

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»
Ордена Трудового Красного Знамени
Медицинский институт им. С. И. Георгиевского

АБЛАЕВА РЕМЗИЕ НАРИМАНОВНА
**«Роль полиморфизма генов интерлейкинов в патогенезе новой
коронавирусной инфекцией у детей»**
Научно-квалификационная работа

Направления подготовки 30.06.01 «Фундаментальная медицина»
Специальность 3.3.3. Патологическая физиология

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, доцент Агеева Е.С.

К ЗАЩИТЕ ДОПУСКАЮ:

Зав. кафедрой общей и клинической
патофизиологии

доктор медицинских наук, профессор

Кубышкин А.В.

г. Симферополь, 2024 г.

Оглавление

Список сокращений.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Общая характеристика вируса, факторы патогенности, распространенность и особенности заболевания у детей	7
1.2 Этиология и патогенез, роль иммунной системы в патогенезе, особенности иммунного ответа у детей.....	11
1.3 Цитокинопосредованные механизмы, роль полиморфизма генов цитокинов.....	20
ГЛАВА 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	27
2.1 Объект исследования.....	27
2.2 Материал исследования.....	28
2.2.1. Определение специфических Ig M и G.....	31
2.2.2. Определение показателей системного иммунитета.....	32
2.2.3. Определение общего количества лимфоцитов крови.....	32
2.2.4. Получение лимфоцитов крови.....	33
2.2.5. Определение субпопуляционного состава лимфоцитов крови.....	34
2.2.6. Определение уровня цитокинов в сыворотке крови.....	34
2.2.7. Анализ аллельных вариантов генов интерлейкинов.....	35
2.3 Статистическая обработка результатов.....	40
ГЛАВА 3: РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	42
3.1. Клинико-морфологическая характеристика.....	42
3.2. Неспецифическое звено иммунитета и показатели лейкоцитов.....	44
3.3. Показатели иммунофенотипа лимфоцитов.....	46
3.4. Анализ частот встречаемости аллельных вариантов полиморфных генов.....	48
ГЛАВА 4: ОБСУЖДЕНИЕ И АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ...64	
ВЫВОДЫ.....	67
Список литературы.....	68

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

ОП – оптическая плотность

ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром

ПК – периферическая кровь

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РХВ – равновесие Харди-Вайнберга

ЦКП – центр коллективного пользования

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

COVID-19 - коронавирусная инфекция

Ig – иммуноглобулин

Ig – иммуноглобулин

IL – интерлейкин

NK - клетки (nature killer) – натуральные киллерные клетки

RSV - респираторно-синцитиальный вирус человека

RT-PCR+ - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

SARS-CoV-2 – коронавирус 2, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом

Th – Т-хелперный лимфоцит

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Дети составляют увеличивающуюся долю случаев заболеваемости COVID-19 [32]. Более 3,87 миллиона детей (0–15 лет) имели положительный результат с момента начала вспышки, что составило примерно 18 % всех случаев в США [10]. Эпидемиологические расследования и клинический мониторинг показывают, что у большинства инфицированных детей развивается легкая форма (27 %) или бессимптомное носительство (66 %). В отличие от взрослых, у детей заболевание характеризуется симптомами больше характерными для других детских инфекций – кашель, температура, гастроинтестинальные симптомы [30, 51]. Средняя и тяжелая степени тяжести встречается крайне редко у детей (5 и 2 % соответственно). В иммунологических механизмах защиты против инфекции SARS-CoV-2 активируется как гуморальный, так и клеточный иммунитет [31]. Т-лимфоциты памяти у пациентов с COVID-19 проявляют функциональную реактивность, которая способствует противовирусной резистентности в случае повторного инфицирования [56]. Развитие иммунного ответа различается в зависимости от возраста человека, тяжести заболевания [32]. Патогенез COVID-19-ассоциированных заболеваний включает инвазию и репликацию вируса в дыхательных путях с последующим развитием виремии. При тяжёлых формах со стороны организма возникает иммунный ответ, который характеризуется так называемым «цитокиновым штормом». Изучение особенностей течения у детей COVID-19-ассоциированных заболеваний с различной степенью тяжести позволяет сделать предположение, что иммунный ответ у детей с MIS-C (Multisystem Inflammatory Syndrome in Children) отличается от иммунного ответа у детей с неосложненным течением новой коронавирусной инфекции [64]. Показано, что младенцы и дети до 5 лет имеют уникальный иммунофенотип и по-разному реагируют на инфекцию SARS-CoV-2 по сравнению со взрослыми [36]. Возможным объяснением более низкого

уровня инфицированности и более частого бессимптомного течения является: незрелость иммунной системы, недостаток выработки рецепторов ангиотензинпревращающих ферментов (ACE-2 – angiotensin converting enzyme 2), пассивный перенос антител от матери во время беременности и кормления грудным молоком, присутствия фетального гемоглобина [52]. Сравнение пациентов взрослого возраста и детей так же демонстрирует отличия как в уровне продукции, так и функциональных особенностей иммунного ответа. Основное внимание уделяется оценке динамики образования и циркуляции специфических антител в период острой инфекции и постковидном периоде. У детей IgG характеризуются более высоким уровнем продукции, но их нейтрализующая функция более низкая чем у взрослых [64]. Одной из гипотез является то что дети с новой коронавирусной инфекцией могут иметь пул В-клеток памяти с перекрестно-реактивными механизмом активации, которые возникают в результате предыдущего воздействия вирусов. Таким образом, актуальность приобретают исследования по изучению сроков возникновения, напряженности механизмов, лежащих в реализации адаптивного иммунитета к SARS-CoV-2 у детей, что крайне важно для понимания степени их участия в формировании иммунитета в популяциях и оценки индивидуальной невосприимчивости к SARS-CoV-2 в последующем.

Цель: установить молекулярно-генетические особенности патогенеза и частоту встречаемости полиморфизма генов интерлейкинов –330 T/G IL-2, -589 C/T IL4, -174 G/C IL-6, -1082 G/A IL10 в патогенезе новой коронавирусной инфекцией у детей.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Оценить роль нарушений системы цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, CD14, G-308A TNFA) в иммунопатогенезе новой коронавирусной инфекции у детей.

2. Установить распространенность генотипов интерлейкинов –330 T/G IL-2, -589 C/T IL4, 174 G/C IL-6, -1082 G/A IL10, CD14, G-308A TNFA у детей, перенесших новую коронавирусную инфекцию; оценить взаимосвязь между генотипами и клиническим течением новой коронавирусной инфекции.

3. Выявить общие закономерности и особенности нарушений локального и системного иммунного ответа у детей, перенесших новую коронавирусную инфекцию (Ig M, G, нейтрофильно-лимфоцитарный индекс, иммуофенотип лимфоцитов).

4. Выявить критические иммуногенетические факторы предрасположенности и резистентности к развитию новой коронавирусной инфекции у детей.

Научная новизна. Исследование было направлено на выявление динамики изменений в иммунной системе в течение острого периода инфекции, вызванной новым коронавирусом COVID-19, а также на протяжении трех, шести и девяти месяцев после выздоровления. В рамках анализа установлена связь между дисбалансом в иммунной системе и клиническими особенностями болезни, в частности, наличием или отсутствием пневмонии, а также с уровнем тяжести и особенностями применяемой иммуносупрессивной терапии. Выявлены иммунологические и молекулярно-генетические маркеры у детей с новой коронавирусной инфекцией. Получены новые данные фундаментального характера о частоте встречаемости полиморфизма генов у детей с новой коронавирусной инфекцией.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика вируса. Факторы патогенности. Распространенность и особенности заболевания у детей

Коронавирусная инфекция представляет собой группу вирусных патогенов, относящихся к категории РНК-вирусов, которая насчитывает более сорока разновидностей, классифицированных в рамках двух подразделений. Исторический момент установления их роли в развитии острых респираторных заболеваний приходится на 1966 год, когда исследователи Тайрелл и Байно документально зафиксировали этот факт [65]. Геном коронавирусов (CoV) характеризуется наличием одноцепочечных РНК с положительной полярностью, которые отличаются своей высокой частотой мутаций и способностью к рекомбинации. Это семейство вирусов получило своё название благодаря уникальной структуре, в частности наличию шипов, внешне напоминающих корону. Эти шипы играют ключевую роль в процессе заражения клеток. Именно они позволяют вирусу мимикрировать под безвредные молекулы, к которым клеточные трансмембранные рецепторы имеют аффинитет. В результате мимикрии, когда рецептор связывается с поддельной молекулой на "короне" вируса, последний эффективно внедряется в клетку, за чем следует проникновение его РНК [6].

В научной классификации коронавирусы подразделяются на четыре основных группы: альфа, бета, гамма и дельта. К вирусной категории бета-коронавирусов относится SARS-CoV-2. Этот вирус имеет геном, который во многом совпадает с генетической структурой возбудителя SARS-CoV, который был идентифицирован как причина серьезного острого респираторного заболевания в 2003 году. Тем не менее, несмотря на выявленное подобие, инфекция, вызываемая COVID-19, отличается меньшей смертностью и тяжестью проявлений по сравнению с заболеванием, вызванным SARS-CoV [1]. Одной из основных характеристик, присущих

коронавирусам, является их способность к изменениям в генетической структуре, включая мутации и рекомбинации. Эти изменения могут привести к появлению новых вариантов вируса, способных передаваться от животных к человеку. В начале XXI века, а именно в 2002 году, на территории Китайской Народной Республики был зафиксирован первый случай инфекции, вызванной ранее неизвестным коронавирусом, который получил наименование SARS-CoV и характеризовался как возбудитель тяжелого острого респираторного синдрома. Согласно широко распространенной научной гипотезе, первоисточником данного вируса стали летучие мыши, от которых, через цепочку передач, инфекция достигла человека [7]. При этом, несмотря на зооотическое происхождение вируса, ключевую роль в масштабах его распространения играют носители вируса SARS-CoV-2 среди людей. Это касается как лиц, у которых наблюдаются клинические симптомы заболевания, так и тех, кто не испытывает заметных признаков инфекции. Вирус имеет способность передаваться от человека к человеку различными путями: воздушно-капельным, при контакте через предметы и фекально-оральным [7]. В соответствии с утверждениями некоторых исследователей, механизм развития инфекционного заболевания COVID-19 связан с ранним уменьшением функциональной активности как клеток врожденного иммунитета (NK-клетки), так и клеток приобретенного иммунитета (CD8+ цитотоксические лимфоциты). Такое убеждение основывается на предположении, что вирус способствует подавлению врожденной иммунной защиты организма. Однако, следует отметить, что не все специалисты разделяют эту точку зрения, указывая на различия в трактовке механизмов воздействия вируса на иммунную систему [47, 76]. Согласно консенсусу в научном сообществе, сложные заболевания связаны с феноменом, который широко известен как цитокиновый шторм. Этот процесс аналогичен патологическим иммунным реакциям, выявляемым при определенных ревматических расстройствах. Примерами таких состояний являются синдром активации макрофагов (MAS) и вторичный гемофагоцитарный

лимфогистиоцитоз (вторичный ГЛХ). Оба эти патологических состояния характеризуются системным воспалительным ответом, который приводит к повреждению различных органов и систем. [47]. В рамках проведенных исследований было установлено, что приблизительно 4–6% детей, которые были госпитализированы из-за острых респираторных инфекций [26], являются носителями общих коронавирусов. Кроме того, данный показатель возрастает до 8% среди детей, проходящих лечение в амбулаторных условиях [63].

В декабре 2019 года, город Ухань, расположенный в Китае, стал эпицентром новой формы коронавирусной инфекции. Вирус быстро передавался, вызвав пандемию и представляя собой серьезную опасность для здоровья населения мира. В начале января 2020 года, ученые из Китая идентифицировали этот вирус как 2019-nCoV, который позже получил официальное наименование SARSCoV-2, а заболевание, вызываемое им – COVID-19. С момента его обнаружения SARSCoV-2 превратился в основную причину респираторных заболеваний, способных эскалировать в тяжелую форму пневмонии и даже привести к смерти [7]. Несмотря на широкое распределение инфекции, которое началось с ее первых проявлений в определенных локациях и последующее стремительное увеличение числа случаев среди населения регионов, стран и далее по всему миру, исследователи с самого начала отмечали, что доля заболевших среди детского населения значительно ниже, по сравнению с другими возрастными категориями. Согласно последним данным, доля детей младше 15 лет среди всех подтвержденных случаев заражения COVID-19 составляет всего 0,9%. Исследования указывают на то, что диапазон распространенности COVID-19 среди детей колеблется от 0,39% до 12,3%. Эта изменчивость в данных, колеблющаяся от 1 до 5 процентов среди диагностированных пациентов, может быть объяснена различиями в составе групп, прошедших тестирование на SARS-CoV-2, известный также как тяжелый острый респираторный синдром, ассоциированный с коронавирусом 2. Важно отметить, что у детей

заболевание, как правило, протекает в более легкой форме, а случаи осложнений и неблагоприятных последствий встречаются значительно реже [5, 19, 40]. Осведомленность о механизмах передачи вируса от матери к ребенку остается ограниченной, хотя существуют научные работы, подтверждающие случаи заражения среди новорожденных, матери которых были инфицированы COVID-19. В данных обстоятельствах точный механизм заражения — будь то в процессе родов или в период после рождения, возможно, через контакт с биологическими жидкостями или грудным молоком, — остается неопределенным, ввиду отсутствия конкретных данных о пути передачи вируса [18, 23]. В течение всего времени наблюдения за пандемией, статистика отмечает лишь изолированные случаи летального исхода среди детей, вызванные заболеванием. Основная масса зарегистрированных инцидентов заражения среди детей происходит вследствие контакта с инфицированными взрослыми. У детей чаще отмечаются следующие клинические проявления: повышение температуры тела, сухой кашель и признаки общего отравления организма, включая мышечные боли, тошноту и слабость.

Стоит отметить, что диарея встречается чаще у детей, зараженных COVID-19, чем у взрослых. Восстановление в большинстве случаев происходит в течение 1–2 недель. Бессимптомный ход болезни наблюдается у не менее чем у четверти инфицированных детей. Необходимость в госпитализации возникает приблизительно у 10% зараженных детей. Тяжелые формы заболевания фиксируются в среднем у 1% случаев среди молодых пациентов, причем развитие осложнений чаще происходит у детей с серьезными сопутствующими заболеваниями [2].

1.2 Этиология и патогенез, роль иммунной системы в патогенезе, особенности иммунного ответа у детей

Инфекционное заболевание, вызванное вирусом COVID-19, может проявляться в различных клинических формах. В их число входят легкие респираторные вирусные инфекции, характеризующиеся отсутствием тяжелых симптомов. Также заболевание может прогрессировать до пневмонии, при этом не вызывая респираторной недостаточности. В более серьезных случаях наблюдается развитие пневмонии, сопровождающейся острой дыхательной недостаточностью, что значительно ухудшает состояние пациента.

Независимо от типа коронавируса, определенные факторы увеличивают вероятность развития тяжелой формы болезни у детей. К таким факторам относятся: предшествующие заболевания, включая респираторные недуги, врожденные аномалии и рак, состояния, связанные с нарушением функции иммунной системы, а также одновременное заражение другими вирусными инфекциями, в том числе респираторно-синцитиальным вирусом и вирусом гриппа.

В научных работах, опубликованных за рубежом, текущее понимание клинического протекания COVID-19 среди детей основывается на рекомендациях, предложенных Ассоциацией медицинских специалистов Китая в марте 2020 года. Указанные руководства свидетельствуют о том, что у детей обычно наблюдаются либо легкие, либо умеренно тяжелые случаи болезни. В то же время некоторые исследования указывают на то, что даже при отсутствии симптомов у некоторых пациентов может быть диагностирована пневмония посредством рентгенологического обследования. Для взрослых пациентов, инфицированных вирусом SARS CoV-2, типично проявление определенных состояний, которые делают необходимым регулярное выполнение рентгенологических исследований в динамике у всех лиц с диагностированным COVID-19 [21, 42, 68].

Исследование, проведенное в одном из городов, включало анализ клинических особенностей COVID-19 у разных групп населения: детей (выборка составила 36 человек), взрослых (135 человек), а также сравнение с детьми, страдающими от острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ, 44 человека) и гриппа (167 человек).

Результаты исследования выявили значительные различия в проявлениях заболевания между указанными группами. В частности, было обнаружено, что дети, инфицированные COVID-19, демонстрируют симптомы меньшей тяжести по сравнению с взрослыми пациентами. Так, лишь 36% детей испытывали лихорадку в отличие от 86% взрослых, кашель наблюдался у 19% детей против 62% взрослых, пневмония была зафиксирована у 53% детей по сравнению с 95% взрослых, уровень С-реактивного белка повысился только у 3% детей в сравнении с 49% взрослых, и ни один из детских случаев не был оценен как тяжелое течение заболевания, в то время как среди взрослых таких случаев насчитывалось 23 %.

Статистическая значимость различий была подтверждена и составила $p < 0,0001$. Эти данные подчеркивают различия в клинических проявлениях COVID-19 у детей и взрослых, а также акцентируют внимание на отличиях в проявлении симптомов между COVID-19 и другими респираторными заболеваниями у детей, такими как ОРВИ и грипп.

В литературе были описаны случаи, когда дети, не проявляющие симптомов болезни, выступали носителями инфекции. Этот факт вызывает серьезные опасения в медицинском сообществе. Ведь даже не проявляя признаков заболевания, такие дети могут стать источником его распространения. В исследовании, проведенном Донгом и его коллегами, было выявлено, что 4,4 % детской популяции являются асимптоматическими носителями. Также было установлено, что у 55,3 % наблюдались лишь легкие симптомы, например, ринофарингит [54]. Результаты недавно проведенного исследования, охватывающего 2143 ребенка, инфицированных COVID-19 в

Китае, выявили, что у подавляющего большинства - 94 процентов участников, наблюдались симптомы заболевания легкой или умеренной степени тяжести.

