

Министерство здравоохранения Республики Казахстан

НАО «НАЦИОНАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР»

УДК 616.9

№ гос. регистрации 0121PK00803

Инв. №

УТВЕРЖДАЮ



И.о. Председателя Правления
НАО «Национальный научный
кардиохирургический центр», д.м.н.
Бекбосынова М.С.
« 29 » октября 2021 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

по теме:

«ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ,
ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ
КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ SARS-COV-2 И ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА»

(промежуточный)

программа целевого финансирования

Руководитель научно-исследовательской работы
И.о. Председателя Правления
НАО «Национальный научный
кардиохирургический центр», д.м.н.

Бекбосынова М.С.

Нур-Султан, 2021

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный руководитель, д.м.н.,
И. о. Председателя Правления НАО
“Национальный научный
кардиохирургический центр”.

Ответственный исполнитель, врач
кардиолог, заведующая отделением
приемного покоя, НАО «Национальный
научный кардиохирургический центр».

Руководитель проекта по генетическим
исследованиям, д.м.н., PhD, профессор,
Руководитель Лаборатории геномной и
персонализированной медицины,

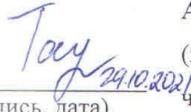
Ведущий научный сотрудник

Руководитель проекта по
имmunологическим исследованиям,
д.м.н., профессор, Руководитель
Лаборатории микробиома человека и
долголетия, Ведущий научный
сотрудник

Ведущий научный сотрудник, к.м.н.,
Начальник отдела науки НАО
“Национальный научный
кардиохирургический центр”

Младший научный сотрудник,
Главный специалист отдела науки НАО
“Национальный научный
кардиохирургический центр”


M.S. Бекбосынова
29.10.2021
(подпись, дата) (введение, основная
часть, заключение)


A.T. Таукелова
29.10.2021
(подпись, дата) (введение, основная
часть, заключение)


A.R. Акильжанова
29.10.2021
(подпись, дата) (введение, основная
часть, заключение)


A.P. Куштукулова
29.10.2021
(подпись, дата) (введение, основная
часть, заключение)


A.I. Сайлыбаева
29.10.2021
(подпись, дата) (основная часть)


С.Р. Хамитов
29.10.2021
(подпись, дата) (основная часть)

РЕФЕРАТ

Отчет содержит: 59 стр., 4 рис., 8 табл., 87 источников, 1 приложение.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ, ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ SARS-COV-2 И ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА

Объекты исследования – пациенты COVID-19 и постковидным синдромом, с клинически подтверждённым диагнозом согласно протоколу исследования. Отбор производился пациентов на базе НАО «Национальный научный кардиохирургический центр» (ННКЦ), г. Нур-Султан. Образцы ДНК, выделенные из клинического материала пациентов, направлялись на исследование в «Центр наук о жизни» ЧУ «National Laboratory Astana» Назарбаев Университета.

Целью данного исследования является определение клинико-функциональных, иммунологических и генетических факторов, влияющих на степень тяжести течения острой коронавирусной инфекции COVID-19 и постковидного синдрома, с целью разработки тактики ведения таких пациентов для снижения рисков развития осложнений и инвалидизации.

Методы исследования: иммунологические, генетические методы и лабораторно-функциональные тестирования в соответствии со стандартной клинической практикой.

В результате проведенных исследований был проведен информационный анализ влияния роли генетики хозяина при иммунном ответе к восприимчивости и тяжести течения коронавирусной инфекции (COVID-19) и оценено влияние перенесенной SARS CoV-2 на исходы течения заболевания. Также были получены важные данные о предикторах смертности в нашей исследуемой когорте в результате ретроспективного анализа.

Область применения – инфекционные заболевания, кардиология, иммунология, генетика, неврология.

Эффективность и значимость работы – изучение COVID-19 имеет важное значение для снижения смертности от коронавирусной инфекций и предупреждения тяжелых осложнений.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА О НИР	10
1. Методы	24
2. Результаты	26
3. Обсуждение	29
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	49
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	51
ПРИЛОЖЕНИЕ А Список опубликованных работ	59

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

ACE2	ангиотензин конвертирующий фермент
COVID -19	коронавирусное инфекционное заболевание
CHGE	COVID Human Genetic Effort
EGF	эпидермальный фактор роста
Eotaxin/CCL11	СС мотив хемокинов 11
FGF-2	основной фактор роста фибробластов лиганд
Flt-3 ligand	лиганд тирозинкиназы 3, связанный с Fms
Fractalkine	лиганд 1 хемокина (мотив C-X3-C)
G-CSF	колониестимулирующий фактор гранулоцитов
GM-CSF	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
GRO	онкоген, регулируемый ростом
GWAS	полногеномный анализ ассоциаций
HLA	человеческий лейкоцитарный антиген
HGI-COVID-19	Host Genetics Initiative COVID-19
Ig	иммуноглобулины
IFN	интерферон
IL	интерлейкины
IP-10	интерферон гамма-индуцированный белок 10
MCP	моноцитарный хемоаттрактантный белок
MDC (CCL22)	хемокин, полученный из макрофагов
MIP-1 α	воспалительный белок макрофагов
MHC	главный комплекс гистосовместимости
MERS-CoV	респираторный синдром средне восточного коронавируса
ОРДС	острый респираторный дистресс синдром
PDGF-AA	тромбоцитарный фактор роста
RANTES	лиганд хемокина (мотив C-C) 5
PRR	рецепторами распознавания образов
RBD	рецептор-связывающий домен
SARS-CoV-2	тяжелый острый респираторный синдром коронавируса 2
sCD40L	растворимая лиганда CD40

TGF- α	трансформирующий фактор роста альфа
TNF- α	фактор некроза опухоли
VEGF	фактор роста эндотелия сосудов

ВВЕДЕНИЕ

Первый случай пневмонии неизвестного генеза был зафиксирован в городе Ухань, Китай в декабре 2019 года. Вскоре после обнаружения первого случая, болезнь была зафиксирована и за пределами Китая. 30 января 2020 года Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила о внесении болезни в Международный перечень чрезвычайных ситуаций в здравоохранении (PHEIC), что означало, что она представляет опасность всему миру и требует скоординированных международных экстренных мер. Уже 11 февраля 2020 года Всемирной организацией здравоохранения болезни было присвоено название COVID-19 [1]. В тот же день Международная комиссия по классификации вирусов объявила, что новый коронавирус был классифицирован как коронавирус 2 типа, тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) [2]. Быстрое распространение этой инфекции уже в течение первых месяцев 2020 года приобрела масштабы пандемии. К сегодняшнему дню в мире зафиксировано уже более 100 миллионов случаев COVID-19 и более 2 миллионов смертей [3].

COVID-19 - не первая вспышка тяжелого респираторного заболевания, вызванного вирусом из семейства коронавирусов. Только за последние два десятилетия коронавирусы стали причиной трех вспышек: COVID-19, тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) и ближневосточного респираторного синдрома (MERS) [4]. Хотя летальность от SARS-CoV-2 ниже, чем от двух предыдущих вспышек коронавируса, его молниеносное распространение, приведшее к развитию пандемии, стал причиной катастрофических последствий для мира. Именно поэтому так важно быстрое и всестороннее изучение патогенеза SARS-CoV-2.

В настоящее время в мире идет активное изучение иммунного патогенеза COVID-19, поиск мер по профилактике и разработке лекарств от инфекции SARS-CoV-2 на основе предыдущего прогресса по исследованиям SARS-CoV и MERS-CoV. Интересно, что COVID-19 способен вызывать целый спектр заболеваний, начиная от бессимптомного течения, заканчивая тяжелым респираторным дистресс синдромом и дыхательной недостаточностью. Тем не менее, до сих пор не до конца понятна роль гуморального и клеточного иммунитета в механизме возникновения «цитокинового шторма» и различных факторов, приводящих к высокой частоте осложнений и летальности от COVID-19.

Согласно отчету в журнале *Lancet* острый респираторный дистресс синдром (ОРДС) является основной причиной летальности при COVID-19, в механизме возникновения которого большую роль играют цитокиновый шторм - смертельная неконтролируемая системная воспалительная реакция, возникающая в результате высвобождения большого количества провоспалительных цитокинов и хемокинов [5,6]. Именно поэтому часто в

лечение COVID-19 использование противовирусных средств недостаточно и необходимо проводить комплексное лечение с помощью стероидов и прочих медицинских препаратов, направленных на подавление иммунного ответа [6,7]. Уже сейчас существуют данные о том, что развитие цитокинового шторма, а соответственно и респираторных осложнений во многом связано с генетическими факторами [7]. Однако, для определения точных данных, необходимо проведение дополнительных, комплексных исследований.

В связи с пандемией с мая 2020 года на базе Национальный научный кардиохирургический центр экстренно был развернут инфекционный стационар для госпитализации лиц с подтверждённым случаями коронавирусной инфекции тяжелой степени. Затем приказом Министерства Здравоохранения Республики Казахстан №763 от 24.11.2020 был создан первый в стране Постковидный центр. С момента открытия было пролечено 561 пациентов в инфекционном стационаре и обследовано 582 пациентов в Постковидном центре.

Все это послужило основанием для детального изучения данной проблемы, что и определило цель и задачи данного исследования.

Цель программы:

Определить клинико-функциональные, иммунологические и генетические факторы, влияющие на степень тяжести течения острой коронавирусной инфекции COVID-19 и постковидного синдрома, с целью разработки тактики ведения таких пациентов для снижения рисков развития осложнений и инвалидизации.

Задачи программы:

1. Определить клинико-функциональные характеристики пациентов с разной степенью течения острой фазы COVID-19 и постковидного синдрома.
 - 1.1. Изучить особенности неврологических нарушений у пациентов с разной степенью течения острой фазы COVID-19 и постковидного синдрома.
 2. Изучить иммунологический профиль пациентов с разной степенью течения острой фазы COVID-19 и постковидного синдрома.
 3. Изучить генетический профиль пациентов с разной степенью течения острой фазы COVID-19 и постковидного синдрома.
 4. Выявить потенциальные предикторы тяжести течения COVID-19.
 5. Определить маркеры, позволяющие прогнозировать развитие постковидного синдрома.

6. На основе выделенных маркеров, разработать шкалу исходов COVID-19, чтобы определить тактику ведения пациентов для предотвращения развития постковидного синдрома.

Выявленные предикторы будут использованы для разработки шкалы исходов COVID-19 для прогнозирования и определения различных вариантов течения, что позволит внедрить алгоритм лечения для предупреждения развития постковидного синдрома, осложнений и инвалидизации у пациентов перенёсших коронавирусную инфекцию.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Инфекционные заболевания сопровождают эволюцию человека через сложное взаимодействие между иммунной системой хозяина и инфекцией [1]. Иммунная система является лучшей защитой, поддерживающей естественную способность организма защищаться от патогенов и противостоять инфекциям. Известно, что моногенные врожденные ошибки иммунитета, лежат в основе опасных для жизни вирусных заболеваний. На клиническом уровне некоторые наследственные дефекты иммунитета описаны еще в 1950-е гг. Исследования пациентов и семей привели к открытию аутосомно-рецессивной нейтропении и X-сцепленной рецессивной агаммаглобулинемии [1]. Эти две патологии с менделевским типом наследования, возникающие в результате врожденной ошибки иммунитета, стали доказательством принципа генетической предрасположенности к инфекционным заболеваниям человека. Эти исследования положили начало кропотливой миссии по расшифровке генетической основы восприимчивости к инфекциям у людей. Однако открытие генов, ответственных за развитие этой группы заболеваний, стало возможным лишь в конце XX в., с появлением технических возможностей надежного выявления мутаций. Второе десятилетие XXI в. благодаря внедрению секвенирования нового поколения ознаменовалось многократным увеличением объема знаний в области генетики инфекций. Следует отметить, что в течение долгого времени акцент генетических исследований делался на поиске аллелей предрасположенности, встречающихся в популяции с высокой частотой. Такой подход дал определенные результаты: в частности, удалось выявить генетические факторы, влияющие на клиническое течение гепатита С [2], локусы предрасположенности к лепре [3], воспалительным заболеваниям кишечника [4], туберкулезу [5] и другим инфекционным болезням [6].

Коронавирусное инфекционное заболевание (COVID-19), вызванное новым одноцепочечным РНК-вирусом SARS-CoV-2 впервые зарегистрированным в декабре 2019 года в г. Ухань, КНР, быстро распространилось по всему миру и привело к высокому числу случаев заболеваемости и смертности [7]. Только за последние два десятилетия коронавирусы стали причиной трех эпидемических заболеваний, а именно COVID-19, тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) и ближневосточного респираторного синдрома (MERS) [8]. В настоящее время случаи COVID-19 выявлены во многих странах мира. По данным Всемирной организации здравоохранения (<https://covid19.who.int>) на 12 октября 2021 года во всем мире зарегистрировано в общей сложности более 237 миллионов подтвержденных случаев COVID-19 и более 4,8 миллионов случаев смертей.

Учитывая, что пандемия вызвана новым штаммом коронавируса с неизвестным исходным хозяином, факторы риска, связанные со способами передачи, тяжестью и риском

смерти, были неясны на ранних стадиях вспышки. Было проведено множество исследований, свидетельствующие, что на восприимчивость к инфекции, тяжесть течения заболевания и риск смерти влияют ряд факторов, такие как социально-демографические факторы, клинические и генетические факторы. Известно, что тяжелая форма COVID-19 гораздо чаще встречается у пациентов старше 50 лет преимущественно мужского пола и имеет высокие показатели летальности при наличии сопутствующих заболеваний как дыхательная недостаточность, вызванная пневмонией, острый респираторный дистресс - синдром, сахарный диабет, тяжелое повреждение сердца со значительным повышением уровня тропонина в крови и сердечной недостаточностью [9, 10].

В частности, зарегистрированные показатели летальности для COVID-19 составляют 10,5% у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, 7,3% у пациентов с диабетом и 6,0% у пациентов с артериальной гипертензией. Это выше, чем уровень летальности, наблюдаемый в целом по миру у пациентов без сопутствующих заболеваний, который составляет 3–4% [11]. Наконец, повышение частоты возникновения нежелательных сердечно-сосудистых и других осложнений после выздоровления от COVID-19 также может играть роль в росте уровня смертности пациентов с коронавирусной инфекцией.

По данным мировых исследований в популяциях, не восприимчивых к новому коронавирусу SARS-CoV-2, наблюдалась высокая индивидуальная генетическая изменчивость среди инфицированных людей, от бессимптомного течения заболевания до прогрессирующего тяжелого острого респираторного синдрома со смертельным исходом [12]. Следовательно, предполагается, что генетика хозяина имеет прямую связь к восприимчивости и тяжести течения коронавирусной инфекции COVID-19. В связи с этим, постепенно интерес исследователей смешается от изучения широко распространенных факторов предрасположенности к поиску генетических вариантов, влияющими как на тяжесть заболевания, так и на иммунный ответ.

Таким образом, вышеуказанные данные послужили целью настоящей исследовательской работы, которая впервые в Казахстане станет работой по изучению патогенетических механизмов, иммунологических и генетических маркеров для разработки эффективных методов лечения, определения прогностических факторов и ведения пациентов с COVID-19 и постковидным синдромом для предотвращения развития последующих осложнений.

Механизмы заражения коронавирусом SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 это одноцепочный РНК-вирус, диаметр которого составляет примерно 60–140 нм. Внешняя мембрана вируса имеет булавовидные отростки с вогнутой

поверхностью в виде короны. Такое строение позволяет вирусу иметь высокую способность привязки к клеточному рецептору. Важным фактором, способствующим проникновению вируса в клетку-хозяина, является S-белок (*spike* - *шип*), представляющий собой гликопротеин на поверхности оболочки шипа SARS-CoV-2. S-белок связывается с рецептором ангиотензин превращающего ферментома 2 (ACE2), тем самым трансформируясь и обеспечивая слияние клетки вируса с клеткой хозяина [13]. Первоначально было установлено, что проникновение SARS-CoV в клетки осуществляется путем прямого мембранного слияния вируса и плазматической мембранны. Belouzard et al. [14] обнаружили, что критическое протеолитическое расщепление происходит у вируса SARS-CoV в S-белке в положении (S2), опосредованном слиянием мембран и вирусной инфекционностью. Помимо слияния мембран, проникновение SARS-CoV опосредовано клатрин-зависимым и -независимым эндоцитозом. После того, как вирус попадает в клетки, геном вирусной РНК высвобождается в цитоплазму и транслируется в два полипротеина и структурные белки, далее вирусный геном начинает реплицироваться. Вновь образованные гликопротеины оболочки встраиваются в мембрану эндоплазматического ретикулума или Гольджи, а нуклеокапсид образуется комбинацией геномной РНК и белка нуклеокапсида. Затем вирусные частицы прорастают в промежуточный компартмент эндоплазматического ретикулума-Гольджи. Наконец, везикулы, содержащие вирусные частицы, затем сливаются с плазматической мембраной, высвобождая вирус (Рисунок 1) [15].

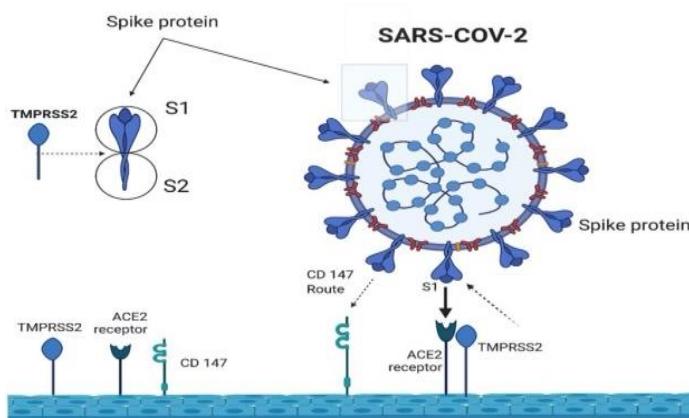


Рисунок 1 - Схематическое изображение механизма проникновения коронавируса [15].
SARS-CoV-2 в клетку-мишень

Механизмы иммунной защиты в организме человека против SARS-CoV-2

Исследования в области иммунологии во многом стали центральными при изучении патогенеза COVID-19. Сегодня в мире изучаются все аспекты иммунной системы, чтобы лучше понять причины развития осложнений и, возможно, разработать таргетированное лечение, позволяющее их избегать. Недавняя публикация в журнале иммунология стала

первым трудом, который помог систематизировать научные данные в данном вопросе. По данным этого исследования важной особенностью COVID-19 является его возможность уклоняться от врожденного иммунного ответа. Так у пациентов с тяжелой формой коронавируса, было отмечено значительное нарушение экспрессии интерферона (IFN-I), играющего важную роль для противовирусной защиты, по отношению к пациентам со средней и легкой формами. Отмечено, что нарушение ответа по средствам IFN-I играют критически важную роль в патогенезе COVID-19 и его уровень коррелируют с тяжестью течения болезни [16].

