

МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ SARS-CoV-2

Михайлов А.О.¹, Плехова Н.Г.¹, Сокотун С.А.¹, Симакова А.И.¹, Черненко И.Н.¹,
Просекова Е.В.¹

¹ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Владивосток, e-mail: pl_nat@hotmail.com

Изучение патомеханизма тяжелого острого респираторного синдрома коронавируса-2 (SARS-CoV-2) остается на сегодняшний день актуальной проблемой. Амплификация вирусной РНК с помощью полимеразно-цепной реакции является золотым стандартом для подтверждения инфекции, но требует длительного времени обработки и показывает ложноотрицательные показатели до 15–20%. Существует потребность в альтернативных, менее дорогих и более доступных тестах для диагностики и уточнения степени тяжести течения заболевания. Анализировали популяционный состав ядродержащих клеток крови и оценивали их мембранный потенциал митохондрий у 200 пациентов с симптомами COVID-19, которым было проведено тестирование наличия вируса с помощью ПЦР, из них 100 с положительным и 100 с отрицательным результатом. Статистически значимые различия наблюдались по содержанию нейтрофилов, лимфоцитов и С-реактивного белка. У больных COVID-19 методом проточной цитометрии определено увеличение количества нейтрофилов и лимфоцитов со сниженным уровнем мембранного потенциала митохондрий, что свидетельствует об активации митохондриального пути апоптоза. Сочетание соответствующих пороговых значений для определенных гематологических параметров может помочь в выявлении ложноположительных/отрицательных тестов ПЦР. Полученные данные по митохондриальной дисфункции могут служить основой для разработки технологий управления продолжительностью жизни клеток в условиях оксидативного стресса при инфекции COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, вирус SARS-CoV-2, клинический анализ крови, нейтрофилы, лимфоциты, мембранный потенциал митохондрий.

MEMBRANE POTENTIAL OF LEUKOCYTE MITOCHONDRIA IN INFECTION CAUSED BY THE SARS-CoV-2 VIRUS

Mikhailov A.O.¹, Plekhova N.G.¹, Sokotun S.A.¹, Simakova A.I.¹, Chernenko I.N.¹,
Prosekova E.V.¹

¹Pacific State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Vladivostok, e-mail: pl_nat@hotmail.com

The issues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pathomechanism remain an urgent problem today. Viral RNA amplification by polymerase chain reaction is the gold standard for confirming infection, but requires a long processing time and shows false negative rates of up to 15–20%. There is a need for alternative, less expensive and more accessible tests to diagnose and clarify the severity of the disease. The population composition of nucleated blood cells was analyzed and their mitochondrial membrane potential was assessed in 200 patients with symptoms of COVID-19 who were tested for the presence of the virus using PCR, of which 100 were positive and 100 were negative. Statistically significant differences were observed in the content of neutrophils, lymphocytes and C-reactive protein. In patients with COVID-19, flow cytometry determined an increase in the number of neutrophils and lymphocytes with a reduced level of mitochondrial membrane potential, which indicates activation of the mitochondrial apoptosis pathway. The combination of appropriate thresholds for certain hematological parameters can help in the detection of false positive/negative PCR tests. The obtained data on mitochondrial dysfunction can serve as a basis for the development of technologies for managing cell lifespan under conditions of oxidative stress during COVID-19 infection.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2 virus, clinical blood test, neutrophils, lymphocytes, mitochondrial membrane potential.

Коронавирусное заболевание 2019 (COVID-19) - сложная респираторная и тромбогенная патология, вызываемая новым штаммом вируса SARS-CoV-2. Показано, что тяжесть ее течения коррелирует с лейко-, лимфопенией и синдромом цитокинового шторма, что указывает на нарушение иммунологической функции организма на фоне

несбалансированной реакции клеток [1]. Ключевая роль в воспалительных реакциях, вызванных SARS-CoV-2, отводится клеточным факторам врожденного иммунитета, в частности, в качестве основного триггера цитокинового шторма у пациентов с COVID-19 продемонстрирована провоспалительная активность легочных макрофагов [2]. Показано, что в лейкоцитах крови повышается экспрессия энхансера легкой цепи ядерного фактора каппа активации В-клеток (NF- κ B), ферментов циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) и индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS) [3]. Гиперактивация этих факторов в макрофагах или дендритных клетках приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов, таких как IL6, IL1 β , TNF α , а также высвобождению активных форм кислорода [4].

