

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ПАТОЛОГИЯ КЛЕТОК ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ COVID-19

С.А. Абрамова¹, Е.И. Дробот¹, Е.В. Пустовалов^{1,2}, Л.М. Сомова¹, М.Ю. Щелканов^{1,2,3}

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия

²Дальневосточный Федеральный университет, Владивосток, Россия

³ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия

ULTRASTRUCTURE PATHOLOGY OF INNATE IMMUNITY CELLS DURING COVID-19

S.A. Abramova¹, E.I. Drobot¹, E.V. Pustovalov^{1,2}, L.M. Somova¹, M.Yu. Shchelkanov^{1,2,3}

¹G.P. Somov Scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Federal service for surveillance on consumers rights protection and human wellbeing (Rospotrebnadzor), Vladivostok, Russia

²Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

³Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Vladivostok, Russia

Современные технологии позволили значительно расширить научные представления о функциональных возможностях клеток врождённого иммунитета – ключевых участников клеточного звена воспаления при инфекционных заболеваниях; при этом, показано, что участие нейтрофилов не ограничивается рамками системы врождённого иммунитета [1, 2].

Пандемическое распространение COVID-19 [3-6] в результате преодоления SARS-CoV-2 (Nidovirales: Coronaviridae, Betacoronavirus, подрод Sarbecovirus) [7-9] межвидового барьера и проникновения из популяций своего резервуарного хозяина – летучих мышей (Chiroptera, Microchiroptera) [10-12] – в популяцию человека (что уже ни раз фиксировалось в новейшей истории [13-15], хотя и не масштабировалось до полноценной пандемии) с самого начала сопровождалось накоплением данных о значительном вовлечении иммунной системы в патологический процесс, включая лейкоциты периферической крови [16-18]. Гематологические изменения были описаны уже в первых исследованиях пациентов с COVID-19, когда были отмечены лимфоцитопения и выраженные аномалии нейтрофильного ростка. В единичных работах сообщается о морфологических аномалиях клеток периферической крови [19-21], однако в доступной литературе нам не удалось встретить работ об ультраструктурных исследованиях этих клеток.

Цель настоящей работы – охарактеризовать ультраструктурную морфологию клеток периферической крови у пациентов с COVID-19, определить значение её изменений в развитии дисфункции иммунной системы и для диагностики заболевания.

В работе представлены результаты морфологического исследования лейкоконцентрата периферической крови 30 пациентов, находившихся на лечении с диагнозом COVID-19 в ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2» (Владивосток). Диагноз был подтвержден с помощью ПЦР-теста.

Полученный осадок лейкоконцентрата из гепаринизированной крови пациентов фиксировался по Ито в растворе параформальдегида, а затем дофиксировался в четырехокиси осмия. Далее образцы обезжизнялись и заливались в эпоксидные смолы. Для электронно-микроскопического исследования ультратонкие срезы контрастировались уранилацетатом и цитратом свинца. Срезы готовили на ультрамикротоме LKB-V (LKB, Швеция); ультратонкие срезы просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Япония).

Исследование субмикроскопической организации эукариотических клеток даёт возможность углубленного понимания сущности и механизмов патологического процесса при различных болезнях человека и животных, в том числе – при вирусных инфекциях. Наше внимание было сосредоточено на морфологию полиморфноядерных (нейтрофилы/гранулоциты) и мононуклеарных (моноциты) лейкоцитов крови, характеризующих базальный уровень иммунной системы [22, 23].

В нашей работе впервые изучена ультраструктура циркулирующих лейкоцитов у пациентов с COVID-19, что позволило детализировать аномалии этих клеток, вызванные коронавирусом SARS-CoV-2, и оценить их патогенетическое значение. При этом, важно отметить, что у пациентов с COVID-19 среднее число морфологически измененных лейкоцитов, включая нейтрофилы и моноциты, составило 69 %, что согласуется с данными научной литературы [20, 21]. Эти изменения характеризовались ядерным дисморфизмом с появлением аномальных форм, отсутствующих у здоровых лиц.