Другой особенностью SARS-CoV-2 является его комплексный эффект на все ростки иммунной системы. Многие исследования показали, что коронавирус может приводить к снижению уровня натуральных киллеров (NK), что также коррелирует с тяжестью течения заболевания. При более детальном изучении роли NK клеток в патогенезе COVID-19 было выдвинуто предположение, что их стимулирование может способствовать устраниению инфекции и предотвращению развития ОРДС. Помимо NK клеток, продолжается изучения роли Т-клеточного ответа у пациентов с коронавирусной инфекцией. Было отмечено, что лимфопения (особенно снижение уровня CD8 Т-клеток), может служить прогностическим фактором, указывающим на более тяжёлое течение заболевания. Более того, авторы отмечают, что нарушение активности Т-клеток, может приводить к иммунопатологии легких и, следовательно, развитию осложнений у пациентов с COVID-19 [16].

Гуморальный иммунитет, несомненно, играет ключевую роль в нейтрализации вируса. При заболевании обычно обнаруживаются антитела, связывающие N-белок SARS-CoV-2 и внешний S-белок. Рецептор-связывающий домен (RBD) белка S является высокоиммуногенным и антитела, связывающие этот домен, вероятно обладают высокой нейтрализующей способностью блокировать COVID-19 при его связывании с клетками человека. Важным вопросом в исследовании последствий коронавирусной инфекции является выявление иммунитета после перенесенной болезни. Отмечается, что В-клеточная память является ключевой в этом вопросе, однако до сих пор не ясно сколько времени она может сохраняться в организме человека. Долгосрочная защита достигается за счет выработки долгоживущих плазматических клеток плазмы и В-клеток памяти, но жизненный цикл данных клеток после перенесенного COVID-19 до сих пор до конца не изучен [17].

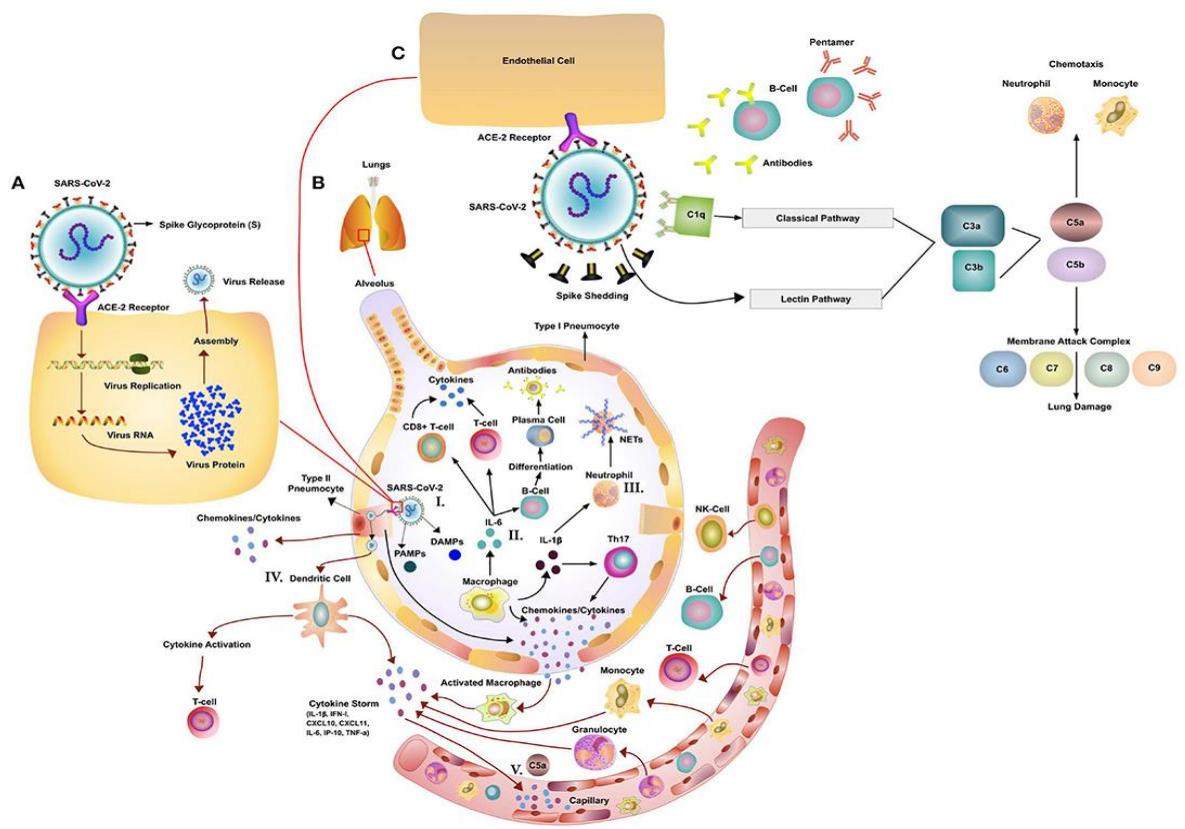


Рисунок 2 – Схематическое изображение механизма иммунного ответа организма [16]

А) Цикл репликации SARS-CoV-2. (В) Врожденный и адаптивный иммунный ответ на инфекцию коронавируса. (С) Эффекты активации комплемента, опосредованной SARS-CoV-2.

Пока вирус SARS-CoV-2 проникает в клетки, его антиген будет представлен антигенпрезентирующими клеткам, которые являются центральной частью противовирусного иммунитета организма. Антигенные пептиды в комплексе с МНС или с человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA) распознаются вирус-специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами. Презентация антигена SARS-CoV в основном зависит от молекул МНС I, но МНС II также способствует его презентации. Презентация антигена впоследствии стимулирует гуморальный и клеточный иммунитет организма, который обеспечивается вирусоспецифическими В- и Т-клетками (Рисунок 2, (В)) [17, 18]. Подобно обычным острым вирусным инфекциям, профиль антител против вируса SARS-CoV имеет типичный образец продукции IgM и IgG. Антитела IgM, специфичные для SARS, исчезают в конце 12 недели, в то время как антитела IgG могут сохраняться в течение длительного времени, что указывает на то, что антитела IgG могут в основном играть защитную роль [19], а антитела IgG, специфичные для SARS, в основном представляют собой S-специфические и N-специфические антитела. По сравнению с гуморальными ответами, исследований клеточного иммунитета коронавируса больше. Последние исследования

показывают, что количество CD4 + и CD8 + Т-клеток в периферической крови пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, значительно снижено, тогда как его статус является чрезмерной активацией, о чем свидетельствует высокая доля HLA-DR (CD4 3,47%) и двойные положительные по CD38 (CD8 39,4%) фракции. Точно так же острая фаза ответа у пациентов с SARS-CoV связана с серьезным снижением CD4 + Т и CD8 + Т-клеток. Даже при отсутствии антигена CD4 + и CD8 + Т-клетки памяти могут сохраняться в течение четырех лет у части людей, выздоровевших от SARS-CoV, и могут выполнять пролиферацию Т-клеток, ответ на гиперчувствительность замедленного типа и продукцию IFN- γ [20]. Через шесть лет после заражения SARS-CoV специфические Т-клеточные реакции памяти на пептидную библиотеку SARS-CoV S все еще можно было идентифицировать у 14 из 23 выздоровевших пациентов с SARS. Специфические CD8 + Т-клетки также демонстрируют сходный эффект на клиренс MERS-CoV у мышей. Чтобы лучше выжить в клетках-хозяевах, SARS-CoV и MERS-CoV используют несколько стратегий, позволяющих избежать иммунных ответов. Эволюционно консервативные микробные структуры, называемые патоген-ассоциированными молекулярными паттернами, могут распознаваться рецепторами распознавания образов (PRR). Однако SARS-CoV и MERS-CoV могут индуцировать продукцию двухмембранных везикул, лишенных рецепторов распознавания, а затем реплицироваться в этих везикулах, тем самым избегая обнаружения их двухцепочной РНК хозяином [21].

Информация о родственных вирусах SARS-CoV и MERS-CoV может позволить улучшить понимание механизмов ускользания SARS-CoV-2 от иммунного ответа хозяина, поскольку данные о SARS-CoV-2 остаются ограниченными. Примечательно, что 80% последовательности РНК SARS-CoV и 50% последовательности РНК MERS-CoV соответствуют РНК SARS-CoV-2, а SARS-CoV-2 имеет дополнительные геномные области. По сравнению с SARS-CoV и другими близкородственными коронавирусами, его белок S на 20–30 аминокислот длиннее [22]. Таким образом, предполагается, что SARS-CoV-2 имеет аналогичные стратегии уклонения от иммунитета, но дополнительные механизмы остаются нераскрытым.

Генетические исследования роли генетики человека при иммунном ответе на коронавирусную инфекцию SARS-CoV-2

Исследования генов-кандидатов и полногеномных ассоциаций (GWAS) позволили существенно понять генетические основы многих инфекционных заболеваний. Эти исследования выявили генетические локусы и аллельные полиморфизмы, которые частично определяют генетическую предрасположенность к инфекциям [23]. Исследования генетики вируса и генетики хозяина имеют решающее значение для понимания

особенностей патофизиологии COVID-19 влияющие на степень тяжести течения острой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 и постковидного синдрома.

Для решения глобальной проблемы коронавирусной инфекции более 3500 ученых из 25 стран объединились в проект «Инициатива по генетике хозяина COVID-19» (COVID-19 Host Genetics Initiative, HGI; <https://www.covid19hg.org/>), который был основан в марте 2020 года Андреа Ганна и Марком Дали из Института молекулярной медицины Хельсинки, Финляндия. Проект представляет собой международное открытое научное сотрудничество для обмена научными методами и ресурсами с исследовательскими группами по всему миру с целью карттирования генетических детерминант хозяина инфекции SARS-CoV-2 и определении влияния на восприимчивость и тяжесть течения заболевания. Результаты проекта представлены в мета-анализе 46 исследований из 19 стран в отношении генетических эффектов COVID-19, включавших генетические данные по 49 562 случаям и двум миллионам контрольных пациентов. В результате авторами исследования выявлены 15 значимых локусов, четыре из которых ассоциированы с восприимчивостью к инфекции или тяжелыми проявлениями COVID-19. Некоторые из этих локусов соответствуют ранее выявленным ассоциациям с легочными или аутоиммунными и воспалительными заболеваниями [24].

Одним из таких локусов выявленный по результатам исследования является область на хромосоме 3. Указанный участок содержит хемокин-связанные гены CXCR6 и CCR1. Как известно, хемокины контролируют перемещение иммунных клеток и крайне важны для функционирования врожденной иммунной системы. В локусе также расположен ген SLC6A20, белковый продукт которого связывается с ACE2, являющейся транспортером для вируса в клетку-хозяина. Таким образом, можно предположить, что генетический вариант SLC6A20 вовлечен в патогенез COVID-19.

Как отмечалось в предыдущих публикациях, генетический вариант DPP9 ассоциирован с увеличением риска интерстициального заболевания легких. Миссенс-варианты в TYK2 проявляют защитный эффект при некоторых аутоиммунных заболеваниях.

Другие варианты, перекрывающие хорошо известный структурными вариантами локус 17q21.31, ранее были связаны с функцией легких. Вместе с увеличением наследственности, наблюдаемым в генах, экспрессируемых в тканях легких, эти результаты подчеркивают участие биологических путей, связанных с легкими, в развитии тяжелой формы COVID-19. Некоторые другие локусы не обнаруживают ранее документально подтвержденных общегеномных значимых ассоциаций, даже несмотря на высокую

значимость и привлекательность генов-кандидатов для COVID-19 (например, локусы CXCR6, LZTFL1, IFNAR2 и OAS1) [25].

Другим масштабным исследованием является COVID Human Genetic Effort (CHGE) который представлен международным консорциумом, целью которого является определение механизмов молекулярной, клеточной и иммунной системы, которые приводят к устойчивости к вирусной инфекции или предрасположенности к более тяжелому течению SARS-CoV-2 у человека. В консорциуме задействованы более 35 медицинских и научно-исследовательских центров предоставляющих геномные данные пациентов со всего мира. Авторы данного исследования предполагают, полученные результаты помогут проложить путь к разработке новых профилактических и терапевтических стратегий [26].

Такие крупномасштабные исследования и консорциумы позволяют быстро продвинуться в понимании молекулярных механизмов, лежащих в основе патологии и выявлении возможной взаимосвязи между генетическим фоном человека и иммунной восприимчивостью к инфекции SARS-CoV-2.

Ассоциация полиморфизмов гена *ACE2* с тяжестью течения коронавирусной инфекции COVID-19

Изучение взаимосвязи полиморфизмов гена *ACE2* с тяжестью течения COVID-19 стало актуальным среди исследователей благодаря роли *ACE2* в качестве основного клеточного рецептора для проникновения коронавируса SARS-CoV-2 в клетку-хозяина. Предыдущие исследования других типов коронавирусов подчеркнули важную роль, которую клеточные рецепторы играют в заболевании. Пациенты, несущие определенные варианты генов, непосредственно вовлеченные в вирусную инфекцию (например, ACE2, TMPRSS2) или демонстрирующие дифференциальную экспрессию этих генов, имели разную чувствительность к SARS-CoV-2, что может объяснить широкий спектр симптомов и тяжесть течения заболевания COVID-19 [27].

Недавнее исследование, проведенное Benneti и его коллегами [28], объединило данные экзомного секвенирования с моделированием молекулярной динамики, идентифицировав и охарактеризовав 33 варианта гена *ACE2* у более 7000 итальянских пациентов. Примечательно, что один вариант (N720D) был проксимальнее сайта расщепления TMPRSS2, в то время как три мутации (W69C, L351V, P389H), как было предсказано, вызывают конформационные изменения, которые изменяют взаимодействия со структурным доменом гликопroteина S. Stawiski и др [29]. также составили список полиморфизмов *ACE2* из существующих наборов геномных данных и использовали структурное моделирование для выявления вариантов, которые предположительно

усиливают (S19P, I21V, E23K, K26R, T27A, N64K, T92I, Q102P, H378R) или ослабляют (K31R, N33I, H34R, E35K, E37K, D38V, Y50F, N51S, M62V, K68E, F72V, Y83H, G326E, G352V, D355N, Q388L, D509Y) восприимчивость к COVID - 19 на основе взаимодействия с гликопротеином-S. Недавнее исследование проведенное на европейских и восточноазиатских когортах также выявило два варианта гена ACE2 (K26R и I468V) как имеющих потенциально более низкую аффинность связывания с S-белком. Исходя из их близости к важным взаимодействующим областям на поверхности S-белка, варианты, идентифицированные в этих исследованиях, могут изменять кинетику связывания и интернализации вируса, тем самым объясняя значительную наблюданную межиндивидуальную вариабельность тяжести течения COVID-19 [30].

Сериновая протеаза TMPRSS2 является вторым значимым белком хозяина, вовлеченным в инфекцию SARS-CoV-2, хотя на сегодняшний день в исследованиях генетических ассоциаций ей уделяется значительно меньше внимания. Russo et al. [31] выявили однокарбонатный полиморфизм, который одновременно был ассоциирован с повышенной экспрессией TMPRSS2 и сниженной экспрессией индуцируемого интерфероном гена *MX1* в ткани легких. Лица, несущие этот полиморфизм, имели повышенную восприимчивость к инфекции SARS-CoV-2 из-за повышенной экспрессии гена TMPRSS2 на поверхности клетки и одновременное ослабление клеточного противовирусного ответа. Другое исследование выявило многочисленные полиморфизмы в гене TMPRSS2 в итальянской когорте, которые были предсказуемо ассоциированы с более высокими уровнями экспрессии гена. Примечательно, что один из этих вариантов был связан с андроген-чувствительным энхансером гена TMPRSS2, что указывает на повышенный риск тяжелого течения COVID-19 у мужчин [32]. Хотя предварительные результаты ассоциаций генов ACE2 и TMPRSS2 с восприимчивостью к COVID-19, являются многообещающими, исследования, изучающие связи между этими генетическими вариантами и клиническими исходами у лиц, инфицированных SARS-CoV-2, отсутствуют. Таким образом, классификация идентифицированных вариантов как защитных или вредных является преждевременной, пока не будут предприняты дополнительные исследования, подтверждающие их биологическую роль.

Ассоциация генотипов HLA класса I с тяжестью COVID-19

Противостояние двух систем «патоген-хозяин» в процессе совместной эволюции разрешалось изобретением все новых разнообразных приемов, обеспечивающих выживание обеих сторон. Иммунная система обладает широкими возможностями маневрирования в организации защитных реакций, восполняя недостаток генетически детерминированных или индуцированных патогеном факторов и управляя сложным

ансамблем элементов для достижения наибольшего эффекта при наименьших усилиях системы защиты [33].

Область HLA в геноме человека была признана за ее важность при определении риска и устойчивости к заболеваниям. Полиморфизм гена HLA был ассоциирован с многочисленными инфекционными заболеваниями, в том числе вызываемыми РНК-вирусами, такими как SARS, грипп, ВИЧ, гепатит С, бешенство, лихорадка Западного Нила, краснуха, эпидемический паротит, корь и другие. Такие исследования генетических ассоциаций и предлагаемые ими сведения имеют решающее значение для идентификации аллелей HLA, которые могут быть ассоциированы с защитными иммунными ответами [34]. Дифференциальные иммунные ответы наблюдались при легких и тяжелых течениях COVID-19, включая отсроченные ответы IgM и более высокие титры S-белка IgG у пациентов, не находящихся в отделении интенсивной терапии, поднимая вопросы о том, влияет ли и как аллельные вариации HLA на этот дифференциальный иммунитет. Крайне важно определить и сравнить профили HLA среди пациентов с тяжелым течением COVID-19 с теми, у кого заболевание протекает в более легкой форме или отсутствует. Это поможет понять основные механизмы защитного врожденного и адаптивного иммунитета и может привести к развитию генетических маркеров как коррелятов защиты.