Воспалительная реакция клеток врожденного иммунитета находится в тесной корреляции с митохондриальной активностью [2]. При воздействии вируса клетки-мишени в митохондриях высвобождаются молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMP), которые активируют рецепторы внутрицитозольных инфламмасом NLRP3 и каспазу 1, что индуцирует последующую секрецию провоспалительных цитокинов IL1 β , IL18 и других [5]. Идентифицированы митохондриальные DAMP (кардиолипиды, н-формил-пептиды, транскрипционные факторы А, TFAM, мтАФК, мтДНК), которые оказывают ключевое воздействие на реализацию воспалительного иммунного ответа. Накопление аномальных митохондрий способствует старению, возрастным заболеваниям, включая метаболический синдром, гипертонию, диабет, ишемическую болезнь сердца и другие [6]. Показано, что степень тяжести COVID-19 у пациентов сопряжена с дисфункцией провоспалительного профиля иммунных клеток, где митохондриальная дисфункция играет существенную роль [7]. В частности, митохондриальная дисфункция лейкоцитов оказывает влияние на снижение иммунного ответа, являясь ключевым фактором воспаления и повышенной восприимчивости к вирусным инфекциям [8]. Таким образом, наличие митохондриальной дисфункции лейкоцитов при предшествующих COVID-19 заболеваниям в конечном итоге может оказывать влияние на прогрессирование и тяжесть течения коронавирусной инфекции. Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования являлось определение состояния мембранного потенциала митохондрий лейкоцитов крови при инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

Материалы и методы исследования. Ретроспективно проанализированы показатели уровня лейкоцитов, нейтрофилов, моноцитов, тромбоцитов и С-реактивного белка (СРБ) в крови и соотнесены с соответствующими тестами ПЦР-анализа у 200 пациентов (120 женщин и 80 мужчин), находящихся на стационарном лечении в КГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2» (г. Владивосток, Приморский край) с 20 января по 20 сентября 2021 года в качестве пациентов с подозрением на COVID-19. Пациенты были выбраны случайным

образом (в алфавитном порядке) с одинаковым количеством людей в группах положительного (100 человек) и отрицательного (100 человек) ПЦР-теста. Средний возраст составил $60,5 \pm 19,2$ года ($59,3 \pm 21,9$ и $61,2 \pm 17,3$ года для женской и мужской групп соответственно). Образцы крови были собраны в день проведения ПЦР-теста. СРБ определяли иммунотурбидиметрическим методом на биохимическом анализаторе (Mindray BS-800, Китай). Лейкоциты, тромбоциты и лейкоцитарную формулу определяли на гематологическом анализаторе Sysmex XN-1000 (Sysmex Corporation, Япония). ПЦР-анализ проводили на термоциклере Roche Cobas Z480 (Roche Diagnostic, Базель, Швейцария) с использованием Tib-теста, предоставленного Roche. Пациенты подписали информированное согласие, разрешающее использование анонимно собранных данных для ретроспективных наблюдательных исследований, одобрено решением Этического комитета ФГБОУ ВО «ТГМУ» Минздрава России.

Для определения мембранного потенциала митохондрий в суспензию клеток крови при концентрации 5×10^5 кл/мл вносили 50 мкл раствора катионного липофильного красителя JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианин иодид/хлорид) (Vector Dikcenson, USA). Процентное содержание флуоресцирующих клеток со сниженным потенциалом митохондриальной мембраны ($\Delta\psi$) определяли с помощью проточного лазерного цитофлуориметра MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) при возбуждающем свечении длиной волны 520 и 570 нм. Обработку данных проводили, используя программу MACSQualify™ Software v/2/5 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия).