В литературе также зафиксированы случаи возникновения у детей синдрома, характеризующегося мультисистемным воспалением [54]. Обычно, перед развитием данного заболевания, наблюдаются расстройства желудочно-кишечного тракта. Эти нарушения затем прогрессируют в системный васкулит, характеризующийся продолжительной лихорадкой, высыпаниями, эритемой ладоней, воспалением конъюнктивы, поражениями в области ротовой полости и увеличением латероцервикальных лимфатических узлов. В отдельных случаях болезнь может усложняться миокардитом и/или серьезным поражением коронарных артерий. Случаи заболевания были зарегистрированы в таких странах, как Великобритания, Франция, Италия и Соединенные Штаты Америки. Методы лечения, применяемые для борьбы с васкулитом Кавасаки, показали свою эффективность в борьбе с этим состоянием.

В рамках разработки методологического подхода представлена классификационная схема для оценки степени тяжести заболевания COVID-19 у детей [24].

Бессимптомная форма: заболевание протекает без каких-либо клинически выраженных симптомов или проявлений. Рентгеновские снимки грудной клетки не выявляют отклонений от нормы, однако результаты анализа на наличие нуклеиновых кислот вируса SARS-CoV-2 указывают на положительный исход.

Легкая форма: повышенная температура тела, приступы кашля, выделение секрета из носа, частые чихания, общее чувство усталости и мышечные боли. Во время проведения физикального осмотра обычно обнаруживаются изолированные области воспаления в глотке, при этом аускультация не выявляет никаких аномальных звуков. Отмечается, что у определенной группы детей может не наблюдаться повышения температуры,

вместо этого присутствуют желудочно-кишечные расстройства, включая тошноту, эпизоды рвоты, болевые ощущения в абдоминальной области и диарею [57].

Средне-тяжелая форма: повышение температуры тела, наличие обильного мокротоотделения при кашле и возможное появление свистящих дыхательных звуков. Отличительной чертой таких состояний является отсутствие гипоксемии и других симптомов, указывающих на нарушение дыхательной функции. В определенных случаях внешние проявления заболевания могут полностью отсутствовать, и единственным подтверждением диагноза служат данные, полученные в результате проведения компьютерной томографии грудной клетки.

В случае тяжелой формы заболевания наблюдаются высокая температура, приступы кашля и затрудненное дыхание, что может сопровождаться центральным цианозом и понижением уровня кислорода в крови до значений ниже 92%. Обычно, состояние ухудшается на протяжении седьмого по десятый день. Критические симптомы включают явные проявления респираторного дистресса: учащенное дыхание, затруднения при вдохе, снижение частоты дыхательных движений и, в исключительных случаях, остановку дыхания. В отличие от взрослых, у детей не зафиксированы случаи тихой гипоксии, когда отсутствуют внешние признаки кислородного голодания [28].

В критической стадии заболевания, развитие может привести к таким серьезным состояниям, как острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), сопровождающийся дыхательной недостаточностью и возможными осложнениями, включая внутрисосудистое рассеянное свертывание крови, шоковое состояние, энцефалопатию, воспаление сердечной мышцы, сердечную недостаточность и острую почечную недостаточность.

Подозрение на инфекцию COVID-19 может возникнуть при наличии характерных клинических признаков и симптомов в рамках определенного эпидемиологического контекста, например, в районах с высокой

распространенностью вируса, особенно если имело место контактирование с лицом, у которого подтвержден COVID-19.

Для подтверждения диагноза применяются лабораторные анализы на наличие вируса. Определение времени заражения основывается на анализе инкубационного периода вируса, который варьируется от 2 до 14 дней и в среднем составляет от 3 до 7 дней. [57].

Появление подозрений на инфекцию COVID-19 у детей может быть обосновано наличием одного или нескольких из ниже перечисленных критериев. Во-первых, это может быть лихорадка, характерные для респираторных инфекций симптомы, проявления со стороны желудочно-кишечного тракта или общая слабость. Второй критерий включает в себя определенные лабораторные показатели, такие как стандартное количество лейкоцитов, снижение их уровня (лейкопения) и увеличение концентрации С-реактивного белка (СРБ) и прокальцитонина. Третий аспект связан с особыми находками при проведении диагностической визуализации, в частности, данных, полученных с помощью рентгеновского обследования грудной клетки и компьютерной томографии[21].

В случаях, когда есть подозрение на заболевание, необходимо провести лабораторное исследование для его подтверждения. Тем не менее, определенная часть медицинского сообщества выступает за установление диагноза на основании клинической картины, включая характерные признаки и симптомы, а также наличие контакта с инфицированным лицом COVID-19 [27].

В контексте диагностирования COVID-19 у детей, необходимо уделить внимание подтверждению положительного эпидемиологического анамнеза. Это требует, помимо прочего, обнаружения как минимум двух клинических симптомов, которые должны быть подтверждены лабораторно. Эпидемиологический анамнез охватывает следующие аспекты: дети, которые в течение двух недель до появления симптомов находились в регионах с высоким уровнем распространения коронавируса; те, кто был в контакте с

лицами, страдающими от высокой температуры или респираторных заболеваний, особенно если эти лица прибыли из зон с активным распространением вируса; дети, проживающие в условиях, где зарегистрированы случаи новой вирусной инфекции; а также новорожденные, чьи матери были инфицированы новым коронавирусом.

В клинической картине, особенно у детей, часто наблюдается повышенная температура тела, однако иногда она может оставаться в пределах нормальных значений или быть слегка повышенной. Среди других симптомов выделяются сухой кашель, боли в области горла, расстройства желудочно-кишечного тракта, а также высыпания и специфические изменения на пальцах, ассоциируемые с COVID-19[25].

Компьютерная томография (КТ) легких выявляет характерные признаки, указывающие на типичные патологии[38]. В начальный период заболевания анализы крови часто показывают обычные результаты, хотя могут быть зафиксированы снижение уровня лейкоцитов и/или лимфоцитов[20, 29]. Отсутствие обнаружения других микроорганизмов, способных вызвать аналогичную клиническую картину, также является характерным признаком[20].

COVID-19 у детей зачастую протекает в более мягкой форме, что подтверждается результатами компьютерной томографии легких. Поражения, обнаруженные при помощи КТ и связанные с COVID-19, не являются уникальными и имеют сходство с поражениями, вызванными другими заболеваниями легких[35, 49, 58]. В ряде случаев у асимптоматических детей может быть выявлена пневмония на основании аномалий, обнаруженных при КТ грудной клетки. Неспецифическая клиническая картина и лабораторные данные усложняют диагностику, особенно когда единственным проявлением болезни являются изменения на КТ грудной клетки[67].

Согласно анализу, проведенному рядом исследователей, клиническая картина COVID-19 у детской популяции демонстрирует определенные

особенности, отличающиеся от проявлений заболевания у взрослых. В частности, отмечается, что некоторые симптомы у детей встречаются с высокой частотой, тогда как у взрослых они проявляются значительно реже. Имеются также симптомы, которые редко наблюдаются у детей, в то время как у взрослых они описаны достаточно подробно. Отдельные проявления болезни, зафиксированные у взрослых, не были зарегистрированы у детей. В то же время, существуют симптомы, специфичные именно для детского возраста, которые не встречаются у взрослых пациентов. Кроме того, некоторые клинические признаки были идентифицированы у детей в последние недели, что указывает на динамику изменения проявлений заболевания.

В медицинской практике наблюдается разнообразие симптоматики у детей, проявляющейся в следующем: большинство случаев протекает без видимых симптомов, приблизительно в половине ситуаций отмечается повышение температуры тела (40–56%), кашель - примерно у 50% пациентов младшего возраста, болезненные ощущения в области горла или фарингит диагностируются в 40% случаев, наличие сопутствующих инфекций, включая грипп типов А и В, *M. pneumoniae*, RSV, RV и другие, также представляет собой распространенное явление.

В то время как некоторые проявления болезни встречаются относительно редко, например, ринит, хрипы при вдохе, общее чувство усталости, боли в голове или мышцах, у взрослых наблюдаются отличительные симптомы, отсутствующие у детей. Среди них - утрата или уменьшение способности чувствовать запахи, что является одним из самых обыденных признаков, а также конъюнктивит, диагностируемый с помощью RT-PCR анализа на присутствие вируса, согласно исследованиям, проведенным в Китае.

С другой стороны, существуют симптомы, специфичные для детского возраста и не влияющие на взрослых, к примеру, так называемые "COVID-пальцы". Это состояние, при котором пальцы рук или их части приобретают

внешний вид, схожий с обморожением, вследствие кожного васкулита, без проявления других симптомов заболевания. Данное явление было зарегистрировано у детей в Испании и США.

Более того, в последнее время были выявлены и описаны новые симптомы, включая папуловезикулезную сыпь, напоминающую ветрянку, обнаруженную у пациентов различных возрастных категорий в Италии, а также неврологические осложнения, среди которых синдром Гийена-Барре, инсульты и полинейропатии [8, 39].

В настоящее время нет ни этиологического лечения, ни профилактики COVID-19 [16]. В легких случаях, основной целью лечения является смягчение присутствующих симптомов. В то же время изоляция больного считается основной мерой профилактики для предотвращения распространения вируса. В случаях, когда инфекция COVID-19 принимает умеренную или тяжелую форму, рекомендации врачей включают в себя поддерживающее лечение и введение дополнительного кислорода. При наличии подозрений на бактериальную инфекцию, которая особенно часто встречается у детей, назначаются эмпирические антибиотики [60, 70].

В рамках стандартного подхода к лечению основное внимание уделяется следующим аспектам: постельный режим, предоставление пищи, отвечающей необходимым калорийным потребностям, и обеспечение достаточного уровня гидратации. Важно также поддерживать баланс электролитов и стабильность гомеостаза. Регулярное наблюдение за жизненно важными показателями и уровнем насыщения крови кислородом является обязательным. В случае выявления нарушений дыхательной функции необходимо принимать корректирующие меры, которые могут включать кислородную терапию.

В начальный трехмесячный период распространения эпидемии, для лечения педиатрических пациентов применялись различные методы этиотропного лечения. Среди применяемых медикаментов были: ингаляции рекомбинантного интерферона альфа с использованием небулайзера, а также

комбинированное применение лопинавира и ритонавира, умифеновир, осельтамивир, рибавирин и введение иммуноглобулинов через внутривенный путь. Несмотря на то, что академическое сообщество склоняется к мнению об оправданности использования противовирусной терапии в случаях тяжелого протекания болезни, существует заметный недостаток надежных данных, подтверждающих ее эффективность и безопасность в контексте лечения детей, заболевших COVID-19 [2].

Кортикостероиды применяются в качестве лечения для некоторых серьезных осложнений COVID-19, включая острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), септический шок, энцефалопатию и коагулопатии. В случаях других особых заболеваний также может потребоваться использование стероидов. Терапевтический курс глюкокортикостероидов обычно короткий, продолжительностью от 3 до 5 дней, при этом дозировка метилпреднизолона не должна превышать 1–2 мг на килограмм массы тела в день [8].

В контексте терапии вторичных респираторных инфекций, связанных с COVID-19, научное сообщество выделяет антибиотики как ключевой элемент лечения. Антибиотическая терапия, особенно та, что характеризуется широким спектром действия, находит широкое применение в соответствующих исследованиях. В случае детской популяции, где зафиксирована высокая распространенность микоплазменных инфекций, азитромицин выделяется благодаря своим противовоспалительным качествам, делая его предпочтительным вариантом для борьбы с бактериальными осложнениями в контексте COVID-19.

В ситуациях, когда температура тела превышает 38,5°C, вызывая значительный дискомфорт у пациента, рекомендуется использование методов физического охлаждения в сочетании с парацетамолом, дозировка которого должна соответствовать установленным нормам. В то же время, длительное применение сиропов и таблеток от кашля, включая препараты на растительной основе, не рекомендуется из-за их сомнительной

эффективности. Исключение составляют ситуации, когда пациент страдает от образования вязкой мокроты, затрудняющей ее отхождение; в таких случаях могут быть рекомендованы муколитические и отхаркивающие средства, например, амброксол, ацетилцистеин или карбоцистеин. [2].

Терапия с использованием иммуномодуляторов предполагает внутривенное введение метилпреднизолона в дозировке 1–2 мг на килограмм веса в сутки на протяжении 3–5 дней. Данный метод не предназначен для длительного применения. В случаях тяжелого течения заболевания возможно применение внутривенных иммуноглобулинов, однако требуется дополнительное исследование их эффективности. Рекомендованные дозировки составляют 1,0 г/кг/сут на протяжении двух дней или 400 мг/кг/сут на протяжении пяти дней [21]. Одной из актуальных проблем сегодня является вопрос о необходимости противовирусной и иммуномодулирующей терапии для всех детей, зараженных SARS-CoV-2. Этот вопрос остается открытым, учитывая высокую частоту бессимптомных случаев и значительное количество побочных эффектов от таких противовирусных препаратов, как лопинавир/ритонавир и рибавирин.

1.3 Цитокинопосредованные механизмы, роль полиморфизма генов цитокинов

Взаимодействие между клетками в зоне воспаления зависит от механизмов межклеточной коммуникации, к которым относится обмен сигналами через интерлейкины, рецепторы и их антагонисты. В таблице 1.1 представлены основные цитокины, играющие важную роль в иммунном ответе на инфекцию COVID-19.

Цитокиновые рецепторы, являющиеся трансмембранными гликопротеинами, находятся на клеточной поверхности. Количество этих рецепторов на одной клетке обычно колеблется от 100 до 1000. Основная функция внеклеточной части этих рецепторных цепей заключается в связывании с цитокинами.

Таблица 1.1. Основные эффекты цитокинов (по данным И. С. Фрейдлина, С. А. Benedict, N. F. Go)

Цитокины	Клетки-продуценты	Биологические эффекты
IL-2	Th ₁ -лимфоциты	Дифференцировка по Th ₁ -пути. Противоопухолевая защита
IL-4	Th ₂ - лимфоциты В-лимфоциты Макрофаги Базофилы Эозинофилы Тучные клетки	Костимуляция В- и Т-клеточной пролиферации, секреция IgE и IgG ₄ , защита клеток от апоптоза. Подавление высвобождения супероксидов, секреции простагландина E ₂ и индукции циклооксигеназной активности. Усиление экспрессии ICAM I, VCAM-1, VLA-4
IL-6	Макрофаги Лимфоциты Эндотелиоциты	Поляризация Th ₂ пути. Онкогенез и гемопоэз
IL-10	Th ₂ -лимфоциты Моноциты Макрофаги	Угнетение пролиферативного ответа Т-клеток на антигены и митогены, стимуляция секреции антител В-клетками, угнетение продукции цитокинов Th ₁ -пути IL-1β, TNF и IL-6, продукция хемокинов, активизирующих Th ₂ -ответ

Когда цитокины связываются с их рецепторами, формируется специфический комплекс, что приводит к трансдукции сигнала в клетку и активации вторичных сигнальных каскадов. Этот процесс включает запуск ферментативных реакций и последующее образование и накопление фосфорилированных белков.

В результате данного процесса белки перемещаются в ядро клетки, где взаимодействуют с конкретными генами, инициируя процесс транскрипции. В результате данного процесса происходит формирование и аккумуляция специфического ассортимента белков, что влечет за собой изменения во внешних признаках и функциональных способностях клеток.

Обычно, структура рецепторов включает в себя несколько компонентов. Отдельные компоненты этих структур, интегрированные в клеточные мембраны, осуществляют выборочное взаимодействие с конкретными цитокинами. В то же время, другие элементы способны формировать универсальные рецепторные ансамбли, обеспечивающие взаимодействие с множеством молекул. Наличие унифицированных компонентов в составе рецепторов может служить объяснением для функциональной аналогии между разнообразными цитокинами.

Практически все клетки, задействованные в процессе воспаления, выполняют двойную функцию: они не только производят цитокины, но и служат их целями. Это взаимодействие играет ключевую роль в механизме эндогенной иммунорегуляции. Кроме того, существуют так называемые растворимые рецепторы, которые действуют как конкурентные антагонисты, блокируя действие соответствующих интерлейкинов. Эти рецепторы обладают высокой аффинностью к своим лигандам, что позволяет им эффективно нейтрализовать цитокины и ограничивать их взаимодействие с интактными мембранными рецепторами.

Известно, что эффективность иммунного ответа человека напрямую связана с его генетическим составом. Чаще всего наследственная предрасположенность к различным инфекционным заболеваниям обусловлена комбинацией аллелей различных генов, влияющих на характеристики иммунной системы и увеличивающих вероятность развития таких заболеваний.

В геноме, представленном одиночными копиями генов цитокинов в гаплоидном наборе, наблюдается характерная структурная организация, включающая как экзоны, так и интроны. Отличительной чертой генетического полиморфизма являются вариации в последовательностях ДНК, в частности, вставки, делеции и замены отдельных нуклеотидов. Эти изменения, в отличие от мутаций, способных нарушать нормальное функционирование организма и вызывать патологии, чаще всего приводят к

синтезу белков с модифицированными физико-химическими характеристиками.

Эти модификации белков могут играть важную роль в механизмах развития иммунопатологий различных заболеваний, несмотря на то, что их влияние на фенотип может быть не столь очевидно. Исследования, направленные на изучение специфических аллелей и их связи с разнообразными патологиями, зачастую приводят к неоднозначным выводам. Это обусловлено тем, что ассоциации между определёнными генетическими вариантами и клиническими проявлениями заболеваний могут значительно варьироваться в зависимости от особенностей популяции.

IL-2 играет ключевую роль в развитии и умножении Th1-лимфоцитов, а также цитотоксических лимфоцитов, активирует NK-клетки и способствует производству иммуноглобулинов В-клетками. Он также усиливает выработку $IFN\gamma$. Локус гена, ответственного за экспрессию IL-2, располагается на 4q26-q27 участке четвертой хромосомы. Наличие гомозиготного генотипа GG в позиции -330 гена IL-2 связано с наибольшим уровнем экспрессии данного интерлейкина по сравнению с генотипами TG и TT. IL-4, производимый В-лимфоцитами, макрофагами и Th2-клетками, выполняет функции, направленные на дифференциацию Т- и В-лимфоцитов. Он подавляет выделение прозапалительных цитокинов и стимулирует продукцию IL-4, IL-5, и IL-6. IL-4 обладает способностью ингибировать как спонтанную, так и стимулированную LPS продукцию различных цитокинов моноцитами, в том числе IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 и фактора некроза опухоли альфа ($TNF\alpha$). Увеличение уровня IL-4 указывает на сдвиг в иммунном ответе в пользу Th2-пути.