Молекулы класса I лейкоцитарного антигена человека (HLA) являются одними из ключевых медиаторов первых звеньев развития специфического иммунного ответа на инфекцию коронавирусной болезни (COVID-19) [35]. Сразу после попадания в клетку коронавирус SARS-CoV-2 вызывает трансляцию своих белков. Некоторые из этих белков проникают в протеасомы инфицированной клетки, расщепляются до пептидов длиной 8–12 аминокислотных остатков и связываются с рецепторами HLA класса I. После связывания комплекс, состоящий из молекулы HLA класса I и пептида, переносится на поверхность инфицированной клетки, где он может взаимодействовать с Т-клеточным рецептором CD8 + Т-лимфоцитов. В ответ на взаимодействие CD8 + Т-лимфоцит активируется и начинает делиться; через 5–7 дней образуется популяция вирусоспецифических цитотоксических CD8 + Т-лимфоцитов, способных уничтожать инфицированные клетки с помощью перфоринов и сериновых протеаз. Решающая роль долгосрочной активации CD8 + Т-клеток в иммунном ответе на COVID-19 недавно была изучена в группе пациентов с легкой формой заболевания [36].

Информация о взаимосвязи генотипа HLA класса I и тяжести течения COVID-19, вызванного коронавирусом SARS-CoV-2, немногочисленна. В исследовании Iturrieta-Zuazo с соавторами использовалась выборка из 45 пациентов с разной степенью тяжести COVID-19 для подтверждения результатов теоретического моделирования взаимодействия

пептидов SARS-CoV-2 с различными аллелями HLA-I. Было продемонстрировано, что количество пептидов с высокой константой взаимодействия связано с отдельными генотипами HLA: чем больше вирусных пептидов с высокой аффинностью связывается с HLA класса I, тем легче течение заболевания [37]. Также было показано, что частота встречаемости аллелей HLA-A * 01: 01 и HLA-A * 02: 01 связана с ростом числа инфицированных пациентов и уровнем смертности в разных регионах Италии. Также имеются данные, что ряд полиморфизмов HLA, например HLA-B * 4601, HLA-B * 0703, HLA-DR B1 * 1202 и HLA-Cw * 0801 коррелируют с восприимчивостью к SARS-CoV, тогда как аллели HLA-DR0301, HLA-Cw1502 и HLA-A * 0201 ассоциированы с защитными механизмами от инфекции SARS [38].

В другом исследований методом секвенирования нового поколения были изучены генотипы HLA-A, HLA-B и HLA-C на 111 умерших от COVID-19 пациентов и 428 добровольцев разной возрастной категории. В результате было выявлено, что гомозиготность по аллели HLA-A * 01: 01 была ассоциирована с высоким риском смертности от COVID-19 у более молодых пациентов, в то время как носители аллели HLA-A * 02: 01 и HLA-A * 03: 01 в основном имели более низкий риск. Также авторами с использованием генотипов HLA класса I удалось разработать шкалу риска (RS), которая отражала способность представлять пептиды коронавируса 2 (SARS-CoV-2) набором молекул HLA класса I. Применение построенной модели RS к независимой когорте испанских пациентов показало, что оценка также была применима и к определению тяжести течения заболевания [39].

Nguen с коллегами были изучены белковые профили всего протеома SARS-CoV-2 для более 150 генотипов HLA класса I, для составления карты локусов восприимчивости к COVID-19. Они определили, что аллель HLA-B * 15:03 обладает высокой способностью к представлению пептидов, консервативных между SARS-CoV-2 и другими патогенными коронавирусами, предполагая, что этот аллель может иметь широкую протективную функцию. Напротив, они предсказали, что HLA-B * 46: 01 будет связываться с наименьшим количеством пептидов вируса SARS-CoV-2, предполагая, что пациенты, несущие этот аллель, могут иметь более слабый иммунный ответ и иметь предрасположенность к более тяжелым симптомам заболевания. Ранее предполагалось, что этот аллель является маркером восприимчивости к инфекции SARS-CoV-2. В частности, при коронавирусной инфекции SARS HLA-B * 46: 01 ($P = 0,0008$) в значительной степени был ассоциирован с тяжелым течением SARS у населения Азии [40].

Полученные результаты свидетельствуют о важной роли презентации пептида HLA класса I в развитии специфического иммунного ответа на COVID-19. Однако, не смотря на

имеющиеся данные, для полного понимания иммунного ответа на коронавирус SARS - CoV - 2 необходимы крупномасштабные полногеномные исследования с валидацией при участии больших когорт выздоравливающих людей.

Роль интерферонов при заражении коронавирусной инфекцией

Интерфероны вырабатываются в ответ на внутриклеточное внедрение патогена и отвечают за правильное формирование иммунного ответа: активацию отдельных клонов клеток иммунной системы, выработку специфических иммуноглобулинов [41]. Существуют четкие доказательства, указывающие на важную роль IFN в развитии SARS и других инфекций CoV. В сыворотках пациентов с SARS выявлено наличие высоких уровней IL-1, IL-6, INF γ , CCL2, CXCL10, IL-8 и продуктов генов, стимулированных интерфероном. Высокие уровни экспрессии IFN-стимулированных генов, таких как *CD58*, *IFNAR1* и *IFNGR1*, и IFN-стимулированных хемокинов CXCL10 и CCL2 наблюдались в другой когорте пациентов с SARS и коррелировали с тяжестью патогенеза. Значительное усиление экспрессии гена *CXCL10* наблюдалось в тяжелой фазе у пациентов, умерших от SARS. Эти данные подтверждаются исследованиями на пациентах с MERS, в которых была обнаружена повышенная регуляция гена *CXCL10* в сыворотке пациентов, у которых развилась пневмония. CXCL10 и INF α также коррелировали с тяжестью заболевания [42].

В исследовании группы китайских ученых из Гонконга включавших пациентов с SARS ($n = 495$) и здоровых людей в контрольной группе ($n = 578$) было проведено генотипирование по панели SNP маркеров, таких как *IFN γ* , *IL-10*, *TNF α* , *IL-12*, *RANTES*, *IL-10*, *Mig* и *MCP-1*. Было выявлено, что полиморфизм аллелей *IFN γ* + 874A и *RANTES*-28G в значительной степени ассоциированы с восприимчивостью коронавирусной инфекции SARS и высокими показателями смертности пациентов. Аллель + 874A чаще выявлялась у пациентов с SARS (83,1%) по сравнению с контрольной группой (66,3%, значение $P < 0,001$). Носители гомозиготного генотипа *IFNG* + 874 AA имели пятикратный риск развития SARS (OR 5,19, $P < 0,001$). Кроме того, у пациентов с генотипами GC и GG гена *RANTES*-28 риск развития инфекции SARS повышался в 3 раза (OR 3,28 и 3,06, соответственно, $P < 0,0001$) [43].

Важность передачи сигналов IFN в ответ на коронавирусную инфекцию была хорошо продемонстрирована на трансгенных моделях мышей. Мыши с дефицитом передачи сигналов IFN типа I, II и III обладали повышенной восприимчивостью к адаптированным к мышам штаммам SARS-CoV-2. Исследования с использованием мышей, лишенных *IFNAR1* и *IFNL1* или *STAT1*, выявили более высокую репликацию SARS-CoV-2 в легких и замедленный клиренс вируса [44].

Интерлейкин-6 и воспалительные факторы при COVID-19

В ретроспективном многоцентровом исследований включавшем 150 подтвержденных случаев COVID-19 в Ухане, проведенное агентством по прогнозированию летального исхода, была рассмотрена критическая роль преувеличенных воспалительных реакций, ведущих к патологии, связанной с инфекциями SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 и MERS [45]. Высвобождение провоцирующих цитокинов (например, IL-6, IL-1 β , TNF α) в ходе инфекции, называемое «цитокиновый штурм», связано с развитием тяжелого альвеолярного повреждения и воспаления / патологии легких, характерных для острого респираторного дистресс-синдрома. Среди факторов, связанных с повышенной тяжестью COVID-19 и летальным исходом (например, пожилой возраст, сопутствующие заболевания, лимфопения, вторичные инфекции), повышенный уровень ферритина, D-димера, C-реактивного белка и повышенный уровень цитокинов IL-2R, IL-6, IL-10 и TNF- α ($P = 0,001$ и $P = 0,04$, соответственно, при сравнении тяжелого и легкого COVID - 19 случаев) коррелировали с тяжестью течения коронавирусной инфекции SARS-CoV-2. Кроме того, хроническое воспаление является одной из ключевых характеристик старения, ожирения и некоторых сопутствующих заболеваний (например, гипертонии, диабета), которые влияют на клиническое течение и исход COVID-19 [46].

Интерлейкин-6 (IL-6) является провоспалительным цитокином с плейотропными функциями и специфическими эффектами в микросреде легких во время вирусных инфекций. Он может иметь противоположные эффекты, стимулируя адаптивные иммунные ответы антиген-специфическими В-клетками и CD8 + Т-клетками и способствуя выживанию фагоцитов, но он также может способствовать несбалансированной дифференцировке Т-клеток Th2 и Th17 по сравнению с дифференцировкой Т-клеток Th1, усиливая повреждение легочной ткани. отек и проницаемость сосудов, а также способствуют проникновению провоспалительных макрофагов и нейтрофилов. Было продемонстрировано, что пневмония COVID-19 характеризуется нарушением регуляции иммунной системы с чрезмерной выработкой IL-6 и что повышенные уровни IL-6 связаны с дыхательной недостаточностью и смертью у пациентов с COVID-19 и могут служить маркером для прогнозирования [47]. Исследования, предполагающие роль полиморфизма гена *IL-6* в прогрессировании COVID-19, были проведены в метаанализе 671 тяжелых случаев бактериальной и вирусной пневмонии, отличной от COVID-19, и 2910 случаев бактериальной и вирусной пневмонии легкого течения. В результате была выявлена значительная ассоциация аллеля *IL-6-174C* с более высоким уровнем IL-6 и с более тяжелым течением пневмонии (аллель C против аллеля G, OR-1,33, 95% CI 1,04-1,69, $P = 0,019$) [48]. Учитывая важность генетических факторов хозяина в восприимчивости к

инфекционным заболеваниям, вероятная ассоциация между генетическим полиморфизмом IL-6 и COVID-19 требует всестороннего исследования в крупных популяционных исследованиях.

Генетический варианты коронавируса SARS-CoV-2

Предыдущие исследования близкородственных коронавирусов SARS и MERS показали, что генетические вариации хозяина могут быть ключевым фактором, влияющим на восприимчивость, тяжесть и общие клинические исходы COVID-19 при заражении SARS-CoV-2. Однако, следует учитывать, что изменения в геноме вируса в результате мутаций или рекомбинации также могут повлиять на все аспекты жизненного цикла вируса, включая трансмиссивность, клеточный тропизм и тяжесть заболевания. Фактически, мутации в геноме SARS-CoV-2 являются самым простым объяснением широкого разнообразия клинических исходов, наблюдавшихся при COVID-19. В геномах вирусов с одноцепочечной РНК мутации накапливаются со скоростью 10^{-6} - 10^{-4} за цикл репликации, что значительно выше, чем скорость мутаций в геноме человека (10^{-8} на поколение) [49]. Это приводит к накоплению множества квазивидов в пределах одного инфицированного человека, что может объяснить наблюдавшиеся различия в симптомах и тяжести заболевания.

Определенные мутации могут дать вирусу явные эволюционные преимущества, такие как изменение первичного эпитопа, чтобы опосредовать уход от иммунной системы хозяина, или изменение факторов вирулентности для усиления передачи. Эти мутации могут установиться в результате естественного отбора или давления отбора вакцин и впоследствии привести к появлению новых вирусных штаммов. Forster и др. сообщили об идентификации трех основных типов вариантов (A, B, C) SARS-CoV-2 после филогенетического анализа 160 вирусных геномов [50]. Интересно, что вирусы B-типа (T8782C + C28144T) были ограничены Восточной Азией, в то время как вирусы A (T29095C) и C-типа (T8782C + C28144T + G26144T) преобладали в Европе и Северной Америке, что предполагает уже, произошли, что позволило распространить варианты SARS-CoV-2 за пределы Азии. Мониторинг глобального распространения вируса в реальном времени предполагает, что в настоящее время циркулируют до восьми штаммов SARS-CoV-2, хотя они продолжают поддерживать высокую степень сходства последовательностей. Это согласуется с наблюдениями эпидемиологических исследований в Италии и США, предполагающими, что только 4-10 стабильных не синонимичных мутаций были внесены в геном SARS-CoV-2 с момента его появления в Ухане несколько месяцев назад [51]. Важно отметить, что одна такая мутация в S-белке (D614G), по-видимому, значительно увеличивает трансмиссивность SARS-CoV-2, при этом штаммы, несущие эту мутацию, быстро распространились по Европе и США с момента своего

происхождения. 144 Сообщалось, что люди, инфицированные вариантом 614D, имеют более высокий уровень летальности, чем люди, инфицированные вариантом 614G. 145 Авторы предполагают, что дифференциальная стабильность белка S (и связывание с ACE2) может играть роль в различных курсах заболевания [52].

Pachetti и его коллеги охарактеризовали восемь повторяющихся мутаций в 220 клинических образцах, одна из которых (P323L) была проксимальнее предполагаемого антивирусного сайта связывания в РНК-зависимой РНК-полимеразе (RdRp) [53]. Подобные мутации в RdRp других вирусов были связаны с устойчивостью к противовирусной терапии. Jia et al. Недавно сообщили о филогенетическом анализе вирусного гликопротеина S из 106 изолятов SARS-CoV-2 из 11 стран. В то время как S-гликопротеин был в значительной степени консервативным среди этих образцов, вариант из Индии был идентифицирован с мутацией (R408I) в RBD и, как было предсказано, значительно изменил аффинность связывания с ACE2 [54]. Более крупное исследование Ou et al. выявило 32 несинонимичные мутации в RBD гликопротеина S в 1609 вирусных геномах и использовало моделирование молекулярной динамики для характеристики их связывания с ACE2. 150 Было предсказано, что три из этих вариантов (V367F, W436R и D364Y) имеют аффинность связывания с ACE2, которая в 100 раз выше, чем у SARS-CoV-2 дикого типа, что позволяет предположить, что эти варианты могут быть более заразными [55].

Не смотря на усилия больших объединенных коллективов ученых, врачей и специалистов смежных областей, на сегодняшний день необходимо продолжать исследования для изучения мутаций коронавируса SARS-CoV-2 у инфицированных людей, чтобы определить, существует ли причинно-следственная связь между появлением конкретных мутаций и тяжестью течения заболевания.

1 Методы

Объекты исследования

Объектами исследования являлись 413 пациента с подтвержденным в анамнезе диагнозом COVID – 19, 154 из которых имели тяжелый острый респираторный синдром SARS-CoV-2. Выборка формировалась на базе Постковидного центра при НАО «Национальный научный кардиохирургический центр» г. Нур-Султан. В выборку включали образцы клинического материала (венозная кровь), пациентов старше 18 лет, после подтверждения положительного диагноза коронавирусной инфекции методом ПЦР тестирования. Из исследования были исключены пациенты, отказавшиеся от прохождения диагностических процедур, определенных протоколом исследования. У участников были получены анкетные данные и информированные согласия об участии в исследовании.

Выделение ДНК из крови

Выделение ДНК из крови проводилось коммерческим набором QIAamp DNA Blood Kits (QIAGEN, Германия) согласно протоколу производителя.

Количественная оценка концентрации выделенного ДНК

Количественный анализ проведен с использованием спектрофотометра NanoDropND 2000 и Qubit.

Для измерения концентрации ДНК использовали набор Qubit dsDNA HS Assay Kit для флуориметрического измерения ДНК (Thermo Fisher Scientific) на флуорометре Qubit 4.0. Флуориметрический метод основан на измерении флуоресценции интеркалирующего красителя, который связывается с двухцепочечной ДНК. Для определения чистоты нуклеиновых кислот дополнительно была проведена спектрометрическая оценка ДНК при длинах волн 260 и 280 нм на приборе NanoDropND 2000. ДНК считается чистым, если соотношение значений 260нм/280нм приблизительно равно 1,8.

Электрофоретический анализ ДНК

Качественный анализ ДНК проводили с помощью электрофореза в 1% агарозном геле в присутствии интеркалирующего агента, бромистого этидия, который использовали для визуализации ДНК. Электрофорез выполняли в горизонтальной электрофорезной камере PowerPac с использованием источника питания для электрофорезной ванны BioRad. В качестве электродного буфера использовали 1 × TAE буфер.

Результаты были задокументированы с использованием системы документации гелей Gel Doc (Bio-Rad) с программным обеспечением Quantity One (Bio-Rad). Молекулярные размеры анализируемых образцов ДНК определяли путем сравнения их электрофоретической подвижности в геле с подвижностью маркеров - фрагмента ДНК с известной молекулярной массой. ДНК маркер размеров 100 п.н. (Thermo Scientific, # SM1293, 100-10 000 п.н.) использовали в качестве маркера молекулярной массы.

Мультиплексный иммуноанализ множественных цитокинов/хемокинов

Уровни цитокинов и хемокинов в образцах крови были определены методом мультиплексного анализа шариков (Milliplex 18x-MPXHCYTO-60, Human Cytokine/Chemokine MAP, Millipore, Watford, UK).

Образцы крови, собранные в пробирки с гель активатором центрифугированы при 1000xg в течении 10 минут. Сыворотка была удалена и образцы сохранены при -20 °C. В дальнейшем образцы сыворотки разбавлены 1:100 в буфере для анализа. Каждый разбавленный образец крови инкубировали с покрытыми антителами в течение ночи при постоянном перемешивании при 4 °C. После промывки гранулы дополнительно инкубировали с меченными биотином антителами к цитокинам человека и хемокинам в

течение 45 минут с последующей инкубацией со стрептавидином и фикоэритрином в течение 30 минут. Далее, образцы были промыты и проанализированы на Bio-Plex 200 (BIO-RAD).