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica 13 (StatSoft, Inc., США) и Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA). Сравнение между показателями для COVID-19 позитивных и негативных групп проводилось с использованием двустороннего t-теста с неравными дисперсиями (критерий Уэлча), различия между указанными переменными считались статистически значимыми, если p-значение было ниже 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение. Клиническая картина коронавирусной инфекции COVID-19 у большинства больных (95%) характеризовалась наличием двусторонней вирусной пневмонии с регистрацией средней степени 48 (61,5%), тяжелой 30 (38,5%) и крайне тяжелой 2 (2,6%). У мужчин чаще, чем у женщин, отмечались симптомы интоксикации (50,6% против 28,2%) и одышка (28,2% против 10,1%), средний возраст составил 59,8 [35;88] года. У 53,8% пациентов отмечалась дыхательная недостаточность различной степени. Согласно результатам компьютерной томографии повреждение легочной ткани в момент госпитализации отмечено у 88% больных от 20 до 50%. Снижение степени повреждения легких на момент окончания периода госпитализации отмечено у большинства

пациентов, но в 26% случаев отсутствовал регресс поражения легких. В крови пациентов в острой фазе заболевания (3-5-й день) количество эритроцитов составило $4,8 \pm 0,5 \times 10^{12}$ ед/л, ядросодержащих клеток $5,4 \pm 1,4 \times 10^9$ ед/л, лимфоцитов $1,8 \pm 0,4 \times 10^9$ ед/л, моноцитов $0,5 \pm 0,2 \times 10^9$ ед/л, нейтрофилов $4,4 \pm 2,1 \times 10^9$ ед/л, из них палочкоядерных – $0,9 \pm 0,06 \times 10^9$ ед/л (табл.). Необходимо отметить, что общее количество лейкоцитов находилось на нижней границе нормы, за ее границы выходили показатели содержания нейтрофилов, которые превышали значения для здоровых лиц в 1.5 раза, обнаруживалась небольшая лимфопения и моноцитопения. Значительно повышены содержание С-реактивного белка ($96,8 \pm 15,4$ мг/л при норме 0 до 5 мг/л), скорость оседания эритроцитов ($26,8 \pm 5,7$ мм/ч, при норме 12-20 мм/ч) и уровень Д-димера до $665,1 \pm 67,8$ нг/мл (норма не выше 250 нг/мл). Причем уровень лейкоцитов у всех 80 пациентов COVID-19 достоверно различался с показателями для пациентов с другими вирусными инфекциями, не подтвержденными методом ПЦР (табл.). Р-значение $<0,001$ указывало на существенную связь наличия вируса SARS-CoV-2 у пациентов с низким уровнем лейкоцитов. При подсчете лейкоцитарной формулы также была отмечена явная зависимость между пятью показателями (нейтрофилами, эозинофилами, базофилами, лимфоцитами и моноцитами) и пациентами с COVID-19 (табл.). В группе пациентов с COVID-19 были отмечены низкие уровни нейтрофилов и, в меньшей степени, лимфоцитов. Не отмечено связи между количеством тромбоцитов и заболеванием (р-значение: 0,072), тогда как содержание СРБ было значительно выше (табл.).

Отношение нейтрофилов к лимфоцитам (ОНЛ) является простым параметром, позволяющим легко оценить воспалительный статус пациента. Доказана прогностическая ценность этого показателя при сердечно-сосудистых заболеваниях, инфекциях, воспалительных заболеваниях и некоторых видах рака [9]. Были предложены на основе контрольных значений количественных показателей здоровых доноров пороговые значения показателя ОНЛ, которые составили от 1.65 [± 1.96 SD: 0.78–3.53] (95% ДИ [0.75–0.81] до [3.40–3.66]). Нами было обнаружено, что показатель ОНЛ для пациентов с COVID-19 в среднем составил $2,4 \pm 0,7$, что совпадает с установленным пороговым значением 3,5. Тогда как для пациентов без наличия вируса SARS-CoV-2 этот показатель был значимо выше $4,4 \pm 1,3$. Как показано в таблице, как количество нейтрофилов, так и лимфоцитов было значимо сопряжено с результатами ОТ-ПЦР на COVID-19 ($p < 0,001$). Пациенты с потенциально сниженным ОНЛ или низким содержанием клеток крови имели более высокую вероятность оказаться инфицированными SARS-CoV-2 (ОИШ ОНЛ: 16,7 и ОИШ количества лимфоцитов: 10,1, оценка с помощью непарного t-критерия).

