

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ КРОВИ У ДЕТЕЙ С COVID-19

Мусаелян О.А.¹, Голубева М.В.¹, Борисова Ю.В.¹, Шапошников Б.С.¹, Погорелова Л.В.¹

¹ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ставрополь, e-mail: postmaster@stgmu.ru

При коронавирусной инфекции может развиваться угрожающая жизни гипервоспалительная реакция, патогенетическую основу которой составляет дисрегуляция синтеза цитокинов. Целью нашего исследования явилось определение прогностической значимости интерлейкинов-6, -10, -17 и -18 при различных формах тяжести COVID-19 у детей. Был обследован 81 ребенок с COVID-19, в том числе 35 детей с легкой формой (группа 1), 25 детей со среднетяжелой формой (группа 2), 21 ребенок с тяжелой формой (группа 3). В группу контроля вошел 31 здоровый ребенок. Забор крови производился дважды: в первые 7 дней от начала заболевания и с 8-го по 14-й день. У пациентов с легкой формой COVID-19 уровень интерлейкинов не превышал референсных значений. Прогностическим критерием тяжелой формы COVID-19 на 1-7-й день заболевания явилось увеличение концентрации ИЛ-18 $\geq 378,2$ пг/мл, ИЛ-6 $\geq 11,6$ пг/мл, ИЛ-17 $\geq 11,8$ пг/мл, на 8-14-й день – повышение уровня ИЛ-18 $\geq 689,5$ пг/мл, ИЛ-6 $\geq 14,1$ пг/мл, ИЛ-17 $\geq 16,4$ пг/мл. Уровень ИЛ-10 во все периоды заболевания не превышал референсных значений при любой форме заболевания. Концентрация воспалительных цитокинов (ИЛ-6, -17, -18) коррелирует с тяжестью состояния пациентов при COVID-19.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция; COVID-19; маркеры воспаления; цитокины, интерлейкины, цитокиновый шторм.

THE PROGNOSTIC ROLE OF BLOOD INTERLEUKIN STUDIES IN CHILDREN WITH COVID-19

Musaelyan O.A.¹, Golubeva M.V.¹, Borisova Yu.V.¹, Shaposhnikov B.S.¹, Pogorelova L.V.¹

¹Stavropol State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia, Stavropol, e-mail: postmaster@stgmu.ru

In coronavirus infection, a life-threatening hyperinflammatory reaction may develop, the pathogenetic basis of which is the dysregulation of cytokine synthesis. The aim of our study was to determine the prognostic significance of interleukins 6, 10, 17 and 18 in different forms of COVID-19 severity in children. Eighty-one children with COVID-19 were examined, including 35 children with a mild form (group 1), 25 children with a moderately severe form (group 2), and 21 children with a severe form (group 3). The control group included 31 healthy children. Blood sampling was performed twice: during the first 7 days from the onset of the disease and from days 8 to 14. In patients with mild COVID-19 the level of interleukins did not exceed the reference values. The prognostic criterion for the severe form of COVID-19 on days 1-7 of the disease was an increase in the concentration of IL 18 ≥ 378.2 pg/mL, IL 6 ≥ 11.6 pg/mL, IL 17 ≥ 11.8 pg/mL, on days 8-14 - an increase in the level of IL 18 ≥ 689.5 pg/mL, IL 6 ≥ 14.1 pg/mL, IL 17 ≥ 16.4 pg/mL. IL 10 levels during all periods of the disease did not exceed reference values for any form of the disease. The concentration of inflammatory cytokines (IL 6, 17, 18) correlates with the severity of the patients' condition in COVID-19.

Keywords: coronavirus infection; COVID-19; inflammatory markers; cytokines, interleukins, cytokine storm.

Пандемия COVID-19 привлекла внимание к проблемам иммунопатологии человека [1-3]. «Гипервоспаление» и «гиперкоагуляция», представляющие собой независимые, но тесно связанные между собой патологические процессы, составляют основу патогенеза широкого спектра иммуновоспалительных заболеваний [4; 5]. Кульминацией тромбовоспаления является развитие гипериммунной патологии, получившей название «синдром цитокинового шторма» [6-8]. Этот синдром может быть стадией прогрессирования COVID-19, проявляясь развитием острого респираторного дистресс-синдрома и полиорганной дисфункции [9-11].

