногена <5,48 г/л на второй исследовательской точке позволяют прогнозировать осложненное течение заболевания и его благоприятный исход как на этапе «цитокинового шторма», так и на 3 неделе заболевания.

Клиническое наблюдение №3. Осложненное течение заболевания, неблагоприятный исход.

Пациент С. 63 года, заболел остро, в течении недели отмечал катаральные явления, слабость и лихорадку до 38,5°C. Лечение на амбулаторном этапе оказалось неэффективным, и пациент был госпитализирован в первичный стационар. При КТ-исследовании грудной клетки выявлена двусторонняя полисегментарная вирусная пневмония. В связи с ухудшением состояния в виде нарастания явлений респираторной недостаточности произведена интубация трахеи и осуществлен перевод на ИВЛ. В связи с прогрессированием явлений полиорганной недостаточности на 11 сутки от момента начала заболевания, пациент доставлена в институт и госпитализирована в реанимационное отделение инфекционного корпуса.

При поступлении состояние пациента тяжелое. Сознание ясное. физиологической окраски и влажности, цианоз отсутствует, температура тела 39,3 °С. Проводилось ИВЛ в режиме SIMV. Перемежающаяся принудительная вентиляция: VC + PS (volume control + pressure support); Объем вдоха: 500 мл; Частота принудительных вдохов: 18 1/мин; Уровень давления поддержки (PS, ASB): 16 мбар; ПДКВ 12 мбар; дыхание через трахеостомическую канюлю.; FIO2: 80 %; В прон-позиции SPO2: 80 %; Комплаинс: 20 мл/мбар; Сопротивление

дыхательных путей: 6 мбар/мл/сек; При санации ТБД аспирируется небольшое количество вязкой слизисто-гноющей мокроты с незначительным геморрагическим компонентом. Гемодинамические показатели были стабильными. ЧСС 98 в минуту. АД 117/62 мм.рт. ст. Состояние по шкале NEWS соответствовало 12 баллам, по шкале SOFA 4 баллам.

По данным КТ-исследования грудной клетки выявлены инфильтративно-воспалительные изменения, тяжелой степени (КТ-4), с высокой степенью вероятности вирусной этиологии. Процент вовлечения легочной паренхимы правого легкого - более 75%, левого легкого – более 75%. Рисунок 50 .

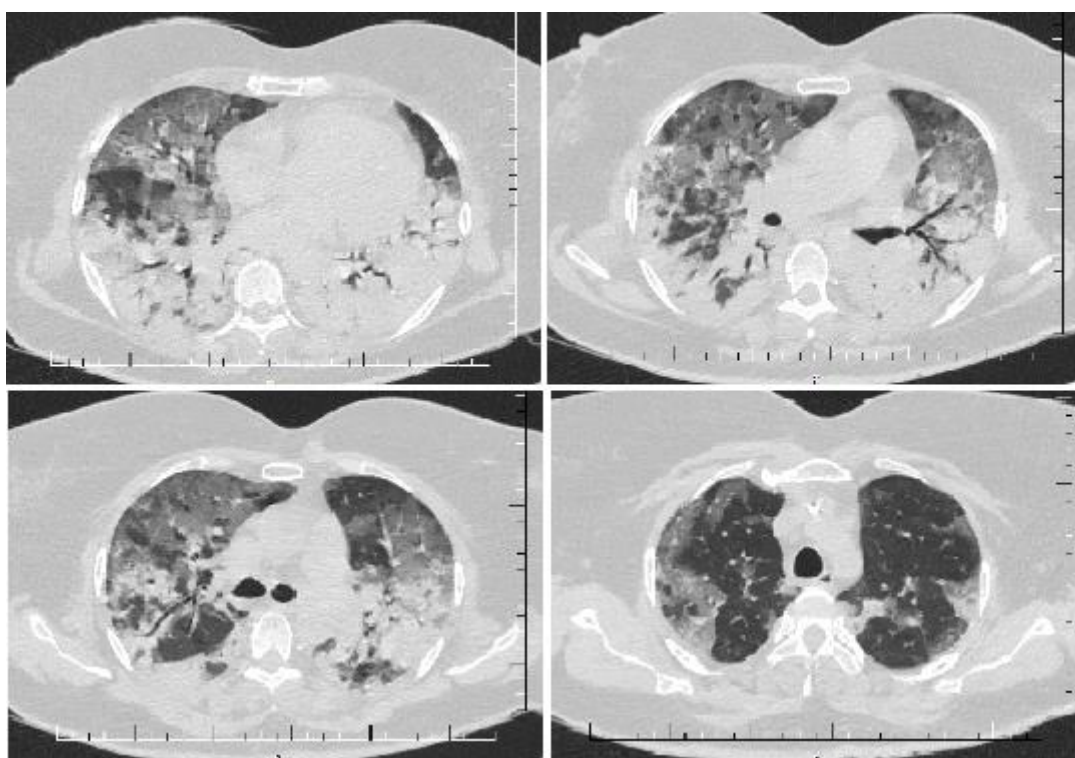


Рисунок 50 - КТ-признаки инфильтративно-воспалительных изменений, тяжелой степени (КТ-4)

По данным лабораторной диагностики, было выявлено повышение маркеров воспаления и лимфопения: лейкоциты $15 \cdot 10^9/\text{л}$. лимфоциты $0,2 \cdot 10^9/\text{л}$., СРБ 352 мг/л, прокальцитонин 0,1 нг/мл, ферритин 1480 мкг/л, ЛДГ 455 ел/л. фибриноген 8,5 г/л. Д-димер 2,77 мкг/мл. CD14+HLADR+ клетки - 49%. Была начата антибактериальная Меропенемом 2000 мг 3 раза в сутки и Линезолидом 600 мг 2 раза в сутки.

На 14 сутки с момента начала заболевания в связи с прогрессированием респираторной дисфункции, снижением р/f индекса менее 100 мм.рт.ст при FiO₂ 85%, критическим поражением легочной ткани, принято решение о начале процедуры ВВ ЭКМО. Поток крови составил 3 л/мин, поток кислорода 4 л/мин. На этом фоне отмечено уменьшение агрессивности параметров ИВЛ. Режим ИВЛ: SIMV; Перемежающаяся принудительная вентиляция: VC + PS (volume control + pressure support); Объем вдоха: 450 мл; Частота принудительных вдохов: 10 в минуту. ПДКВ 10 мбар.

FiO₂: 40 %; SpO₂: 98 %; Комплаинс: 29 мл/мбар; Сопротивление дыхательных путей: 12 мбар/мл/сек;

На второй исследовательской точке среди лабораторных маркеров выявлено: лейкоциты $15,5 \cdot 10^9$ /л. лимфоциты $0,31 \cdot 10^9$ /л., СРБ 275 мг/л, прокальцитонин 0,15 нг/мл, ферритин 147 мкг/л, ЛДГ 475 ел/л. фибриноген 8,79 г/л. Д-димер 5,4 мкг/мл. CD14+HLADR+ клетки - 54%.

ЭКМО продолжалось в течение 40 суток. По данным КТ-исследования грудной клетки, сохранялось тотальное поражение легких. Попытки снизить поток крови, оксигенируемой аппаратом ЭКМО приводили к развитию гипоксемии и гиперкапнии. На 40 сутки проведения ЭКМО у пациента развилась артериальная гипотензия 75/45 мм.рт.ст. По данным лабораторной диагностики выявлена анемия со снижением гемоглобина со 100 до 49 г/л. По данным УЗИ брюшной полости и забрюшинного пространства выявлена свободная жидкость в брюшной полости и жидкостное скопление в забрюшинном пространстве слева объемом около 1935 мл. Развился геморрагический шок с последующей остановкой сердечной деятельности. Реанимационное пособие в течение 30 минут оказалось неэффективным. Констатирована биологическая смерть.

Приведенное клиническое наблюдение иллюстрирует развитие осложненного течения заболевания и летального исхода. У пациента отмечалось тотальное повреждение, развитие коагулопатии осложнившей течение COVID-19 и вызвавшее кровотечение с последующим развитием геморрагического шока,

приведшего к летальному исходу. Описанный клинический случай иллюстрирует типичный для пациентов с осложненным течением и летальным исходом уровень маркеров воспаления на пике «цитокинового шторма» и на второй исследовательской точке. Значения лабораторных маркеров такие, как: СРБ более 66мг/л, ЛДГ более 332 Ед/л, Д-димера более 2,65 мкг/мл, CD14+HLADR+ менее 55% на пике «цитокинового шторма», и значения СРБ >67 мг/л, ЛДГ >292 Ед/л, Д-димера >1,95 мкг/л, фибриногена >5,48 г/л на второй исследовательской точке позволяют прогнозировать осложненное течение заболевания и его благоприятный исход как на этапе «цитокинового шторма», так и на 3 неделе заболевания.

3.8. Корреляционный анализ клинико-инструментальных показателей между группами пациентов

Проведен корреляционный анализ клинико-инструментальных показателей между группами пациентов. Наиболее значимые корреляции представлены в таблице 19 и на рисунках 51-53.

Таблица 19 - Корреляционные взаимосвязи между 1, 2, 3 группами пациентов.

Корреляция		г	СІ	р-сorr
На первой точке исследования				
лимфоциты	СРБ	-0,42	-0,58; -0,24	0,007
Лимфоциты	д-димер	-0,38	-0,54; -0,2	0,047
Лимфоциты	КТ	-0,4	-0,56; -0,22	0,02
Лимфоциты	CD14+HLA-DR+	0,4	0,22; 0,57	0,01
СРБ	ЛДГ	0,52	0,35; 0,67	0,0001
СРБ	фибриноген	0,54	0,39; 0,68	0,0001
СРБ	д-димер	0,56	0,4; 0,69	0,0001
д- димер	КТ	0,54	0,38; 0,67	0,0001
д-димер	NEWS	0,54	0,37; 0,67	0,0001
д-димер	SOFA	0,59	0,44; 0,71	0,0001
СРБ	CD14+HLA-DR+	-0,54	0,68; -0,39	0,0001

Продолжение таблицы 19

фибриноген	CD14+HLA-DR+	-0,45	-0,6;-0,28	0,001
д-димер	CD14+HLA-DR+	-0,58	-0,7;-0,43	0,0001
CD14+HLA-DR+	температура	-0,43	-0,59;-0,26	0,004
CD14+HLA-DR+	КТ	-0,63	-0,7;-0,5	0,0001
CD14+HLA-DR+	NEWS	-0,62	-0,74;-0,48	0,0001
CD14+HLA-DR+	SOFA	-0,62	-0,73;-0,48	0,001
На второй точке исследования				
СРБ	фибриноген	0,72	0,55;0,84	0,0001
лимфоциты	СРБ	-0,53	-0,71; -0,3	0,02

