

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*На правах рукописи*



Щелкановцева Екатерина Сергеевна

**Прогнозирование течения и исходов новой коронавирусной инфекции  
(COVID-19) у госпитализированных пациентов: роль определения  
активности хитотриозидазы**

3.1.18. Внутренние болезни

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор,

член-корреспондент РАН

Фомин Виктор Викторович

Москва - 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1. Хитотриозидаза: определение, историческая справка, патофизиология .....	12
1.2. Значение хитиназ в клинической практике .....	16
1.3. Биомаркеры прогнозирования течения и исходов COVID-19 .....	27
1.4. Роль хитотриозидазы в прогнозировании течения и исходов COVID-19 .....	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	40
2.1. Дизайн исследования .....	40
2.2. Методы исследования .....	43
2.3. Статистическая обработка данных .....	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	50
3.1. Общая характеристика пациентов .....	50
3.2. Результаты оценки влияния исходной активности хитотриозидазы на выживаемость .....	53
3.3. Результаты оценки влияния исходной активности хитотриозидазы на потребность в ИВЛ/НИВЛ .....	60
3.4. Результаты сравнения прогностической значимости повышения активности хитотриозидазы с известными лабораторными биомаркерами неблагоприятного исхода .....	65
3.5. Результаты оценки взаимосвязи исходной активности уровня хитотриозидазы с динамикой данных КТ .....	69
3.6. Клинические наблюдения .....	71
3.6.1. Клиническое наблюдение №1 .....	71
3.6.2. Клиническое наблюдение №2 .....	73
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	74
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	82

ВЫВОДЫ .....	83
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	85
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	89

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

В 2020 году Всемирная Организация Здравоохранения объявила о пандемии новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV2, что впоследствии стало глобальной проблемой для всего человечества.

Заболевание характеризуется высокой контагиозностью [1], ускоренной вирусной репродукцией [2] и потенциально скрытой передачей вируса в течение предсимптомного инкубационного периода [3], а также имеет непредсказуемое клиническое течение, поэтому крайне необходим поиск прогностических биомаркеров, что позволит в том числе рациональнее управлять ресурсами медицинских учреждений и работой медицинского персонала. Раннее выявление пациентов, находящихся в группе риска по развитию тяжелого течения заболевания, будет способствовать оптимизации их лечения. Появляется всё больше исследований по прогностической значимости отдельных маркеров, разрабатываются прогностические модели у пациентов с COVID-19, составляются шкалы для прогнозирования рисков клинического ухудшения заболевания. Однако выделить какой-либо показатель, который может послужить независимым ранним предиктором неблагоприятного исхода у пациентов с коронавирусной инфекцией, даже по истечении нескольких лет с момента начала пандемии затруднительно.

Разносторонний взгляд на коронавирусную инфекцию позволил нам подойти к заболеванию с ранее не изученной стороны.

Патогенез COVID-19 сложен и неоднозначен. Известно, что синдром активации макрофагов реализуется TLR4/MyD88-зависимым путем и выделением различных белков, принимающих участие в иммунном ответе [4,5]. Одним из ферментов, высвобождаемым активированными макрофагами и нейтрофилами, является хитотриозидаза (ХТЗ). К настоящему времени роль активности данного фермента рассматривалась в различных областях медицины: в пульмонологии

(бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь лёгких, саркоидоз, идиопатический лёгочный фиброз), в неврологии (в основном при нейродегенеративных заболеваниях), онкологии, кардиологии, эндокринологии и даже гинекологии (синдром поликистозных яичников). Фермент, как биохимический маркер, признанный мировым медицинским сообществом, активно используется у пациентов с болезнью Гоше для оценки эффективности проводимого лечения [6].

Что касается коронавирусной инфекции, по данным одноцентрового наблюдательного исследования, проведенного нашими соотечественниками, было выявлено, что у пациентов с COVID-19 уровень ХТЗ оказался выше, чем в контрольной группе [7]. Несмотря на то, нами не было найдено каких-либо дополнительных исследований, связанных с коронавирусной инфекцией и ХТЗ в качестве прогностического биомаркера, изучение ее роли в качестве независимого предиктора течения COVID-19 весьма перспективно и актуально, так как заболевание продолжает создавать нагрузку на мировое здравоохранение по сей день, несмотря на то, что статус пандемии был снят в 2023 году.

### **Степень разработанности темы исследования**

Опубликован метанализ, в который вошли 32 исследования с 10491 участниками, описывающих различные факторы, которые могут быть полезны для прогнозирования тяжелого течения коронавирусной инфекции. Начиная с первой волны пандемии, по данным научной литературы в качестве ранних биомаркеров тяжелого течения преобладали такие показатели, как снижение лимфоцитов и тромбоцитов, повышение С-реактивного белка, лактатдегидрогеназы, прокальцитонина и Д-димера [8]. На тот момент времени, как правило, исследования носили ретроспективный характер, а отсутствие единых критериев тяжести заболевания делало их еще более несовершенными. По мере формирования более четкого представления о болезни и её патогенезе, было

выяснено, что вирус идентифицируется во многих тканях, включая эндотелиальные, печеночные, почечные, легочные и нейрональные клетки [9], что не исключает прямую инвазию вируса и развитие системных эффектов. Дальнейшее направление развития науки проходило в сторону изучения показателей системной воспалительной реакции, клеточного и гуморального иммунитета.

Изучение ХТЗ у пациентов с коронавирусной инфекции практически не представлено среди имеющихся научных данных. По данным протеомного анализа [10], проведенного у пациентов с COVID-19, было продемонстрировано, что хитиназо-3-подобный белок-1, принадлежащий к семейству 18-гликозилгидролаз, которое состоит из хитиназ и хитиназоподобных белков, может служить высокочувствительным прогностическим маркером. Данное средство ферментов также может быть подтверждением возможности использования ХТЗ как прогностического биомаркера. Прогностическое значение раннего определения активности хитотриозидазы у госпитализированных пациентов с COVID-19 не изучалось в проспективном исследовании.

Таким образом, из-за отсутствия единой диагностической модели прогнозирования течения заболевания у госпитализированных пациентов с коронавирусной инфекцией, наше исследование, возможно, внесет вклад для построения системного подхода к грамотному распределению ресурсов и успешному лечению пациентов.

### **Цель и задачи исследования**

Повысить эффективность прогнозирования неблагоприятного течения и исходов COVID-19 у госпитализированных пациентов с помощью определения активности хитотриозидазы.

Для достижения цели данного исследования были поставлены следующие задачи:

1. Определить активность хитотриозидазы в плазме крови у госпитализированных пациентов с коронавирусной инфекцией (COVID-19).
2. Оценить влияние исходной активности хитотриозидазы на выживаемость пациентов с коронавирусной инфекцией (COVID-19).
3. Оценить влияние исходной активности хитотриозидазы на потребность в искусственной вентиляции легких и неинвазивной искусственной вентиляции легких (ИВЛ/НИВЛ) у пациентов с COVID-19.
4. Сравнить прогностическую значимость повышения активности хитотриозидазы выше порогового значения с известными предикторами неблагоприятного прогноза COVID-19 (С-реактивный белок, количество лимфоцитов и другие).
5. Оценить взаимосвязь исходной активности хитотриозидазы с динамикой данных компьютерной томографии: объемом поражения легочной ткани, плотностью печени и селезенки у госпитализированных пациентов с COVID-19.

### **Научная новизна**

Впервые в проспективном исследовании оценивалась активность уровня хитотриозидазы у госпитализированных пациентов с коронавирусной инфекцией в качестве раннего прогностического биомаркера.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Поиск прогностического маркера тяжелого течения у пациентов с коронавирусной инфекцией имеет высокую практическую значимость для работы медицинских учреждений и врачебного персонала. Использование ХТЗ потенциально имеет высокую практическую значимость, исходя из результатов

диссертационного исследования, и может быть внедрено в рутинную лечебную работу.

### **Методология и методы исследования**

Диссертационная работа выполнена в виде одноцентрового когортного проспективного наблюдательного исследования.

В приемном отделении осуществлялись осмотр пациента, заполнение истории болезни; забор крови из вены для проведения клинического (лейкоциты, лимфоциты, тромбоциты, эритроциты, гемоглобин), биохимического (аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), креатинфосфокиназа (КФК), глюкоза, креатинин, С-реактивный белок (СРБ), мочевины) и коагулологического (Д-димер, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновый индекс (ПИ)) исследований, также из пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) отбиралась кровь (сухие пятна) для исследования активности ХТЗ методом тандемной масс-спектрометрии. Компьютерная томография легких выполнялась в день поступления.

Выживаемость после выписки из стационара оценивалась с помощью телефонного интервью на 90-й и 180-й день от момента включения в исследование.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью программ StatSoft, Inc. 1984–2011, V. 10, Statistica 1984–2011, а также с помощью языка программирования Python v.3.8.12 (Anaconda distribution) и его модулей для анализа, в частности: Sklearn, Pandas, Nona, Numpy, Sweetviz, Seaborn для данных и Matplotlib и Plotly для визуализации.

Протокол диссертационного исследования на тему «Прогнозирование течения и исходов новой коронавирусной инфекции (COVID-19) у госпитализированных пациентов: роль определения активности хитотриозидазы» был одобрен Локальным Комитетом по этике при ФГАОУ ВО Первый МГМУ



имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (протокол No 22-21 от 09.12.2021 года). ClinicalTrials.gov ID: NCT04752085.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. У госпитализированных пациентов с коронавирусной инфекцией (COVID-19) отмечается повышение активности хитотриозидазы в плазме крови.

2. Увеличение активности хитотриозидазы выше 150 нмоль/мл/ч может служить ранним предиктором неблагоприятного исхода (смерти от любых причин) у пациентов, госпитализированных по поводу новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

3. Увеличение активности хитотриозидазы выше 150 нмоль/мл/ч повышает вероятность необходимости в респираторной поддержке (ИВЛ/НИВЛ) у пациентов, госпитализированных по поводу новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

4. Повышение активности хитотриозидазы превосходит С-реактивный белок в предиктивной способности потребности в ИВЛ/НИВЛ у госпитализированных пациентов с коронавирусной инфекцией (COVID-19).

5. Исходная активность хитотриозидазы менее 100 нмоль/мл/ч может сопровождаться прогрессированием поражения легочной ткани, но не влиять на динамику плотности печени и селезенки по данным КТ.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация по поставленной цели, задачам и полученным результатам соответствует паспорту научной специальности 3.1.18. Внутренние болезни. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2, 3 и 5 паспорта специальности.

## **Степень достоверности и апробация результатов**

В рамках диссертационной работы автором обследованы 347 пациентов с диагнозом новая коронавирусная инфекция, которые впоследствии были разделены на группы: выжившие и умершие, а также переведенные на ИВЛ/НИВЛ и непереведенные на ИВЛ/НИВЛ. Исследовательские задачи, поставленные в рамках диссертационной работы, были успешно выполнены в полном объеме, после этого были сформулированы выводы и практические рекомендации. Результаты представлены в виде таблиц и рисунков. Для статистической обработки данных использовался язык программирования Python v.3.8.12 (Anaconda distribution) и его модули для анализа, программы Statistica и SPSS. База данных была сформирована в программе Microsoft Excel 2019.

Первичная документация (акты внедрения в лечебный и учебный процессы, акт проверки первичной документации) проверена (протокол № 071/Р от 12 марта 2024 года) и допущена к дальнейшему использованию. Получено одобрение Локального Этического комитета (протокол № 22–21 от 09.12.2021 года).

17 мая 2022 года на постерной сессии Американского конгресса ATS (American Thoracic Society) был представлен тезис с оценкой влияния ХТЗ на выживаемость пациентов в рамках устного доклада.

Апробация состоялась на заседании кафедры факультетской терапии №1 Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол №12 от 06.09.2024 года.

## **Личный вклад автора**

Автор самостоятельно провел поиск и анализ данных литературы по теме диссертационной работы. Анализ медицинской документации, телефонное интервью с выжившими участниками исследования, создание компьютерной базы,

обобщение результатов, подготовка публикаций по теме диссертации, а также ее написание выполнены диссертантом лично.

### **Публикации по теме диссертации**

По результатам исследования автором опубликовано 4 работы, в том числе 1 научная статья в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/Перечень ВАК при Минобрнауки России, 2 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах данных (Web of Science, Scopus, PubMed); 1 публикация в сборниках материалов зарубежных научных конференций.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация представляет собой рукопись на русском языке объемом 102 страницы машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, главы, посвящённой результатам собственного исследования, и заключения, включающего обсуждение результатов, выводы, практические рекомендации. Список цитируемой литературы содержит 112 источника, из которых 24 отечественных и 88 зарубежных. Работа иллюстрирована 15 таблицами и 11 рисунками, а также в ней представлены 2 клинических случая.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Хитотриозидаза: определение, историческая справка, патофизиология

Одними из самых известных природных полимеров являются целлюлоза и хитин. Открытие хитина произошло в 1821 году. Анри Браконно – французский химик, ботаник и фармацевт, работал директором ботанического сада при Академии наук в Нанси и однажды в ходе химических опытов он выделил из грибов вещество, которое не поддавалось растворению в серной кислоте, и назвал его «фунгин» [11]. По прошествии двух лет, другой французский учёный - Андре Одье, изучая элементы экзоскелета тарантулов, выделил из внешних оболочек членистоногих то же самое вещество и предложил использовать для его названия термин «хитин» [12]. На этом исследования хитина прервались на долгое время. И только в 30-е годы XX века ученые вновь проявили к нему интерес и начали искать возможности потенциального использования хитина в практической деятельности.

Хитин – это второй по распространенности после целлюлозы природный полимер, в котором  $\beta$ -(1–4)-связанные N-ацетил-D-глюкозаминовые звенья линейно соединены между собой и образуют длинные цепи. Хитин – это структурный полисахарид, в отличие от крахмала и гликогена, которые тоже являются полимерами (Рисунок 1) [6].

В окружающей среде хитин не накапливается, несмотря на его большое количество, благодаря наличию хитинолитических ферментов [13]. Хитиназы — это гликозилированные гидролитические ферменты, которые гидролизуют связи звеньев N-ацетилглюкозамина, и разрушают хитин. Хитиназы широко экспрессируются растениями, бактериями, грибами, насекомыми. Большинство млекопитающих, включая человека, не синтезируют свой собственный хитин, их геномы кодируют несколько ферментов хитиназ, которые могут специфически разрушать этот природный полимер, с которым они сталкиваются при попадании его из внешней среды [13].

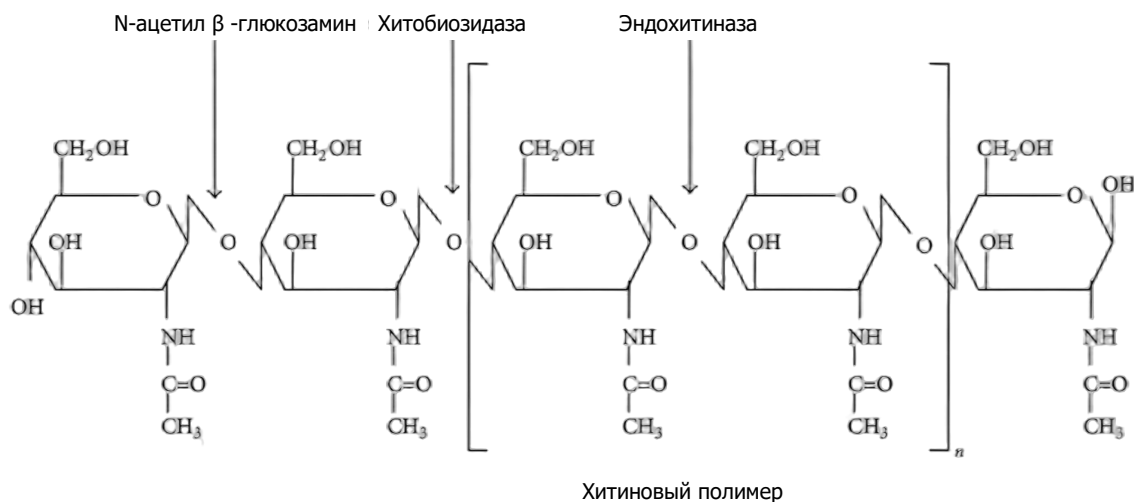


Рисунок 1 - Специфичность различных хитиназ по отношению к хитиновому полимеру [13]

В организме человека экспрессируются следующие виды хитиназ: хитотриозидаза, кислотоустойчивая хитиназа млекопитающих (AMCase), а также хитиназоподобные белки, полностью или частично лишенные ферментативной активности [6].

Хитотриозидаза – первая хитиназа, обнаруженная у человека и присутствующая во всех геномах млекопитающих [6, 14]. Она экспрессируется клетками различных тканей, таких как легкие, селезенка, печень, тимус и слезная железа [15], а также клетками врожденного иммунитета, такими как активированные макрофаги и нейтрофилы [6, 16].

Распознавание и деградация хитина исторически всегда была связана с активацией сигнальных путей, участвующих в воспалении. При развитии острых и хронических воспалительных заболеваний ферментативная активность ХТЗ значительно возрастает [16]. Неотъемлемыми участниками воспалительной реакции являются тканевые резидентные макрофаги, источниками которых служат терминально дифференцированные моноциты [17, 18]. При действии воспалительных стимулов циркулирующие в крови макрофаги перемещаются из

тканевого русла и оседают в тканевых компартментах, где впоследствии дифференцируются. Во время усиленного созревания моноцитов в макрофаги фенотипическая и функциональная дифференцировка макрофагов, зависящая от сигналов локального микроокружения, проходит по двум путям: макрофаги приобретают статус классически или альтернативно активированных клеток - M1 или M2, соответственно [19]. M1-поляризованные макрофаги активируются липополисахаридами и цитокинами T-хелперов: гамма-интерфероном и гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF), а противовоспалительные и иммунорегуляторные M2-макрофаги поляризуются под действием цитокинов T-хелперов-2: интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-13 (IL-13) [19].

Уровень ХТЗ значительно увеличивается на разных стадиях созревания макрофагов и изменяется в M1 и M2 клетках, что указывает на важную роль этого фермента в специализации макрофагов и подчеркивает, что этот фермент может рассматриваться не только как маркер их активации, но и как важный регулятор воспалительных процессов [20].

Сами по себе макрофаги характеризуются высокой степенью пластичности и способны изменять свой фенотип и статус активации в зависимости от различных факторов микроокружения. M1 макрофаги обладают мощной противомикробной и противоопухолевой активностью, но в то же время при переходе в хроническую фазу воспалительного ответа они способствуют разрушению тканей и нарушению их регенерации. Важно понимать, что эти процессы способны регулировать M2 макрофаги: альтернативно активированные макрофаги участвуют в фагоцитозе патогенов, удалении погибших клеток, поддержании тканевого гомеостаза и формировании завершающей фазы воспаления. Фенотипическое перепрограммирование макрофагов происходит под влиянием сигнальных, эпигенетических, пострансляционных и метаболических механизмов [21].

Известно, что макрофаги синтезируют ХТЗ в избыточном количестве, когда в их лизосомах накапливается много гликофинголипидов, железа или гликогена

[22-23], что характерно в том числе и для воспалительных реакций. Помимо этого, макрофаги и нейтрофилы имеют рецепторы, распознающие хитин. Известно, что три рецептора врожденного иммунитета - Toll-подобный рецептор - 2, Dectin-1 и рецептор маннозы - участвуют в опосредовании различных иммунных реакций на хитин. Как это происходит, пока не совсем понятно. Прямое связывание с хитином не доказано, и нельзя исключить возможность того, что за некоторые из этих эффектов ответственны вдыхаемые аэрополлютанты. Макрофаги высвобождают ХТЗ после стимуляции интерферонами, фактором некроза опухоли и гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором через сигнальные пути nuclear factor kappa B signaling pathway (NF-kB), janus kinase and signal transducer and activator of transcription pathway (Jak-Stat), nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 pathway (NOD-2) и Toll-like рецепторов [5, 24–26].

Также активность ХТЗ прогрессивно увеличивается с повышением активности лейкоцитарной эластазы, которая является маркером активации нейтрофилов [27]. Некоторая исходная секреция резидентными макрофагами, или структурными клетками, или ими обоими подтверждается содержанием ХТЗ в лёгких и кишечнике [25]. Кроме того, ХТЗ хранится в готовых к высвобождению гранулах в иммунных клетках вместе с другими антимикробными агентами, такими как лизоцим, что еще раз подчеркивает возможную роль этого фермента во врождённом иммунитете [28]. В пользу того, что данный фермент – неотъемлемая часть врожденного иммунного ответа, говорит его специфическая экспрессия для фагоцитов [29].

В наши дни хитиназы человека активно исследуются в развитии различных заболеваний, но до ясного понимания их истинных функций, в том числе в работе иммунной системы, должно пройти время и проведены большие научные исследовательские достижения.