Нами было установлено, что в ядрах как нейтрофилов, так и моноцитов преобладал транскрипционно неактивный (конденсированный) хроматин, расположенный под ядерной оболочкой

(плазмалеммой). Центральная часть ядра была заполнена транскрипционно активным эухроматином, находящимся в деконденсированном (диспергированном) состоянии. Это указывало на то, что коронавирус SARS-CoV-2 не вызывал отчетливого стимулирующего действия на циркулирующие лейкоциты крови.

На поверхности наружной цитоплазматической мембраны лейкоцитов наблюдалась редукция микроворсинок с наличием лишь единичных выростов цитоплазмы. Цитоплазма нейтрофилов была плотно заполнена секреторными гранулами. Однако в наших исследованиях при коронавирусной инфекции в нейтрофилах периферической крови не удалось визуализировать экзоцитоз гранулярного содержимого во внеклеточное пространство с появлением запустевших гранул. Это позволяет предположить о нарушении одной из важных эффекторных функций нейтрофилов, а именно – секреторной дегрануляции, обычно сопутствующей «метаболическому взрыву». В части клеток выявлена вакуолизация цитоплазмы разной степени выраженности.

При электронной микроскопии лейкоконцентрата периферической крови пациентов с COVID-19 также обращало на себя внимание наличие большого количества клеток с измененной формой ядра и апоптотических лейкоцитов, содержащих ядерные фрагменты. Как известно, в отличие от некроза разрушение ядра при апоптозе происходит с участием специальной кальций/магний-зависимой эндонуклеазы, расщепляющей молекулы ДНК в участках между нуклеосомами, что приводит к формированию однотипных по размерам фрагментов ядерной ДНК [24]. Обнаруживались лейкоциты с сегментированным ядром неправильной и причудливой формы, двухядерные дейоциты, а также кариорексис ядра.

Таким образом, электронно-микроскопические исследования ультратонких срезов лейкоконцентрата периферической крови пациентов с COVID-19 показали, что выявленные морфологические аномалии лейкоцитов можно рассматривать как маркеры гипореактивности этих клеток со снижением их бактерицидного потенциала.

К этим морфологическим аномалиям отнесены:

1. нарушение секреторной дегрануляции нейтрофилов, при которой обычно происходит выделение содержимого гранул во внеклеточное пространство и проявляется его бактерицидное действие на нефагоцитированные микроорганизмы;
2. сглаженность плазмалеммы лейкоцитов с малым числом микроворсинок – цитоплазматических выростов на поверхности лейкоцитов, участвующих в захвате объектов фагоцитоза;
3. большое количество апоптотических лейкоцитов, у которых фагоцитарная способность редуцирована.

Полученные результаты свидетельствуют о кариопатологическом эффекте вируса SARS-CoV-2 на лейкоциты периферической крови. Еще в 2002 г. И.Н. Ильинских было установлено, что многие вирусы и живые вакцины вызывают кариопатологические изменения в лимфоцитах крови человека и животных, что сопровождается иммунодепрессивным состоянием организма [25]. В нашей работе впервые у пациентов с COVID-19 обнаружены кариопатологические изменения в нейтрофилах и моноцитах крови, характеризующих состояние врожденного иммунитета. Выявление морфологических аномалий в лейкоцитах периферической крови имеет клинко-диагностическую и прогностическую значимость при данной инфекции.

Литература

1. Долгушин ИИ, Мезенцева ЕА, Савочкина АЮ, Кузнецова ЕК. Нейтрофил как «многофункциональное устройство» иммунной системы. Инфекция и иммунитет. 2019;9(1):9-38.
2. Johansson C, Kirsebom FC. Neutrophils in respiratory viral infections. *Mucosal Immunology*. 2021;14:815-827.
3. Щелканов МЮ, Колобухина ЛВ, Бургасова ОА и др. COVID-19: этиология, клиника, лечение // Инфекция и иммунитет. 2020;10(3):421-445.
4. Никифоров ВВ, Колобухина ЛВ, Сметанина СВ и др. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика. М.: Департамент здравоохранения города Москвы, 2020. 71 с.
5. Щеглов БО, Семейкина ЛМ, Щелканов ЕМ и др. Программа для прогнозирования эпидемической динамики COVID-19. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ в Российской Федерации № 2022611150. Дата государственной регистрации: 20.01.2022.
6. Щелканов МЮ. Этиология COVID-19. В кн.: COVID-19: от этиологии до вакцинопрофилактики. Руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2023. 11-53.
7. Щелканов МЮ, Попова АЮ, Дедков ВГ и др. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae). Инфекция и иммунитет. 2020;10(2):221-246.
8. Грибова ВВ, Окунь ДБ, Шалфеева ЕА и др. Облачный сервис для дифференциальной клинической диагностики острых респираторных вирусных заболеваний (в том числе – связанных с особо опасными коронавирусами) методами искусственного интеллекта. Якутский медицинский журнал. 2020;(2):44-47.

