

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет біології, географії та екології
Кафедра біології людини та імунології

**Актуальність моніторингу морфологічних змін білої
крові у хворих на COV19**

Кваліфікаційна робота (проект)
на здобуття ступеня вищої освіти «магістр»

Виконала: здобувачка 2 курсу 211 М групи
Спеціальності 091 Біологія
Освітньо програми Біологія
Двороковська Вікторія Ігорівна

Керівник: к.б.н., доцент Шкуропат Анастасія
Вікторівна
Рецензент: д.б.н., професор Чернозуб А.А.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Covid-19 - це інфекційне захворювання, спричинене вірусом SARS-CoV-2.

ЗАК — загальний аналіз крові.

ДД — лабораторний аналіз визначення рівня Д-Дімера.

ЛП — лейкоцитопенія.

ЛЦ — лейкоцитоз.

SARS-CoV-2 — оболонковий одноланцюжковий РНК-вірус, що відноситься до підроду Sarbecovirus роду Betacoronavirus.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика коронавірусної інфекції.....	5
1.1 Загальна характеристика вірусу	5
1.2 Епідеміологія та патогенез	8
1.3 Ускладнення коронавірусної інфекції.....	13
РОЗДІЛ 2. Діагностика коронавірусної інфекції.....	15
2.1 Лабораторні методи діагностики	15
2.2 Показники загального аналізу крові у хворих на коронавірус.....	18
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 3. Матеріали та методи досліджень.....	21
3.1 Умови, об'єкти і методика експерименту.....	21
РОЗДІЛ 4. Результати та їх обговорення.....	25
4.1 Показники лейкоцитів при гострій фазі хвороби.....	25
4.2 Зіставлення показників лейкоцитів та біомаркерів коронавірусної інфекції.....	27
4.3 Морфологічні особливості білої крові при захворюванні на Covid – 19....	29
ВИСНОВКИ	36
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	37

ВСТУП

Коронавірусна хвороба 2019 року (COVID-19) швидко поширилася у всьому світі, і вже 3й рік поспіль є проблемою номер один для всього людства. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) офіційно оголосила її пандемією.

Реакція на пандемію COVID-19 спричинила безпрецедентну економічну кризу в Україні, оскільки карантинні заходи передбачали тимчасове закриття більшості підприємств, особливо в секторі послуг, такі обставини майже зовсім зупинили економічну діяльність, за винятком ключових галузей.

Система охорони здоров'я має обмежене охоплення та недостатній рівень в вирішенні багатьох питань у профілактиці, лікуванні так і діагностиці. Однією з актуальних проблем є вакцинація населення, яка відбувається дуже повільно за рахунок відсутності даних про переносимість щеплення тих чи інших категорій людей, про ефективність вакцин, про виявлені побічні ефекти, про тривалості формованого імунітету.

Насьогодні першочергові діагностичні дії зосереджені більше на виявленні вірусу SARS-CoV-2 у пацієнтів, але беручи до уваги епідемічні властивості вірусу, ефективною, профілактичною дією є паралельне втілення систем діагностичних скринінгів у виявленні груп ризику, як на етапі виявлення вірусу, так і на етапі моніторингу стану здоров'я пацієнтів хворих на COVID-19, як при гострому прояві так і на віддалених термінах.

Тому, поточне дослідження було спрямоване на аналіз наукових джерел про COVID-19, її етіологію, епідеміологію, патогенез, на основі клінічних досліджень та їх проявів. Визначення сучасних алгоритмів діагностики на різних станах та етапах перебігу хвороби та визначити діагностичну цінність загального аналізу крові, а саме показників білої крові.

РОЗДІЛ 1.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА КОРОНАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

1.1. Загальна характеристика вірусу

Коронавірус сьогодення - це збудник захворювання - оболонковий зоонозний РНК-вірус SARS-CoV-2 - відноситься до сімейства Coronaviridae, роду Betacoronavirus, як і відомі раніше віруси SARS-CoV та MERS-CoV, які викликають тяжкий гострий респіраторний синдром та близькосхідний респіраторний синдром відповідно.

Безліч коронавірусів, вперше виявлених у свійських птахів у 1930-х роках, викликають у тварин респіраторні, шлунково-кишкові, печінкові та неврологічні захворювання. Лише 7 коронавірусів викликають захворювання у людей.

Коронавірусні інфекції у людини найчастіше викликають симптоми застуди. Коронавіруси 229E, OC43, NL63 та HKU1 приблизно в 15–30% випадків викликають вірусну інфекцію верхніх дихальних шляхів. Зрідка можуть виникати важкі інфекції нижніх дихальних шляхів, включаючи бронхіоліт та пневмонію, в основному у немовлят, людей похилого віку та людей з імунодефіцитом[1].

Віруси нестійкі у зовнішньому середовищі, руйнуються під дією ефіру, хлороформу. Миттєво руйнуються при температурі 56 ° С, а при 37 ° С - за 10-15 хв. Добре переносять заморожування[2].

Збудник захворювання виділив Д. Тіррел з колегами з носоглотки при гострому риніті (1965). Пізніше аналогічні віруси виділили і з випорожнень при гастроентериті у дітей - Е. Каул і С. Кларк (1975)[3].

Коронавіруси містять одноланцюгову позитивно заряджену РНК і мають одним із найбільших геномів серед усіх РНК вірусів. Дві третини геному коронавірусу на 5'-кінці кодує вірусні білки, що беруть участь у транскрипції вірусної РНК та реплікації, а одна третина на 3'-кінці кодує структурні та групспецифічні допоміжні білки. Основними структурними білками коронавірусів є: S (spike), E (envelope), M (membrane) та N (nucleocapsid) (Рис

1). Ці біомаркери не тільки відіграють центральну роль у діагностиці захворювання, а й у розумінні його патогенності [3].

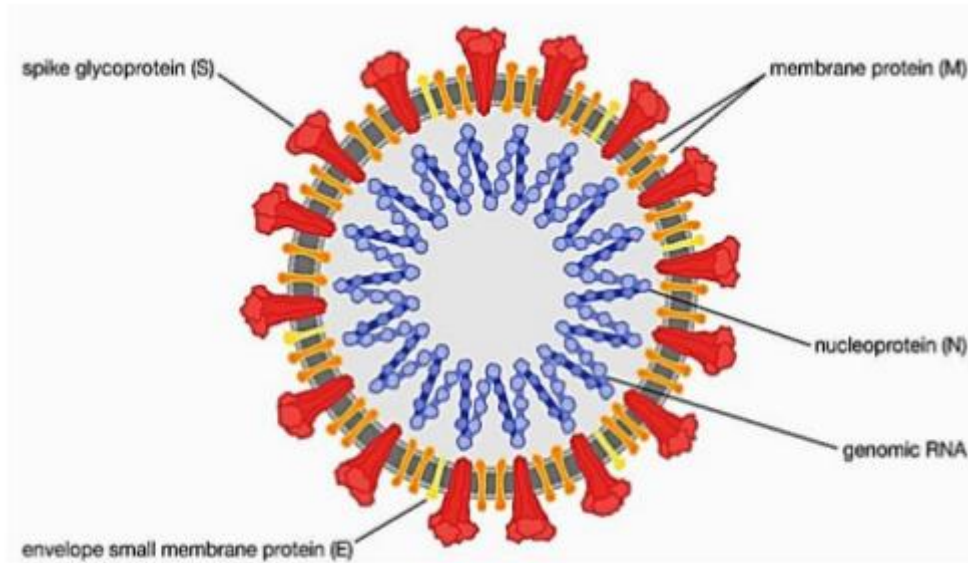


Рис. 1. Структура SARS-CoV-2

Білок "Шип" (S білок) складається з 1300 амінокислот (а.к.) і має розмір 180–200 кДа, у структурі S білка виділяють позаклітинний N-термінальний домен (NTD), трансмембранний домен (TMD), закріплений на вірусній мембрані, та короткий внутрішньоклітинний C-термінальний домен (CMD). До злиття з мембраною клітини S білок зазвичай існує у метастабільній конформації, як тільки вірус взаємодіє з клітиною-господарем, відбувається велика структурна перебудова S білка, що дозволяє вірусу зливатися з мембраною клітини-хазяїна. S білок покритий молекулами полісахариду, щоб уникнути імунної відповіді організму господаря під час проникнення у клітину.

У структурі S білка можна виділити сигнальний пептид (амінокислоти 1-13), розташований на N-кінці, субодиницю S1 (14–685 залишків) та субодиницю S2 (686–1273 залишку); останні дві області відповідають за зв'язування рецепторів та злиття відповідних мембран [4]. У нативному стані S білок неактивний. Під час вірусної інфекції протеази клітин-мішеней розщеплюють S білок, на S1 та S2 білки, це необхідно для активації домену злиття мембран для проникнення вірусу в клітини-мішені[5].

Е білок – це невеликий гідрофобний білок, що складається з 74-109 а.к. молекулярною масою 8,4– 109 кДа. Він складається з трьох частин. У структурі Е білка виділяють три сайти цистеїну, які специфічні до пальмітолітичного білка . Зміни всіх трьох амінокислот у MHV-CoV можуть значно послабити вірус . Інша консервативна амінокислота у структурі Е білка – пролін. Він відіграє важливу роль у фолдингу білка в комплексі Гольджі, а також опосередковує екзоцитоз вірусних частинок. Е білок відіграє основну роль передачі сигналів, тобто, при зміні кількох амінокислот області Е білка SARS CoV-2 вплинув на PALS1(кодуючий білок), який відіграє ключову роль у контакті. Внаслідок чого вірус став більш патогеннішими, ніж інші коронавіруси. Ці особливості стимулюють «цитокіновий шторм», посилюють запалення і, як наслідок, збільшується набряк легень. Цей процес викликає гострий респіраторний дистрес-синдром і, зрештою в результаті, смерть при інфекціях SARS-CoV і SARS-CoV-2[6].

Білок матриксу (М-білок) SARS-CoV-2 – трансмембранний глікопротеїн є важливим структурним білком коронавірусів. Це найпоширеніший протеїн на поверхні вірусу, який додає йому форму. Згідно з дослідженнями, проведеними на двох вірусах SARS-CoV та MERS-CoV, М білок містить 230 амінокислот і має молекулярну масу 25–35 кДа та є найменшим структурним білком SARS-CoV-2. Аналіз *in silico* показав, що структура М білка SARS-CoV-2 аналогічна прокаріотичному білку, транспортує глюкозу. М білок відіграє роль у проникненні вірусу в клітину господаря та дозріванні РНК-вірусів, так як має здатність зв'язуватися з РНК. Цей білок транслюється рибосомами, які прикріплені до шорсткого ендоплазматичного ретикулуму[7].