Локализация гена IL-4 обнаружена на пятой хромосоме, в точке 5q31.1, где его структура включает в себя четыре экзона и три интрона. Один из ключевых полиморфизмов этого гена, С-590Т, характеризуется заменой цитозина на тимин на 590-й позиции. Этот конкретный полиморфизм связан

с увеличением активности промотора гена, что влечет за собой повышение уровня иммуноглобулина Е (IgE) в крови.

В отличие от гена IL-4, ген IL6 отвечает за кодирование интерлейкина 6, играющего важную роль в активации иммунной системы, инициируя активную фазу воспалительного процесса. Этот ген участвует не только в иммунном ответе, но и в ряде других жизненно важных процессов. В регуляторной области гена IL6 присутствует замена гуанина на цитозин (G на C) в позиции (-174), которая является важным генетическим маркером.

Этот маркер влияет на множество функций в организме, включая активацию производства белков острой фазы воспаления, участие в обеспечении иммунной защиты, воздействие на эндокринную систему через стимуляцию выделения различных гормонов, регуляцию температуры тела, а также способствует дифференцировке клеток. Важность гена IL6 также проявляется в его роли в развитии таких заболеваний, как остеопороз, ревматоидный артрит и различные онкологические патологии.

Наблюдается увеличение концентрации интерлейкина-6 (ИЛ-6) в крови в контексте серьезных воспалительных реакций, инфекционных заболеваний и физических повреждений. Изменение, характеризующееся присутствием аллеля С, приводит к уменьшению активности гена, отвечающего за производство ИЛ-6.

При этом, важно отметить, что аллель С остается нечувствителен к влиянию липополисахаридов и интерлейкина-1, в то время как аллель G демонстрирует повышенную реактивность к этим стимулам. Интерлейкин-6, являющийся гликопротеином и состоящий из 184 аминокислот, производится макрофагами, Т- и В-лимфоцитами, эндотелиоцитами и фибробластами. Этот цитокин играет ключевую роль в процессе зрелости В-лимфоцитов, превращая их в клетки, производящие антитела, а также регулирует пролиферацию и формирование гранул.

Не менее важно его значение в контексте развития опухолевых процессов, поскольку большое количество опухолевых клеток

демонстрируют наличие рецепторов к ИЛ-6. Повышенные уровни ИЛ-6 зафиксированы в периоды обострения различных гастроэнтерологических патологий. Ген, отвечающий за синтез ИЛ-6, локализован на 7-й хромосоме в области p21. Присутствие полиморфизма в позиции -174 промоторной области этого гена предполагает его влияние на интенсивность экспрессии соответствующего гена.

IL-10, цитокин, синтезируемый Th2-лимфоцитами, моноцитами и макрофагами, играет ключевую роль в иммунной системе. В контексте хронического воспаления увеличение его уровня в организме считается неблагоприятным признаком, часто сопровождаясь ускоренным развитием опухолевых процессов. Это связано с тем, что избыточное присутствие IL-10 может вызвать состояние, известное как «иммунный паралич», когда эффективность иммунной системы снижается.

Локализованный на первой хромосоме, в диапазоне 1q31-q32, ген IL-10 содержит пять экзонов. В научной литературе описаны различные полиморфизмы этого гена, особенно интерес представляют три из них (-1082A→G, -819C→T, -592C→A), расположенные в промоторной области. Эти вариации гена связаны с различиями в уровне продукции цитокина. Например, аллельные варианты GA и GG в позиции -1082 демонстрируют более высокую активность по сравнению с вариантом AA в той же позиции.

Кроме того, наличие полиморфизма AA в позиции -1082 повышает риск развития рака желудка, что подчеркивает важность генетических исследований в понимании механизмов развития онкологических заболеваний.

В результате исследования были идентифицированы и картографированы многочисленные генетические кластеры. Эти кластеры играют ключевую роль в определении склонности к различным заболеваниям, имеющим значительное социальное влияние.

Интересно, что для различных групп населения комбинация предрасполагающих генов и связанных с ними генетических сетей для

каждого конкретного заболевания может значительно различаться. Эти различия в частоте встречаемости определенных генов обуславливают межпопуляционные различия в распространенности и характеристиках мультифакториальных заболеваний.

Следовательно, в разных популяциях один и тот же аллель может служить как маркером предрасположенности к заболеванию, так и маркером устойчивости к нему. Это зависит от множества факторов, включая географическое положение, питание, расовую или этническую принадлежность и другие.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования

Данное исследование основывается на всестороннем анализе клинических и лабораторных данных, полученных в ходе наблюдения за детьми в возрастной категории от 0 до 14 лет, которые страдали от инфекции, вызванной новым коронавирусом, и относились к категории средней степени тяжести заболевания (n=102). Все пациенты были разделены на 3 возрастные группы 0-4 лет (n=74), 5-9 лет (n=15) и 10-14 лет (n=13) [4, 17]. Контрольную группу составят здоровые доноры – 100 человек.

Верификация диагноза новая коронавирусная инфекция у детей была основана на подтверждении вируса SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР и наличия клинически идентифицируемых симптомов или признаков инфекции верхних дыхательных путей, а именно заложенность глотки, боль в горле и лихорадка, и при рентгенологическом исследовании.



Рис. 1. Дизайн исследования

В ходе проведения исследования строго придерживались этических норм и стандартов, определенных статьей 24 Конституции Российской Федерации и Декларацией Хельсинки, разработанной Всемирной Медицинской Ассоциацией в 1964 году. Информированное согласие, подтверждающее добровольное участие в исследовании, было получено от всех участников, за исключением несовершеннолетних. Данный документ был подписан каждым пациентом перед началом исследования. Сбор клинических данных проводился под руководством квалифицированных специалистов Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Республики Крым «Республиканская детская инфекционная клиническая больница». Ответственные за данный процесс: Е.Н. Дядюра, заведующая инфекционным отделением №1, врач-инфекционист, и Н.В. Рымаренко, доктор медицинских наук, доцент, врач-инфекционист. В исследование были включены пациенты, у которых была диагностирована новая коронавирусная инфекция средней степени тяжести.

2.2. Материал исследования

Исследовательский материал представлял собой образцы венозной крови. Для получения материала процедура забора крови проводилась в утренние часы на голодный желудок, при этом избирали локтевую вену как место забора. Объем отобранной крови составлял 10 миллилитров, которую помещали в пробирку с добавлением 2,5 процентного раствора ЭДТА. Сбор крови осуществлялся дважды: в момент обращения пациента за медицинской помощью, что соответствовало началу заболевания, и спустя две недели терапевтического вмешательства. Аналитическая оценка биохимических параметров крови проводилась с использованием автоматизированного биохимического анализатора Medonic M20, производства Германии. Для выполнения общего анализа крови применялся гематологический анализатор Accent 200, что позволяло обеспечить высокую точность и достоверность результатов исследования.

В ходе исследования было проведено измерение уровня лейкоцитов, а также определено как абсолютное, так и относительное количество лимфоцитов и нейтрофилов с использованием гематологического анализатора. Для вычисления индекса, отражающего соотношение нейтрофилов к лимфоцитам в крови (обозначаемого как ИСНЛ), применялся расчет, основанный на сравнении абсолютных и относительных значений численности нейтрофилов и лимфоцитов. Все данные о лейкоцитарном составе были представлены как в относительных процентах, так и в абсолютных единицах (клеток на литр). Для оценки и сравнения полученных данных применялись стандартные показатели, установленные в местной лаборатории ГБУЗ РК «Республиканская детская инфекционная клиническая больница».

Исследование проводилось в ЦКП (центре коллективного пользования) научным оборудованием «Молекулярная биология» КФУ им. В. И. Вернадского.

Для анализа собранных данных использовалась программная система Statistica версии 8.0. В свете того, что распределение анализируемых параметров отклонялось от нормального, представление данных осуществлялось через медиану (Me) и интерквартильный размах (Q1-Q3). В процессе сравнения двух различных групп применялся тест Манна-Уитни, тогда как анализ связанных групп требовал использования теста Вилкоксона. Установленный порог статистической значимости составлял $p \leq 0,05$. Исследование охватывало как клинические проявления, так и лабораторные данные, включая гематологические параметры и результаты, полученные с помощью цитофлуориметрии. Для определения биохимических показателей крови использовался автоматизированный биохимический анализатор MedonicM20, производства Германии. Анализ общего состава крови проводился на гематологическом анализаторе Accent 200.

Содержание лейкоцитов, относительное и абсолютное содержание лимфоцитов и нейтрофилов определяли на гематологическом анализаторе,

для определения индекса соотношения нейтрофилов к лимфоцитам крови (ИСНЛ) рассчитывали, как отношение количества нейтрофилов к количеству лимфоцитов (abs – абсолютные значения, % - относительные значения). Показатели лейкоцитарной формулы выражали в относительных (%) и абсолютных значениях (кл/л). Для сравнительного анализа полученных результатов использовались нормальные значения, принятые в локальной лаборатории ГБУЗ РК «Республиканская детская инфекционная клиническая больница».

1) ОАК

2) специфических Ig классов G и M.

3) Иммуноферментный анализ содержания цитокинов в сыворотке крови (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10)

4) Для исследования субпопуляционной структуры кровяных лимфоцитов, включая CD3, CD4, CD8, CD16 и CD45, использовался метод проточной цитофлуориметрии. Этот метод предполагает применение моноклональных антител, предоставленных компанией "R&D Systems" из Соединенных Штатов Америки. Исследование было проведено с использованием цитофлуориметра Epics XL («BeckmanCoulterEPICSXL»), определяя размер клеток через малое угловое светорассеяние (FSC) и цитоплазматические и мембранные характеристики через боковое светорассеяние (SSC). Также были изучены параметры зеленой флуоресценции (FITC – 530 нм) на канале FL1. Настройки напряжения для регистрации данных на проточном цитометре выполнялись в соответствии с рекомендациями производителя, указанными в инструкции. Результаты анализа представляли в виде относительных (%) и абсолютных (тыс./мкл) показателей.

5) Частоту встречаемости полиморфизма генов интерлейкинов –330 T/G IL2, -589 C/T IL4, 174 G/C IL6, -1082 G/A IL10 определяли с помощью ПЦР анализа.

2.2.1. Определение специфических Ig M и G

Для выявления наличия специфических антител класса IgG, направленных против НР, в образцах кровяной сыворотки был применен метод иммуноферментного анализа. Использование данного метода предполагало применение стандартизированного набора реагентов под наименованием «Им-Ди Спектр», который производится в Новосибирске. В процессе исследования строго следовали указаниям, представленным в прилагаемой инструкции.

В процессе данного исследования, специально обработанные лунки, покрытые антителами барана, нацеленными на человеческий IgG, заполнялись 100 микролитрами неразбавленной сыворотки крови. Далее следовала инкубация при нормальной комнатной температуре на протяжении полутора часов.

После троекратного ополаскивания используемым буфером, в каждую лунку добавлялся 100-микролитровый объем комплекса антигена НР, связанного с биотином, который также подвергался инкубации в течение получаса при комнатной температуре. Следующим шагом было введение 100 микролитров комплекса стрептавидин-пероксидазы без удаления предыдущей смеси, с последующей инкубацией в течение 20 минут.

В процессе эксперимента, каждая из лунок подверглась процедуре пятикратного промывания при помощи специализированного буферного раствора. Заключительный этап экспериментальной процедуры предусматривал добавление в каждую из лунок по 100 микролитров раствора, содержащего триметилбензидин и пероксид водорода, после чего следовала инкубация в условиях полной темноты в течение десяти минут. Прекращение реакции достигалось путем введения в каждую лунку по 50 микролитров двунормального раствора соляной кислоты. Фиксация и анализ полученных результатов осуществлялись с использованием спектрофотометра модели Immunochem 2100, производства финской компании «ThermoLabSistems», путем измерения оптической плотности на

длине волны 450 нанометров. В качестве контрольного значения (бланка) использовались показатели, полученные путем измерения оптической плотности воздуха. В исследовании была применена методика, основанная на вычислении оптической плотности (ОП), для определения критических и исследуемых значений ОП. Когда оптическая плотность образца, подлежащего анализу, не превышала 90% от критической оптической плотности, результаты теста интерпретировались как отрицательные, указывая на отсутствие иммуноглобулинов G к *Helicobacter pylori*. В случае, если оптическая плотность пробы оказывалась выше порога в 120% от критического значения, анализ считался положительным, подтверждая наличие IgG к НР.

2.2.2. Определение показателей системного иммунитета

В рамках анализа системной иммунной активности применялся комплексный метод, включающий измерение общего числа лимфоцитов в крови. В дополнение, проводилось исследование концентрации интерлейкинов в сыворотке, а также оценка разнообразия субпопуляций лимфоцитов. Ключевым аспектом анализа являлось изучение способности лимфоцитов к спонтанной и стимулированной продукции цитокинов. Отдельное внимание уделялось исследованию процессов спонтанного и вызванного апоптоза среди лимфоцитарных клеток крови.

2.2.3. Определение общего количества лимфоцитов крови

Для измерения количества и состояния жизнеспособности лимфоцитов применялись установленные гематологические процедуры. В ходе исследований анализировалось количество клеток в суспензии, а также их способность к выживанию, используя для этой цели однопроцентный раствор трипанового синего в растворе NaCl концентрацией 0,85%. Этот краситель имеет способность маркировать исключительно мертвые клетки, указывая на необратимые изменения в структуре плазматической мембраны. Подсчет клеток в обоих случаях проводили в камере Горяева по формуле:

$$X = K \times A \times 10^4,$$

где K – разведение, A – количество клеток в 25 больших квадратах камеры.

Результаты выражали в относительных (%) и абсолютных значениях (кл/л).

2.2.4. Получение лимфоцитов крови

В ходе научного эксперимента проводилась обработка крови. Для начала, кровь объединяли с ЭДТА, соблюдая соотношение 4:1. Далее, эту смесь поддерживали в инкубаторе на протяжении 45 до 60 минут при стабильной температуре 37°C. Завершающим этапом было аккуратное извлечение плазмы, располагавшейся над эритроцитами, с последующим ее переносом в стерильный контейнер с помощью пипетки Пастера.

Следующим этапом было центрифугирование на протяжении 10 минут при скорости 1000 оборотов в минуту. Излишки жидкости над осадком удаляли, а полученный осадок предназначался для последующего анализа. В ходе эксперимента по извлечению моноклеарных лейкоцитов из крови был применен метод центрифугирования. Этот метод опирался на использование специализированного слоя, созданного из фиколла и верографина. Композиция упомянутого слоя была результатом смешивания фиколла, произведенного компанией «Pharmacia», базирующейся в Швеции, с 9% концентрацией, и верографина, характеризующегося 33,9% концентрацией и плотностью 1,077, в соотношении один к четырем. Центрифугирование проводилось в течение временного интервала от 30 до 40 минут при выполнении 1500 оборотов в минуту. После окончания процесса центрифугирования, лимфоциты, образующие белую полосу над разделяющим слоем, аккуратно извлекались с использованием пипетки. Далее, эти клетки подвергались трехкратной промывке в растворе Хенкса. Каждая промывка длилась 10 минут и проводилась при скорости 1000 оборотов в минуту.

2.2.5. Определение субпопуляционного состава лимфоцитов крови

Для исследования состава лимфоцитарных подгрупп в крови использовался метод проточной цитофлуориметрии, который основывается на использовании моноклональных антител. Этот метод позволял оценивать размеры клеток по малому угловому светорассеянию (FSC) и их цитоплазматические и мембранные характеристики через боковое светорассеяние (SSC). В дополнение к этому, проводился анализ светимости в зеленом спектре (FITC – 530 нм) на FL1-канале (Рисунок 1). Измерения представлялись как в процентном, так и в абсолютном выражении (тысячи клеток на микролитр).

2.2.6. Определение уровня цитокинов в сыворотке крови

Для измерения концентраций цитокинов (включая IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 и IL-10) в сыворотке использовали метод ELISA, следуя рекомендациям производителя тест-комплектов «Вектор – Бест», базирующегося в Новосибирске. Инициальный этап включал трехкратное промывание сенсibilизированных антителами лунок с использованием буфера объемом 300 мкл для каждой лунки, с последующим полным удалением жидкости.

Далее, в каждую лунку вводили 200 мкл неразведенного сыворотки, за которым последовало добавление 50 мкл биотинилированных вторичных антител. Следующий этап предусматривал инкубацию при комнатной температуре в течение одного часа с обеспечением непрерывного взбалтывания.

После этого производили еще одну трехкратную промывку буфером (300 мкл на лунку) с полным удалением жидкости, а затем в каждую лунку добавляли 200 мкл конъюгата пероксидазы хрена с стрептавидином. Инкубацию продолжали в течение 30 минут при 37°C, обеспечивая непрерывное взбалтывание. После этого лунки снова промывали трижды буфером и пять раз – дистиллированной водой, каждый раз с полным удалением жидкости.

В процессе эксперимента, следовавшем за этапом высушивания лунок, в них вносили по 200 микролитров раствора, содержащего субстрат и краситель. Данную процедуру осуществляли в условиях, исключающих воздействие прямых солнечных лучей, при этом поддерживая температуру окружающей среды. Инкубация длительностью от 10 до 15 минут предшествовала завершению реакции, которое достигалось путем добавления 50 микролитров стоп-реагента в каждую из лунок.

Для анализа данных применялся спектрофотометрический аппарат Immunochem 2100, производства компании «ThermoLabSistemas», расположенной в Финляндии. Измерение оптической плотности выполняли на длине волны 450 нанометров. Контрольный образец, или "бланк", формировали за счет использования лунки, заполненной буферным раствором. Осуществляя анализ, опирались на калибровочную зависимость между оптической плотностью и концентрацией, дополнительно введя стандартные образцы интерлейкинов с различным уровнем концентрации. Итоговые показатели выражались в пикограммах на миллилитр.

