

УДК 616.9:578.834:615.37

ІМУНОКОРЕКЦІЯ ХВОРИХ НА КОРОНАВІРУСНУ ІНФЕКЦІЮ ТА ЇЇ ЕФЕКТИВНІСТЬ

Дуда О. К., доктор медичних наук, професор

Бойко В. О., кандидат медичних наук, доцент

Коцюбайло Л. П.

Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика (Україна)

Резюме. Мета: аналіз імунного статусу хворих на коронавірусні інфекції та підвищення ефективності їх лікування шляхом включення до загальноприйнятої схеми препарату з противірусною та імуотропною дією. **Матеріали і методи.** Для досягнення мети роботи протягом 2012 – 2015 рр. на базі інфекційного відділення міської клінічної лікарні № 4 м. Києва обстежено 150 хворих віком від 18 до 65 років з діагнозом: гостра респіраторна вірусна інфекція (ГРВІ) середньотяжкого та тяжкого ступенів, з яких у подальшому сформували групу хворих на коронавірусні інфекції (n=36). Перша (I, дослідна) група (n=22) – це пацієнти, які на фоні основного лікування отримували Нуклекс® по 2 капсули 3 рази на добу, 7 днів. Друга (II, контрольна) – це 14 хворих, яким проводили тільки загальноприйнятую патогенетичну терапію (дезінтоксикаційну та симптоматичну). Верифікацію діагнозу проводили за допомогою меллекулярно-генетичних досліджень (мультиплексна полімеразно-ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією в реальному часі) з біологічного матеріалу – харкотиння. Комплекс імунологічних досліджень периферійної крові включав визначення рецепторів до моноклональних антитіл CD-3, CD-4, CD-8, CD-16, CD-22 на лімфоцитах крові, вміст Т-лімфоцитів, за даними спонтанної розеткоутворювальної здатності лімфоцитів з еритроцитами барана за методикою М. Jondal і співав. у модифікації Е. Ф. Чернушенко і співав. Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програмного комплексу Windows, Word і Excel, Statistica 6.0 з використанням методу варіаційної статистики з визначенням вірогідності за допомогою непараметричного методу Вілкоксона для незалежних сукупностей або дисперсійний аналіз Краскела–Уоліса. Для порівняння двох незалежних груп використовували U-критерій Манна–Уїтні. **Результати.** При обстеженні 36 хворих на коронавірусні інфекції встановлено, що ці захворювання супроводжуються розвитком вторинного клітинного імунодефіциту зі зниженням основних субпопуляцій лімфоцитів (CD3, CD4, CD22), показників НСТ-тесту нейтрофілів крові та підвищенням CD16–лімфоцитів. Загальна кількість Т-лімфоцитів і Т-хелперів була знижена ($P<0,05$), а от рівень натуральних кілерів (CD16) вірогідно був високим: у хворих на коронавірусні інфекції – $26,34\pm 2,22\%$, а у пацієнтів з діагнозом ГРВІ іншої етіології – $18,45\pm 1,23\%$, при нормі – $16,60\pm 0,80\%$ ($P<0,05$). Це свідчить про розвиток при коронавірусних інфекціях вторинного імунодефіцитного стану за відносним гіперкілерним типом. Рівень В-клітин (CD22) у хворих на коронавірусні інфекції був істотно меншим ($P<0,05$), а через 7 днів після прийому Нуклексу® у хворих основної групи вони досягали, в середньому, $24,06\pm 2,44\%$, у пацієнтів II-ї групи середні значення досягали $19,03\pm 2,05\%$ ($P<0,05$). Імунорегуляторний індекс (IPI) коливався від 1,2 до 2,3. **Висновки.** Коронавірусна інфекція перебігає з розвитком вторинного імунодефіциту, зумовленого значним зниженням загальної кількості Т-лімфоцитів і Т-хелперів. Імунний дисбаланс у хворих на коронавірусну є важливим патогенетичним чинником. Включення Нуклексу® у комплексну терапію хворих на коронавірусну інфекцію сприяє не тільки скороченню клінічних проявів хвороби, але й суттєвій корекції супутніх імунних порушень, а також забезпечує найбільш сприятливі віддалені результати, дозволяючи уникнути розвитку різних бактеріальних ускладнень.