Н білок має молекулярну масу 43-50 кДа. Цей структурний білок спірального нуклеокапсиду має спорідненість до РНК та кількома амінокислотами (лізин та аргінін). У структурі Н білка виділяють: NTD (сайт зв'язування РНК), СТД (домен димеризації), а також безліч неупорядкованих фрагментів (багатих серином та аргініном). Н білок виконує функцію

приєднання та складання геному вірусної РНК до довгої спіральної структури нуклеокапсиду або матриці рибонуклеопротеїду, проте він дуже чутливий до протеаз[9]. Цей білок фосфорилується (процес біосинтезу) у кількох специфічних положеннях у різних коронавірусах, що призводить до зміни його функцій, таких як специфічність до вірусної РНК, порушення зв'язування моноклональних антитіл з поверхнею вірусу, а також дозрівання та складання вірусу [7]. Однак причина фосфорилування залишається незрозумілою. N білок також може брати участь у регуляції вірусної транскрипції та збільшувати продуктивність геномної реплікації РНК у зворотних генетичних системах. Дані, що накопичуються, показали, що N білок, який часто присутній у цитоплазмі заражених клітин, призводить до зупинки клітинного циклу у фазі G2/M (остання з трьох послідовних фаз інтерфазної стадії клітинного циклу, постсинтетична, або премітотична) . Оскільки білок N є поверхневим білком і менш варіабельний, ніж S білок, його застосовують при розробці вакцин від SARS-CoV-2[8]. Аналіз *in silico* показав, що вплив двох препаратів, гліциризинової кислоти та фітохімічної речовини Theaflavi, на N білок можна використовувати як один із варіантів лікування [9].

Взагалом весь діапазон структурних білків SARS-CoV-2 має антигенні властивості, але Sag-послідовності (білок, який кодується однойменним геном) виявлено лише у S білка. Оскільки S білок після зв'язування ACE2 рецептора визначає проникнення вірусу в клітину, це свідчить про те, що S білок SARS-CoV-2 є основним фактором патогенезу COVID-19. Тому білок S є перспективним для розробки специфічних пептидних лігандів *in silico*. Теоретично отримані ліганди можна використовувати не тільки для створення біосорбентів, але і як інгібітори SARS-CoV-2[11].

1.2. Епідеміологія та патогенез

У процесі філогенетичного розвитку паразитичні живі істоти, включаючи бактерії та віруси, закріплені за певними видами чутливих до них господарів. Не є винятком і вид *Homo-sapiens*, у якого є свої, людські збудники, що викликають антропонозні захворювання і передаються виключно від людини

до людини. Частина інфекційних захворювань відноситься до зооантропонозів, тобто може уражати і людину, і тварин (сказ, туляремія, бруцельоз, сибірка та ін.). За певних умов може відбуватися подолання збудником міжвидових бар'єрів, і така трансформація призводить до появи нових небезпечних емерджентних інфекцій. За останні півстоліття людство зіткнулося із 70 нозологічними формами емерджентних захворювань, що спричинено негативним впливом на біосферу та її біоценози діяльності людей (вирубка лісів, глобальне потепління, інтенсивні трансконтинентальні транспортні зв'язки, техногенні викиди з мутагенною активністю та ін.). У 75% випадків походження емерджентних інфекцій людини пов'язане із тваринним світом[6].

Вірус SARS-CoV-2 належить до родини Coronaviridae представленої більше ніж 40 видами, що уражають ссавців і птахів. Викликають у них певні захворювання та підтримують циркуляцію патогену серед носіїв у дикій природі. Чутливими господарями для коронавірусів, які циркулюють серед тварин, є свині (викликають смертельний трансмісивний гастроентерит), коні, собаки та кішки (вірус інфекційного перитоніту кошачих), кити (білуга), кажани, різні види мишей, щурів, байбаків, дикобразів, їжаків, у птахів давно відомий коронавірус смертельного бронхіту курей, коронавіруси уражають також журавлів, куріпок, індиків та ін. З 1965р. відомі коронавіруси, здатні спричиняти різні респіраторні захворювання у людей. Вони не викликали особливої стурбованості, оскільки зумовлені ними захворювання верхніх дихальних шляхів мають сезонний характер і легкий перебіг. Однак характерний для них повітряно-крапельний шлях передачі робить ці захворювання з точки зору епідеміології доволі небезпечними, оскільки за рахунок високої контагіозності спричиняє значне поширення збудника [6].

Перші випадки SARS-CoV-2 були виявлені у квітні 2019 р. в Йорданії. Надалі випадки SARS-CoV-2 реєструвалися як на Близькому Сході (Йорданія, Кувейт, Оман, Катар, Ємен, Ліван, Іран, Саудівська Аравія та Об'єднані Арабські Емірати (ОАЕ), і в Європі(Франція, Німеччина, Греція, Італія,

Великобританія та Нідерланди), а також у Північній Африці (Туніс, Алжир, Єгипет), в Азії (Малайзія та Філіппіни) та в Північній Америці (США)[6].

Слід зазначити, що завізні випадки інфекції, пов'язані з перебуванням на території дальнього сходу та Аравійському півострові, були виявлені у країнах Європи, Північної Африки, а також у деяких країнах Азії та Північної Америки (США). Як основне джерело інфекції для людини можуть розглядатися одnogорбні верблюди та кажани.

Більшість верблюдів інфікуються новим корона вірусом при народженні та у перші місяці життя. Близько третини молодих верблюдів згодом стають безсимптомними носіями цієї інфекції. Сезон народження верблюдів припадає на весну, що на думку експертів, може пояснювати підйом захворюваності у цей період.

Підйом захворюваності SARS-CoV-2 носить сезонний характер з піком у березні–квітні. Так з середини травня 2019 р. низці країн дальнього сходу різко зросла кількість випадків SARS-CoV-2, а вже у вересні та жовтні було відзначено деяке зниження захворюваності. У Китаї у березні 2019 р. було зареєстровано значущі для системи охорони здоров'я спалаху COVID-19, причому в 75% випадків відзначалася передача інфекції від людини до людини. Реєструвалися також випадки передачі інфекції серед членів однієї сім'ї.

Цей вірус не має особливості щодо стійкості у навколишньому середовищі та відноситься до I рангу 3 класу згідно з класифікацією Національної асоціації фахівців з контролю інфекцій, пов'язаних з наданням медичної допомоги.

Вірус ефективно інактивується жиророзчинними агентами та неіонними детергентами, формальдегідом, окислювачами та ультрафіолетом.

Період контагіозності хворого невизначено довгий. Механізми передачі - повітряно-крапельний і фекально-оральний. Природна сприйнятливість людей висока, до збудника чутливі усі вікові групи населення. Постінфекційний імунітет носить типоспецифічний характер. Антигенна різноманітність

збудників обумовлює високу частоту реінфекцій вірусом інших серологічних типів[2].

Враховуючи характер поширення SARS-CoV-2 інфекції, фахівці ВООЗ виділяють групи ризику, що вимагають особливої уваги:

1. Особи, які мають тісні контакти з хворими (лихоманка, кашель, задишка) пасажирями чи гостями, що приїжджають із країн Аравійського півострова або суміжних країн.
2. Особи, які тісно контактували з хворим SARS-CoV-2 або з хворими, у яких підозрюють SARS-CoV-2 (медпрацівники, члени сім'ї хворого).
3. Люди похилого віку, вагітних жінки.
4. Людей з хронічними захворюваннями, такими як діабет, захворювання нирок, легень чи рак.
5. Людей із ослабленою імунною системою.

У осіб із супутніми хронічними захворюваннями, ослабленим імунітетом і у людей старших вікових груп інфекція протікає важче і частіше призводить до смерті. Так до груп ризику розвитку тяжкої форми інфекції відносяться пацієнти з цукровим діабетом, хронічними захворюваннями легень, нирковою недостатністю та імуносупресією[5].

Вірус SARS-CoV-2, для проникнення в клітину використовує трансмембранну екзопептидазу ангіотензин-перетворюючого фактора 2 (ACE2-angiotensine converting enzyme), локалізовану в невеликій популяції добре диференційованих альвеолярних клітин (пневмоцитів) типу II і ентероцитах тонкої кишки (саме тому респіраторні симптоми не менше ніж в 1/3 випадків супроводжуються симптомами з боку шлунково-кишкового тракту: нудота, блювання та ін.). Органами мішенями, які вважаються більш чутливими до SARS-CoV-2, у наслідок їхніх рівнів експресії ACE2, є: легені, серце, стравохід, нирки, сечовий міхур і клубова кишка. Епідемічний штам має високу спорідненість із людським ACE2 і тому відзначають високий потенціал для ефективної передачі між людьми [28].

Інкубаційний період триває 2-14 діб. У більшості хворих симптоми з'являються приблизно через чотири-п'ять днів після зараження. Спектр клінічних симптомів досить широкий – від мізерних ознак до вкрай тяжкого перебігу з розвитком ГРДС з гострою легеневою недостатністю, котра є основною причиною смерті пацієнтів.

До основних клінічних критеріїв COVID-19 належать кашель і задишка чи утруднене дихання. Також, як правило, характерні гарячка, озноб, тремор, біль у м'язах, відчуття розбитості в усьому тілі. У частини пацієнтів можлива втрата нюху та смаку (аносмія та дисгевзія) [32]. Крім того, хворі можуть скаржитися на закладеність носа чи ринорею, кон'юнктивіт, шлунково-кишкові розлади – відсутність апетиту, зрідка на нудоту, блювання, пронос. Серед інших симптомів – біль у горлі, грудях, дезорієнтація, запаморочення, біль голови, кровохаркання, шкірні прояви. Хвороба, як правило, супроводжується високою температурою тіла - до 38–39°C. На піку захворювання температура зберігається, з'являється задишка, почуття нестачі повітря, серцебиття, стиснення в ділянці грудної клітки.

Для SARS-CoV-2 характерне дифузне ураження альвеол (включно з гіаліновими мембранами). Не виключено, що коронавірус COVID-19 чинить пряму цитопатичну дію на пневмоцити. Травму альвеолоцитів підсилюють прозапальні цитокіни (так звана цитокінова буря). Реплікація вірусу відбувається протягом декількох днів. Уроджена імунна відповідь не завжди справляється з вірусом. Відносно легкі симптоми можуть виникнути через прямий вірусний цитопатичний ефект та ефективні вроджені імунні реакції.

Із часом приєднується адаптивний імунітет. Це приводить до падіння титру вірусу. Однак при цьому також може підвищитись рівень прозапальних цитокінів, які можуть сприяти пошкодженню тканин, спричиняючи клінічне погіршення стану. Деякі пацієнти можуть реагувати на COVID-19 підвищеною імунною реакцією, що спричиняє цитокінову бурю.

1.3 Ускладнення коронавірусної інфекції

Головним ускладненням є цитокиновий шторм, який розвивається через індукцію віруса та інтенсивної цитокинової відповіді організму. Доведено, що ступінь тяжкості COVID-19 корелює з цитокиновим штормом – гіперпродукцією прозапальних цитокінів, таких, як IL-6, TNF α , IL-1 β білків гострої фази запалення. Прозапальні цитокіни і хемокіни, в тому числі IL-6, TNF α , IL-1 β , притягують запальні клітини до місця інфекції. Нейтрофіли і цитотоксичні Т-клітини, поряд із цитокінами, спричинюють пошкодження тканин легень, включаючи підвищення проникності судин і стимуляцію легеневого фіброзу, що в свою чергу і є одним із головних чинників ГРДС. У пацієнтів, які померли від хвороби спостерігався підвищений синтез IL-6, IL-2R, IL-8, IL-10 та TNF- α порівняно з пацієнтами, які одужали.

Критеріями розвитку ГРДС є поява нових симптомів ураження легень або посилення наявних протягом одного тижня після виявленої клінічної патології.

Вірус, інфікуючи пневмоцити, які покривають 95% площі альвеолярної поверхні та забезпечують газообмін із кров'ю в капілярах легень, спричинюють їх десквамацію в альвеолах, сприяють альвеолярній дисфункції, набряку і кровотечі, порушують газообмін і ведуть до дихальної недостатності. Одночасно зменшується кількість сурфактанту, а відповідно, здатність легень розширюватись і стискатись під час акту дихання знижується. Цей процес може призвести до колапсу легень під час видиху. У міру заповнення альвеол рідиною, наростає дихальна недостатність. Смерть настає при порушенні цілісності альвеолярної мембрани, що веде до накопичення рідких ексудатів в альвеолярному просторі, механічна вентиляція легень виявляється марною [30].