## 1.2. Значение хитиназ в клинической практике

Исследования ХТЗ при различных заболеваниях, довольно распространены, но это не относится к коронавирусной инфекции.

Впервые ХТЗ была обнаружена в плазме крови пациентов, страдающих болезнью Гоше в 1990-х годах [30]. Болезнь Гоше — это наследственное заболевание, характеризующееся накоплением глюкоцереброзида в лизосомах макрофагов, в результате дефицита лизосомальной гидролазы (глюкоцереброзидазы). Предполагалось, что макрофаги, наполненные глюкоцереброзидом (клетки Гоше) являются главным источником ХТЗ. Однако быстрое снижение активности фермента при начале лечения ферментативными препаратами навело на мысль, что всё-таки особое состояние активации и дифференцировки макрофагов или их предшественников приводит к избыточной продукции фермента [6]. У примерно 10% носителей гомозиготной мутации в гене фермента активность ХТЗ в крови не определяется [30]. Это может говорить о том, что фермент в процессе эволюции либо потерял свои функции, либо о том, что этот дефицит наш организм научился компенсировать другими механизмами.

Активность ХТЗ изучалась также у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). ХОБЛ является следствием хронического воспалительного ответа дыхательных путей на воздействие ингалируемых повреждающих частиц или газов, сопровождающееся повышенным количеством воспалительных клеток, в том числе нейтрофилов и макрофагов. Хронический воспалительный процесс сопровождается ухудшением прогноза и увеличением частоты обострений заболевания. В настоящее время не найден предиктор будущих обострений болезни, обладающий достаточной чувствительностью и специфичностью для внедрения в клиническую практику [31].

В связи с обилием альвеолярных макрофагов в органах дыхательной системы и хронической воспалительной реакцией, сопровождающей заболевание, ученые начали активно изучать ХТЗ про ХОБЛ. В исследовании европейских коллег



уровень ХТЗ достоверно повышался у пациентов с  $\geq 1$  обострением в анамнезе за последние 12 месяцев, но связи фермента с исходами заболевания продемонстрировано не было, что вероятно связано с коротким периодом наблюдения (12 месяцев) и небольшим количеством участников исследования (97 человек) [32]. Следует отметить, что 4 человека были исключены из научной работы, так как у них не было зарегистрировано активности ХТЗ плазмы крови, что подтверждает наличие в популяции носителей гомозиготной мутации, но генетического тестирования в этом исследовании не проводилось.

С другой стороны к ХТЗ подошли Severine Letuve и коллеги, показав, что повышенная экспрессия ХТЗ у пациентов с ХОБЛ определялась в бронхоальвеолярном лаваже и была сопряжена с патологическими изменениями легочной ткани. Авторы говорят, что стратегии, направленные на специфическую нейтрализацию хитиноподобной активности или на ограничение синтеза ХТЗ, могут иметь терапевтическое значение для улучшения лечения ХОБЛ [33].

Рассмотрение основного фактора риска развития ХОБЛ - курения в патогенезе заболевания, открывает потенциал для использования ХТЗ в диагностике и лечении данной патологии. Альвеолярные макрофаги напрямую взаимодействуют с аэрополлютантами, в том числе сигаретным дымом. В исследовании Renat Shaykhiev и коллег продемонстрировано, что фенотипически пластичные по своей природе альвеолярные макрофаги под воздействием курения преимущественно развиваются по пути альтернативной активации (M2), что вносит вклад в патогенез ХОБЛ [34]. Изучение альтернативной активации макрофагов и поиск биомаркеров этого пути могут помочь ученым в прогнозировании и лечении ХОБЛ и рака легких.

Что касается бронхиальной астмы (БА) и участия ХТЗ в ее патогенезе, всё не так однозначно. В исследовании Elena Bargagli и коллег было показано, что активность ХТЗ в сыворотке крови больных астмой намного выше, чем у здоровых людей. Весомых различий между концентрациями ХТЗ у пациентов с аллергической БА и неаллергической обнаружено не было [35]. В другой работе

авторы показали, что активность хитиназ реализуется за счет ХТЗ, в то время как AMCase не продемонстрировала своей активности в содержимом бронхоальвеолярного лаважа. При этом полученные результаты говорят о том, что у больных бронхиальной астмой хитиназная активность вовсе имеет тенденцию к снижению. И также был подтвержден факт того, что у курящих людей определялся высокий уровень ХТЗ за счет усиления экспрессии гена ХТЗ в макрофагах [36].

Не такие противоречивые данные имеются по саркоидозу и ХТЗ. До сих пор важным моментом остается поиск лабораторного биомаркера, предсказывающего прогрессирование заболевания, ведь первое международное соглашение по саркоидозу, опубликованное еще в конце 20-го века, сохраняет свою актуальность и в настоящее время. Патогенез заболевания связан с накоплением активированных Т-клеток и макрофагов в местах с активным воспалительным процессом, особенно это касается легочной ткани. Патофизиологическая основа связана с тем, что саркоидные гранулемы формируются в ответ на влияние стойкого антигенного стимула, который индуцирует реакцию активации клеток, что приводит к развитию воспалительной реакции [37].

В исследовании итальянских коллег принимало участие 694 человека с подтвержденным диагнозом саркоидоза и 101 человек из контрольной группы (здоровые добровольцы). Авторы продемонстрировали, что активность ХТЗ коррелирует с активностью заболевания, тяжестью и развитием саркоидоза внелегочной локализации. Ученые выдвинули гипотезу о том, что экспрессия ХТЗ активированными макрофагами может отражать количество активным гранулам, также экспрессия фермента повышалась в преддверии рецидива заболевания [38].

Исследование сербских коллег, включающее довольно внушительное количество человек (430), продемонстрировало, что определение уровня ХТЗ имеет преимущество в оценке активности заболевания и риска возможной хронизации процесса в сравнении с определением ангиотензин-превращающего фермента [39]. В исследовании Bargagli и соавторов активность ХТЗ у пациентов с саркоидозом была выше, чем активность фермента у пациентов с туберкулезом

легких [40], но количество принимающих участие пациентов было относительно небольшим, при этом преобладали пациенты с саркоидозом (96 человек с подтвержденным диагнозом саркоидоза, 15 человек с туберкулезом легких и 30 человек в контрольной группе).

Изучение ХТЗ не ограничивается заболеваниями бронхолегочной системы, фермент активно изучается и при заболеваниях сердечно-сосудистой системы.

Одним из потенциальных биомаркеров активности и распространенности атеросклеротических процессов является ХТЗ.

В исследовании Marta Artieda и соавторов изучалась активность ХТЗ плазмы крови у больных с атеротромботическим инсультом и больных с ишемической болезнью сердца. Также в работу была включена контрольная группа пациентов (относительно здоровые пациенты с нормальным липидным профилем). Согласно полученным результатам, активность ХТЗ повышена у лиц, страдающих атеросклерозом, и связана с его тяжестью, что потенциально доказывает возможную роль этого фермента в качестве маркера степени прогрессирования атеросклероза. Авторы всем пациентам проводили анализ, направленный на изучение полиморфизма гена ХТЗ, с целью большей чистоты исследования. Было отмечено, что данный диагностический метод должен проводиться всем пациентам, у которых определяется уровень ХТЗ, что не является рутинным исследованием [41].

В научной работе турецких коллег участвовало 200 пациентов с подозрением на стабильную ишемическую болезнь сердца. Пациентам проводилась коронарная ангиография, по результатам которой они были разделены на 4 группы: одна контрольная и три другие, разделенные по степени тяжести атеросклеротического поражения. Активность ХТЗ сравнивалась с уровнем высокочувствительного С-реактивного белка, который широко изучается как маркер воспаления при сердечно-сосудистых заболеваниях [42]. Авторы обнаружили, что увеличение уровня ХТЗ плазмы крови и вч-СРБ ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.254$ ) коррелировали с масштабом

поражения коронарных сосудов у пациентов с подтвержденными атеросклеротическими изменениями коронарных артерий [43].

ХТЗ, в дополнение к своему потенциалу как биомаркера, исследовалась и в качестве терапевтической мишени при ишемической болезни сердца (ИБС). Например, в исследовании Yip J и соавторов обнаружили, что лечение ингибитором ХТЗ значительно уменьшает размер атеросклеротических бляшек в мышинной модели ИБС. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что ингибиторы ХТЗ потенциально могут служить в качестве нового терапевтического подхода в лечении ИБС [44].

В целом, существующие научные работы предполагают, что ХТЗ может играть важную роль в развитии и прогрессировании ИБС. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы полностью выяснить механизмы, лежащие в основе этой взаимосвязи, и оценить потенциал ХТЗ в качестве биомаркера и терапевтической мишени для ИБС.

Метаболические нарушения, в том числе метаболический синдром, повышают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний и сахарного диабета 2 типа и тоже связаны с повышением активности ХТЗ [45]. Поэтому ХТЗ изучается в патогенезе различных нарушений обмена веществ, в том числе при сахарном диабете и ожирении [45, 46].

Влияние жировой ткани на нарушения обмена вещества реализуется, по одной из наиболее распространенных теорий, за счет развития хронической воспалительной реакции. Хроническое воспаление при ожирении вялотекущее и не сравнимо с воспалительным ответом при инфекционных заболеваниях. Тем не менее, повышенное содержание жировой ткани характеризуется накоплением в ней иммунных клеток и увеличением выработки циркулирующих провоспалительных факторов [47].

В исследовании Harman-Boehm и коллег изучалось содержание CSF1 и MCP1 в образцах жировой ткани, взятых при биопсии из сальника и подкожно-жировой клетчатки у двух независимых когорт пациентов: с разными типами ожирения и

без него. При этом пациенты с ожирением были разные: с наличием сопутствующих заболеваний и с незначительной сопутствующей патологией. Повышенная инфильтрация макрофагами усугублялась при ожирении, особенно при интраабдоминальном накоплении жира и сопровождалась повышением мРНК MCP 1 и CSF 1. Уровень мРНК, колониестимулирующего фактора (CSF1) и моноцитарного хемотаксического белка (MCP1) коррелировали с количеством макрофагов ( $r = 0,521$ ,  $p < 0,0001$  и  $r = 0,258$ ,  $p < 0,051$  соответственно). Авторы подчеркивают, что их исследование доказывает, что инфильтрация макрофагами сальника усугубляется центральным ожирением и может играть роль в развитии таких сопутствующих состояний, как сахарный диабет и ишемическая болезнь сердца [48].

Метаболические и эндокринные функции жировой ткани изменяются при ожирении, что приводит к увеличению высвобождения жирных кислот, гормонов и провоспалительных молекул, которые способствуют развитию осложнений в виде сопутствующих заболеваний, связанных с ожирением. Количество макрофагов жировой ткани увеличивается при ожирении и участвует в воспалительных путях, которые активируются в жировых тканях [49-50]. С учетом доказанного повышенного содержания макрофагов и взаимосвязи матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) ХТЗ с уровнем мРНК MCP1 в жировой ткани, изучение уровня ХТЗ при ожирении является актуальным [50].

По данным поперечного исследования Ioana Taranu и соавторов, активность ХТЗ в плазме крови увеличивается у детей от 5 до 18 лет с ожирением по сравнению с контрольной группой. Также активность фермента была выше у пациентов с крайними степенями ожирения [46]. Учитывая тот факт, что в детской популяции в меньшей мере распространены различные сопутствующие хронические заболевания полученные результаты достаточно интересные и многообещающие.

Формирование инсулинорезистентности при ожирении вносит вклад в развитие сахарного диабета 2 типа. При увеличении высвобождения свободных жирных кислот из депо жира при ожирении, M1 активированные макрофаги

попадают в жировую ткань и становятся участниками воспалительной реакции, что способствует хронизации процесса и развитию инсулинорезистентности [51]. ХТЗ является маркером активации макрофагов, поэтому изучение роли фермента при изменении углеводного обмена является актуальным.

Например, в исследовании польских коллег приняли участие 91 человек с подтвержденным диагнозом сахарный диабет (СД) 2 типа и 46 человек из контрольной группы, не страдающих нарушением углеводного обмена и другими воспалительными заболеваниями. Уровень ХТЗ плазмы крови измерялся спектрофлуориметрическим методом. Целью авторов было оценить возможность использования фермента в качестве предиктора развития диабетических ангиопатий у пациентов с СД 2 типа. Исходя из результатов, уровень сывороточной ХТЗ у пациентов с СД 2 типа был выше практически в 2 раза по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,001$ ). Авторы заявляют, что ХТЗ играет роль в течении СД 2 типа, особенно в отношении развития диабетических ангиопатий [51].

С целью определения прогностической значимости активности ХТЗ изучалась у пациентов с недавно выявленным и неосложненным СД 2 типа. Результаты исследования Alper Sonmez и коллег показали, что ХТЗ сыворотки крови повышалась у таких пациентов. Авторы предполагают, что фермент может использоваться в качестве раннего предиктора эндотелиальной дисфункции у пациентов с недавно выявленным СД 2 типа без осложнений [52]. А с учетом корреляции между сахарным диабетом и сердечно-сосудистыми заболеваниями, это также может быть полезно с прогностической стороны.

Несмотря на все преимущества имеющихся данных роль определения ХТЗ при СД 2 типа остается неопределенной. Например, неоднозначно и непонятно является ли активность ХТЗ следствием нарушения углеводного обмена или одной из причин, обуславливающих развитие заболевания.

Помимо вышеупомянутых болезней, роль ХТЗ обсуждается и при заболеваниях печени. Доказано, что фермент экспрессируется Купферовскими клетками печени, которые являются частью мононуклеарно-фагоцитарной

системы и обеспечивают множество процессов, поддерживая нормальное функционирование органа. Будучи частью врожденного иммунитета, в первую очередь, они защищают печень от инфекций. При развитии патологических состояний клетки Купфера дифференцируются по M1 и M2 путям активации макрофагов [53-54]. При этом особенно важным является поддержание купферовских клеток в толерогенном состоянии, которое необходимо для предотвращения нежелательных иммунных реакций [55].

Кроме положительных функций, при нарушениях регуляции воспалительной реакции купферовские клетки способствуют хронизации патологического процесса и развитию заболеваний печени [55-56]. Поскольку купферовские клетки являются частью большой системы, которая непосредственно участвует в иммунных реакциях, определение роли и функций ХТЗ кажется весьма интересной. Так, было обнаружено, что ХТЗ экспрессируется купферовскими клетками через задействование Toll-подобных рецепторов 4 и 2 типов [57]. В то время макрофаги высвобождают ХТЗ путем воздействия на эти же рецепторы [58]. Изучение ХТЗ, как участника различных патофизиологических процессов, при патологиях печени актуально.

Несмотря на возможность длительной работы защитных механизмов печени и высокую способность к регенерации, при длительном воздействии повреждающих факторов развивается хроническое воспаление, что впоследствии может привести к нарушению структуры органа и развитию необратимых последствий. Одними из основополагающих клеток, участвующих в формировании фибротических процессов, являются клетки Ито, после активации которых клетками Купфера, под влиянием активных форм кислорода и провоспалительных цитокинов происходит потеря ими липидных включений, содержащих витамин А, и приобретение ими фенотипа миофибробластов [59]. Поэтому участие ХТЗ может рассматриваться в разных аспектах патологии печени.

В научной работе Chantal A. Rivera и коллег изучалась связь между экспрессией толл-подобного рецептора 4 (TLR-4) в печени и содержанием клеток

Купфера при неалкогольной жировой болезни печени на мышиных моделях. Авторы подчеркивают прямую связь между TLR-4 и клетками Купфера в патогенезе неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), основными факторами которой являются окислительный стресс и отложение липидов в печеночной паренхиме [57].

В другой работе изучалась экспрессия гена ХТЗ в клетках Купфера для оценки потенциального участия фермента в воспалительной реакции и прогрессировании фиброза при НАЖБП. В ходе исследования было проведено 75 биопсий, 15 из которых принадлежали контрольной группе для определения экспрессии ХТЗ. Было обнаружено, что фермент ХТЗ экспрессировался исключительно клетками Купфера. Уровни экспрессии ХТЗ были достоверно выше у больных с фиброзом печени, чем с неосложненной НАЖБП [54].

Хроническая инфекция вирусного гепатита С связана с воспалительными и фибротическими повреждениями печени. В свою очередь, эффективных лабораторных методов развития данной патологии не существует, поэтому поиск биомаркера для диагностики фиброза печени остается актуальным. В исследовании немецких коллег оценивались потенциальные маркеры прогрессирования фиброза у пациентов с хронической инфекцией вируса гепатита С. Классификация фиброза печени выполнялась согласно критериям METAVIR (F0-F4) [59]. Также у всех пациентов, включенных в исследование, измерялся уровень активности ХТЗ в плазме крови. По результатам получилось, что активность фермента значительно коррелирует со стадиями гистологического фиброза и жесткостью печени, оцененной с помощью переходной эластографии [55].

Переходя к обсуждению роли ХТЗ при циррозе печени, хочется обратиться к научной работе Engin Altintas и коллег. В исследование были включены 90 человек: страдающие хроническим вирусным гепатитом С, переболевшие пациенты, пациенты с циррозом печени, развившимся на фоне гепатита С, а также пациенты с гепатоцеллюлярной карциномой, индуцированной гепатитом С. Согласно полученным результатам, активность ХТЗ была достоверно выше у больных с



гепатоцеллюлярной карциномой, что свидетельствует о том, что ХТЗ с высокой чувствительностью и специфичностью можно рассматривать как перспективный маркер для диагностики гепатоцеллюлярной карциномы [60].

Многогранность ХТЗ при различных патологических процессах, по-видимому, связана с ее регуляторными и патогенными функциями, которые всячески варьируются под действием тех или иных факторов. С одной стороны, повышенная активность фермента при некоторых хронических заболеваниях способствует поддержанию воспалительной реакции, повреждению тканей и прогрессированию заболевания. С другой стороны, роль ХТЗ, как части врожденного иммунного ответа, может играть и благотворную функцию в определенных патологических ситуациях. Очевидно, что ее активность существенно варьирует в зависимости от типа инфекционного агента, выраженности воспалительной реакции и иммунного ответа, поэтому следующим этапом необходимо рассмотреть ХТЗ при инфекционных заболеваниях. При анализе научной литературы мы стремились выявить основополагающие закономерности, связанные с экспрессией и активностью фермента.

ХТЗ является хитинолитическим ферментом [6], что в первую очередь свидетельствует о ее активном участии в качестве неотъемлемого элемента врожденного иммунитета против хитинсодержащих патогенов, таких как грибы и простейшие. При этом научные исследования свидетельствуют о том, что ее иммуномодулирующие эффекты выходят далеко за рамки врожденного иммунитета и фермент не является специфическим маркером только грибкового поражения, он также экспрессируется при бактериальных инфекциях, что в большей мере свидетельствует об активации макрофагов [61, 62].

В работе Patricia E. V. Verwer и соавторов изучалась связь полиморфизма гена ХТЗ с риском развития мицетомы - хроническое инфекционное гранулематозное заболевание, характеризующееся поражением подкожной ткани преимущественно нижних конечностей, чаще всего вызванное *Madurella mycetomatis*. Исследование носило ретроспективный характер, были определены генотипы 112 пациентов,

инфицированных *M. Mucetomatis*, и 103 здоровых человек из группы контроля, соответствующих полу и возрасту и проживающих в одних и тех же эндемичных регионах. Результаты исследования продемонстрировали, что полиморфизм в гене ХТЗ (вставка 24bp (rs383117)), приводящий к нарушению активности фермента, значительно увеличивал риск развития заболевания [63].

Что касается генетических особенностей, общая мутация дублирования 24bp в экзоне 10 гена ХТЗ отвечает почти за все обнаруженные дефициты фермента при гомозиготной мутации у разных популяций. У лиц кавказской национальности мутировавший аллель дублирования 24bp довольно распространен (4–6% гомозиготных и 30–50% гетерозиготных), в то время у африканцев он чрезвычайно редок (0–2% только гетерозиготный), что говорит об эволюционном преимуществе сохранения фермента дикого типа в районах с высокой степенью эндемических паразитарных и грибковых заболеваний [64]. Что касается Российской Федерации, в исследование С. В. Макарова и коллег были включены образцы крови из четырех совершеннолетних групп населения РФ: ненцев, хантов, калмыков и русских. Анализ indel-полиморфизма в 1-экзоне гена ХТЗ (rs383117) осуществлялся методом ПЦР. Согласно результатам, низкая и близкая к европейской частота мутации была получена у русских пациентов, а частота мутации в группе ненцев была близка к мировому максимуму [64].

Ввиду того, что наименьшая частота встречаемости мутации в гене ХТЗ характерна для групп африканского происхождения, активность фермента активно исследовалась для определения значимости и возможной связи с малярией [64, 65].