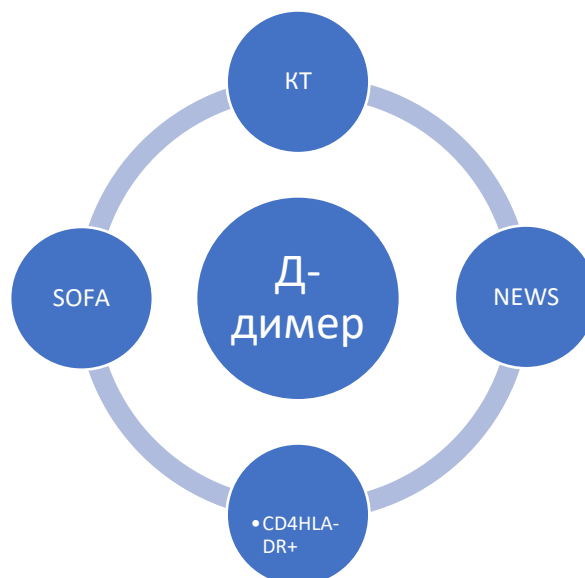


Рисунок 51 - Корреляционные взаимосвязи Д-димера

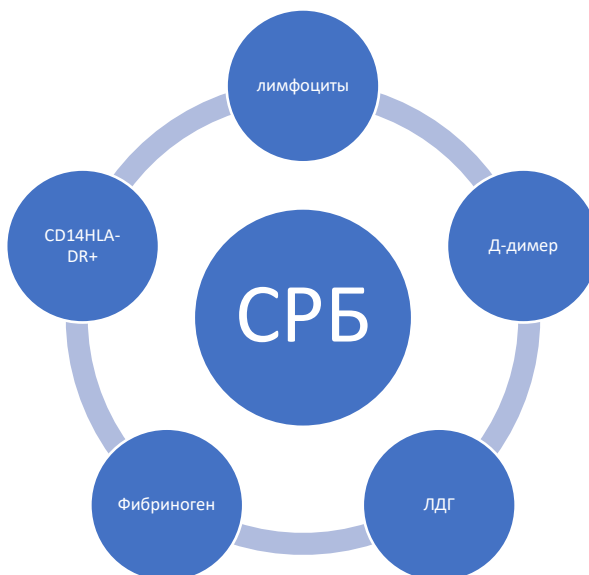


Рисунок 52 - Корреляционные взаимосвязи СРБ

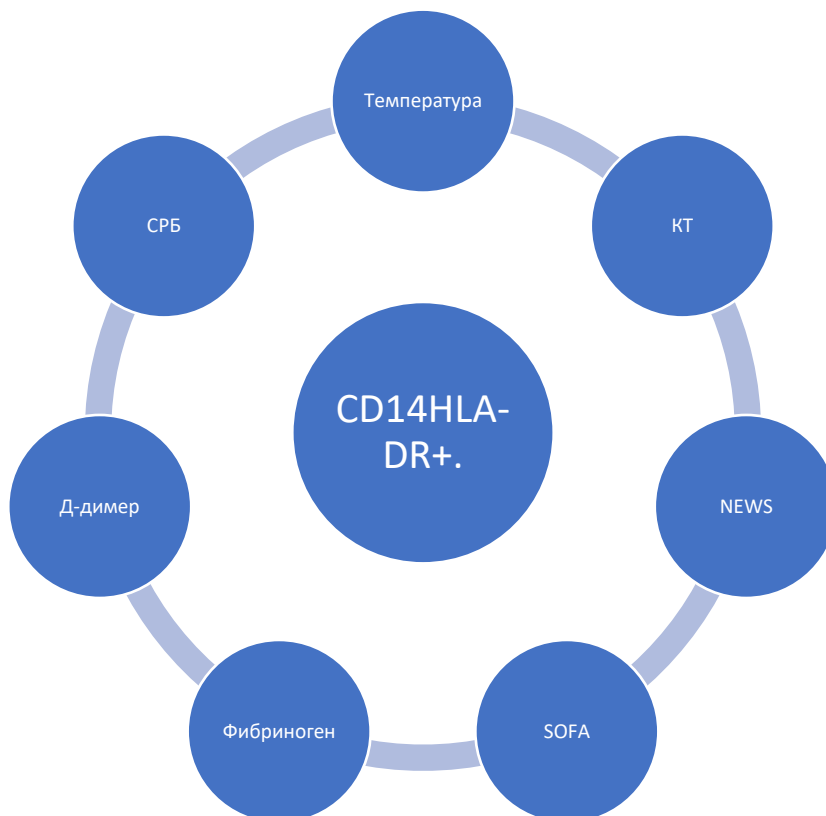


Рисунок 53 - Корреляционные взаимосвязи CD14HLA-DR+

«Цитокиновый шторм» – состояние характеризующееся, прежде всего воспалением, гиперкоагуляцией и иммунной дисфункцией. Наше исследование это подтвердило и выявило наиболее тесные корреляционные взаимосвязи таких маркеров как СРБ, Д-димер, CD14HLA-DR+ клеток. Показатели Д-димера коррелируют преимущественно с клиническими показателями и отражают тяжесть состояния пациентов, значения СРБ взаимосвязаны в основном с лабораторными маркерами и отражают выраженность воспалительной реакции, тогда как показатели уровня CD14HLA-DR+ коррелируют и с лабораторными и с клиническими показателями и является интегральным показателем.

Таким образом, значения CD14HLA-DR+, Д-димера, с-реактивного белка являются наиболее значимыми показателями для прогнозирования исхода и тяжести течения заболевания у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2.

ГЛАВА 4. МАРКЕРЫ АПОПТОЗА У РЕАНИМАЦИОННЫХ ПАЦИЕНТОВ С ВИРУСНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ, ВЫЗВАННОЙ SARS-CoV-2

4.1 Результаты исследования показателей апоптоза лимфоцитов и лейкоцитов в венозной крови у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2 на пике «цитокинового шторма»

Результаты исследования показателей апоптоза лимфоцитов и лейкоцитов в венозной крови у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, во временной интервал с 5 по 12 сутки с момента начала заболевания, ассоциированный с развитием пика «цитокинового шторма», представленные в таблице 20.

Таблица 20 - Показатели апоптоза лимфоцитов и лейкоцитов в венозной крови пациентов исследуемых групп на пике «цитокинового шторма». (5-12 сутки с момента начала заболевания)

Показатели апоптоза	Референсный интервал	1 группа Медиана (Q1; Q3)	2 группа Медиана (Q1; Q3)	3 группа Медиана (Q1; Q3)	p
Относительное количество погибших лейкоцитов %	<0,9%	1.05 (0,74;1,3)	1.23 (0,8;1,46)	1.57 (0,72;1,96)	0,354
Абсолютное количество погибших Лейкоцитов кл/мкл	<100 кл/мкл	49.84 (32,76;69,0)	95.8 (36,75;106,06)	173.78 (54,82;226,5)	0,002 *
CD 95+ лимфоциты	38-50%	37.06 (29,9;43,2)	37.0 (25,12;48,1)	37.87 (28,78;49,28)	0,975
Ранний апоптоз %	1,9-5,5%	10.81 (6,3;14,9)	7.26 (4,51;9,4)	5,61 (2,06;5,52)	0,001 *

Примечание: Q1; Q3 - 1 и 3 квартили; * - статистически различающиеся показатели (критерий Краскела-Уоллиса)

Продолжение таблицы 20

Поздний апоптоз %	0,01-0,1%	0.12 (0,03;0,18)	0.13 (0,03;0,2)	0,12 (0,07;0,13)	0,629
АКТ у.е.	124	367.75 (194,88;472,38)	450.54 (170,75;578)	514,5 (378,88;710)	0,404
BAD у.е.	141	102.7 (76,75;129,25)	139.41 (80,25;144,5)	253,25 (185,75;329,75)	0,011*
BCL -2 у.е.	18,6	38.88 (25,88;44,88)	36.5 (26,5;45)	27,42 (22,25;25,5)	0,226
Каспаза -8 у.е.	82,4	56.3 (46,62;62,62)	62.53 (53,75;71,5)	62,5 (5,12;76,12)	0,223
Каспаза -9 у.е.	29	269.8 (179,38;365,62)	302.5 (181,5;429,25)	418,83 (208,5;625,25)	0,473
JNK у.е.	134	195.68 (81;121,25)	210.51 (87,25;214,75)	222 (108,12;326,12)	0,248
P-53 у.е.	180	58.58 (43,75;71,5)	71.96 (53,25;90,5)	48,83 (38,38;62,38)	0,022*

Маркеры апоптоза, такие, как абсолютное количество погибших лейкоцитов, лимфоциты на ранней стадии апоптоза, BAD, P-53 достоверно отличались между группами. Пациенты первой группы характеризовались значительно меньшим количеством погибших лейкоцитов в сравнении с третьей группой пациентов, где показатель был более чем в три раза выше. Процент лимфоцитов на ранней стадии апоптоза был более высоким у пациентов с неосложненным исходом и неосложненным течением заболевания, что может свидетельствовать об успешном иммунном ответе организма на инвазию вируса SARS-CoV-2. Белок BAD, обладающий функцией, направленной на стимуляцию апоптоза, у пациентов 1 и 2 группы в лизате лимфоцитов венозной крови не определялся, тогда как у пациентов с летальным исходом уровень BAD был достоверно выше, что говорит о инициировании апоптоза клеток. Отмечалась тенденция к увеличению значений протеинкиназы АКТ, определяющей выживание клеток, у пациентов от 1 к 3 группе, хотя различия статистически не достоверны. Уровень белка BCL -2 отмечался на повышенном уровне у пациентов всех групп с повышением значений от третьей группы к первой где отмечался максимальный подъем. При

исследовании уровня активированной каспазы-9 отмечалась тенденция к увеличению у пациентов 2 и 3 групп.



Рисунок 54 - Уровень активированной каспазы-9 в исследуемых группах

Уровень ядерного белка p53, ответственного за восстановление ДНК и стимуляцию апоптоза, у пациентов исследуемых групп не определялся (свечение ниже линии cut-off). Значение JNK, при сравнении пациентов исследуемых групп было несколько повышено, однако, не отличалось между группами.

4.2. Результаты исследования показателей апоптоза лимфоцитов и лейкоцитов в венозной крови у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2 на пике «цитокинового шторма» среди пациентов с благоприятным и летальным исходом

Разделение пациентов на пике «цитокинового шторма» на группы в зависимости от исхода заболевания – благоприятный исход (группа 1+ группа 2) или летальный исход (группа 3) позволяет выявить параметры апоптоза лимфоцитов и лейкоцитов венозной крови, с помощью которых можно прогнозировать развитие летального исхода. Вероятно, эти показатели будут свидетельствовать о развитии летального исхода вследствие тяжести самой

коронавирусной инфекции и выраженности дисбаланса иммунного ответа на инвазию вируса SARS-CoV-2, а именно тяжести «цитокинового шторма». ROC-анализ продемонстрирует чувствительность и специфичность, достоверно отличающихся параметров которые прогностически значимы в отношении развития летального исхода. При сравнении показателей апоптоза лимфоцитов на пике «цитокинового шторма» были выявлены статистически достоверные отличия, представленные в таблице 21.

Таблица 21 - Сравнение показателей апоптоза лимфоцитов и лейкоцитов венозной крови пациентов на пике «цитокинового шторма» в соответствии с исходом заболевания

Показатели апоптоза	Благоприятный исход (1 группа + 2 группа) Медиана (Q1; Q3)	Летальный исход (3 группа) Медиана (Q1; Q3)	p
Относительное количество погибших лейкоцитов %	1,11(0,74;1,35)	1,57(0,72;1,96)	0,336
Абсолютное количество погибших Лейкоцитов кл/мкл	64,97(32,93;73,02)	173,78(54,82;226,5)	0,01*
CD 95	37,04(28,45;44,2)	37,87(28,78;49,28)	0,987
Ранний апопоз %	9,64(5,2;13,9)	5,61(2,06;5,52)	0,001*
Поздний апопоз %	0,12(0,03;0,18)	0,12(0,07;0,13)	0,404
АКТ	408,08(182;573)	514,5(348;710)	0,187
BAD	120,58(78,25;130,5)	253,25(185,75;329)	0,004*
BCL -2	37,72(26;45,25)	27,42(22,25;25,5)	0,101
Каспаза -8	59,33(47,5;68)	62,59(50,12;76,12)	0,472
Каспаза - 9	285,73(180,75;374,75)	418,83(208,5;625,25)	0,263
JNK	202,9(83;163,5)	222(108,12;326,12)	0,222
P-53	65,09(53;76,5)	48,83(38,38;62,38)	0,12

Примечание: Q1; Q3 - 1 и 3 квартили; * - статистически различающиеся показатели (U-критерий Манна — Уитни)

При исследовании абсолютного количества погибших лейкоцитов у пациентов с благоприятным исходом, уровень составил 64,97 кл/мкл (32,93;73,02).

В группе с неблагоприятным исходом 173,78 кл/мкл (54,82;226,5), что может быть связано с более выраженной гипоксией у пациентов с летальным исходом. Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень абсолютного количества погибших лейкоцитов более 89 кл/мкл свидетельствует о развитии летального исхода заболевания с чувствительностью 57% и специфичностью 83%. Значение AUC ROC – 0.7 (Рисунок 55).

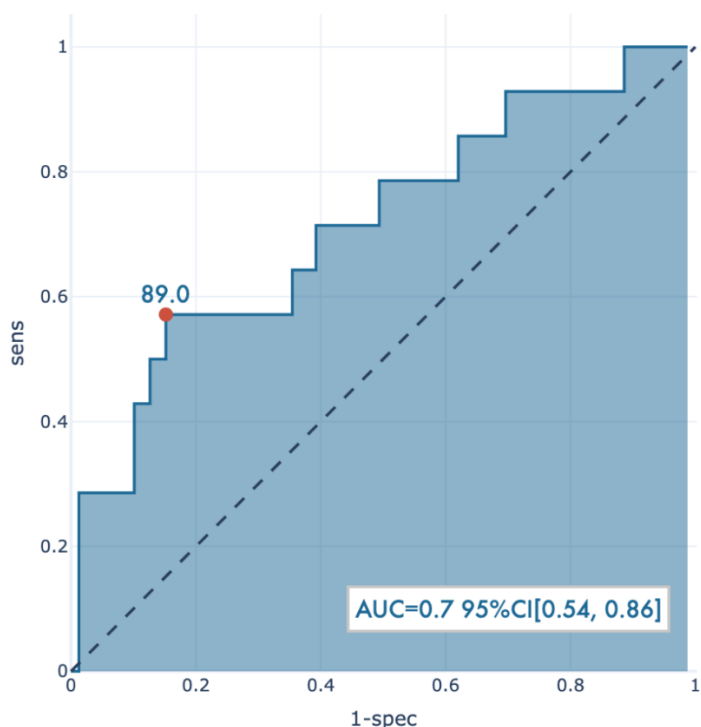


Рисунок 55 - Чувствительность и специфичность уровня абсолютного количества погибших лейкоцитов для прогнозирования исхода заболевания во время «цитокинового шторма» у пациентов с COVID-19 (ROC-анализ)

При исследовании уровня лимфоцитов на ранней стадии апоптоза у пациентов с благоприятным исходом, уровень составил 9,64 % (5,2;13,9). В группе с неблагоприятным 5,61(2,06;5,52). Это характеризует нарушение индукции апоптоза. Полученные значения статистически достоверно различались ($p < 0,05$). Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень лимфоцитов на ранней стадии апоптоза менее 4,7% с чувствительностью 81% и специфичностью 71% свидетельствует о неблагоприятном исходе заболевания. Значение AUC ROC – 0.7. Уровень лимфоцитов на поздней стадии апоптоза были в пределах референсных

значений, что, вероятно, ассоциировано с элиминацией уже погибших лимфоцитов из сосудистого русла (Рисунок 56).