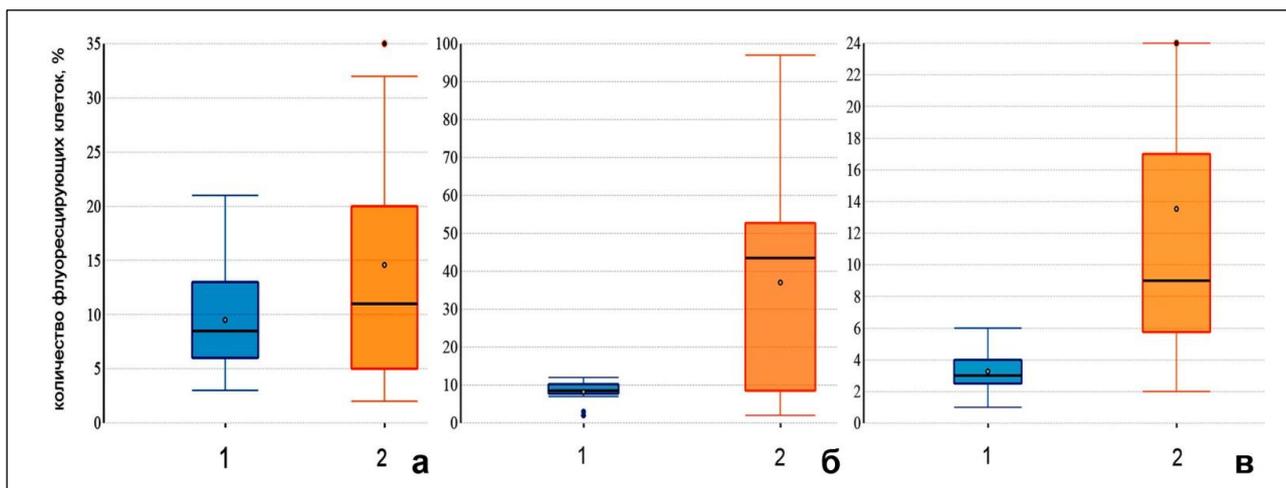
Результаты лабораторных тестов пациентов с COVID-19 (по данным ОТ-ПЦР в реальном времени) и без наличия этого вируса

Показатель	Наличие COVID-19 (n=100)	Другое вирусное заболевание (n=100)	Значение p
Лейкоциты (абс. число X10 ⁹ кл/л)	5,4±1,4	9,8±4,8	<0.001
Нейтрофилы	4,4±2,1	7,2±5,3	0.001
Лимфоциты	1,8±0,1	1,5±0,9	0.01
Моноциты	0,5±0,2	0,8±0,57	0.001
Эозинофилы	0,00±0,00	0,09±0,2	0.003
Базофилы	0,09±0,2	0,02±0,01	<0.001
Тромбоциты	243,1±78,9	232,8±82,4	0.072
Показатель соотношения нейтрофилов к лимфоцитам, усл. ед.	2,4±0,7	4,4±1,3	0.001
С-реактивный белок, мг/л	66,5±6,8	63,1±71,2	0.034
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч	26,8±5,7	20,2±1,7	0.001

Примечание: p-значение, показывающее статистически значимую разницу (<0,05) между показателями пациентов с SARS-Cov-2 и отрицательными результатами ПЦР-анализа на этот вирус, выделено жирным шрифтом.

Липофильные свойства мономеров флуоресцентного зонда JC-10 обеспечивают его проникновение через мембрану в цитоплазму клеток, тогда как катионные свойства позволяют этим молекулам накапливаться в местах с повышенным содержанием протонов, формируя «J-агрегаты». Структура агрегатов при возбуждении длиной волны 522 нм достигает максимума испускания 590 нм. В случае деполяризации митохондриальной мембраны при снижении ее потенциала ($\Delta\Psi_m$), JC остается в цитоплазме в виде мономерной формы и при возбуждении той же длиной волны флуоресцирует в зеленом диапазоне – 520 нм. Содержание JC-10 измеряли и представляли в виде процента положительно флуоресцирующих клеток в каналах FL-2 (520 нм, представляющих неапоптотические агрегаты) и FL-1 (590 нм, указывающих на популяцию апоптотических клеток с деполяризованными или поврежденными митохондриями). Было обнаружено, что развитие коронавирусной инфекции COVID-19 сопровождается достоверным увеличением содержания клеток с деполяризованной митохондриальной мембраной. Так, если в крови здоровых лиц количество клеток, содержащих в мономерную форму JC-10, составило 71,9 [48;89,2] %, то у больных COVID-19 – 25,7 [10,6;94,5] %, и соответственно число лейкоцитов, содержащих J-агрегаты, 28,1 [12,7;43,2] % и 72,5 [19,6;84,5] %. Эти показатели указывали на значительное снижение числа клеток, содержащих неповрежденные митохондрии (мономерная форма JC-10), на фоне