В научной работе Varone Rita и соавторов уровень ХТЗ плазмы крови определялся у 67 детей из Африки с подтвержденным диагнозом малярии, вызванной *Plasmodium falciparum*. Диагноз малярии подтверждался микроскопическим обнаружением бесполок *Plasmodium falciparum* в периферической крови. Клинические проявления соответствовали разным степеням тяжести заболевания. В результате была обнаружена заметная корреляция между ХТЗ плазмы крови и ретикуло-эндотелиальной активацией, о

чем судили по степени тромбоцитопении ( $p < 0,001$ ) и уровню ферритина сыворотки ( $p < 0,0001$ ), в то время как статистически значимой связи с уровнем паразитемии выявлено не было [66].

В исследовании пакистанских ученых сравнивалась активность ХТЗ у больных малярией и здоровых африканских детей. Среди всех больных малярией активность ХТЗ была выше, чем у здоровых детей, при это разница с учетом тяжелой степени заболевания и отсутствием осложнений была несущественной. Однако была обнаружена значительная корреляция между уровнем ХТЗ и сывороточным ферритином у детей с неосложненной малярией. Авторы отмечают, что такая рассинхронизация между ХТЗ и ферритином у больных с тяжелой малярией может быть связана с патологическим нарушением генной регуляции в макрофагах в отношении производства этих двух белков или отражать иную метаболическую роль в случае тяжелой болезни, что может оказаться важным прогностическим фактором неблагоприятного исхода заболевания [67].

Многогранность применения ХТЗ в научной медицинской деятельности с каждым годом постепенно расширяется и затрагивает все больше новых аспектов. Повышение активности ХТЗ наблюдается при заболеваниях, в патогенезе которых важную роль играет активация макрофагов и нейтрофилов. Яркий тому пример - полученные результаты нашей работы на примере COVID-19. В то время как снижение активности фермента может приводить к ослаблению иммунного ответа в отношении определенных возбудителей, например, *M. Mucetomatis*. В любом случае, ХТЗ играет крайне важную роль в иммунном ответе и при более детальном изучении может улучшить или поменять подход к лечению многих болезней.

### **1.3. Биомаркеры прогнозирования течения и исходов COVID-19**

Начало пандемии COVID-19 привело к неизбежному поиску надежных лабораторных и инструментальных методов, которые могли бы способствовать формированию эффективных и рабочих алгоритмов для диагностики и лечения

пациентов. Своевременное определение пациентов из группы риска тяжелого течения и плохого прогноза заболевания было основной задачей специалистов по всему миру для оптимизации лечебно-диагностических процессов в условиях повышенной нагрузки. Лабораторное звено в виду своей всеобщей доступности и относительной дешевизны стало изучаться с первых дней для диагностики распространяющегося инфекционного заболевания - коронавирусной инфекции.

Множество лабораторных биомаркеров было изучено за период пандемии и продолжает изучаться по сей день. Несмотря на их многообразие, на данный момент не существует эталонного лабораторного показателя, отличающегося эффективностью и точностью в прогнозировании неблагоприятного течения и исходов COVID-19. Изначально для прогнозирования тяжелого течения и плохих исходов заболевания основной фокус был сделан на лабораторные показатели, отражающие активность воспалительной реакции. Именно поэтому начали изучаться показатели общего анализа крови (лейкоциты в целом, лимфоциты, нейтрофилы, отношение нейтрофилов к лимфоцитам, тромбоциты, гемоглобин) и уровень С-реактивного белка. Эти анализы общедоступны, а их использование финансово не затратно.

COVID-19 имеет стадийность в развитии клинической картины заболевания, которая напрямую определяется степенью выраженности иммунологических реакций, которые запускаются после контакта организма с SARS-CoV-2. В начале болезни количество лейкоцитов и лимфоцитов находится в норме или немного уменьшено. По мере связывания вируса с рецепторами наблюдается увеличение неспецифических маркеров воспаления. При тяжелом течении болезни происходит интенсивное высвобождение медиаторов воспаления и цитокинов и нарастание лимфопении [68].

Лимфопения, увеличение провоспалительных маркеров и цитокинов в крови и гиперкоагуляция характеризуют тяжелые случаи COVID-19. Это объясняет разнообразие клинического спектра - от бессимптомных до тяжелых и крайне тяжелых случаев [69].

В проспективном исследовании китайских коллег приняли участие 192 госпитализированных пациента с коронавирусной инфекцией. Согласно результатам, у 43,8% пациентов наблюдалась лимфопения, из которых 32,1% умерли. Также у лиц старше 70 лет количество лимфоцитов было ниже, чем у более молодых пациентов. Авторы сделали вывод, что в начале болезни наличие лимфопении может усугублять тяжесть состояния пациентов и повышать риск смерти [70]. Однако лимфопения является закономерной реакцией иммунной системы на воспалительную реакцию, вызванную вирусной инфекцией.

Более интересным в этом плане представляется метаанализ, который включал 1579 пациентов. В нем оценивалась взаимосвязь между уровнем NLR и прогнозом заболевания COVID-19. Результаты были получены следующие: чем выше было значение NLR, тем выше была вероятность тяжелого течения и летальности [71]. В ретроспективном исследовании случай-контроль, включающем 527 человек для каждой группы, оценивалось влияние NLR на исход коронавирусной инфекции. Согласно результатам, NLR имеет высокую прогностическую ценность в отношении госпитальной летальности [72].

Также в качестве биомаркера неблагоприятных исходов, в том числе и смерти, в ретроспективном исследовании французских ученых рассматривалась эозинопения. В исследовании приняло участие 551 человек, которые были разделены на 2 группы. В первую группу вошли пациенты, у которых абсолютное число эозинофилов было равно  $0 \cdot 10^9/\text{л}$ , а во вторую - больные с абсолютным показателем эозинофилов более  $0 \cdot 10^9/\text{л}$ . Авторы указывают на то, что тяжелая эозинопения может отражать иммунную гиперактивацию и является надежным биомаркером неблагоприятного исхода пациентов с COVID-19 [73].

Важно помнить о том, что картина рентгенологических методов обследований не всегда соответствует клиническому течению болезни. И часто происходит так, что болезнь начинает прогрессировать быстро и вскоре догоняет картину поражения легких, задокументированную на КТ органов грудной клетки. Именно этому аспекту было уделено особое внимание отечественных ученых,

которые выпустили ретроспективное поперечное исследование, где изучались потенциально ранние биомаркеры неблагоприятного развития событий у пациентов с коронавирусной инфекцией. В него были включены 155 человек. По результатам у больных с легким течением инфекции был получен более низкий уровень лейкоцитов, мочевины, креатинина, билирубина, АСТ по сравнению с пациентами с крайне тяжелым течением COVID-19. Важно отметить, что больные с поражением легких по данным КТ ОГК, соответствующим КТ-1, имели более высокий уровень лимфоцитов и более низкие уровни лактатдегидрогеназы (ЛДГ), Д-димера и СРБ. Более того, ученые не выявили взаимосвязи между клиническим течением болезни и КТ-картиной при оценке тяжести и исхода COVID-19 [74]. Отдельно хочется упомянуть о гиперферритинемии, влияние которой на неблагоприятные исходы весьма противоречиво, как и сам патогенез повышения этого лабораторного показателя. Дело в том, что ферритин повышается наряду с другими острофазовыми показателями во время воспалительного процесса. В условиях отсутствия воспаления этот белок осуществляет функции депо железа. Роль ферритина в воспалительной реакции обсуждается. Одни авторы считают, что повышение уровня ферритина является биомаркером неконтролируемого воспаления, который может быть использован как красный флаг для начала интенсивного наблюдения и лечения пациентов. Другие полагают, что этот белок в высоком количестве является ключевым медиатором иммунной дисрегуляции [75].

Изучение влияния ферритина на течение и исходы коронавирусной инфекции проводилось учеными из многих стран. Например, в ретроспективном исследовании российский коллег, было продемонстрировано, что нарастание уровня ферритина до 1 000 мкг/л и выше – это признак, свидетельствующий о высокой вероятности летального исхода [76]. В исследование было включено 479 пациентов из отделения ОРИТ с тяжелым течением болезни. Было отмечено, что у выживших пациентов (51%) за период наблюдения (8–9 дней) концентрация ферритина оставалась практически равной исходной, в то время как у умерших

больных ферритин заметно повышался. Авторы подчеркивают, что результаты их работы в какой-то степени позволяют опровергнуть теорию, что гиперферритинемия является следствием гемотоксического действия вируса и подтвердить тот факт, что повышение ферритина – это проявление цитокинового шторма [76].

В метаанализе, который включал 10614 пациентов, также изучалась роль ферритина в течении COVID-19. По результатам работы было выявлено, что у тяжелых и/или умерших пациентов уровень ферритина значительно выше по сравнению с нетяжелыми и/или выжившими, и, по мнению авторов, это говорит о том, что уровень этого белка ассоциируется с плохим прогнозом и может предсказывать ухудшение состояния пациентов [77]. Однако у метаанализа есть некоторые ограничения. Например, оно было значимо гетерогенно по включенным исследованиям, а количество исследований, оценивающих влияние уровня ферритина на тяжесть состояния и смерть, было относительно небольшим.

Роль ферритина при коронавирусной инфекции, как проявление цитокинового шторма, вероятности развития острого респираторного дистресс синдрома и, как следствие летальности, или же как признак гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза, сочетанного с плохим прогнозом – этот вопрос остается открытым и спорным.

Поиском эффективных лабораторных биомаркеров плохого прогноза и летальности у больных с COVID-19 занимались ученые из Боснии и Герцеговины. Они провели проспективное исследование, в которое включили 66 пациентов, госпитализированных с диагнозом коронавирусная инфекция. По данным этой работы, у пациентов в критическом состоянии наблюдались более высокие уровни лейкоцитов, С-реактивного белка, лактатдегидрогеназы, ферритина, но меньшее количество лимфоцитов и снижена сатурация. Авторы отметили, что высокие значения ферритина и низкие - сатурации показали наилучшие прогностические результаты развития более тяжелых клинических проявлений заболевания и смерти у госпитализированных больных [78]. Тот факт, что исследование

проспективное, является его несомненным плюсом, при том, что оно включало в себя небольшое количество участников.

Для более детального понимания болезни и подходов к ее лечению и диагностики с момента начала пандемии начали рассматриваться различные патофизиологические механизмы прогрессирования COVID-19. В работе L. E. Eijk были сформулированы основные моменты, из которых складывается патогенез заболевания. К ним относятся: прямые цитопатические эффекты SARS-CoV-2, снижение активности ангиотензинпревращающего фермента 2 с последующим нарушением баланса ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС) и снижением инактивации дез-Arg<sup>9</sup>-брадикинина, нарушение регуляции иммунного ответа с развитием бурных иммунных реакций, коагулопатия, связанная с экзоцитозом прокоагуляционных факторов, тромботическая микроангиопатия, вероятно, вызванная вирус-индуцированным повреждением эндотелия, активацией комплемента и эффектами цитокинов, неконтролируемый локальный и/или системный «иммуотромбоз» и роль аутоиммунитета [79]. Если брать во внимание фактор, затрагивающий тромбоцитарно-коагуляционную часть патогенеза, хочется обсудить биомаркеры непосредственно к ней относящиеся.

Уже было доказано, что в начале XXI века в период вспышки тяжелого острого респираторного синдрома тромбоцитопения была признана значимым фактором риска смертности пациентов [80]. Ответить на вопрос о влиянии количества тромбоцитов на течение коронавирусной инфекции, попытались в своем метаанализе, состоящем из 1779 человек, Giuseppe Lippi и коллеги. В их работу вошло 9 исследований и было показано, что низкий уровень тромбоцитов связан с повышенным риском тяжелого течения заболевания и смертности у пациентов с COVID-19. Авторы утверждают, что тромбоцитопения должна восприниматься как индикатор ухудшения состояния у госпитализированных больных [81].

Если подойти со стороны коагуляционного звена гемостаза, то здесь хочется рассмотреть ретроспективное исследование российских коллег, которые изучали



прогностическую ценность концентрации фибриногена плазмы крови по Клаусу у пациентов с COVID-19. В роли доминирующего патогенетического механизма заболевания в данной работе была взята коагулопатия, проявляющаяся гиперкоагуляцией и приводящая к развитию осложнений или к неблагоприятному исходу.

В исследовании принимали участие 350 человек с равным соотношением мужчин и женщин. С интервалом 1–2 дня оценивался уровень фибриногена плазмы крови и других показателей. Согласно полученным результатам, как снижение фибриногена ниже референсных значений, так и его повышение выше 9 г/л являются предикторами неблагоприятного исхода болезни [82]. Механизм повышения фибриногена расценивается, как проявление системного воспалительного ответа, а его понижение связывают с нарушением функции печени. Хотя исследователи и рекомендуют мониторировать фибриноген по Клаусу всем больным с коронавирусной инфекцией, их работа не лишена недостатков. К ним можно отнести медикаментозное лечение пациентов. Все больные, включенные в исследование, получали терапию низкомолекулярными гепаринами, гидроксихинином и азитромицином, что могло отразиться на состоянии пациентов и развитии побочных эффектов препаратов. Средний возраст пациентов – 63 года и наличие сопутствующих заболеваний, также заставляют задуматься о чистоте результатов этой работы [82].

В похожем ретроспективном исследовании коллег из Узбекистана изучались помимо фибриногена и другие маркеры коагулопатии, такие как ПТВ и АЧТВ. Выборка пациентов была случайная и составила 120 человек. По результатам сообщалось, что повышение фибриногена в 2 нормы, а также снижение фибриногена ниже нормального значения можно рассматривать как значимый прогностический признак. Изменения АЧТВ и ПТВ не продемонстрировали существенного влияния на прогноз пациентов. Среди сопутствующих хронических патологий, у пациентов описывались артериальная гипертензия, сердечно-сосудистые заболевания и ХОБЛ. Следует отметить, что большая часть пациентов

были мужчинами (76,7%), а информация о сроках и кратности забора анализов крови вовсе не представлена [83].

Изменения гемостаза при воспалении, вызванные различными причинами, известны давно. Тяжесть изменений при воспалении зависит от реактивности организма, локализации воспаления и свойств самого воспалительного агента. При воспалении, вызванном антигеном, возникает дисфункция эндотелия, а при нарушениях иммунной системы избыточный цитокиновый ответ усугубляет повреждение сосудистой стенки и тем самым повышает риск тромбообразования. Безусловно, нарушение коагуляции особенно у пациентов с тяжелым течением коронавирусной инфекции присутствует и отличается от других системных коагулопатий: ДВС-синдрома или тромботической микроангиопатии, тем, что оно связано с повышенным риском смерти и развитием необъяснимых венозных и артериальных тромбозов даже на фоне приема препаратов, предотвращающих их [84]. Например, в одном из описанных клинических случаев, у молодого пациента 41-го года без наличия сопутствующих заболеваний, заболевшего коронавирусной инфекцией, развились ишемический, а затем и геморрагический инсульты, а также венозные и артериальные тромбозы, приведшие к инвалидизации больного [85], что лишний раз говорит о необходимости прояснения механизмов развития нарушений коагуляции, ассоциированных с COVID-19.

Следует отметить, что тромбоэмболические события чаще встречается у больных с тяжелым течением заболевания [86-87]. И в качестве предиктора в этом случае также изучался такой лабораторный показатель, как Д-димер. В обзоре литературы белорусских коллег рассматривались накопленные данные по профилактике и лечению венозных тромбоэмболий, ассоциированных с COVID-19. Согласно одной из работ китайских коллег у 46,4% пациентов было зарегистрировано повышение Д-димера выше 0,5 мг/л, из них примерно в 60% случаев отмечалось тяжелое течение COVID-19 [88]. Нельзя не отметить, что в данном исследовании были собраны данные пациентов, проходивших лечение как в амбулаторном звене, так и в стационарном, что непосредственно могло иметь

отражение на полноте обследований. Но также важен тот факт, что пациентов с бессимптомным заболеванием или легким течением представлено не было. Однако, доказано, что пожилые люди и лица с хроническими заболеваниями с большей вероятностью умирают от COVID-19, а также имеют более тяжелое течение заболевания [87]. Истинная распространенность венозных тромбоэмболических событий, ассоциированных с COVID-19, по-прежнему не ясна, а оценка как Д-димера, так и других показателей коагулограммы неоднозначна и не может истинно отражать вероятность развития осложнений.

По данным еще одного отечественного исследования, ряд фоновых заболеваний таких как: бронхиальная астма, сахарный диабет, заболевания сердца, печени, инсульты, аутоиммунные заболевания, ожирение связаны с повышенным риском летального исхода, а наличие в анамнезе диализа или терминальной стадии почечной недостаточности увеличивало риск смерти в 3,5 раза. Наличие сопутствующих патологий обязательно необходимо рассматривать как факторы риска тяжелого течения заболевания и летальности у госпитализированных пациентов [68].

Несмотря на то, что статус пандемии с коронавирусной инфекции был снят, роль прогностических биомаркеров у пациентов до конца не изучена. В связи с этим, чтобы найти эффективный предиктор заболевания, ученые обратились к молекулярной биологии. Для выявления белков, тесно связанных с COVID-19, ученые применили протеомный анализ с использованием масс-спектрометрии. У 10-ти человек с тяжелым течением болезни как с благоприятными, так и с неблагоприятными исходами (смерть, экстракорпоральная мембранная оксигенация (ЭКМО)), посредством анализа были исследованы 27 белков. После проведения иммуноферментного анализа, было показано, что хитиназо-3-подобный белок-1 (CHI3L1) и insulin-like growth factor binding protein (IGFALS) могут быть высокочувствительными прогностическими маркерами. Ученые отмечают, что вновь открытые биомаркеры лучше коррелируют с прогностическими показателями, чем существующие общепринятые лабораторные

показатели. Но нельзя не отметить маленькую выборку больных, участвующих в научной работе [89]. Несомненно, эти биомаркеры активно не изучаются в научном мире, но, хочется отметить, что они имеют потенциал и могут пролить свет на новые диагностические подходы к инфекционным заболеваниям, в том числе и на коронавирусную инфекцию.

#### **1.4. Роль хитотриозидазы в прогнозировании течения и исходов COVID-19**

Известно, что у большинства пациентов заболевание имеет нетяжелое гриппоподобное течение, в то же время глобальной проблемой являются пациенты с тяжелым течением заболевания. Было показано, что определённые лабораторные показатели в совокупности с клинической картиной заболевания и наличием сопутствующих заболеваний могут дать некоторую оценку тяжести заболевания и прогнозу пациента. Тем не менее эффективного маркера неблагоприятного исхода не было найдено до сих пор.

Возраст как предиктор неблагоприятного исхода COVID-19 рассматривался во многих исследованиях. С возрастом вероятность наличия хронических заболеваний повышается, что непременно будет влиять на прогноз коронавирусной инфекции негативным образом. В проспективном исследовании было показано, что увеличение возраста, наличие ожирения и хронических заболеваний, мужской являются независимыми факторами риска внутрибольничной смертности и ассоциируется с высокой частотой применения инвазивной механической вентиляции легких [90].

В предыдущих разделах мы подробно разобрали изменение активности ХТЗ при многих хронических заболеваниях. Научные данные об активности ХТЗ и связи фермента с возрастом найдены не были. На наш взгляд, такого рода исследования так или иначе будут сводиться к наличию хронических заболеваний, связанных с макрофагальным ответом.

Также не стоит забывать, что сам по себе возраст ассоциирован с малоинтенсивным системным воспалением. В настоящее время большое внимание уделяется феномену СНР (clonal hematopoiesis of indeterminate potential) - приобретенные соматические мутации коммитированных клеток-предшественниц гемопоэза), рассматриваемым как универсальный механизм старения, что приводит к появлению минорного клона с ненормальным миелопоэзом, в том числе к гиперактивации нейтрофилов, дисрегуляции воспалительной сигнализации, и может реализоваться в дальнейшем в развитие различных заболеваний [91]. СНР встречается не менее чем у 10% взрослых старше 70 лет [91].

Связь между СНР и смертностью от COVID-19 была изучена в работе испанских ученых. В ретроспективное исследование были отобраны клинические случаи 241 пациента, умерших от COVID-19 возрастом старше 60 лет. Контролем служили 239 выживших пациента, сопоставленных со случаем по возрасту и полу. Лица с гематологическим раком в анамнезе исключались. Согласно полученным результатам, авторы предположили, что наличие клональной экспансии СНР может быть связано с риском летального исхода у пациентов с COVID-19 [92].

Указанные результаты могут свидетельствовать о том, что феномен СНР, частота встречаемости которого повышается с возрастом, вносит свой вклад в инфекционно-триггерные воспалительные процессы, влияющие на исход COVID-19 и, так как речь идет о дисрегуляции иммунной системы, связан с активностью ХТЗ.

Участие хитотриозидаз в воспалительных реакциях и их влияние на иммунный ответ не вызывает никаких сомнений. ХТЗ – это фермент, гетерогенный по физическим свойствам, который присутствует в различных тканях и жидкостях организма. Наследственный дефицит ХТЗ, о котором мы говорили ранее, может указывать на некоторое избирательное преимущество для носителей, но в настоящее время нет никаких указаний на природу такого селективного фактора [30]. Не исключено, что наследственный дефицит фермента связан с феноменом приобретенных соматических мутаций.