Ключові слова: коронавірусна інфекція, лімфоцити, клітинний та вроджений імунітет, дорослі, Нуклекс®.

Резюме. Цель: анализ иммунного статуса больных коронавирусной инфекцией и повышение эффективности их лечения путем включения в общепринятую схему препарата с противовирусным и иммуотропным действием. **Материалы и методы.** Для достижения цели работы в течение 2012 – 2015 гг. на базе инфекционного отделения городской клинической больницы № 4 г. Киева обследовано 150 больных в возрасте от 18 до 65 лет с диагнозом: острая респираторная вирусная инфекция (ОРВИ) среднетяжелой и тяжелой степени, из которых в дальнейшем сформировали группы больных коронавирусной инфекцией (n=36). Первая (I, исследовательская) группа (n=22) – это пациенты, которые на фоне основного лечения получали Нуклекс® по 2 капсулы 3 раза в сутки, 7 дней. Вторая (II, контрольная) – это 14 больных, которым проводили только общепринятую патогенетическую терапию (дезінтоксикационную и симптоматическую). Верификацию диагноза проводили с помощью меллекулярно-генетических исследований (мультиплексной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени) из биологического материала – мокрота. Комплекс

иммунологических исследований периферической крови включал определение рецепторов к моноклональным антителам CD-3, CD-4, CD-8, CD-16, CD-22 лимфоцитов крови, содержание Т-лимфоцитов по данным спонтанной розеткообразовательной способности лимфоцитов с эритроцитами барана по методике М. Jondal в модификации Е.Ф. Чернушенко и соавт.. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программного комплекса Windows, Word i Excel, Statistica 6.0 с использованием метода вариационной статистики с определением достоверности с помощью непараметрического метода Вилкоксона для независимых совокупностей или дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса. Для сравнения двух независимых групп использовали U-критерий Манна–Уитни. **Результаты.** При обследовании 36 больных коронавирусной инфекцией установлено, что эти заболевания сопровождаются развитием вторичного клеточного иммунодефицита со снижением основных субпопуляций лимфоцитов (CD3, CD4, CD22), показателей НСТ-теста нейтрофилов крови и повышением CD16-лимфоцитов. Общее количество Т-лимфоцитов и Т-хелперов было снижено ($P < 0,05$), а вот уровень натуральных киллеров (CD16) достоверно был высоким: у больных коронавирусной инфекцией – $26,34 \pm 2,22\%$, а у пациентов с диагнозом ОРВИ другой этиологии – $18,45 \pm 1,23\%$, при норме – $16,60 \pm 0,80\%$ ($P < 0,05$). Уровень В-клеток (CD22) у больных коронавирусной инфекцией был существенно меньшим ($P < 0,05$), а через 7 дней после приема Нуклексу® у больных основной группы они достигали, в среднем, $24,06 \pm 2,44\%$, у пациентов II-й группы средние значения достигали $19,03 \pm 2,05\%$ ($P < 0,05$). Иммунорегуляторный индекс (ИРИ) колебался от 1,2 до 2,3. **Выводы.** Коронавирусная инфекция протекает с развитием вторичного иммунодефицита, обусловленного значительным снижением общего количества Т-лимфоцитов и Т-хелперов. Иммунный дисбаланс у больных коронавирусной инфекцией является важным патогенетическим фактором. Включение Нуклекса® в комплексную терапию больных коронавирусной инфекцией способствует не только сокращению клинических проявлений болезни, но и существенной коррекции сопутствующих иммунных нарушений, а также обеспечивает наиболее благоприятные отдаленные результаты, позволяя избежать развития различных бактериальных осложнений.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, лимфоциты, клеточный и врожденный иммунитет, взрослые, Нуклекс®.