увеличения количества поврежденных у больных COVID-19. Соотношение между клетками, содержащими митохондрии с неизменным и измененным мембранным потенциалом, составило $2,6 \pm 0,3\%$ для здоровых и $0,35 \pm 0,02\%$ для больных. При вычислении показателя количества клеток с поврежденными митохондриями, соответственно популяциям, достоверные различия были получены между значениями для лимфоцитов и нейтрофилов ($p=0,001$). Они составили для здоровых $3,3 [2,5; 6,2] \%$ и $8,2 [7,7; 10,1] \%$ и для больных COVID-19 $13,5 [5,75; 55] \%$ и $37,1 [8,5; 52,8] \%$ соответственно (рис.), тогда как для моноцитов эти различия были не достоверны ($9,5 [6,1; 21,2] \%$; $14,6 [4,4; 27,3] \%$, $p>0,05$).



Количество моноцитов (а), нейтрофилов (б) и лимфоцитов (в), содержащих митохондрии с неизменным (1) и измененным (2) мембранным потенциалом в крови больных COVID-19

Решающее значение для разработки эффективных методов лечения имеет понимание фундаментальных процессов, лежащих в основе клинических проявлений и патогенеза инфекции COVID-19. Основные проблемы при изучении инфекции SARS-CoV-2 заключаются в выявлении гетерогенности вирусных штаммов и вероятных механизмов заражения тканей человека. В ранние сроки тяжелой пневмонии, вызванной SARS-CoV-2, отмечается массивная инфильтрация легких клетками врожденного иммунитета нейтрофилами и макрофагами. Нами отмечен низкий уровень ядросодержащих клеток в периферической крови и показана значимая связь ($p=0,001$) между пятью популяциями клеток лейкоцитарной формулы и наличием вирусной инфекции COVID-19 (табл.). Подобные данные были получены ранее другими исследователями [10-12]. Несмотря на то что содержание базофилов, эозинофилов и моноцитов значительно снижалось при относительно низких p -значениях (табл.), их количество, даже у здоровых людей, довольно небольшое и вариабельно независимо от патологической ситуации. Поэтому эти показатели могут не иметь клинического значения для диагностики COVID-19, а также не было обнаружено связи между количеством тромбоцитов и заболеванием. Значимо отличалось содержание в сыворотке крови С-реактивного белка у

пациентов с обнаруженным SARS-CoV-2 и без него. Однако, несмотря на относительно высокое значение p , такое различие в лабораторных результатах анализа необходимо принимать во внимание с осторожностью, так как оно не всегда указывает на наличие вирусной инфекции COVID-19. Значительное снижение содержания нейтрофилов и моноцитов в крови пациентов демонстрирует важность этих клеток и их вероятный отток в место воспаления, где их активированное состояние может инициировать быстрый и интенсивный цитокиновый шторм, ведущий в конечном итоге к полиорганной недостаточности и смерти. Сопряженность указанных показателей со степенью тяжести течения вирусной инфекции COVID-19 была продемонстрирована с применением методов машинного обучения [1]. Таким образом, простой анализ крови может помочь в выявлении ложноположительных/отрицательных результатов ПЦР и использоваться там, где нет финансовой возможности постановки этой реакции и/или наличия специализированных лабораторий.