Нами не было найдено проспективных исследований, которые бы изучали уровень ХТЗ у больных коронавирусной инфекцией за исключением одноцентрового наблюдательного исследования А. Skvortsov и коллег [7]. В работе было продемонстрировано, что уровень ХТЗ у пациентов с COVID-19 выше, чем в контрольной группе, и при этом отсутствовала связь между активностью фермента и тяжестью повреждения легких. Углубление в патофизиологические моменты с вовлечением ХТЗ может помочь пролить свет на такие не решенные наукой задачи, а также может стать прорывом в диагностике и лечении инфекционных заболеваний.

Известно, что клетки Купфера являются частью мононуклеарно-фагоцитарной системы и активно выделяют ХТЗ, синтез которой повышается у пациентов с COVID-19 [93]. Активация данных клеток запускает процесс реакций, которые индуцируют процессы повреждения и фиброза печени [57]. Изучение вопроса потенциальной взаимосвязи уровня активности фермента с плотностными показателями печени и селезенки, определяемыми по КТ является перспективным.

А. Palomar-Lever и соавторы рекомендуют всем пациентам с COVID-19 измерять отношение плотности печени к плотности селезенки, так как наличие стеатоза коррелирует с тяжелым течением заболевания [94]. А в ретроспективном исследовании отечественных коллег было установлено, что у больных COVID-19 плотность печени была снижена при тяжёлых поражениях лёгких (КТ 3–4) и увеличивалась в динамике [95].

Предполагается, что это связано с переключением активации макрофагов на альтернативные пути, что может свидетельствовать о том, что при достижении определённого уровня ферментативной активности воспаление перестаёт регулироваться классическими механизмами и становится системным.

Таким образом, определение прогностической значимости ХТЗ у госпитализированных пациентов с новой коронавирусной инфекцией открывает перспективу для дальнейших как фундаментальных, так и прикладных исследований в этой области, потому что современная научная доказательная база

по данной тематике является достаточно скудной и представлена в большей степени обзорными публикациями. А любые новые знания, полученные относительно фундаментальных механизмов реализации и течения коронавирусной инфекции, достоверных способов определения прогноза пациентов, являются принципиально значимыми для клинической практики.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Дизайн исследования

Диссертационная работа выполнена на кафедре факультетской терапии №1 Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) под руководством доктора медицинских наук, профессора, член-корреспондента РАН, заведующего кафедрой факультетской терапии №1 Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) Фомина В.В. на базе Университетской клинической больницы №4, которая во время набора пациентов была перепрофилирована в стационар для лечения пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19.

Были проанализированы данные 347 больных с верифицированным диагнозом коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, случайно отобранные из пациентов, госпитализировавшихся в УКБ №4 с 1 ноября 2020 года по 1 февраля 2021.

Исследование является пилотным, в литературе нет сведений о влиянии активности ХТЗ на выживаемость или потребность в респираторной поддержке у пациентов с COVID-19. По этой причине мы были вынуждены оценить достаточность объема выборки и статистическую мощность нашего исследования *post hoc*.

Согласно номограмме Альтмана, объем нашей выборки (347 человек) при уровне статистической значимости 0,05 и статистической мощности 0,8d Коэна составляет 0,325, то есть объем нашей выборки по заданным стандартным параметрам исследования позволяет выявить эффект меньше средней величины.

Анализируя результаты полученных нами многофакторных регрессионных моделей по методу Кохена. При достигнутом коэффициенте детерминации (R<sup>2</sup>)



наших моделей 0,4, количестве предикторов до 10, объеме выборки до 300 и заданной статистической значимости 0,05 мы получили значение статистической мощности близкое к 1, что также свидетельствует о достаточном объеме нашей выборки.

Критериями включения пациентов в исследования были: госпитализация по поводу новой коронавирусной инфекции, диагностированной согласно временным методическим рекомендациям [96]. Для поставки диагноза COVID-19, согласно действующим на тот момент временным клиническим рекомендациям, использовалась не только этиологическая лабораторная диагностика, но и методы лучевой диагностики патологии ОГК пациентов с предполагаемой/установленной COVID-19 пневмонией: обзорная рентгенография легких, компьютерная томография легких, ультразвуковое исследование легких и плевральных полостей.

Критериями невключения в исследование были: возраст менее 18 лет, наличие сопутствующего заболевания с ожидаемой продолжительностью жизни менее 6 месяцев, продолжительность заболевания к моменту госпитализации больше 21 дня.

Критериями исключения из исследования были: выписка из стационара по собственному желанию до завершения курса лечения, перевод в другой стационар, наступление беременности, отказ пациента от дальнейшего участия в исследовании, невыполнение протокола. 20 человек были исключены из исследования по следующим причинам: выписка из стационара по собственному желанию до завершения лечения, отказ от дальнейшего участия в исследовании и перевод в другой стационар.

В исследование не включались больные, отказавшиеся подписать добровольное информированное согласие. Также не включались пациенты с сопутствующей патологией, течение которой ассоциировано с активным провоспалительным цитокиновым статусом (например, воспалительные заболевания кишечника, аутоиммунные патологии и другие заболевания), что могло повлиять на исходную активность ХТЗ.

Первичная конечная точка – смерть от любых причин за весь период исследования. Вторичная конечная точка - потребность в проведении ИВЛ/НИВЛ-СРАР-терапии.

О достижении первичной конечной точки судили по исходам госпитализации, выписанных больных интервьюировали по телефону на 90-й и 180-й дни от включения в исследование. Дизайн исследования представлен на рисунке 2.



Рисунок 2 - Дизайн исследования

Проведение проспективного исследования было одобрено Локальным этическим Комитетом (протокол № 22–21 от 09.12.2021 года). Также исследование было зарегистрировано в Clinical Trial Registry под номером: NCT04752085.

## 2.2. Методы исследования

Всем больным проводились стандартные методы обследования: оценка жалоб, анамнеза заболевания и истории жизни, включая сопутствующие заболевания; физикальное обследование больных - оценка общего состояния пациента в том числе по шкале NEWS, куда входили: частота дыхательных движений за минуту, насыщение кислородом крови, необходимость инсуффляции кислородом, температура тела, систолическое артериальное давление, частота сердечных сокращений за минуту, изменение уровня сознания [97], термометрия, состояния кожных покровов, легких, сердца, органов брюшной полости, почек, измерение частоты сердечных сокращений (уд/мин), частоты дыхательных движений (дд/мин), сатурации (%), АД (мм рт ст), роста (см) и взвешивание пациента с последующим расчетом индекса массы тела ИМТ. Для оценки ИМТ использовалась формула Кетле:  $ИМТ = \text{масса тела (кг)} / \text{рост (м)}^2$ .

У всех пациентов, включенных в исследование, исходно определяли активность ХТЗ плазмы крови. С этой целью капля венозной крови наносилась на стандартную карточку-фильтр (Greenvan-Biocard) и высушивалась при комнатной температуре. После проводилась транспортировка анализов в лабораторию ФНБУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н. П. Бочкова», где активность ХТЗ определялась флуориметрическим методом с использованием синтетического субстрата 4-метилумбеллиферил-три-N-ацетил-β-хитотриозид. Образцы высушенных пятен хранились в обычной камере холодильника при +4°C до отправки. Срок хранения до отправки материалов не превышал 7-ми дней.

Далее в лаборатории образец экстрагировался из пятна диаметром 3,2 мм 0,25 М ацетатом натрия (рН 5,5) в течение 60 минут на шейкере-инкубаторе ST-3L (Elmi, Латвия) при 37°C, 900 об/мин. К 10 мкл экстракта добавляли 50 мкл 0,02 мМ 4-метилумбеллиферил-три-N-ацетил-β-хитотриозида в 0,1/0,2 М цитрат-фосфатном буфере рН 5,2. Ферментная реакция проводилась в шейкере-инкубаторе ST-3L (Elmi, Латвия) в течение 30 минут при 37°C, 500 об/мин. Реакция останавливалась 250 мкл 0,4 М глицин-карбонатным буфером рН 10,3.

Интенсивность флуоресценции определялась с помощью ридера PE EnSpire (Perkin Elmer, США). Активность ХТЗ рассчитывалась как нМ 4-метилумбеллиферина, высвобожденного в ходе ферментной реакции из 4-метилумбеллиферил-три-N-ацетил-β-хитотриозида, на миллилитр в час. Концентрацию 4-метилумбеллиферина получали путем построения калибровочной кривой.

Помимо этого, проводился стандартный лабораторно-инструментальный комплекс обследований, необходимый для госпитализации в стационар, который включал в себя следующее: общий анализ крови (количество лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов, отношение абсолютного числа нейтрофилов к лимфоцитам, гемоглобин, количество тромбоцитов, скорость оседания эритроцитов, С-реактивный белок, аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза, креатинин, общий белок, Д-димер, активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновый индекс, международное нормализованное отношение).

Всем больным была проведена КТ органов грудной клетки в день поступления и как минимум еще один раз за период госпитализации на аппарате Canon «Aquilion One Genesis» 640. Параметры сканирования были идентичны стандартным рекомендуемым производителем настройкам для процедуры сканирования грудной клетки. Для определения объема поражения легочной ткани использовалась адаптированная «эмпирическая» визуальная шкала [98], основанная на визуальной оценке примерного объема уплотненной легочной ткани в легком с наибольшим поражением:

- отсутствие характерных проявлений (КТ-0);
- минимальный объем/распространенность < 25% объема легких (КТ-1);
- средний объем/распространенность 25–50% объема легких (КТ-2);
- значительный объем/распространенность 50–75% объема легких (КТ-3);
- субтотальный объем/распространенность > 75% объема легких (КТ-4).

Плотность печени измеряли путем получения среднего значения в однородных круговых областях площадью 1,5 см<sup>2</sup> в каждой доле печени согласно денситометрической шкале Хаунсфилда (HU). Аналогичным образом измерялась плотность селезенки. В обоих случаях избегали областей патологически высокой плотности или низкой плотности, затем рассчитывали отношение плотности печени к плотности селезенки.

Дальнейшие обследования включали в себя специальные инструментальные и лабораторные исследования, которые назначались индивидуально в зависимости от клинического случая пациента.

Основная лекарственная терапия COVID-19, которую принимали включенные в исследование пациенты до поступления, представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Основная лекарственная терапия COVID-19 у госпитализированных пациентов на амбулаторном этапе

Принимаемые препараты на амбулаторном этапе	Количество человек	Доля от всей группы (%)
Фавипиравир	123	35,5
Имидазолилэтанамид пентандиовой кислоты	8	2,3
Осельтамивир	3	0,9
Риамиловир	12	3,5
Умифеновир	21	6,1
Антибактериальная терапия	170	49
Нестероидные противовоспалительные средства	10	2,8
Парацетамол	79	35,5
Антикоагулянты	74	22,8
Гидроксихлорохин	13	3,7

Продолжение таблицы 1

Глюкокортикостероиды	20	5,8
Колхицин	2	0,6

К основным принимаемым антибактериальным препаратам относились: антибиотики пенициллинового ряда, макролиды, фторхинолоны и цефалоспорины). Нестероидные противовоспалительные средства были представлены ацетилсалициловой кислотой, ацеклофенаком, ибупрофеном. Антикоагулянтная терапия в основном включала в себя пероральные антикоагулянты и лишь 4 человека получали гепарин натрия и эноксапарин натрия. Из глюкокортикостероидов 18 человек получали дексаметазон, 1 человек преднизолон и 1 человек метилпреднизолон.

Основные классы препаратов постоянной лекарственной терапии, которую принимали пациенты, включенные в исследование, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Основные классы препаратов постоянной лекарственной терапии у госпитализированных пациентов

Принимаемые препараты	Количество человек	Доля от всей группы (%)
Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (эналаприл, лизиноприл, периндоприл)	36	10,4
Антагонисты рецепторов ангиотензина II (лозартан, валсартан, азилсартан, олмесартан, телмисартан)	41	11,9
Бета-блокаторы (бисопролол, невиболлол, метопролол)	42	12,1

## Продолжение таблицы 2

Блокаторы кальциевых каналов (амлодипин, нифедипин, лерканидипин)	21	6,1
Диуретики (индапамид, гидрохлортиазид, фуросемид, торасемид)	25	7,2
Антиагреганты (клопидогрел, ацетилсалициловая кислота, тикагрелор)	12	3,5
Ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы (3- гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктаза) (розувастатин, аторвастатин, симвастатин)	12	3,5
Сахароснижающие препараты (метформин, инсулин, линаглиптин, глидиаб МВ, эмпаглифлозин, гликлазид, дапаглифлозин,	45	12,9
Ингаляционные глюкокортикостероиды (будесонид, беклометазон)	9	2,6
Бронходилатирующие средства (формотерол, сальбутамол, тиотропия бромид, ипратропия бромид, фенотерол)	12	3,5
Гликозиды (дигоксин)	2	0,6
L-тироксин	6	1,7
Антикоагулянты (дабигатран, варфарин, апиксабан)	4	1,2
Блокаторы альфа1-адренорецепторов (тамсулозин)	2	0,6

### 2.3. Статистическая обработка данных

Для статистической обработки данных мы использовали язык программирования Python v.3.8.12 (Anaconda distribution) и его модули для анализа, в частности: Sklearn, Pandas, Nona, Numpy, Sweetviz, Seaborn для данных и Matplotlib и Plotly для визуализации. Также использовались программы Statistica и SPSS. База данных была сформирована в программе Microsoft Excel 2019.

Работа проводилась на базе данных, состоящей из 347 пациентов и 40 различных медицинских показателей, из которых 29 численных и 11 категориальных. В базе данных 24% пропущенных значений, в связи с чем проводилась предобработка данных в виде исключения показателей с пропуском выше 80% или заполнением пропущенных значений с помощью алгоритмов машинного обучения для показателей с процентом пропусков ниже 80%.

Количественные показатели представлены медианами и межквартильными промежутками,  $Me [Q1; Q3]$ . Категориальные показатели представлены абсолютными и относительными (в %) частотами встречаемости. При сравнении количественных показателей в независимых группах пациентов использовали *U*-критерий Манна – Уитни, при сопоставлении связанных выборок – критерий Уилкоксона. Сравнение процентных долей при анализе многопольных таблиц сопряженности выполнялось с помощью критерия хи-квадрат Пирсона.

В связи с тем, что исход изначально был неизвестен, выживаемость определялась методом оценки Каплана-Майера.

Из набора параметров, которые достоверно отличались между подгруппами, были выбраны те, которые могли бы предсказать неблагоприятные исходы. С помощью ROC-анализа и AUC были определены наиболее точные пороговые значения для этих параметров. Затем было рассчитано отношение шансов для достижения выбранных конечных точек. Предикторы, для которых 95% ДИ не включал 1, были включены в многомерную логистическую регрессию. В



результате регрессии были выявлены независимые предикторы неблагоприятных исходов.

Для оценки шансов неблагоприятных динамических изменений КТ-показателей в зависимости от исходной активности ХТЗ плазмы крови в двух независимых группах пациентов использовалась модель логистической регрессии.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Общая характеристика пациентов

В исследование включено 347 пациентов с диагнозом коронавирусная инфекция, среди которых 165 (47,6%) мужчин и 182 (52,4%) женщин. Поступающие в Университетскую клинику для стационарного лечения пациенты отбирались в исследование в случайном порядке. Медиана среднего возраста пациентов составила 66 [56; 75] лет. Пациенты оценивались по шкале NEWS – протокол оценки тяжести состояния, средний балл 4 ( $p=0,001$ ). Полное описание исходных характеристик госпитализированных пациентов представлено в таблице 3.

Таблица 3 – Общая характеристика всех пациентов, включенных в исследование

Параметр	Все пациенты N - 347
Мужской пол	165 (47,6%)
Возраст, года	66 [56; 75]
День болезни на дату поступления, дни	7 [5; 10]
Длительность госпитализации, дни	13 [10; 16,5]
Анализ на SARS-CoV2, обнаружено	266 (76,7%)
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	28,5 [25,6; 32,3]
StO <sub>2</sub> , %	95 [93; 96]
NEWS, баллы	4 [2; 5]

Данные выражены в процентах или медиане [Q1; Q3]

Среди выявленных сопутствующих заболеваний чаще всего встречались артериальная гипертензия и сахарный диабет, 224 (65%) и 60 (17%), соответственно. Основные сопутствующие заболевания, имеющиеся у пациентов с COVID-19 на момент госпитализации, представлены на рисунке 3.

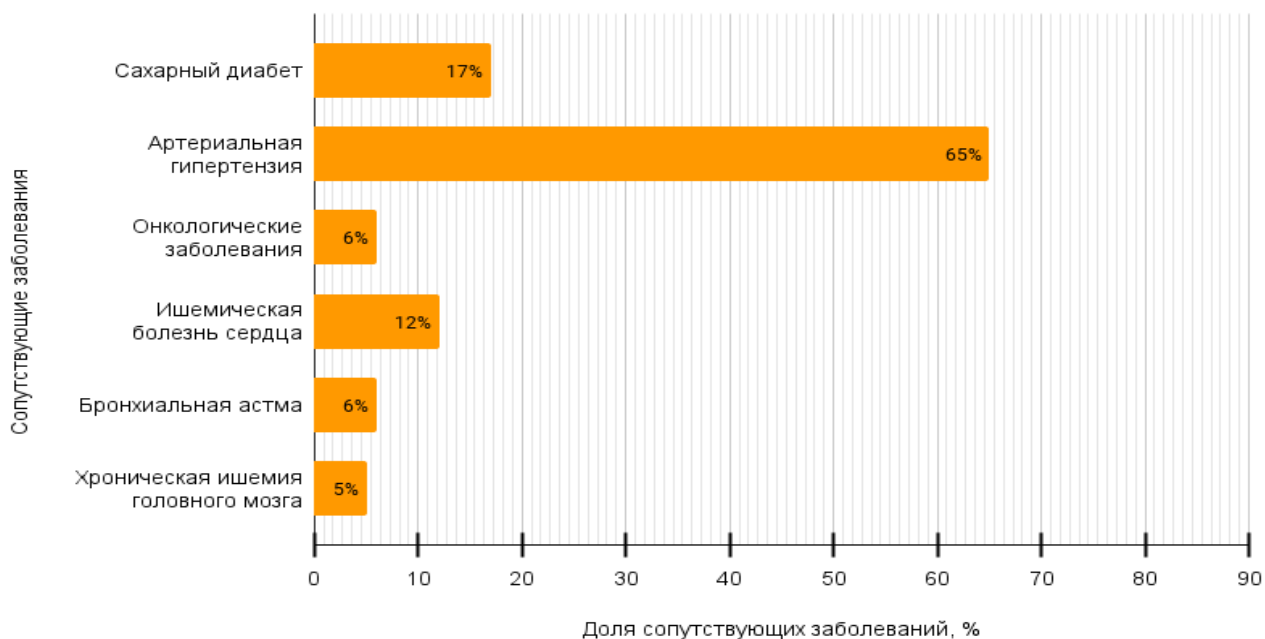


Рисунок 3 - Основные сопутствующие заболевания

Пациенты, включенные в исследование, были скомпенсированы по хроническим заболеваниям. Например, медиана уровня систолического артериального давления составляла 129 [120; 140] мм рт.ст. ( $p < 0,001$ ) и диастолического 80 [78; 80] мм рт.ст. ( $p < 0,001$ ). Данные о постоянной принимаемой терапии по поводу хронических заболеваний представлены в таблице 2.

Далее был проведен одномерный регрессионный анализ по Коксу с учетом сопутствующих заболеваний. В данном случае анализировалось влияние каждого фактора по отдельности на первичную конечную точку – смерть от любых причин (Таблица 4).

Таблица 4 – Одномерный регрессионный анализ с поправками на возраст и мужской пол

<b>Сопутствующая патология</b>	<b>ОШ (отношение шансов)</b>	<b>95% ДИ (доверительные интервалы)</b>	<b>p</b>
Сахарный диабет	1,67	0,77-3,64	0,194
Артериальная гипертензия	1,43	0,58-3,54	0,439
Онкологические заболевания	1,59	0,48-5,31	0,448
Ишемическая болезнь сердца	1,13	0,44-2,9	0,797
Бронхиальная астма	2,45	0,66-9,17	0,183
Хроническая ишемия головного мозга	3,59	1,34-9,63	0,011

Среди всех рассмотренных сопутствующих патологий только хроническая ишемия головного мозга показала статистически значимое влияние на риск смерти, увеличивая его в 3,59 раза по сравнению с группой без этого заболевания. Остальные патологии не продемонстрировали статистически значимого влияния на исход.

По результатам компьютерной томографии органов грудной клетки, процент поражения легочной ткани при поступлении составил 30 [20; 43,8], средняя плотность печени 51,9 HU [44,7; 56,9], LSR 1,04 [0,91; 1,13].