9. Щелканов МЮ, Дунаева МН, Москвина ТВ и др. Каталог вирусов рукокрылых (2020). Юг России: экология, развитие. 2020;15(3):6-30.
10. Щелканов МЮ, Табакаева ТВ, Любченко ЕН и др. Рукокрылые: общая характеристика отряда. Владивосток: Изд-во ДВФУ, 2021. 130 с.
11. Щелканов ЕМ, Уколов СС, Дунаева МН и др. Эхолокация рукокрылых (Chiroptera Blumenbach, 1779) как элемент их экологической пластичности. Юг России: экология, развитие. 2020;15(4):6-20.
12. Щелканов МЮ, Щелканов ЕМ, Уколов СС и др. Биоэхолокация. Владивосток: Изд-во ДВФУ, 2021. 250 с.
13. Щелканов МЮ, Колобухина ЛВ, Львов ДК. Коронавирусы человека (Nidovirales, Coronaviridae): возросший уровень эпидемической опасности. Лечащий врач. 2013;10:49-54.
14. Щелканов МЮ, Ананьев ВЮ, Кузнецов ВВ, Шуматов ВБ. Ближневосточный респираторный синдром: когда вспыхнет тлеющий очаг? Тихоокеанский медицинский журнал. 2015;(2):94-98.
15. Щелканов МЮ, Ананьев ВЮ, Кузнецов ВВ, Шуматов ВБ. Эпидемическая вспышка Ближневосточного респираторного синдрома в Республике Корея (май-июль 2015 г.): причины, динамика, выводы. Тихоокеанский медицинский журнал. 2015;(3):25-29.
16. Сомова ЛМ, Коцюрбий ЕА, Дробот ЕИ и др. Клинико-морфологические проявления дисфункции иммунной системы при новой коронавирусной инфекции COVID-19. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(1):11-20.
17. Kuznetsova TA, Andryukov BG, Makarenkova ID, et al. The potency of seaweed sulfated polysaccharides for the correction of hemostasis disorders in COVID-19. Molecules. 2021;26(9):2618.
18. Сомова ЛМ, Коцюрбий ЕА, Дробот ЕИ и др. Патоморфология лимфатических узлов в случаях тяжёлой инфекции, вызванной SARS-CoV-2, наблюдавшихся в Приморском крае. Клиническая и экспериментальная морфология. 2022;11(4):16-24.
19. Zini G, Bellesi S, Ramundo F, d'Onofrio G. Morphological anomalies of circulating blood cells in COVID-19. Am J Hematol. 2020;95(7):870-872.
20. Мишура ЛГ, Ногина РГ, Липова ВА, Гайковская ЛБ. Особенности изменения морфологии клеток периферической крови и выпотных жидкостей у пациентов с новой коронавирусной инфекцией. Клиническая лабораторная диагностика. 2021;66(S4):45.
21. Singh A, Sood N, Narang V, Goyal A. Morphology of COVID-19-affected cells in peripheral blood film. Brit Med J Case Rep. 2020;13:e236117.
22. Маянский АН, Маянский ДН. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука, 1989. 340 с.
23. Тотолян АА, Фрейдлин ИС. Клетки иммунной системы. Санкт-Петербург: Наука, 2000. 231 с.
24. Пальцев МА, Пауков ВС. Патология. Том 1. Москва: ГЕОТАР-Медиа, 2008. 89-94.
25. Ильинских ИИ. Кариопатологические изменения в иммунокомпетентных клетках человека и животных под влиянием факторов инфекционной природы. Автореф. дис. докт. биол. наук, 2002.