Цитокиновий шторм є також каталізатором сепсису. Потужний викид цитокінів імунною системою у відповідь на вірусну інфекцію або вторинні інфекції можуть призвести до симптомів сепсису, який є причиною смерті у 28 % летальних випадків COVID-19, внаслідок неконтрольованого запалення, що

призводить до поліорганної недостатності, особливо вражаючи серцеву, печінкову та ниркову системи. Більшість пацієнтів із SARS-CoV-2 інфекцією, у яких розвивалася ниркова недостатність, зрештою вмирали [14].

Симптоми сепсису є зміна кольору шкіри, зміна психічного стану, утруднене або часте дихання, низьке насичення киснем крові, зниження діурезу, тахікардія, слабкий пульс, холодні кінцівки або артеріальна гіпотензія.

Наслідком цитокінового шторму також є ураження судин кровоносної системи, що призводить до тромбоемболічних ускладнень. Рівень D-димеру при подальшому спостереженні може бути розглянутий у тих, хто одужав після важкого захворювання. Патологія SARS CoV-2 поєднує інтенсивний запальний процес з порушенням гемостазу у вигляді гіперкоагуляційних станів, що супроводжуються як мікроангіопатією, так і системними дефектами згортання крові. Таким чином, тромбозапалення є складним фактором у розвитку та прогресуванні захворювання SARS CoV-2, оскільки декілька компонентів обох процесів, запалення та тромбозу, є загальними та перекриваються [16].

До інших ускладнень включають ураження серця (міо-кардит, аритмію та ін.), дисфункцію печінки, гостре ураження нирок з розвитком гострої ниркової недостатності, поліорганну недостатність, отит, синусит, бронхіт, периферичну полінейропатію, вторинну інфекцію, бак-теріємію, грибкову суперінфекцію [17].

РОЗДІЛ 2.

ДІАГНОСТИКА КОРОНАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

2.1 Лабораторні методи діагностики

Полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією на виявлення нуклеїнової кислоти коронавірусу в матеріалі від хворого є золотим стандартом у сучасній діагностиці. Молекулярне тестування потрібне для підтвердження діагнозу. Сумарна чутливість - 89 %. Зразки беруть з верхніх дихальних шляхів (мазки або змиви з носоглотки і ротоглотки) в амбулаторних пацієнтів або зразки з нижніх дихальних шляхів (мокрота та/або ендотрахеальний аспірат або ж бронхоальвеолярний лаваж) у пацієнтів з важкими респіраторними захворюваннями. Можливий забір додаткових клінічних зразків (наприклад, крові, калу, сечі).

Також для більш швидкого скринінгу у виявленні вірусу використовуються швидкі тести на антиген та антитіла, де безпосередньо виявляють антиген (Ag) вірусу SARS-COV-2 та антитіла (Ab).

Але чутливість тесту не така висока як у ПЛР-системах, тому у разі, коли результат тесту негативний, а клінічні симптоми захворювання присутні, рекомендується провести тестування методом ПЛР.

Для моніторингу перебігу хвороби та вчасного виявлення ускладнення, доцільно аналізувати біомаркери, які мінливі при COVID-19 та пов'язані з діагнозом, прогнозом та наслідками хвороби.

Легені зазвичай є органом, що уражуються в першу чергу SARS-CoV-2 через їхню велику і сильно васкуляризовану поверхню. На ранніх стадіях захворювання можна використовувати нейронспецифічну енолазу (NSE) для диференціації пацієнтів, у яких розвинеться задишка. Показники феритину, D-димеру, лактатдегідрогенази (ЛДГ) та аспартатамінотрансферази (АСТ) були пов'язані з ризиком смертності у пацієнтів з COVID-19, яким в кінцевому підсумку знадобилася вентиляція легень. Більше того, ці біомаркери добре корелювали з клінічною тяжкістю. У тяжких випадках COVID-19 загальний титр, феритин та ЛДГ були ідентифіковані як прогностичні біомаркери розвитку

ОРДС.

Для серцево-судинної системи SARS-CoV-2 може викликати безпосередньо ендотеліальну дисфункцію, викликаючи стан, відомий як коагулопатія, пов'язана з COVID-19. Після проникнення вірусу в клітини підвищена проникність судин та експресія тканинного фактора у субендотеліальних клітинах з активацією тромбоцитів та лейкоцитів можуть запускати коагуляційний каскад. Пошкодження ендотелію та генералізований запальний стан є факторами тромбозу, які можуть сприяти серцево-судинним проявам.

В цілому, механізми, що лежать в основі серцево-судинних проявів, включають підвищене навантаження на серце, гіпоксемію, гіперволемію, пошкодження міокарда, аритмії, міокардит, стрес-індуковану кардіоміопатію, гостру ниркову недостатність і, як зазначалося вище, системну запальну цитокінів та хемокінів. Тригерні механізми можуть бути пов'язані з дисбалансом між підвищеним навантаженням на серце та зниженням постачання кисню, вторинним по відношенню до системних станів, з можливим інфарктом міокарда 2-го типу.

Серцеві біомаркери включають натрійуретичні пептиди та тропоніни, креатинкіназу (СКМВ), міоглобін, D-димер, мозковий натрійуретичний пептид (BNP) та його N-кінцевий прогормон (NT-proBNP), які можуть відображати ураження серцево-судинної системи[15].

Порушення коагуляції - це добре відомий системний ефект COVID-19, який може виникати в результаті прямого або непрямого впливу вірусу на ендотелій або в результаті імунотромбозу. COVID-19 може викликати зміни в коагуляційному каскаді з дисбалансом регуляторних механізмів зсідання крові та фібринолізу, зміною функції тромбоцитів та гіперзапальною реакцією. У цьому контексті D-димер був ідентифікований серед перших змінених біомаркерів зсідання крові при COVID-19 і є предиктором смертності при вступі. Так само плазмовий фібриноген, мабуть, пов'язаний з гіперзапаленням і

тяжкістю захворювання при COVID-19. Показники фібриногену та тромбіну були пов'язані з тяжкістю та вищим ризиком смерті.

Метаболізм сфінголіпідів регулює запалення та імунну відповідь за допомогою перетворення сфінгозину на сфінгозин-1-фосфат, збільшуючи викид лімфоцитів у кров з подальшим системним запаленням та вивільненням цитокінів та хемокінів при COVID-19. Подібно до метаболізму ліпідів, жиророзчинні вітаміни, такі як вітамін D, беруть участь у придушенні цитокінового шторму та посиленні імунної відповіді. Таким чином, вивчення ліпідного обміну та його біомаркерів може мати діагностичне та прогностичне значення при COVID-19.

Супутні метаболічні захворювання, включаючи ожиріння, діабет, серцево-судинні захворювання та гіпертонію, пов'язані з несприятливим прогнозом при COVID-19. Певний ступінь метаболічної дисрегуляції був виявлений при COVID-19, можливо, через імунне запалення та гіперкоагуляцію, а також мікробні зміни у фізіології господаря. Дійсно, пацієнти з COVID-19 з нижчим рівнем холестерину ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) більш схильні до госпіталізації, тоді як холестерин ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) був пов'язаний з сильнішим запаленням. Рівні вітаміну А та вітамін D були значною мірою пов'язані з розвитком ОРДС та тяжким перебігом хвороби. Показники гормонів щитовидної залози показали помітний зв'язок із тяжкістю захворювання та смертністю, що свідчить про важливість ранньої оцінки функції щитовидної залози та, за необхідності, початку лікування у госпіталізованих пацієнтів із COVID-19[18].

Взагалом у топ лабораторних досліджень залишаються визначення показників лімфопенії (спостерігається у 80% пацієнтів) та С-реактивного білка, рівень якого позитивно корелює з об'ємом ураження легень. Значне підвищення С-реактивного білка вказує на прогресуючий перебіг захворювання та можливість приєднання вторинної інфекції і в цілому свідчить про несприятливий прогноз.

З біохімічних показників, крім С-реактивного білка, необхідно визначати прокальцитонін, феритин, D-димер, висока концентрація якого також є несприятливим прогностичним фактором, а також рівень калію та показники печінкового та ниркового обміну[23].

2.2 Показники загального аналізу крові у хворих на коронавірус

У групи пацієнтів з квітня 2020 року по жовтень 2021 року лабораторно підтверджені інфекції важкого гострого респіраторного синдрому коронавірусу SARS-CoV-2 були виявлені як якісні, так і кількісні зміни показників крові.

Кількість нейтрофілів також була прогностичним фактором клінічного результату у госпіталізованих пацієнтів із COVID-19, тоді як співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів було тісно пов'язане з тяжкістю та смертністю при COVID-19. Крім того, було виявлено, що загальна кількість лімфоцитів, кластерне диференціювання (CD3+ , CD4 + , CD8 + , CD25 + , CD127 - Т-клітини та природні клітини-кілери (NK) знижуються при тяжкому перебігу COVID-19, тоді як С-реактивний білок, швидкість осідання еритроцитів та ІЛ-6 - загальні маркери запалення - були підвищені. Дані досліджень були представлені пацієнтами з центральних регіонах України, як жінками так і чоловіки віком від 20 років до 80 років .

У кожного четвертого пацієнта з позитивним результатом на SARS-CoV-2 спостерігалася певна форма лейкопенії (лейкопенія $< 4 \times 10^9$ клітин/л), при цьому більшість (78,0%) демонструє лімфоцитопенію (кількість лімфоцитів $< 1 \times 10^9$ клітин/л) . В дослідженні було виявлено, що у 8,0% пацієнтів кількість лейкоцитів у межах норми ($4-10 \times 10^9$ клітин/л), тоді як у 14,0% – підвищена кількість лейкоцитів ($> 10 \times 10^9$ клітин/л). Ступінь відхилення від нормальної кількості лейкоцитів, корелює з тяжкістю захворювання, оскільки було виявлено, що у пацієнтів із тяжким захворюванням, кількість лейкоцитів у два рази вища, ніж у пацієнтів із нетяжкою формою захворювання. Крім того, у крові важкохворих пацієнтів було більше нейтрофілів і менше лімфоцитів, ніж у крові пацієнтів з нетяжкою хворобою, які показали, що у

більшості пацієнтів (72,3%) кількість лімфоцитів нижче 1×10^9 клітин/л крові. Більша частка пацієнтів з тяжкими симптомами (61,1%) з діагнозом лейкопенія, на відміну від 33,7% пацієнтів, з усіма ступенями тяжкості захворювання, яким діагностовано лейкопенію. Крім того, у підгрупі тяжкохворих також спостерігалася лімфоцитопенія у 93,5% пацієнтів, що підтвердило попередні спостереження[21].

Важливі клінічні спостереження щодо гематологічних змін під час прогресування захворювання надає мікроскопічний аналіз мазків периферичної крові. У деяких пацієнтів, а саме у більшості пацієнтів похилого віку, спостерігалися рідкісні лейкоцитарні реакції — велика кількість реактивних лімфоцитів та токсогена зернистість нейтрофілів.

Іншим показником, який можна використовувалися для оцінки тяжкості захворювання, є відношення лімфоцитів до С-реактивного білка, яке було помітно зниженим у випадках тяжкого перебігу захворювання. Це зумовлено посиленням запального процесу (синдром цитокінового шторму) або прямим інфікуванням лімфоцитів та руйнуванням лімфоїдних органів.