Результаты лабораторной диагностики в том числе и уровня ХТЗ, проведенной в день поступления всем включенным в исследование пациентам, представлены в таблице 5. Активность ХТЗ составила 0–1070 нмоль/мл/ч. Медианное значение исследуемой группы было 97 [42,5; 185] нмоль/мл/ч. Также следует отметить, что у 95% выборки уровень ХТЗ был ниже 418 нмоль/мл/ч [99].

Таблица 5 - Результаты лабораторных обследований

Параметр	Все пациенты N - 347
Хитотриозидаза, нмоль/мл/ч	97 [42,5; 185]
Лимфоциты, тыс/мкл	1,2 [0,8; 1,7]
Креатинин, мкмоль/л	88 [77,8; 104,4]
Гемоглобин, г/л	138 [127; 151]
Лейкоциты, 10*9/л	6 [4,8; 7,8]
NLR	3,35 [2,1; 6,4]
Тромбоциты 10*9/л	181 [146; 218]
АСТ, ед/л	32,7 [25,1; 51,5]
АЛТ, ед/л	28,3 [21,4; 45,1]
СРБ, мг/л	44,9 [19; 87,7]
АЧТВ, с	34,7 [31; 39,1]
ПИ, %	112 [90,7; 128,8]
МНО	0,95 [0,89; 1.05]

Данные выражены в медиане [Q1; Q3]

### 3.2. Результаты оценки влияния исходной активности хитотриозидазы на выживаемость

Для оценки выживаемости пациентов была проведена оценка первичной конечной точки – смерти от любых причин. После госпитализации пациентов интервьюировали по телефону на 90-й и 180-й дни от включения в исследование. 68 человек (19%) не ответили на телефонные звонки.

За период наблюдения умерло 36 человек (10,4%). 30 из них (83,3%) скончались в первые 30 дней наблюдения, остальные - не позже 90-го дня.

Основные характеристики выживших и умерших пациентов представлены в таблице 6 [99].

Таблица 6 - Основные характеристики госпитализированных пациентов

<b>Параметр</b>	<b>Выжившие N=311</b>	<b>Умершие N=36</b>	<b>p</b>
Средний возраст, годы	65,0 [55,0; 74,0]	80,0 [68,8; 82,8]	0,001
Женский пол	169 (52,6 %)	13 (40,0 %)	0,258
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>	28,7 [25,5; 32,3]	28,3 [26,6; 33,3]	0,335
День болезни на момент включения в исследование	7 [5; 10]	7 [5; 9]	0,169
NEWS, баллы	3,0 [2,0; 5,0]	6,0 [3,0; 8,0]	0,001
Стадия КТ 3-4	44 (13,4 %)	12 (40 %)	0,010
Лимфоциты, тыс/мкл	1,6 [1,1; 2,0]	1,1 [0,8; 1,3]	0,001
Протромбиновый индекс, %	113,0 [93,8; 131,4]	88,3 [66,0; 114,2]	0,001
Креатинин, мкмоль/мл	87,5 [77,8; 103,0]	106,6 [83,9; 133,8]	0,001
С-реактивный белок, мг/мл	44,1 [18,2; 86,1]	99,3 [28,3; 192,5]	0,001

Продолжение таблицы 6

Активность ХТЗ, нмоль/мл/ч		90,5 [40,2; 178,0]	180,0 [77,2; 393,2]	0,001
Потребность НИВЛ/ИВЛ, %	в	15 (4,6 %)	22 (73,3 %)	0,001
Использование ГИБТ, %		118 (37,9 %)	21 (58,3 %)	0,082

Данные выражены в процентах или медиане [Q1; Q3]

21 (58,3%) человек среди умерших получали в стационаре биологическую терапию и 118 (37,9%) выживших пациентов ( $p=0,082$ ). При этом у 7-ми выживших пациентов была комбинированная биологическая терапия: тоцилизумаб+олокизумаб, олокизумаб+барицитиниб, олокизумаб+тофацитиниб, олокизумаб+циклоспорин. Препараты, относящиеся к получаемой биологической терапии за период госпитализации биологической терапии, представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Биологическая терапия у госпитализированных пациентов

Биологическая терапия	Количество человек	Доля от всей группы (%)
Артлегия (Олокизумаб)	88	23,98
Актемра (Тоцилизумаб)	42	11,44
Иларис (Канакинумаб)	9	2,45
Эфлейра (Нетакимаб)	4	1,09
Барицитиниб	1	0,27
Яквинус (Тофацитиниб)	1	0,27

## Продолжение таблицы 7

Неорал (Циклоспорин)	1	0,27
----------------------	---	------

Основными сопутствующими заболеваниями среди выживших и умерших пациентов представлены на рисунке 4. Умершие пациенты были старше и чаще страдали ишемической болезнью сердца и головного мозга, при поступлении их состояние было тяжелее, отмечался больший объем поражения легочной ткани по данным КТ [100].

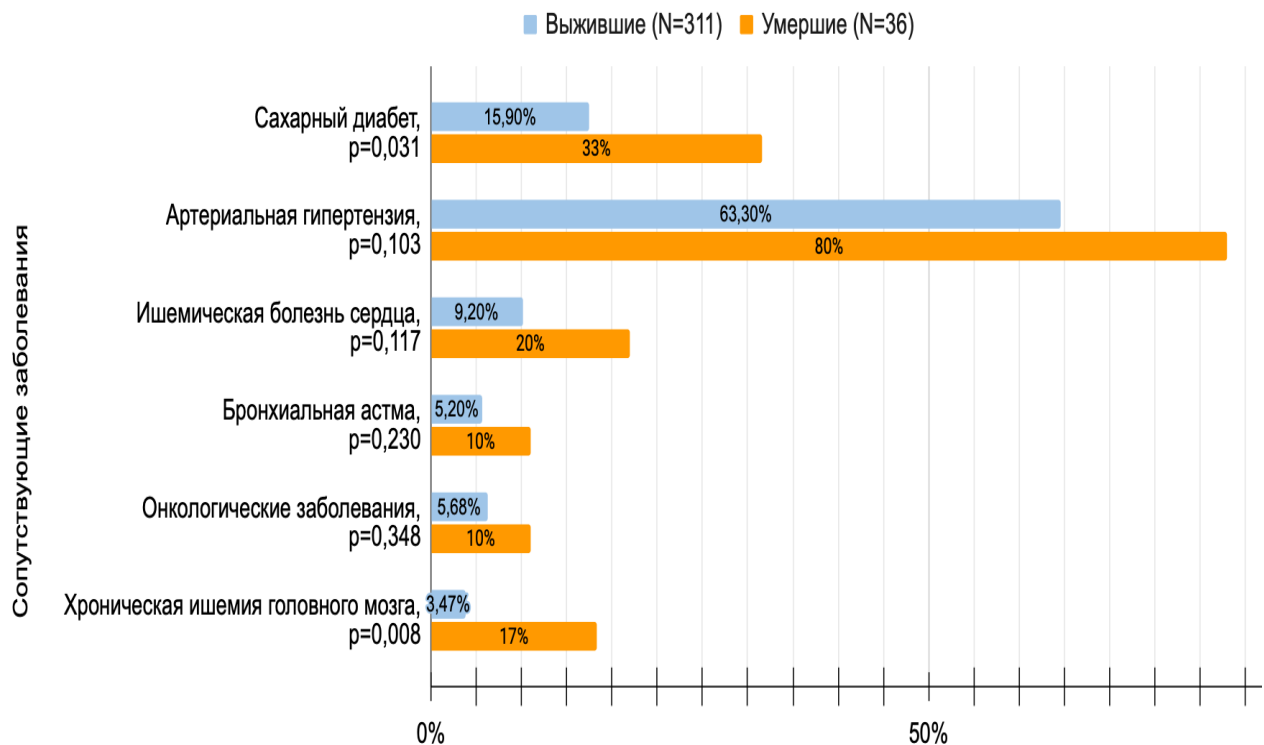


Рисунок 4 – Основные сопутствующие заболевания при разделении пациентов на выживших и умерших

Основными причинами смерти пациентов в стационаре являлись острый респираторный дистресс-синдром, также развитие легочно-сердечной, сердечно-сосудистой и дыхательной недостаточности. Что касается смерти после выписки из стационара, из известных причин были следующие: острый инфаркт миокарда,



хроническая ишемия головного мозга, деменция смешанного генеза, синдром когнитивной дисфункции, мезентеральный тромбоз.

Далее для анализа выживаемости была построена дополнительная диаграмма размаха или Box Plot (Рисунок 5), на которой умершие пациенты отражены синим цветом, а выжившие - оранжевым. Так как величина количественного показателя – активности хитотриозидазы, имела ненормальное распределение ( $p < 0,001$  для проверки на нормальность тестом Шапиро-Уилка), мы использовали U-test Манна-Уитни,  $p < 0,001$ , что указывает на статистически значимое различие по показателю ХТЗ в двух группах.

Очевидно, что среднее значение активности ХТЗ для смертельных случаев находится около 180 нмоль/мл/ч, а пациенты достигают первичной конечной точки при активности хитотриозидазы в пределах от 150 до 200 нмоль/мл/ч. Выздоровление же чаще наступает при активности ХТЗ около 120 нмоль/мл/ч.

По нашим данным у 22 пациентов (6,4%) уровень ХТЗ составил 0 нмоль/мл/ч, исходы у этих пациентов не были достоверно лучше [100].

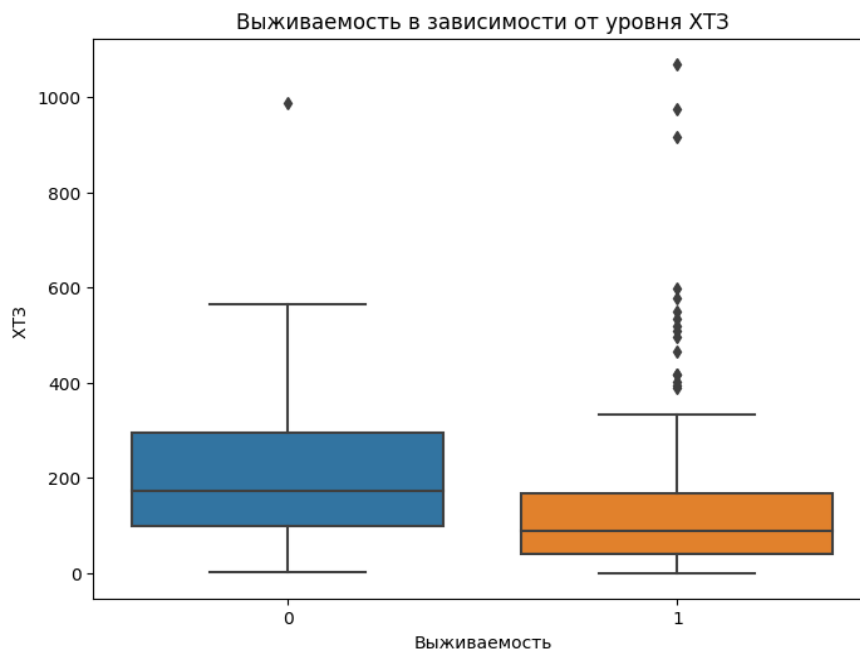


Рисунок 5 - Анализ выживаемости в зависимости от исходной активности хитотриозидазы

Для выявления связи между независимыми переменными (факторами риска неблагоприятного прогноза заболевания) и зависимой бинарной переменной - смертью от любых причин за период исследования, мы выполнили логистический регрессионный анализ. В то время как прогностическая ценность разработанной модели определялась путем построения ROC-кривой.

При пороге отсечения ХТЗ в 150 нмоль/мл/ч чувствительность составила 55,9%, а специфичность 69,9% (Рисунок 6). Следует отметить, что оптимальный порог отсечения согласно индексу Юдена - 100,5 нмоль/мл/ч (чувствительность 73,6%, специфичность 55,1%), но так как это значение в большей степени соответствует средней активности ХТЗ выживших пациентов, мы решили для дальнейшего анализа ориентироваться на активность ХТЗ 150 нмоль/мл/ч.

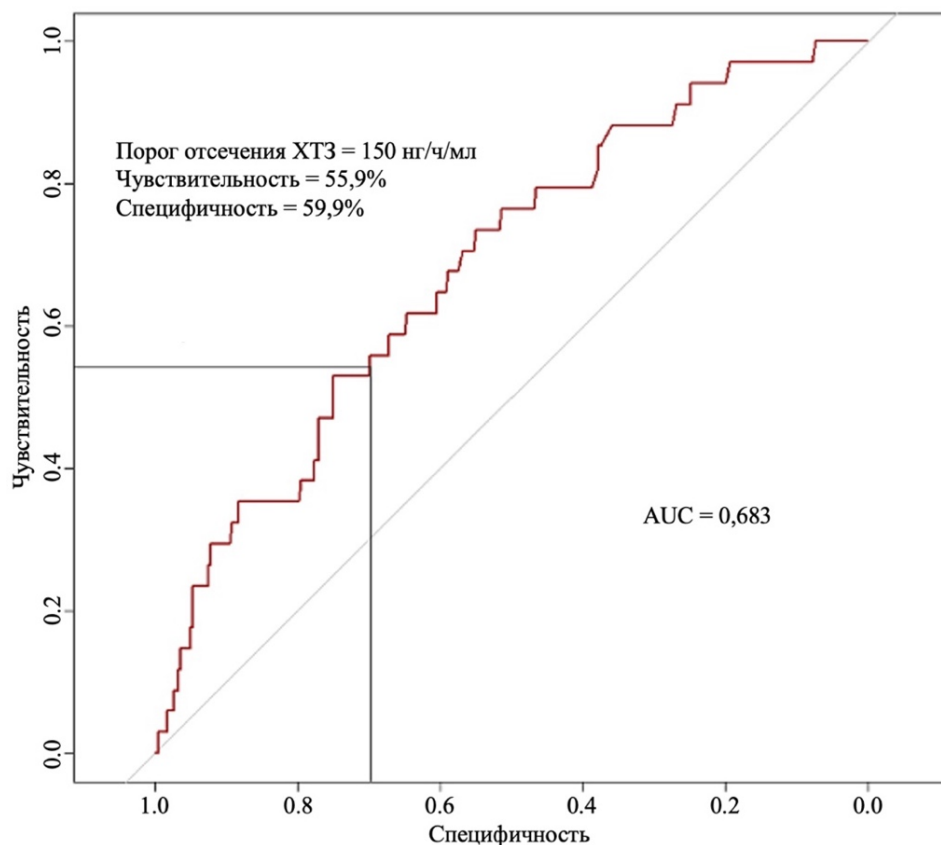


Рисунок 6 - ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности развития смертельного исхода у госпитализированных пациентов с COVID-19 от значения логистической функции P

Среди умерших 19 пациентов (18,8%) с активностью ХТЗ > 150 нмоль/мл/ч и 17 (7,2%) пациентов с активностью ХТЗ < 150 нмоль/мл/ч (ОШ=2,97; ДИ 1,44-6,12,  $p=0,003$ ).

Отношение шансов равное 2,97 говорит о том, что шансы смертельного исхода у пациентов с ХТЗ > 150 нмоль/мл/ч почти в 3 раза выше, чем для пациентов с исходной активностью ХТЗ менее 150 нмоль/мл/ч.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что при исходной активности ХТЗ > 150 нмоль/мл/ч заметно ухудшается выживаемость пациентов (Рисунок 7).

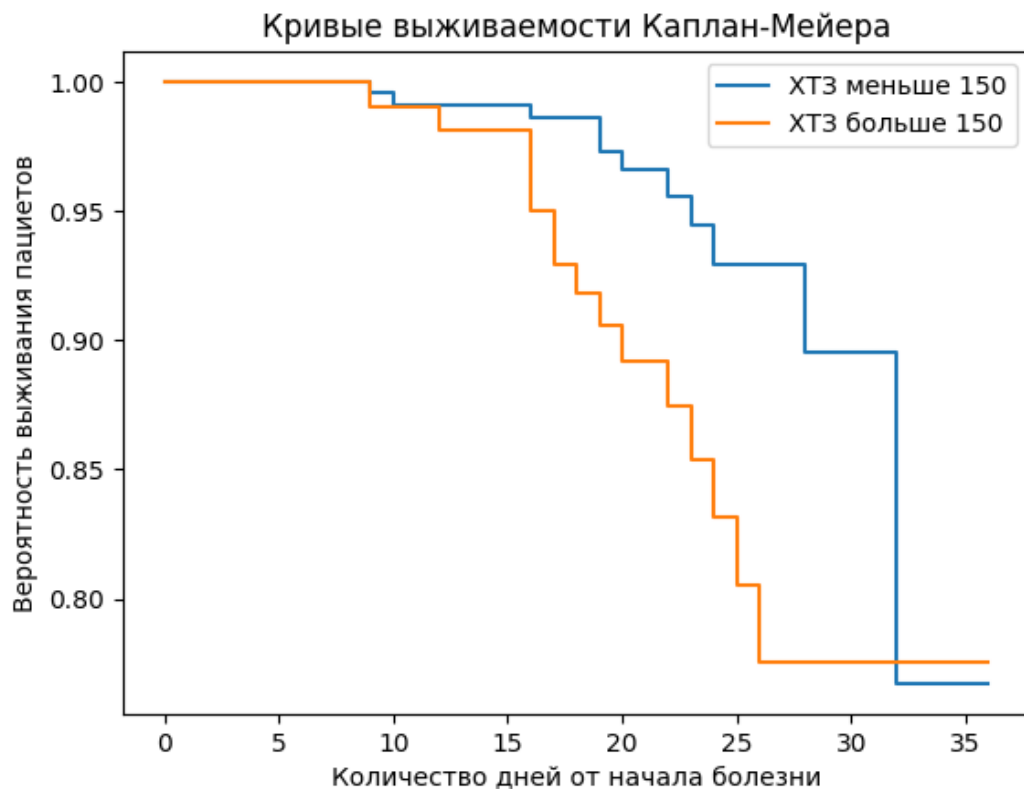


Рисунок 7 - Кривые Каплана-Мейера, показывающие выживаемость пациентов с коронавирусной инфекцией с активностью хитотриозидазы выше и ниже 150 нмоль/мл/ч

В рамках исследования мы построили модель логистической регрессии, предсказывающую выживаемость, на которой 0 - умершие, 1 – выжившие (Рисунок 8). Модель логистической регрессии, предсказывающая выживаемость пациентов

на основе медицинских показателей, дала результат в 84,13% точности на заданной выборке, что является очень высоким уровнем предсказательной способности модели. Как мы видим, всего 10 неверных предсказанных значений (отмечены синими точками).

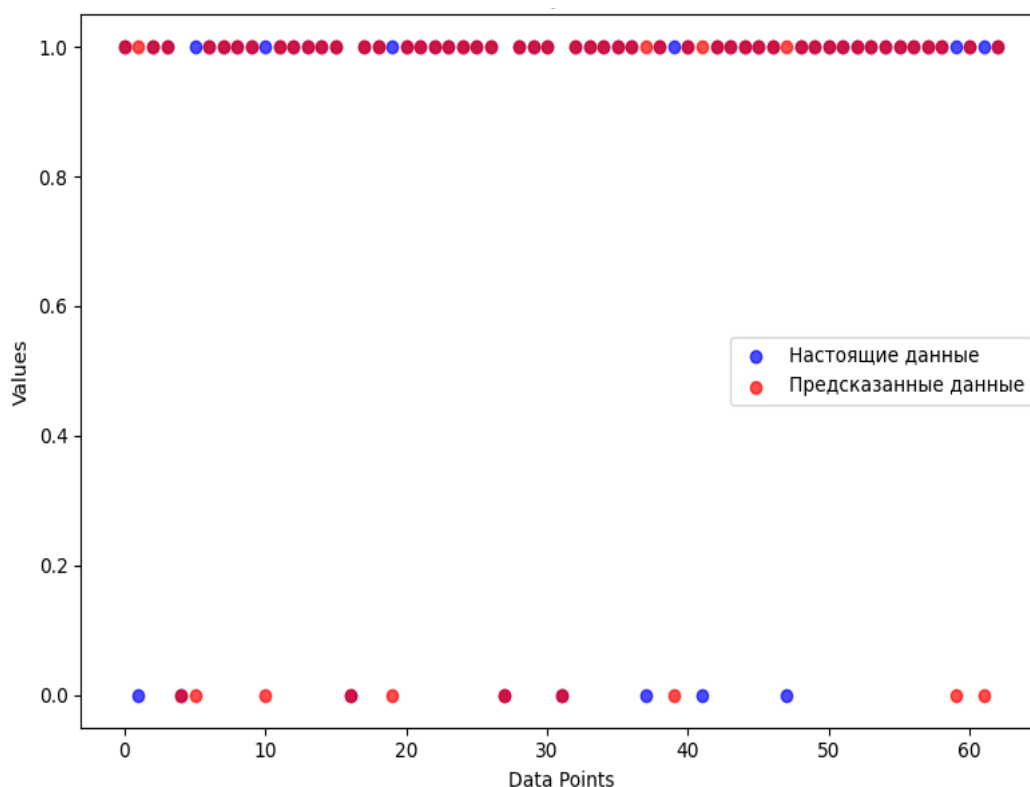


Рисунок 8 - Модель логистической регрессии

### 3.3. Результаты оценки влияния исходной активности хитотриозидазы на потребность в ИВЛ/НИВЛ

При анализе подгрупп по вторичной конечной точке - потребность в проведении искусственной вентиляции легких (ИВЛ) / неинвазивной искусственной вентиляции легких (НИВЛ) - СРАР-терапии (СРАР - Constant Positive Airway Pressure) ИВЛ/НИВЛ потребовалось 39 пациентам (11,2 %), из них

16 умерших пациентов были изначально на неинвазивной респираторной поддержке, а затем в силу тяжести состояния их переводили на ИВЛ. 6 умерших пациентов были только НИВЛ и 4 на ИВЛ. 13 выживших находились на НИВЛ.