Summary. Objective: to analyze the immune status of coronavirus infections patients and to improve the effectiveness of their treatment by including a drug with antiviral and immunotropic action into the conventional scheme. **Materials and methods.** To achieve the objective, 150 patients aged 18 to 65 years with a diagnosis of acute respiratory moderate-to-severe and severe viral infection were examined at the Kyiv City Clinical Hospital № 4 Infectious Department during 2012–2015. Subsequently, the patients were included in 2 groups of patients with coronavirus infections ($n=36$). The first (I, research one) group ($n=22$) patients received the main treatment and Nuclex®: 2 capsules 3 times a day, for 7 days. The second (II, control one) group ($n = 14$) patients have got conventional pathogenic therapy (detoxification and symptomatic) only. Verification of the diagnosis was carried out using molecular genetic studies (multiplex polymerase chain reaction with reverse transcription in real time) of the biological material — sputum. Complex of immunological studies of the peripheral blood included determining the receptors to monoclonal antibodies CD3, CD4, CD8, CD16, CD22 on blood lymphocytes, the content of T-lymphocytes according to the data of spontaneous resetting ability of lymphocytes with sheep red blood cells by the method of M. Jondal et al. modified by K.F. Chernushenko et al. Statistical analysis of the findings was carried out by software system Windows, Word and Excel, Statistica 6.0, using the method of variation statistics with the definition of probability by means of the nonparametric Wilcoxon method for independent samples and Kruskal-Wallis analysis of variance. To compare two independent groups, we have used Mann-Whitney U-test. **Results.** An examination of 36 coronavirus infections patients found that these diseases are accompanied by the development of secondary cellular immune deficiency with a decrease in major subpopulations of lymphocytes (CD3, CD4, CD22), indices of NBT-test of neutrophils and increased levels of CD16 lymphocytes. The total number of T-lymphocytes and T-helper cells was reduced ($P < 0.05$), but the level of natural killer cells (CD16) was significantly higher: in the coronavirus infections patients — $26.34 \pm 2.22 \%$, and in the acute respiratory infections of other origin patients — $18.45 \pm 1.23 \%$ (normal values — $16.60 \pm 0.80 \%$) ($P < 0.05$). This indicates the development in coronavirus infections of secondary immunodeficiency by the relative hyperkiller type. The level of B-cells (CD22) in the coronavirus infections patients was significantly lower ($P < 0.05$), and 7 days after receiving ribonucleic acid in the research group patients they reached an average of $24.06 \pm 2.44\%$, in patients from group II average values were $19.03 \pm 2.05\%$ ($P < 0.05$). Immunoregulatory index ranged from 1.2 to 2.3. **Conclusions.** Coronavirus infection proceeds with the development of secondary immunodeficiency caused by a significant decrease in the total number of T-lymphocytes and T-helper cells. Immune imbalance in the coronavirus patients is an important pathogenetic factor. The Nuclex® inclusion in the complex therapy the coronavirus infection patients contributes not only to reduction of the disease clinical manifestations, but also a significant correction of concomitant immune disorders, as well as provides the most favorable long-term results, allowing you to avoid various bacterial complications.

Key words: coronavirus infection, lymphocytes, cellular and innate immunity, adults, Nuclex®.

Вступ. Незалежно від географічного розташування, кліматичних умов, гендерних ознак, інфекції дихальних шляхів посідають провідні місця в структурі причин смертності, як у дітей, так і дорослих [1].

Гострі респіраторні вірусні інфекції (ГРВІ) – найбільш поширені інфекційні хвороби, що уражають усі вікові групи населення. В Україні щорічно на ГРВІ хворіють 10–14 млн. осіб, що становить 25–30 % випадків усієї та близько 75–90 % інфекційної захворюваності [2].

Етіотропна терапія коронавірусних інфекцій (КВІ) у дорослих сьогодні регламентована, однак досі немає чітких рекомендацій стосовно використання багатьох патогенетичних середників, передусім імунотропних препаратів [3]. Актуальність цього напрямку у підвищенні ефективності терапії хворих на КВІ визначається тим, що тяжкість патологічного процесу, розвиток ускладнень або формування загрозливих для життя станів значною мірою зумовлені глибиною порушень імунної реакції організму і зниження його неспецифічної резистентності. До числа таких порушень належать розлади макрофагальної ланки, оскільки коронавіруси безпосередньо мають тропність до макрофагів [4].