Вірус може інфікувати Т-клітини через рецепторзалежне, опосередковане S-білком мембранне злиття, що призводить до виснаження цитотоксичної здатності лімфоцитів [15].

У системі червоної крові (еритроцитів) у пацієнтів з коронавірусною хворобою, аналіз показав, що у пацієнтів із тяжкими симптомами спостерігався нижчий рівень гемоглобіну, порівняно з пацієнтами з легкими симптомами.

Пов'язаний з еритроцитами лабораторний параметр феритин, зазвичай, використовується для оцінки метаболізму заліза. Було відзначено, що у пацієнтів із тяжким перебігом спостерігається підвищення рівня феритину. Це є наслідком запалення, оскільки феритин є позитивним білком гострої фази.

Показники швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ) був значно вищий у пацієнтів із тяжким захворюванням, що в свою чергу корелював з високими результатами С-реактивного білка.

Кількість тромбоцитів (PLT) були зниженні у більш ніж половини пацієнтів із середнім показником 100- 150 $10^9/l$. Це узгоджується з метааналітичними даними [6], які припускають, що низький рівень тромбоцитів асоціюється з важкою формою захворювання. Вважається, що тромбоцитопенія може бути результатом трьох переважних механізмів, включаючи зниження виробництва тромбоцитів, а також збільшення руйнування та збільшення споживання тромбоцитів. Однак це теоретичні положення, засновані на експериментальних і клінічних спостереженнях за перебігом інших вірусних інфекцій [19], і рекомендовані подальші дослідження щодо потенційного механізму тромбоцитопенії та ролі тромбоцитів у COVID-19.

Лабораторний аналіз D-димеру є чутливим і специфічним маркером активації коагуляції та фібринолізу, а також мають вирішальне значення для діагностики дисемінованого внутрішньосудинного згортання. Пацієнти з вірусною інфекцією мають високий ризик розвитку цього ускладнення [23], тому їх необхідно ретельно контролювати на предмет можливого розвитку тромботичних та геморагічних ускладнень. У патофізіології тромботичних ускладнень, пов'язаних із інфекцією SARS-CoV-2, вирішальну роль відіграють ендотеліальні дисфункції [24].

Цікавим фактом, але не перевіреним є те, що пацієнти з групою крові А більш схильні до інфекції, однак механізми, що відповідають за цей ефект, невідомі. Однак обидві статті, які встановлюють цю кореляцію, поки що опубліковані лише як препринти, тому інтерпретацію результатів авторами слід вважати попередньою до завершення процесу експертної оцінки[21].

РОЗДІЛ 3.

Матеріали і методи досліджень

3.1 Умови, об'єкти і методика експерименту

Проведена робота мала на меті вивчення показників загального аналізу крові при коронавірусній інфекції. Дослідження проводились в діагностичній лабораторії “Сінлаб-Україна” у відділах загальноклінічних та цитологічних досліджень, клінічних біо- та імунохімічних досліджень, молекулярно-генетичних досліджень, імуноферментних досліджень.

В роботі в якості об'єкту виступала група пацієнтів з позитивними результатами ПЛР-тесту та серологічного тесту на COV19. Моніторинг лабораторних показників крові у пацієнтів з виявленим COV19 проводився на протязі течії хвороби та після стану одужання, біомаркерів стану якого були негативний показник ПЛР-тесту, біохімічні показники С-реактивного білка, ферритин), коагулометричних показників (D-димеру, фібриногену по Клаусу).

Матеріал було взято за загальноприйнятою методикою при додержанні всіх преаналітичних правил та вимог забору крові та назо-орофарингеального зішкрябу.

При оцінці результатів основна увага приділялась загальному аналізу крові, показникам білої крові, оцінці ступеню відхилення в їх структурі від нормальних прототипів і визначенню кореляції з іншими біомаркерами. При дослідженні біохімічні показники крові звірялися з референтними значеннями, виявлені клітини при мікроскопічному дослідженні співставлялися з їх варіантом в нормі, а також при різних патологічних процесах.

При дослідженні виявлені результати та розбиті на фонові процеси від нормальних референтних значень:

Біохімічні показники:

- С-Реактивний білок (С-РБ) - є неспецифічним маркером інфекції, запаленням та пошкодженням тканин, належить до так званих білків гострої фази. С-РБ пов'язаний у комплекс із молекулами

фосфатидилхоліну на поверхні багатьох бактерій, є потужним опсоніном для моноцитів, стимулюючи перетравлення залучених організмів, також бере участь у взаємодії Т- і В-лімфоцитів, активує класичний шлях комплементу [30].

- Феритин - є відомим біомаркером запалення при COVID-19. Феритин людини складається з двох субодиниць, а саме важкого ланцюга феритину (FTH) та легкого ланцюга феритину (FTL). Синтез феритину регулюється різними «окислювальними та антиоксидантними стимулами», наприклад, закисом азоту, глутатіоном та іншими «активними формами кисню». Співвідношення експресії як FTH, і FTL залежить від запального процесу. Сироватковий феритин, будучи «реагентом гострої фази», відображає ступінь як хронічної, так і гострої запальної реакції в організмі. Однак неясно, чи є гіперферитинемія результатом або медіатором запалення. Вищий рівень феритину свідчить про активовану моноцитарно-макрофагальну систему. У моноцитах та макрофагах синтез феритину залежить від зміни статусу цитокінів як на транскрипційному, так і на трансляційному рівні [30].

Коагулометричні показники :

- Д-дімер — це білковий фрагмент, що утворюється при розчиненні згустка крові, який виникає при згортанні крові. При пошкодженні судини або тканин в організмі запускається процес згортання крові, що призводить до утворення тромбів. В нормі до 500 од.

Показники загального аналізу крові:

- Лейкоцитоз — наявність у крові більш як 11×10^9 /л лейкоцитів — часто виявляють під час рутинного лабораторного обстеження. Підвищення кількості лейкоцитів звичайно відображає нормальну відповідь кісткового мозку на інфекційний або запальний процес. Іноді лейкоцитоз буває проявом первинної патології кісткового мозку, пов'язаної із синтезом, дозріванням або смертю (апоптозом) лейкоцитів, яка призводить до лейкемії або мієлопроліферативного захворювання.

Часто сімейні лікарі можуть встановити етіологію лейкоцитозу на основі анамнезу та фізикального обстеження в поєднанні з результатами розгорнутого загального аналізу крові.

- Лейкопенія - називають стан, при якому спостерігається зниження рівня лейкоцитів (білих кров'яних тілець) у крові - $< 4,0 \times 10^9/\text{л}$. Зміни з боку лейкоцитів крові проявляються у вигляді лейкопенії, лейкоцитозу, лейкемоїдних реакцій. Лейкопенія може бути обумовлена переважним зменшенням у крові кількості нейтрофілів (нейтропенія), еозинофілів (еозинопенія), лімфоцитів (лімфопенія), моноцитів (моноцитопенія). Залежно від тривалості перебігу виділяють гострі, хронічні, циклічні та рецидивні лейкопенії. Клінічні прояви лейкопеній зазвичай виникають при різкому зниженні кількості лейкоцитів до 800 в 1 мкл, обумовленому або пригніченням кістковомозкового кровотворення, або посиленням розпадом лейкоцитів у периферичній крові, кровотворному апараті. У цих випадках є різке зниження фагоцитарної активності лейкоцитів (при нейтропеніях, моноцитопеніях), пригнічуються специфічні імунологічні механізми захисту (при моноцитопенії, лімфопенії), продукція пірогенів (при моноцитопенії та нейтропеніях), що призводить до розвитку бактеріальних та вірусних інфекційних захворювань.
- Лімфоцитопенія — зниження кількості лімфоцитів , абсолютна кількість — $< 1,0 \times 10^9/\text{л}$ та відносна — $< 19\%$.
- Лімфоцитоз — збільшена кількість лімфоцитів, абсолютна кількість — $> 4,8 \times 10^9/\text{л}$ та відносна — $> 40\%$. Лейкемоїдні реакції лімфатичного типу фіксуються найчастіше при інфекційному мононуклеозі, але іноді вони виникають при туберкульозі, сифілісі, бруцельозі. Картина крові при гострому інфекційному мононуклеозі — вірусній інфекції, що виникає частіше у дітей, характеризується високим лейкоцитозом за рахунок лімфоцитів. При інфекційному мононуклеозі лімфоцити набувають морфологічної різноманітності. У крові з'являється велика

кількість атипових лімфоцитів, що характеризуються дисплазією та збільшенням цитоплазми і набувають подібності з моноцитами.

- Тіні Боткіна-Гумпрехта - наявність напівзруйнованих ядер лімфоцитів, глибок хроматину із залишками нуклеол, є артефактом: у рідкій крові їх немає, вони утворюються в процесі приготування мазка. Поява незначної кількості тілець Боткіна-Гумпрехта при тяжких інфекціях, гострому лейкозі, хронічному лімфолейкозі (іноді - при інфекційному). Виявлення клітин Боткіна-Гумпрехта на ранніх етапах захворювання має діагностичну цінність. В нормі відсутні.
- Віроцити (атипові мононуклеари) - лімфоцитами з морфологічними особливостями моноцитів. Мононуклеарні клітинні структури містять одне ядро і вважаються молодими клітинами, що вступають в боротьбу з вірусами. За розміром, забарвленням цитоплазми і формі ядра атипові клітини схожі на лімфоцити і моноцити периферичної крові. Існує два види віроцитів: лімфоцитоподібні і моноцитоподібні, які відрізняються за своїми розмірами і складом цитоплазми. В нормі відсутні.
- Тромбоцитоз - це стан, що характеризується підвищенням числа тромбоцитів в крові - $400\text{—}100 \times 10^9/\text{л}$. Ці клітини відповідають за згортання крові, і при їх надлишку зростає ризик розвитку тромбів в судинах.
- Тромбоцитопенії - зниження кількості тромбоцитів нижче $150\text{—}100 \times 10^9/\text{л}$, що супроводжується підвищеною кровоточивістю та проблемами із зупинкою кровотечі.
- Нейтрофільоз - підвищений вміст нейтрофілів у крові - $> 7 \times 10^9/\text{л}$, що свідчить про розвиток бактеріальної інфекції, наприклад, ангіни, пневмонії, абсцесу. Нейтрофіли є дуже рухливими клітинами, вони здатні залишати кров'яне русло і прямувати до осередку інфекції, проникати у тканини, які недоступні для інших лейкоцитів, беручи активну участь у розвитку запалення[30].

РОЗДІЛ 4.

Результати досліджень та їх обговорення

4.1 Показники лейкоцитів при гострій фазі хвороби

У період з січня по грудень 2021 року була сформована група пацієнтів в кількості 413 чоловік, яка мала у анамнезі симптоми гострої респіраторної вірусної інфекції та пневмонію, вони мали позитивний ПЛР-результат на COVID-19 та високий рівень одного з показників біомаркерів до COVID-19, а саме С-реактивний білок, ферритин, Д-дімер. Показники даної групи збиралися на протязі активної фази хвороби та після одужання, маркером якого був негативний ПЛР-результат на COVID-19.

Усім пацієнтам на кожний скрінінговий цикл назначався загальний аналіз крові. Проводився автоматичним методом на 3-diff аналізаторі ABX Micros ES60 (Рис 4), підрахунок лейкоцитарної формули та дослідження морфологічних особливостей клітин проводилося мікроскопічним методом на мікроскопі PRIMOSTAR Olympus (Рис 4).