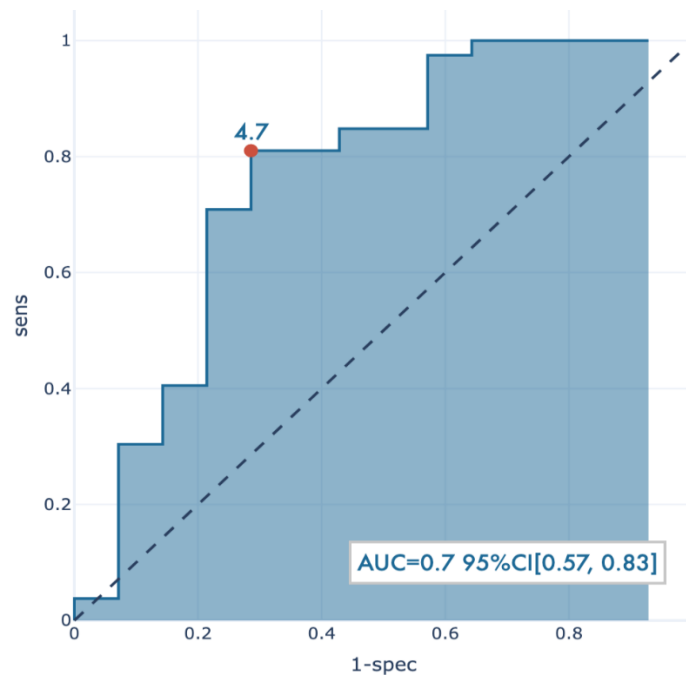


Рисунок 56 - Чувствительность и специфичность уровня лимфоцитов на ранней стадии апоптоза для прогнозирования исхода заболевания во время «цитокинового шторма» (ROC-анализ)

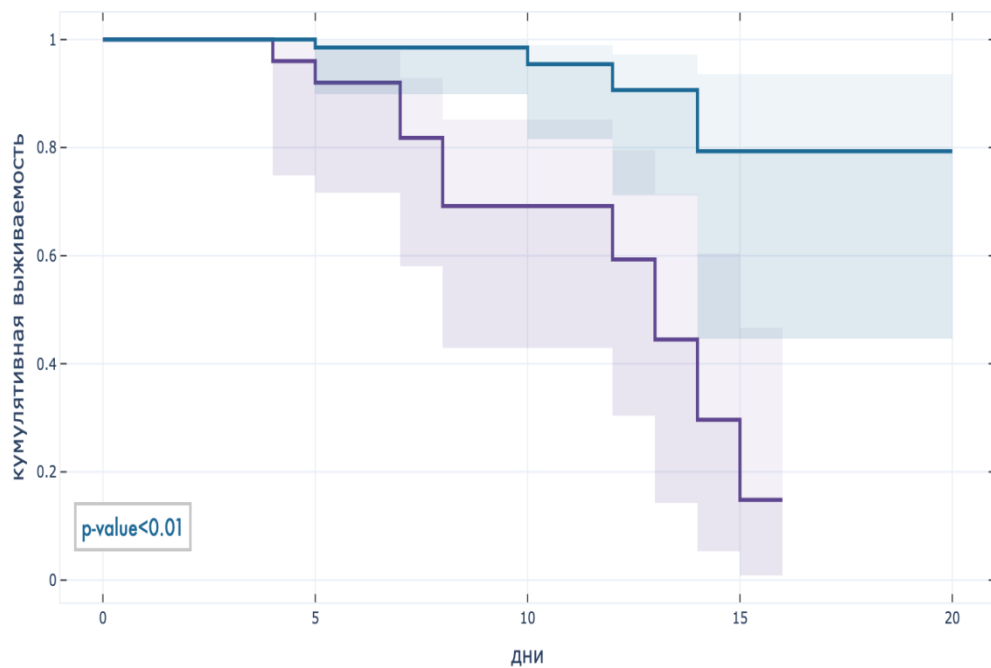


Рисунок 57 - Кривые оценки выживания Каплан-Мейера. Сравнения кривых при помощи лог-ранк теста. Фиолетовая - уровень лимфоцитов на ранней стадии менее 4.7 %, синяя – уровень лимфоцитов на ранней стадии апоптоза более 4.7%

При исследовании в венозной крови регуляторного проапоптотического белка BAD, выявлено, что у пациентов с благоприятным исходом, данный белок не определяется (свечение ниже линии cut-off). В группе с летальным исходом уровень свечения составляет 253,25 у.е. и был почти в два раза выше точки cut-off (185,75;329). Это характеризует индукцию апоптоза. Полученные значения статистически достоверно различались ($p < 0,05$). Значение AUC ROC – 0.85. Проведенный ROC-анализ выявил, что уровень белка BAD выше 145 с чувствительностью 85% и специфичностью 82% свидетельствует о неблагоприятном исходе (рисунок 58).

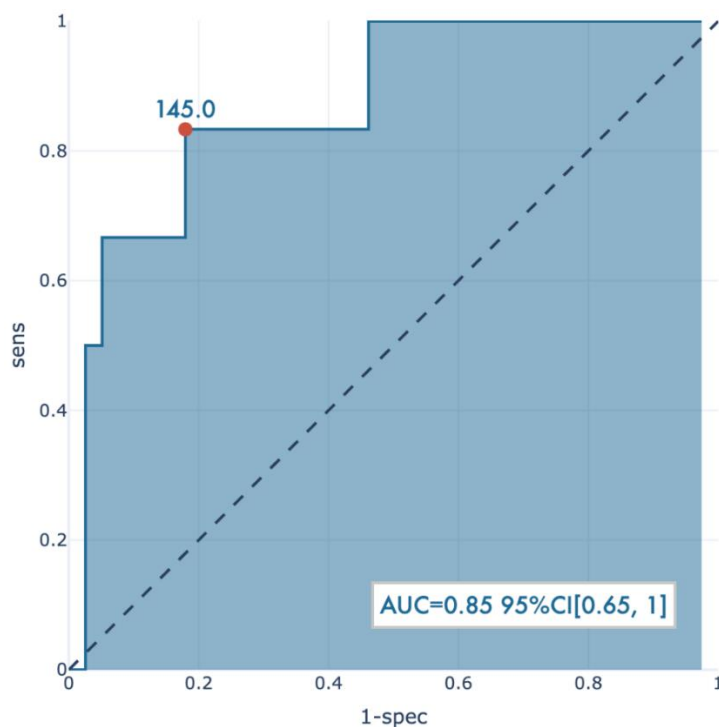


Рисунок 58 - Чувствительность и специфичность уровня белка BAD для прогнозирования исхода заболевания у пациентов во время «цитокинового шторма» (ROC-анализ)

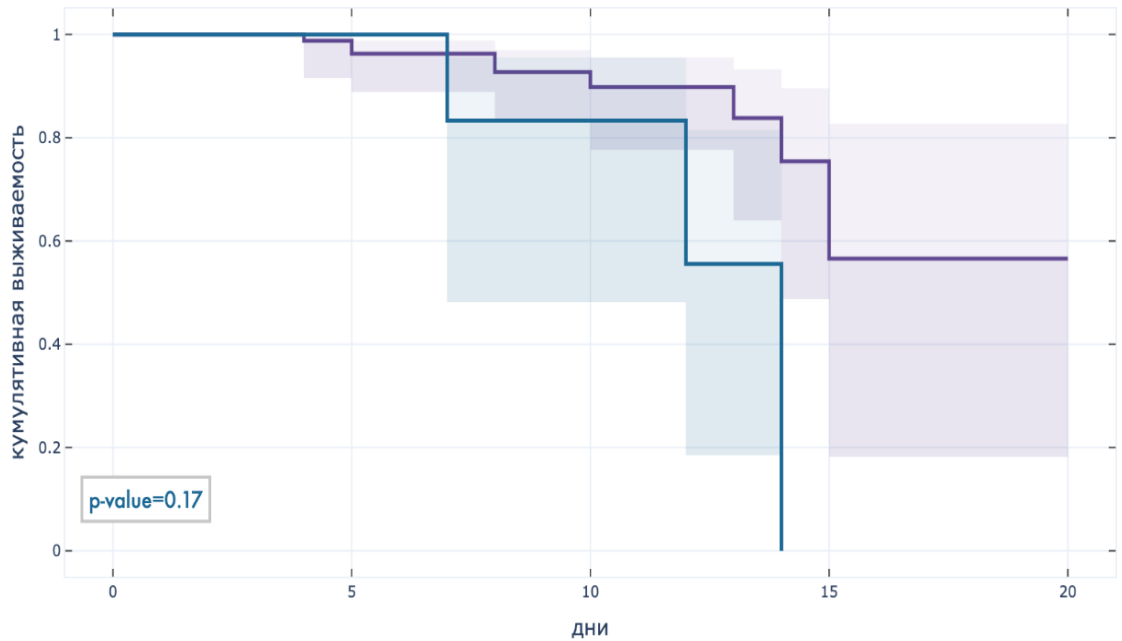


Рисунок 59 - Кривые оценки выживания Каплан-Мейера. Сравнения кривых при помощи лог-ранк теста. Фиолетовая - уровень белка BAD менее 145, синяя – уровень белка BAD более 145

Значения протеинкиназы АКТ отмечались на значительно более высоком уровне относительно базового свечения и в особенности повышались у пациентов в группе с летальным исходом, что может свидетельствовать об ингибировании апоптоза. Антиапоптотический белок BCL-2 был выше у пациентов с неосложненным исходом, хотя различия между группами статистически не значимы. Значения каспазы – 8 отмечались на низком уровне, однако, каспаза -9, напротив, значительно повышена у пациентов обеих групп, что так же свидетельствует о инициации внутреннего пути апоптоза. Уровень JNK имел тенденцию к повышению у пациентов обеих групп, что объясняется гиперцитокинемией, клеточной гипоксией и ведет к активации апоптоза.

Таким образом, наблюдалась дисрегуляция апоптотической гибели клеток у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2. При этом у пациентов с неосложненным исходом отмечается повышение антиапоптотического белка BCL-2, который препятствует выходу цитохрома-с в цитоплазму клетки и активации каспазы-9. У пациентов с осложненным исходом заболевания уровень BCL-2 не повышается, что ассоциировано с более высокими

значениями каспазы-9, а повышение значений АКТ не достаточно для блокирования апоптотического каскада.

4.3. Результаты исследования показателей апоптоза лимфоцитов и лейкоцитов в венозной крови у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2 на пике «цитокинового шторма» среди пациентов с осложненным и не осложнённым течением

В таблице 22 приведены сравнительные данные анализа апоптоза лимфоцитов и лейкоцитов венозной крови пациентов на пике «цитокинового шторма», у которых данное заболевание протекало как неосложненное (группа 1) и осложненное (группа 2+ группа 3). Этот анализ необходим для определения маркеров прогноза осложненного течения заболевания. Выявленные маркеры будут прогнозировать вероятность развития осложненного течения на следующем после «цитокинового шторма» этапе заболевания.

Таблица 22 – Сравнение показателей апоптоза лимфоцитов и лейкоцитов в венозной крови пациентов на пике «цитокинового шторма» с осложненным и неосложненным течением заболевания

Показатели апоптоза	Неосложненное течение (1 группа) Медиана (Q1; Q3)	Осложненное течение (2 группа + 3 группа) Медиана (Q1; Q3)	p
Относительное количество погибших лейкоцитов %	1,05(0,74;1,3)	1,35(0,78;1,6)	0,162
Абсолютное количество погибших лейкоцитов кл/мкл	49,84(32,76;69)	123,09(39,15;117,25)	0,001*
CD 95	37,06(29,9;43,2)	37,31(25,18;49,3)	0,84
Ранний апопоз %	10,81(6,3;14,9)	6,68(3,53;8,8)	0,001*
Поздний апоптоз %	0,12(0,03;0,18)	0,12(0,06;0,17)	0,416
АКТ	367,75(194,88;472,38)	465(183,5;620)	0,544

Продолжение таблицы 22

BAD	102,7(76,75;129,25)	166,73(86;245)	0,082
BCL -2	38,88(25,88;44,88)	34,32(24;44)	0,909
Каспаза -8	56,3(46,62;62,62)	62,52(51,5;72)	0,086
Каспаза - 9	269,8(179,38;365,62)	330,42(181;483)	0,417
JNK	195,68(81;121,25)	213,27(88,5;256)	0,14
P-53	58,58(43,75;71,5)	66,41(54,5;80,5)	0,12

При исследовании абсолютного количества погибших лейкоцитов у пациентов с неосложненным течением заболевания, уровень составил 49,84 кл/мкл (32,76;69) и соответствует значениям нормы, тогда как в группе с осложненным течением заболевания 123,09(39,15;117,25). При исследовании уровня лимфоцитов на ранней стадии апоптоза у пациентов с неосложненным течением, уровень составил 10,81(6,3;14,9). В группе с осложненным течением 6,68(3,53;8,8). Это характеризует нарушение индукции апоптоза. Проведенный ROC-анализ показал, что уровень лимфоцитов на ранней стадии апоптоза менее 7,21 с чувствительностью 67% и специфичностью 72% свидетельствует об осложненном течении заболевания (рисунок 60).

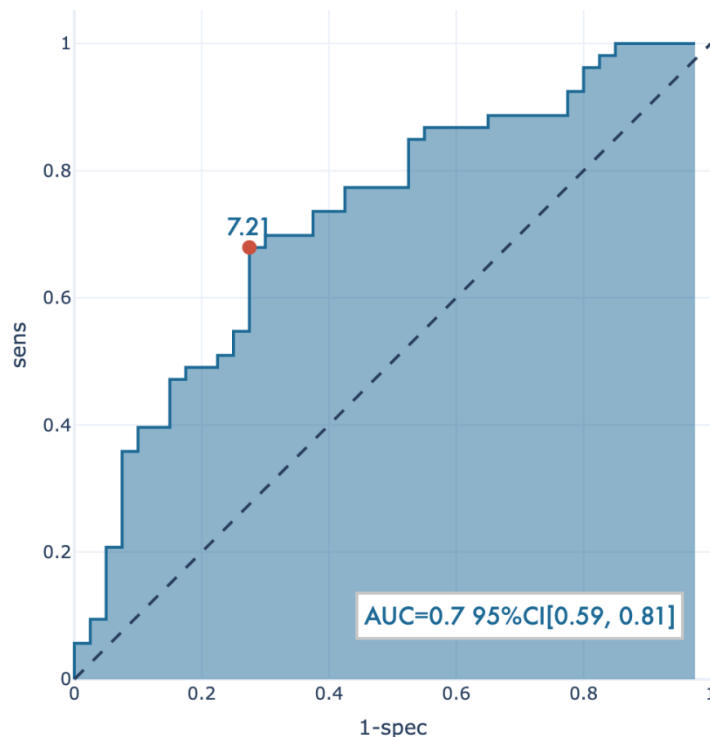


Рисунок 60 - Чувствительность и специфичность уровня лимфоцитов на ранней стадии апоптоза для прогнозирования исхода заболевания у пациентов с COVID-19 (ROC-анализ)

Значения протеинкиназы АКТ отмечались на значительно более высоком уровне относительно базового свечения, в особенности повышались у пациентов в группе с тяжелым течением заболевания. Уровень каспазы -9 значительно повышен у пациентов обеих групп. Остальные показатели не имели отличий между группами.