Мультиплексный иммуноанализ уровня иммуноглобулинов

Для изотипирования иммуноглобулинов использовали мультиплексный анализ изотипирования человека с магнитными шариками Milliplex® MAP (HGAMMAG-301K, EMD Millipore Corp., Billerica, MA). Образцы крови разбавляли 1: 16 000 перед анализом изотипа в соответствии с инструкциями производителя, концентрации которых указаны для разбавленных образцов. Исходные 20Х гранулы для изотипирования встряхивали, обрабатывали ультразвуком, разбавляли до 1Х и инкубировали с 50 мкл серийно разведенного раствора при объемном соотношении гранул: 1:2. Через 1 час разделяли с помощью магнитной пластины и дважды промывали промывочным буфером. Затем инкубировали с 25 мкл 1Х антитела в течение 1 часа, дважды промывали и ресуспендировали. Интенсивность флуоресценции измеряли с использованием системы Bio-Plex 200 (BIO-RAD), а анализ данных средней интенсивности флуоресценции (MFI) проанализирован для расчета концентраций аналита в образцах. Все инкубации проводили при комнатной температуре в темноте при интенсивном перемешивании.

Информационный анализ

Информационный анализ статей по иммунологическим и генетическим факторам, влияющим на степень тяжести течения коронавирусной инфекции COVID-19 проводился в открытых научных базах данных <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Pubmed) и <http://www.webofknowledge.com/> (Thomson Reuters).

2 Результаты исследований

Формирование основной группы больных

Репрезентативную выборку собирали на базе НАО «Национальный научный кардиохирургический центр» г. Нур - Султан. В выборку включали больных с подтвержденным положительным диагнозом коронавирусной инфекции SARS-CoV-2. Общее количество выборки составило 413 пациента, среди которых 275 женщин и 214 мужчин. Возрастной интервал – от 21 до 86 лет (средний возраст $52,67 \pm 12,43$ лет). 154 пациента имели подтвержденный результатами КТ тяжелый острый респираторный синдром SARS-CoV-2 с разной степенью поражения легких. Данные указывают на более высокую частоту встречаемости коронавирусной инфекции среди пациентов женского пола.

Выделение и качественная оценка ДНК

Все выделенные ДНК имели концентрацию от 100 до 648 нг/μl при спектрометрическом измерении и от 104 до 516 нг/μl при флуориметрическом методе измерения. При этом в обоих случаях ДНК имело чистоту 260/280 нм равную ~1.88.

Результаты электрофоретического анализа ДНК представлены на Рисунке 1. Изображение геля показывает высокую концентрацию ДНК в исследуемых пробах крови (Рисунок 3). Это говорит о том, что выделение ДНК из крови было проведено методически правильно, и имеют высокое качество.

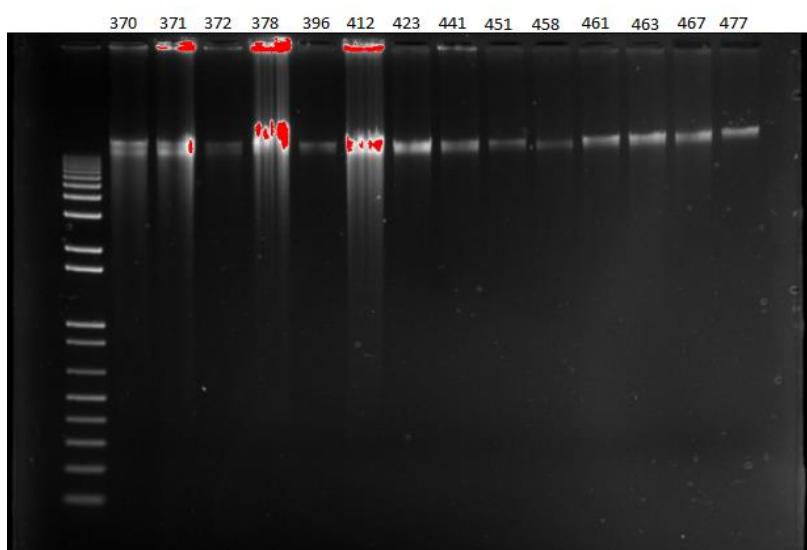


Рисунок 3 - Электрофорограмма образцов ДНК в 1% агарозном геле, 370-477 образцы ДНК, 1 – ДНК маркер

Иммunoологический анализ для определения уровня иммунного ответа

Собранные 413 образцов клинического материала (кровь) исследованы на определение уровней цитокинов/хемокинов и изотопов иммуноглобулинов с помощью мультиплексного иммуноанализа. Данная мультиплексная детекция является высокоэффективным инструментом для измерения уровня множества анализов в единственном образце, владеет высокой чувствительностью -< 1 pg/ml, широким диапазоном 1-10,000 pg/ml и воспроизводит быстрые результаты.

Согласно полученным данным определена концентрация цитокинов и хемокинов по следующим показателям: sCD40L, EGF, Eotaxin/CCL11, FGF-2, Flt-3 ligand, Fractalkine, G-CSF, GM-CSF, GRO, IFN- α 2, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, MCP-1, MCP-3, MDC (CCL22), MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-AA, PDGF-AB/BB, RANTES, TGF- α , TNF- α , TNF- β , VEGF. Также оценены уровни иммуноглобулинов IgA, IgG1, Ig G2, IgG3, G4 и IgM в крови

у больных с подтвержденным положительным диагнозом коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 (Рисунок 4).

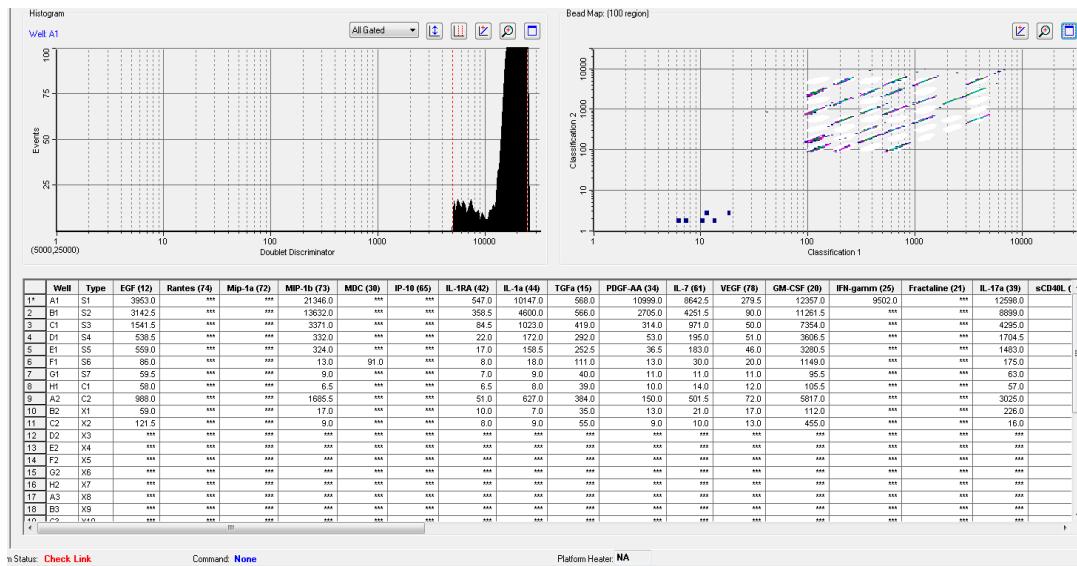


Рисунок 4 – Обзор полученных результатов на Bio-Plex Manager

Стандартные кривые известных концентраций рекомбинантных цитокинов/хемокинов человека использовали для преобразования единиц флуоресценции в единицы концентрации цитокинов (пг/мл).

Информационный анализ

В отчете представлен обзор исследований, оценивающих роль генетики хозяина (и вируса) в иммунном ответе на коронавирусы, а также клинических исходов заболевания, опосредованного коронавирусом SARS-CoV-2. Выявлены генетические варианты пациентов с COVID-19, влияющих на индивидуальную восприимчивость к коронавирусной инфекции. Также обсуждаются механизм работы иммунной системы с точки зрения защиты человеческого организма от COVID-19 и представлена информация о клинических и экспериментальных данных.

Клинический анализ данных пациентов с COVID-19 и постковидным синдромом

Дополнительно на начальном этапе научного исследования с целью определения клинико-функциональных особенностей течения COVID-19 и постковидного синдрома, нами было проведено следующие исследования: Ретроспективный анализ медицинских карт пациентов, госпитализированных в инфекционный стационар в период май – август 2020 года с клиническим диагнозом COVID-19 в острой фазе. Целью анализа было получить предварительные результаты по клинико – функциональным тяжестям заболевания и определение предикторов смертности.

Были проанализированы истории 239 пациентов с клиническим диагнозом COVID-19. Диагноз был подтверждён положительным результатом мазка из носоглотки на SARS-CoV-2 с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ПЦР) и / или клинически подтвержденными доказательствами SARS-CoV-2 в отсутствие подтвержденного ПЦР теста. Обязательным критерием для обоснования клинического диагноза при отсутствии положительного ПЦР результата, указывало наличие пневмонии COVID-19, подтверждённой рентгенографией и компьютерной томографией. Лабораторные и радиологические исследования проводились в соответствии с Национальным клиническим протоколом лечения COVID-19.

Анализ обследованных пациентов с постковидным синдромом с целью определения различных осложнений и оценкой влияния перенесенной SARS-CoV-2 на исходы течения заболевания.

В данный анализ вошли 312 пациентов с диагнозом постковидным синдром, с подтвержденным в анамнезе клиническим диагнозом COVID-19 в период март - сентябрь 2020 года.

Статистические исследования

Для описательного анализа непрерывные данные были представлены в виде количества пациентов, среднего значения \pm стандартное отклонение (SD), медианы (межквартильный диапазон). Категориальные переменные сравнивались с использованием критериев χ^2 . Непрерывные переменные сравнивались с использованием t-критерия или U-критерия Манна – Уитни. Связь между демографическими, клиническими, лабораторными, связанными с лечением переменными и риском госпитальной смерти изучалась с использованием нескорректированного (одномерного) и скорректированного (многомерного) анализа логистической регрессии. Исследование было одобрено Этическим комитетом Национального исследовательского кардиохирургического центра (№ 01-97 / 2021 от 22.04.21). Не ожидалось никаких известных рисков для участников. Амбулаторные карты пациентов представлены анонимной базой данных без какой-либо идентифицирующей информации о пациентах.

3 Обсуждение

Клинико-функциональные факторы тяжести заболевания COVID-19

Ретроспективный анализ историй болезни с COVID-19 показал, что 205 (85,8%) пациентов выписаны с выздоровлением, 34 (14,2%) пациента умерли во время госпитализации. У 151 пациента (63,2%) диагноз COVID-19 был подтвержден методом ПЦР. Средний возраст пациентов составил $57,3 \pm 12,7$ года. Пациентов мужского пола составило большую часть 61,1% - мужчины (Таблица 1). Средняя продолжительность от

начала заболевания до госпитализации составляла 10 дней (IQR 7–14). Умершие с большей вероятностью поступали в больницу позже, чем пациенты, госпитализированные с начала заболевания. Более того, на момент госпитализации у пациентов с летальным исходом, с большей вероятностью отмечалась низкая сатурация кислорода, повышенная температура и частота дыхания), то есть, более высокая степень тяжести заболевания, более высокая стадия дыхательной недостаточности и более выраженная легочная недостаточность.

Таблица 1 - Основные характеристики пациентов с COVID-19

Характеристики	Всего пациенто в	Пациенты с выздоровлен ием	Пациенты с летальным исходом	p value
1	2	3	4	5
Положительный ПЦР к SARS-CoV-2, n (%)	151 (63.2)	122 (59.5)	29 (85.3)	0.004
возраст, годах (mean ± SD)	57.3±12.7	56.6±12.96	61.5±10.5	0.037
Пол, n (муж %)	146 (61.1)	120 (58.6)	26 (76.5)	0.047
BMI (mean ± SD)	28.9±5.01	28.7±5.2	30.2±3.3	0.15
Ожирение стадии, n (%)				0.085
Недовес	2 (0.4)	2 (1.1)	0 (0)	
Нормальный вес	38 (17.2)	38 (20.3)	0 (0)	
Избыточный вес	92 (43.0)	79 (42.3)	13 (52.00)	
Ожирение	80 (37.4)	68 (36.4)	12 (48)	
Клинические данные при поступлении				
Койко-дней (median [IQR])	10 [7-14]	10 [7-14]	14 [9.5-18.5]	0.0048
Сатурация, %/100 (mean ± SD)	89±10	92±6	76±15	<0.0001
Кашель, n (%)	130 (54.4)	114 (55.6)	16 (47.1)	0.35
Температура, °C (mean ± SD)	37.97±0.7	37.92±0.77	38.32±0.76	0.022

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5
Частота дыхания, вдох в мин (mean ± SD)	21.6±4.1	21.28±3.91	26.3±3.9	<0.0001
Степень тяжести, n (%):				<0.0001
Легкая	16 (6.7)	16 (7.8)	0 (0)	
Средняя	178 (74.5)	178 (86.8)	0 (0)	
Тяжелая	45 (18.8)	11 (5.4)	34 (100)	
Степени дыхательной недостаточности, n (%)				<0.0001
0	43 (17.9)	41 (20)	2 (5.9)	
1	132 (55.2)	132 (64.4)	0	
2	22 (9.2)	22 (10.7)	0	
3	42 (17.6)	10 (4.9)	32 (94.1)	
Сопутствующие заболевания				
Диабет, n (%)	53 (22.2)	43 (20.98)	10 (29.4)	0.27
HbA1c>6.5%, n (%)	47 (50)	37 (45.7)	10 (76.9)	0.036
Артериальная гипертензия, n (%)	126 (52.7)	112 (54.6)	14 (41.2)	0.14
Сердечно-сосудистая патология, n (%)	69 (28.3)	61 (29.8)	8 (23.5)	0.46
Предыдущие операции на сердце, n (%)	55 (23.0)	44 (21.5)	11 (32.4)	0.16
Рентгенологические данные легких				
Максимальное повреждение легких % (CT), % (Median [IQR])	40 [20-60]	30 [20-50]	60 [40-80]	0.0004
СТ стадии, n (%)				0.008
1-стадия (<25% damage)	55 (28.6)	55 (31.1)	0 (0)	
2-стадия (25-49% damage)	80 (41.7)	74 (41.8)	6 (40)	
3-стадия (50-74% damage)	40 (20.8)	35 (19.8)	6 (33.3)	
4-стадия (\geq 75% damage)	17 (8.9)	13 (7.3)	4 (26.7)	

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5
Полисегментарные признаки, n (%)	191 (79.9)	158 (77.1)	33 (97.1)	0.007
Двустороннее поражение, n (%)	199 (93.4)	166 (92.2)	33 (100)	0.097
Фиброз легких, n (%)	16 (6.7)	14 (6.8)	2 (5.9)	0.84
Лабораторные данные при поступлении				
Мочевина, mg/dl (median [IQR])	33.3 [25.1-43.5]	31.6 [24.7-40.6]	55.7 [37.8-99.6]	<0.0001
Креатинин mg/dl (median [IQR])	0.9 [0.7-1.0]	0.9 [0.7-1.0]	1.0 [0.8-1.7]	0.0025
АЛТ U/l (median [IQR])	30.6 [18.7-50.1]	29.1 [18.5-50.3]	35.9 [22.2-50.1]	0.18
АСТ U/l (median [IQR])	33.1 [22.1-49.7]	31.9 [21.9 – 48]	45.4 [30.7-66]	0.0034
Общий билирубин, mg/dl (median [IQR])	0.6 [0.4-0.8]	0.5 [0.40-0.8]	0.8 [0.6-1.2]	<0.0001
Общий белок, g/dl (mean ± SD)	6.6±0.7	6.7±0.6	5.9±0.9	<0.0001
Альбумин, g/dl (mean ± SD)	3.5±0.7	3.7±0.6	2.8±0.6	<0.0001
LDH, U/L (median [IQR])	255 [190-342]	247 [190-330.6]	370 [318-556]	0.0064
CRP mg/dl (median [IQR])	3.5 [0.9-9.1]	2.9 [0.6-7.8]	12.8 [7.4 – 23.8]	<0.0001
HbA1c % (mean ± SD)	7.1±1.8	6.99±1.8	7.4±1.2	0.42
D-димер, ng/ml (median [IQR])	0.6 [0.3-1.2]	0.6 [0.3-0.9]	2.9 [1.0-7.7]	<0.0001
Фибриноген, g/l (median [IQR])	4.2 [3.2-5.3]	4.1 [3.3-5.0]	5.1 [3.2-6.6]	0.043
INR (median [IQR])	0.96 [0.9-1.1]	0.9 (0.9-1.0)	1.1 {1.0-1.3}	<0.0001
aPTT seconds (median [IQR])	37.2 [32.8-42]	36.1 [32.5-40.7]	43.6 [38.4-68.1]	<0.0001

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5
Ферритин, µg/l (median [IQR])	335.5 [185.7- 779.4]	292.6 [169.2 – 651.3]	1047.1 [674.8- 1483]	<0.0001
Лечение				
Кислородная оксигенация, n (%)	113 (47.3)	110 (53.7)	3 (8.8)	<0.0001
Неинвазивная механическая вентиляция легких, n (%)	5 (2.1)	3 (1.5)	2 (5.9)	0.095
Инвазивная механическая вентиляция легких, n (%)	33 (13.8)	2 (0.98)	31 (91.2)	<0.0001
ECMO, n (%)	14 (5.9)	2 (0.98)	12 (35.3)	<0.0001
Заместительная почечная терапия, n (%)	27 (11.3)	5 (2.44)	22 (64.71)	<0.0001
Медикаментозная терапия				
Противовирусная терапия, n (%)	50 (20.92)	27 (13.2)	23 (67.6)	<0.0001
Антибиотики, n (%)	226 (94.6)	194 (94.6)	32 (94.1)	0.90
Стероиды, n (%)	188 (78.7)	168 (81.9)	20 (58.8)	0.002
Антикоагулянты (perorальная), n (%)	27 (11.3)	27 (13.2)	0 (0)	0.025
Антикоагулянты (в,в), n (%)	201 (84.1)	174 (84.9)	27 (79.4)	0.42
Аспирин, n (%)	57 (23.8)	54 (26.3)	3 (8.8)	0.026
Осложнения / исход				
AKI, n (%)	56 (24.4)	27 (13.2)	29 (85.3)	<0.0001
Direct ICU admission, n (%)	26 (10.9)	0	26 (76.4)	<0.0001
Hospital stay duration, day median [IQR]	8 (6-12)	7 (6-11)	13 (6-21)	0.0032

У пациентов с летальным исходом были значительно аномальные параметры общего анализа крови, повышенный креатинин сыворотки крови, мочевина, АСТ, общий билирубин, общий белок и альбумин. Аналогичным образом, в коагулограмме: повышенные уровни D-димера, фибриногена, МНО и АЧТВ чаще обнаруживались среди умерших пациентов по сравнению с выздоровевшими пациентами. Аналогичная тенденция наблюдалась для маркеров воспаления (ферритин, CRP). Умершие пациенты с большей вероятностью нуждались в кислородной терапии, инвазивной механической вентиляции

легких, ЭКМО, для приема противовирусных препаратов, стероидов, аспирина и пероральных антикоагулянтов, а также для развития ОПП по сравнению с выздоровевшими пациентами.