Рис 4. Мікроскоп PRIMOSTAR Olympus та аналізатор ABX Micros ES60

Приготування препаратів (мазків) крові відбувалось шляхом фіксації висушуванням, забарвлювалися за Романовським – Гімзою. Первинні експериментальні дані склалися з автоматичного методу дослідження

показників загального аналізу крові, а саме лейкоцитів в активній фазі хвороби. Показники приведені на діаграмі (Рис 4.1).

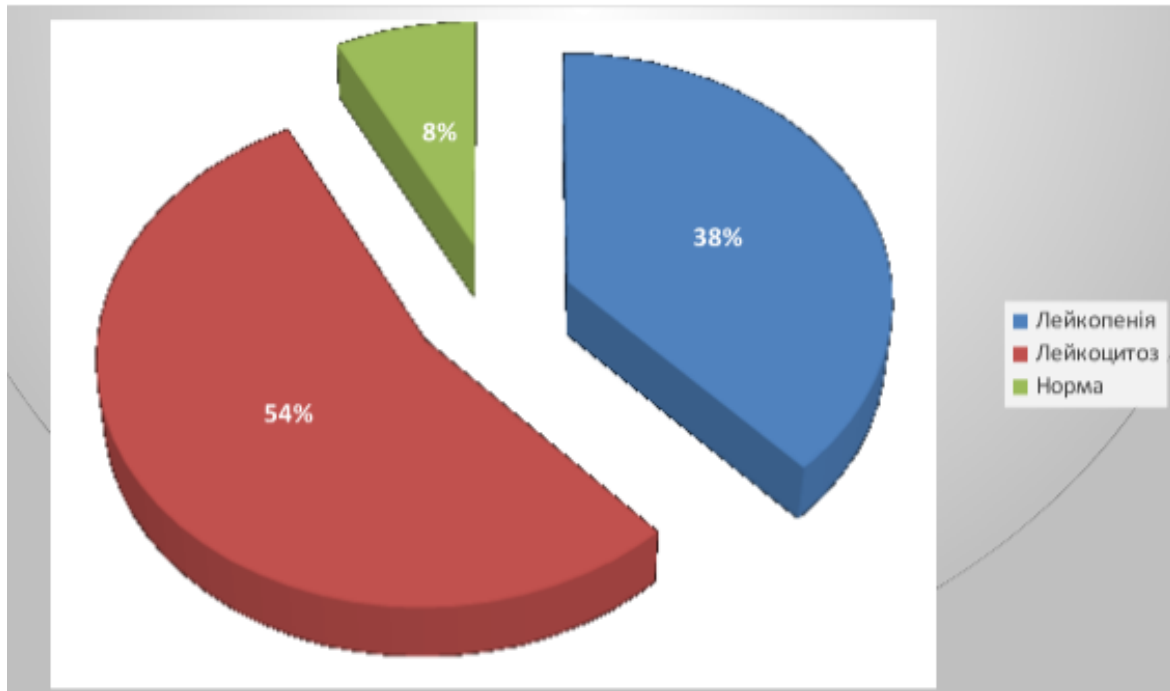


Рис 4.1 Показники лейкоцитів (%) у групі з виявленням COVID -19

Як видно з рисунка, найчисленнішу групу становлять пацієнти з лейкоцитозом – 225 (54%) випадків. Менший відсоток хворих становили пацієнти з лейкопенією – 157(38%), відповідно у 31(8%) загальна кількість лейкоцитів була у нормальному діапазоні. При важкості перебігу хвороби доцільно визначити ступень цитокінового шторму, який залежить від проліферації лейкоцитарного, лімфоцитарного та мієлоцитарного паростка. За літературними даними наявність у хворих лімфопенії і та нейтрофілії є маркером тяжкого перебігу хвороби[27], тому у групах пацієнтів з лейкоцитопенією, лейкоцитозами та нормою, було доцільно визначити наявність лімфопеній та нейтрофілій (таблиця 4.1).

Таблиця 4.1 Визначення кількості пацієнтів з лімфоцитопенією та нейтрофілією.

За загальною кількістю лейкоцитів	Кількість хворих									
			Нормальне значення		Лімфоцитопенія		Нейтрофілія		Нейтрофілія з лімфоцитопенією	
	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%
Норма	31	8	22	5,4	7	1,7	2	0,4	0	0
Лейкопенія	157	38	1	0,3	51	12,4	101	24,2	4	1,3
Лейкоцитоз	225	54	2	0,4	44	10,6	113	27,4	66	15,9
Всього	413	100	25	6,1	102	24,7	215	52	71	17,2

При дослідженні кількісних показників нейтрофілів та лімфоцитів у пацієнтів з нормальною кількістю лейкоцитів 22(5,4%), й кількість лімфоцитів нейтрофілів була нормальною, у пацієнтів з лейкопенією 101(24,2%) пацієнт був з нейтрофілією та 51(12,4%) спостерігалась лімфоцитопенія, а пацієнти з лейкоцитозом мали також велику кількість випадків з нейтрофілією — 113(27,4%) та 66(15,9%) були з лімфоцитопенією та з нейтрофілією, що є маркером генералізованої фази цитокінового шторму.

4.2 Зіставлення показників лейкоцитів та біомаркерів коронавірусної інфекції

Для визначення тяжких станів хвороби, групам пацієнтів з лейкоцитозами, паралельно було проведено лабораторні дослідження, які є маркерами ускладнень, а саме кількісне визначення С-реактивного білку та Д-Дімеру.

Цілью С-реактивного білку, безпосередньо пов'язаний з тяжкістю та прогресуванням хвороби COVID-19 та вказує на ступінь цитокінового шторму. При легкій формі захворювання кількість СРБ у крові суттєво не зростає, то при

важких формах вона зазвичай збільшується дуже помітно, тому актуальною границею було взято результати з показниками більше 30 мг/л.

Що до Д-дімеру, то показник відображає посилення генерації тромбіну, який в свою чергу бере участь у згортанні крові. При неконтрольованому вивільненні прозапальних медіаторів у русло судин, іде пригнічення стінок ендотелію судин, відповіддю чого є вивільнення тромбіну, що в свою чергу запускає патологічне згортання крові і утворення тромбів.

Результати показали, що значне підвищення рівня Д-дімеру є одним із прогностичних параметрів смертності від COVID-19, навіть за відсутності симптомів тяжкої пневмонії. Тому для Д-дімеру актуальною границею було взято результати з показниками більше 2000 нг/мл. Зіставлення результатів на діаграмі (Рис 4.2).

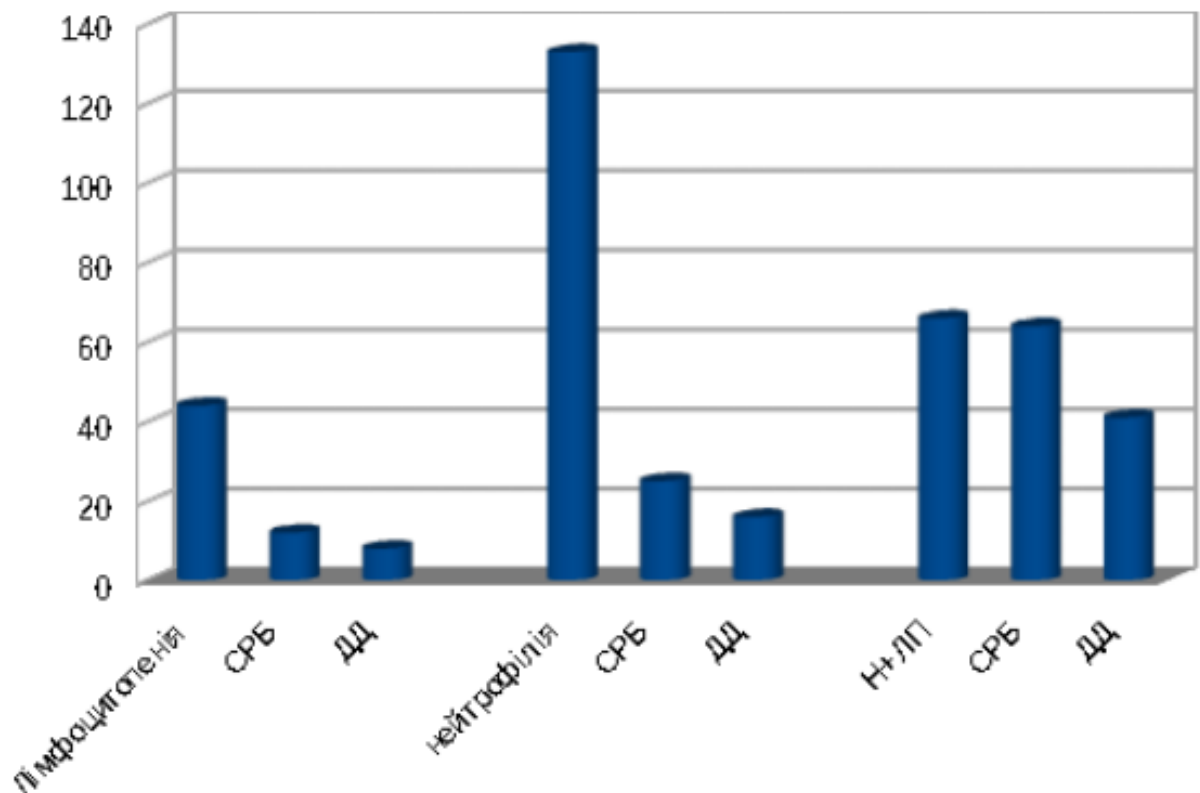


Рис 4.2 Діаграма показників біомаркерів Covid -19 відносно показників білої крові

Проведені дослідження у групі пацієнтів з лейкоцитозом одночасно патологічно-низькими лімфоцитами та нейтрофілією — 66(15,9%), виявили високий рівень випадків із значно патологічними показниками С-реактивного

білку — 61(92,5) та Д-дімеру — 48(72,8%). Це свідчить про сильну і неконтрольовану імунна відповідь. У пацієнтів з лімфоцитопенією - 44(10,6%), значно високі були показники біомаркерів: 8(18,2%) - С-РБ та 3(6%) - Д-дімер.

Не зважаючи на деякі літературні дані про значну загрозу лімфоцитопенії у розвитку тяжкої течії хвороби, така картина обумовлена диференціацію лімфоцитів на В-лімфоцити та Т-лімфоцити. Якщо при імунній відповіді задіяна значна кількість В-лімфоцитів і лімфоцитопенія виражена за рахунок їх браку, то запальний процес проходить більш помірно та сироватковий рівень прозапальних цитокінів буде в нормі. Якщо у пацієнтів лімфоцитопенія обумовлена браком Т-клітин вірогідність тяжкої течії хвороби є високою[29].

4.3 Морфологічні особливості білої крові при COVID-19

Дослідження лейкоцитарної формули, має велике значення в діагностиці більшості інфекційних запальних захворювань, а також для оцінки тяжкості стану та ефективності терапії, що проводиться. Різні види лейкоцитів виконують специфічні функції, тому визначення співвідношення різних видів лейкоцитів, змісту молодих форм (зсув лейкоцитарної формули вліво), виявлення патологічних клітинних форм- несе цінну діагностичну інформацію.

При дослідженні лейкоцитарної формули, було виявлено якісні та кількісні зміни в системі білої крові від нормальних показників. У групі пацієнтів з лейкоцитозами були виявлені нейтрофіли, залежно від ступеня зрілості в периферичній крові, паличкоядерні та молодші клітини нейтрофільного ряду – метамієлоцити, мієлоцити.