Патогенетическую основу синдрома цитокинового шторма составляет дисрегуляция синтеза широкого спектра цитокинов (как «провоспалительных» и иммунорегуляторных, так и «противовоспалительных») и хемокинов, отражающая патологическую активацию врожденного и приобретенного иммунитета [12; 13]. К ним относятся интерлейкин (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-18, фактор некроза опухоли α , интерферон- γ (провоспалительные) и IL-4, IL-10, IL-13 (противовоспалительные), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, интерферон- γ -индуцируемый белок 10, интерферон- α и интерферон- β , моноцитарный хемоаттрактантный белок 1, макрофагальный воспалительный белок 1 α , хемокины. При COVID-19 выраженное увеличение концентрации этих цитокинов (в различной степени и в разных сочетаниях) особенно характерно для тяжелой и критической формы [14; 15].

Таким образом, динамический мониторинг концентрации IL в разные периоды COVID-19 у детей остается актуальным.

Цель исследования: определить прогностическую значимость интерлейкинов-6, -10, -17 и -18 в зависимости от тяжести COVID-19 у детей.

Материалы и методы исследования

Уровень воспалительных цитокинов (IL-6, -10, -17, -18) изучен у 112 детей в возрасте от 1 года до 18 лет. Из них в группу 1 вошли 35 пациентов с легкой формой COVID-19, в группу 2 – 25 детей со среднетяжелой формой, в группу 3 – 21 пациент с тяжелой формой. Контролем служил 31 здоровый ребенок аналогичного возраста. Степень тяжести COVID-19 была установлена в соответствии с временными методическими рекомендациями МЗ РФ. Определение уровня IL проводилось дважды: в первые 7 дней и с 8-го по 14-й день от начала заболевания.

Пациенты с COVID-19 находились на стационарном лечении в ГБУЗ СК «Краевая специализированная клиническая инфекционная больница» с мая 2020 по май 2023 г. Критерии включения: пациенты с подтвержденным диагнозом COVID-19 в возрасте от 1 года до 18 лет, госпитализированные в стационары.

Концентрации IL-6, -10 и -18 определяли методом ИФА с использованием наборов: «Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-18-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-бест»). Определение концентрации IL-17 в сыворотке крови методом ИФА проводилось с использованием набор СЕА 482НУ (Cloud-Clone Corp. Китай). Нормы: IL-18 104-640 пг/мл, IL-10 0-31 пг/мл, IL-17 0-5 пг/мл, IL-6 0-10 пг/мл.

Статистические расчеты выполняли на персональном компьютере с использованием Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office, USA) и программ Attestat 10.5.1, Statistica SPSS, Primer of Biostat 4.0. С помощью критериев Шапиро - Уилка и Колмогорова - Смирнова

количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению. Для количественных величин рассчитывали медиану (Me) и нижние и верхние квартили (Q1-Q3). Сравнение трех и более групп по количественному показателю выполнялось с помощью критерия Краскела - Уоллиса. Корреляционные взаимосвязи между двумя показателями оценивались с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Для оценки диагностической значимости признаков при прогнозировании определенного исхода применялся метод анализа ROC-кривых. Разделяющее значение количественного признака в точке cut-off определялось по наивысшему значению индекса Юдена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Уровень IL-18 в сыворотке крови детей в исследуемых группах представлен в таблице 1.

Таблица 1

Уровень IL-18 (Me [Q1-Q3]) в сыворотке крови детей в исследуемых группах

| Сроки исследования | Группа 1 (n=35) | Группа 2 (n=25) | Группа 3 (n=21) | Группа контроля (n=31) | критерий Краскела - Уоллиса |
|----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|--|
| 1-7-й день, пг/мл | 128,8 [115,8-204,5] | 328,8 [257,4-440,3] | 373,4 [324,0-453,8] | 127,0 [95,0-170,5] | p2-к<0,001 p3-к<0,001 p1-2<0,001 p1-3<0,001 |
| 8-14-й день болезни, пг/мл | 178,9 [139,8-199,3] | 409,2 [265,8-516,2] | 888,4 [674,8-953,8] | | p1-к=0,042 p2-к<0,001 p3-к<0,001 p1-2<0,001 p1-3<0,001 p2-3=0,021 |

Примечание: p – статистическая значимость различий между группами.