Связь между клинико-демографическими параметрами и риском смерти с использованием результатов одномерной логистической регрессии суммирована в Таблице 2, где отмечается, что каждое постепенное прибавление к возрасту 5 лет, повышает шансы на смерть на 17% (OR 1,17; 95% CI 1,01–1,36), $p = 0,039$). У пациентов с неконтролируемым диабетом ($\text{HbA1c} > 6,5\%$) шансы смерти почти в 4 раза выше (OR 3,96; 95% ДИ 1,02–15,48; $p = 0,048$) по сравнению с теми, у которых уровень HbA1c был ниже 6,5%. Каждое постепенное увеличение на 5 дней поздней госпитализации также повышает риск смерти на 32% (OR 1,32; 95% CI 1,03–1,68; $p = 0,026$). Повышенная температура при поступлении связана с двукратным увеличением шансов смерти (OR 2,06; 95% ДИ 1,10–3,83; $p = 0,023$), каждое постепенное повышение на 2 градуса Цельсия увеличивает шансы смерти в 4 раза. Повышенная частота дыхания (ОР) (ОШ 1,23; 95% ДИ 1,11–1,37; $p < 0,0001$) и пониженная сатурация кислорода (ОШ 1,66; 95% ДИ 1,39–1,99; $p < 0,0001$) также увеличивают шансы смерти. Каждое постепенное увеличение ЧД на 7 вдохов / мин и каждое постепенное уменьшение насыщения кислородом на 7% связано с 4-кратным и 3,5-кратным риском смерти, соответственно. Лейкоцитоз, лимфопения, анемия, повышенные функциональные пробы печени и почек, гипопротеинемия, повышенные воспалительные маркеры (С-реактивный белок, ферритин и ЛДГ) и тесты коагулограммы (фибриноген, D-димер, МНО и АЧТВ) при поступлении также были связаны с более высокими рисками смерти в одномерном логистическом регрессионном анализе (Таблица 2).

Таблица 2 - Связь между демографическими, клиническими, лабораторными, переменными, связанными с лечением, и риском госпитальной смерти с использованием нескорректированной логистической регрессии.

Характеристики	Количество наблюдений / Количество событий	Одномерный анализ OR (95% CI)	p value
1	2	3	4
Пол	239 / 34	2.3 (0.99-5.33)	0.052
Возраст	239 / 34	1.03 (1.00-1.06)	0.039
Возраст ⁺⁵		1.17 (1.01-1.36)	

Продолжение таблицы

1	2	3	4
ИМТ	212 / 25	1.05 (0.98-1.14)	0.16
Диабет	239 / 34	1.57 (0.70-3.53)	0.28
HbA1c > 6.5%	94 / 13	3.96 (1.02-15.48)	0.048
Артериальная гипертензия	239 / 34	0.58 (0.28-1.21)	0.15
Сердечно-сосудистые заболевания	239 / 34	0.73 (0.31-1.69)	0.46
Предыдущее операции на сердце	239 / 34	1.75 (0.79-3.86)	0.17
День заболевания при поступлении	239 / 34	1.06 (1.01-1.11) 1.12 (1.013-1.23)	0.026
День ⁺²		1.32 (1.034-1.68)	
День ⁺⁵		1.47 (1.048-2.06)	
День ⁺⁷		1.73 (1.069-2.81)	
День ⁺¹⁰			
Кашель	239 / 34	0.71 (0.34-1.47)	0.36
Температура	220 / 23	2.06 (1.10-3.83)	0.023
Температура ⁺²		4.23 (1.22-14.68)	
Частота дыхания	217 / 15	1.23 (1.11—1.37)	<0.0001
Частота дыхания ⁺⁵		2.84 (1.69-4.78)	
Частота дыхания ⁺⁷		4.31 (2.08-8.94)	
Сатурация	140 / 25	0.84 (0.79-0.89)	<0.0001
Сатурация ⁻³		1.66 (1.39-1.99)	
Сатурация ⁻⁵		2.33 (1.72-3.15)	
Сатурация ⁻⁷		3.26 (2.14-4.97)	
КТ полисегментарная	239 / 34	9.82 (1.31-73.70)	0.026
ПЦР тест	239 / 34	3.95 (1.47-10.61)	0.007
Нейтрофилы	239 / 34	1.26 (1.16-1.37)	<0.0001
Нейтрофилы ⁺⁵		3.22 (2.12-4.88)	
Лимфоциты	238 / 33	0.91 (0.87-0.96)	<0.0001
Лимфоциты ⁻⁵		1.58 (1.26-1.99)	

Продолжение таблицы

1	2	3	4
NLR	238 / 33	1.29 (1.11-1.50)	0.001
NLR ⁺⁵		3.61 (1.69-7.69)	
WBC	238 / 33	1.27 (1.16-1.37)	<0.0001
WBC ⁺⁵		3.18 (2.12-4.78)	
PLT	238 / 33	1 (1-1.002)	0.56
RBC	238 / 33	0.44 (0.25-0.77)	0.004
RBC ⁻²		5.26 (1.67-16.5)	
HGB	238 / 33	0.97 (0.95-0.99)	0.001
HGB ⁻⁵		1.16 (1.058-1.26)	
HGB ⁻¹⁰		1.34 (1.12-1.60)	
Мочевина	238 / 33	1.056 (1.035-1.076)	<0.0001
Мочевина ⁻⁵		1.31 (1.19-1.44)	
Креатинин	237/33	4.17 (1.89-9.17)	<0.0001
Креатинин ⁺²		17.37 (3.59-84.1)	
Общий белок	236/33	0.17 (0.086-0.33)	<0.0001
Общий белок ⁻²		35.11 (9.15-134.7)	
Альбумин	197/33	0.12 (0.054-0.27)	<0.0001
Альбумин ⁻²		69.46 (13.96-345.49)	
Билирубин	238/33	3.045 (1.64-5.66)	<0.0001
Билирубин ⁺⁵		261.89 (11.76-5834.21)	
ALT	237 / 33	1.00 (0.99-1.01)	0.41
AST	238 / 33	1.01 (1.01-1.013)	0.027
LDH	195 / 34	1.0039 (1.0012-1.01)	0.005
LDH ⁺⁵⁰		1.22 (1.063-1.39)	
CRP	233 / 31	1.18 (1.11-1.24)	<0.0001
CRP ⁺⁵		2.24 (1.70-2.95)	
Ферритин	226 / 29	1.002 (1.0014-1.003)	<0.0001
Ферритин ⁺⁵⁰		1.12 (1.075-1.17)	
Ферритин ⁺¹⁰⁰		1.26 (1.16-1.36)	
GlycHGB	94 / 13	1.13 (0.84-1.54)	0.42

Продолжение таблицы

1	2	3	4
INR	234 / 33	1.60 (1.02-2.53)	0.043
aPTT	238 / 33	1.02 (1.01-1.037)	< 0.0001
aPTT ⁺⁵		1.12 (1.055-1.199)	
Фибриноген	235 / 33	1.3 (1.06-1.59)	0.013
Фибриноген ⁺⁵		3.69 (1.32-10.31)	
D-димер	224 / 32	1.39 (1.19-1.62)	< 0.0001
D-димер ⁺⁵		5.13 (2.36-11.14)	
Противовирусные препараты	238/23	13.8 (6.04-31.44)	< 0.0001
Антибиотики	238/32	0.91 (0.19-4.28)	0.902
Кортикоиды	238/20	0.31 (0.15-0.68)	0.003

После корректировки в различных моделях (Таблица 3), возраст (OR 1,20; 95% ДИ 1,01–1,43; p = 0,035), частота дыхания (OR 1,38; 95% ДИ 1,07–1,77; p = 0,013) и CRP (OR 1,39; 95% ДИ 1,04–1,87; p = 0,026) оставались независимыми факторами, связанными с внутрибольничной летальностью.

Таблица 3 - Связь между демографическими, клиническими, лабораторными, переменными, связанными с лечением, и риском госпитальной смертности с использованием скорректированных моделей логистической регрессии.

Независимая переменная	Модель 1 OR (95% CI)	p value	Модель 2 OR (95% CI)	p value	Модель 3 OR (95% CI)	p value
1	2	3	4	5	6	7
Возраст	1.07 (1.01-1.13)	0.016	1.09 (1.01-1.19)	0.037	1.2 (1.01-1.43)	0.035
Пол	1.14 (0.34-3.78)	0.827	0.65 (0.11-3.72)	0.63	0.13 (0.01-2.20)	0.16
День болезни	1.03 (0.95-1.12)	0.466	0.99 (1.03-1.39)	0.89	0.81 (0.62-1)	0.14
Частота дыхания	1.22 (1.09-1.37)	<0.001	1.20 (1.03-1.39)	0.018	1.38 (1.07-1.77)	0.013

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7
WBC	-	-	1.15 (1.01-1.31)	0.03	1.30 (0.96-1.76)	0.086
Serum креатинин	-	-	1.3 (0.52-3.27)	0.57	0.80 (0.35-1.80)	0.59
Общий белок	-	-	0.41 (0.10-1.73)	0.23	0.050 (0.001-1.47)	0.083
СРБ	-	-	1.13 (1.00-1.28)	0.043	1.39 (1.04-1.87)	0.026
Фибриноген	-	-	0.82 (0.50-1.35)	0.44	0.54 (0.22-1.35)	0.19
Гемоглобин	-	-	1.01 (0.96-1.06)	0.72	1.02 (0.97-1.07)	0.41
Антивирусная терапия	-	-	-	-	508.5 (5.67-45633)	0.007
Кортикостериоиды	-	-	-	-	3.35 (0.17-66)	0.43

Это первый в Казахстане ретроспективный анализ с целью определения предикторов смертности COVID-19. Мы обнаружили, что возраст, частота дыхания и CRP были независимыми предикторами смертности в нашей когорте. Часто самые тяжелые пациенты были госпитализированы в нашу клинику, которая имеет достаточный опыт и высокотехнологичное оборудование для оказания специализированной медицинской помощи в отделении интенсивной терапии. Это может объяснить, почему уровень летальности в нашем исследовании в 3-4 раза выше, чем общенациональный или мировой уровень смертности от COVID-19, составляющий 3-4% [56,57].

Существующие исследования показали, что пожилой возраст связан с повышенным риском смертности [58,59]. Это согласуется с результатами нашего исследования, в котором было установлено, что пожилой возраст является независимым предиктором смертности от COVID-19. Обзор литературы также показал, что мужской пол, как сообщалось, был связан с повышенной госпитальной смертностью, а также с госпитализацией в ОИТ [59,60]. В этом исследовании, несмотря на то что выжившие чаще были мужчинами, логистическая регрессия не смогла выявить значительных различий, возможно, из-за небольшого числа выборок. Важно отметить, что мы также подтвердили, что чем дольше время ожидания до госпитализации, тем выше риски на летальный исход,

что подчеркивает важность ранней диагностики, наблюдения и сортировки пациентов для госпитализации с целью предотвращения неблагоприятного исхода [61].

Кроме того, в нашем исследовании было установлено, что низкое насыщение кислородом, повышенная температура тела, частота дыхания и степень дыхательной недостаточности связаны с более высокими рисками летального исхода пациентов с COVID-19. Более того, было сделано заключение, что частота дыхания является независимым предиктором смертности. Соответственно, тяжесть заболевания, о которой судят по отклонению от нормы этих клинических симптомов, также была связана с высокими рисками летальности. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными исследованиями в мире [56].

Многие исследователи сообщают, что наличие сопутствующих заболеваний, таких как болезни сердца, артериальная гипертония и сахарный диабет, связаны также с риском развития высокой смертности от COVID-19 [59,62,63]. Результаты нашего анализа не показали никакой связи между этими переменными. Однако важно отметить, что наше исследование показало, что повышенный уровень гликированного гемоглобина был связан с высоким риском смерти пациентов от COVID-19. Это можно объяснить наличием неконтролируемого и / или ранее не диагностированного диабета у пациентов нашей когорты. Поэтому мы предлагаем, чтобы уровень гликозилированного гемоглобина оценивался при поступлении пациентов, несмотря на ранее отсутствие диагноза сахарного диабета. Хотя наше исследование ограничено отсутствием данных, но это важный вывод, который следует более детального изучения.

Результаты нашего исследования подтверждают ранее опубликованные выводы [61,64,65] о том, что исходные лабораторные характеристики могут служить предикторами смертности. В частности, мы пришли к выводу, что лейкоцитоз, а также повышенный уровень СРБ являются независимыми предикторами смертности в нашей когорте.

В заключение, это первое исследование в Казахстане по оценке смертности пациентов с COVID-19 в специализированном центре. Это исследование описывает 14% госпитальную летальность от COVID-19. Многие отклонения от нормы клинических и лабораторных данных при поступлении связаны с плохим исходом. Было обнаружено, что возраст, частота дыхания и СРБ являются независимыми предикторами смертности. Результаты нашего предварительного исследования могут помочь в отборе и сортировке тяжелых пациентов и тактике лечения.

Пациенты с LVAD и COVID-19

Отдельного внимания заслуживает пациенты с вспомогательным устройством левого желудочка (LVAD) с хронической сердечной недостаточностью, перенесшие COVID-19. Данные пациенты не вошли в вышеуказанную когорту исследования. Им был проведен только опрос с целью выявления распространенности случаев COVID-19.

Всего было опрошено 177 пациентов с LVAD, находящихся на поддержке. 23,2% (41) пациента отметили у себя симптомы COVID-19, из них у 22 пациентов (53,6%) был подтвержден с помощью ПЦР. У 7 пациентов (17%) результат ПЦР был отрицательным при наличии рентгенологических признаков COVID-19. Остальные 12 пациентов (29,4%) при наличии симптомов COVID-19 не имели возможности сдать анализ ПЦР.

По степени тяжести пациенты распределились следующим образом: легкая степень - 60,9% (25), средний - 17% (7) пациентов, тяжелый - 22,1% - 9 пациентов.

Средний возраст пациентов составил 55 лет (± 17), из них только 9 (21,9%) - женщины. Виды вспомогательных устройств левого желудочка были следующими: LVAD HeartMate 3 был имплантирован 36 (87,8%) пациенту, HeartWare HVAD - 4 пациента, Jarvik2000 - 1 пациенту.

Сопутствующие заболевания пациентов включали сахарный диабет 26,8 % (11), гипертонию 19,5% (8), ожирение 12,2% (5), предшествующие легочные заболевания 19,5% (8), сопутствующие заболевания почек 9,7% (4), заболевания печени 7,3% (3).

Как показал анализ, у большинства наших пациентов симптомы COVID-19 были легкими (60,9%). Belfort D et al. представили первый систематический обзор по COVID-19 у LVAD пациентов и установили, что 42,8% пациентов имели легкие симптомы, а средний возраст составил 62,7 года [66]. Начальные проявления COVID-19 включали симптомы интоксикации: головная боль, слабость, потливость, боль в мышцах, снижение аппетита, которые были обнаружены у 27 пациентов (65,8%); лихорадка была у 17 пациентов (41,5%), а аносmia наблюдалась у 10 пациентов (24,4%). Пациенты находились под тщательным амбулаторным наблюдением. Легкое течение COVID-19 у пациентов LVAD, может быть связано с тем, что пациенты постоянно находятся на антикоагулянтной и антиагрегантной терапии при непрерывном контроле анализе МНО, а также само наличие адекватной разгрузки левого желудочка при поддержке LVAD способствует оптимальной гемодинамике

13 пациентам (31,7%) со средней и тяжелой степенью потребовалась госпитализация в больницы по месту жительства, из них 3 (7,3%) имели летальный исход. Но, тем не менее, уровень смертности (7,3%), был значительно ниже по сравнению с данными систематического обзора (21,4%) [66]. Постоянный мониторинг здоровья, прием

антикоагулянтов, контроль МНО, социальная изоляция пациентов позволило снизить смертность в данной тяжелой категорией пациентов.

Влияние перенесенной SARS CoV-2 на исходы течения заболевания и развития постковидного синдрома

Последствия коронавирусной инфекций, при котором пациенты имеют долгосрочные различные осложнения внесены в Международный классификатор болезней как «Состояние после COVID-19 неуточненное» с кодом U09.9.

Но данный синдром нельзя использовать в случаях, когда возбудитель COVID-19 все еще присутствует в организме.

В данное время рассматривают два термина для определения состояния после перенесенной коронавирусной инфекции:

Long COVID (длительная или затянувшаяся коронавирусная инфекция) – при котором симптомы Covid-19 продолжаются в течение более 4 недель после начала заболевания [67].

Постковидный синдром — это симптомокомплекс, который продолжается более 12 недель, после перенесенной коронавирусной инфекции, проявляющийся группой симптомов, которые могут меняться со временем и могут повлиять на любую систему в организме, и привести к снижению качества жизни [67].

Хотя большинство пациентов выздоравливают от инфекций COVID-19, более 70% выздоровевших имели нарушения в одном или нескольких органах через 4 месяца после появления первых симптомов [67]. Их называют пациентами, живущими с «хроническим синдромом COVID», «синдромом пост-COVID-19» или «пост-острым COVID19» [68,69]. Такие пациенты сообщали об обширных симптомах, таких как хронический кашель, стеснение в груди, одышка, когнитивная дисфункция и усталость [67].

Синдром длительного COVID-19 — это общий термин, включающий пост-острый COVID-19 и пост-COVID-19 синдром, в зависимости от продолжительности после первых симптомов. Постострый COVID-19 определяется как продолжающийся симптоматический COVID-19 для людей, у которых все еще есть симптомы через 4 и 12 недель после появления острых симптомов, в то время как пост-COVID-19-синдром - для людей, у которых симптомы все еще сохраняются более 12 недель после появления острых симптомов в соответствии с рекомендациями UK NICE [67]. В систематическом обзоре и метаанализе UK NICE, посвященном долгосрочному эффекту COVID-19, пять наиболее распространенных симптомов — это усталость (58%), головная боль (44%), нарушение внимания (27%), выпадение волос (25%) и одышка (24%) [67]. Для исчезновения этих симптомов могут потребоваться месяцы, даже у не госпитализированных лиц с легким течением заболевания в острой фазе [67].