Нашу увагу привернув принципово новий імунотропний препарат Нуклекс® (реєстраційне посвідчення № UA/5066/01/02 від 15.07.2015 р.). Його діючою речовиною є рибонуклеїнова кислота. Препарат запатентований в Україні, випускається ТОВ «Фарма Старт» (м. Київ). В основі противірусної дії лежать механізми впливу на конформацію поверхневих антигенів і рецепторів вірусів. Стимулює міграцію стовбурових клітин у кістковому мозку, відновлює диференціювання, кількісний і якісний склад клітин кісткового мозку і периферичної крові [5]. Нормалізує клітинний імунітет, підвищуючи міграцію і кооперацію Т- і В-лімфоцитів і фагоцитарну активність макрофагів, посилюючи активність факторів неспецифічної резистентності [6].

Матеріали і методи. Для досягнення мети роботи протягом 2012 – 2015 рр. на базі інфекційного відділення міської клінічної лікарні № 4 м. Києва обстежено 150 хворих віком від 18 до 65 років з діагнозом: гостра респіраторна вірусна інфекція (ГРВІ) середньо тяжкого та тяжкого ступенів, з яких у подальшому сформували групу хворих на коронавірусні інфекції (n=36). Перша (I, дослідна) група (n=22) – це пацієнти, які на фоні основного лікування отримували Нуклекс® по 2 капсули 3 рази на добу впродовж 7 днів. Друга (II, контрольна) – це 14 хворих, яким проводили тільки загальноприйнятту патогенетичну терапію (дезінтоксикаційну та симптоматичну) [2].

Верифікацію діагнозу проводили за допомогою мелекулярно-генетичних досліджень (мультиплексна полімеразно-ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією в реальному часі – ЗТ-ПЛР Real-time) з біологічного матеріалу – харкотиння. Дослідження виконувалися на кафедрі вірусології НМАПО імені П. Л. Шупика (зав. кафедри – професор Дзюблик І. В.).

Комплекс імунологічних досліджень периферійної крові включав визначення рецепторів до моноклональних антитіл CD-3, CD-4, CD-8, CD-16, CD-22 на лімфоцитах крові, вміст Т-лімфоцитів, за даними спонтанної розеткоутворювальної здатності лімфоцитів з еритроцитами барана за методикою M. Jondal і співав. у модифікації Е. Ф. Чернушенко і співав.; оцінку фагоцитарної активності та фагоцитарного числа нейтрофільних лейкоцитів за Е. Ф. Чернушенко; визначення киснезалежного метаболізму еозинофільних та нейтрофільних гранулоцитів крові – за даними спонтанного та стимульованого НСТ-тесту в модифікації В. В. Климова і співав.

Усі числові показники оцінювали з урахуванням значень 30 хворих на ГРВІ іншої етіології. Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програмного комплексу Windows, Word і Excel, Statistica 6.0 з використанням методу варіаційної статистики з визначенням вірогідності за допомогою непараметричного методу Вілкоксона для незалежних сукупностей або дисперсійний аналіз Краскела–Уоліса. Для порівняння двох незалежних груп використовували U-критерій Манна–Уїтні.

Результати досліджень та їх обговорення. Оцінка клінічних симптомів перебігу гострих респіраторних вірусних інфекцій у дорослих, сформованих залежно від

етіологічного агента, дозволила виявити значні відмінності. Так, у хворих на коронавірусні інфекції лихоманка та кашель відмічалися у 100 % ($n=36$), симптом менінгізму виявлявся у 52,6 % ($n=10$), ознаки ураження нижніх дихальних шляхів у 61,5 % ($n=22$), риніт ($P<0,05$). Один летальний випадок у групі дослідження. З I-ї групи 7 хворих перебували у відділенні інтенсивної терапії та реанімації, відповідно з II-ї – 3 хворих ($P<0,05$).