2.2.7. Анализ аллельных вариантов генов интерлейкинов

Для извлечения ДНК из кровяных клеток использовали метод, основанный на применении фенола. Процесс начинался с добавления в эппендорфовские пробирки, каждая из которых содержала 100 микролитров сыворотки из анализируемого образца, равного объема буфера для разведения. Этот буфер состоял из 50 мМ Трис-НСI с рН между 7,5 и 8,0 и включал в себя 20 мМ ЭДТА.

После тщательного перемешивания на вортексе смесь подвергалась инкубации в течение 10 минут при температуре окружающей среды. Далее к смеси добавляли 200 микролитров лизирующего буфера, содержащего 1% SDS и 0,2 М NaOH, после чего снова производили перемешивание на вортексе и инкубировали в аналогичных условиях. Перед процедурой выделения ДНК буфера предварительно нагревались до 65 °С на протяжении 10-15 минут. В пробирки вносили 120 микролитров

денатурирующего раствора, состоящего из равных частей фенола (имеющего коричневатый оттенок в нижней фракции) и хлороформа.

В процессе эксперимента содержимое пробирок было внимательно перемешано до достижения гомогенной консистенции молочного оттенка. Затем было произведено введение 150 микролитров трехмолярного раствора ацетата натрия (CH_3COONa) с уровнем pH равным 4,8, после чего смесь подверглась повторному перемешиванию и была инкубирована в течение 10 минут при температурном режиме минус 20 градусов Цельсия. На следующем этапе осуществлялось центрифугирование в течение 5 минут при скорости 10 000 оборотов в минуту. После этого процедура включала инкубацию объема супернатанта, равного 500 микролитрам, в течение 20 минут при температуре минус 20 градусов Цельсия с последующим добавлением 1 миллилитра 96-процентного этилового алкоголя. В завершающем этапе процесса, последующем за очередным центрифугированием, к полученной надосадочной жидкости аккуратно добавляли объем в один миллилитр 75% раствора этилового алкоголя. Для обеспечения тщательного смешивания содержимого, пробирки осторожно переворачивались. После этого манипуляции с пробирками повторно подвергались центрифугированию в течение пяти минут для достижения необходимой степени разделения компонентов.

После того как супернатант был отделен, остаток подвергли процессу сушки. Этот процесс проводился путем размещения пробирки без крышки внутри термостата. Условия для сушки были строго определены: температура поддерживалась на уровне 65 градусов Цельсия, а продолжительность процедуры варьировалась от пяти до десяти минут. Для подготовки высушенного осадка к дальнейшему использованию, особенно перед экстракцией ДНК, к нему добавляли 50 микролитров специфического TE-буфера. Этот буфер, служащий для элюирования, включал в свой состав 10 mM Трис-HCl и 1 mM ЭДТА. После добавления буфера образец инкубировали в течение трех минут. Условия инкубации также

предусматривали температуру в 65 градусов Цельсия, но в отличие от процесса сушки, пробирка оставалась закрытой. Этот подход к подготовке образца для извлечения ДНК отличается высокой точностью и эффективностью, обеспечивая надежные результаты для последующих научных исследований.

В ходе исследования вариативности генов интерлейкинов IL2, IL4, IL6, IL10 был применен метод аллель-специфической цепной реакции полимеразы (АСЦРП), с последующим анализом методом электрофореза. Для проведения экспериментов использовались реактивы от российской компании «Литех». Для проведения процесса амплификации, реакционная смесь была составлена из следующих компонентов: по 0,5 микролитра R- и F-праймеров, что соответствует информации, зафиксированной в таблице; 1,5 микролитра 25-миллимолярного раствора сульфата магния; того же объема дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и 10-кратного буфера для полимеразной цепной реакции; 0,15 микролитра Taq-полимеразы; и 8,35 микролитра деионизированной воды. После этого, к полученной смеси добавляли один микролитр исходной ДНК. В конечном этапе, для предотвращения испарения, поверхность смеси была аккуратно покрыта слоем минерального масла.

Процесс амплификации состоял из нескольких этапов: начальная денатурация проводилась при 92 °С в течение 90 секунд, за этим следовало 40 циклов. Каждый цикл включал в себя этапы: отжиг праймеров при 60 °С длительностью 30 секунд, элонгацию при 74 °С также на 30 секунд, повторную денатурацию при 92 °С на 30 секунд, и завершающий этап, где продукт синтезировался при 72 °С в течение 10 минут. После завершения циклов амплификации образцы охлаждали и хранили при 10 °С.

Анализ ПЦР проводился в специально предназначенном для этой цели термостате, который был предварительно нагрет до температуры +94 °С. Данный аппарат, «Терцик», изготовлен ЗАО НПФ «ДНК-технология» в городе Москва.

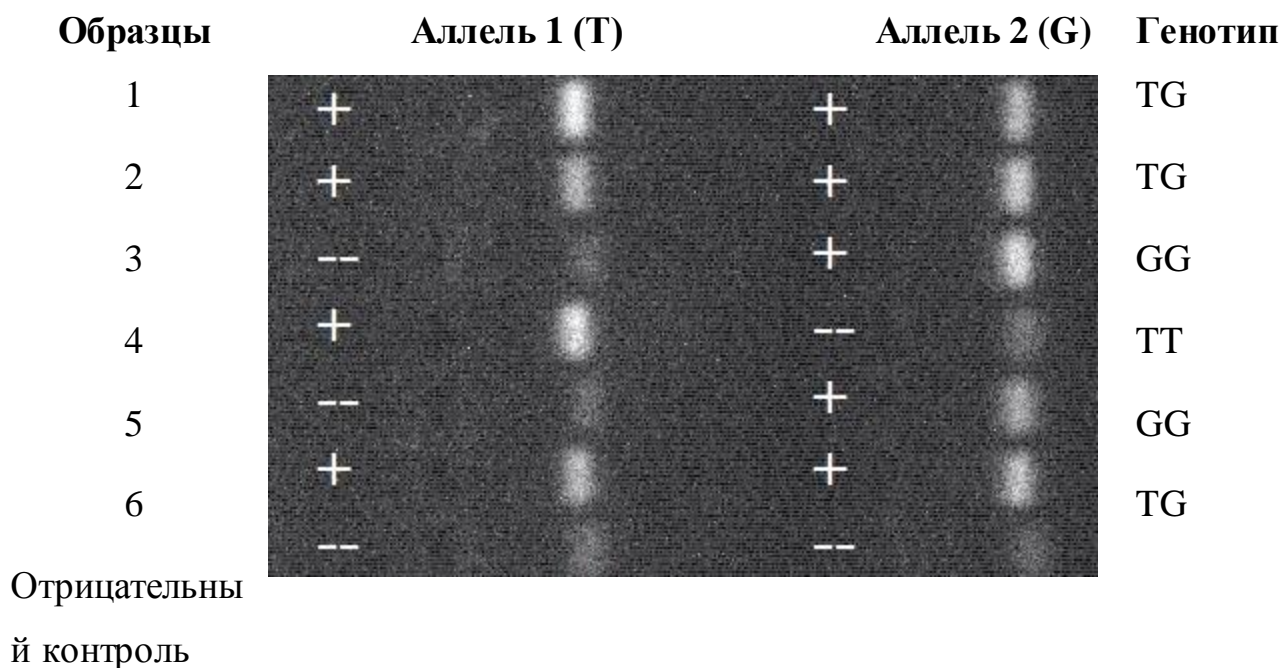


Рисунок 2. Фото электрофореграммы с результатами исследования образцов детей с НКИ на полиморфизм гена T-330G гена IL2. + - положительный результат ПЦР-реакции, аллель выявлен, -- отрицательный, аллель не выявлен

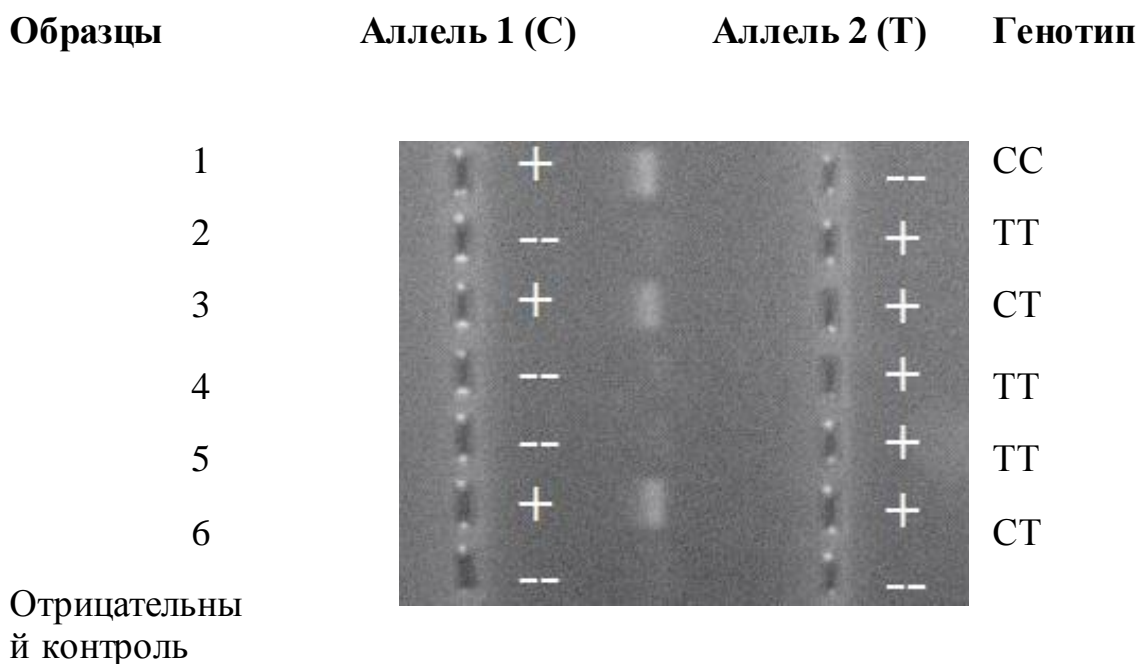


Рисунок 3. Фото электрофореграммы с результатами исследования образцов детей с НКИ на полиморфизм гена C-589T гена IL4. + - положительный результат ПЦР-реакции, аллель выявлен, -- отрицательный, аллель не выявлен

Детекция продуктов амплификации для полиморфизмов G-1082A IL-10(рис. 4) и C-159T CD14 (рис. 5), осуществлялась методом горизонтального электрофореза в 3-х % агарозном геле.

Образцы	Аллель 1 (C)	Аллель 2 (G)	Генотип
1	+	--	CC
2	+	+	CG
3	+	+	CG
4	--	+	GG
Отрицательный контроль	--	--	

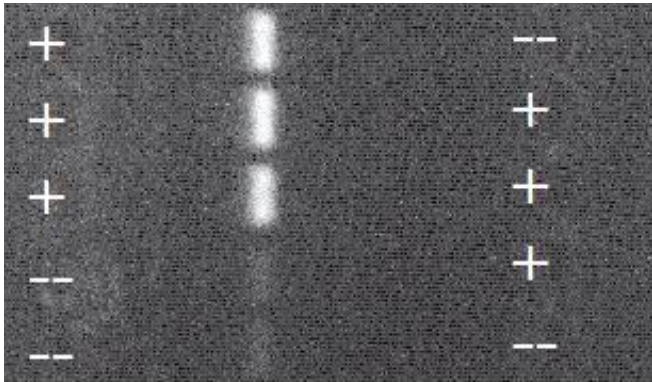


Рисунок 4. Фото электрофореграммы с результатами исследования образцов детей с НКИ на полиморфизм C-174G гена IL6. + - положительный результат ПЦР-реакции, аллель выявлен, -- отрицательный, аллель не выявлен

Образцы	Аллель 1 (G)	Аллель 2 (A)	Генотип
1	+	--	GG
2	+	+	GA
3	+	+	GA
4	--	+	AA
Отрицательный контроль	--	--	

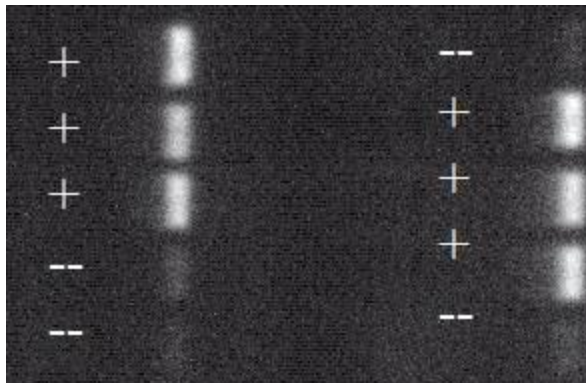


Рисунок 5. Фото электрофореграммы с результатами исследования образцов детей с НКИ на полиморфизм G-1082A гена IL10. + - положительный результат ПЦР-реакции, аллель выявлен, -- отрицательный, аллель не выявлен

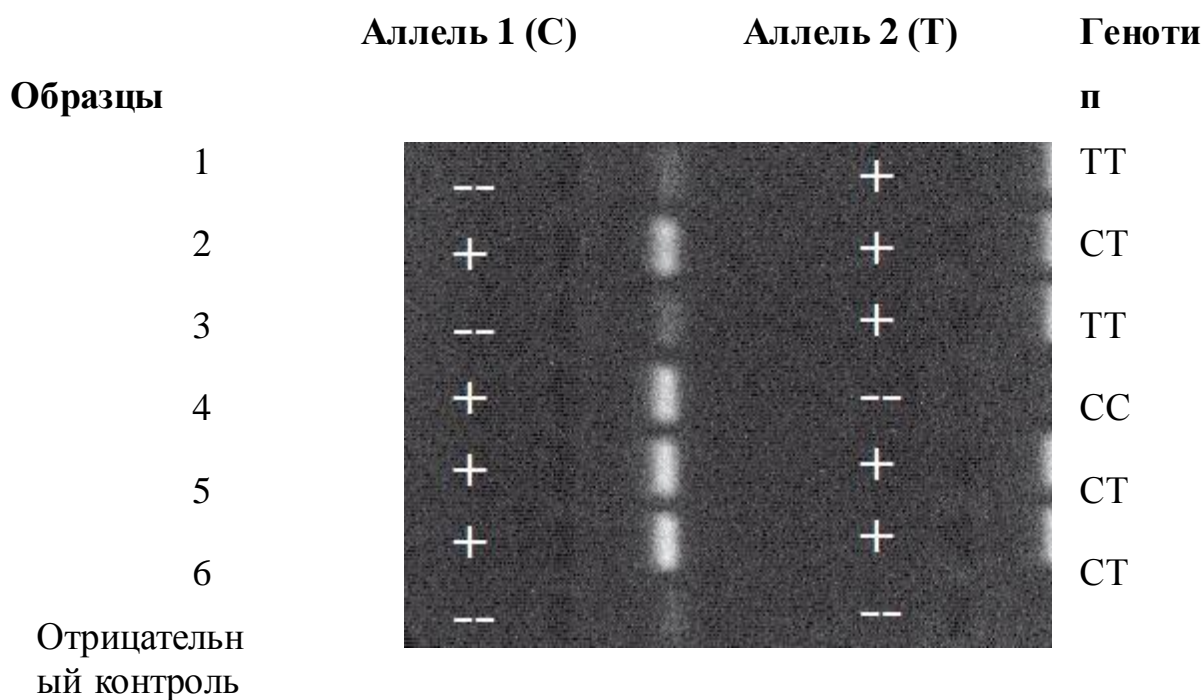


Рисунок 6. Фото электрофореграммы с результатами исследования образцов детей с НКИ на полиморфизм гена С-159Т гена CD14. + - положительный результат ПЦР-реакции, аллель выявлен, -- отрицательный, аллель не выявлен

2.3. Статистический анализ результатов исследования

Анализ данных, полученных в ходе исследования, был осуществлён с использованием программного комплекса «Statistica for Windows 6.0». Для оценки соответствия распределения изучаемых параметров нормальному закону применялся критерий Колмогорова-Смирнова, модифицированный согласно методике Лиллиефорса.

В ситуациях, когда наблюдаемые количественные данные в обеих исследуемых группах следовали нормальному распределению, для анализа статистически значимых отличий между этими группами применялся t-критерий, предложенный ученым по имени Стьюдент. Результаты измерений представлялись в виде формулы $M \pm m$, где символ «M» указывал на среднее значение, «m» обозначал стандартную ошибку среднего, а «n» отражал размер выборки. В обстоятельствах, где распределение данных не следовало

нормальному, применялись непараметрические методы анализа: критерий Вилкоксона для независимых выборок и соответствующий критерий для анализа зависимых выборок использовались для сравнения данных. В этих сценариях ключевыми статистическими характеристиками являлись медиана (Me) и интерквартильный размах, который рассчитывался на основе 25-го и 75-го перцентилей (Q25 и Q75). Это давало возможность более глубоко исследовать распределение значений внутри выборки.

Достоверность различий утверждалась при достижении уровня значимости меньше 0,05, что эквивалентно 5%. В случаях, когда значение уровня значимости было меньше 0,00099, использовалась нотация $p < 0,001$ для его обозначения.

Критерий Спирмена служил основой для проведения корреляционного анализа, при этом пороговое значение для признания результатов значимыми также составляло 5%. Вновь, при обнаружении значений менее 0,00099, принято было применять обозначение $p < 0,001$. В ходе исследования генетических характеристик выбранных групп, использование критерия хи-квадрат (χ^2) было направлено на анализ соответствия распределения генотипов в рамках полиморфизмов установленному принципу равновесия, известному как закон Харди-Вайнберга. Для оценки статистической значимости взаимосвязи между анализируемыми переменными применялся усовершенствованный критерий хи-квадрат по Мантелю-Ханзелу. Этот подход обеспечивал возможность вычисления коэффициента шансов (Odds Ratio, OR), а также определения для него 95-процентного доверительного интервала (Confidence Intervals, CI), обеспечивая тем самым глубину и точность аналитической оценки.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Клинико-морфологическая характеристика

Среди клинико-морфологических проявлений характерными были следующие – субфебрильная температура тела чаще встречалась в группах детей 5-9 и 10-14 лет (63,6 и 58,3 % соответственно, $p < 0,05$, Табл. 3.1). В то время как среди детей 0-4 года статистически значимо было больше детей с температурой 38-39 ° С (44,4 %, $p < 0,05$). Кашель встречался у каждого второго ребенка младшей (0-4 года) и старшей (10-14 лет) возрастной группы (64,5 и 60,0 %, соответственно, $p < 0,05$). Вялость была характерна для детей всех возрастных групп. Снижение аппетита чаще встречалось у детей младшего возраста 0-4 года (Табл. 3.1).