Показано, что вирусы при прогрессировании инфекции способны на различных уровнях изменять динамику митохондрий клеток [7]. Так, они оказывают повреждающее действие на ДНК митохондрий, на реализацию в них метаболических путей и гомеостаз кальция, изменяют потенциал мембран, влияют на количество и распределение этих органелл в клетках, что в конечном итоге нарушает антиоксидантную защиту организма. Указывается влияние митохондриальной дисфункции клеток на запуск цитокинового шторма, связанного с симптомами, приводящими к коллапсу легких и смерти пациентов с COVID-19 [13]. Также наличие дисфункциональных митохондрий связано с дефектным иммунологическим ответом на вирусные инфекции и хроническое воспаление. Нами показано, что достоверное ($p < 0,01$) наибольшее количество с поврежденными митохондриями отмечается у пациентов с COVID-19 в отношении нейтрофилов. Возрастание наработки внутри- и внеклеточных прооксидантов и ингибирования системы регенерации восстановительного потенциала в нейтрофилах является признаком окислительного дисбаланса эффекторных клеток острого воспаления, развивающегося в дебюте вирусной пневмонии, что усугубляет течение болезни [13]. Выраженная митохондриальная дисфункция, обнаруженная у пациентов с COVID-19, приводит к накоплению активных форм кислорода и/или азота. Нарушение окислительно-восстановительного дисбаланса вследствие митохондриальной дисфункции оказывает влияние на прогрессирование инфекции COVID-19. Противовирусная терапия, которая может остановить проникновение вируса в клетки или ингибировать дальнейшее инфицирование, может быть дополнена такими стратегиями, как усиление антиоксидантной защиты и улучшение функций митохондрий, что может не только предотвратить вирусную инфекцию, но и оказать влияние на негативные последствия заболевания.

Список литературы

1. Brinati D., Campagner A., Ferrari D., Locatelli M., Banfi G., Cabitza F. Detection of COVID-19 Infection from Routine Blood Exams with Machine Learning: A Feasibility Study. *J. Med. Syst.* 2020. vol. 44 (8). P. 135-137.
2. Shenoy S. Coronavirus (Covid-19) sepsis: revisiting mitochondrial dysfunction in pathogenesis, aging, inflammation, and mortality. *Inflammation research: official j. Europ. Histamine Res. Soc. ... [et al.]*. 2020. vol. 69 (11). P. 1077–1085.
3. Schultze J.L., Aschenbrenner A.C. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell*. 2021. vol. 184 (7). P. 1671-1692.
4. Knoll R., Schultze J.L., Schulte-Schrepping J. Monocytes and Macrophages in COVID-19. *Front Immunol.* 2021. vol. 12. P. 720109-720112.
5. Sefik E., Qu R., Junqueira C., Kaffe E. ... Flavell R.A. Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. *Nature*. 2022. vol. 606 (7914). P. 585-593.
6. Moreno Fernández-Ayala D.J., Navas P., López-Lluch G. Age-related mitochondrial dysfunction as a key factor in COVID-19 disease. *Experimental gerontology*, 2020. vol. 142. P. 111147.
7. de Las Heras N., Martín Giménez V.M., Ferder L., Manucha W., Lahera V. Implications of Oxidative Stress and Potential Role of Mitochondrial Dysfunction in COVID-19: Therapeutic Effects of Vitamin D. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2020. vol. 9 (9). P. 897-997.
8. Saleh J., Peyssonnaud C., Singh K.K., Edeas M. Mitochondria and microbiota dysfunction in COVID-19 pathogenesis. *Mitochondrion*. 2020. vol. 54. P. 1-7.
9. Forget P., Khalifa C., Defour J.P., Latinne D., Van Pel M.C., De Kock M. What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? *BMC Res. Notes*. 2017. vol. 10. P. 12-24.
10. Cheng Z., Lu Y., Cao Q., Qin L., Pan Z., Yan F., et al. Clinical features and chest CT manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a single center study in Shanghai, China. *Cardiopulmonary Imag.* 2020. vol. 215. P. 1–6.
11. Ferrari D., Cabitza F., Carobene A., Locatelli M. Routine blood tests as an active surveillance to monitor COVID-19 prevalence. A retrospective study. *Acta Biomed.* 2020. vol. 91 (3). P. e2020009.
12. Shahid M.F., Malik A., Siddiqi F.A., Fazal I., Hammad M., Saeed A., Abbas N. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and absolute lymphocyte count as early diagnostic tools for corona virus disease 2019. *Cureus*. 2022. vol. 14 (3). P. e22863.

13. Kaundal R.K., Kalvala A.K., Kumar A. Neurological implications of COVID-19: role of redox imbalance and mitochondrial dysfunction. *Mol. Neurobiol.* 2021. vol. 58 (9). P. 4575-4587.