Таким образом, наиболее заметно увеличение концентрации лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза в венозной крови у пациентов с COVID-19 в группах с благоприятным исходом и неосложненным течением заболевания. При этом у этих пациентов отмечали отсутствие проапоптотического фактора BAD и высокое содержание противоапоптотического белка BCL-2, что, напротив, позволяет предотвратить развитие выраженного апоптоза лимфоцитов. Среди пациентов с летальным исходом нарушение апоптоза лимфоцитов ассоциировано с дисрегуляцией митохондриального пути апоптотического каскада. У пациентов с летальным исходом заболевания отмечалось значительное увеличение белка BAD, невысокое содержание BCL-2, вследствие чего отмечалась выраженная активация каспазы 9. Более высокий уровень АКТ оказался недостаточным для блокировки активации каспазы-9, что должно приводить к выраженному апоптозу лимфоцитов в сравнении с выжившими пациентами. Однако, повышения уровня клеток на поздних стадиях апоптоза, в венозной крови у пациентов с COVID-19 не наблюдалось, что, вероятно, ассоциировано с элиминацией их из сосудистого русла, что сопровождалось развитием лимфопении, лимфоидной инфильтрации тканей с последующим поражением и развитием полиорганной дисфункции.

У пациентов на этапе «Цитокинового шторма», при принятии решения о маршрутизации и терапии, основываясь на стандартной тактике, отмечается большая длительность пребывания в отделении реанимации и интенсивной терапии и стационаре, требуется более длительная респираторная поддержка, выше частота развития инфекционных и тромбоэмболических осложнений. Использование выявленных маркеров воспаления и апоптоза, наиболее значимых в прогнозировании осложненного течения и летального исхода, способствует

оптимизации маршрутизации пациентов, позволяет рассмотреть целесообразность проведения патогенетической терапии, а также использования наиболее агрессивных режимов профилактики развития тромбоэмболических и инфекционных осложнений, что позволяет сократить время пребывания в отделении реанимации и интенсивной терапии, сократить длительность пребывания в стационаре, длительность и агрессивность респираторной поддержки, частоту развития инфекционных и тромбоэмболических осложнений.

Таблица № 23.

Таблица 23 - Сравнение пациентов при использовании стандартной тактики и основанной на прогностическом комплексе

Показатель	Группа 2а (комплекс) (n=8) (ср. знач, ст. откл)	Группа 2б (стандартная) (n=8) (ср. знач, ст. откл)	p
Длительность в орит	11,14 ± 6,74	16,25 ± 5,46	<0,05
Длительность в стационаре	14,52 ± 4,71	29,05 ± 7,83	<0,05
НИВЛ	8	5	<0,05
ИВЛ	0	3	<0,05
Длительность нивл	6,12 ± 3,02	10,37 ± 1,96	<0,05
Длительность ивл	0	15,33 ± 13,11	<0,05
Нозокомиальная пневмония	3	6	<0,05
сепсис	0	2	<0,05
Тромбоэмболические осложнения	1	4	<0,05

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пандемия новой коронавирусной инфекции 2019 (COVID-19) представляет собой научную, медицинскую и социальную проблему, в основе которой находится непредсказуемое клиническое течение заболевания, характеризующееся быстрым нарастанием тяжести, развитием тяжелых, в том числе летальных осложнений. Тяжесть течения новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, во многом обусловлена развитием у больных иммунопатологического состояния. Тяжелая форма Covid-19 связана со значительной гиперактивацией иммунной системы, так называемый «цитокиновый шторм», и как следствие этого, повреждением органов и тканей, что предполагает широко распространенную и пагубную иммунную активность. Проведенные исследования описывают генерализованные васкулиты, лежащие в основе поражения органов у пациентов с тяжелым течением COVID-19, индуцированные активацией воспалительных каскадов, активацией комплемента и провоспалительными цитокинами [115]. Генерализованные васкулиты вызывают повреждения легких, играют значительную роль в венозных и артериальных тромботических и тромбоэмболических осложнениях. Формирование и тяжесть осложнений, которые развиваются и клинически реализуются, как правило, уже после «цитокинового шторма» трудно достоверно прогнозировать с помощью используемых в настоящее время лабораторных биомаркеров. Текущая клиническая практика предлагает определение ИЛ-6 в дополнение к рутинным лабораторным тестам, чтобы выявить пациентов с риском фатальных осложнений и тех, кому потенциально будет полезна иммунотерапия антогонистами и блокаторами рецепторов ИЛ-6 [130]. Анализ цитокинов дорогостоящий и рутинно не проводится в большинстве лабораторий. Однако, чувствительность и специфичность уровня ИЛ-6 в прогнозировании исхода заболевания оставляет желать лучшего [131]. Кроме того, ИЛ-6 представляет собой молекулу, играющую ключевую роль в формировании и течении «цитокинового шторма». «Цитокиновый шторм», в свою

очередь, развивается на второй стадии заболевания COVID-19. На этой стадии, как правило, не формируется тяжелых соматических осложнений за исключением РДС, и как следствие, дыхательной дисфункции. На этой стадии заболевания нарушение газообмена, как правило, удается компенсировать при помощи высокопоточной оксигенотерапии, неинвазивной вентиляции легких, инвазивной вентиляцией легких или ЭКМО. Летальный исход и клинически значимые осложнения в подавляющем большинстве наблюдений у пациентов с COVID-19 развиваются не на второй стадии, а уже на следующей, третьей стадии заболевания, начиная с третьей недели заболевания. Это этап выздоровления или развития осложнений и летального исхода. Такая стадийность заболевания COVID-19 особенно подчеркнулась после начала повсеместного использования блокаторов рецепторов ИЛ-6 и свободного ИЛ-6 [132]. Своевременное использование этих препаратов позволило в значительной мере решить проблему «цитокинового шторма». Вместе с этим, проблема тромбгеморрагических и инфекционно-септических осложнений, развивающихся уже после «цитокинового шторма», на третьей неделе заболевания во многом не решена. Прогнозированию осложненного течения и летального исхода посвящено представленное исследование.

Альтернативные маркеры воспаления, коррелирующие с тяжестью состояния и исходом заболевания, будут представлять растущий интерес с точки зрения прогностической ценности. В условиях ограниченности медицинских ресурсов и значительного числа больных наиболее логичным является персонализированный подход к терапии пациентов с применением методов, позволяющих в максимально короткие сроки объективно стратифицировать пациентов на группы в соответствии с течением заболевания и с прогнозируемым исходом и, следовательно, степенью оказания необходимой медицинской помощи.

В этой связи настоящее исследование сосредоточено на поиске наиболее надежных и экономически выгодных маркеров в прогнозировании осложненного течения заболевания и летального исхода у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

В исследование вошли 93 пациента. В зависимости от тяжести течения заболевания и его исхода, пациенты были разделены на три группы: группа 1 – неосложненное течение заболевания, благоприятный исход (n=53); группа 2 – осложненное течение заболевания, благоприятный исход (n=26); группа 3 – осложненное течение заболевания и неблагоприятный (летальный) исход (n=14).

Группы отличались по необходимости проведения респираторной поддержки. Все пациенты с осложненным течением заболевания и благоприятным исходом нуждались в проведении респираторной поддержки, преимущественно в неинвазивной вентиляции легких, тогда как пациенты с осложненным течением и неблагоприятным исходом требовали проведения инвазивной вентиляции легких, а большинство пациентов с неосложненным течением заболевания не нуждались в респираторной поддержке. У пациентов с осложненным течением и благоприятным исходом отмечалась наибольшая длительность поведения респираторной поддержки и наибольшая длительность пребывания в стационаре. В связи с этим отмечалась необходимость в определении лабораторных маркеров, позволяющих прогнозировать осложненное течение заболевания и его исход. Под осложненным течением заболевания мы понимали развитие клинически значимых осложнений, напрямую не связанных с инвазией вируса SARS-CoV-2 или с реакцией на него иммунной системы пациента. Также под осложненным течением COVID-19 мы понимали ситуации, когда терапия, направленная на профилактику типичных осложнений, главным образом, тромбоэмболических, оказывалась неэффективной. Осложнения манифестировали в исходе «цитокинового шторма». В начале развития «цитокинового шторма» и на его пике невозможно прогнозировать разовьются осложнения на следующей стадии заболевания или нет. У пациентов с неблагоприятным исходом отмечалась наивысшая частота развития осложнений. Наиболее частыми осложнениями являлись тромбозы вен верхних и/или нижних конечностей, ТЭЛА, клинически значимые геморрагические осложнения нозокомиальная бактериальная пневмония, сепсис и, как следствие, этого полиорганная дисфункция. Летальный исход, развивающийся

уже после завершения «цитокинового шторма», у пациентов с COVID-19 может быть обусловлен или тяжестью повреждения легких на фоне «цитокинового шторма» или, в подавляющем большинстве наблюдений осложнениями, развившимися уже после успешной коррекции ЦШ. В связи с этим стояла цель в определении лабораторных маркеров, которые позволяют прогнозировать осложненное течение заболевания и его исход.

Среди лабораторных показателей, отражающих тяжесть состояния реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS – CoV- 2 прослеживались значительные отличия. Результаты проведенной работы показали, что на этапе «цитокинового шторма» наиболее чувствительными и специфичными маркерами для прогнозирования осложнённого течения и неблагоприятного исхода являлись ЛДГ, Д-димер, CD14+HLADR, СРБ. Наиболее высоких значений маркеры таких как ЛДГ, Д-димер и СРБ достигали у пациентов с летальным исходом, что согласуется с представленными в литературе данными исследований других авторов [8,133]. В нашем исследовании среди пациентов с летальными исходами медиана ЛДГ составила 394,45(332,5;475) Ед/л., Д-димер - 5,39(2,82;5,4) мкг/л., СРБ - 127,37(70,75;181,25) мг/л. Среди пациентов с осложненным течением медиана ЛДГ составила 356,58(299,75;409,0) Ед/л., Д-димер - 1,51(0,64;1,79) мкг/л., СРБ - 93,2(30,17;152,25) мг/л. Среди пациентов с неосложненным течением медиана ЛДГ составила 264,88(209,0;297,0) Ед/л., Д-димер - 0,77(0,43;0,96) мкг/л., СРБ - 44,99(5,8;56,7) мг/л. Медиана CD14+HLADR+ клеток у пациентов с летальным исходом составила 43,09%(16,65;73,9), среди пациентов с осложненным течением 76,17% (64,88;92,72) и среди пациентов с благоприятным исходом 87,52% (82,6;97,0).

На основании проведенного анализа удалось установить пороговые уровни для маркеров, характеризующие осложненное течение и неблагоприятный исход заболевания COVID-19. Так, осложненное течение заболевания развивалось при уровне СРБ на этапе «цитокинового шторма» более 52 мг/л (чувствительность 75% и специфичность 69%), ЛДГ на этапе «цитокинового шторма» более 296 Ед/л

(чувствительность 78% и специфичность 87%), Д-димера на этапе «цитокинового шторма» более 1,4 мкг/мл (чувствительность 62% и специфичность 87%), CD14+HLADR+ клеток на этапе «цитокинового шторма» менее 76,3% (чувствительность 88% и специфичность 57%) при исследовании, выполненном на пике «цитокинового шторма».

Неблагоприятный исход заболевания развивался при уровне СРБ, на этапе «цитокинового шторма», 66мг/л (чувствительность 86% и специфичность 67%), ЛДГ на этапе «цитокинового шторма» более 332,0 ед./л (чувствительность 90% и специфичность 71%), Д-димера на этапе «цитокинового шторма» более 2,65 мкг/мл (чувствительность 92% и специфичность 96%), CD14+HLADR+ клеток на этапе «цитокинового шторма» менее 55% (чувствительность 92% и специфичность 71%) при исследовании, выполненном на пике «цитокинового шторма».

При исследовании, выполненном на второй точке, соответствовавшей третьей неделе заболевания, неблагоприятный исход заболевания развивался при значениях ЛДГ более 292 Ед/л (чувствительность 97% и специфичность 67%), при значениях д-димера более 1,95 мкг/л (чувствительность 98% и специфичность 83%), при значениях СРБ более 67 мг/л (чувствительность 75% и специфичность 93%), при значениях фибриногена более 5,48 г/л (чувствительность 77% и специфичность 80%), при значениях прокальцитонина более 1,95 нг/мл (чувствительность 97% и специфичность 78%)

«Цитокиновый шторм» – состояние характеризующееся, прежде всего воспалением, гиперкоагуляцией и иммунной дисфункцией. Наше исследование это подтвердило и выявило наиболее тесные корреляционные взаимосвязи таких маркеров как СРБ, Д-димер, CD14HLA-DR+ клеток. Показатели Д-димера коррелируют преимущественно с клиническими показателями и отражают тяжесть состояния пациентов, значения СРБ взаимосвязаны в основном с лабораторными маркерами и отражают выраженность воспалительной реакции, тогда как показатели уровня CD14HLA-DR+ коррелируют и с лабораторными и с клиническими показателями и является интегральным показателем.

Клетки с фенотипом CD14+HLA-DR+ являются основной популяцией моноцитов в крови здоровых людей. Уменьшение или отсутствие экспрессии молекул HLA-DR на моноцитах ассоциировано с развитием иммунной дисфункции [91]. Оценка параметра CD14+HLA-DR+ методом проточной цитометрии позволяет экономически выгодно и в короткие сроки оценить иммунный статус пациента, прогнозировать вариант течения заболевания и его исход и способствует принятию решение о начале антибактериальной терапии совместно с проведением патогенетической терапии поскольку антагонисты рецептора ИЛ-6 способны индуцировать и усугублять уже развившуюся иммунную дисфункцию.