Недавнее исследование UK NICE показало, что повышенный риск длительного синдрома COVID-19 не зависит от возраста и наличия ранее существовавших заболеваний [70]. По мере продолжения пандемии COVID-19 стало ясно, что заражение SARS-CoV-2 может быть причиной, неожиданных ранее, долгосрочных иммунологических последствий для здоровья. Британские иммунологи находятся в разгаре исследования наблюдаемых нами явлений и лежащих в их основе механизмов.

Нами было обследовано 312 пациентов с диагнозом «постковидный синдром», с подтвержденным в анамнезе клиническим диагнозом COVID-19 в период март - сентябрь 2020 года.

Средний возраст пациентов составил 51,5 ($\pm 7,4$) лет. Из них мужчины - 32%, женщины - 68%. Этнический состав пациентов, следующий: азиаты – 91,3% (285), европейцы – 8,6 % (23), 1,2% (4) - другие национальности.

Госпитализацию в стационар в анамнезе имели 146 (46,79%) исследуемых пациентов, из них на инвазивной вентиляции легких находились 5 пациентов, на заместительной почечной терапии - 5, на экстракорпоральной мембранный оксигенации (ЭКМО) - 2, остальные на увлажненном кислороде). Амбулаторное лечение по поводу COVID-19 принимали 166 (53,2%) пациентов.

Низкая толерантность к физической нагрузке в виде: одышки, усталости, мышечных и суставных болей ухудшали качество жизни пациентов, ограничивали их в повседневной жизни. Снижение памяти, нарушение концентрации внимания, трудность выполнения повседневных обязанностей — это одна из частых причин низкой работоспособности, отсутствия удовлетворения от работы.

Таблица 4 - Основные признаки постковидного синдрома

Симптомы	Количество пациентов – 312, %
1	2
Усталость/утомляемость	206 (64,02%)
Слабость	200 (64,10%)
Одышка, диспноэ	30 (9,6%)
Выпадение волос - алопеция	50 (1,6%)
Нарушение сна, бессонница	100 (32,05%)
Мышечная слабость/боли	45 (14,42%)
Боли в суставах	57 (18,26%)
Лихорадка	1 (0,32%)

У 12% пациентов отмечались стойкое повышение трансаминаз, гипербилирубинемия, через 3-6 месяцев после острой фазы коронаровирусной инфекции, что свидетельствует о повреждении печени через прямое инфицирование холангиоцитов, поскольку антиген SARS-CoV-2 связывается с рецепторами ACE 2 холангиоцитов.

Патофизиология SARS-CoV-2 сложна и затрагивает несколько органов и систем, однако осложнения со стороны сердечно-легочной системы очень серьезны. [50]. Растущее число клинически изученных случаев инфекции SARS-CoV-2 продемонстрировало, что этот вирус поражает легочную систему, вызывая тяжелую дыхательную недостаточность [50 , 52], а также вызывает внелегочные клинические проявления [51 , 53 , 54].

Данные рентгенологической картины легких были следующими: через 3 и более месяцев на КТ легких у 52(16,66%) пациентов присутствовал фиброз легких, у 42(13,46%) - лимфоаденопатия, у 40(12,8%) - бронхэкстазы и буллезные изменения, которые не регистрировались ранее.

Таблица 5 - Состояние легких по данным спирографии и компьютерной томографии в постковидном периоде

Диагноз	Количество пациентов 312,%
1	2
Патологии дыхательной системы (нарушение вентиляционной функции легких)	218 (69,8%)
по рестриктивному типу (спирография)	118(37,82%)
по обструктивному типу (спирография)	8 (2,56%)
пневмофиброз легких (по КТ легких)	52(16,66%)
бронхэкстазы и буллезные изменения (по КТ легких)	40(12,8%)
лимфоаденопатия (по КТ легких)	37(11,85%)

COVID-19 имеет по крайней мере пять общепринятых патофизиологических механизмов, влияющих на миокард:

1. Разрыв атеросклеротической бляшки, наблюдаемый при инфаркте миокарда I типа [71, 72, 73, 74];
2. Дисбаланс между поставкой и потреблением кислорода миокардом при инфаркте миокарда II типа [71]. Из этого второго типа инфаркта можно описать четыре конкретных механизма, связанных с COVID-19, которые кажутся важными: фиксированный коронарный атеросклероз, ограничивающий перфузию миокарда, эндотелиальная дисфункция в коронарной микроциркуляции, тяжелая системная гипертензия, возникающая в результате высоких уровней циркулирующего Ang II, и интенсивная

вазоконстрикция артериол и гипоксемия в результате острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) или тромбоза легочных сосудов *in situ*;

3. Генерализованная инфекция (сепсис);

4. Повреждение легких;

5. Дыхательная недостаточность, связанная с тяжелым физиологическим стрессом, который может быть связан с повышением биомаркеров напряжения и повреждения миокарда [75,76].

Таблица 6 - Результаты функционального теста 6 минутной ходьбы.

Классы	Количество пациентов – 312
1	2
0 ФК (550м и более)	189 (60%)
1 ФК (426-550м)	30 (9,6%)
2 ФК (301-425м)	72 (23,07%)
3 ФК (151-300м)	17 (5,44%)
4 ФК (менее 150м)	4 (1,28%)

Исследования по функциональному тест с 6 минутной ходьбой показали, что 39,4% обследованных пациентов отмечали снижение толерантности к физической нагрузке и находились в функциональном классе сердечной недостаточности от 1 ФК - 4 ФК, из них у 4 пациентов отмечалось снижение насыщение кислородом и появление одышки. У 10 пациентов выявлено прогрессирование периферического атеросклероза, подтвержденных инструментальными ультразвуковым исследованием брахиоцефальных сосудов, артерий и вен нижних конечностей, которые были подтверждены на КТ ангиографии. У 135 (43,27 %) пациентов усиlena и/или заменена гипотензивная терапия, в связи с резистентностью к применяемым препаратам по артериальной гипертензии. У 20 пациентов впервые диагностировано повышение артериального давления. По суточному мониторингу ЭКГ выявлены у 16 (5,12%) пациентов следующие нарушение ритма: полная блокада левой ножки пучка Гиса, АВ блокада 2 стадии - 5 пациентов; нарушение ритма по типу фибрилляции предсердий – 2 пациентов, желудочковая и наджелудочковая экстрасистолия различной степени градации - 9 пациентов. На электрофизиологическое исследование направлен 1 пациент, на имплантацию CRTD 1 пациент. По результатам скринингового исследования эхокардиографии систолическая функция левого желудочка была сниженной у 4 пациентов, ранее у этих пациентов патологии сердечно-сосудистой системы не отмечались.

Наиболее оптимальным, неинвазивным, а также доступным методом диагностики систолической функции левого желудочка является трансторакальная эхокардиография. В

своем исследовании мы использовали диагностику сократимости миокарда левого желудочка с помощью измерения фракции выброса по методу Симпсона и продольной деформации миокарда с помощью спекл-трекинг эхокардиографии.

Нами получены следующие эхокардиографические изменения продольной деформации миокарда у 76 пациентов с постковидным синдромом: фракция выброса левого желудочка была сохранной у 67 пациентов (88%), сниженной у 9 пациентов (12%). Глобальная продольная деформация миокарда была сохранной у 32 пациентов (43%), сниженной у 44 пациентов (57%).

Таблица 7 - Показатели данных эхокардиографии продольной деформации миокарда

Характеристики	Количество пациентов – 76
1	2
Возраст	54,6 (30-83 лет)
Мужской пол	46/76 (61%)
Женский пол	30/76 (30%)
ФВ ЛЖ <54%	9/76 (12%)
ФВ ЛЖ >54%	67/76 (88%)
Global longitudinal Strain <18%	44/76 (57%)
Global longitudinal Strain >18%	32/76 (43%)

Из 76 исследуемых пациентов у 67 (88%) была сохранная фракция выброса левого желудочка по данным метода Симпсона, у 9 пациентов (12%) фракция выброса была снижена. Согласно нормативам нормальных значений глобальной продольной деформации миокарда левого желудочка по спекл-трекинг эхокардиографии из 76 исследуемых пациентов 32 (43%) имели значение выше 18%. В то время как 44 пациента (57%) имели значения продольной деформации миокарда ниже 18%, что говорит о том, что достоверность спекл-трекинг эхокардиографии в диагностике систолической дисфункции миокарда левого желудочка значительно выше, чем измерение фракции выброса.

Цепочка иммунологических событий, связанных с SARS-CoV-2, характеризуется развитием адаптивного иммунитета (опосредованного Т- и В-лимфоцитами) к вирусу [77,78]. Помимо понимания иммунного ответа на COVID-19, ассоциация симптомов с аутоиммунными заболеваниями предполагает, что SARS-CoV-2 может вызывать вторичные заболевания, связанные с временным профилем иммуносупрессии и присутствием вируса [79,80]. Патофизиология инфекции, вызванной COVID-19, включает несколько основных органических систем для поддержания гомеостаза [81]. Прямое воздействие гипервоспаления SARS-CoV-2 вызывает выработку эндогенных химических веществ, которые способствуют нарушению гемостаза сосудов [82]. На свертываемость

крови напрямую влияет высвобождение прокоагулянтов и провоспалительных цитокинов [83], которые активируют диссеминацию внутрисосудистого свертывания и формирование тромбоэмбологических состояний, которые могут агрессивно влиять на различные ткани, которые более чувствительны к ишемическим процессам, например, на ткани легких, сердца и цереброваскулярные ткани [84].

У практических всех (94,5%) пациентов отмечался тромбоцитоз, повышенный уровень фибриногена, как признак продолжающегося постковидного воспалительного процесса, около 85% пациентов принимали после коронавирусной инфекции стандартный протокол антикоагулянтной, антитромбоцитарной терапии длительностью до одного месяца, кроме пациентов с сопутствующей патологией, требующей назначения антиагрегантов. Данные изменения говорят о необходимости более длительного применения антитромбоцитарных препаратов, антикоагулянтов у данной группы пациентов, под пристальным мониторингом количества тромбоцитов и свертывающей системы крови.

Мы сравнили данные гемостаза и некоторых иммунологических показателей 80 пациентов с постковидным синдромом до лечения и после лечения на 60 сутки.

Установлено, что в общем анализе крови существенных изменений не наблюдалось в обеих исследуемых группах, независимо от полученной терапии. (Таблица 8) В то время как по данным иммунологического исследования крови наблюдалось снижение популяции CD 19 лимфоцитов в основной группе в сравнении с контрольной 10.4 (4.6) vs 10.3 (6.2), повышение популяции CD 3 лимфоцитов в основной группе в сравнении с контрольной 66.2 (12.8) vs 67.9 (10.0).

Таблица 8 - Гематологические и иммунологические характеристики пациентов с COVID-19 в зависимости от типа лечения.

Значения	Исходные		На 60 день	
	Контроль N=82	Лечение N=80	Контроль N=82	Лечение N=80
1	2	3	4	5
WBC, $10^9/L$, mean (sd)	5.9 (1.4)	6.1 (1.6)	6.2 (1.6)	6.2 (1.2)
RBC, $10^{12}/L$, mean (sd)	4.7 (0.7)	4.9 (0.6)	4.7 (0.4)	4.8 (0.4)
Hb, g/L, mean (sd)	133.6 (16.1)	141.0 (18.7)	132.0 (16.0)	137.3 (15.6)
Ht, %	40.8 (4.1)	42.4 (4.8)	40.4 (4.0)	41.4 (3.73)
Plt, $10^9/L$, mean (sd)	264.9 (57.7)	263.7 (59.7)	257.6 (62.2)	270.5 (62.0)
Neutrophile, $10^9/L$, mean (sd)	3.3 (1.0)	3.4 (1.3)	3.4 (1.2)	3.3 (1.0)

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5
Lymphocytes, $10^9/L$, mean (sd)	2.0 (0.5)	2.1 (0.6)	2.0 (0.5)	2.1 (0.5)
Monocytes, $10^9/L$, mean (sd)	0.5 (0.2)	0.5 (0.1)	0.5 (0.2)	0.5 (0.1)
Eosinophyles, $10^9/L$, mean (sd)	0.2 (0.2)	0.1 (0.09)	0.2 (0.1)	0.2 (0.1)
Basophiles, $10^9/L$, mean (sd)	0.03 (0.02)	0.03 (0.02)	0.03 (0.02)	0.04 (0.02)
CD3, mean (sd)	67.1 (13.3)	59.7 (23.7)	67.9 (10.0)	66.2 (12.8)
CD4, mean (sd)	44.9 (51.0)	37.7 (7.3)	34.2 (8.3)	35.3 (8.6)
CD8, mean (sd)	25.8 (8.1)	25.5 (9.1)	28.2 (9.4)	28.1 (9.6)
CD19, mean (sd)	12.0 (6.8)	21.2 (13.6)	10.3 (6.2)	10.4 (4.6)

У 287 пациентов (91,98%) на основании иммуноферментных анализов и полимеразной цепной реакции выявлен иммуноглобулины G к цитомегаловирусу, вирусу простого герпеса и вирусу Эбштейн-Барра при отсутствии в анамнезе ранее подтвержденных лабораторными тестами. Наличие иммуноглобулинов G к вирусам семейства гриппа, дает нам предложить возможное дополнительное инфицирование ими респондентов вовремя или сразу после перенесенной коронаровирусной инфекции в связи снижением иммунитета. У 20 пациентов сохранялись IgM цитомегаловируса и вируса Эбштейна-Барра, что подтверждает данные о том, что цитомегаловирусная инфекция и ВЭБ является негативным фактором риска для клинического исхода после инфекции SARS-CoV-2. У 9 (2,88%) пациентов сохраняется высокий титр IgM антител к SARS Cov-2 несмотря на давность перенесенной коронавирусной инфекции более 3-х месяцев.

Большинство пациентов отмечали низкий нутритивный статус и дефицит витаминов группы Д, В и микроэлементов, несмотря на профилактический прием витаминных комплексов. Дефицит витамина D наблюдался у 197 (63%) пациентов, дефицит витамина B12 у 24 (7%) пациентов, несмотря на применение профилактических доз витаминов и микроэлементов большей половиной всех респондентов.

Помимо физических патологий, пандемия COVID-19 стала тяжелым бременем для ментального здоровья населения мира [85, 86, 87]. Карантин и самоизоляция были основными мерами, принятыми для предотвращения распространения болезни, что привело к резкому изменению образа жизни людей [86], вызвав панику и тревогу у значительного числа людей [85]. Скудные данные о психических изменениях после перенесенной болезни COVID-19, требуют дальнейших наблюдений.

У 190 (60%) обследованных пациентов присутствовали когнитивные симптомы, различной степени астении, тревожные признаки депрессии и склонность к паническим атакам. У 244(78,2%) исследуемых пациентов по результатам анкетирования наблюдалась умеренная и выраженная усталость и утомляемость и дополнительно нуждались в психотерапии и медикаментозной поддержке. Они были направлены на консультацию к психотерапевту, в группы психологической поддержки.

Наше исследование полностью подтверждают данные Международного консорциума тяжелых острых респираторных и возникающих инфекций (ISARIC) среди людей, госпитализированных с COVID-19. Результаты их исследования показало, что преобладающими симптомами являются усталость и одышка, о которых сообщили 77% и 54% респондентов соответственно. Более половины участников этого исследования сообщили, что не чувствовали себя полностью излеченными от COVID-19 в среднем через семь месяцев. Данные свидетельствуют о том, что психологические симптомы также распространены, и люди могут иметь повышенный риск проблем с психическим здоровьем после заражения COVID-19. Таким образом, длительный COVID может выводить из строя и влиять на трудоспособность людей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пандемия COVID-19 привлекла внимание к тому факту, что инфекции являются и остаются единственной неизбежной, непредсказуемой и катастрофической медицинской угрозой для человечества, способные убить сотни тысяч людей в течение небольшого периода времени. Сложившаяся в мире ситуация в целом должна заставить задуматься об альтернативном подходе к изучению инфекционных заболеваний.

Главным вопросом остается механизм высокой индивидуальной клинической вариабельности иммунной реакции на восприимчивость к коронавирусной инфекции COVID-19 и степень тяжести ее течения от бессимптомных случаев до высокой смертности среди населения. До сих пор влияние генетики хозяина на индивидуальную восприимчивость COVID-19 было в значительной степени недооценено. Полногеномные исследования помогут выявить генетические особенности пациентов с лонг/постковидным синдромом для выявления потенциальных предикторов тяжести, прогнозирования течения и исходов заболевания. Полученные данные помогут усилить контроль текущей угрозы коронавирусной инфекции COVID-19 среди населения и развить инфраструктуру, необходимой для предотвращения будущих угроз.

Проведен информационный анализ опубликованных исследований по изучению влияния роли генетики хозяина при иммунном ответе к восприимчивости и тяжести течения коронавирусной инфекции (COVID-19). Были проанализированы статьи по тематике проекта по базам данных библиотек, онлайн библиотек (Medline, PubMed, Thomson Reuters) и др.

За отчетный период была собрана выборка (кровь) 413 пациента подтвержденным положительным диагнозом коронавирусной инфекции. Из образцов выделена ДНК. Все ДНК имеют высокую концентрацию (100-600 нг/мкл) и чистоту (1.8 нм). Проведена оценка иммунологических параметров в сыворотке крови с определением уровней множественных цитокинов и хемокинов/иммуноглобулинов мультиплексным иммуноанализом у пациентов в острый период (1 точка). Исследуемые внутри групп были дифференцированы по гендерному признаку. Антропометрические данные указывают на более высокую частоту встречаемости коронавирусной инфекции среди пациентов женского пола.

Дополнительно проведен ретроспективный анализ 239 пациентов медицинских карт пациентов, госпитализированных в инфекционный стационар в период май – август 2020 года с клиническим диагнозом COVID-19 в острой фазе. Целью анализа было получить предварительные результаты клинико – функциональных особенностей тяжести заболевания и определение предикторов смертности. Были получены важные данные о

предикторах смертности, такие как возраст, частота дыхания и CRP были независимыми предикторами смертности в нашей исследуемой когорте.

Также важной частью нашего исследования стал анализ 312 обследованных пациентов с постковидным синдромом и оценены влияние перенесенной SARS CoV-2 на исходы течения заболевания.