В первые 7 дней от начала заболевания в группе 2 (328,8 пг/мл) и группе 3 (373,4 пг/мл) наблюдалось повышение уровня IL-18 по сравнению с контрольной группой (127,0 пг/мл) и группой 1 (128,8 пг/мл), $p < 0,05$. Уровень IL-18 в этот период заболевания не превышал референсных значений во всех изучаемых группах.

С 8-го по 14-й день от начала заболевания также наблюдалось повышение уровня IL-18 в группе 1 (178,9 пг/мл), в группе 2 (409,2 пг/мл) и в группе 3 (888,4 пг/мл) по сравнению с

группой контроля, $p < 0,05$. Причем выше референсных значений уровень IL-18 был только в группе 3.

При определении уровня IL-10 было установлено, что во всех изучаемых группах уровень IL-10 не превышал референсных значений ни в одном из периодов заболевания. Вместе с тем, по данным некоторых зарубежных и отечественных исследований, IL-10 является независимым прогностическим маркером тяжести COVID-19 [14; 15].

Уровень IL-6 в сыворотке крови детей в исследуемых группах представлен в таблице 2.

Таблица 2

Уровень IL-6 (Ме [Q1-Q3]) в сыворотке крови детей в исследуемых группах

| Сроки исследования | Группа 1 (n=35) | Группа 2 (n=25) | Группа 3 (n=21) | Группа контроля (n=31) | критерий Краскела - Уоллиса |
|----------------------------|------------------|------------------|---------------------|------------------------|--|
| 1-7-й день, пг/мл | 3,0 [2,6-3,6] | 4,6 [3,3-5,5] | 16,7 [13,5-22,0] | 2,6 [1,9-3,4] | рк-2<0,001 рк-3<0,001 р1-2=0,009 р1-3<0,001 р2-3<0,001 |
| 8-14-й день болезни, пг/мл | 4,1 [3,2-4,8] | 6,2 [4,9-7,8] | 23,4 [21,6-29,9] | | р1-к=0,015 р2-к<0,001 р3-к<0,001 р1-2=0,001 р1-3<0,001 р2-3<0,001 |

Примечание: р – статистическая значимость различий между группами.

В первые 7 дней от начала заболевания IL-6 в группе 2 (4,6 пг/мл) не превышал референсных значений. В группе 3 в этот период отмечалось повышение уровня IL-6 (16,7 пг/мл, $p < 0,05$) по сравнению со всеми изучаемыми группами.

С 8-го по 14-й день от начала заболевания регистрировалось повышение уровня IL-6 в группе 1 (4,1 пг/мл), в группе 2 (6,2 пг/мл) и в группе 3 (23,4 пг/мл) по сравнению с группой контроля, $p < 0,05$, причем выше референсных значений его уровень был только в группе с тяжелой формой заболевания.

При определении уровня IL-17 было установлено, что в группе 3 (20,9 пг/мл) в первые 7 дней от начала заболевания наблюдалось повышение уровня IL-17 по сравнению с контрольной группой (3,0 пг/мл), группой 1 (3,5 пг/мл) и группой 2 (4,2 мг/мл), $p < 0,05$

(табл. 3).

Таблица 3

Уровень IL-17 (Me [Q1-Q3]) в сыворотке крови детей в исследуемых группах

| Сроки исследования | Группа 1 (n=35) | Группа 2 (n=25) | Группа 3 (n=21) | Группа контроля (n=31) | критерий Краскела - Уоллиса |
|----------------------------|------------------|------------------|---------------------|------------------------|--|
| 1-7-й день, пг/мл | 3,5 [2,7-4,4] | 4,2 [3,3-4,9] | 20,9 [18,4-24,9] | 3,0 [2,7-4,0] | рк-3<0,001 р1-3<0,001 р2-3<0,001 |
| 8-14-й день болезни, пг/мл | 4,1 [3,2-4,8] | 4,9 [3,6-6,1] | 27,3 [24,3-33,6] | | р2-к<0,001 р3-к<0,001 р1-3<0,001 р2-3<0,001 |

Примечание: р – статистическая значимость различий между группами.