При заболеваниях вирусной этиологии, чаще всего, развивается лимфоцитоз, что вызвано особенностями иммунного ответа, потребностью в инактивации вируса и элиминации пораженных клеток путем апоптоза, с помощью Т-цитотоксических лимфоцитов. При COVID-19 развивается лимфопения, коррелирующая с тяжестью состояния пациентов на фоне гипервоспалительной реакции организма [12]. Одной из причин развития глубокой лимфопении при COVID-19 является усиленный апоптоз иммунокомпетентных клеток [91]. В исследованиях, посвященных патогенетическим особенностям коронавирусной инфекции выявлен значительный апоптоз лимфоцитов [10, 11] и повышенная экспрессия Fas [11] у пациентов с COVID-19. В своей работе мы также выявили увеличение лимфоцитов подверженных апоптозу в венозной крови пациентов с COVID-19, однако, это не коррелировало с развитием лимфопении. Также, не выявлено существенной активизации экспрессии CD95 на лимфоцитах ни в одной из изучаемых групп. Известно, что экспрессия и чувствительность к стимуляции CD95 повышается при активации Т-лимфоцитов [6]. При этом активация лимфоцитов может быть реализована за счет суперантигенного мотива на шиповидном белке SARS-CoV-2 [91]. А реализация апоптотического сигнала Fas-рецептор происходит при активации каспазы 8, изменение уровня которой в настоящем исследовании не отмечено [91]. Тем временем, CD 95 представляется не только передатчиком апоптотического сигнала, но также может стимулировать

дифференцировку клеток через протеинкиназу АКТ. Таким образом, выполненное нами исследование показывает как сбой активации лимфоцитов в ответ на вирусную инвазию, так и дисфункцию активации апоптоза лимфоцитов через внешний путь у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией вызванной SARS-CoV-2.

Существенные инверсии выявлены при изучении белков, ответственных за регуляцию внутреннего пути активации апоптоза при развитии «цитокинового шторма» у пациентов с COVID-19. У пациентов с летальным исходом доминировало влияние проапоптотических сигналов, при выраженном снижении антиапоптотических сигналов. Несмотря на развитие существенной лимфопении у пациентов с летальным исходом, коррелирующей с тяжестью дыхательной недостаточностью, органной дисфункцией концентрацией С-реактивного белка, мы не смогли установить корреляционной взаимосвязи концентрации лимфоцитов в венозной крови с уровнем белков ответственных за регуляцию апоптоза.

Среди лабораторных показателей, отражающих состояния апоптоза лейкоцитов и лимфоцитов у реанимационных пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS – CoV- 2, прослеживались значительные отличия. Результаты проведенной работы показали, что наиболее чувствительными и специфичными маркерами для прогнозирования осложнённого течения и неблагоприятного исхода являлись абсолютное количество погибших лейкоцитов, процент раннего апоптоза лимфоцитов, белок BAD. Наиболее высоких значений абсолютное количество погибших лейкоцитов и белок BAD достигали у пациентов с летальным исходом, однако, процент раннего апоптоза был наибольшим в группе пациентов с неосложнённым течением заболевания, что ассоциировано с запрограммированной и ненарушенной гибелью клеток, отсутствием выброса паттернов связанных с повреждением клеток и, как следствие, этого отсутствием выброса медиаторов воспаления и выраженного повреждения эндотелия. В настоящем исследовании среди пациентов с летальными исходами медиана абсолютного количества погибших лейкоцитов составила 173.78(54,82;226,5) кл/мкл, процента раннего

апоптоза лимфоцитов 5,61(2,06;5,52)., белка BAD 253,25(185,75;329,75). Среди пациентов с осложненным течением медиана абсолютного количества погибших лейкоцитов составила 95.8(36,75;106,06) кл/мкл, процента раннего апоптоза лимфоцитов 7.26 (4,51;9,4)., белка BAD 139.41(80,25;144,5). Среди пациентов с неосложненным течением медиана абсолютного количества погибших лейкоцитов составила 49.84(32,76;69,0) кл/мкл, процента раннего апоптоза лимфоцитов 10.81(6,3;14,9)., белка BAD 102.7(76,75;129,25). На основании проведенного анализа удалось установить пороговые уровни для маркеров, характеризующие осложненное течение и неблагоприятный исход заболевания COVID-19. Так осложненное течение заболевания развивалось при уровне лимфоцитов на ранней стадии апоптоза менее 7,21 (чувствительность 67% и специфичность 72%),

Неблагоприятный исход заболевания развивался при уровне абсолютного количества погибших лейкоцитов более 89 кл/мкл (чувствительностью 57% и специфичностью 83%)., при уровне лимфоцитов на ранней стадии апоптоза менее 4,7% (чувствительность 81% и специфичность 71%), при уровне белка BAD выше 145 (чувствительность 85% и специфичностью 82%), при исследовании, выполненном на пике «цитокинового шторма». Осложненное течение заболевания прогнозируется при уровне лимфоцитов на ранней стадии апоптоза менее 7,21%. Неблагоприятный исход заболевания прогнозируется при уровне абсолютного количества погибших лейкоцитов более 89 кл/мкл, при уровне лимфоцитов на ранней стадии апоптоза менее 4,7%, при уровне белка BAD выше 145 у.е.

Таким образом, для целого ряда лабораторных параметров, оцениваемых на пике «цитокинового шторма», показана возможность достоверного прогнозирования течения заболевания и его исход, были определены пороговые уровни характерные для неосложненного течения заболевания с благоприятным исходом, осложненного течения заболевания с благоприятным исходом и осложненного течения заболевания с летальным исходом. При значениях ЛДГ на второй стадии заболевания, на этапе «цитокинового шторма», менее 296 Ед/л предполагается неосложненное течение заболевания, при значениях свыше 296

Ед/л прогнозируется осложненное течение, при достижении уровня в 332 Ед/л и более летальный исход. При значениях д-димера на этапе «цитокинового шторма» менее 1,4 мкг/л предполагается неосложненное течение заболевания, при значениях свыше 1,4 мкг/л прогнозируется осложненное течение, при достижении уровня в 2,65 мкг/л и более летальный исход. При значениях СРБ на этапе «цитокинового шторма» менее 52 мг/л прогнозируется неосложненное течение заболевания, при значениях более 52 мг/л прогнозируется осложненное течение заболевания, при значениях более 66мг/л летальный исход. При значениях CD14+HLADR+ на этапе «цитокинового шторма» более 76,3% прогнозируется неосложненное течение заболевания, при значениях менее 76,3% - осложненное течение заболевания, при снижении уровня CD14+HLADR+ менее 55% -летальный исход.

Среди лабораторных параметров, оценивающих состояние апоптоза у пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, при исследовании на пике «цитокинового шторма» показана возможность достоверного прогнозирования течения заболевания и его исход. При значениях лимфоцитов на ранней стадии апоптоза менее 7,21% прогнозируется осложненное течение заболевания, при значениях менее 4,7% прогнозируется летальный исход.

Таким образом, выявлен комплекс маркеров воспаления и апоптоза, способный достоверно прогнозировать осложненное течение заболевания и летальный исход у пациентов с вирусной пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (таблица 24).

Таблица 24 - Прогностический комплекс маркеров на второй стадии заболевания COVID-19 (этап «цитокинового шторма»)

Прогностический комплекс маркеров			
Показатель	Неосложненное течение, благоприятный исход	Осложненное течение, благоприятный исход	Летальный исход
ЛДГ Ед/л	<296	296-332	>332

Продолжение таблицы 24

Д-димер мкг/л	<1,4	1,4-2,65	>2,65
CD14+HLADR%	>76,3	55-76,3	<55
СРБ мг/л	<52	52-66	>66
Лимфоциты на ранней стадии апоптоза %	>7,21	7,21-4,7	<4,7

Для ряда лабораторных параметров, оцениваемых на второй точке исследования, соответствующей третьей неделе заболевания, наступающей после завершения «цитокинового шторма», показана возможность достоверно прогнозировать летальный исход заболевания. Были определены пороговые уровни характерные уровни для наступающего позднее летального исхода. Достоверно прогнозировать летальный исход можно при выявлении у пациента на третьей неделе заболевания, после завершения «цитокинового шторма», любого из следующих критериев: ЛДГ более 292 Ед/л., д-димера более 1,95 мкг/л., СРБ более 67 мг/л., фибриногена более 5,48 г/л., прокальцитонина более 1,95 нг/мл.

На рисунки 61, 62 представлены деревья классификации, работа с данными моделями строится следующим образом. Структура дерева представляет собой «листья» и «ветки». На «ветках» дерева решения записаны признаки, от которых зависит целевая функция, в «листьях» показаны значения результата классификации. Для классификации случая, надо спуститься по дереву от корня до листа и получить соответствующее значение. В узлах дерева находятся переменные, по которым происходит разбиение. На рисунке № 61 представлено дерево принятия решения для определения тяжести течения заболевания при анализе, выполненном на пике «цитокинового шторма». На рисунке № 62 представлено дерево принятия решений для прогнозирования исхода заболевания при анализе, выполненном на пике «цитокинового шторма».

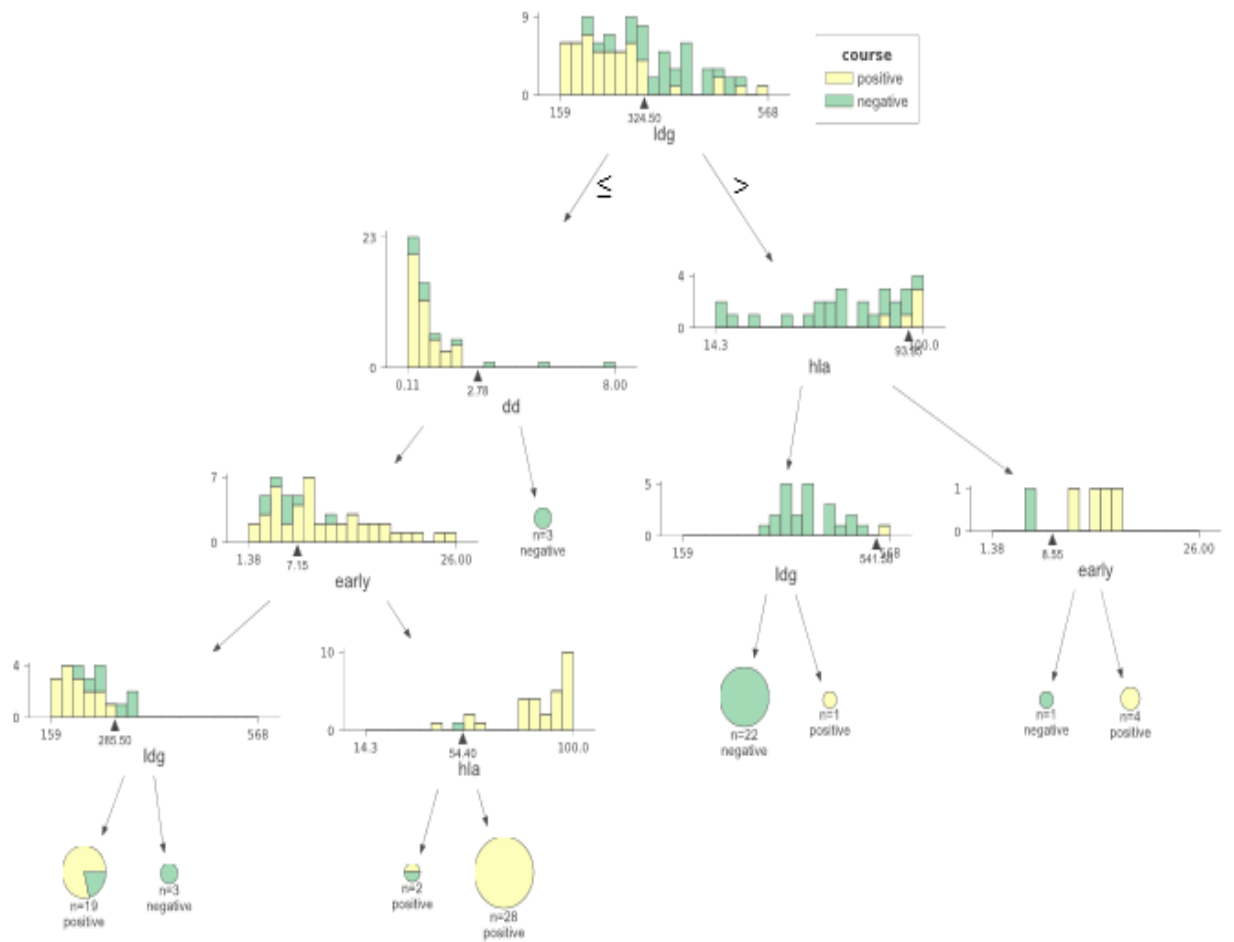


Рисунок 61 - Дерево принятия решения для определения тяжести течения заболевания при анализе, выполненном на пике «цитокинового шторма»