Після проведеного курсу лікування позитивна динаміка спостерігалася в обох групах пацієнтів, але найзначнішою вона була у I-ї групі, що отримувала, крім стандартної терапії, ще й Нуклекс®, тривалість стаціонарного лікування у I групі – $7,02\pm1,03$ ліжко-днів, а у II-ї – $10,32\pm2,04$.

У процесі лікування у пацієнтів основної групи відзначене зниження загальної температури тіла до нормальних показників уже на 3-тю – 4-ту добу, тоді як у контрольній групі до цього дня ще відзначався субфебрилітет – $37,6\pm0,6^{\circ}\text{C}$. На 5-ту добу хвороби температура тіла досягала нормальних показників у пацієнтів обох груп. Темп зникнення симптомів інтоксикації корелював з динамікою зниження температури, при нормалізації якої, як правило, зникали й загальнотоксичні прояви захворювання та кашель. Проте, у хворих основної групи, які отримували нуклекс, на 2–3 дні раніше зникали катаральні симптоми та 30 % з них не призначалися антибактеріальні препарати, оскільки не відзначалося ускладнень. У контрольній групі ускладнення діагностували на 2–4 добу хвороби (синусити, отити, ларингіти, бронхіти).

Беручи до уваги імунні патогенетичні механізми формування запального процесу в бронхах та альвеолах при КВІ, автори вважали за доцільне вивчити показники імунотаксису периферійної крові у пацієнтів груп порівняння.

У гострому періоді хвороби виявлено значні зміни показників імунотаксису (табл. 1). Загальна кількість Т-лімфоцитів і Т-хелперів була знижена ($P<0,05$), а от рівень натуральних кілерів (CD16) вірогідно був високим: у хворих на КВІ $26,34\pm2,22$ %, а у пацієнтів з діагнозом ГРВІ іншої етіології – $18,45\pm1,23$ %, при нормі – $16,60\pm0,80$ % ($P<0,05$). Це свідчить про розвиток при КВІ вторинного імунodefіцитного стану за відносним гіперкілерним типом.

Рівень В-клітин (CD22) у хворих на КВІ був істотно меншим ($P<0,05$), а через 7 днів після прийому Нуклексу® у хворих основної групи вони досягали, в середньому, $24,06\pm2,44$ %, у пацієнтів II-ї групи середні значення досягали $19,03\pm2,05$ % ($P<0,05$). Імунорегуляторний індекс (ІРІ) коливався від 1,2 до 2,3.

У період ранньої реконвалесценції (7 доба хвороби) у представників I-ї групи нормалізувалися значення усіх досліджуваних показників клітинного імунітету та виявлено активацію моноцитів у периферійній крові від 33 до 62 %.

Важливо, що у реконвалесцентів II-ї групи, які отримували лікування згідно «Уніфікованого клінічного протоколу первинної медичної допомоги дорослим та дітям. Гострі респіраторні інфекції. Наказ Міністерства охорони здоров'я України 16 липня 2014 р. № 499», концентрація Т-загальних, Т-хелперів і В-клітин, хоч і мала тенденцію до зростання, однак не досягала рівня здорових осіб ($P<0,05$).

Наявність у хворих на КВІ обструктивного синдрому передбачала активацію вторинних ефекторних клітин та перш за все їх киснезалежних процесів. З огляду на це проаналізовано показники спонтанного та стимульованого НСТ-тесту нейтрофілів гранулоцитів крові у групах порівняння (табл. 1).

Таким чином, виявлено статистично значущі міжгрупові відмінності у середніх показниках тесту з нітросинім тетразолієм у спонтанному та стимульованому пірогеналом варіантах зі значним зниженням індексу стимуляції нейтрофілів периферійної крові, що обчислюється шляхом віднесення результатів стимульованого НСТ-тесту до показників спонтанного варіанта (у хворих I групи – $1,17\pm0,04$ ум.од., II групи – $1,54\pm0,20$ ум.од.; $P<0,05$). Такі результати можуть вказувати на певну виснаженість здатності нейтрофілів до дегрануляції у процесі нейтрофіл-опосередкованого запалення бронхів у дорослих на КВІ.