Таблица 3.1 – Жалобы детей при поступлении с новой коронавирусной инфекцией в зависимости от возраста при поступлении и через 2 недели

Клинические проявления	Группы пациентов (%)		
	0-4 лет	5-9 лет	10-14 лет
Температура 37-38 ° С	20,0	63,6 ¹	58,3 ²
Температура 38-39 ° С	44,4	36,4 ¹	16,7 ^{2, 3}
Температура выше 39 ° С	4,8	0	0
Кашель	64,5	27,3 ¹	60,0 ³
Насморк	57,8	64,6	25,5 ^{2, 3}
Вялость	5,6	72,7	50,0
Снижение аппетита	60,0	45,5	33,4 ²
Всего детей	72,5	14,7	12,8

Примечание. ¹ – статистическая значимость ($p < 0,05$) между возрастными группами 0-4 года и 5-9 лет, ² – статистическая значимость ($p < 0,05$) между возрастными группами 0-4 года и 9-14 лет, ³ – статистическая значимость ($p < 0,05$) между возрастными группами 5-9 лет и 9-14 лет

Таблица 3.2 – Гематологические показатели у детей с новой коронавирусной инфекцией в зависимости от возраста при поступлении и через 2 недели

Показатели	Период	Возраст, лет			Норма
		0-4 лет	5-9 лет	10-14 лет	
Эритроциты, $10^9 / л$	До	4,3 (4,0-4,8)	4,3(4,1- 4,7)	4,5 (4,0-5,0)	3,5-5,0 3,9-5,3
	После	4,2 (3,8-4,7)	4,6 (4,1-4,8)	4,7 (4,2-4,9)	4,0-5,2
Гемоглобин, г/л	До	117 (104-125)	115 (116-121)	126 (110-137)	100-140 115-145
	После	119 (108-128)	127 (113-129)	117 (108-127)	120-150
Цветовой показатель	До	0,82 (0,78- 0,88)	0,79 (0,77- 0,81)	0,81 (0,77-0,87)	0,8-1,1
	После	0,81 (0,77- 0,85)	0,79 (0,77- 0,83)	0,80 (0,79-0,84)	

Таблица 3.3 – Показатели коагулограммы у детей с новой коронавирусной инфекцией в зависимости от возраста при поступлении и через 2 недели

Показател и	Перио д	Возраст, лет			Норма
		0-4 лет	5-9 лет	10-14 лет	
Тромбоци ты $10^9 / л$	До	307 (215-383)	236 (214-295) 1	252 (232- 280)	150-390
	После	428 (327-498) 4	300 (276-328) 4	238 (218- 294)	

Протромбиновый индекс, %	92 (80-98)	90 (79-100)	101 (98-102)	70-100
Фибриноген, г/л	2,8 (2,3-3,3)	3,8 (3,2-4,4)	4,09 (3,7-5,1)	1.25-3 1,25-4 2-4
Тромбиновое время, сек	15,9 (13,7-23,6)	16,1 (14,4-18,9)	14,4 (13,9-14,7)	14-18 13-18 15-20

Примечание ¹ – статистическая значимость ($p < 0,05$) между возрастными группами 0-4 года и 5-9 лет, ⁴ – статистическая значимость ($p < 0,05$) между возрастными группами до начала и через 2 недели лечения

3.2. Неспецифическое звено иммунитета и показатели лейкоцитов

Анализ содержания лейкоцитов крови показал умеренное увеличение в динамике возрастных группах 0-4 года и 5-9 лет и уменьшение показателя после лечения по сравнению с содержанием лейкоцитов на момент поступления в группе 10-14 лет. Общий белок соответствовал нормальным показателям и не отличался по содержанию на момент госпитализации и после 2-х недель лечения (табл. 3.4). При анализе лейкоцитарного ростка в группе детей 0-4 года было выявлено увеличение лимфоцитарного индекса и снижение гранулоцитарного. Уровень лимфоцитов был снижен, тенденция снижения сохранялась и через 2 недели. Коэффициент соотношения нейтрофилов к лимфоцитам демонстрирует преобладание нейтрофилов над лимфоцитами крови. У детей 5-9 лет наблюдалось значимое повышение СОЭ после лечения. Выявлено что у детей в группе 0-4 года уровень лимфоцитов периферической крови был ниже, чем показатели возрастной нормы. Через 2 недели в данной группе наблюдалось снижение лимфоцитов крови, по сравнению с их уровнем на момент поступления. В группе детей 10-14 лет наиболее значимыми находками являлись повышение абсолютного и относительного значения лимфоцитарного индекса, а также выраженное

увеличение палочкоядерных нейтрофилов крови, особенно через 2 недели после лечения. Коэффициент соотношения нейтрофилов к лимфоцитам, был больше 1 и отражал возрастные особенности (Табл. 3.4).

Также наблюдалось преобладание нейтрофилов у детей в первые дни жизни в лейкоцитарной формуле со сдвигом влево (62–75 %). Также можно наблюдать изменения в активности миелопоэза и лимфопоэза. Первый перекрест наблюдается на 5-6 день жизни т.к. число нейтрофилов и лимфоцитов становится одинаковым - по 45 %. В результате к 10 –му дню происходит дальнейшее возрастание числа лимфоцитов до 55–60 %. У детей первых 2–5 лет жизни преобладают лимфоциты, но их уровень не должен превышать 65 %.

Таблица 3.4 – Показатели воспаления у детей с COVID-19

Показатели	Возраст, лет	До лечения	После лечения	Нормальные показатели
Общий белок, г/л	0-4	69,4 (64,7-74,4)	68,1 (67,7-75,7)	60,0-80,0
	5-9	72,1 (67,7-75,7)	66,5 (47,5-68,9) ¹	60,0-80,0
	10-14	66,3 (59,1-74,0)	69,7 (67,9-78,7)	60,0-80,0
СОЭ, мм / час	0-4	9,5 (5,6-12,0)	9,2 (7,2-11,0)	2,0-15,0
	5-9	5,0 (3,0-7,0)	11,0 (9,0-24,0) ¹	2,0-15,0
	10-14	8,2 (4,4-9,6)	6,8 (5,9-8,4)	2,0-15,0
Лейкоциты, 10 ⁹ / л	0-4	8,2 (5,5-10,7)	9,4 (7,5-12,2)	4,9-15,5
	5-9	6,0 (4,0-7,6)	8,2 (5,0-8,0)	5,0–14,5
	10-14	8,2 (4,4-8,4)	6,8 (5,9-8,4)	4,5-13,0
Лимфоцитарный индекс, 10 ⁹ / л	0-4	3,9 (2,2-4,6)	3,3 (2,2-3,9)	1,2-3,0
	5-9	3,4 (1,4-4,8)	3,1 (2,1-4,5)	1,2-3,0
	10-14	3,5 (2,0-4,3)	3,2 (1,8-3,7)	1,2-3,0
Лимфоцитарный индекс, %	0-4	45,2 (27,5-57,4)	36,4 (22,3-43,2)	25,0-40,0
	5-9	50,0 (35,4-59,0)	46,8 (42,2-53,7)	25,0-40,0

	10-14	46,4 (32,7-48,9)	42,3 (30,1-46,5)	25,0-40,0
Гранулоцитарный индекс, $10^9 / л$	0-4	4,9 (2,0-9,0)	2,8 (1,0-8,7)	1,2-6,8
	5-9	2,5 (2,2-2,8)	2,8 (2,4-3,3)	1,2-6,8
	10-14	2,2 (1,6-3,1)	2,4 (1,8-2,9)	1,2-6,8
Гранулоцитарный индекс, %	0-4	35,9 (26,8-59,2)	49,0 (39,3-64,8)	47,0-72,0
	5-9	41,9 (34,1-55,5)	43,3 (39,4-46,3)	47,0-72,0
	10-14	47,3 (36,4-51,8)	49,2 (39,0-52,7)	47,0-72,0
Лимфоциты, %	0-4	30,8 (20,0-39,0)	25,6 (16,0-39,0)	37,0-60,0
	5-9	42,0 (32,0-47,0)	37,0 (27,0-39,0)	30,0-50,0
	10-14	44 (31-52)	38 (30-43)	30,0-45,0
Палочко-ядерные нейтрофилы, %	0-4	9,0 (6,0-13,0)	7,0 (5,0-15,0)	0-5,0
	5-9	15,3 (8,0-26,0)	12,3 (8,0-15,0)	0-5,0
	10-14	12,0 (8,1-21,2)	16,0 (11,5-27,8) ¹	0-5,0
Сегменто-ядерные нейтрофилы, %	0-4	39,1 (31,0-49,0)	44,6 (16,0-49,0)	29,0-54,0
	5-9	37,6 (25,0-50,0)	40,6 (36,0-46,0)	39,0-64,0
	10-14	39,4 (27,1-48,2)	42,4 (36,1-52,0)	46,0-66,0
ИСНЛ, у.е.	0-4	1,54 (1,35-1,67)	1,96 (1,31-2,11)	1,0
	5-9	1,26 (1,03-1,62)	1,43 (1,25-1,56)	Более 1,0
	10-14	1,15 (1,12-1,32)	1,51 (1,36-1,84)	Более 1,0

Примечание. ИСЛН – коэффициент соотношения нейтрофилов к лимфоцитам крови. ¹ – статистическая значимость ($p < 0,05$) между показателями до лечения и после лечения.

3.3 Показатели иммунофенотипа лимфоцитов

При анализе показателей субпопуляций лимфоцитов периферической крови было показано, что во время острой фазы у детей с новой

коронавирусной инфекцией уровень Т-лимфоцитов (CD3+CD4+), Т-цитотоксических лимфоцитов (CD3+CD8+) и соотношения CD4+/CD8+ соответствовали возрастной норме. (рис. 7, Табл. 3.5).

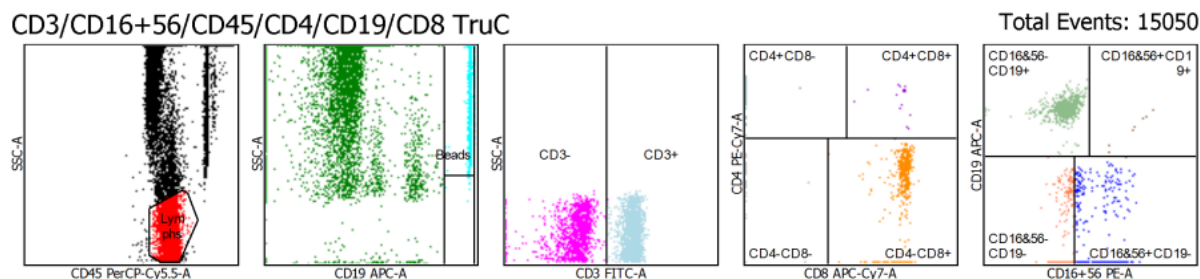


Рисунок 7. Распределение CD-маркеров субпопуляций лимфоцитов у детей с новой коронавирусной инфекцией, результаты цитофлуориметрического анализа

Таблица 3.5 – Показатели субпопуляций лимфоцитов у детей с COVID-19 инфекцией

Субпопуляции лимфоцитов	Абсолютные значения, $10^9 / л$	Относительные значения, %	Нормальные показатели, %
Т-лимфоциты CD3+	1793,63 (1604,0-1964,9)	70,9 (67,1-74,0)	62-69
Т-лимфоциты хелперы CD3+CD4+	969,35 (872,5-1007,39)	39,4 (35,6-41,8)	30-40
Т-цитотоксические лимфоциты CD3+CD8+	679,78 (591,93-750,45)	24,4 (20,3-27,4)	25-32
НК-лимфоциты CD16+CD5 +	233,05 (199,4-259,66)	6,1 (5,1-6,0)	8-15
В-лимфоциты CD19+	513,75 (297,83-637,18)	18,8 (14,0 -22,9)	21-28
Соотношение CD4+/CD8+	1,42 (1,33-1,98)		1,1-1,4

Уровень Т-лимфоцитов периферической крови (CD3+) имел тенденцию к увеличению показателя. В то время как В-лимфоциты (CD19+) и NK-лимфоциты (CD16+CD56+) были ниже пределов возрастной нормы.

3.4 Анализ частот встречаемости аллельных вариантов полиморфных генов

В результате проведенного исследования было показано, что распределение полиморфных вариантов генотипов ИЛ-2 отличалось во всех 3-х обследованных группах. У детей доминирующим был гетерозиготы и гомозиготы GG, которые почти в 2 раза превышали частоту встречаемости данного генотипа у взрослых пациентов и здоровых доноров (Табл. 3.6).

Таблица 3.6 – Частота аллелей и генотипов генов T-330G IL-2 в исследованных группах

IL2-330	Всего n (%)	Дети n (%)	Взрослые n (%)	Контроль n (%)
Генотипы				
TT	49 (33,9)	12 (26,7)	37 (37,0)	27 (54,0)
TG	63 (43,4)	19 (42,2)	44 (44,0)	14 (28,0)
GG	33 (22,7)	14 (31,1)	19 (19,0)	9 (18,0)
Аллели				
T	161 (55,6)	43 (47,8)	118 (59,0)	68 (68,0)
G	129 (44,4)	47 (52,2)	82 (41,0)	32 (32,0)

При сравнении межгрупповых различий было выявлено, что частота встречаемости гомозиготных генотипов GG и TT имела статистически значимые различия между группой детей и контролем. В группе взрослых пациентов с инфекцией COVID-19 статически значимо различалась частота гомозиготного генотипа TT и гетерозиготного GT при сравнении с контрольной группой (рис. 8).

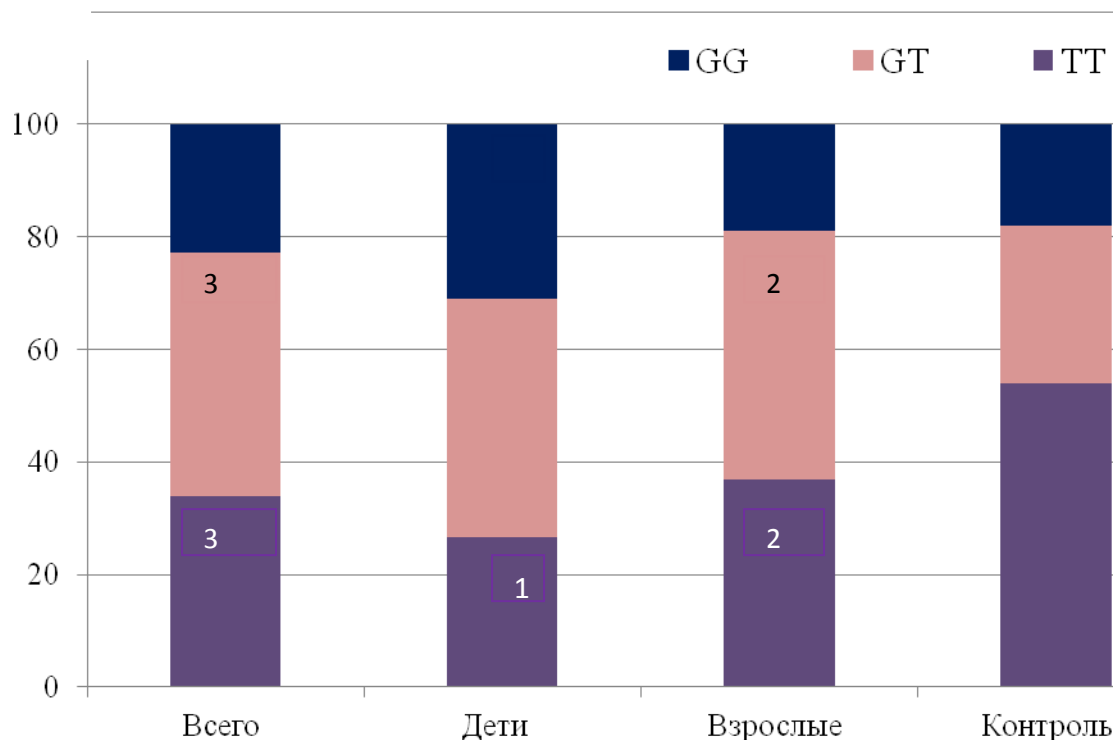


Рисунок 8. Сравнительная характеристика комбинаций аллельных вариантов полиморфизма T-330G гена IL-2 у взрослых и детей с инфекцией COVID-19

При анализе критерия отношения шансов установлено, что у детей и взрослых с инфекцией COVID-19 генотип TT был ассоциирован с низким риском развития новой коронавирусной инфекции. В то время как рискованные генотипы у взрослых и детей различались – GT и GG соответственно (Табл. 3.7).

Было показано у взрослых СС, в то время как генотип TT – редкий. Такая же тенденция распределения наблюдалась и в группе контроля. У детей частота встречаемости была одинаковой для СС и СТ (Табл. 3.8).

Таблица 3.7 – Значение критерия отношения шансов риска развития новой коронавирусной инфекции с полиморфизмом Т-330G гена IL-2

Генотип	Критерий сопряженности (χ^2)	Критерий отношения шансов (OR)	95 % доверительный интервал (CI)		Уровень значимости p
			Нижний Предел	верхний предел	
<i>У детей с инфекцией COVID-19</i>					
TT	14,026	0,315	0,174	0,569	0,001
TG	3,714	1,862	1,032	3,360	0,054
GG	3,892	2,047	1,054	3,973	0,042
<i>У взрослых с инфекцией COVID-19</i>					
TT	5,162	0,500	0,284	0,880	0,024
GT	4,883	2,020	1,122	3,640	0,028
GG	0	1,069	0,523	2,182	1,0

Примечание. Жирным шрифтом выделены достоверные результаты.