Больные, которым проводилась респираторная поддержка, были старше и имели больше баллов по шкале NEWS, а также имели больше сопутствующих заболеваний. Полные результаты представлены в таблице 8 и на рисунке 9.

Таблица 8 - Сравнительные характеристики групп: переведенные/не переведенные на ИВЛ/НИВЛ

Параметр	НЕ ИВЛ/НИВЛ N=308	ИВЛ/НИВЛ N=39	p
Женский пол	164 (53,2%)	18 (46,2)	0,403
Возраст, годы	65,5 [55;74]	73 [64; 81]	0,008
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>	28,5 [25,4; 32]	28,4 [26,6; 32,7]	0,5
День болезни на момент включения в исследование, дни	7 [5; 10]	6 [4,5; 8]	0,004
NEWS, баллы	3 [2; 5]	6 [3;7]	0,001
Стадия КТ 3-4	43 (13,96%)	14 (35,9%)	0,001

Данные выражены в процентах или медиане [Q1; Q3]

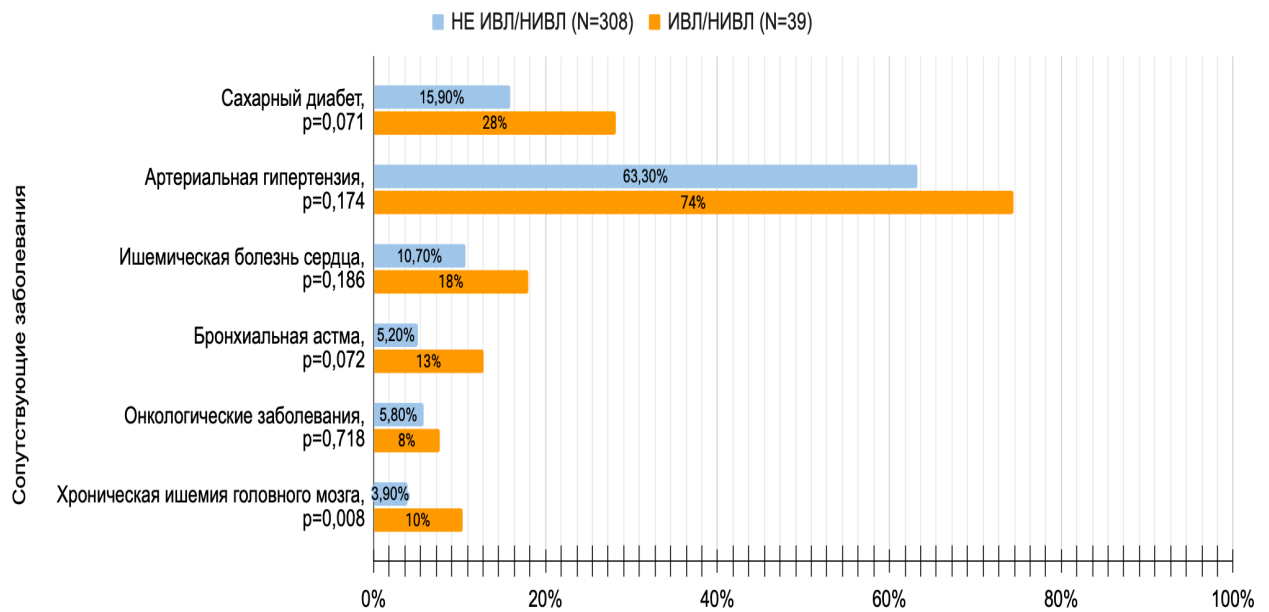


Рисунок 9 - Характеристика сопутствующих патологий для переведенных/не переведенных на ИВЛ/НИВЛ пациентов

Для сравнения распределений вероятностей для ХТЗ и потребности в респираторной поддержке построили диаграмма размаха или Box Plot (Рисунок 9).

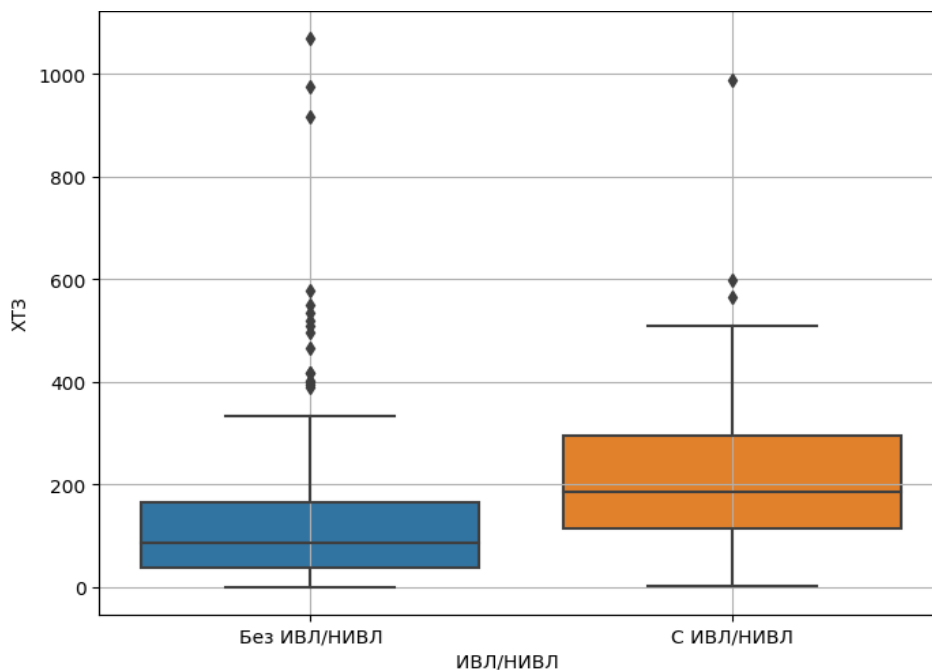


Рисунок 9 - Анализ потребности в ИВЛ/НИВЛ в зависимости от уровня хитотриозидазы

Для сравнения количественного показателя - активности ХТЗ для двух групп пациентов по вторичной конечной точке - потребность в проведении ИВЛ/НИВЛ, мы использовали U-test Манна-Уитни, так как величина имеет ненормальное распределение.  $p < 0,001$ , что указывает на статистически значимое различие по показателю ХТЗ в двух группах (85,5 [38,0; 168,0] нмоль/мл/ч для непереведенных на ИВЛ/НИВЛ и 185,0 [110,0; 296,0] нмоль/мл/ч для переведенных на ИВЛ/НИВЛ (Рисунок 10). Оптимальный порог отсечения согласно индексу Юдена - 100,5 нмоль/мл/ч (чувствительность 81,1%, специфичность 56,2%).

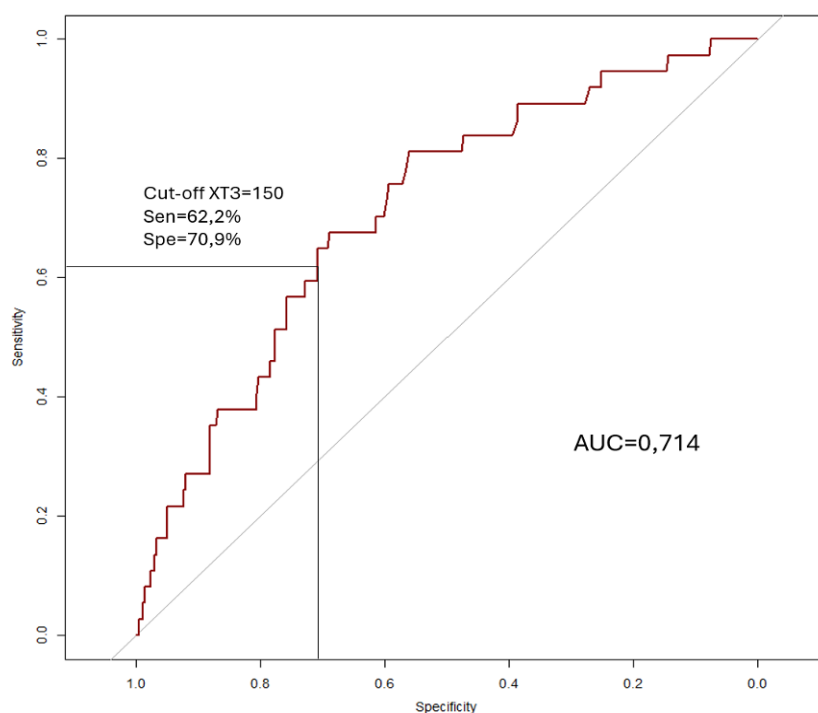


Рисунок 10 - ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности потребности в ИВЛ/НИВЛ у госпитализированных пациентов с COVID-19 от значения логистической функции P

Для количественной оценки сравнения частоты перехода на ИВЛ/НИВЛ у пациентов с  $ХТЗ > 150$  нмоль/мл/ч и пациентов с  $ХТЗ < 150$  нмоль/мл/ч использовался статистический показатель отношения шансов. Также для полученных результатов был построен 95% доверительный интервал и

рассчитывался p-value при помощи теста Хи-квадрат. Уровень статистической значимости был принят за 5%.

Среди пациентов с активностью ХТЗ > 150 нмоль/мл/ч на ИВЛ/НИВЛ перевели 23 пациента (20,54%), в то время как у пациентов с активностью ХТЗ < 150 нмоль/мл/ч перевод на респираторную поддержку был осуществлен только у 16 (6,8%) пациентов (ОШ=4,01; ДИ 1,97-8,14,  $p < 0,01$ ).

Отношение шансов равное 4,01 говорит о том, что шансы перехода на ИВЛ/НИВЛ у пациентов с ХТЗ > 150 нмоль/мл/ч в 4 раза выше, чем для пациентов с исходной активностью ХТЗ менее 150 нмоль/мл/ч. Также, полученный 95% доверительный интервал равный 1,97 – 8,14 и значение  $p < 0,01$ , на уровне статистической значимости равной 5%, позволяют утверждать, что данный результат является статистически значимым.

Таким образом, исходная активность ХТЗ > 150 нмоль/мл/ч может выступать в качестве биомаркера, указывающего на более высокую вероятность перехода на ИВЛ/НИВЛ госпитализированных пациентов с коронавирусной инфекцией. Наглядно результаты представлены на рисунке 11 [100].

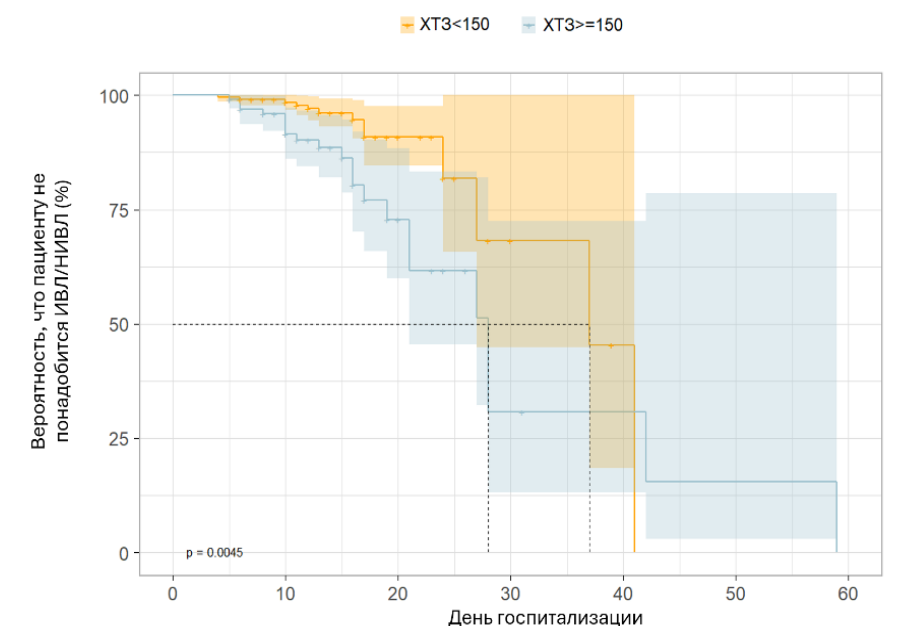


Рисунок 11 - Кривые Каплана-Мейера, показывающие вероятность перехода на ИВЛ/НИВЛ госпитализированных пациентов с COVID-19 с активностью хитотриозидазы выше и ниже 150 нмоль/мл/ч



### **3.4. Результаты сравнения прогностической значимости повышения активности хитотриозидазы с известными лабораторными биомаркерами неблагоприятного исхода**

Для сравнения прогностической значимости повышения активности ХТЗ с известными лабораторными биомаркерами неблагоприятными исходами количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка (при числе исследуемых менее 50) или критерия Колмогорова-Смирнова (при числе исследуемых более 50). Количественные показатели, имеющие нормальное распределение, описывались с помощью средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD), границ 95% доверительного интервала (95% ДИ). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1 – Q3). Сравнение двух групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, при условии равенства дисперсий выполнялось с помощью t-критерия Стьюдента, при неравных дисперсиях выполнялось с помощью t-критерия Уэлча. Сравнение двух групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Помимо ХТЗ в качестве независимых предикторов неблагоприятного прогноза были рассмотрены следующие лабораторные показатели: лейкоциты, лимфоциты, тромбоциты, NLR, СОЭ, СРБ, АСТ, АЛТ, общий белок, альбумин, креатинин, ферритин, ПИ, фибриноген, Д-димер.

В связи с отсутствием регламентированных алгоритмов действия и разнообразием пациентов осуществлялся индивидуальный подход к взятию анализов у больных в период госпитализации, поэтому некоторых количественных переменных было недостаточно для проведения достоверной статистической обработки. Например, значений ферритина, фибриногена и Д-димера.

Для сравнения прогностической значимости повышения активности ХТЗ с известными лабораторными биомаркерами проведен многофакторный регрессионный анализ, в который вошли предикторы достижения конечных точек, выявленные на предыдущих этапах анализа, а именно лимфоциты, тромбоциты, NRL, ПИ, креатинин, С-реактивный белок и хитотриозидаза. Результаты ROC-анализа представлены в таблице 9 и таблице 10.

Таблица 9 - Результаты ROC-анализа по определению пороговых значений предикторов неблагоприятного течения COVID-19 (смерть от любых причин)

Параметр	Порог отсечения	AUC
Лимфоциты, тыс/мкл	0,89	0,660
Тромбоциты, *10 <sup>9</sup> /л	253,5	0,538
NLR	4,26	0,784
ПИ, %	106,4	0,651
Креатинин, мкмоль/л	100,1	0,652
СРБ, мг/л	83,7	0,718
ХТЗ, нмоль/мл/ч	150	0,683

Таблица 10 – Результаты ROC-анализа по определению пороговых значений предикторов неблагоприятного течения COVID-19 (потребность в переходе на ИВЛ/НИВЛ)

Параметр	Порог отсечения	AUC
Лимфоциты, тыс/мкл	0,89	0,710
Тромбоциты, *10 <sup>9</sup> /л	202,5	0,593
NLR	4,26	0,792
ПИ, %	106,4	0,608
Креатинин, мкмоль/л	100,1	0,673

Продолжение таблицы 10

СРБ, мг/л	84,15	0,733
ХТЗ, нмоль/мл/ч	150	0,683

После определения пороговых значений потенциальных лабораторных предикторов неблагоприятного течения COVID-19 были рассчитаны отношения шансов для каждого из них и затем проведена пошаговая логистическая регрессия (Таблица 11, Таблица 12).

Таблица 11 – Пошаговая логистическая регрессия (смерть от любых причин)

Пороговые значения	ОШ (отношение шансов)	95% ДИ (доверительные интервалы)
Лимфоциты менее 0,89 тыс/мкл	3,64	1,739-7,756
Тромбоциты более 253,5 0,10*9/л	3,217	1,373-7,533
NRL более 4,26	2,667	0,794-8,954
Протромбиновый индекс менее 106,4%	3,344	1,540-7,299
Креатинин более 100,1 мкмоль/л	3,527	1,710-7,277
С-реактивный белок более 83,7 мг/л	2,973	1,077-8,208
ХТЗ более 150 нмоль/мл/ч	2,942	1,433-6,040

Таблица 12 – Пошаговая логистическая регрессия (потребность в переходе на ИВЛ/НИВЛ)

Пороговые значения	ОШ (отношение шансов)	95% ДИ (доверительные интервалы)
Лимфоциты менее 0,89 тыс/мкл	5,076	2,457-10,526
Тромбоциты более 202,5 0,10*9/л	1,94	0,983-3,829
NRL более 4,26	1,455	0,393-5,378
Протромбиновый индекс менее 106,4%	2,22	1,094-4,504
Креатинин более 100,1 мкмоль/л	3,51	1,732-7,113
С-реактивный белок более 84,15 мг/л	2,29	0,784-6,689
ХТЗ более 150 нмоль/мл/ч	4,006	1,972-8,137

По ее результатам независимыми лабораторными предикторами смерти у госпитализированных пациентов оказались уровень лимфоцитов менее 0,89 тыс/мкл, тромбоцитов более 253,5 0,10\*9/л, протромбиновый индекс менее 106,4 %, креатинин более 100,1 мкмоль/л, С-реактивный белок более 83,7 мг/л и ХТЗ более 150 нмоль/мл/ч при  $p < 0,05$ .

По отношению к потребности в ИВЛ/НИВЛ: уровень лимфоцитов менее 0,89 тыс/мкл, протромбиновый индекс менее 106,4 %, креатинин более 100,1 мкмоль/л, ХТЗ более 150 нмоль/мл/ч при  $p < 0,05$ .

### 3.5. Результаты оценки взаимосвязи исходной активности уровня хитотриозидазы с динамикой данных КТ

Для оценки взаимосвязи исходной активности ХТЗ с динамикой данных КТ: плотность печени, процент поражения легочной ткани и отношение плотности печени к плотности селезенки (LSR) мы провели субанализ, в который вошли 121 пациент, включенных в исследование. Среди них первичной конечной точки достигли 3 человека (2,43%), 3 (2,43%) пациента находились на респираторной поддержке (ИВЛ/НИВЛ).

Наличие КТ ОГК в день поступления и как минимум еще один раз за период госпитализации - критерии отбора пациентов в субанализ.

Учитывая клиническую картину заболевания, повторное исследование выполнялось в среднем на 7-й [6; 9] день госпитализации.

В данной когорте пациентов из сопутствующих заболеваний чаще всего встречались артериальная гипертензия (58,5%), ожирение (ИМТ более 30 кг/м<sup>2</sup>) (35,4%) и сахарный диабет 14,6%.

Далее мы сравнили динамику выбранных КТ-показателей. Результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Сравнение КТ-данных в динамике

Параметр	КТ в день поступления	КТ повторно	<i>p</i>
Поражение легких, %	30 [20; 40]	30 [15; 40]	0,384
Плотность печени, HU	52,04 [45,4; 56,7]	57,5 [49,8; 62,7]	0,000
LSR	1,05 [0,91; 1,14]	1,13 [0,99; 1,28]	0,000

Исходя из того, как изменялись КТ-параметры, мы делили пациентов на группы и сравнивали в них исходную активность ХТЗ (Таблица 14).

Таблица 14 - Сравнение активности ХТЗ в зависимости от динамики КТ-данных

Данные КТ	Объем поражения легочной ткани		<i>p</i>	Плотность печени		<i>p</i>	LSR		<i>p</i>
	Увеличился	Не увеличился		Увеличилась	Не увеличилась		Увеличилась	Не увеличилась	
ХТЗ, нмоль/ мл/ч	65 [27; 119]	124 [53; 232]	0,006	100 [28; 225]	84 [47; 164]	0,694	88 [26; 215]	105 [68; 202]	0,336

Согласно результатам модели логистической регрессии, представленным в таблице 15, оказалось, что у пациентов с исходной активностью ХТЗ менее 100 нмоль/мл/ч статистически значимо повышены шансы прогрессирования поражения легочной ткани, в то время как динамика показателей плотности печени и селезенки не зависит от исходного уровня ХТЗ [101].