Разом з тим, фагоцитарні функції гранулоцитів крові, зокрема показник фагоцитарної активності та фагоцитарного числа, мали тенденцію до зростання у хворих II контрольної групи, але активності моноцитів периферійної крові не відмічалось в жодного пацієнта.

Таблиця 1

ДИНАМІКА ПОКАЗНИКІВ ІМУННОГО СТАТУСУ У ХВОРИХ НА КВІ (М±М)

Показник %	Контроль (ГРВІ іншої етіології), n=30	Група хворих			
		I (рекомендоване + Нуклекс) n=22		II (тільки рекомендоване) n=14	
		Гострий період (до лікування)	Рання реконвалесценція (7 доба)	Гострий період (до лікування)	Рання реконвалесценція (7 доба)
CD-3	53,65±1,43	48,03±2,34*	54,44±3,54**	47,67±3,54*	48,90±3,35*
CD-4	38,12±2,54	26,70±6,30*	33,36±5,05**	28,42±4,21*	30,02±1,05*
CD-8	14,76±0,75	22,04±1,22*	24,06±2,02	23,04±1,86*	24,32±2,06
CD-22	17,65±3,42	15,32±1,02*	24,06±2,44**	15,32±1,02*	19,03±2,05*
CD-16	18,45±1,23	26,34±2,22*	25,76±3,06*	26,34±2,22*	25,86±2,08*
НСТ-спонт.	4,03±0,93	1,17±0,04*	3,09±1,43*	1,54±0,20	1,94±0,95
НСТ-стимул.	8,04±1,93	5,07±3,44*	17,34±2,57**	6,09±2,76	8,97±4,54
P	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Примітки: * - вірогідна (P<0,05) різниця порівняно з показником у хворих на ГРВІ іншої етіології за критерієм Манна-Уїтні;

** - вірогідна різниця порівняно з відповідним показником до лікування (P<0,05).

Висновки.

1. Коронавірусна інфекція перебігає з розвитком вторинного імунодефіциту, зумовленого значним зниженням загальної кількості Т-лімфоцитів і Т-хелперів. Імунний дисбаланс у хворих на коронавірусну інфекцію є важливим патогенетичним чинником.

2. Включення Нуклексу® у комплексну терапію хворих на коронавірусну інфекцію сприяє не тільки скороченню клінічних проявів хвороби, але й суттєвій корекції супутніх імунних порушень, а також забезпечує найбільш сприятливі віддалені результати, дозволяючи уникнути розвитку різних бактеріальних ускладнень.

Література

1. Уніфікований клінічний протокол первинної медичної допомоги дорослим та дітям. Гострі респіраторні інфекції. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 16 липня 2014 р. № 499.
2. [Дуда А. К.](#) Применение противовирусного препарата нового поколения Аллокин-альфа в терапии социально значимых вирусных инфекций / А. К. Дуда, Л. П. Коцюбайло, Н. В. Окружнов // [Актуальная инфектология](#). – 2014. – № 4. – С. 32–41. Режим доступа: http://nbuv.gov.ua/UJRN/akinf_2014_4_9.
3. Fielding B. C., Tan Y. J. The Singapore contribution in the battle against SARS. // *Issues Infect. Dis.* – 2007; 4:1–22.
4. Дуда О. К. Сучасна імунотропна терапія хворих на коронавірусні інфекції / О. К. Дуда, Л. П. Коцюбайло // *Актуальная инфектология*. – 2016. – № 3. – С. 33–37. – Режим доступа: http://nbuv.gov.ua/UJRN/akinf_2016_3_7.
5. Інструкція для медичного застосування Нуклекс. Наказ МОЗ України № 752 від 01.09.2010.
6. K. Sure, G. Ihorst, A. Stang et al. 2005. Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS. Med.* 2:240.
7. P. C. Woo, S. K. Lau, C. M. Chu et al. 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patient with pneumonia. // *J. Virol.* – 79:884-895.