Гранулоцити					Агранулоцити	
Базофіли	Еозинофіли	Нейтрофіли			Лімфоцити	Моноцити
		Метамієлоцити	Паличкоядерні	Сегментоядерні		
0-1	2-4	0-1	2-5	55-68	23-35	5-8
						

Рис 4.3 Лейкоцитарна формула крові

Група пацієнтів з нейтрофілією мала підвищені показники паличкоядерних нейтрофілів, від 7- 18% клітин білої крові. Значні зміни спостерігалися у хворих з одночасною лімфоцитопенією та нейтрофілією , а саме підвищені показники паличкоядерних нейтрофілів, метамієлоцити та мієлоцити зустрічалися у 53(80,3%), 15(22,8%) - мали токсогену зернистість нейтрофілів, лімфоцити у 66(100%) - мали велику синю цитоплазму або лімфоплазмоцитоїдну морфологію, а моноцити активовані з висипкою та вакуолізацією (Рис 4.4).

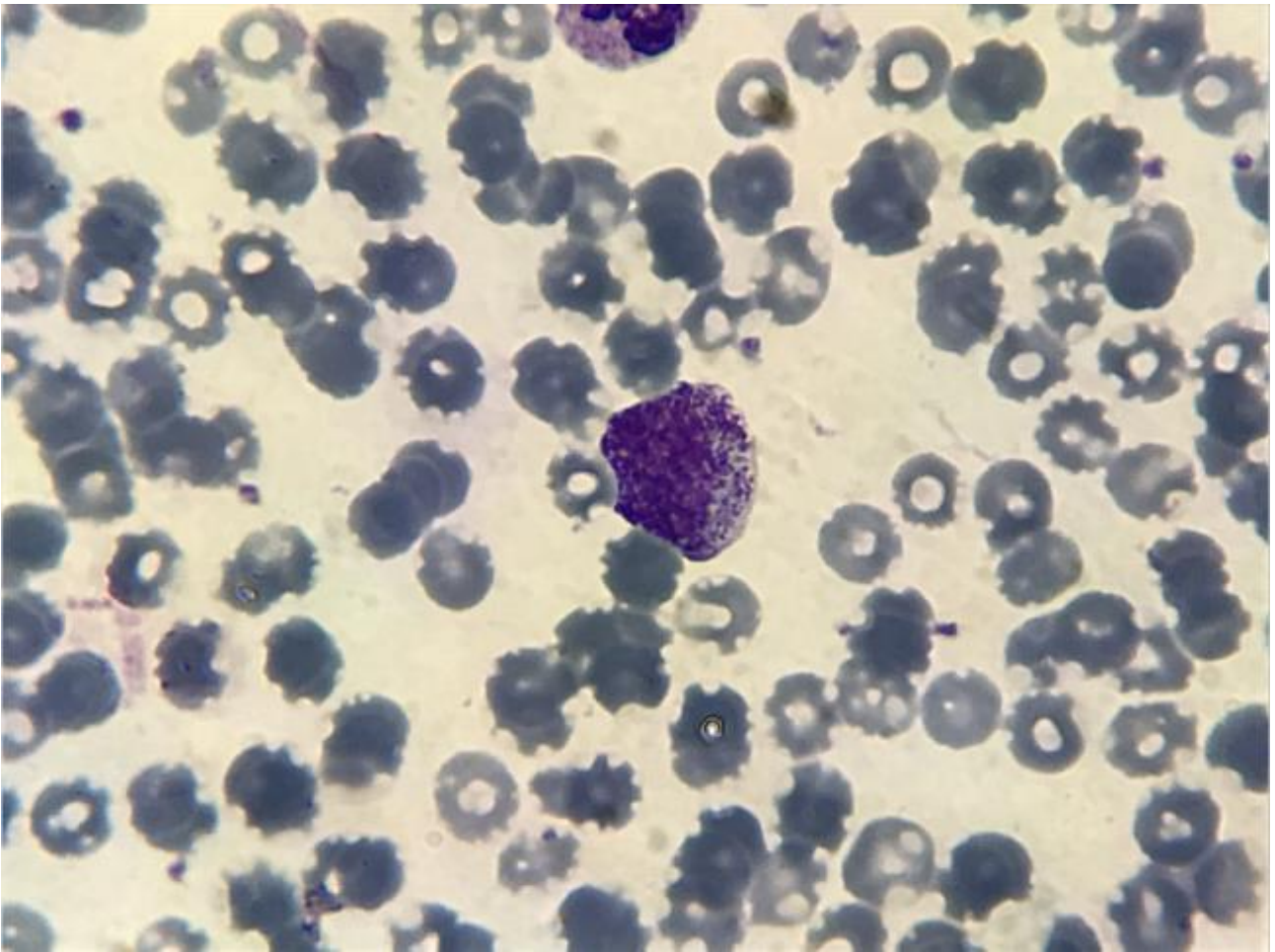


Рис. 4.4. Мазок периферичної крові у пацієнта з Covid-19. Моноцит з висипкою та вакуолізацією. Збарвлення за Романовським–Гімзою.

Збільшення: $\times 1000$

Зустрічалися тіні Боткіна-Гумпрехта та лізовані нейтрофіли- 10(15%) (Рис. 4.5).

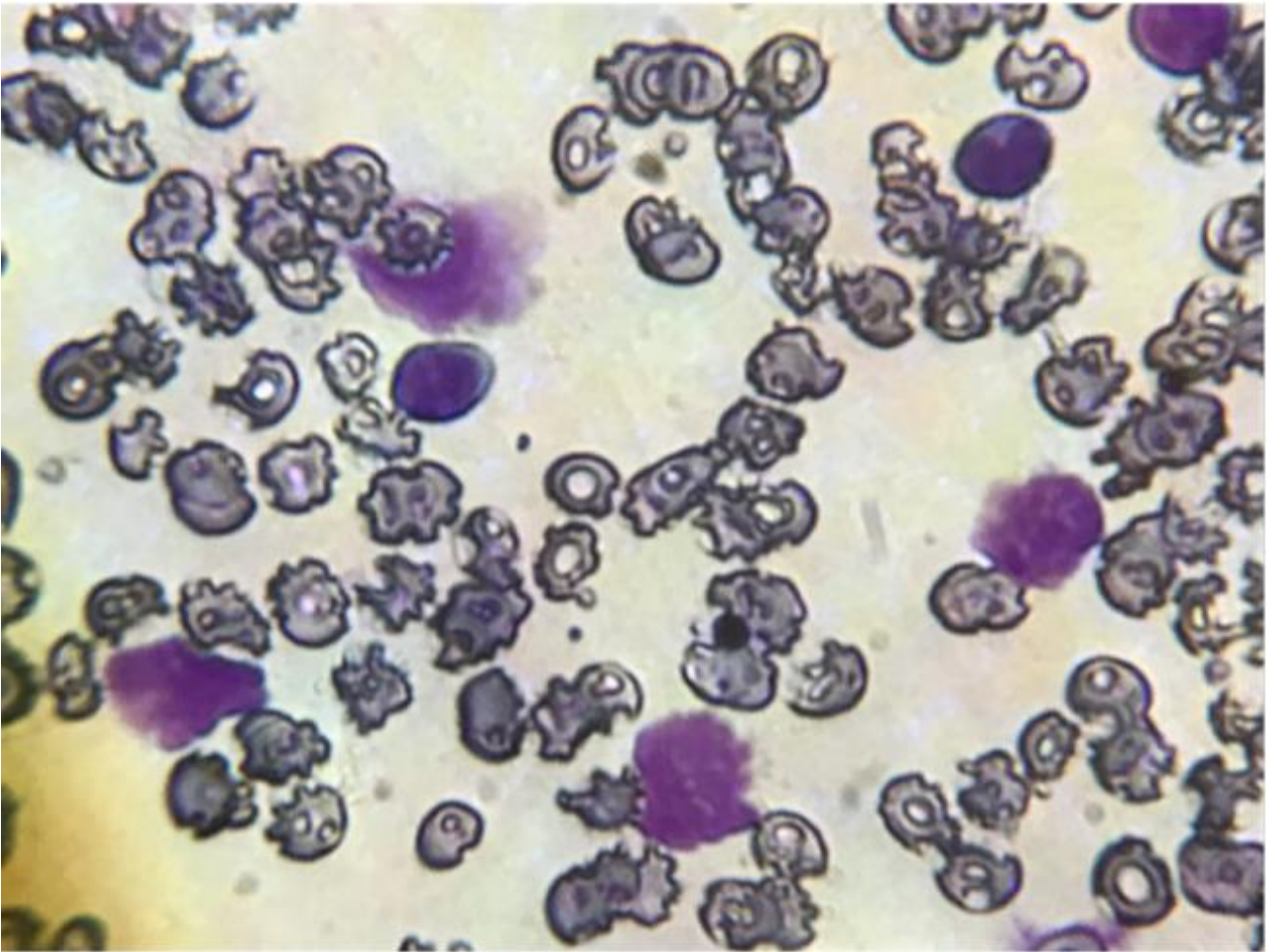


Рис. 4.5 Мазок периферичної крові у пацієнта з Covid-19. Тіні Боткіна-Гумпрехта(лізовані лімфоцити). Зabarвлення за Романовським-Гімзою.

Збільшення: ×1000

У групі пацієнтів з лейкоцитопенією, а це 157(38%) по мієлоцитарному паростку зустрічались нейтрофіли з гіпер-сегментованими ядрами - 71(45,3%) та віроцитами, кількість яких була половиною від відносної кількості лімфоцитів(Рис. 4.6, Рис 4.7).