Таблица 3.8 – Частота аллелей и генотипов генов С-589Т IL-4 в исследованных группах

IL4-589	Всего n (%)	Дети n (%)	Взрослые n (%)	Контроль n (%)
Генотипы				
CC	96 (57,2)	32 (47,1)	64 (64,0)	41 (56,9)
CT	63 (37,5)	29 (42,6)	34 (34,0)	25 (34,8)
TT	9 (5,3)	7 (10,3)	2 (2,0)	6 (8,3)

Аллели				
С	255 (75,9)	93 (68,4)	162 (81,0)	107 (74,3)
Т	81 (24,1)	43 (31,6)	38 (19,0)	37 (27,5)

Статически значимые различия по частоте встречаемости мутантного генотипа СС были показаны между группой детей и взрослых (рис. 9).

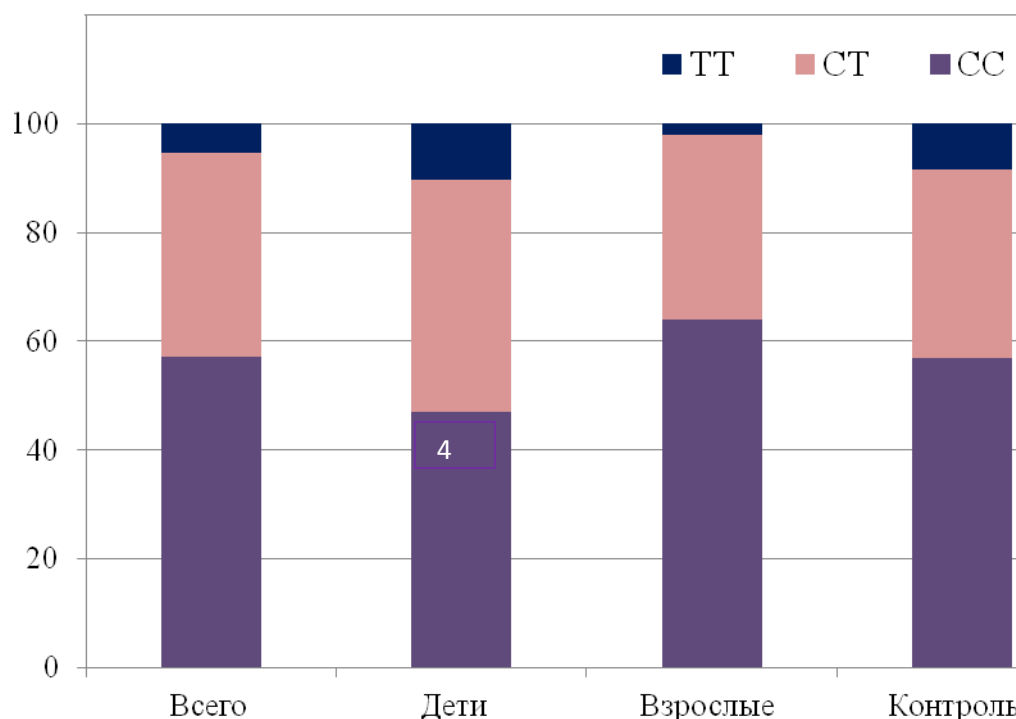


Рисунок 9. Сравнительная характеристика комбинаций аллельных вариантов полиморфизма С-589Т гена IL4 у взрослых и детей с инфекцией COVID-19

При проведении статического анализа не было выявлено каких-либо различий или ассоциированности генотипов с заболеванием новой коронавирусной инфекцией ни у детей, ни у взрослых (Табл. 3.9).

Таблица 3.9 – Значение критерия отношения шансов риска развития новой коронавирусной инфекции с полиморфизмом С-589Т гена IL4

Генотип	Критерий сопряженности (χ^2)	Критерий отношения шансов (OR)	95 % доверительный интервал (CI)		Уровень значимости, p
			нижний предел	верхний предел	
<i>У детей с инфекцией COVID-19</i>					
СС	1,623	0,669	0,383	1,168	0,203
СТ	1,030	1,401	0,792	2,479	0,311
ТТ	0,061	1,278	0,482	3,384	0,805
<i>У взрослых с инфекцией COVID-19</i>					
СС	0,753	1,341	0,759	2,369	0,386
СТ	0	0,957	0,534	1,714	1,0
ТТ	2,632	0,233	0,049	1,134	0,105

Примечание. Жирным шрифтом выделены достоверные результаты.

В результате анализа полиморфизма гена интерлейкина-6 было показано, что наиболее частым в группе взрослых и в группе детей был гетерозиготный генотип CG (таблица 3.10). Вторым по частоте встречаемости и у взрослых, и у детей был СС гомозиготный генотип. Его частота превышала таковую в группе контроля. Наиболее редким в группе пациентов (как детей, так и взрослых) был GG.

Межгрупповые различия были установлены при сравнении группы детей и контрольной группы, и при сравнении группы взрослых и контроля – гомозиготный GG (рис. 10).

Таблица 3.10 – Частота аллелей и генотипов генов С-174G IL-6 в исследованных группах

IL6 -174	Всего n (%)	Дети n (%)	Взрослые n (%)	Контроль n (%)
Генотипы				
CC	44 (26,2)	15 (22,1)	29 (29,0)	27 (18,9)
CG	99 (58,9)	44 (64,7)	55 (55,0)	70 (48,9)
GG	25 (14,9)	9 (13,2)	16 (16,0)	46 (32,2)
Аллели				
С	187 (55,6)	74 (54,5)	113 (56,5)	124 (43,4)
G	149 (44,5)	62 (45,5)	87 (43,5)	162 (56,6)

На основании анализа критерия шансов было показано, что у детей с риском развития новой коронавирусной инфекции ассоциирован - гетерозиготный CG. Проективным эффектом как у взрослых, так и у детей обладает гомозиготный GG (Табл. 3.11).

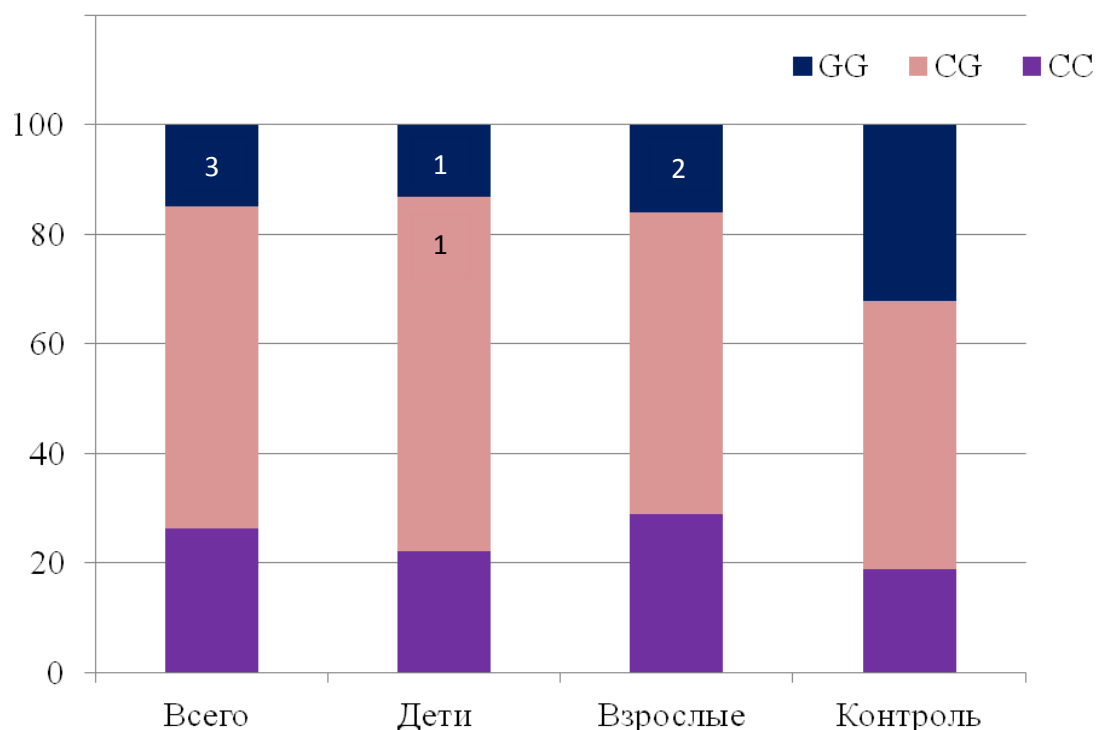


Рисунок 10. Сравнительная характеристика комбинаций аллельных вариантов полиморфизма С-174G гена IL-6 у взрослых и детей с инфекцией COVID-19

Таблица 3.11 – Значение критерия отношения шансов риска развития новойкоронавирусной инфекции с полиморфизмом С-174G гена IL-6

Генотип	Критерий сопряженности (χ^2)	Критерий отношения шансов (OR)	95 % доверительный интервал (CI)		Уровень значимости p
			нижний предел	верхний предел	
<i>У детей с инфекцией COVID-19</i>					
CC	0,123	1,202	0,604	2,393	0,727
CG	4,590	1,933	1,095	3,411	0,033
GG	9,290	0,318	0,155	0,651	0,003
<i>У взрослых с инфекцией COVID-19</i>					
CC	2,220	1,741	0,900	3,371	0,137
CG	0,501	1,272	0,730	2,218	0,480
GG	6,168	0,405	0,205	0,799	0,014

Примечание. Жирным шрифтом выделены достоверные результаты.

Анализ распространенности генотипов показала, что у детей наиболее частым является – GA, такая же тенденция характерна и для взрослых, и для группы контроля (таблица 3.12).

Таблица 3.12 – Частота аллелей и генотипов генов G-1082A IL-10 в исследованных группах

IL10 -1082	Всего n (%)	Дети n (%)	Взрослые n (%)	Контроль n (%)
Генотипы				
GG	27 (16,1)	10 (14,7)	17 (17,0)	20 (25,6)
GA	86 (51,2)	33 (48,5)	53 (53,0)	38 (48,8)
AA	55 (32,7)	25 (36,8)	30 (30,0)	20 (25,6)
Аллели				
G	140 (41,7)	53 (38,9)	87 (43,5)	78 (50,0)
A	196 (58,3)	83 (61,1)	113 (56,5)	78 (50,0)

Статистически значимых межгрупповых различий выявлено не было (рис. 11).

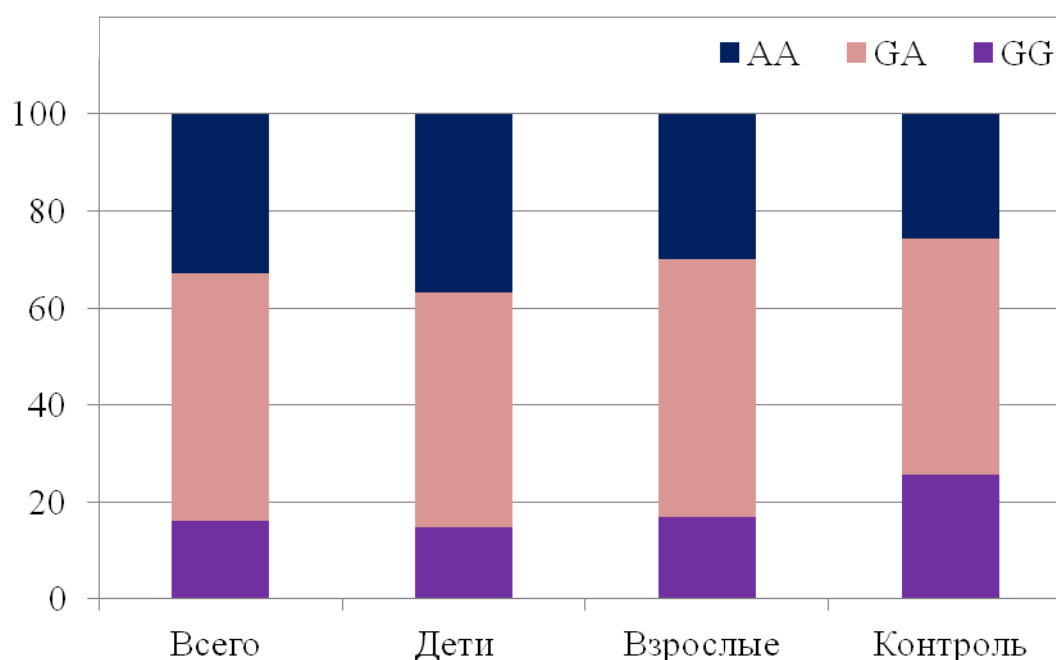


Рисунок 11. Сравнительная характеристика комбинаций аллельных вариантов полиморфизма G-1082A гена IL-10 у взрослых и детей с инфекцией COVID-19

Анализ отношения шансов показал, что патогенетического значения между полиморфизмом генов и риском развития новой коронавирусной инфекции в исследованных группах выявлено не было (Табл. 3.13).

Таблица 3.13 – Значение критерия отношения шансов риска развития новой коронавирусной инфекции с полиморфизмом G-1082A гена IL-10

Генотип	Критерий сопряженности (χ^2)	Критерий отношения шансов (OR)	95 % доверительный интервал (CI)		Уровень значимости, p
			нижний предел	верхний предел	
<i>У детей с инфекцией COVID-19</i>					
GG	1,068	0,502	0,247	1,019	0,080

GA	0,020	1,0	0,574	1,741	0,888
AA	2,317	1,672	0,914	3,057	0,128
<i>У взрослых с инфекцией COVID-19</i>					
GG	1,896	0,583	0,293	1,159	0,169
GA	0,180	1,174	0,674	2,044	0,672
AA	0,223	1,220	0,657	2,264	0,637

Примечание. Жирным шрифтом выделены достоверные результаты.

Результаты исследования полиморфизма G-308A гена TNFA позволяли установить преобладание генотипа GG над другими вариантами и комбинациями полиморфизма гена. Тенденция была характерна и для группы контроля (Табл. 3.14).

Таблица 3.14 – Частота аллелей и генотипов генов G-308A TNFA в исследованных группах

TNFA -308	Всего n (%)	Дети n (%)	Взрослые n (%)	Контроль n (%)
Генотипы				
GG	124 (75,6)	51 (75,0)	73 (76,1)	36 (59,0)
GA	34 (20,7)	14 (20,6)	20 (20,8)	18 (29,5)
AA	6 (3,7)	3 (4,4)	3 (3,1)	7 (11,5)
Аллели				
G	282 (85,9)	116 (85,3)	166 (86,5)	90 (73,8)
A	46 (14,1)	20 (14,7)	26 (13,5)	32 (26,2)

Межгрупповой анализ позволили установить статистически значимые различия между группой детей и контролем по частоте встречаемости GG, между группой взрослых и контроле (GG и AA) (рис. 12).

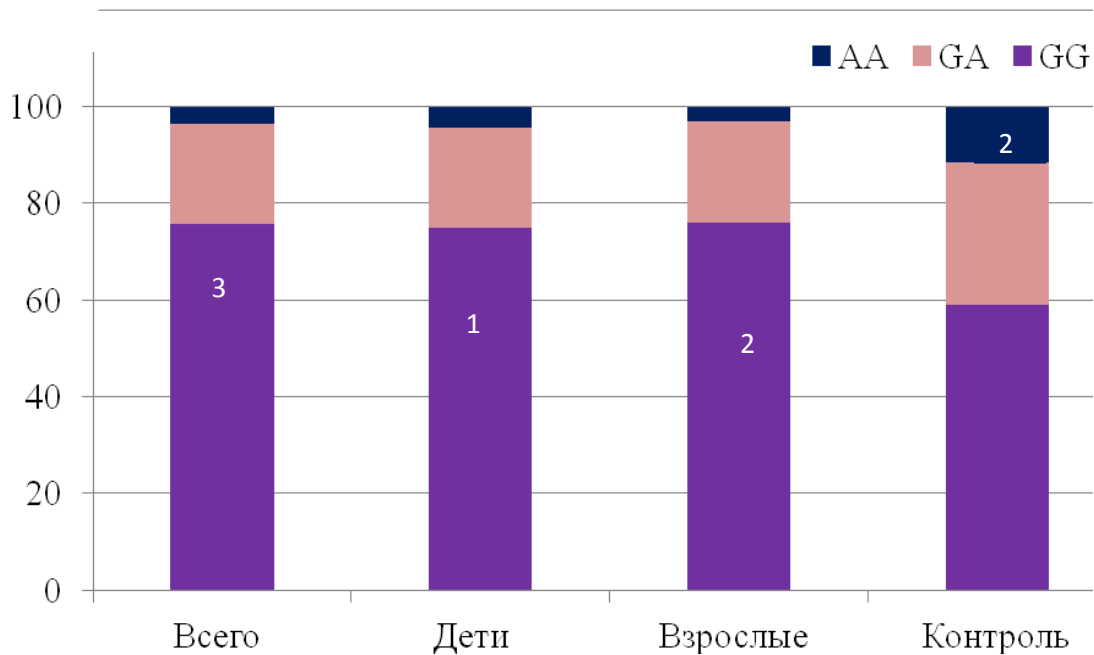


Рисунок 12. Сравнительная характеристика комбинаций аллельных вариантов полиморфизма G-308A гена TNFA у взрослых и детей с инфекцией COVID-19

Анализ ассоциации показал, что у детей и у взрослых риск развития новой коронавирусной инфекции ассоциирован с генотипом GG. В то время как сниженный риск развития заболевания можно ожидать у взрослых носителей генотипа AA (Табл. 3.15).

Таблица 3.15 – Значение критерия отношения шансов риска развития новой коронавирусной инфекции с полиморфизмом G-308A гена TNFA

Генотип	Критерий сопряженности (χ^2)	Критерий отношения шансов (OR)	95 % доверительный интервал (CI)		Уровень значимости p
			нижний предел	верхний предел	
<i>У детей с инфекцией COVID-19</i>					
GG	5,088	2,085	1,141	3,810	0,025

GA	1,684	0,620	0,326	1,181	0,195
AA	3,329	0,306	0,095	0,983	0,069
<i>У взрослых с инфекцией COVID-19</i>					
GG	5,835	2,201	1,198	4,041	0,016
GA	1,684	0,620	0,326	1,181	0,195
AA	4,613	0,227	0,062	0,830	0,032

Примечание. Жирным шрифтом выделены достоверные результаты.