Данная тенденция сохранялась и на 8-14-е сутки от начала заболевания. Максимальное повышение уровня IL-17 наблюдалось в группе с тяжелой формой заболевания (27,3 пг/мл, $p < 0,05$) по сравнению со всеми изучаемыми группами.

При оценке корреляционных взаимосвязей между уровнями провоспалительных (IL-18, IL-6, IL-17) и противовоспалительных цитокинов (IL-10) была установлена прямая связь (табл. 4).

Таблица 4

Результаты корреляционного анализа взаимосвязи IL-10 < 7 дня и IL-18 < 7 дня

| Показатель | Характеристика корреляционной связи | | |
|----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------|
| | ρ | Теснота связи по шкале Чеддока | р |
| IL-10 – IL-18 на 1-7 день | 0,662 | Заметная | < 0,001* |
| IL-10 – IL-6 на 1-7 день | 0,576 | Заметная | < 0,001* |
| IL-10 – IL-17 на 1-7 день | 0,643 | Заметная | < 0,001* |
| IL-10 – IL-17 на 8-14 день | 0,608 | Заметная | < 0,001* |
| IL-10 – IL-6 на 8-14 день | 0,651 | Заметная | < 0,001* |
| IL-10 – IL-18 на 8-14 день | 0,727 | Высокая | < 0,001* |

Примечание. * – различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$).

При увеличении уровня IL-10 на 1-7 и 8-14 день следует ожидать увеличения уровня IL-6 на 0,7 пг/мл (рис. 1), IL-17 на 0,8 пг/мл (рис. 2), уровня IL-18 (рис. 3) на 13,2 пг/мл на 1-7 день и на 22,7 пг/мл на 8-14 день от начала заболевания.

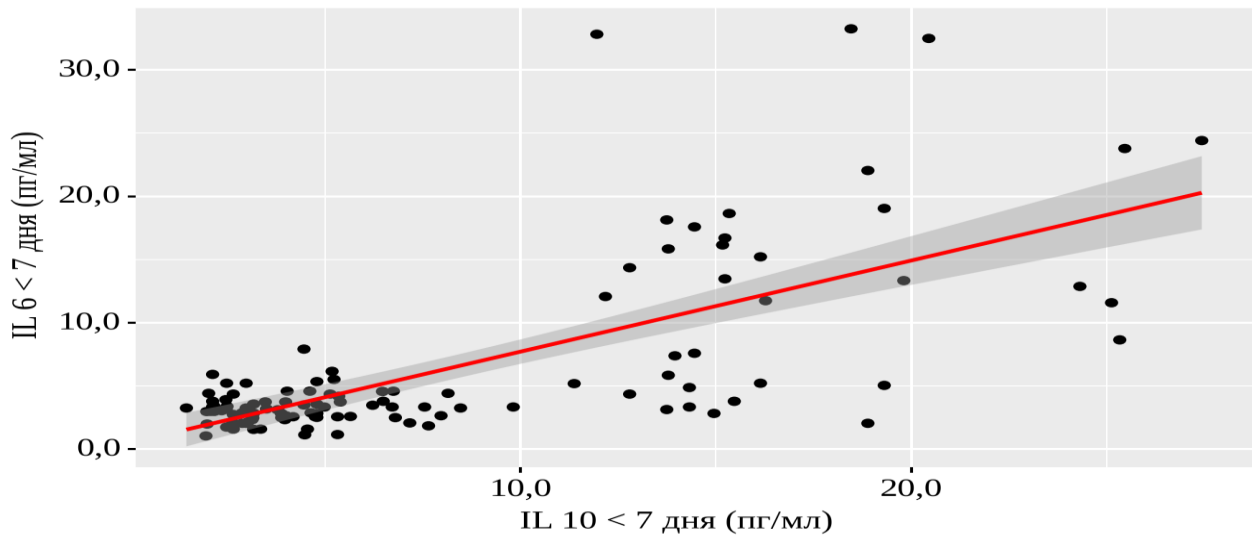


Рис. 1. График регрессионной функции, характеризующий зависимость IL-6 от IL-10 на 1-7 день