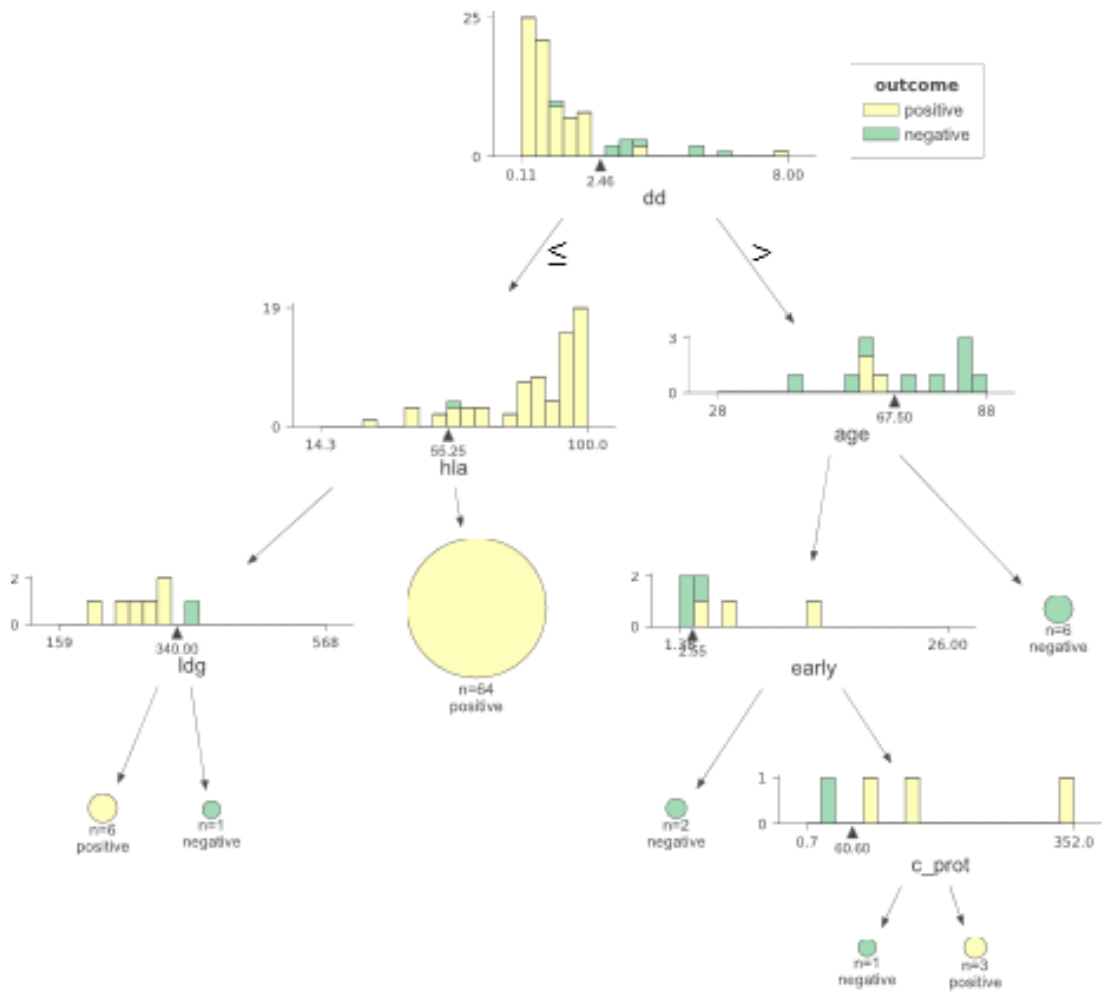


Рисунок 62 - Дерево принятия решений для прогнозирования исхода заболевания при анализе, выполненном на пике «цитокинового шторма»

Полученные деревья отличаются друг от друга, как глубиной, так и количеством листьев, однако, условия распределения пациента к листьям, основанные на данных математического анализа, на которых наблюдается летальный исход и неблагоприятное течение заболевания соответствуют представленному прогностическому комплексу маркеров.

Интерпретация клинической ситуации с принятием решения о начале патогенетической и антибактериальной терапии является одним из ключевых моментов в ведении пациента с новой коронавирусной инфекцией. Эффективность патогенетической терапии во многом зависит от своевременного присоединения антитромботической и антибактериальной терапии. Бактериальная инфекция значительно повышает вероятность летального исхода. Наиболее частой причиной

смерти пациентов с COVID-19 был сепсис (57,14%), второй по частоте причиной летальных исходов являлась тромбоэмболия легочной артерии (29%). В связи этим прогнозирование варианта течения заболевания и его исхода с помощью представленного комплексного набора маркеров и, как можно, более раннее начало антибактериальной терапии и антитромботической терапии у пациентов с прогнозируемым осложненным течением и неблагоприятным исходом является жизненно спасающим для реанимационного пациента с вирусной пневмонией вызванной SARS-CoV-2.

ВЫВОДЫ

1. Клинически значимыми осложнениями, у реанимационных пациентов, развивающимися после «цитокинового шторма» являются: тромбозы вен верхних и/или нижних конечностей (19%), ТЭЛА (4%), клинически значимые геморрагические осложнения (5%), острая сердечно-сосудистая дисфункция (3%), нозокомиальная бактериальная пневмония (21%), сепсис (10%), полиорганная дисфункция (18%). Непосредственной причиной летального исхода у пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, является: сепсис (57%), тромбоэмболия легочной артерии (28%).

2. На этапе «цитокинового шторма» наиболее высокой прогностической значимостью, свидетельствующей о развитии осложненного течения COVID-19 и летального исхода, обладают следующие маркеры воспаления: ЛДГ, Д-димер, СРБ CD14+HLA-DR+ моноциты.

3. На этапе «цитокинового шторма» наиболее высокой прогностической значимостью, свидетельствующей о развитии осложненного течения COVID-19, обладает уровень лимфоцитов, находящихся на ранней стадии апоптоза, а о развитии летального исхода - абсолютное количество погибших лейкоцитов, уровень лимфоцитов на ранней стадии апоптоза, а также содержание проапоптотического белок BAD.

4. На пике «цитокинового шторма» у пациентов с COVID-19 выявлены наиболее значимые корреляционные взаимосвязи:

- между Д-димером и степенью поражения легких по данным КТ, тяжестью состояния по шкале NEWS и SOFA;
- между СРБ и лимфоцитами, Д-димером, ЛДГ и фибриногеном.
- между содержанием CD14+HLA-DR+ моноцитов и фибриногеном, Д-димером, СРБ, температурой тела, степенью поражения легких по данным КТ, тяжестью состояния по шкале NEWS и SOFA.

5. Во время «цитокинового шторма» достоверно прогнозировать развитие осложненного течения заболевания и летального исхода возможно на основании комбинации уровней СРБ, ЛДГ, Д-димера, CD14+HLADR+ моноцитов и лимфоцитов на ранней стадии апоптоза. На третьей неделе заболевания летальный исход возможно прогнозировать на основании комбинации уровней ЛДГ, Д-димера, СРБ, фибриногена и прокальцитонина.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациенты, у которых на этапе «цитокинового шторма» СРБ 52-66мг/л, ЛДГ 296-332 Ед/л, Д-димер 1,4-2,65 мкг/л, CD14+HLADR+ 55-76,3%, лимфоциты на ранней стадии апоптоза 7,21-4,7%, требуют незамедлительного перевода в отделение реанимации и интенсивной терапии и незамедлительного проведения всего возможного комплекса патогенетической терапии. Это обусловлено тем, что такие уровни вышеперечисленных маркеров достоверно свидетельствуют о развитии осложненного течения заболевания на следующем его этапе.

2. Пациенты, у которых на этапе «цитокинового шторма» СРБ выше 66 мг/л, ЛДГ выше 332 Ед/л, Д-димер выше 2,65 мкг/л, CD14+HLADR+ менее 55%, лимфоциты на ранней стадии апоптоза менее 4,7%, требуют незамедлительного перевода в отделение реанимации и интенсивной терапии и незамедлительного проведения всего возможного комплекса патогенетической терапии, а также и использования наиболее агрессивных режимов профилактики развития тромбоэмболических и инфекционных осложнений. Это обусловлено тем, что такие уровни вышеперечисленных маркеров свидетельствуют о развитии летального исхода заболевания.

3. Повышение уровня лимфоцитов более 7,21% на ранней стадии апоптоза на этапе «цитокинового шторма», является достоверным критерием благоприятного исхода заболевания, может служить дополнительным надежным показателем для перевода пациента из отделения реанимации и интенсивной терапии в профильное отделение.

4. При снижении CD14+HLADR+ клеток менее 55%, повышении уровня прокальцитонина более 0,05 нг/мл на этапе «цитокинового шторма» необходимо рассмотреть целесообразность начала антибактериальной терапии. Это обусловлено тем, что уровень CD14+HLADR+ клеток и прокальцитонина во время «цитокинового шторма» достоверно свидетельствует о развитии иммунной дисфункции и бактериальных осложнений на следующем этапе заболевания с

последующим развитием летального исхода вследствие сепсиса. При повышении прокальцитонина более 1,95 нг/мл на третьей неделе заболевания, при его осложненном течении, следует рассмотреть вопрос о необходимости коррекции проводимой антибактериальной терапии. Это обусловлено тем, что уровень прокальцитонина более 1,95 нг/мл на этом этапе заболевания достоверно ассоциирован с развитием летального исхода.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

AIF	- Apoptosis inducing factor (Фактор, индуцирующий апоптоз)
APAF-1	- Apoptosis Protease Activating Factor-1 (Клеточный цитозольный белок и одноименный ген. Основной компонент апоптосом)
CD	- Cluster of differentiation (Кластер дифференцировки)
DAMP	- Молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением
DD	- death domain (Домен смерти)
DISC	- Death-inducing signaling complex (Сигнальный комплекс, индуцирующий смерть)
FADD	- Fas-associated DD-protein (Fas-ассоциированный белок с доменом смерти)
FOUR	- Full Outline of UnResponsiveness (Шкала подробной оценки состояния ареактивных пациентов)
IFITM	- Interferon-induced transmembrane protein (Мембранный белок из семейства интерферон-индуцируемых мембранных белков)
IL	- Interleukin (интерлейкин)
IRE/IRP	- Iron-responsive element (железочувствительный элемент и IRP , iron-responsive element-binding proteins - белок, связывающийся с железочувствительным элементом)
JNK	- c-Jun N-terminal kinases (N-концевые киназы c-Jun)
MERS	- Middle East Respiratory Syndrome (Ближневосточный респираторный синдром)
MHC	- Major histocompatibility complex (Главный комплекс гистосовместимости)
MOMP	- Mitochondrial outer membrane permeabilization (Проницаемость наружной мембраны митохондрий)
NEWS	- National Early Warning Score (Шкала оценки тяжести состояния пациентов)

NF-κB	- nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (Транскрипционный фактор)
Nsp	- Nonstructural protein (Неструктурные белки)
ORF	- Open Reading Frame (Открытые рамки считывания)
PAMP	- Pathogen-associated molecular pattern (Патогены, ассоциированные с молекулярными паттернами)
PKB/Akt	- Альфа серин-треониновая протеинкиназа
RASS	-Richmond Agitation-Sedation Scale (Шкала возбуждения-седации Ричмонда)
SARS	- Severe acute respiratory syndrome (Тяжёлый острый респираторный синдром)
SOFA	- Sequential Organ Failure Assessment (шкала ценка органной недостаточности и риска смертности)
SpO ₂	- Уровень насыщения крови кислородом
TLR	- Toll-like receptor (Толл-подобные рецепторы)
TNF	- Tumor necrosis factor (фактор некроза опухоли)
АД	- Артериальное давление
АЛТ	- Аланинаминотрансфераза
АПФ-2	- Ангиотензин-превращающий фермент-2
АСТ	- Аспаргатаминотрансфераза
АЧТВ	- Активированное частичное тромбопластиновое время
ДВС	- Диссеминированное внутрисосудистое свёртывание
ИБС	- Ишемическая болезнь сердца
ИВЛ	- Искусственная вентиляция легких
КТ	- Компьютерная томография
ЛДГ	- Лактатдегидрогеназа
МНО	- Международное нормализованное отношение
НИВЛ	- Неинвазивная вентиляция легких
ОКС	- Острый коронарный синдром

ПКТ	- Прокальцитонин
РДС	- Респираторный дистресс синдром
СРБ	- С-реактивный белок
ССВО	- Синдром системного воспалительного ответа
ТЭЛА	- Тромбоэмболия легочной артерии
У. е.	- Условная единица
ФНО- α	- Фактор некроза опухоли-альфа
ЧСС	- Частота сердечных сокращений
ЭКМО	- Экстракорпоральная мембранная оксигенация
ЭП	- Энтеральное питание

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Временные методические рекомендации профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (сovid-19): [Электронный ресурс]. – URL: <http://ivo.garant.ru/#/document/403310712> (дата обращения 03.03.2023)
2. Петриков, С.С. Интенсивная терапия больных Covid-19 / С.С. Петриков, К.А. Попугаев, С.В. Журавель // Вестник Российской академии наук. -2022. -Т. 92, № 7.- С. 66-73.
3. Severe covid-19 pneumonia: pathogenesis and clinical management / A.H. Attaway, R.G. Scheraga, A. Bhimraj [et al.] // BMJ. -2021.-Vol.372.-n436.
4. Fathi, N. Lymphopenia in COVID-19: Therapeutic opportunities / N. Fathi, N. Rezaei // Cell Biol Int. -2020.-Vol.4. -N9.-P.1792-1797.
5. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts / J. Wang, M. Jiang, X. Chen, L.J. Montaner // J Leukoc Biol. - 2020.-Vol.108. -N1.-P.17-41.
6. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding / R.Lu, X. Zhao, J.Li [et al.] // Lancet. -2020.-Vol.395.-N 10224.-P.565–574.
7. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview/ A.A Rabaan, S.H Al-Ahmed, S Haque [et al.] // InfezMed. -2020. -Vol.28 -N. 2.- P.174-184.
8. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses / E. Wit, N van Doremalen, D. Falzarano [et al.] // Nature Reviews Microbiology-2016. -Vol.14.-N 8. – P.523-534.
9. Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19 / R. Yadav, J.K. Chaudhary, N. Jain [et al.] // Cells. -2021. -Vol.10. -N 4. -:P.821.