В результате исследования частоты встречаемости аллельных комбинаций полиморфизма G-1082A гена TNFAIP3 было показано, что их частота встречаемости резко различается у взрослых и детей (Табл. 3.16). Если для детей был характерен тренд аналогичный группе контроля, то у взрослых как раз наоборот.

Таблица 3.16 – Частота аллелей и генотипов генов G-1082A TNFAIP3 в исследованных группах

TNFAIP3 -1082	Всего n (%)	Дети n (%)	Взрослые n (%)	Контроль n (%)
Генотипы				
TT	76 (45,3)	50 (73,5)	26 (26,0)	58 (80,5)
TG	89 (52,9)	15 (22,1)	74 (74,0)	12 (16,7)
GG	3 (1,8)	3 (4,4)	0 (0)	2 (2,8)
Аллели				
T	141 (59,7)	115 (84,5)	126 (63,0)	128 (88,9)
G	95 (40,3)	21 (15,5)	74 (37,0)	16 (11,1)

Межгрупповой анализ показал, что частота встречаемости обоих генотипических вариантов в группе взрослых пациентов имеет статистически значимые различия. Кроме того, оба варианта достоверно отличается у детей и взрослых (рис. 13).

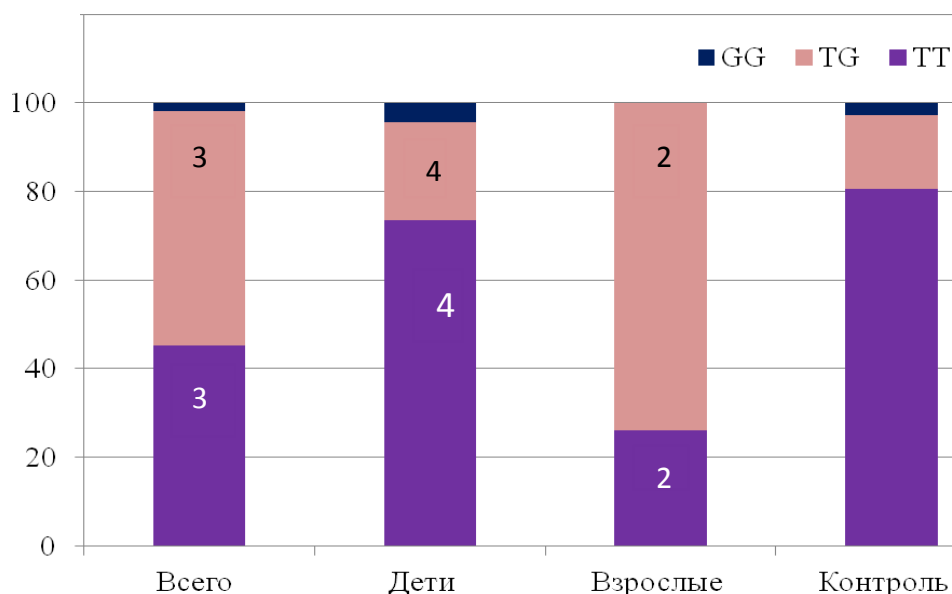


Рисунок 13. Сравнительная характеристика комбинаций аллельных вариантов полиморфизма G-1082A гена TNFAIP3 у взрослых и детей с инфекцией COVID-19

На основании анализа критерия отношения шансов было установлено, что у взрослых риск развития новой коронавирусной инфекции ассоциирован с генотипом TG. В то время как у носителей генотипа TT он снижен (Табл. 3.17).

Таблица 3.17 – Значение критерия отношения шансов риска развития новой коронавирусной инфекции с полиморфизмом G-1082A гена TNFAIP3

Генотип	Критерий сопряженности (χ^2)	Критерий отношения шансов (OR)	95 % доверительный интервал (CI)		Уровень значимости, p
			нижний предел	верхний предел	
<i>У детей с инфекцией COVID-19</i>					
TT	1,032	0,668	0,342	1,305	0,310
TG	0,510	1,377	0,681	2,785	0,476

GG	0	1,347	0,294	6,180	1,0
<i>У взрослых с инфекцией COVID-19</i>					
TT	58,607	0,082	0,042	0,161	0,001
TG	63,232	13,896	6,991	27,621	0,001
GG	-	-	-	-	-

Примечание. Жирным шрифтом выделены достоверные результаты.

Анализ распространенности генотипов у взрослых и детей с новой коронавирусной инфекцией показал отсутствие различий у взрослых по сравнению с контролем (Табл. 3.18). В то время как у детей доминирующий и редкий генотипы были отличны как по сравнению со взрослыми, так и по сравнению с контролем (рис. 14).

Таблица 3.18 – Частота аллелей и генотипов генов C-159T CD14 в исследованных группах

CD14 -159T	Всего n (%)	Дети n (%)	Взрослые n (%)	Контроль n (%)
Генотипы				
CC	55 (32,8)	24 (35,8)	31 (31,0)	43 (32,1)
CT	89 (52,9)	42 (61,8)	47 (47,0)	62 (46,3)
TT	24 (14,3)	2 (2,9)	22 (22,0)	29 (21,6)
Аллели				
C	199 (59,2)	90 (66,2)	109 (54,5)	148 (55,3)
T	137 (40,8)	46 (33,8)	91 (45,5)	120 (44,7)

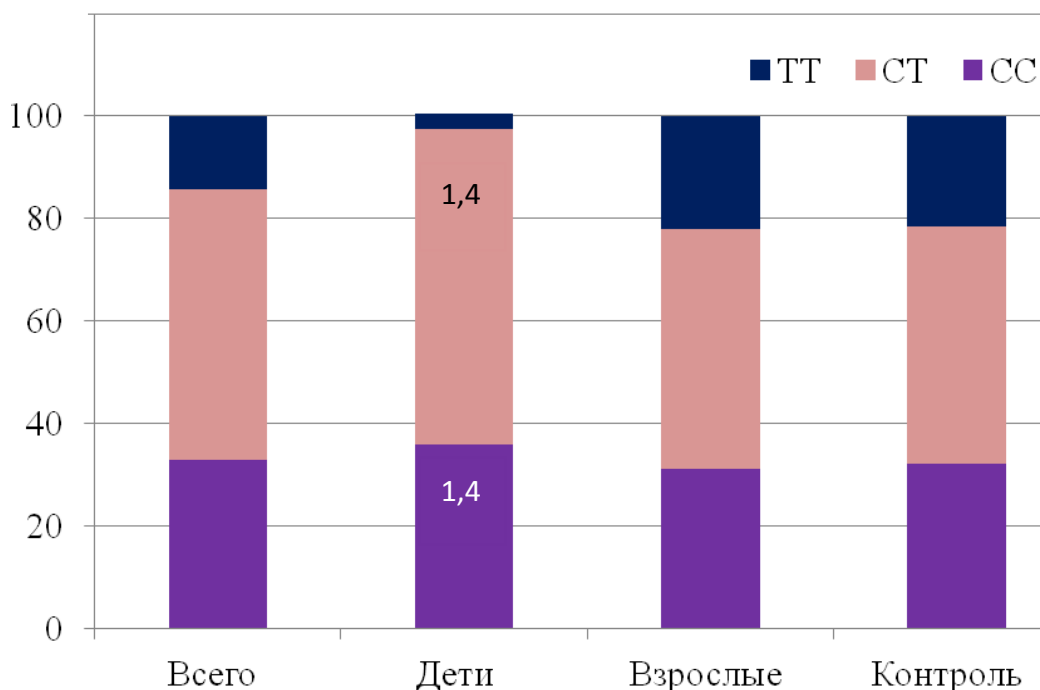


Рисунок 14. Сравнительная характеристика комбинаций аллельных вариантов полиморфизма С-159Т гена CD14 у взрослых и детей с инфекцией COVID-19

Анализ риска развития критерия отношения шансов позволил установить, что у детей риск развития новой коронавирусной инфекции ассоциирован с генотипом СТ, протективным генотипом является – ТТ (Таблица 3.19).

Таблица 3.19 – Значение критерия отношения шансов риска развития новой коронавирусной инфекции с полиморфизмом С-159Т гена CD14

Генотип	Критерий сопряженности (χ^2)	Критерий отношения шансов (OR)	95 % доверительный интервал (CI)		Уровень значимости, р
			нижний предел	верхний предел	
<i>У детей с инфекцией COVID-19</i>					
CC	0,201	1,195	0,665	2,148	0,655
CT	4,529	1,915	1,090	3,365	0,034

ТТ	14,811	0,110	0,032	0,380	0,001
<i>У взрослых с инфекцией COVID-19</i>					
СС	0	0,955	0,526	1,734	1,0
СТ	0	1,041	0,597	1,815	1,0
ТТ	0	1,0	0,512	1,953	1,0

Примечание. Жирным шрифтом выделены достоверные результаты.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ И АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В связи с глобальным распространением инфекции, вызванной новым коронавирусом, возникла насущная потребность в идентификации клинических и лабораторных маркеров. Эти маркеры необходимы для прогнозирования течения заболевания, определения риска перехода в тяжелую форму и возможности летального исхода. Важность этого исследования обусловлена стремлением к своевременному выявлению пациентов с высоким риском осложнений, что позволит нацелить усилия на предотвращение наиболее тяжелых последствий инфекции [11, 12]. В нашем исследовании нам не удалось выявить специфических морфологических проявлений у детей с новой коронавирусной инфекцией, которые были бы специфичны для SARS-CoV-2. Подобные закономерности сопоставимы и с данными других авторов. Считается, что легкие у детей находятся в состоянии развития, неонатальные легочные эндотелиальные клетки имеют лучшую сохранность легочного барьера [75], в связи с чем заживление легких происходит лучше, а развитие фиброза – в меньшей степени [50]. Показано, что большинство клинических показателей нормализовались на ранней стадии выздоровления. Однако для функциональных показателей иммунной системы нормализация показателей не отмечалась [75].

В результате создания специализированных лабораторных индикаторов становится возможным эффективное разделение пациентов на группы по степени риска. Это, в свою очередь, позволяет целенаправленно включать в интервенционные исследования тех, кто находится под угрозой развития осложнений. Особое внимание уделяется изучению вероятности возникновения постковидных осложнений и процессов, приводящих к хроническому течению болезни среди лиц без явных симптомов [15, 75].

Вирус SARS-CoV-2 приводит к усилению поляризации активированных макрофагов в сторону макрофагов 1 типа, что в свою очередь, усиливает экспрессию TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, активирует Т-клетки и нейтрофилы [13, 72, 79].

Нами установлено, что увеличение количества лейкоцитов периферической крови у детей было связано с повышенным содержанием нейтрофилов, для лимфоцитов и моноцитов имела место обратная тенденция.

Считается, что большинство Т-клеток у новорожденных и детей младшего возраста незрелые и играют важную роль в подавлении иммунных реакций, развитии толерантности, а моноцитарно-макрофагальная система характеризуется нарушением продукции провоспалительных цитокинов [30, 50]. Анализ литературы демонстрирует, что SARS-CoV-2 относится к лимфотропным вирусам, у взрослых увеличение лимфоцитов крови является неблагоприятным фактором, отражая компенсаторное накопление данных клеток [37].

Нами было выявлено, что лимфоциты периферической крови у детей до 4-х лет были ниже возрастной нормы, в то время как у детей группы 5-9 лет и 10-14 лет находились в границах возрастных норм. Нейтрофилы характеризовались увеличением продукции с выраженным сдвигом влево, однако уровни сегментоядерных нейтрофилов не выходили за верхние границы возрастных норм.

Исследования, проведенные различными учеными, демонстрируют, что индекс соотношения нейтрофилов к лимфоцитам (ИСНЛ) служит предиктором степени воспалительного процесса и возможности негативного развития клинической картины заболевания, когда его значение превышает три. [33, 39, 71]. В нашем исследовании ИСНЛ не характеризовался избыточным ростом показателя. У детей младшей группы (0-4 года) характеризовался динамикой увеличения через 2 недели после лечения и был связан с развитием лимфопении. Отмечено что выраженная лимфопения может наблюдаться на фоне нормального или повышенного количества

лейкоцитов [73, 62]. Точность данного предиктора требует изучения и объяснения механизмов [3, 33].

Снижение количества лимфоцитов в периферической крови может быть вызвано мобилизацией иммунных клеток к местам инфекции, например, к легким. Другим объясняющим механизмом является направленное разрушение лимфоцитов вирусом SARS-CoV-2 [48].

Так же неоднозначна роль нейтрофилов в патогенезе новой коронавирусной инфекции. С одной стороны, нейтрофилы наиболее эффективны при бактериальных инфекциях, однако они также имеют значение и в противовирусной защите. В частности, по данным литературы отмечено, что более тяжелое течение новой коронавирусной инфекции связано с повышением соотношения нейтрофилов к лимфоцитам и гиперэкспрессией IL-6 и IL-8 [55]. В целом роль нейтрофилов охарактеризована как предиктор плохого исхода, ассоциированного с развитием тромбозов и легочных инфильтратов. Сдвиг в сторону незрелых нейтрофилов может быть драйвером гипервоспаления и усугубления тяжести заболевания [53, 59].

У пациентов со средней степенью тяжести отмечается повышение уровня CD3+CD4+ и CD3+CD8+ лимфоцитов, что положительно влияет на более быстрое разрешение инфекции [75]. При этом происходит перераспределение субпопуляций лимфоцитов в сторону снижения В-лимфоцитов (CD19+) и NK-лимфоцитов (CD16+CD56+) [45].

В нашем исследовании было установлено, что наиболее значимые изменения субпопуляционного состава лимфоцитов касались снижения NK-лимфоцитов (CD16+CD56+) и В-лимфоцитов (CD19+) ниже пределов возрастной нормы.

Снижение NK-лимфоцитов (CD16+CD56+) является характерным проявлением при вирусной инфекции, и описан при SARS-CoV-2-инфекции [17]. Аналогичные изменения в виде снижения NK-лимфоцитов характерны и у взрослых. Известно, NK-лимфоциты распознают

инфицированные клетки. После активации дегрануляция NK-лимфоцитов вызывает высвобождение перфорины и гранзима, которые непосредственно лизируют инфицированные клетки. Это так называемая антителозависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, NK-клетки взаимодействуют с дендритными клетками в процессе антигенпрезентации и влияют на адаптивный иммунный ответ.

ВЫВОДЫ

1. В исследовании показано, что у детей с новой коронавирусной инфекцией наблюдается дисбаланс гранулоцитарного и лимфоцитарного звена, наиболее выраженный для детей младшего (0-4 года) и среднего (5-9 лет) возрастной групп. Изменения субпопуляционного состава лимфоцитов характеризуется снижением NK-лимфоцитов(CD16+CD56+).

2. Установленные изменения характеризуются как специфичные для большинства вирусных инфекций, но в тоже время отражают патогенетическую специфику SARS-CoV-2-инфекции, как совокупность возрастных особенностей функционирования иммунной системы и этиотропного действия вируса.

3. Понимание механизмов патогенеза новой коронавирусной инфекции у детей с определением роли и динамики изменения иммунных клеток периферической крови (нейтрофилов, лимфоцитов) позволит не только определить тактику лечения детей, профилактику развития осложненных и тяжелых форм заболевания, но и определить показания и противопоказания к вакцинации детей, особенно, в группах часто болеющих и с врожденными формами иммунодефицитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абатуров А.Е. Патогенез COVID-19 / А.Е. Абатуров, Е.А. Агафонова, Е.Л. Кривуша, А.А. Никулина // *Zdorov'e Rebenka*. – 2020. – Вып. №15(2):133-144. doi: 10.22141/2224-0551.15.1.2020.200598
2. Александрович Ю.С. Ведение детей с заболеванием, вызванным новой коронавирусной инфекцией (SARS-CoV-2) / Ю.С. Александрович, Е.Н. Байбарина, А.А. Баранов // *Педиатрическая фармакология*. – 2020. – Вып. 17 (2). – С. 103–118. doi: 10.15690/pf.v17i2.2096
3. Губенко Н.С. Связь показателей общего анализа крови с тяжестью течения COVID-19 у госпитализированных пациентов / Н.С. Губенко, А.А. Будко, А.Г. Плисюк // *Южно-Российский журнал терапевтической практики*. – 2021. – Т. 2. – №1. – С. 90-101. DOI: 10.21886/2712-8156-2021-2-1-90-101.
4. Заболевание COVID-19 у детей и подростков Научная справка 29 сентября 2021 г. [Электронный ресурс]: режим доступа: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/345575/WHO-2019-nCoV-Sci-Brief-Children-and-adolescents-2021.1-rus.pdf> (Дата обращения 15.03.2023).
5. Заплатников А.Л. COVID-19 и дети / А.Л. Заплатников, В.И. Свинцицкая // *РМЖ*. – 2020. – Вып. 1. – С.1–3.
6. Ларина В. Н., Головкин М. Г., Ларин В. Г. Влияние коронавирусной инфекции (сovid-19) на сердечно-сосудистую систему / В. Н. Ларина, М. Г. Головкин, В. Г. Ларин. *Вестник РГМУ* 2. – 2020. – Р. 5-13
7. Мелехина Е.В. Клинические особенности течения COVID-19 у детей различных возрастных групп. Обзор литературы к началу апреля 2020 года / Е.В. Мелехина, А.В. Горелов, А.Д. Музыка // *Вопросы практической педиатрии*. 2020; 15(2): 7–20. (In Russian). DOI: 10.20953/1817-7646-2020-2-7-20
8. Намазова-Баранова Л.С. Коронавирусная инфекция (COVID-19) у детей (состояние на апрель 2020). *Педиатрическая фармакология*. – 2020. – Вып. 17 (2). – С. 85–94. doi: 10.15690/pf.v17i2.2094,