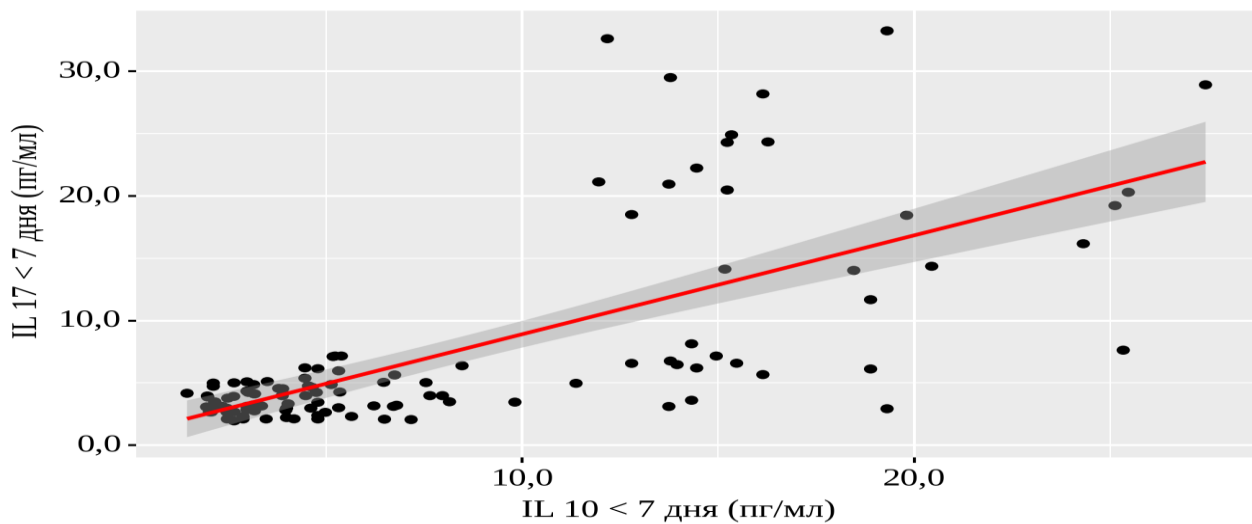


Рис. 2. График регрессионной функции, характеризующий зависимость IL-17 от IL-10 на 1-7 день