Таким образом, запланированные задачи на 2021 год выполнены в полном объеме.

По теме работы опубликована одна и подана одна международные статьи.

На следующий год планируется проведение последующих этапов данного научного исследования: генетические и иммунологические исследования согласно поставленным задачам.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Суспицын Е.Н., Скрипченко Е.Ю., Имянитов Е.Н., Скрипченко Н.В. Генетика предрасположенности к инфекционным заболеваниям // Журнал инфектологии. – 2017. - №9.-С. 40-46.
2. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance // Nature. – 2009. – Vol. 461. – P. 399-401.
3. Zhang F, Liu H, Chen S, et al. Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy // Nat Genet. – 2011. - Vol.43. – P. 1247-51.
4. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease // Nature. – 2012. - Vol.491. – P. 119-24.
5. Thye T, Owusu-Dabo E, Vannberg FO, et al. Common variants at 11p13 are associated with susceptibility to tuberculosis // Nat Genet. – 2012. - Vol.44. – P. 257-9.
6. Abel L, Alcaïs A, Schurr E. The dissection of complex susceptibility to infectious disease: bacterial, viral and parasitic infections // Curr Opin Immunol. – 2014. – Vol.30. – P.72-78.
7. World Health Organization. Novel coronavirus – China 2020. www.who.int/csr/don/12-january-2020-novel-coronavirus-china/en/. Accessed 11 Oct 2021.
8. de Wit E., van Doremalen N., Falzarano D. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses // Nat. Rev. Microbiol. – 2016. – Vol. 14. – P. 523–534. doi: 10.1038/nrmicro.2016.81.
9. Liu D Cui P Zeng S et al. Risk factors for developing into critical COVID-19 patients in Wuhan, China: a multicenter, retrospective, cohort study // EClinicalMedicine. – 2020. - Vol.25 <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100471>.
10. Yegorov, S., Goremykina, M., Ivanova, R., Good, S. V., Babenko, D., Shevtsov, A., Zhunussov, Y. Epidemiology, clinical characteristics, and virologic features of COVID-19 patients in Kazakhstan: A nation-wide retrospective cohort study // The Lancet Regional Health. – 2021. doi:10.1016/j.lanepe.2021.100096.
11. Brest, P., Refae, S., Mograbi, B., Hofman, P., Milano, G. Host Polymorphisms May Impact SARS-CoV-2 Infectivity // Trends in Genetics. – 2020. doi:10.1016/j.tig.2020.08.003.
12. Shang J., Ye G., Shi K. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2 // Nature. - 2020. – Vol. 581. – P. 221–224.
13. Perlman S. J. Netland Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis // Nat. Rev. Microbiol. – 2009. – Vol. 7. – P. 439–450. doi: 10.1038/nrmicro2147.

14. Belouzard S., Chu V.C., Whittaker G.R. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 2009. – Vol. 106. – P. 5871–5876. doi: 10.1073/pnas.0809524106.
15. Wang H., Yang P., Liu K. SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway // *Cell Res.* – 2008. – Vol. 18.- P. 290–301. doi: 10.1038/cr.2008.15.
16. Ahmed-Hassan, H., Sisson, B., Shukla, R. K., Wijewantha, Y., Funderburg, N. T., Li, Z. Liyanage, N. P. M. Innate Immune Responses to Highly Pathogenic Coronaviruses and Other Significant Respiratory Viral Infections // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. doi:10.3389/fimmu.2020.01979.
17. Pya, Y. V., Bekbossynov, S. T., Bekbossynova, M. S., Medressova, A. T., Andossova, S. A., Dzhetybayeva, S. K., Novikova, S. P. New mechanical circulatory support devices as an alternative to the heart transplantation in end-stage heart failure patients // *Clinical and Experimental Surgery*. – 2017. – Vol. 5. – P. 7-14.
18. Liu J., Wu P., Gao F. Novel immunodominant peptide presentation strategy: a featured HLA-A*2402-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope stabilized by intrachain hydrogen bonds from severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein // *J. Virol.* - 2010.- Vol. 84. – P. 11849–11857. doi: 10.1128/JVI.01464-10.
19. Li G., Chen X., Xu A. Profile of specific antibodies to the SARS-associated coronavirus // *N. Engl. J. Med.* - 2003. – Vol. 349. – P. 508–509. doi: 10.1056/NEJM200307313490520.
20. Li, X., Geng, M., Peng, Y., Meng, L., Lu, S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19 // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2020. – Vol. 10. – P. 102–108.
21. Zhao J., Li K., Wohlford-Lenane C. Rapid generation of a mouse model for Middle East respiratory syndrome // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2014. – Vol. 111. – P. 4970–4975.
22. Xu Z., Shi L., Wang Y. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome // *Lancet Resp. Med.* – 2020. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X.
23. Severe Covid-19 GWAS Group et al. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure // *N. Engl. J. Med.* – 2020. – Vol.383. – P. 1522–1534.
24. COVID-19 Host Genetics Initiative. The COVID-19 Host Genetics Initiative, a global initiative to elucidate the role of host genetic factors in susceptibility and severity of the SARS-CoV-2 virus pandemic // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2020. – Vol. 28. – P. 715–718.

25. Xiao, G. et al. CXCL16/CXCR6 chemokine signaling mediates breast cancer progression by pERK1/2-dependent mechanisms // *Oncotarget*. - 2015. – Vol. 6. – P. 14165–14178.
26. Casanova JL, Su HC, Effort CHG. A global effort to define the human genetics of protective immunity to SARS-CoV-2 infection // *Cell*. – 2020. – Vol.181. – P.1194–99.
27. Heurich A. TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein // *J. Virol.* - 2014. – Vol.88.- P.1293–1307.
28. Benetti E, Tita R, Spiga O, et al. ACE2 variants underlie interindividual variability and susceptibility to COVID-19 in Italian population // *medRxiv*. - 2020. doi: 10.1101/2020.04.03.20047977.
29. Stawiski EW, Diwanji D, Suryamohan K, et al. Human ACE2 receptor polymorphisms predict SARS-CoV-2 susceptibility // *bioRxiv*. - 2020. doi: 10.1101/2020.04.07.024752.
30. Pinto BG, Oliveira AE, Singh Y, et al. ACE2 expression is increased in the lungs of patients with comorbidities associated with severe COVID-19 // *medRxiv*. - 2020. doi: 10.1101/2020.03.21.20040261.
31. Russo R, Andolfo I, Lasorsa VA, Iolascon A, Capasso M. Genetic analysis of the novel SARS-CoV-2 host receptor *TMPRSS2* in different populations // *bioRxiv*. - 2020. doi: 10.1101/2020.04.23.057190.
32. Asselta R, Paraboschi EM, Mantovani A, Duga S. ACE2 and TMPRSS2 variants and expression as candidates to sex and country differences in COVID-19 severity in Italy // *medRxiv*. - 2020. doi: 10.1101/2020.03.30.20047878
33. Monreal, E., Sainz de la Maza, S., Fernández-Velasco, J. I., Natera-Villalba, E., Rita, C. G., Villar, L. M. The Impact of Immunosuppression and Autoimmune Disease on Severe Outcomes in Patients Hospitalized with COVID-19 // *Journal of Clinical Immunology*. – 2020. – Vol.41. – P. 315–323. doi:10.1007/s10875-020-00927-y.
34. Maxim Shkurnikov, Stepan Nersisyan, Tatjana Jankevic, Alexei Galatenko, Ivan Gordeev, Valery Vechorko and Alexander Tonevitsky Association of HLA Class I Genotypes with Severity of Coronavirus Disease-19 // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 1-12.
35. Kratzer B, Trapin D, Ettel P, Körmöczi U, Rottal A, Tuppy F, et al. Immunological imprint of COVID-19 on human peripheral blood leukocyte populations // *Allergy*. - 2020. doi: 10.1111/all.14647.

36. Gattinger P, Borochova K, Dorofeeva Y, Henning R, Kiss R, Kratzer B, et al. Antibodies in serum of convalescent patients following mild COVID-19 do not always prevent virus-receptor binding // Allergy. - 2020. doi: 10.1111/all.14523.
37. Iturrieta-Zuazo I, Rita CG, García-Soidán A, de Malet Pintos-Fonseca A, Alonso-Alarcón N, Pariente-Rodríguez R, et al. Possible role of HLA class-I genotype in SARS-CoV-2 infection and progression: a pilot study in a cohort of Covid-19 Spanish patients // Clin Immunol. – 2020. – Vol. 219. doi: 10.1016/j.clim.2020.108572.
38. Keicho N., Itoyama S., Kashiwase K. Association of human leukocyte antigen class II alleles with severe acute respiratory syndrome in the Vietnamese population // *Hum. Immunol.* – 2009. – Vol. 70. – P. 527–531. doi: 10.1016/j.humimm.2009.05.006.
39. Pisanti S, Deelen J, Gallina AM, Caputo M, Citro M, Abate M, et al. Correlation of the two most frequent HLA haplotypes in the Italian population to the differential regional incidence of Covid-19 // J Transl Med. – 2020. – Vol.18. - P352. doi: 10.1186/s12967-020-02515-5.
40. Nguyen A, David JK, Maden SK, et al. Human leukocyte antigen susceptibility map for SARS-CoV-2 // *J Virol.* – 2020. – Vol. 94. – P. e00510–20.
41. Costa-Pereira A.P., Williams T.M., Strobl B., Watling D., Briscoe J., Kerr I.M. The Antiviral Response to Gamma Interferon // *J. Virol.* – 2002. – Vol. 76. – P. 9060–8.
42. Sainz B., Mossel E.C., Peters C.J., Garry R.F. Interferon-beta and interferon-gamma synergistically inhibit the replication of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) // *Virology.* – 2004. – Vol. 329. – P. 11–7.
43. Lau YL, Peiris JS. Association of cytokine and chemokine gene polymorphisms with severe acute respiratory syndrome // *Hong Kong Med J.* – 2009. – Vol. 15(Suppl 2). – P.43-46.
44. Niemeyer D., Zillinger T., Muth D. Middle East respiratory syndrome coronavirus accessory protein 4a is a type I interferon antagonist // *J. Virol.* – 2013. – Vol. 87. – P.12489–12495. doi: 10.1128/JVI.01845-13.
45. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China // *Intensive Care Med.* – 2020. – Vol 46. – P. 846-848.
46. Puja Mehta, McAuley Daniel F., Michael Brown, Emilie Sanchez, Tat-tersall Rachel S., Manson Jessica J. COVID-16: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression // *Lancet.* - 2020. – Vol. 395. – P.1033–034.

47. Ulhaq ZS, Soraya GV. Anti-IL-6 Receptor Antibody Treatment for Severe COVID-19 and the Potential Implication of IL-6 Gene Polymorphisms in Novel Coronavirus Pneumonia // *Medicina Clinica*. – 2020. doi: 10.1016/j.medcli.2020.07.002.
48. Kirtipal N, Bharadwaj S. Interleukin 6 polymorphisms as an indicator of COVID-19 severity in humans // *J Biomol Struct Dyn*. – 2020. – P. 1-4. doi:10.1080/07391102.2020.
49. Sanjuan R, Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation // *Cell Mol Life Sci*. - 2016. -Vol. 73. – P. 4433-4448.
50. Forster P, Forster L, Renfrew C, Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2020. – Vol. 117. – P.9241-9243.
51. The Nextstrain Team. Genomic epidemiology of novel coronavirus-Global sampling. <https://nextstrain.org/ncov/global> 2020. Accessed 11 Oct 2021.
52. Becerra-Flores M, Cardozo T. SARS-CoV-2 viral spike G614 mutation exhibits higher case fatality rate // *Int J Clin Pract*. - 2020. – Vol.7. doi: 10.1111/ijcp.13525.
53. Pachetti M, Marini B, Benedetti F, et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant // *J Transl Med*. – 2020. – Vol.18. – P. 179.
54. Jia Y, Shen G, Zhang Y, et al. Analysis of the mutation dynamics of SARS-CoV-2 reveals the spread history and emergence of RBD mutant with lower ACE2 binding affinity // *bioRxiv*. - 2020. doi:10.1101/2020.04.09.034942.
55. Ou J, Zhou Z, Dai R, et al. Emergence of RBD mutations in circulating SARS-CoV-2 strains enhancing the structural stability and human ACE2 receptor affinity of the spike protein // *bioRxiv*. - 2020. doi:10.1101/2020.03.15.991844.
56. Yegorov S, Goremykina M, Ivanova R, Good S, Babenko D, Shevtsov A et al. Epidemiology, clinical characteristics, and virologic features of COVID-19 patients in Kazakhstan: A nation-wide retrospective cohort study. *The Lancet Regional Health - Europe*. 2021;4:100096.
57. Karadag E. Increase in COVID-19 cases and case-fatality and case-recovery rates in Europe: A cross-temporal meta-analysis. *Journal of Medical Virology*. 2020;92(9):1511-1517. doi: 10.1002/jmv.26035. Epub 2020 Jun 2.
58. Bellan M, Patti G, Hayden E, Azzolina D, Pirisi M, Acquaviva A et al. Fatality rate and predictors of mortality in an Italian cohort of hospitalized COVID-19 patients. *Scientific Reports*. 2020;10(1).
59. Mesas A, Cavero-Redondo I, Álvarez-Bueno C, Sarriá Cabrera M, Maffei de Andrade S, Sequí-Dominguez I et al. Predictors of in-hospital COVID-19 mortality: A

comprehensive systematic review and meta-analysis exploring differences by age, sex and health conditions. PLOS ONE. 2020;15(11):e0241742. doi: 10.1371/journal.pone.0241742.

60. Peckham H, de Gruijter N, Raine C, Radziszewska A, Ciurtin C, Wedderburn L et al. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. Nature Communications. 2020;11(1):6317. doi: 10.1038/s41467-020-19741-6.

61. Ponti G, Maccaferri M, Ruini C, Tomasi A, Ozben T. Biomarkers associated with COVID-19 disease progression. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2020;57(6):389-399. doi: 10.1080/10408363.2020.1770685.

62. Bienvenu L, Noonan J, Wang X, Peter K. Higher mortality of COVID-19 in males: sex differences in immune response and cardiovascular comorbidities. Cardiovascular Research. 2020;116(14):2197-2206. doi: 10.1093/cvr/cvaa284.

63. Tian W, Jiang W, Yao J, Nicholson C, Li R, Sigurslid H et al. Predictors of mortality in hospitalized COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. Journal of Medical Virology. 2020;92(10):1875-1883. doi: 10.1002/jmv.26050.

64. Chilimuri S, Sun H, Alemam A, Manthri N, Shehi E, Tejada J et al. Predictors of Mortality in Adults Admitted with COVID-19: Retrospective Cohort Study from New York City. Western Journal of Emergency Medicine. 2020;21(4):779-784. doi: 10.5811/westjem.2020.6.47919.

65. Henry B, de Oliveira M, Benoit S, Plebani M, Lippi G. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2020;58(7):1021-1028. doi: 10.1515/cclm-2020-0369.

66. Belfort DdSP, Biselli B, Ávila MS, et al., COVID-19 complicating perioperative management of LVAD implantation: a case report and systematic review. J Card Surg. 2021;36:3405–3409 <https://doi.org/10.1111/jocs.15690>

67. Zhipeng Y., Ming Y., Ching-Lung L., Long COVID-19 Syndrome: A Comprehensive Review of Its Effect on Various Organ Systems and Recommendation on Rehabilitation Plans. Biomedicines 2021, 9, 966.

68. Greenhalgh T., Knight M., A'Court C., Buxton M., Husain L. Management of post-acute COVID-19 in primary care. BMJ 2020, 370, m3026 (5)

69. Audrey C.H., Murray B., Varsavsky T., Graham M.S., Penfold R.S., Bowyer R.S., Pujol J.C., Klaser K., Antonelli M., Canas L.S. et al. Attributes and predictors of long COVID. Nat. Med. 2021, 27, 626-631 (6)

70. British Society for immunology. Long-term immunological health consequences of Covid-19. Report, August 2020, 3-5.

71. Varga, Z.; Flammer, A.J.; Steiger, P.; Haberecker, M.; Andermatt, R.; Zinkernagel, A.S.; Mehra, M.R.; Schuepbach, R.A.; Ruschitzka, F.; Moch, H. Endothelial cell infection and endotheliitis in Covid-19. *Lancet* **2020**, *395*, 1417–1418.
72. Thygesen, K.; Alpert, J.S.; Jaffe, A.S.; Chaitman, B.R.; Bax, J.J.; Morrow, D.A.; White, H.D.; Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology/American Heart Association/World Heart Federation Task Force for the Universal Definition of Myocardial, I. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Circulation* **2018**, *138*, e618–e651.
73. Van de Veerdonk, F.L.; Netea, M.G.; Dinarello, C.A.; Joosten, L.A. Inflammasome activation and il-1beta and il-18 processing during infection. *Trends Immunol.* **2011**, *32*, 110–116.
74. Vallance, P.; Collier, J.; Bhagat, K. Infection, inflammation, and infarction: Does acute endothelial dysfunction provide a link? *Lancet* **1997**, *349*, 1391–1392.
75. Bermejo-Martin, J.F.; Almansa, R.; Torres, A.; Gonzalez-Rivera, M.; Kelvin, D.J. Covid-19 as a cardiovascular disease: The potential role of chronic endothelial dysfunction. *Cardiovasc. Res.* **2020**, *116*, e132–e133.
76. Sarkisian, L.; Saaby, L.; Poulsen, T.S.; Gerke, O.; Jangaard, N.; Hosbond, S.; Diederichsen, A.C.; Thygesen, K.; Mickley, H. Clinical characteristics and outcomes of patients with myocardial infarction, myocardial injury, and nonelevated troponins. *Am. J. Med.* **2016**, *129*, 446.e5–446.e21.
77. Canas, C.A. The triggering of post-Covid-19 autoimmunity phenomena could be associated with both transient immunosuppression and an inappropriate form of immune reconstitution in susceptible individuals. *Med. Hypotheses* **2020**, *145*, 110345.
78. Loarce-Martos, J.; Garcia-Fernandez, A.; Lopez-Gutierrez, F.; Garcia-Garcia, V.; Calvo-Sanz, L.; Del Bosque-Granero, I.; Teran-Tinedo, M.A.; Boteanu, A.; Bachiller-Corral, J.; Vazquez-Diaz, M. High rates of severe disease and death due to sars-cov-2 infection in rheumatic disease patients treated with rituximab: A descriptive study. *Rheumatol. Int.* **2020**, *40*, 2015–2021. Haberman, R.H.; Castillo, R.; Chen, A.; Yan, D.; Ramirez, D.; Sekar, V.; Lesser, R.; Solomon, G.; Neumann, A.L.; Blank, R.B.; et al. Covid-19 in patients with inflammatory arthritis: A prospective study on the effects of comorbidities and disease-modifying antirheumatic drugs on clinical outcomes. *Arthritis Rheumatol.* **2020**, *72*, 1981–1989.
79. Sadanandam, A.; Bopp, T.; Dixit, S.; Knapp, D.; Emperumal, C.P.; Vergidis, P.; Rajalingam, K.; Melcher, A.; Kannan, N. A blood transcriptome-based analysis of disease progression, immune regulation, and symptoms in coronavirus-infected patients. *Cell Death Discov.* **2020**, *6*, 141.