9. Намазова-Баранова Л.С. Коронавирусная инфекция у детей (состояние на февраль 2020) / Л.С. Намазова-Баранова, А.А. Баранов // Педиатрическая фармакология. – 2020. – Вып. 17 (1). – С. 7–11. doi: 10.15690/pf.v17i1.2076
10. Педиатрические данные. [Электронный ресурс]: режим доступа: <https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/#pediatric-data> (Дата обращения 28.10.2022)
11. Понежева Ж. Б. Клинико-лабораторная характеристика тяжелых форм новой коронавирусной инфекции / Ж. Б. Понежева, А. А. Гришаева, Л. К. Алимова, и др. // Терапия. – 2022. – №3. – С. 7-13 DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/therapy.2022.3.7-13>
12. Сухомлинова И. М. Клинико-лабораторные и инструментальные предикторы эффективности противовоспалительной терапии при COVID-19 / И. М. Сухомлинова, И. Г. Бакулин, М. Ю. Кабанов // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2022. – Т. 14. – № 3. – С. 53-60. DOI: <https://doi.org/10.17816/mechnikov109536>
13. Aberdein J.D., Cole J., Bewley M.A., Marriott H.M., Dockrell D.H. Alveolar Macrophages in Pulmonary Host Defence the Unrecognized Role of Apoptosis as a Mechanism of Intracellular Bacterial Killing. Clin. Exp. Immunol. 2013. 174. P. 193–202.
14. Argun M. Lymphocyte Subsets in Mild COVID-19 Pediatric Patients / M. Argun, D. B. İnan , H. T. Hörmet Öz, et al. // Turk. Arch. Pediatr. – 2022. – Vol.57(2). – P.210-215 DOI: 10.5152/TurkArchPediatr.2022.21245
15. Bacher P. Low-avidity CD4(+) T cell responses to SARS-CoV-2 in unexposed individuals and humans with severe COVID-19 / P. Bacher, E. Rosati, D. Esser et al. // Immunity. – 2020. – Vo. 53. – P. 1258–1271.
16. Bouadma L. Severe SARS-CoV-2 infections: practical considerations and management strategy for intensivists / L. Bouadma, F. Lescure, J. Lucet, Y. Yazdanpanah, J.F. Timsit // Intensive Care Med. – 2020. – Vol. 46(4). – P. 579–582. doi:10.1007/s00134-020-05967-x

17. Casado J. L. Expansion of CD56^{dim}CD16^{neg} NK Cell Subset and Increased Inhibitory KIRs in Hospitalized COVID-19 Patients / J. L. Casado, E. Moraga, P. Vizcarra, et al. // *Viruses*. – 2022. – Vol.14 (1). – P. 46. doi: 10.3390/v14010046
18. Centers for Disease Control and Prevention. Care for Breastfeeding Women [Электронный ресурс]: режим доступа: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/care-for-breastfeeding-women> (дата посещения 01.04.2020).
19. Chan J.F. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster / J.F. Chan, S. Yuan, K.H. Kok // *Lancet*. – 2020. – Vol. 395. – P. 514–523.
20. Chen N. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study / N. Chen, M. Zhou, X. Dong et al. // *Lancet*. – 2020. – Vol. 395(10223). – P. 507– 513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
21. Chen Z.M. Diagnosis and treatment recommendations for pediatric respiratory infection caused by the 2019 novel coronavirus / Z.M. Chen, J.F. Fu, Q. Shu, Y.H. Chen, C.Z. Hua, F.B. Li et al. // *World J Pediatr*. – 2020. DOI: 10.1007/s12519-020-00345-5
22. COVID Data Tracker. [Электронный ресурс]: режим доступа: <https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/#pediatric-data>. (Дата обращения 28.10.2022).
23. Fan C, Lei D, Fang C, et al. Perinatal transmission of COVID-19 associated SARS-CoV-2: should we worry? / C. Fan, D. Lei, C. Fang et al. // *Clin Infect Dis*. 2020:ciaa226. doi:10.1093/cid/ciaa226
24. Fang F. Recommendations for the diagnosis, prevention, and control of the 2019 novel coronavirus infection in children (first interim edition) / F. Fang, D. Zhao, Y. Chen // *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. – 2020. – Vol. 145.
25. Gao Y. Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19 / Y. Gao, T. Li, M. Han et al // *J Med Virol*. – 2020. – P. 0.1002/jmv.25770. doi: 10.1002/jmv.25770

26. Gaunt E.R. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method / E.R. Gaunt, A. Hardie, E.C. Claas, P. Simmonds, K.E. Templeton // *J Clin Microbiol.* – 2010. – Vol. 48(8). – P. 2940-7. DOI: 10.1128/JCM.00636-10
27. Global surveillance for COVID-19 caused by human infection with COVID-19 virus Interim guidance; March 20, 2020. [Электронный ресурс]: режим доступа: [www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](http://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-(2019-ncov)). (дата посещения 11.07.2020).
28. Guan W.J. Comorbidity and its impact on 1590 patients with Covid-19 in China: a nationwide analysis / W.J. Guan, W.H. Liang, Y. Zhao et al // *Eur Respir J.* – 2020. – Vol. 55(5). P. 2000547. doi:10.1183/13993003.00547-2020
29. Henry B.M. Laboratory abnormalities in children with novel coronavirus disease 2019 / B.M. Henry, G. Lippi, M. Plebani // *Clin Chem Lab Med.* – 2020.
30. Hoang A. COVID-19 in 7780 pediatric patients: a systematic review / A. Hoang, K. Chorath, M. Moreira, et al. // *E. Clinical. Medicine.* – 2020. – Vol.24(100433). doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100433.
31. Howard-Jones A.R. COVID-19 in children. II: Pathogenesis, disease spectrum and management / A.R. Howard-Jones, D.P. Burgner, N.W. Crawford, et al. // *Journal of Paediatrics and Child Health.* – 2022. – Vol. 58. – P. 46–53.
32. Huang C. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China / C. Huang, Y. Wang, X. Li et al. // *Lancet.* – 2020. - Vol 395. – P. 497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).
33. Imtiaz F. Neutrophil lymphocyte ratio as a measure of systemic inflammation in prevalent chronic diseases in Asian population / F. Imtiaz, K. Shafique, S. Mirza, et al. // *International Archives of Medicine.* – 2012. – Vol. 5(1). – P. 2–8. DOI: 10.1186/1755-7682-5-2.
34. Ioana M Ciuca. COVID-19 in Children: An Ample Review Risk Manag Healthc Policy. – 2020. – Vol. 13. – P. 661–669. doi: 10.2147/RMHP.S257180

35. Ji L.N. Clinical features of pediatric patients with COVID-19: a report of two family cluster cases / L.N. Ji, S. Chao, Y.J. Wang et al. // *World J Pediatr.* – 2020. – P. 1–4. doi:10.1007/s12519-020-00356-2.
36. Kamdar S. Perinatal Inflammation Influences but Does Not Arrest Rapid Immune Development in Preterm Babies / S. Kamdar, R. Hutchinson, A. Laing, et al. // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1284.]
37. Kuklina E. M. T Lymphocytes as Targets for SARS-CoV-2 / E. M. Kuklina // *Biokhimiya.* 2022. - Vol. 87, No.6. - P. 780-793.
38. Li W. Chest computed tomography in children with COVID-19 respiratory infection / W. Li, H. Cui, K. Li et al. // *Pediatr Radiol.* – 2020. – Vol. 50(6). P. 796–799. doi: 10.1007/s00247-020-04656-7.
39. Liu J. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts critical illness patients with 2019 coronavirus disease in the early stage / J. Liu, Y. Liu, P. Xiang, et al. // *Journal of Translational Medicine.* – 2020. – Vol. 18(1). – P. 206–218. DOI: 10.1186/s12967-020-02374-0
40. Liu W. Detection of COVID-19 in Children in Early January 2020 in Wuhan, China / W. Liu, Q. Zhang, J. Chen et al. // *N Engl J Med.* – 2020. DOI: 10.1056/NEJMc2003717.
41. Liu W. Detection of Covid-19 in Children in Early January 2020 in Wuhan, China / W. Liu, Q. Zhang, J. Chen et al. // *N Engl J Med.* – 2020. – Vol. 382(14). – P. 1370–1371. doi: 10.1056/NEJMc2003717
42. Livingston E. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Italy / E. Livingston, K. Bucher // *JAMA.* – 2020. DOI: 10.1001/jama.2020.4344 22.
43. Lu X. SARS-CoV-2 infection in children / X. Lu, L. Zhang, H. Du, et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2020. – Vol. 382(17). – P. 1663–1665. doi: 10.1056/NEJMc2005073.
44. Luk H.K.H. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus / H.K.H Luk, X. Li, J. Fung, S.K.P Lau, P.C.Y Woo // *Infect Genet Evol.* – 2019. – Vol. 71. – P. 21-30. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.03.001

45. Mahmoudi S. Effects of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) on Peripheral Blood Lymphocytes and Their Subsets in Children: Imbalanced CD4⁺/CD8⁺ T Cell Ratio and Disease Severity / S. Mahmoudi, B. Yaghmaei, M. Sharifzadeh Ekbatani, et al. // *Front. Pediatr.* – 2021. – Vol.9:643299. – P. 1-7. doi: 10.3389/fped.2021.643299
46. Marlais M. COVID-19 in children treated with immunosuppressive medication for kidney diseases / M. Marlais, T. Wlodkowski, S. Al-Akash, et al. // *Arch. Dis. Child.* – 2021. – Vol. 106. – P. 798–801.
47. Mehta P. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression / P. Mehta, D.F. McAuley, M. Brown et al. // *Lancet.* – 2020. – Vol. 395(10229). P.1033–1034. doi: 10.1016/S01406736(20)30628-0
48. Merad M. Pathological inflammation in patients with COVID-19: A key role for monocytes and macrophages / M. Merad, J.C. Martin // *Nat. Rev. Immunol.* – 2020. – Vol. 20(6). – P.355–362. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0331-4>
49. Ng M. Imaging Profile of the COVID-19 Infection: radiologic findings and literature review / M. Ng, E. Lee, J. Yang et al. // *Radiology.* – 2020. – Vol. 2(1). – P. e200034. doi:10.1148/ryct.2020200034
50. Pillai A. COVID-19 Disease in Under-5 Children: Current Status and Strategies for Prevention including Vaccination / A. Pillai, A. Nayak, D. Tiwari, at al. // *Vaccines.* – 2023. – Vol. 11. – P. 693. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030693>.
51. Posfay-Barbe K.M. COVID-19 in children and the dynamics of infection in families / K.M. Posfay-Barbe, N. Wagner, M. Gauthey, et al. // *Pediatrics.* – 2020. – Vol. 146 (2). - e20201576. doi: 10.1542/peds.2020-1576.
52. Robaina-Castellanos G.R. Congenital and Intrapartum SARS-CoV-2 Infection in Neonates: Hypotheses, Evidence and Perspectives / G.R. Robaina-Castellanos, S. de la Caridad Riesgo-Rodriguez // *MEDICC Rev.* – 2021. – Vol. 23. – P. 72–83.
53. Schreiber A. Necroptosis controls NET generation and mediates complement activation, endothelial damage, and autoimmune vasculitis / A. Schreiber, A.

- Rousselle, J.U. Becker, et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2017. – Vol. 114(45). - E9618-625.
54. Schroeder A.R. COVID-19 and Kawasaki disease: finding the signal in the noise / A.R. Schroeder, K.M. Wilson, S.L. Ralston // Hosp Pediatr. – 2020. – P. 2020–000356. doi:10.1542/hpeds.2020-000356
55. Seery V. Blood neutrophils from children with COVID-19 exhibit both inflammatory and anti-inflammatory markers / V. Seery, S.C. Raiden, S.C. Algieri, et al. // EBioMedicine. – 2021. – Vol. 67. – P. 103357.
56. Selva K.J. Systems serology detects functionally distinct coronavirus antibody features in children and elderly / K.J. Selva, C.E. van de Sandt, M.M. Lemke et al. // Nat. Commun. – 2021. Vol. 12. – P. 2037.
57. Shen K. Global Pediatric Pulmonology Alliance. Diagnosis, treatment, and prevention of 2019 novel coronavirus infection in children: experts' consensus statement / K. Shen, Y. Yang, T. Wang et al. // World J Pediatr. – 2020. – P. 1–9. doi:10.1007/s12519-020-00343-7
58. Shi H, Han X, Jiang N, et al. Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study / H. Shi, X. Han, N. Jiang et al. // Lancet Infect Dis. – 2020. – Vol. 20(4). – P. 425–434. doi:10.1016/S1473-3099(20)30086-4
59. Silvestre-Roig C. Neutrophil diversity in health and disease / C. Silvestre-Roig, Z.G. Fridlender, M. Glogauer, P. Scapini // Trends Immunol. – 2019. – Vol. 40(7). – P. 565–583.
60. Sun D. Clinical features of severe pediatric patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan: a single center's observational study / D. Sun, H. Li, X. Lu et al. // World J Pediatr. – 2020. doi:10.1007/s12519-020-00354-4
61. Sunil S. B. Children and young people remain at low risk of COVID-19 mortality / S. B. Sunil, B. Jayshree, O. Bayanne, B. Raj // 2021. Published Online March 10. [Электронный ресурс]: режим доступа: [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(21\)00066-3](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(21)00066-3). (Дата обращения 15.03.2023).

62. Tan L. Validation of Predictors of Disease Severity and Outcomes in COVID-19 Patients: A Descriptive and Retrospective Study / L. Tan, X. Kang, X. Ji, et al. // *Med.* – 2020. – Vol.1 (1). – P. 128–138. DOI: 10.1016/j.medj.2020.05.002
63. Taylor S, Lopez P, Weckx L, Borja-Tabora C, Ulloa-Gutierrez R, Lazcano-Ponce E, et al. Respiratory viruses and influenza-like illness: epidemiology and outcomes in children aged 6 months to 10 years in a multi-country population sample / S. Taylor, P. Lopez, L. Weckx, C. Borja-Tabora, R. Ulloa-Gutierrez, E. Lazcano-Ponce et al. // *J Infect.* – 2017. – Vol. 74(1). – P. 29-41. DOI: 10.1016/j.jinf.2016.09.003
64. Thiriard A. Antibody response in children with multisystem inflammatory syndrome related to COVID-19 (MIS-C) compared to children with uncomplicated COVID-19 / A. Thiriard, B. Meyer, C.S. Eberhardt, et al. // *Front. Immunol.* – 2023. – Vol. 14. – P. 1107156. doi: 10.3389/fimmu.2023.1107156.
65. Tyrrell D.A, Bynoe M.L. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet* / D.A. Tyrrell, M.L. Bynoe // 1966. – Vol. 1(7428). P. 76– 77. doi:10.1016/s0140-6736(66)92364-6
66. Viner R.M. Susceptibility to SARS-CoV-2 Infection Among Children and Adolescents Compared With Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis / R.M. Viner, O.T. Mytton, C. Bonell, et al. // *JAMA Pediatr.* – 2021. – Vol. 175. – P.143–156.
67. Virol J.C. Clinical features of pediatric patients with coronavirus disease (COVID-19). – 2020. – Vol. 127. – P. 104377. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104377
68. Wei M. Novel coronavirus infection in hospitalized infants under 1 year of age in China / M. Wei, J. Yuan, Y. Liu, T. Fu, X. Yu, Z.J. Zhang// *JAMA.* – 2020. DOI: 10.1001/ jama.2020.2131
69. Xia W, Shao J, Guo Y, Peng X, Li Z, Hu D. Clinical and CT features in pediatric patients with COVID- 19 infection: different points from adults / W. Xia, J. Shao, Y. Guo, X. Peng, Z. Li, D. Hu // *Ped Pulmonol.* – 2020. – Vol. 55. – P.1169–1174. doi:10.1002/ppul.24718

70. Xu X.W. Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus (SARS-Cov-2) outside of Wuhan, China: retrospective case series / X.W. Xu, X.X. Wu, X.G. Jiang et al.// *BMJ*. – 2020;368:m606. doi:10.1136/bmj.m606
71. Yang A-P. The diagnostic and predictive role of NLR, d-NLR and PLR in COVID-19 patients / A-P. Yang, J. Liu, W. Tao, H. Li // *International Immunopharmacology*. – 2020. – Vol. 84. – P. 106504. DOI: 10.1186/1755-7682-5-2
72. Yang C.-Y. New Insights into the Immune Molecular Regulation of the Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome / C.-Y. Yang, C.-S. Chen, G.-T. Yiang, et al. // *Int. J. Mol. Sci.* –2018. – Vol. 19. – P. 588.
73. Yarali N. Hematological parameters and peripheral blood morphologic abnormalities in children with COVID-19 / N. Yarali, Y. M. Akcabelen, Y. Unal, A. Ö. Parlakay // *Authorea*. - 2020. - DOI: 10.22541/au.159069193.34265275
74. Ying L. Developmental Differences in Focal Adhesion Kinase Expression Modulate Pulmonary Endothelial Barrier Function in Response to Inflammation / L. Ying, C.M. Alvira, D.N. Cornfield // *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2018. – Vol. 315. - L66–L77.
75. Zhang Ji.-Y. Single-cell landscape of immunological responses in patients with COVID-19 / Ji.-Y. Zhang, X.-M. Wang, X. Xing, et al. // *Nature Immunology*. – 2020. – Vol. 21. – P. 1107–1118.
76. Zheng M. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients / M. Zheng, Y. Gao, G. Wang et al. // *Cell Mol Immunol.* – 2020. – 17(5). – P. 533–535. doi: 10.1038/s41423-020-0402-2. 7.
77. Zhu H. Clinical analysis of 10 neonates born to mothers with 2019-nCoV pneumonia / H. Zhu, L. Wang, C. Fang et al. // *Transl Pediatr.* – 2020. – Vol. 9(1). – P. 51- 60. doi:10.21037/tp.2020.02.06
78. Zimmermann P. Why Is COVID-19 Less Severe in Children? A Review of the Proposed Mechanisms Underlying the Age-Related Difference in Severity of

SARS-CoV-2 Infections / P. Zimmermann, N. Curtis // Arch. Dis. Child. – 2020. – Vol.106. – P. 429–439.

79. Zuo Y. Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19 / Y. Zuo, S. Yalavarthi, H. Shi, et al. // JCI Insight. – 2020. – Vol. 5. - e13899.