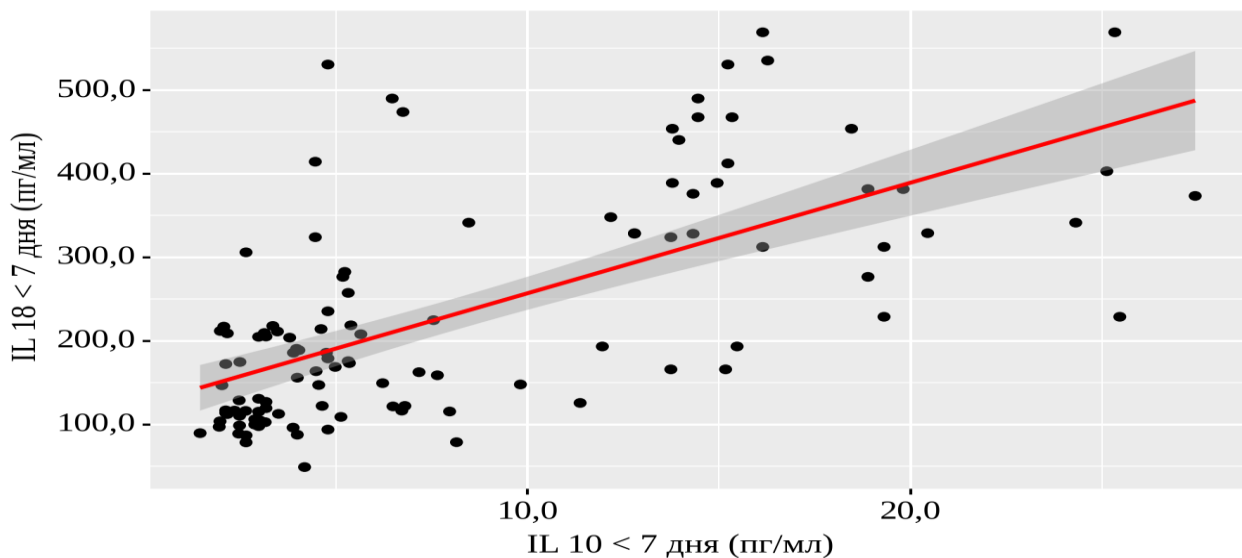


Рис. 3. График регрессионной функции, характеризующий зависимость IL-18 от IL-10 на 1-7 день

Для оценки диагностической значимости уровней IL для прогнозирования тяжелой формы COVID-19 применялся метод анализа ROC-кривых. Разделяющее значение количественного признака в точке cut-off определялось по наивысшему значению индекса Юдена. Прогностическим критерием тяжелой формы COVID-19 в первые 7 дней от начала заболевания явились уровни IL-18 $\geq 378,2$ пг/мл, IL-6 $\geq 11,6$ пг/мл, IL-17 $\geq 11,8$ пг/мл. Риск развития осложнений был связан с увеличением на 8-14-й день уровней IL-18 $\geq 689,5$ пг/мл, IL-6 $\geq 14,1$ пг/мл, IL-17 $\geq 16,4$ пг/мл.

Заключение

Тяжелое течение COVID-19 сопровождается агрессивной воспалительной реакцией с выбросом большого количества провоспалительных цитокинов, которые могут рассматриваться в качестве потенциальных маркеров прогноза течения и исходов болезни.

Тяжелая форма прогнозируется при увеличении в первую неделю болезни концентрации IL-18 $\geq 378,2$ пг/мл, IL-6 $\geq 11,6$ пг/мл, IL-17 $\geq 11,8$ пг/мл. Повышение на 8-14-й день заболевания уровней IL-18 $\geq 689,5$ пг/мл, IL-6 $\geq 14,1$ пг/мл, IL-17 $\geq 16,4$ пг/мл характеризует риск неблагоприятного исхода. Уровень IL-6, IL-17, IL-18 коррелирует с увеличением степени повреждения легких, с развитием тяжелой формы COVID-19, особенно с прогрессированием ОРДС, а также ассоциируется с риском летальных исходов. Другие закономерности получены в отношении IL-10, уровень которого не превышал референсных значений при всех формах COVID-19.

В представленном исследовании у детей при легкой форме заболевания уровень интерлейкинов оставался в пределах референсных значений в первые 14 дней от начала заболевания.

Несомненное участие гиперпродукции ИЛ в иммунопатогенезе синдрома цитокинового шторма при COVID-19 подтверждается эффективностью терапии ингибиторами ИЛ. Но остаются нерешенными проблемы, касающиеся показаний для назначения терапии этими препаратами. Учитывая значительные побочные эффекты и нежелательные лекарственные реакции, связанные с использованием иммунобиологических препаратов, существует острая необходимость в идентификации биомаркеров, которые могут предсказать неблагоприятный исход заболевания. Таким образом, изучение состояния цитокиновой системы позволит не только прогнозировать тяжелое течение заболевания, но и определять тактику лечения COVID-19.