10. Interferons and other cytokines, genetics and beyond in COVID-19 and autoimmunity / O.Ghislain, Jo Van Damme // *Cytokine and Growth Factor Reviews*. - 2021. -Vol.58. -P.134–140.
11. Аутоантитела к интерферону альфа и их значение при COVID-19 / С.С. Петриков, Н.В. Боровкова, К.А. Попугаев [и др.] // *Инфекция и иммунитет*.- 2022.- Т.12, -№2.- С.279-287.
12. T-cell responses and therapies against SARS-CoV-2 infection / S.M Toor, R. Saleh, V. Sasidharan, [et al.] // *Immunology*. -2021. –Vol.162. -N1. –P.30-43.
13. Sette, A. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19 / A. Sette, S. Crotty // *Cell*. -2021. –Vol.184. -N4. –P.861-880.
14. Distinct immune signatures discriminate between asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2pos subjects /S. Yu, C. Di, S. Chen [et al.] // *Cell Research*. -2021. –Vol.31. –N.11. –P.1148-1162.
15. Single-Cell Sequencing of Peripheral Mononuclear Cells Reveals Distinct Immune Response Landscapes of COVID-19 and Influenza Patients / L. Zhu, P. Yang, Y. Zhao [et al.] // *Immunity*. -2020. –Vol.53. -N3. –P.685-696.
16. Klebanoff, C.A. Memory T cell–driven differentiation of naive cells impairs adoptive immunotherapy / C.A. Klebanoff, C.D. Scott, A. J. Leonardi // *J. Clin. Invest*. - 2016. –Vol.126. –N.1. –P.318–334.
17. Increased CD95 (Fas) and PD-1 expression in peripheral blood T lymphocytes in COVID-19 patients / S. Bellesi, E. Metafuni, S. Hohaus [et al.] // *British Journal of Haematology*. -2020. -Vol.191. -N2. –P.207–211.
18. Apoptosis-induced T-cell lymphopenia is related to COVID-19 severity / A. Cizmecioglu, H. Cizmecioglu, M. H. Goktepe [et al.] // *Journal of Medical Virology*. - 2021. –Vol.93. -N5. –P.2867–2874.
19. Apoptosis and immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes in Iranian COVID-19 patients: clinical and laboratory characteristics / S. Taghiloo, M. Aliyali, S. Abedi [et al.] // *Journal of Medical Virology*. -2021. Vol.93. –N.3. –P.1589–1598.

20. Спонтанные гематомы при COVID-19: причины возникновения, клиника, диагностика и лечение / М.В. Нагибина, А.С. Сычева, И.А. Кошелев [и др.] // Клиническая медицина. – 2021. – Т. 99. – № 9-10. – С. 540-547.
21. Особенности клеточного состава воспалительного инфильтрата в разные фазы диффузного альвеолярного повреждения легких при COVID-19 / В.Э. Родионов, А.М. Авдалян, Д.М. Коновалов [и др.] // Архив патологии.- 2022.- Т.84. - №3. - С.5-13.
22. Система гемостаза при COVID-19 / А.А. Филькова, А.А. Мартьянов, Д.Н. Проценко [и др.] // Природа. – 2020. – № 10 (1262). – С. 3-10.
23. COVID-19 and coagulation: bleeding and thrombotic manifestations of SARS-CoV-2 infection / H. Al-Samkari, R.S. Karp W.H. Dzik [et al.] // Blood. -2020. –Vol.136. -N4. –P. 489-500.
24. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials / X. Xu, Y. Lai, Z.C. Hua [et al.] // Bioscients Reports. -2019 -Vol.39. –N.1. – P. 1-17.
25. Потапнев, М.П. Аутофагия, апоптоз, некроз клеток и иммунное распознавание своего и чужого // Иммунология. -2014. –Т.35. -№2. –С. 95-102.
26. Матвеева, Н.Ю. Апоптоз: морфологические особенности и молекулярные механизмы / Н.Ю. Матвеева // Тихоокеанский медицинский журнал.- 2003. -№4.- С.12-16.
27. Бабаев, М.Ш.О. Значение апоптоза и механизмы гибели клеток / М.Ш.О. Бабаев, Н.Т.К. Гусейнова, Р.Ф.К. Мамедова // Евразийский Союз Ученых. -2019. - №2 (59). -С.25-28.
28. Роль апоптоза в поддержании гомеостаза живых систем / Д.А. Лунев, Л.В. Заклякова, Е.Г. Овсянникова, А.К. Сарсенгалиева // Астраханский медицинский журнал. - 2010. -№1. –С.10.
29. Апоптоз: [Электронный ресурс]. – URL: https://www.rusmedserv.com/files/labdiag/42_Апоптоз.pdf (дата обращения 05.04.2023).

30. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as the potential therapeutic target in hematological malignancies / A. Naimi, A.A. Movassaghpour, M.F. Hagh [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2018. -Vol.98. –P.566-576.

31. Ковалева, О. В. Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания? / О. В. Ковалева, М. С. Шитова, И. Б. Зборовская// *Клиническая онкогематология.* 2014. - №2. – С.103 – 113.

32. Молекулярная регуляция метаболизма и клеточного цикла: [Электронный ресурс]. – URL: <https://edu.volgmed.ru/mod/book/tool/print/index/.php?id=20308>

33. Апоптоз: [Электронный ресурс]. – URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Апоптоз> (дата обращения 03.03.2023)

34. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy / V. Nikolettou, M. Markaki, K. Palikaras [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* -2013. -Vol.1833. –N.12. – P.3448-3459.

35. Green, D. R. The Death Receptor Pathway of Apoptosis / D.R. Green // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* -2022. -Vol.14. –N.2. –P. 1-12.

36. The mitochondrial pathways of apoptosis / J. Estaquier, F. Vallette, J. L. Vayssiere [et al.] // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2012. -Vol.942. –N.157. –P.157-183.

37. Jeong, S.Y. The role of mitochondria in apoptosis / S.Y. Jeong, D.W. Seol. // *BMB Reports.* -2008. –Vol.41. – N.1. –P.11-22.

38. Самуилов, В.Д. Программируемая клеточная смерть / В.Д. Самуилов, А. В. Олескин, Е. М. Лагунова // *Биохимия.* - 2000. -Т.65. - №8. – С. 1029-1046.

39. Bock, F.J. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death / F. J. Bock, S.W.G. Tait // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* -2020. –Vol.21. –N.2. – P.85-100.

40. Kalkavan, H. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business / H. Kalkavan, D. R. Green // *Cell Death Differ.* -2018. -Vol.25. –N.1. –P.46-55.

41. Апоптоз и его значение: [Электронный ресурс]. – URL: <http://diplomba.ru/work/129536> (дата обращения 03.03.2023)

42. Kovacs, S.B. Gasdermins: Effectors of Pyroptosis / S.B. Kovacs, E.A. Miao // Trends Cell Biol. -2017. –Vol.27. –N.9. –P.673-684.
43. Release of Cytochrome C from Bax Pores at the Mitochondrial Membrane / M. Zhang, J. Zheng, R. Nussinov [et al.] // Sci. Rep. -2017. -Vol.7. – N.1. – P.2635.
44. Shakeri, R. Apaf-1: Regulation and function in cell death / R. Shakeri, A. Kheirollahi , J. Davoodi // Biochimie. -2017. -Vol.135. –P.111-125.
45. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application / P. Li, L. Zhou, T. Zhao [et al.] // Oncotarget. -2017. –Vol.8. –N.14. –P.23996-24008.
46. Soni, I. V. Caspase-9 Activation of Procaspace-3 but Not Procaspace-6 Is Based on the Local Context of Cleavage Site Motifs and on Sequence / I.V. Soni, J. A. Hardy JA.// Biochemistry. -2021. -Vol.60. –N.37. –P.2824-2835.
47. Polster, B. M. AIF, reactive oxygen species, and neurodegeneration: a "complex" problem / B.M. Polster // Neurochem. Int. -2013 -Vol.62. –N.5. – P.695-702.
48. Фомченко, Н. Е. Биологические аспекты апоптоза (обзор литературы) / Н. Е. Фомченко, Е. В. Воропаев // Проблемы здоровья и экологии. -2013. .-№135. - С. 39-43.
49. Cao, C. Pathological alteration and therapeutic implications of sepsis-induced immune cell apoptosis / C. Cao, M. Yu, Y. Chai // Cell Death Dis. -2019 -Vol.10. –N.10. –P.782-796.
50. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways / S. R. Hotchkiss, S. B. Osmon, K. C Chang, [et al.] // J. Immunol. -2005. -Vol.174. -N.8. –P.5110-5518.
51. Denstaedt, S. J. Sepsis and Nosocomial Infection: Patient Characteristics, Mechanisms, and Modulation / S.J. Denstaedt, B.H. Singer, T.J. Standiford // Frontiers of Immunology. -2018 –Vol.9. –P.2446.
52. IL-6 induced lncRNA MALAT1 enhances TNF- α expression in LPS-induced septic cardiomyocytes via activation of SAA3 / Y.T. Zhuang, Xu DY, G.Y. Wang, [et al.] // Eur. Rev. Med. Pharmacol Sci. -2017. -Vol.21. -N.2. –P.302-309.

53. The inhibition of H1N1 influenza induced apoptosis by sodium selenite through ROS-mediated signaling pathways / G. Gong, Y. Li, K. He [et al.] // Royal Society of Chemistry. -2020. -Vol.10. –N.13. –P.8002-8007.

54. Fas determines differential fates of resident and recruited macrophages during resolution of acute lung injury / W.J. Janssen, L. Barthel, A. Muldrow A, [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. -2011. -Vol.184. –N.5. –P.547-560.

55. Knoll, R. Monocytes and Macrophages in COVID-19 / R. Knoll, J. L. Schultze, J. Schulte-Schrepping // Frontiers in Immunology. -2021. -Vol. 12. –P.1-12.

56. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management / A.U. Anka, M.I. Tahir, S.D. Abubakar [et al.] // J. Immunol. -2021. – Vol.93. –N.4. –P. 1-12.

57. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients / T.S. Rodrigues, A.Y. Ishimoto, A. Becerra, [et al.] // The Journal of Experimental Medicine. -2021. –Vol.218. –N.3. – P. 1-11.

58. Bryant, C. COVID-19 stokes inflammasomes / C. Bryant // The Journal of Experimental Medicine. -2021 -Vol.218. –N.3. – P.1-3.

59. Клетки по Льюину: [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.studentlibrary.ru/doc/ISBN9785001015871-SCN0000.html> (дата обращения 03.03.2023)

60. Значение апоптоза в развитии вирусных инфекций и рака: [Электронный ресурс] – URL: https://meduniver.com/Medical/genetika/apoptoz_virusnie_infekcii_i_rak.html (Дата обращения 03.03.2023)

61. Analysis of the anti-apoptotic v-Bcl2 and v-Flip genes and effect on in vitro programmed cell death of Argentinean isolates of bovine gammaherpesvirus 4 (BoHV-4) / P. Moran, J. Manrique, S. Perez [et al.] // Microbial Pathogenesis. -2020. -Vol.144.- P.104170.

62. Sharma, A. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention / A. Sharma, A. Farouk, S.K. Lal // *Viruses*. -2021 -Vol.13. –N.2. -P.202-212.

63. Синицын, Б. Ф. К механизму и путям передачи COVID-19 / Б.Ф Синицын, Н.Н Каладзе, Н.А Игнатенко // *Вестник физиотерапии и курортологии*. -2021. №2. –С. 66-70.

64. Оказание акушерско-гинекологической помощи пациенткам с COVID-19 / О.Б. Шахова, З.И. Саттарова, К.А. Попугаев, С.С. Петриков // *Диагностика и лечение неотложных состояний у больных COVID-19: руководство для врачей* / под ред. С.С. Петрикова. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, -2022. – Гл. 16. - С. 306-326.

65. Саадауи, М. Инфицирование Covid-19 во время беременности: риск вертикальной передачи, фетальные и неонатальные исходы/ М. Саадауи, М. Кумар, С. Аль-Ходор // *Неонатология: Новости. Мнения. Обучение*. -2022. -№2(36). – С. 61-69.

66. Do children need a longer time to shed SARS-CoV-2 in stool than adults? / X. Ma, L.Su, Y. Zhang, [et al.] // *J. Microbiol. Immunol. Infect.* -2020. -Vol.53. –N.3. – P.373-376.

67. Characteristics of pediatric SARSCoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding / X. Xu, X. Li, B. Zhu [et al.] // *Nat. Med.* -2020 – Vol.26. – N.4. – P.502-505.

68. Особенности течения коронавирусной инфекции COVID-19 у пациентов с коморбидной патологией / А.С. Сычева, М.А. Малявина, Л.В. Тебуева [и др.] // *Терапия*. – 2022. – Т. 8. – № 6(58). – С. 11-26.

69. Клинико-лабораторные особенности COVID-19 у людей молодого возраста / А.Х. Нурпейсова, Л.К. Алимова, Ж.Б. Понежева [и др.] // *Лечащий врач*. – 2021. – № 3. – С. 45-50.

70. Клинический протокол лечения больных новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), находящихся на стационарном лечении в медицинских организациях государственной системы здравоохранения города Москвы / О. В.

Аверков, А. Ю. Буланов, Е. Ю. Васильева [и др.] // Москва : Государственное бюджетное учреждение города Москвы "Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского менеджмента Департамента здравоохранения города Москвы", - 2022. –С. 1-47.

71. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management / R. Ochani, A. Asad, F. Yasmin [et al.] // *Infez. Med.* -2021. –Vol.29. – N.1. –P.20-36.

72. Оценка влияния кислородно-гелиевой смеси на выраженность кашля у пациентов с коронавирусной инфекцией / К. А. Цыганков, Р. Е. Лахин, А. В. Щеголев [и др.] // *Вестник анестезиологии и реаниматологии.* – 2022. – Т. 19. – № 1. – С. 18-24.

73. Hu, B. The cytokine storm and COVID-19 / B. Hu, S. Huang, L. L. Yin // *Journal of Medical Virology.* -2021. – Vol.93. –N.1. –P.250-256.

74. Анестезиолого-реанимационное обеспечение пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19. Методические рекомендации Общероссийской общественной организации "Федерация анестезиологов и реаниматологов" / И.Б. Заболотских, М. Ю. Киров, К. М. Лебединский [и др.] // *Вестник интенсивной терапии имени А.И. Салтанова.* – 2022. – № 1. – С. 5-140.