80. Jin, Y.; Ji, W.; Yang, H.; Chen, S.; Zhang, W.; Duan, G. Endothelial activation and dysfunction in Covid-19: From basic mechanisms to potential therapeutic approaches. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 293.
81. Liu, P.P.; Blet, A.; Smyth, D.; Li, H. The science underlying Covid-19: Implications for the cardiovascular system. *Circulation* **2020**, *142*, 68–78.
82. Zachariah, U.; Nair, S.C.; Goel, A.; Balasubramanian, K.A.; Mackie, I.; Elias, E.; Eapen, C.E. Targeting raised von willebrand factor levels and macrophage activation in severe Covid-19: Consider low volume plasma exchange and low dose steroid. *Thromb. Res.* **2020**, *192*, 2.
83. Giustino, G.; Pinney, S.P.; Lala, A.; Reddy, V.Y.; Johnston-Cox, H.A.; Mechanick, J.I.; Halperin, J.L.; Fuster, V. Coronavirus and cardiovascular disease, myocardial injury, and arrhythmia: Jacc focus seminar. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2020**, *76*, 2011–2023.
84. Bareeqa, S.B.; Ahmed, S.I.; Samar, S.S.; Yasin, W.; Zehra, S.; Monese, G.M.; Gouthro, R.V. Prevalence of depression, anxiety and stress in china during Covid-19 pandemic: A systematic review with meta-analysis. *Int. J. Psychiatry Med.* **2020**.
85. Burhamah, W.; AlKhayyat, A.; Oroszlanyova, M.; AlKenane, A.; Almansouri, A.; Behbehani, M.; Karimi, N.; Jafar, H.; AlSuwaidan, M. The psychological burden of the Covid-19 pandemic and associated lockdown measures: Experience from 4000 participants. *J. Affect. Disord.* **2020**, *277*, 977–985.
86. Luo, M.; Guo, L.; Yu, M.; Jiang, W.; Wang, H. The psychological and mental impact of coronavirus disease 2019 (Covid-19) on medical staff and general public—A systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Res.* **2020**, *291*, 113190.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Список опубликованных работ

1. Перечень опубликованных международных публикаций:

1.1 Bekbossynova, M., & Ainur, T. (2021). Hypertension as a manifestation of COVID-19 pneumonia. Clinical case reports, 9(9), e04720. <https://doi.org/10.1002/ccr3.4720> (Citescore 0.4 Scopus, 25й процентиль)

2. Перечень поданных на публикацию:

2.1. Polina Len, Gaukhar Iskakova, Zarina Sautbayeva, Aigul Kussanova, Ainura T. Tauekulova, Madina M. Sugralimova, Anara S. Dautbaeva, Meruert M. Abdieva, Eugene D. Ponomarev, Aleksander Tikhonov, Makhabbat S. Bekbossynova and Natasha S. Barteneva. Manuscript title: Meta-analysis of coagulation disbalances in COVID-19: 41 studies and 17601 patients, Manuscript ID: 794092, Journal: Frontiers in Cardiovascular Medicine, section Thrombosis, Article type: Original Research,

Submitted on: 13 Oct 2021 (Citescore 7.8 Scopus, 87й процентиль)



Received: 1 June 2021 | Revised: 29 July 2021 | Accepted: 2 August 2021
DOI: 10.1002/ccr3.4720

CASE REPORT

Clinical Case Reports Open Access

WILEY

Hypertension as a manifestation of COVID-19 pneumonia

Makhabbat Bekbossynova | Tauekelova Ainur

Non-commercial joint-stock company
National Research Center for Cardiac
Surgery, Nur-Sultan, Kazakhstan

Correspondence
Makhabbat Bekbossynova, Non-
commercial joint-stock company
National Research Center for
Cardiac Surgery, Nur-Sultan 010000,
Kazakhstan.
Emails: astanamaha@gmail.com;
cardiacsurgeryres@gmail.com

Funding information
There is no source of funding

Abstract

Several factors such as hypertension, bile duct disease, and age can affect the duration of COVID, which can lead to long COVID. Any course of coronavirus infection could have a diverse nature of clinical forms and should have a personalized approach.

KEY WORDS

arterial hypertension ACE2 receptors, case study, coronavirus infection, COVID-19 pneumonia, initial manifestation, long COVID syndrome, postviral inflammatory complications

1 | INTRODUCTION

This clinical case represents an unusual manifestation of COVID-19 pneumonia, which started as arterial hypertension. Several factors such as hypertension, bile duct disease, and age can affect the duration of Covid. An unusual manifestation of COVID-19 pneumonia can start with symptoms like arterial hypertension as was described in the case.

COVID-19 has become a serious problem in the world due to its rapid spread and high mortality rate. Since the pandemic, various manifestations of COVID-19 pneumonia have been described, ranging from classic acute respiratory viral infections to thromboembolic manifestations as the first signs of the disease.

Previously, the patient annually underwent an in-depth medical examination, including a study of the cardiovascular system. From the medical record, the correct sinus rhythm of the heart rate of 70 beats per minute was present on the electrocardiography; according to echocardiography, the global systolic function of the left ventricle was satisfactory, no violations of local myocardial contractility were detected, and the dimensions and cavities of the heart were not expanded. Prior to infection with SARS CoV-2, the patient did not have an increase in blood pressure. The acute phase of coronavirus infection debuted for the first time with arterial hypertension, other catarrhal phenomena, and symptoms of infection appeared on the 3–4 days of the disease.

The patient undergoes an annual screening examination, including an in-depth study of the cardiovascular system; no other risk factors were observed.

Elevated blood pressure values persisted for two days and were marked by ineffectiveness of antihypertensive drugs, specifically to valsartan at a dose of 80 mg two times a day. The volume of the lesion according to CT was 36% /Comment 1/.

On the third day, chills appeared, and the body temperature increased to 38.8 C.

2 | CASE HISTORY

A 57-year-old female patient, a healthcare worker at the hospital, started having headache and tinnitus together with an increase in blood pressure to 160/90 mm Hg. Hypertension and other chronic illness conditions were unremarkable in the past medical history.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
© 2021 The Authors. *Clinical Case Reports* published by John Wiley & Sons Ltd.

On the fourth day, elevated blood pressure persisted without a tendency to decrease. BP was 150/90 mm Hg mm. Saturation was 96%.

On the fifth day, PCR for COVID-19 was obtained, which gave a positive result, and on the lung computed tomography (CT), foci of infiltration of the pulmonary parenchyma of the "ground-glass" type, measuring up to 5.2–2.6 cm, were found. The volume of the lesion was 22% (Figure 1).

The patient was hospitalized with a diagnosis of coronavirus infection COVID-19 of moderate severity. PCR confirmed with bilateral polysegmental pneumonia.

2.1 | Investigations and treatment

On laboratory assessment, CBC showed neutropenia— $2.27 \cdot 10^6$ L (15–61), lymphopenia— $1.14 \cdot 10^6$, and anesomophilia. Biochemical analysis revealed an increased level of CRP—0.51 mg/dl, ferritin—373.6 mg/L, glucose—112.58 mg/dl, increased ALT—114.59 U/L, and AST—70.13 U/L with normal bilirubin levels. It should be noted that the patient had a history of cholecystectomy (1998) and therapy for opisthorchiasis of the bile duct two years ago. Immunological study showed an increase in interleukin – 6—22.17 pg/ml.

Based on the data obtained, therapy with low molecular weight heparins was started: enoxaparin (clexane) 0.4 ml b.i.d. The antiviral drug remdesivir was prescribed according to the following scheme: day one—200 mg IV, on the following days—100 mg IV for ten days. Also, humidified oxygen was supplied nasally at a flow rate of 5 L/min for seven days, due to increased oxygen consumption noted on ABG.

On day six of the disease (the second day of hospitalization), improvement in the patient's well-being was noted. Blood pressure reduced to 130/80 mm Hg on valsartan 160 mg per day. However, despite the ongoing therapy, body temperature up to 38 C lasted for five days and then persisted in the evening hours for up to 37.5 C for four more days. Laboratory tests showed that decrease in neutrophils - $1.65 \cdot 10^3$, and lymphocytes to $1.22 \cdot 10^3$ and anesomophilia persisted. In the biochemical analysis, there is

a slight decrease in liver function tests compared to the previous day, but the indicators remain elevated: ALT—94.8 U/L and AST—61.1 U/L. Also, an increase in CRP—1.032 mg/dl—and ferritin—484.1 µg/L—was observed.

2.2 | Outcome and follow-up

On the 11th day of hospitalization and the 16th day of illness, the patient's condition had stabilized, and the laboratory data continued to increase in the previous indicators: ALT 81.2 U/L, AST 38.6 U/L, CRP 2.793 mg/dl (0–0.5), and ferritin 473.1 µg/L. Normalization of neutrophils - $2.52 \cdot 10^3$, eosinophils - $2 \cdot 10^3$, but a sharp increase in platelets - $533 \cdot 10^9$ which could indicate the development of acute viral inflammatory syndrome. Lymphocytes in a relative amount - 41%. Immunogram: interleukin 6 - 29.70 pg/ml. PCR: RNA SARS-CoV-2 not detected (negative).

CT of the lungs (Figure 2) after a month of the disease showed improvement, the number of affected foci decreased, and the size of the infiltration has reduced.

3 | DISCUSSION

This case report once again points to the link between several risk factors and prognosis in patients with COVID-19, including hypertension, bile duct disease, and age.

Hypertension in adults is quite common, but due to the pandemic, it is of particular interest, since there are concerns that the virus uses ACE-2 receptor to enter host cells.¹

In this clinical case, the onset of COVID-19 began with arterial hypertension, in the absence of risk factors for arterial hypertension. It is noteworthy that clinical manifestation in the form of high blood pressure proceeded during the latent period of COVID-19. This is evidenced by the data of CT examination of the lungs and performed on the third day of the development of arterial hypertension. According to the CT scans, by this time, multiple ground-glass opacities and infiltrates, which are not early signs of pneumonia, have already

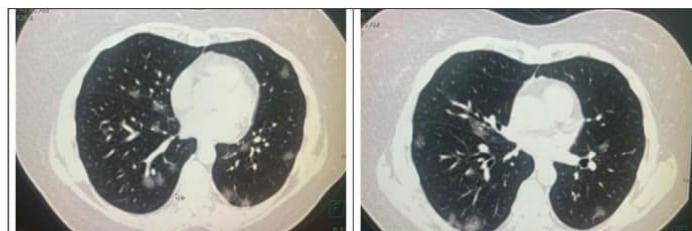
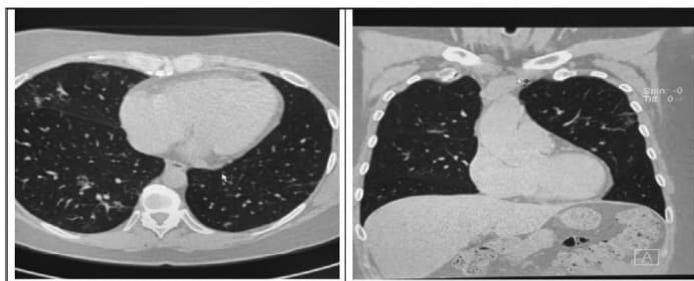


FIGURE 1 Lungs CT scan

FIGURE 2 CT after a month of the disease



been found. At the same time, in the first 48 hours of the incubation period, there were no other symptoms besides arterial hypertension. This fact confirms that the detected changes in the lungs developed before or simultaneously with an increase in blood pressure. Thus, this further confirms the hypothesis that the initial stage of infection is the penetration of SARS-CoV-2 into target cells with ACE2 receptors. However, some experimental studies have shown that ACE2 protects against lung damage.^{2,3}

Special attention should be paid to the short-term decrease in blood pressure in response to taking valsartan. At the same time, against the background of intensive treatment of pneumonia with remdesivir and ongoing hypotensive blood pressure, blood pressure returned to normal and the course of coronavirus infection did not worsen, although the effectiveness of any particular anti-viral drug for treating patients with severe COVID-19 has not been proven.^{4,5}

In addition, given the high transaminases—ALT, AST and normal indicators of other biochemical indicators of liver damage, such as bilirubin, alkaline phosphatase, and gamma-glutamyltransferase in the patient, the role of the virus in liver damage remains open and requires detailed systematic study. There are studies that the virus also uses ACE2 as an entry receptor and that both liver cells and bile duct cells express ACE2. However, the expression of ACE2 in the bile duct cells is much higher than in liver cells, but is similar to the level of alveolar 2 cells type in the lungs.⁶⁻⁸

Another aspect to be explored is a genetic predisposition to an increased risk of severe SARS-CoV-2 infection and development of complications, which may be related to the ACE2 polymorphism that has been associated with diabetes, cerebral stroke, and hypertension, especially in Asian populations. Summarizing this information, we can say that human sensitivity may be the result of a combination of therapy and ACE2 polymorphism.³

Although this case has some limitations, hypertension may be taken as one of the pre-clinical manifestation of

COVID-19, especially when it is not responding to treatment, but this cannot be generalized without further studies.

This case clearly indicates that several factors such as hypertension, bile duct disease, and age can affect the duration of COVID, which can lead to long COVID. Thus, this case clearly shows that any course of coronavirus infection could have a diverse nature of clinical forms and should have a personalized approach, taking into account risk factors and predictors, with the involvement of a multidisciplinary team to prevent long and post-COVID-19 syndromes.

In the context of the ongoing global pandemic, the emergence of new strains, and conflicting scientific data, clinicians have to use in daily practice in the fight against coronavirus infection treatment methods that do not currently have an evidence base, based on the clinical experience of the clinic and personal observations. To date, the presented therapy shows its effectiveness. In the future, we hope that with the accumulation of sufficient experience and knowledge, the level of evidence of these treatment methods will be determined.

ACKNOWLEDGMENTS

Published with written consent of the patient.

CONFLICT OF INTEREST

None.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Makhabbat Bekbossynova made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data. Tauekelova Ainur was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content.

ETHICAL APPROVAL

Ethics approval and consent were given by "Local Bioethics Committee" JSC "National Research Cardiac surgery Center," Reference number: 01-97/2021.

CONSENT FOR PUBLICATION

Written informed consent was obtained from the patient for publication of this case report and any accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the editor in chief of this journal.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. The pre-print version of your manuscript is available online at www.researchsquare.com/article/rs-467269/v1

ORCID

Makhabbat Bekbossynova  <https://orcid.org/0000-0003-3437-0512>

REFERENCES

1. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor recognition by the novel coronavirus from wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J Virol*. 2020;94(7):e0127-e220. doi:<https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20>
2. Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med*. 2020;46(4):586-590. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9>
3. Fang L, Karakiulakis G, Roth M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *Lancet Respir Med*. 2020;8(4):e21.
4. Norrie JD. Remdesivir for COVID-19: challenges of underpowered studies. *The Lancet*. 2020;395(10236):1525-1527. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31023-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31023-0)
5. McCreary EK, Angus DC. Efficacy of Remdesivir in COVID-19. *JAMA*. 2020;324(11):1041. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.16337>
6. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Krüger N, et al. The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-1 coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells. *bioRxiv*. in press. 2020. doi:<https://doi.org/10.1101/2020.01.31.929042>
7. Chai X, Hu L, Zhang Y, et al. Specific ACE2 expression in cholangiocytes may cause liver damage after 2019-nCoV infection. *bioRxiv*. 2020. doi:<https://doi.org/10.1101/2020.02.03.931766>
8. Banales JM, Huebert RC, Karlsem T, Strazzabosco M, LaRusso NF, Gores GJ. Cholangiocyte pathobiology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(5):269-281.

How to cite this article: Bekbossynova M, Ainur T. Hypertension as a manifestation of COVID-19 pneumonia. *Clin Case Rep*. 2021;00:e04720. <https://doi.org/10.1002/CCR3.4720>

Fwd: Independent Review Report Submitted - 794092

Mahabbat Mahabbat <astanamaha@gmail.com>
Кому: Research Department <cardiacsurgeryres@gmail.com>

29 октября 2021 г., 21:49

----- Пересылаемое сообщение -----

От: **Frontiers in Cardiovascular Medicine** <cardiovascularmedicine.editorial.office@frontiersin.org>
Дата: Пт, 29 окт. 2021 г. в 21:48
Тема: Independent Review Report Submitted - 794092
Кому: Makhabbat Bekbossynova <astanamaha@gmail.com>

Dear Dr Bekbossynova,

A new review report has been submitted by a Reviewer 2. Once the other Reviewer(s) have submitted their comments, you will be granted access to the reports in the review forum, so that you can begin your revisions. Please be ready to respond and revise your manuscript promptly when they do.

Please click here to access this manuscript directly:
<http://review.frontiersin.org/review/794092/0/0>

Manuscript title: Meta-analysis of coagulation disbalances in COVID-19: 41 studies and 17601 patients

Manuscript ID: 794092

Authors: Polina Len, Gaukhar Iskakova, Zarina Sautbayeva, Aigul Kussanova, Ainurra T. Taukekulova, Madina M. Sugralimova, Anara S. Dautbaeva, Meruert M. Abdieva,

Eugene D. Ponomarev, Aleksander Tikhonov, Makhabbat S. Bekbossynova and Natasha S. Barteneva

Journal: Frontiers in Cardiovascular Medicine, section Thrombosis

Article type: Original Research

Submitted on: 13 Oct 2021

Best regards,

Your Frontiers in Cardiovascular Medicine team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team
www.frontiersin.org
12 Moorgate,
EC2R 6DA, London, UK
Office T 41 21 510 1725

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (zendesk.frontiersin.org/hc/en-us)