Таблица 15 - Влияние исходной активности хитотриозидазы < 100 нмоль/мл/ч на динамику показателей компьютерной томографии

Динамика КТ-показателей	ОШ (отношение шансов)	95% ДИ (доверительный интервал)
Увеличение объема поражения легочной ткани	3,2	1,4–7,15
Увеличение плотности печени	1,1	0,44–2,78
Увеличение LSR	2,14	0,72–6,33

Хочется отметить, что активность ХТЗ ниже 100 нмоль/мл/ч достоверно сопровождалась прогрессированием поражения легочной ткани. В то же время, повышение фермента выше 150 нмоль/мл/ч было сопряжено с неблагоприятным прогнозом и течением коронавирусной инфекции [100].

Отсутствие влияния активности ХТЗ на динамику плотности печени и селезенки, вероятно, связано с тем, что для выхода купферовских клеток из толерогенного состояния необходимо больше времени и более длительное воздействие провоцирующего фактора, чем в нашем исследовании [101].

### 3.6. Клинические наблюдения

#### 3.6.1. Клиническое наблюдение №1

Пациент 46 лет госпитализирован в отделение анестезиологии-реанимации ковид-центра УКБ №4 в крайне тяжелом состоянии, на ИВЛ.

В анамнезе – расслоение аорты 1 типа по ДеБейки с двукратным оперативным лечением в виде протезирования восходящего отдела аорты от 2019 года и рестернотомией, аневризмэктомией, протезированием дуги аорты с реимплантацией брахицефального ствола и левой общей сонной артерии в протез,

эндопротезированием нисходящей грудной аорты гибридным графтом в условиях искусственного кровообращения, антеградной селективной кардиopleгией, умеренной гипотермии. протезирование безымянной вены синтетическим протезом от ноября 2020 года. Состоявшееся желудочно-кишечное кровотечение. ОНМК в правой теменной доле от 23.11.20. В связи с нарастающей дыхательной недостаточностью переведен на ИВЛ 26.11.20. Была диагностирована вирусная пневмония (КТ-3). В связи с чем для долечивания переведён в ковид-центр УКБ №4. В анамнезе: артериальная гипертония, ХОБЛ, ХБП 3 стадии.

При осмотре: состояние крайне тяжелое. ИМТ 26,3 кг/м<sup>2</sup>. Т тела 38С, продуктивному контакту не доступен. Оценка по ШКГ (шкала комы Глазго) 7 баллов. ЧДД 26/мин. Проводится ИВЛ. SpO<sub>2</sub> 90–92%. Экскурсия грудной клетки симметрична. Гемодинамика с вазопрессорной поддержкой норадреналином 0,12 мкг/кг/мин, при этом АД 96/70 мм. рт. ст. Живот не вздут, мягкий, безболезненный. Мочеиспускание по уретральному катетеру, в мочеприемнике около 50 мл желтой мочи.

В анализах крови при поступлении - гемоглобин 105 г/л, лейкоциты 13.82 10<sup>9</sup>/л, СРБ 169 мг/л, ХТЗ 0 нмоль/мл/ч. Анализ на SARS-CoV-2 не обнаружено. При оценке по шкале NEWS 10 баллов По КТ ОГК при поступлении КТ-3.

На 12-й день болезни: внезапно асистолия на кардиомониторе, десатурация до 41%. Немедленно начаты реанимационные мероприятия, в течение 30 минут без эффекта, констатирована смерть больного.

Несмотря на исходную активность хитотриозидазы 0 нмоль/мл/ч, прогноз пациента оказался неблагоприятным и, вероятно, по большей мере обусловлен тяжелым сопутствующим заболеванием и его осложнениями. Также можно предположить, что пациент был носителем гомозиготной мутации в гене фермента, которая выражается отсутствием активности ХТЗ и встречается у 10% людей в популяции [30].



### 3.6.2. Клиническое наблюдение №2

Пациент 58 лет госпитализирован в отделение для лечения пациентов с коронавирусной инфекцией №3 ковид-центра УКБ №4 в тяжелом состоянии.

В анамнезе – ХОБЛ, ремиссия. Постоянную терапию не принимал. Госпитализирован на 5-й день болезни с жалобами на одышку, чувство заложенности в грудной клетке, кашель и повышение температуры до 39С.

При осмотре: состояние тяжелое. ИМТ 30,1 кг/м<sup>2</sup>. Т тела 37.1С. ЧДД 24 в минуту. SpO<sub>2</sub> 90% на воздухе, на инсуффляции кислородом 5-6л/мин 95-96%. Пульс 60/минуту. Артериальное давление 125/80 мм. рт. ст. Живот при пальпации мягкий, участвует в дыхании, безболезненный. Диурез без особенностей.

В анализах крови при поступлении - гемоглобин 167 г/л, лейкоциты 12,6 10<sup>9</sup>/л, СРБ 100,7 мг/л, ХТЗ 1070 нмоль/мл/ч. Анализ на SARS-CoV-2 обнаружено. По КТ ОГК 35% поражения легких, КТ – 2.

За период госпитализации (11 дней) состояние больного с положительной динамикой: улучшение самочувствия, жалобы регрессировали, нормализовалась температура тела. По КТ ОГК на 10-й день госпитализации отмечается положительная динамика в виде уменьшения интенсивности и объема участков поражения легочной ткани и их незначительное уплотнение. Также отмечается нормализация до 3,4 мг/л.

Во время телефонного интервью на 180-й день болезни активно жалоб не предъявлял, самочувствие удовлетворительное.

Несмотря на повышение активности хитотриозидазы до 1070 нмоль/мл/ч, прогноз заболевания оказался благоприятным, также за период стационарного лечения пациенту не было необходимо проведение ИВЛ/НИВЛ. В данном клиническом случае, следует отметить наличие сопутствующих заболеваний – ХОБЛ и ожирения, которые теоретически могли повлиять на уровень фермента.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Диссертационная работа посвящена определению прогностической значимости оценки активности ХТЗ – фермента нейтрофильно-макрофагальной гиперактивации, у госпитализированных больных по поводу острого течения новой коронавирусной инфекции.

Пандемия коронавирусной инфекции оказала влияние не только на международное медицинское сообщество, но и в целом на население нашей планеты, что послужило толчком к усиленному проведению мероприятий в области здравоохранения, направленных на борьбу и профилактику с инфекциями.

Перед тем как перейти к обсуждению результатов, хочется отметить, что на момент проведения научной работы в России еще не была широко распространена массовая вакцинация от коронавирусной инфекции и в нашей стране на тот период времени еще не был достигнут значительный прогресс в иммунизации населения, как это произошло с середины 2021 года. Однако в настоящее время все еще актуален не только вопрос просветительской деятельности и вакцинации, но и разработки четкого алгоритма действий в случае необходимости борьбы с инфекционными заболеваниями, в том числе и COVID-19. Кроме того, докторам различных специальностей ежедневно приходится сталкиваться с неблагоприятными последствиями пандемии в виде постковидного синдрома в отдаленном периоде. В июле 2024 году был опубликован метаанализ, который показал, что совокупная распространенность постковидного синдрома в мире составляет 41,79% [102]. 48 исследований (41 – когортное) было включено в метаанализ, среди которых 21 исследование было проведено в европейских странах, 14 - в американском регионе, 10 - в Азии, два - в Австралии и одно - на африканском континенте, что говорит об достаточно хорошем охвате и большой выборке человек. [102].

Непосредственно само течение COVID-19 ассоциировано с выраженным и зачастую извращенным островоспалительным ответом клеточного и гуморального

звеньев иммунитета. Хитиназы принимают участие в иммунном ответе, который возникает в ответ на инвазию в организм патогена, что подтверждается высокой частотой встречаемости транскрипта гена ХТЗ в ДНК макрофагов [103-105]. В связи с чем гипотеза об использовании определения активности ХТЗ в качестве подобного маркера является научно-обоснованной. На наш взгляд, подобная стратегия может позволить разработать универсальные системы стратификации групп высокого риска развития неблагоприятных событий на фоне COVID-19 с дальнейшей разработкой оптимальных протоколов мониторинга на основе принципов персонализированной медицины.

Активность ХТЗ нами изучалась при коронавирусной инфекции, поэтому для нас особенный интерес представляет повышение активности фермента при инфекционных заболеваниях. ХТЗ участвует в инициации иммунного ответа на чужеродные инфекционные агенты, поэтому неудивительно, что фермент встречается в повышенных концентрациях в легких и кишечнике – органах, активно контактирующих с внешней средой и ее микроорганизмами. Мы определяли уровень активности ХТЗ в плазме крови, так как такой способ был для нас наиболее доступным и возможным в исполнении в период пандемии, в отличие от определения активности фермента в мокроте. В качестве порогового значения мы считали уровень активности фермента 30 нмоль/мл/ч, все значения, превышающие вышеупомянутое рассматривались, как повышение активности. В научной литературе встречаются схожие данные о нормальных значениях активности ХТЗ в группах людей, не имеющих хронических заболеваний. Например, в работе David Bennett и коллег у здоровых добровольцев из контрольной группы активность ХТЗ составляла  $34.2 \pm 13,8$  нмоль/мл/ч [38]. По нашим данным у 22 пациентов (6,4%) исходная активность ХТЗ составила 0 нмоль/мл/ч, при том, что исходы у этих пациентов не были достоверно лучше: всего 1 пациент с неблагоприятным прогнозом, описанный в клиническом случае №2 [100]. Вероятно, это может быть связано с наследственным дефицитом ХТЗ, при котором все ее формы могут отсутствовать. Вполне возможно, что это может

указывать на некоторое избирательное преимущество для носителей такой мутации, но в настоящее время нет никаких указаний на природу такого селективного фактора [100].

То обстоятельство, что в наше исследование были включены пациенты на ранней стадии заболевания, и большинство из них на момент включения в исследование имели умеренную тяжесть течения заболевания (поражение менее 50% объема легочной ткани), позволяет рассматривать ХТЗ именно как ранний прогностический маркер. Поскольку большинство смертей в нашем исследовании наступило в течение месяца, этот маркер отражает краткосрочный прогноз. Оба обстоятельства могут иметь важное значение для определения тактики ведения этих больных [99].

Кроме того, в исследовании не оценивалась активность ХТЗ в динамике, так как мы рассматривали фермент с точки зрения раннего предиктора плохого прогноза. Именно поэтому мы не включали в исследование больных, длительность заболевания у которых была больше 21 дня. Предшествующая догоспитальная терапия глюкокортикостероидами проводилась только у 5,8% человек, лечение было представлено в основном противовирусными и антибактериальными препаратами, влияние которых на активность ХТЗ сомнительна.

В клинической практике уровень ХТЗ, как мы уже обсуждали выше, может повышаться при многих хронических заболеваниях, в том числе и тех, которые напрямую сопряжены с активацией макрофагального русла. В наше исследование не включались пациенты с аутоиммунными заболеваниями, активными онкологическими процессами, воспалительными заболеваниями кишечника и другими патологиями. Все больные, вошедшие в исследование, были компенсированы по имеющимся хроническим заболеваниям и находились на постоянной медикаментозной терапии. К недостатку исследования можно отнести тот факт, что не все анамнестические сведения о сопутствующих заболеваниях имели объективное подтверждение. Поэтому, хотя среди наших пациентов,

достигших конечных точек, чаще встречались больные с ИБС и ХИГМ, мы не учитывали это при построении прогностических моделей [100].

Нельзя исключать влияние возраста на активность фермента, так как именно возраст был первым параметром, продемонстрировавшим свою прогностическую значимость у больных COVID-19.

Турецкие коллеги провели исследование, где определяли активности ХТЗ в сыворотке крови у здоровых пожилых людей. Были отобраны 90 человек в возрасте 65-94 лет и 69 человек в возрасте 20-44 лет. Ферментативную активность ХТЗ определяли в сыворотке крови. Активность ХТЗ составила  $270 \pm 21$  (нмоль/мл/ч) (среднее значение  $\pm$  SD) у пожилых людей и  $136 \pm 17$  у молодых [106]. В работе Луца D'Onofrio и коллег, наоборот, у больных с СД 2 типа не было выявлено связи ХТЗ возрастом, а также с полом, длительностью заболевания, ИМТ, с приемом глюкозоснижающих препаратов или текущей антигипертензивной терапии и другими параметрами в отличие от артериальной жесткости. При том, что активность ХТЗ была в диапазоне 12,4 [9,5–15,6] нмоль/мл/ч [107]. Вероятно, небольшая выборка (75 человек) и ограниченный возрастной диапазон (средний возраст  $55 \pm 5,4$  года) могли повлиять на отсутствие увеличения активности фермента в зависимости от возраста. Что касается бронхиальной астмы, у пациентов с легкой и умеренной астмой активность ХТЗ плазмы крови составила 96,3 [61,3-137,6] нмоль/мл/ч, а с тяжелой астмой 90,7 [58,1-134,8] нмоль/мл/ч, при этом активность ХТЗ астматиков была ниже, чем у пациентов с ХОБЛ ( $P < 0,001$ ) [108]. Отдельно хочется подчеркнуть тот факт, что лечение пероральными стероидами (преднизолон) у пациентов с бронхиальной астмой не приводило к снижению активности ХТЗ [108]. Отдельно необходимо отметить диапазон активности фермента в выше представленных исследованиях. Такое различие активности ХТЗ связано с реакцией врожденного иммунитета, может иметь широкий спектр клинических применений и требует дальнейшего изучения. В том числе данный разброс активности фермента может быть связан с мутацией дублирования 24-бр в экзоне 10 гена ХТЗ. В одном из исследований субъекты,

гомозиготные по 24-bp дупликации в экзоне 10, были полностью лишены активности ХТЗ, а при сравнении всех испытуемых активность фермента у лиц, лишенных дупликации 24-bp, была значительно выше, чем у гетерозигот (соответственно, 113,6 [74,5-156,6] [n = 146] против 59,2 [36,0-86,2] нмоль/мл/ч [n = 76];  $P < 0,0001$ ) [108].

По нашим результатам, умершие больные и те пациенты, которым потребовалась респираторная поддержка, были старше. Но если говорить о рассмотрении возраста старше 65 лет как маркера неблагоприятного исхода, согласно данным пошаговой логистической регрессии статистически значимый результат он показал только в отношении смертельного исхода, а не в потребности в ИВЛ/НИВЛ [100]. Отчасти такие результаты объясняются более стремительным неблагоприятным течением COVID-19 у пожилых больных и, как следствие, наступлением смертельного исхода.

В ретроспективном исследовании греческих коллег принимали участие 300 человек с COVID-19, находящиеся на лечении в отделении интенсивной терапии. Согласно полученным результатам, авторы не рекомендуют рассматривать возраст как самостоятельный предиктор смертности, вместо чего рекомендуется использовать индекс коморбидности Чарлсона, который позволяет более комплексно оценить пациента и прогноз заболевания [109].

Мы рассматриваем ХТЗ как независимый от возраста и пола предиктор неблагоприятного прогноза у госпитализированных пациентов, что является несомненным преимуществом этого биомаркера. Следует отметить, что недостатком определения активности ХТЗ служат не столько финансовые затраты, сколько недоступность определения фермента повсеместно, даже в столице Российской Федерации.

Прогностическая значимость известных клинических и лабораторных предикторов неблагоприятного исхода COVID-19 не всегда высокая, а сами показатели тем или иным образом зависят как от наличия хронических заболеваний, так и от других причин, что давно доказано наукой, в отличие от

активности ХТЗ. Также большинство имеющихся исследований по определению биомаркеров носят ретроспективный характер, в отличие от нашей работы, что является ее весомым преимуществом.

Несомненно, комплексная оценка состояния пациентов с COVID-19, имеет свои преимущества. Например, ассоциация клинико-лабораторных биомаркеров и рентгенологических симптомов изучалась в одноцентровом когортном ретроспективном исследовании отечественных коллег. Согласно результатам, объем поражения при КТ показал положительные корреляции со многими лабораторными показателями. После проведения анализа по методу GBM (gradient boosting machine) выяснилось, что такие показатели как уровень нейтрофилов, лимфоцитов, концентрация СРБ, а также лабораторные анализы, показывающие нарушение функции печени и почек (АСТ, КФК, мочевины, креатинин) и метаболические изменения и КТ-картина могут с высокой достоверностью прогнозировать характер течения болезни. Следует подчеркнуть, что особое внимание авторы уделяют связи лимфопении и рентгенологическому ухудшению КТ-картины легких [109]. Однако желаемой «универсальности» в прогнозировании исходов заболевания предложено не было, чем отличается наша работа.

Мы успешно продемонстрировали прогностическую способность определения активности ХТЗ на основе заболевания COVID-19. Активность фермента была значительно выше у умерших пациентов, чем у выживших, что также отразилось на выживаемости пациентов [111]. В научной работе отечественных коллег авторы отмечают, что при тяжелом течении COVID-19 можно выделить несколько ведущих клинико-лабораторных синдромов (в том числе синдром активации макрофагов), которые при прогрессировании заболевания на поздней стадии могут привести к развитию острого повреждения почек, острой сердечной недостаточности, септическому шоку, а при наличии коморбидности, пациент может погибнуть уже на ранней стадии заболевания [112]. При развитии так называемого «цитокинового шторма» одной из ведущих патогенетической тактикой лечения тяжелых пациентов, по мнению авторов,

может быть применение методов экстракорпоральной гемокоррекции [112]. Именно поэтому ХТЗ может послужить тем самым «сигналом» перехода болезни в тяжелую стадию заболевания, когда риски неблагоприятных исходов повышены. Кроме того, повышение активности ХТЗ должно сопровождаться повышенным наблюдением за пациентом и его лечением и учитываться в маршрутизации пациентов с COVID-19 в пределах стационара.

На основе результатов нашего исследования мы можем предложить ученым показать потенциальные возможности использования ХТЗ в качестве биомаркера прогноза при других заболеваниях легких. Например, ХТЗ была идентифицирована как новый маркер фиброза и новая терапевтическая мишень при идиопатическом легочном фиброзе. В легких ХТЗ экспрессируется профибротическими, специфическими для заболевания макрофагами и является одним из определяющих маркеров этого кластера гена, ассоциированного с фиброзом [19]. Именно поэтому наши данные могут помочь ученым в изучении ХТЗ не только при коронавирусной инфекции. Пандемия коронавирусной инфекции позволила по-новому взглянуть на многие заболевания. Мы считаем, что изучение ХТЗ очень актуально при болезнях легких и имеет большие перспективы в будущем.

В проведенном субанализе мы оценивали взаимосвязь исходной активности ХТЗ с динамикой данных КТ: объемом поражения легочной ткани, плотностью печени и селезенки у госпитализированных пациентов с COVID-19, так как среди пациентов с COVID-19 описано достаточно много случаев повреждения печени, сопровождающихся различными клиническими проявлениями [101].

По нашим данным, активность ХТЗ ниже 100 нмоль/мл/ч достоверно сопровождалась прогрессированием поражения легочной ткани, в то время как отсутствовало влияния активности фермента на динамику плотности печени и селезенки [101]. Согласно опыту работы с пациентами с COVID-19, развернутое поражение легких происходило после 10-14 дней от начала болезни. В нашем исследовании больные в среднем поступали на 7 день от начала заболевания. Вполне вероятно, что у больных, поступивших в более ранние сроки активность



ХТЗ была невысокой и коррелировала с небольшим поражением легких, которое неизбежно в течение нескольких дней прогрессировало. Из недостатков субанализа можно дополнительно выделить тот факт, что его дизайн изначально не был рассчитан на анализ КТ в динамике, поэтому сроки повторных исследований оказались различными, что затрудняло интерпретацию полученных данных и выяснение причин выявленных изменений. Кроме того, выполнение повторного КТ было невозможно у части пациентов в связи с тяжестью состояния или смертью, поэтому в субанализ попали пациенты с более легким течением заболевания [101].

Наше проспективное исследование выделяется на фоне большинства работ, посвященных прогнозированию течения COVID-19, за счет своего проспективного характера, достаточно большим объемом выборки пациентов. Однако оно обладает рядом ограничений, связанных в первую очередь с объективными трудностями получения полной и достоверной информации о пациентах в условиях реальной клинической практики во время пандемии. Например, не все анамнестические данные о сопутствующих заболеваниях имели объективное подтверждение. Более того, мы не проводили генетическое тестирование на определение мутаций в гене ХТЗ. Некоторые лабораторные прогностические маркеры были доступны не для всех пациентов, что не позволило включить их в многофакторный анализ. К тому же определение активности ХТЗ не является рутинным лабораторным исследованием и не доступно во всех лабораториях, что ограничивает его применение. Тем не менее, полученные нами данные достаточно обнадеживающие и позволяют планировать дальнейшие исследования в этом направлении.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Практическая значимость диссертационной работы не вызывает сомнения, так как в ходе исследования была выявлена предикторная роль исходной активности ХТЗ и ее пороговых значений в отношении риска развития неблагоприятных исходов (перевод на поддерживающие методы оксигенации, смерть от любых причин) у пациентов, госпитализированных по поводу новой коронавирусной инфекции.