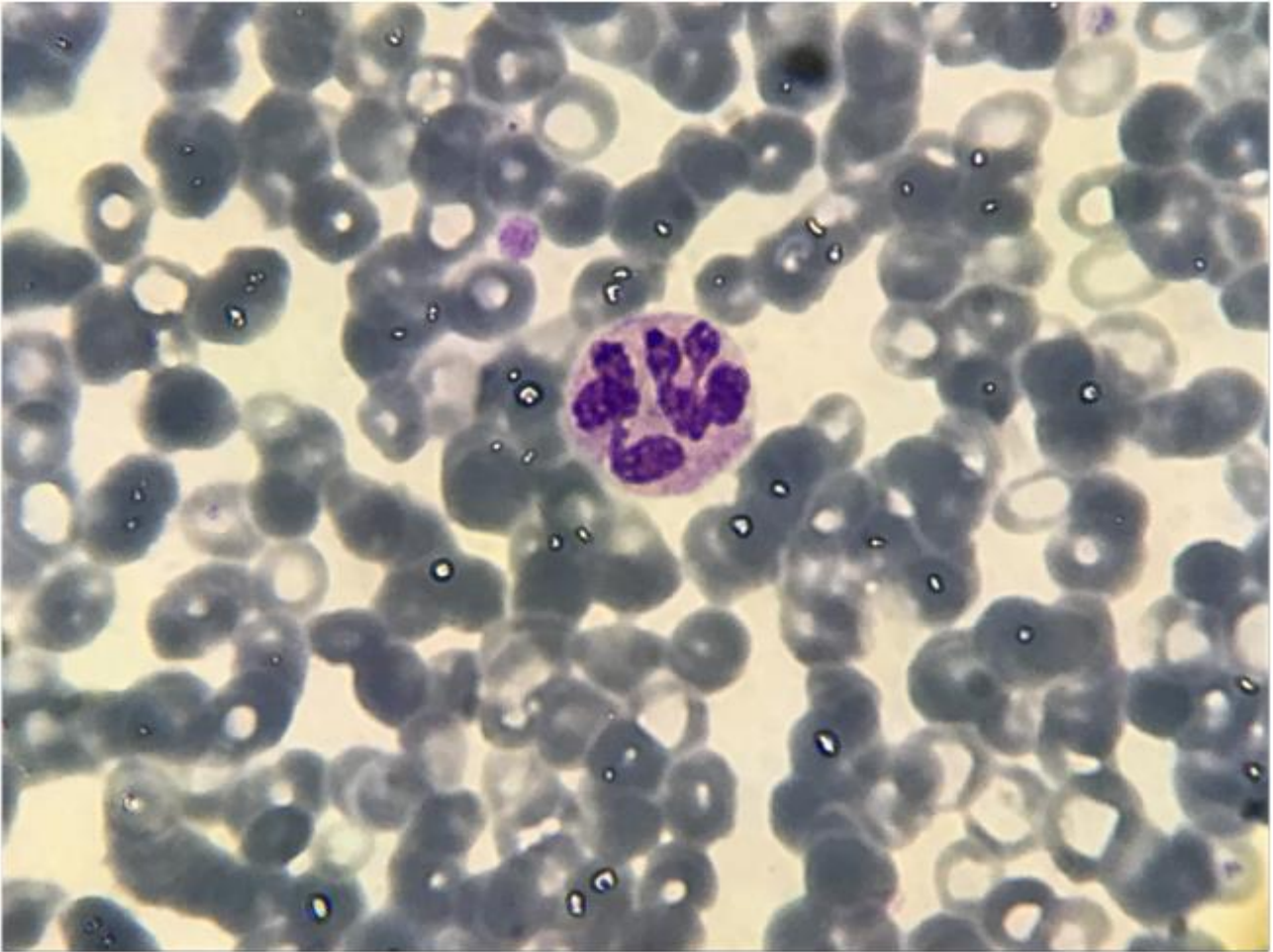


Рис. 4.6 Мазок периферичної крові у пацієнта з Covid-19. Гіпер-
сегментовані нейтрофіл. Зabarвлення за Романовським–Гімзою.

Збільшення: ×1000

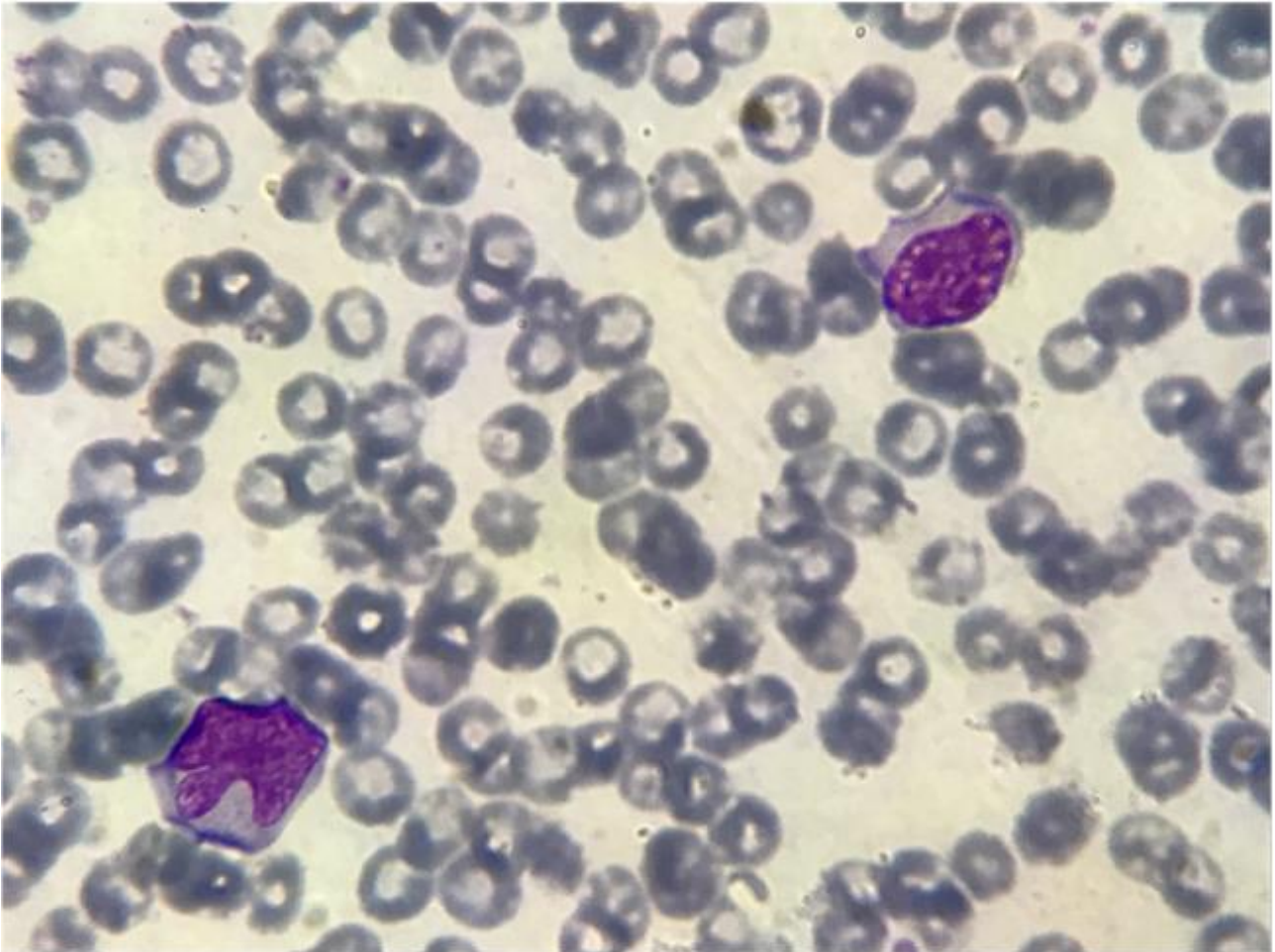


Рис. 4.7 Мазок периферичної крові у пацієнта з Covid-19. Віроцити.

Забарвлення за Романовським–Гімзою. Збільшення: $\times 1000$

Аналізуючи взагалом морфологічні зміни, як при лейкоцитозах так і при лейкоцитопенії, найчастіше спостерігалися нейтрофіли зі зліпим хроматином, множинними аномальними формами ядер, деформацією псевдо-Пельгера-Хюета і змащеними нейтрофілами, що є наслідком значного навантаження на мієлоцитарний паросток у наслідок цитокінового шторму (Рис. 4.8). Наявність віроцитів та тіней Боткіна-Гумпрехта є картиною тяжких інфекцій якою є коронавірус.

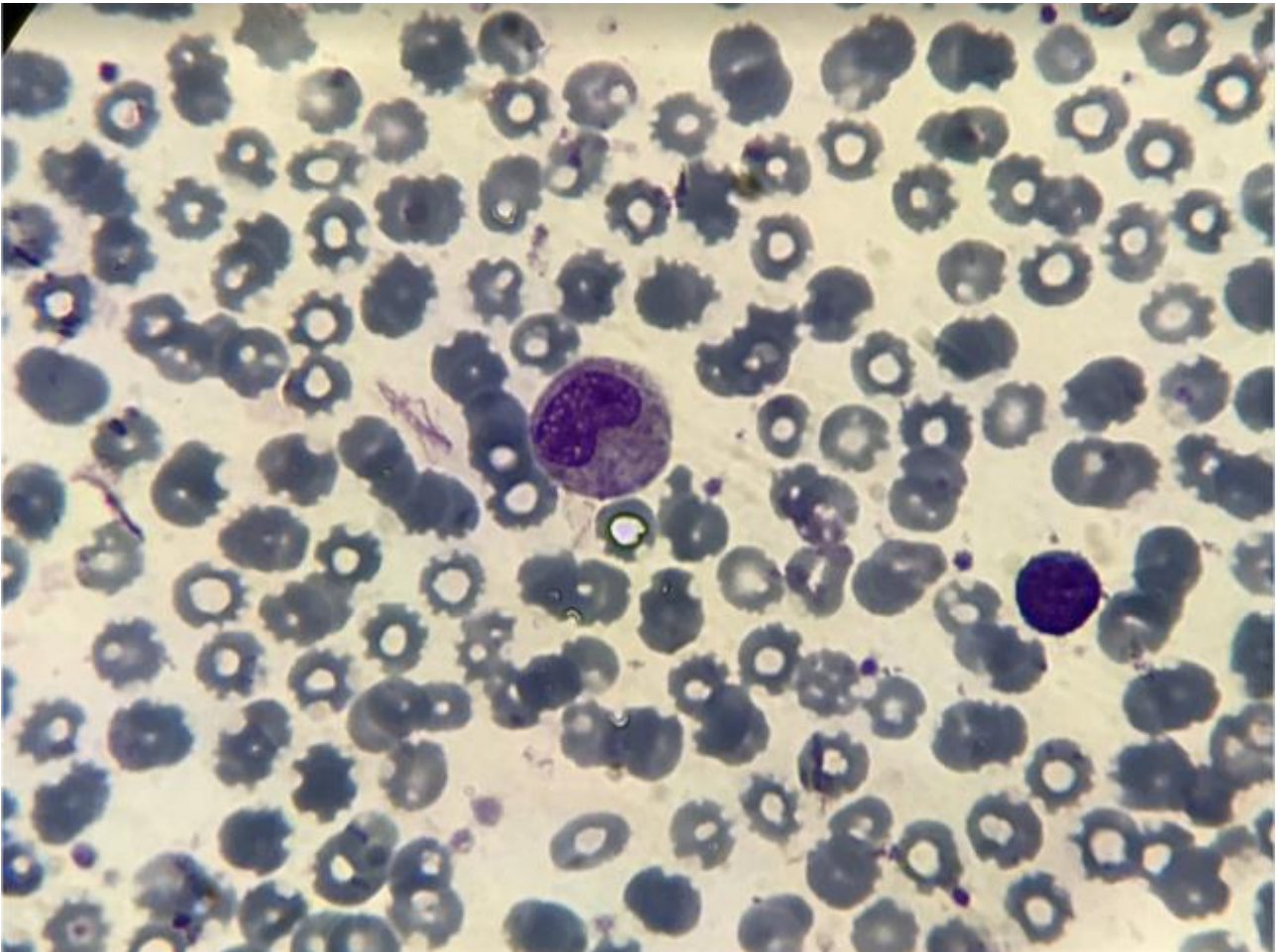


Рис. 4.8 Мазок периферичної крові у пацієнта з лейкоцитопенією. Поцентру поля зору клітина з деформацією ядра - псевдо-Пельгера-Хюета нейтрофіл. Забарвлення за Романовським-Гімзою. Збільшення: $\times 1000$