75. Gibson, P. G. COVID-19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre-COVID-19 ARDS / P.G. Gibson, L. Qin, S.H. Pua // *The Medical Journal of Australia.* -2020. -Vol.213. –N.2. –P.54-56.

76. Ультразвуковой индекс поражения легких как предиктор исходов лечения: когортное исследование 388 пациентов с коронавирусной инфекцией / Р.Е. Лахин, Е.А. Жирнова, А.В. Щеголев [и др.] // *Вестник интенсивной терапии имени А.И. Салтанова.* – 2022. – № 3. – С. 45-56.

77. Batah, S. S. Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19: A pathological review for clinicians / S. S. Batah, A. T. Fabro // *Respir. Med.* -2021. –Vol.176. –P. 1-8.

78. Agrawal, A. CRP after 2004 / A. Agrawal // *Mol. Immunol.* -2005. -Vol.42. - N.8. –P.927-930.

79. Transitional changes in the CRP structure lead to the exposure of proinflammatory binding sites / D. Braig, T. L. Nero, H. G. Koch [et al.] // *Nature Communications*. -2017. Vol.8. –P.1-19.

80. Pathak, E. Evolution of C-Reactive Protein / A. Pathak, A. Agrawal // *Front. Immunol.* -2019 –Vol 10. – P.943.

81. Role of C-reactive Protein as an Indicator for Determining the Outcome of Sepsis / M. M. Anush, V. K. Ashok, R. Sarma, [et al.] // *Indian J. Crit. Care. Med.* -2019. –Vol.23. –N.1. –P. 11–14.

82. Singhal, T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19) / T. Singhal // *Indian J. Pediatr.* -2020. -Vol.87. –N.4. –P.281-286.

83. Update Advances on C-Reactive Protein in COVID-19 and Other Viral Infections / Y. Y. Luan, C. H. Yin, Y. M. Yao // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol.12. – P. 1-10.

84. Vasavada, B. Postoperative serum procalcitonin versus C-reactive protein as a marker of postoperative infectious complications in pancreatic surgery: a meta-analysis / B. Vasavada, H. Patel // *ANZ Journal of Surgery*. -2021. –Vol. 91. –N.5. –P.260-270.

85. C-reactive protein and procalcitonin profile in ventilator-associated lower respiratory infections / L. Coelho, L. Rabello, J. Salluh [et al.] // *Journal of Critical Care*. -2018. –Vol. 48. – P.385-389.

86. C-reactive protein and clinical outcomes in patients with COVID-19 / N.R. Smilowitz, D. Kunichoff, M. Garshick [et al.] // *European Heart Journal*. -2021. -Vol.42. –N.23. –P.2270-2279.

87. C-reactive protein and procalcitonin for antimicrobial stewardship in COVID-19 / I. Pink, D. Raupach, J. Fuge [et al.] // *Infection*. -2021. –Vol.49. –N.5. –P.935-943.

88. Заместительная почечная терапия при лечении пациентов с тяжелым течением новой коронавирусной инфекции / С.Н. Авдейкин, Д.М. Костин, А.В. Средняков [и др.] // *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. – 2021. – Т. 18. – № 2. – С. 23-30.

89. Transient lymphopenia and neutropenia: pediatric influenza A/H1N1 infection in a primary hospital in Israel / N. Sharon, R. Talnir, O. Lavid [et al.] // *Isr. Med. Assoc. J.* -2011. -Vol.13. -N.7. -P.408-412.

90. Dynamic changes of lymphocyte counts in adult patients with severe pandemic H1N1 influenza A / Y. Cheng, H. Zhao, P. Song P [et al.] // *J. Infect. Public. Health.* -2019. -Vol.12. - N.6. -P.878-883.

91. Регуляция апоптоза лимфоцитов у реанимационных больных с COVID-19 / А.М. Квасников, Н.В. Боровкова, С.С. Петриков [и др.] // *Анестезиология и реаниматология.* -2023. -№ 1. -С. 49-55.

92. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review / Y. D. Gao, M. Ding, X. Dong [et al.] // *Allergy.* -2021. -Vol.76. -N.2. -P.428-455.

93. Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase / J.A. Read, V.J. Winter, C.M. Eszes [et al.] // *Proteins.* -2001. -Vol.43. - N.2. -P.175-185.

94. Risk factors of A/H1N1 etiology in pneumonia and its impact on mortality / S. Reyes, B. Montull, R. Martinez [et al.] // *Respir Med.* -2011. -Vol.105. -N.9. -P.1404-1411.

95. Serum ferritin: Past, present and future / W. Wang, M.A Knovich, L.G. Coffman [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* -2010. -Vol.1800. -N.8. -P. 760-769.

96. Kell, D.B. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells / D.B. Kell, E. Pretorius // *Metallomics.* -2014. -Vol.6. -N.4. -P.748-773.

97. Aberrant Transferrin and Ferritin Upregulation Elicits Iron Accumulation and Oxidative Inflammation Causing Ferroptosis and Undermines Estradiol Biosynthesis in Aging Rat Ovaries by Upregulating NF-Kb-Activated Inducible Nitric Oxide Synthase: First Demonstration of an Intricate Mechanism / S.C.W. Sze, L. Zhang, S. Zhang [et al.] // *International Journal of Molecular Science.* -2022. - Vol.23. -N.20. -P.1-28.

98. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-

analysis / B. M. Henry, M.H.S. de Oliveira, S. Benoit [et al.] // Clin. Chem. Lab. Med. - 2020. –Vol.58. –N.7. –P.1021-1028.

99. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: a review inspired by the COVID-19 pandemic / M. Soy, P. Atagündüz, I. Atagündüz [et al.] // Rheumatol. Int. -2021. –Vol.41. –N.1. –P.7-18.

100. Clinical and laboratory signs of haemophagocytic lymphohistiocytosis associated with pandemic influenza A (H1N1) infection in patients needing extracorporeal membrane oxygenation: A retrospective observational study / T. von Bahr Greenwood, B. Holzgraefe, S.C.C. Chiang [et al.] // Eur. J. Anaesthesiol. -2021. –Vol.38. –N.7. –P.692-701.

101. D-Dimer elevation and adverse outcomes / R. Halaby, C. J. Popma, A. Cohen [et al.] // J. Thromb. Thrombolysis. -2015. –Vol.39. –N.1. –P.55-59.

102. Thrombosis and Coagulopathy in COVID-19 / J.E. Gomez-Mesa, S. Galindo-Coral, M. C. Montes MC [et al.] // Curr. Probl. Cardiol. -2021. –Vol.46. –N.3. – P. 1-20.

103. Clinical significance of D-dimer levels in refractory Mycoplasma pneumoniae pneumonia / X. Huang, D. Li, F. [et al.] // BMC. Infect Dis. -2021. –Vol.21. –N.1. –P. 1-8.

104. Clinical characteristics of 75 pandemic H1N1 influenza patients from Turkey; risk factors for fatality / H. Kilic, A. Kanbay, A. Karalezli [et al.] // Turk. J. Med Sci. - 2015. – Vol.45. –N.3.562-570.

105. Rostami, M. D-dimer level in COVID-19 infection: a systematic review / M. Rostami, H. Mansouritorghabeh // Expert. Rev. Hematol. -2020. –Vol.13. –N.11. –P. 1265-1275.

106. Влияние концентрации витамина D (25-ОН D3) на течение и исходы заболевания у пациентов с COVID-19, нуждавшихся в реанимационной помощи / С.С. Петриков, Г.Е. Савков, М.А. Годков [и др.] // Анестезиология и реаниматология.- 2022.- №5.- С.30-35.

107. Профилактика и лечение дефицита витамина Д: выбор оптимального подхода / Г.А Мельниченко, Л.С Намазова-Баранова, О.А Громова [и др.] // Вопросы современной педиатрии. -2021. -№4. – С. 338-345.

108. Изменения Экспрессии HLA-DR-антигенов на моноцитах у детей и ее клиническая значимость при сепсисе / А. В. Зурочка, А. Н. Котляров, М. М. Кувайцев [и др.] // Медицинская иммунология. – 2008. – Т. 10, -№ 4-5. – С. 379-388.

109. Mengos, A. E. The CD14+HLA-DR^{lo}/neg Monocyte: An Immunosuppressive Phenotype That Restrains Responses to Cancer Immunotherapy / A. E. Mengos, D. A. Gastineau, M. P. Gustafson // Front Immunol. -2019. Vol. 22. – P. 1-14.

110. Prognostic value of peripheral blood CD14+HLA-DR+ monocytes in patients with acute pancreatitis / G. Minkov, E. Dimitrov, Y. Yovtchev [et al.] // J. Immunoassay Immunochem. -2021. –Vol.42. –N.5. –P.478-492.

111. Immunoparalysis: Clinical and immunological associations in SIRS and severe sepsis patients / P. Papadopoulos, A. Pistiki, M. Theodorakopoulou [et al.] // Cytokine. -2017. -Vol. 92. –P.83-92.

112. Effects of haemofiltration and mannitol treatment on cardiopulmonary-bypass induced immunosuppression. / S. Ziegeler, A. Raddatz, S.O Schneider [et al.] // Scand. J. Immunol. -2009. –Vol.69. –N.3. –P.234-241.

113. Ascites-derived IL-6 and IL-10 synergistically expand CD14+HLA-DR⁻/low myeloid-derived suppressor cells in ovarian cancer patients / L.Wu, Z. Deng, Y. Peng [et al.] // Oncotarget. -2017. –Vol.8. –N.44. –P.76843-76856.

114. Monocytic-Myeloid Derived Suppressor Cells Suppress T-Cell Responses in Recovered SARS CoV2-Infected Individuals / N. Beliakova-Bethell, K. Maruthai, R. [et al.] // Front. Immunol. -2022. –Vol.13. –P.1-19.

115. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death / A. M Rieger, K. L. Nelson, J. D. Konowalchuk, D. R.Barreda. Journal of Visualized Experiments. -2011. –Vol.50. –P.1-12.

116. Еще раз об апоптозе: [Электронный ресурс]. – URL: <https://medach.pro/post/1690> (дата обращения 03.04.2023)

117. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies / G. Pistritto, D. Trisciuglio, C. Ceci [et al.] // *Aging* (Albany NY). -2016. –Vol.8. –N.4. –P.603-619.

118. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients / Y. Xiong, Y. Liu, L. [et al.] // *Emerg. Microbes. Infect.* -2020. –Vol.9. –N.1. –P.761-770.

119. Weston, C.R. The JNK signal transduction pathway / C. R. Weston, R. J. Davis. // *Curr. Opin. Cell. Biol.* -2007. –Vol.19. –N.2. –P.142-149.

120. Fung, T.S. Activation of the c-Jun NH2-terminal kinase pathway by coronavirus infectious bronchitis virus promotes apoptosis independently of c-Jun. / T. S. Fung, D.X Liu, // *Cell. Death. Dis.* -2017. –Vol.8. –N.12. –P.1-13.

121. The Roles of c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) in Infectious Diseases / J. Chen, Y. Chao, W. Chao [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences.* -2021. –Vol.22, –N.17. –P.1-15.

122. Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis / M. Fritsch, S. D. Gunther, R. Schwarzer [et al.] // *Nature.* -2019. –Vol.575. –N.7784. –P.683-687.

123. Caspase-8-Dependent Inflammatory Responses Are Controlled by Its Adaptor, FADD, and Necroptosis / B.Tummers, L. Mari, C.S. Guy [et al.] // *Immunity.* -2020. – Vol.52. –N.6. –P.994-1006.

124. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis / M. Brentnall, L. Rodriguez-Menocal, R.L. De Guevara [et al.] // *BMC Cell. Biol.* -2013. Vol.14. –N.32. –P.1-9.

125. The role of IL-6 and IL-6 blockade in COVID-19 / N. Potere, A. Batticciotto, A. Vecchie [et al.] // *Expert. Rev. Clin. Immunol.* -2021. –Vol.17. –N.6. –P.601-618.

126. Механизмы развития геморрагических осложнений при проведении экстракорпоральной мембранной оксигенации. Пилотное исследование. / С.А. Бахарев, К.А Попугаев, К.В Киселев, А.С. Самойлов [и др.] // *Анестезиология и реаниматология.* - 2020. -№.1. – С. 25-34

127. Prediction of mortality in COVID-19 through combining CT severity score with NEWS, qSOFA, or peripheral perfusion index / G. Akdur, M. Das, O. Bardakci O [et al.] // *Am. J. Emerg. Med.* -2021. –Vol.50. –P.546-552.

128. The SOFA score-development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials / S. Lambden, P.F. Laterre, M.M. Levy, B. Francois // *Critical Care.* - 2019. – Vol.23. –N.1. –P.374-383.

129. Влияние неинвазивных методик респираторной поддержки на частоту летального исхода у взрослых пациентов с тяжелой дыхательной недостаточностью, вызванной новой коронавирусной инфекцией / К.А. Цыганков, И.Н. Грачев, В.И. Шаталов, А.В. Щеголев [и др.] // *Вестник анестезиологии и реаниматологии.* – 2021. – Т. 18, -№.1. – С. 47-56.

130. Coomes, E.A. Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and meta-analysis / E. A. Coomes, H. Haghbayan // *Rev. Med. Virol.* -2020. –Vol.30. -N6. –P.1-9.

131. IL-6 and other biomarkers as predictors of severity in COVID-19 / N. Broman, K. Rantasarkka, T. Feuth [et al.] // *Annals of Medicicne.* - 2021. –Vol.53. –N.1. –P.410-412.

132. An updated overview of recent advances, challenges, and clinical considerations of IL-6 signaling blockade in severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) / R. Elahi, P. Karami , A. H. Heidary, A Esmaeilzadeh. // *International Immunopharmacology.* -2022. –Vol.105. -P.1-19.

133. SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF- κ B pathway / S. Khan, M. S. Shafiei, C. Longoria [et al.] // *Elife.* - 2021. –Vol.10 –P.1-32.