Список литературы

1. Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention // JAMA. 2020. Vol. 323. Is. 13. P. 1239-1242. DOI: 10.1001/jama.2020.2648.
2. Jackson S.P, Darbousset R., Schoenwaelder S.M. Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms // Blood. 2019. Vol. 133. Is. 9. P. 906-918. DOI: 10.1182/blood-2018-11-882993.
3. Liu Y., Zhang C., Huang F., Yang Y., Wang F., Yuan J., Qin Y., Li X., Zhao D., Li S., Tan S., Wang Z., Li J., Shen C., Li J., Peng L., Wu Z., Cao M., Xing L., Chen L., Zhou C., Liu W.J., Liu L., Jiang C. Elevated plasma level of selective cytokines in COVID-19 patients reflect viral load and lung injury // Nat Sci Rev. 2020. Vol. 7. Is. 6. P. 1003-1011. DOI: 10.1093/nsr/nwaa037.
4. Guo L., Rondina M.T. The era of thromboinflammation: platelets are dynamic sensors and effector cells during infectious diseases // Front Immunol. 2019. Vol. 10. P. 2204. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02204
5. Chan J.F., Yuan S., Kok K.H., To K.K., Chu H., Yang J., Xing F., Liu J., Yip C.C., Poon R.W., Tsoi H.W., Lo S. K.F., Chan K.H., Poon V.K.-M., Chan W.-M., Ip J.D., Cai J.-P., Cheng V.C.-C., Chen H., Hui C.K.-M., Yuen K.-Y. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster // Lancet. 2020. Vol. 395. P. 514-523.

6. Pedersen S.F., Ho Y.C. A storm is raging // *J Clin Invest.* 2020. Vol. 130. Is. 5. P. 2202-2205. DOI: 10.1172/JCI137647.
7. Henderson L.A., Canna S.W., Schulert G.S., Volpi S., Lee P.Y., Kernan K.F., Caricchio R., Mahmud S., Hazen M., Halyabar O., Hoyt K. J., Han J., Grom A.A., Gattorno M., Ravelli A., De Benedetti F., Behrens E., Cron R.Q., Nigrovic P. A. On the alert for cytokine storm: Immunopathology in COVID-19 // *Arthritis Rheum.* 2020. Vol. 72. Is. 7. P. 1059-1063. DOI: 10.1002/art.41285.
8. Gupta K.K, Khan M.A, Singh S.K. Constitutive inflammatory cytokine storm: a major threat to human health // *J. Interferon Cytokine Res.* 2020. Vol. 40. Is. 1. P. 19-23. DOI: 10.1089/jir.2019.0085.
9. Sun X., Wang T., Cai D., Hu Z., Chen J., Liao H., Zhi L., Wei H., Zhang Z., Qiu Y., Wang J., Wang A. Cytokine storm intervention in the early stages of COVID-19 pneumonia // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020. Vol. 53. P. 38-42. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2020.04.002.
10. Karakike E, Giamarellos-Bourboulis E.J. Macrophage activation- like syndrome: a distinct entity leading to early death in sepsis // *Front Immunol.* 2019. Vol. 31. Is. 10. P. 55. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00055.
11. Rello J., Storti E., Belliato M., Serrano R. Clinical phenotypes of SARS-CoV-2: Implications for clinicians and researchers // *Eur. Respir. J.* 2020. Vol. 55. Is. 5. P. 2001028. DOI: 10.1183/13993003.01028-2020.
12. Насонов ЕЛ. Иммунопатология и иммунофармакотерапия коронавирусной болезни 2019 (COVID-19): фокус на интерлейкин 6 // *Научно-практическая ревматология.* 2020. № 58(3). С. 245-261. DOI: 10.14412/1995-4484-2020-245-261.
13. Velazquez-Salinas L., Verdugo-Rodriguez A., Rodriguez L.L., Borca M.V. The role of interleukin 6 during viral infections // *Front Microbiol.* 2019. Vol. 10. P. 1057. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01057.
14. Убайдуллаев С.А., Шамсутдинова М.И., Исмаилова А.А., Мустанов Й.Г., Таджиева З.М., Шамсутдинов М.М., Собитходжаева С.У., Нуралиева Г.С., Холбоева Г.Б., Шер Л.В., Адылов Д.Г., Ильчибаева А.Б., Алимова Д.Б., Касимова М.С. Цитокины как предиктор тяжести заболевания у пациентов с COVID-19 // *Журнал теоретическая и клиническая медицина.* 2022. №1. С. 129-134.
15. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Chen Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China // *Lancet.* 2020. Vol. 395. Is. 10223. P. 497-506. DOI: 10.1016/S0140-67362030183-5.