Висновки

- 1.«Цитокіновий шторм» є критичним чинником тяжкого перебігу хвороби Covid19. Моніторинг показників загального аналізу крові дає змогу швидко і ефективно оцінити стан білої крові та попередити неконтрольовану реакцію організму.
 2. Атиповий прояв вірусу при гострій фазі хвороби- це хвильоподібний перебіг хвороби при якому хибне зникнення клінічних симптомів є наслідком лейкопенії на тлі лімфоцитопенії .
 - 3.Порушення балансу клітин лімфоїдного та мієлоцитарного ряду , а саме поява лімфоцитопенії одночасно з приєднанням нейтрофілією на тлі лейкоцитозу- є критичним показником у перебігу хвороби.
 4. Лімфоцитопенія та нейтрофілія є надійним індикатором інфекції COVID-19 і диференціація якісних та кількісних змін лімфоцитарного та мієлоцитарного паростка, дає змогу виявити групи ризику.
 5. Значне навантаження на систему білої крові, інфекцією COVID-19 призводить до пригнічення, як лімфоцитарного так і мієлоцитарного паростку, що є ризиком розвитку у майбутньому різноманітних лейкемоїдних реакцій.
-

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. CDC Morbidity and Mortality Weekly Report// *Revised U.S. Surveillance Case Definition for Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Update on SARS Cases --- United States and Worldwide*, 52(49);1202-1206, 2003.
2. В.І. Покровський, С.Г. Пак, Н.І. Бріко, Б.К. Данилкін // *Інфекційні хвороби та епідеміологія* - М.: ГЕОТАР-Медіа, 2007. - 816 .
3. *Огляд нового коронавірусу 2019 року (2019-nCoV)*// 1 лютого 2020
-М. Джерело контенту: Національний центр імунізації та респіраторних захворювань (NCIRD), відділ вірусних захворювань.
4. Gorbalenya A.E., // *The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2* // *Nat. Microbiol.* – 2020. – Vol. 5, no. 4. – P. 536–544. 5. *Encyclopaedia Brit.*
5. Wrapp D. // *Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation* // *Science.* – 2020. – Vol. 367, no. 6483. – P. 1260–1263.
6. Bosch B.J// *The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion corecomplex* // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 77, no. 16. – P. 8801–8811.
7. Chen Y. // *The phosphorylation of the N protein could affect PRRSV virulence in vivo* // *Vet. Microbiol.* – 2019. – Vol. 231. – P. 226–231.
8. Tilocca B.// *Immunoinformatic analysis of the SARS-CoV-2 envelope protein as a strategy to assess cross-protection against COVID-19* // *Microbes Infect.* – 2020. – Vol. 22, no. 4–5. – P. 182–187.
9. Ahmed S.F. Quadeer A.A. McKay M.R. // *Preliminary identification of potential vaccine targets for the COVID-19 coronavirus (SARS-CoV-2) based on SARSCoV immunological studies* // *Viruses.* – 2020. – Vol. 12, no. 3. – P. 254.
10. Wrapp D. // *Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation* // *Science.* – 2020. – Vol. 367, no. 6483. – P. 1260–1263.
11. Xia S. // *Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein* // *Cell Mol. Immunol.* – 2020. – Vol. 17, no. 7. – P. 765–767.

12. Андрейчин М.А.// *Проблема емерджентних інфекцій в Україні* : Інфекційні хвороби. – 2019. – № 4(98). – С. 4-9.
13. Макаров В. В., Петров А. К., Васильев Д. А. // *Основы учения об инфекции* (учебное пособие). Москва/Ульяновск.
14. Merad M. // *Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages* / *Nature Reviews Immunology*. – 2020. – Vol. 20. – P. 355-362.
15. W.Li, M.J. Moore, N. Vasilieva, J. Sui, S.K. Wong, M.A. Berne, M. Somasundaran, J.L. Sullivan, K. Luzuriaga, T.C. Greenough, H. Choe, M. Farzan // *Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus* *Nature*, 426(2003), pp.450-454.
16. Chen Y. // *The phosphorylation of the N protein could affect PRRSV virulence in vivo* // *Vet. Microbiol.* – 2019. – Vol. 231. – P. 226–231.
17. M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Krüger, T. Herrler, S. Erichsen, T.S. Schiergens, G. Herrler, N.H. Wu, A. Nitsche, M.A. Müller, C. Drosten, S. Pöhlmann // *SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor* *Cell*, 181(2020), pp.271-280.e278.
18. J. Lan, J. Ge, J. Yu, S. Shan, H. Zhou, S. Fan, Q. Zhang, X. Shi, Q. Wang, L. Zhang, X. Wang // *Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor* *Nature*, 581(2020), pp.215-220.
19. Wang X., Xu W., Hu G., Xia S., Sun Z., Liu Z., Xie Y., Zhang R., Jiang S., Lu L. // *SARS-CoV-2 Infects T Lymphocytes Through Its Spike Protein-Mediated Membrane Fusion*. *Cell. Mol. Immunol.* 2020:1–3. doi: 10.1038/s41423-020-0424-9.
19. Yao Z., DuBois D.C., Almon R.R., Jusko W.J. // *Pharmacokinetic, pharmacodynamic Modeling of Corticosterone Suppression and Lymphocytopenia by Methylprednisolone in Rats*. *J. Pharm.Sci.* 2008;97:2820–2832. doi:10.1002/jps.21167.
20. J. Shang, G. Ye, K. Shi, Y. Wan, C. Luo, H. Aihara, Q. Geng, A. Auerbach, F. Li // *Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2* *Nature*, 581(2020), pp.221-224.

21. Zini G., Bellesi S., Ramundo F., d'Onofrio G.// *Morphological Anomalies of Circulating Blood Cells in COVID-19*. Am. J. Hematol. -2020;95:870–872. doi:10.1002/ajh.25824.
22. Matthew Z.T., Chek Meng Poh., Laurent Renia., Paul A.MacAry., Lisa F.P.// *The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention*. Nature Reviews Immunology.- 2020.
23. Li Q., Ding X., Xia G., Geng Z., Chen F., Wang L., Wang Z. A Simple// *Laboratory Parameter Facilitates Early Identification of COVID-19 Patients*.medRxiv. - 2020 doi:10.1101/2020.02.13.20022830.
24. J.Shang, Y.Wan, C.Luo, G.Ye, Q.Geng, A. Auerbach, F. Li// *Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,117(2020), pp.11727-11734.
25. Tan L., Wang Q., Zhang D., Ding J., Huang Q., Tang Y.Q., Wang Q., Miao H. // *Lymphopenia Predicts Disease Severity of COVID-19: A Descriptive and Predictive Study*. Signal Transduct. Target. Ther. 2020;5:33. doi:10.1038/s41392-020-0148-4.
26. H. Nishiura, T. Kobayashi, T. Miyama // *Estimation of the asymptomatic ratio of novel coronavirus infections (COVID-19)* // MedRxiv. – 2020. – Electronic resource. – Access mode.
27. Zhang B., Zhou X., Zhu C., Feng F., Qiu Y., Feng J., Joa Q., Song Q., Zhu B., Wang J. // *Immune Phenotyping Based on Neutrophil-to-lymphocyte Ratio and IgG Predicts Disease Severity and Outcome for Patients with COVID-19*. - medRxiv. 2020 doi:10.1101/2020.03.12.20035048.
28. Henry BM, De oliveira MHS, Benoit S, Plebani M, Lippi G. // *Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis*.
29. Дженис О Х.Л., Кен-Эн Ган С., Бертолетти А., Тан Ю.Дж.// *Понимание иммунного ответа Т-клеток при коронавирусной инфекции SARS*//Эмердж.микробы заражают.2012 г.;1(9): стор.23.

30. Kernan K.F., Carcillo J.A. // *Hyperferritinemia and inflammation. Int Immunol*//2017;29:401–409. doi:10.1093/intimm/dxx031.

ЕЛЕКТРОННІ РЕСУРСИ:

1. Концептуальна модель спалаху коронавірусної хвороби 2019 (COVID-19) в Ухані та Китаї.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S120197122030117X>

2. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/summary.html>

**КОДЕКС АКАДЕМІЧНОЇ ДОБРОЧЕСНОСТІ
ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ ХЕРСОНСЬКОГО
ДЕРЖАВНОГО УНІВЕРСИТЕТУ**

Я, Двороковська Вікторія Ігорівна, учасниця освітнього процесу Херсонського державного університету, **УСВІДОМЛЮЮ**, що академічна доброчесність – це фундаментальна етична цінність усієї академічної спільноти світу.

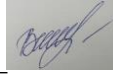
ЗАЯВЛЯЮ, що у своїй освітній і науковій діяльності **ЗОБОВ'ЯЗУЮСЯ**:

– дотримуватися:

- вимог законодавства України та внутрішніх нормативних документів університету, зокрема Статуту Університету;
- принципів та правил академічної доброчесності;
- нульової толерантності до академічного плагіату;
- моральних норм та правил етичної поведінки;
- толерантного ставлення до інших;
- дотримуватися високого рівня культури спілкування;
 - надавати згоду на:
- безпосередню перевірку курсових, кваліфікаційних робіт тощо на ознаки наявності академічного плагіату за допомогою спеціалізованих програмних продуктів;
- оброблення, збереження й розміщення кваліфікаційних робіт у відкритому доступі в інституційному репозитарії;
- використання робіт для перевірки на ознаки наявності академічного плагіату в інших роботах виключно з метою виявлення можливих ознак академічного плагіату;
 - самостійно виконувати навчальні завдання, завдання поточного й підсумкового контролю результатів навчання;
 - надавати достовірну інформацію щодо результатів власної навчальної (наукової, творчої) діяльності, використаних методик досліджень та джерел інформації;
 - не використовувати результати досліджень інших авторів без використання покликань на їхню роботу;
 - своєю діяльністю сприяти збереженню та примноженню традицій університету, формуванню його позитивного іміджу;
 - не чинити правопорушень і не сприяти їхньому скоєнню іншими особами;
 - підтримувати атмосферу довіри, взаємної відповідальності та співпраці в освітньому середовищі;
 - поважати честь, гідність та особисту недоторканність особи, незважаючи на її стать, вік, матеріальний стан, соціальне становище, расову належність, релігійні й політичні переконання;
 - не дискримінувати людей на підставі академічного статусу, а також за національною, расовою, статевою чи іншою належністю;
 - відповідально ставитися до своїх обов'язків, вчасно та сумлінно виконувати необхідні навчальні та науково-дослідницькі завдання;
 - запобігати виникненню у своїй діяльності конфлікту інтересів, зокрема не використовувати службових і родинних зв'язків з метою отримання нечесної переваги в навчальній, науковій і трудовій діяльності;
 - не брати участі в будь-якій діяльності, пов'язаній із обманом, нечесністю, списуванням, фабрикацією;
 - не підроблювати документи;
 - не поширювати неправдиву та компрометуючу інформацію про інших здобувачів вищої освіти, викладачів і співробітників;
 - не отримувати і не пропонувати винагород за несправедливе отримання будь-яких переваг або здійснення впливу на зміну отриманої академічної оцінки;
 - не залякувати й не проявляти агресії та насильства проти інших, сексуальні домагання;
 - не завдавати шкоди матеріальним цінностям, матеріально-технічній базі університету та особистій власності інших студентів та/або працівників;
 - не використовувати без дозволу ректорату (деканату) символіки університету в заходах, не пов'язаних з діяльністю університету;
 - не здійснювати і не заохочувати будь-яких спроб, спрямованих на те, щоб за допомогою нечесних і негідних методів досягати власних корисних цілей;
 - не завдавати загрози власному здоров'ю або безпеці іншим студентам та/або працівникам.

УСВІДОМЛЮЮ, що відповідно до чинного законодавства у разі недотримання Кодексу академічної доброчесності буду нести академічну та/або інші види відповідальності до мене можуть бути застосовані заходи дисциплінарного характеру за порушення принципів академічної доброчесності.

27.09.2021
(дата)



(підпис)

Вікторія Двороковська
(ім'я, прізвище)