Впервые в мире была исследована активность хитотриозидазы у госпитализированных больных с COVID-19.

Хитотриозидаза может выступать в качестве раннего лабораторного предиктора неблагоприятного прогноза наряду с известными маркерами: уровнем лимфоцитов, тромбоцитов, протромбиновым индексом, креатинином и С-реактивным белком. Использование ХТЗ для изучения других заболеваний, сопровождающихся активацией макрофагов, обладает несомненным преимуществом и требует проведения более масштабных исследований, так как потенциально может помочь клиницистам правильно стратифицировать пациентов и рационализировать тактику их лечения.

Результаты исследования могут позволить разработать универсальные системы стратификации групп высокого риска развития неблагоприятных событий на фоне COVID-19 с дальнейшей разработкой оптимальных протоколов мониторинга на основе принципов персонализированной медицины.

Несмотря на убедительные результаты диссертационной работы, необходимы дальнейшие подтверждающие исследования на более крупных когортах пациентов с различными клиническими характеристиками. Отдельный интерес представляло бы исследование активности ХТЗ у пациентов на амбулаторном звене обращения по поводу COVID-19.

## ВЫВОДЫ

1) Активность хитотриозидазы у выживших пациентов была статистически значимо ниже, чем у умерших больных – 90,5 нмоль/мл/ч и 180 нмоль/мл/ч, соответственно ( $p < 0,001$ ). Шансы смертельного исхода у госпитализированных пациентов с COVID-19 с исходной активностью хитотриозидазы более 150 нмоль/мл/ч в 3 раза выше, чем у пациентов с активностью хитотриозидазы менее 150 нмоль/мл/ч (ОШ 2,97; 95% ДИ 1,44-6,12;  $p = 0,003$ ).

2) Активность хитотриозидазы у пациентов без респираторной поддержки (ИВЛ/НИВЛ) была статистически значимо ниже, чем у пациентов, находившихся на ИВЛ/НИВЛ – 85,5 нмоль/мл/ч и 185 нмоль/мл/ч, соответственно ( $p < 0,001$ ). Шансы перехода на ИВЛ/НИВЛ у госпитализированных пациентов с COVID-19 с исходной активностью хитотриозидазы более 150 нмоль/мл/ч в 4 раза выше, чем у пациентов с активностью хитотриозидазы менее 150 нмоль/мл/ч (ОШ 4,01; 95% ДИ 1,97-8,14;  $p < 0,001$ ).

3) Независимыми лабораторными предикторами неблагоприятного исхода заболевания (смерти от любых причин) у госпитализированных пациентов с COVID-19 являются: уровень лимфоцитов менее 0,89 тыс/мкл (ОШ 3,64; 95% ДИ 1,739-7,756), уровень тромбоцитов более 253,5 тыс/мкл (ОШ 3,217; 95% ДИ 1,373-7,533), протромбиновый индекс менее 106,4% (ОШ 3,344; 95% ДИ 1,540-7,299), креатинин более 100,1 мколь/л (ОШ 3,527; 95% ДИ 1,710-7,277), СРБ более 83,7 мг/л (ОШ 2,273; 95% ДИ 1,077-8,208), активность ХТЗ более 150 нмоль/мл/ч (ОШ 2,942; 95% ДИ 1,433-6,040) при  $p < 0,05$  при поступлении в стационар.

4) Независимыми лабораторными предикторами необходимости в переходе на ИВЛ/НИВЛ у госпитализированных пациентов с COVID-19 являются: уровень лимфоцитов менее 0,89 тыс/мкл (ОШ 5,076; 95% ДИ 2,457-10,526), протромбиновый индекс менее 106,4% (ОШ 2,22; 95% ДИ 1,094-4,504), креатинин более 100,1 мколь/л (ОШ 3,51; 95% ДИ 1,732-7,113), активность ХТЗ более 150

нмоль/мл/ч (ОШ 4,006; 95% ДИ 1,972-8,137) при  $p < 0,05$  при поступлении в стационар.

5) Повышение активности хитотриозидазы более 150 нмоль/мл/ч на момент госпитализации в 4 раза повышает шансы потребности в ИВЛ/НИВЛ, что превосходит такой показатель как С-реактивный белок.

6) У пациентов с исходной активностью ХТЗ менее 100 нмоль/мл/ч повышаются шансы прогрессирования поражения легочной ткани по данным компьютерной томографии (ОШ 3,2; 95% ДИ 1,4-7,15) при  $p < 0,05$ , в то время как динамика показателей плотности печени и селезенки не зависит от исходной активности фермента.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В план обследования стационарных больных с коронавирусной инфекцией (COVID-19) необходимо включать определение активности хитотриозидазы, как раннего биомаркера смертельного исхода заболевания.

2. Высокий риск летального исхода и необходимости в респираторной поддержке (ИВЛ/НИВЛ) у госпитализированных пациентов с коронавирусной инфекцией (COVID-19) с уровнем хитотриозидазы более 150 нмоль/мл/ч должен учитываться в маршрутизации пациентов в условиях стационара.

3. Повышение активности хитотриозидазы более 150 нмоль/мл/ч должно сопровождаться повышенным наблюдением за пациентом и его лечением.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АЛТ - аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время

БА - бронхиальная астма

вч-СРБ - высокочувствительный С-реактивный белок

ГМГ-КоА-редуктаза - 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктаза

ИБС - ишемическая болезнь сердца

ИВЛ/НИВЛ – искусственная вентиляция легких/неинвазивная искусственная вентиляция легких

ИМТ – индекс массы тела

КТ ОГК – компьютерная томография органов грудной клетки

КФК - креатинфосфокиназа

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НАЖБП - неалкогольная жировая болезнь печени

ОШ – отношение шансов

ПИ - протромбиновый индекс

РААС - ренин-ангелотензин-альдостероновая система

РФ – Российская Федерация

СД – сахарный диабет

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СРБ - С-реактивный белок

ХОБЛ - хроническая обструктивная болезнь

ХТЗ – хитотриозидаза

ШКГ – шкала комы Глазго

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭКМО – экстракорпоральная мембранная оксигенация

AMCase - кислотоустойчивая хитиназа млекопитающих

AUC – площадь под кривой

CAR – соотношение С-реактивного белка к альбумину

CH3L1 - хитиназо-3-подобный белок-1

CHIP - clonal hematopoiesis of indeterminate potential

CHIT-1 - хитотриозидаза-1

COVID-19 – коронавирусная инфекция

CPAP - Constant Positive Airway Pressure

CSF1 - колониестимулирующий фактор 1

Dectin-1 – дектин-1

GBM - Gradient Boosting Machine

GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

IGFALS - insulin-like growth factor binding protein

IL-17 – интерлейкин-17

IL-18 – интерлейкин-18

IL-23 – интерлейкин-23

IL-4 – интерлейкин-4

Jak-Stat – janus kinase and signal transducer and activator of transcription pathway

LE - лейкоцитарная эластаза

LPS – липополисахарид

LSR – liver to spleen ratio, отношение плотности печени к плотности селезенки

M. mycetomatis - *Madurella mycetomatis*

MCP1 - моноцитарный хемотаксический белок 1

MyD88 - белок-88 миелоидной дифференцировки первичного генного ответа

NEWS - National Early Warning Score

NF-κB – nuclear factor kappa B signaling pathway

NLR – отношение нейтрофилов к лимфоцитам

NOD-2 – nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 pathway

ROC-анализ - анализ кривой рабочих характеристик

SARS-CoV2 – severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2

TLR-4 - толл-подобный рецептор 4

TNF - фактор некроза опухоли



**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Харченко, Е.П. Коронавирус SARS-Cov-2: особенности структурных белков, контагиозность и возможные иммунные коллизии / Е.П.Харченко // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2020. – Т. 19, № 2. – С. 13-30.
2. Riou, J. Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) / J. Riou, C.L. Althaus // Euro Surveill. – 2020. – Vol 25, № 4 – P. 2000058.
3. Presumed asymptomatic carrier transmission of COVID-19 / Y. Bai, L. Yao, T. Wei [et al.] // Jama. – 2020. – Vol. 323, № 14. – P. 1406-1407.
4. COVID-19: immunopathology, pathophysiological mechanisms, and treatment options / L.E. van Eijk, M. Binkhorst, A.R. Bourgonje [et al.] // The Journal of pathology. – 2021. – Vol. 254, № 4. – P. 307-331.
5. Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages / L. Malaguarnera, M. Musumeci, M. Di Rosa [et al.] // Journal of clinical laboratory analysis. – 2005. – Vol. 19, № 3. – P. 128-132.
6. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease / C.E. Hollak, S. van Weely, M.H. Van Oers [et al.] // The Journal of clinical investigation. – 1994. – Vol. 93, № 3. – P. 1288-1292.
7. Skvortsov, A. Chitotriosidase Activity in Lung Injury Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) / A. Skvortsov, A. Balakhonov, A. Panferov // TP3. TP003 COVID-19 infections, mechanisms, and clinical implications. – American Thoracic Society, 2021. – P. A1288-A1288.
8. Biomarkers and outcomes of COVID-19 hospitalisations: systematic review and meta-analysis / P. Malik, U. Patel, D. Mehta [et al.] // BMJ evidence-based medicine. – 2021. – Vol. 26, № 3. – P. 107-108.

9. Multiple organ dysfunction in SARS-CoV-2: MODS-CoV-2 / C. Robba, D. Battaglini, P. Pelosi [et al.] // *Expert review of respiratory medicine*. – 2020. – Vol. 14, № 9. – P. 865-868.
10. Identification of serum prognostic biomarkers of severe COVID-19 using a quantitative proteomic approach / Y/ Kimura, Y/ Nakai, J/ Shin [et al.] // *Scientific reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 20638.
11. Jeuniaux, C. A brief survey of the early contribution of European scientists to chitin knowledge / C. Jeuniaux // *Advances in chitin sciences*. – Jacques André Publ; Lyon, France, 1996. – P. 1-9.
12. Muzzarelli, R. Chitin and chitosan hydrogels / R. Muzzarelli, C. Muzzarelli // *Handbook of Hydrocolloids* / G.O. Phillips, P.A. Williams, editors. – Woodhead Publishing Ltd; Cambridge, UK: 2009. – P. 849-888.
13. Rathore, A.S. Chitinases from bacteria to human: properties, applications, and future perspectives / A.S. Rathore, R.D. Gupta // *Enzyme research*. – 2015. – Vol. 2015, № 1. – P. 791907.
14. Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages (\*) / R.G. Boot, G.H. Renkema, A. Strijland [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – Vol. 270, № 44. – P. 26252-26256.
15. Quantification of chitinase mRNA levels in human and mouse tissues by real-time PCR: species-specific expression of acidic mammalian chitinase in stomach tissues / M. Ohno, Y. Togashi, K. Tsuda [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 6. – P. e67399.
16. Malaguarnera, L. Chitotriosidase: the yin and yang / L. Malaguarnera // *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. – 2006. – Vol. 63. – P. 3018-3029.
17. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis / S. Yona, K.W. Kim, Y. Wolf [et al.] // *Immunity*. – 2013. – Vol. 38(1). – P. 78-91. – doi: 10.1016/j.immuni.2012.12.001.
18. Ginhoux, F. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis / F. Ginhoux, S. Jung // *Nature Reviews Immunology*. – 2014. – Vol. 14(6). – P. 392-404. – doi: 10.1038/nri3671.

19. Atri, C. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases / C. Atri, F.Z. Guerfali, D. Laouini // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19(6). – P. E1801. – doi: 10.3390/ijms19061801.
20. Modulation of chitotriosidase during macrophage differentiation / M. Di Rosa, G. Malaguarnera, C. De Gregorio [et al.] // *Cell Biochem Biophys*. – 2013. – Vol. 66(2). – P. 239–247. – doi: 10.1007/s12013-012-9471-x.
21. Богданова, И.М. Функциональная и фенотипическая характеристика классических (M1) и альтернативно активированных (M2) макрофагов и их роль в течении нормальной и патологической беременности (обзор литературы) / И.М. Богданова, М.Н. Болтовская // *Проблемы репродукции*. – 2019. – Т. 25, № 5. – С. 110-118. – doi: 10.1116/repro201925051110.
22. Biochemistry of glycosphingolipid storage disorders: implications for therapeutic intervention / J.M. Aerts, C. Hollak, R. Boot, A. Groener // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* – 2003. – Vol. 358. – P. 905.
23. Michelakakis, H. The expanding spectrum of disorders with elevated plasma chitotriosidase activity: an update / H. Michelakakis, E. Dimitriou, I. Labadaridis // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2004. – Vol. 27. – P. 705.
24. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions / K. Schroder, P.J. Hertzog, T. Ravasi, D. Hume // *J Leukoc Biol.* – 2004. – Vol. 75(2). – P. 163-189. – doi: 10.1189/jlb.0603252.
25. Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages / O. Sharif, V.N. Bolshakov, S. Raines [et al.] // *BMC Immunol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 1. – doi: 10.1186/1471-2172-8-1.
26. TLR- and NOD2-dependent regulation of human phagocyte-specific chitotriosidase / M. van Eijk, S.S. Scheij, C.P. van Roomen [et al.] // *FEBS Lett.* – 2007. – Vol. 581(28). – P. 5389-5395. – doi: 10.1016/j.febslet.2007.10.039.
27. Piwowar, A. Concentration of leukocyte elastase in plasma and polymorphonuclear neutrophil extracts in type 2 diabetes / A. Piwowar, M. Knapik-

Kordecka, M. Warwas // *Clin Chem Lab Med.* – 2000. – Vol. 38(12). – P. 1257-1261. – doi: 10.1515/CCLM.2000.198.

28. Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man / R.G. Boot, A.P. Bussink, M. Verhoek [et al.] // *J Histochem Cytochem.* – 2005. – Vol. 53(10). – P. 1283-1292. – doi: 10.1369/jhc.4A6547.2005.

29. Chitotriosidase activity in plasma and mononuclear and polymorphonuclear leukocyte populations / L. Bouzas, J. Carlos Guinarte, J. Carlos Tutor // *J Clin Lab Anal.* – 2003. – Vol. 17(6). – P. 271-275. – doi: 10.1002/jcla.10108.

30. Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase / G.H. Renkema, R.G. Boot, A. Strijland [et al.] // *Eur J Biochem.* – 1997. – Vol. 244(2). – P. 279-285. – doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00279.x.

31. Blood and sputum biomarkers in COPD and asthma: a review / G. Paone, V. Leone, V. Conti [et al.] // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2016. – Vol. 20(4). – P. 698-708.

32. Chitotriosidase Activity in Plasma and COPD Exacerbations / M. Harlander, D. Lestan, M. Turel [et al.] // *Springer Nature Lung.* – 2020. – Vol. 198(2). – P. 299-306. – doi: 10.1007/s00408-020-00331-8.

33. Lung Chitinolytic Activity and Chitotriosidase Are Elevated in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Contribute to Lung Inflammation / S. Letuve, A. Kozhich, A. Humbles [et al.] // *The American Journal of Pathology.* – 2010. – Vol. 176(2). – P. 638-649. – doi: 10.2353/ajpath.2010.090455.

34. Smoking-Dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease / R. Shaykhiev, A. Krause, J. Salit [et al.] // *J Immunol.* – 2009. – Vol. 183(4). – P. 2867-2883. – doi: 10.4049/jimmunol.0900473.

35. Serum chitotriosidase levels in patients with allergic and non-allergic asthma / E. Bargagli, C. Olivieri, M. Margollicci [et al.] // *Respiration.* – 2010. – Vol. 79(5). – P. 437-438. – doi: 10.1159/000277664.

36. Chitotriosidase is the primary active chitinase in the human lung and is modulated by genotype and smoking habit / M.A. Seibold, S. Donnelly, M. Solon [et al.] // *J Allergy Clin Immunol.* – 2008. – Vol. 122(5). – P. 944-950. – doi: 10.1016/j.jaci.2008.08.023.
37. Costabel, U. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis / U. Costabel, G.W. Hunninghake // *The European Respiratory Journal.* – 1999. – Vol. 14(4). – P. 735-737. – doi: 10.1034/j.1399-3003.1999.14d02.x.
38. Chitotriosidase: a biomarker of activity and severity in patients with sarcoidosis / D. Bennett, P. Cameli, N. Lanzarone [et al.] // *Respir Res.* – 2020. – Vol. 21. – Vol. 21(1). – P. 6. – doi: 10.1186/s12931-019-1263-z.
39. Verifying Sarcoidosis Activity: Chitotriosidase versus ACE in Sarcoidosis – a Case-control Study / S. Popević, Z. Šumarac, D. Jovanović [et al.] // *J Med Biochem.* – 2016. – Vol. 35(4). – P. 390-400. – doi: 10.1515/jomb-2016-0017.
40. Chitotriosidase Activity in the Serum of Patients with Sarcoidosis and Pulmonary Tuberculosis / E. Bargagli, M. Margollicci, N. Nikiforakis [et al.] // *Respiration.* – 2007. – Vol. 74. – P. 548-552. – doi: 10.1159/000100555.
41. Serum chitotriosidase activity is increased in subjects with atherosclerosis disease / M. Artieda, A. Cenarro, A. Gañán [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2003. – Vol. 23(9). – P. 1645-1652. – doi: 10.1161/01.ATV.0000089329.09061.07.
42. Risk factors for coronary heart disease and acute-phase proteins. A population-based study / J. Danesh, J. Muir, Y.K. Wong [et al.] // *Eur Heart J.* – 1999. – Vol. 20(13). – P. 954-959. – doi: 10.1053/ehj.1998.1309.
43. Serum Chitotriosidase Activity in Patients with Coronary Artery Disease / B. Karadag, M. Kucur, F.K. Isman [et al.] // *Circ J.* – 2008. – Vol. 72. – P. 71-75. – doi: 10.1253/circj.72.71.
44. Expression of Chitotriosidase in Macrophages Modulates Atherosclerotic Plaque Formation in Hyperlipidemic Mice / J. Yap, S. McCurdy, M. Alcala [et al.] // *Front Physiol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 714. – doi: 10.3389/fphys.2020.00714.

45. Increased chitotriosidase activity in plasma of patients with type 2 diabetes / E. Żurawska-Płaksej, M. Knapik-Kordecka, A. Rorbach-Dolata, A. Piwowar // Arch Med Sci. – 2016. – Vol. 12(5). – P. 977-984. – doi: 10.5114/aoms.2016.60093.
46. Evaluation of Circulating Chitotriosidase Activity in Children with Obesity / I. Taranu, M. Iancu, C. Lazea, C. Alkhzouz [et al.] // J. Clin. Med. – 2022. – Vol. 11. – P. 3634. – doi: 10.3390/jcm11133634.
47. Association of chitotriosidase activity and metabolic disturbances in relation to oxidative stress in obesity / R. Kumar, L.P. Nandhini, N. Kamalakkannan [et al.] // Free Radic Biol Med. – 2013. – Vol. 65. – P. 1443-1449.
48. Artemniak-Wojtowicz, D. Obesity and chronic inflammation crosslinking / D. Artemniak-Wojtowicz, A.M. Kucharska, B. Pyrzak // Central European Journal of Immunology. – 2020. – Vol. 45(4). – P. 461-468. – doi: 10.5114/ceji.2020.103418.
49. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue / S.P. Weisberg, D. McCann, M. Desai [et al.] // J Clin Invest. – 2003. – Vol. 112(12). – P. 1796-1808. – doi: 10.1172/JCI19246.
50. Evaluation of chitotriosidase as a biomarker for adipose tissue inflammation in overweight individuals and type 2 diabetic patients / R. Tans, J.A. van Diepen, S. Bijlsma [et al.] // Int J Obes. – 2019. – Vol. 43. – P. 1712-1723. – doi: 10.1038/s41366-018-0225-8.
51. Patel, P.S. The role of the immune system in obesity and insulin resistance / P.S. Patel, E.D. Buras, A. Balasubramanyam // J Obes. – 2013. – Vol. 2013. – P. 616. – doi: 10.1155/2013/616193.
52. Chitotriosidase activity predicts endothelial dysfunction in type-2 diabetes mellitus / A. Sonmez, C. Haymana, S. Tapan [et al.] // Endocr. – 2010. – Vol. 37. – P. 455-459. – doi: 10.1007/s12020-010-9334-4.
53. Nguyen-Lefebvre, AT. Kupffer Cell Metabolism and Function / A.T. Nguyen-Lefebvre, A. Horuzsko // J Enzymol Metab. – 2015. – Vol. 1(1). – P. 101.

54. Potential role of chitotriosidase gene in nonalcoholic fatty liver disease evolution / L. Malaguarnera, M. Di Rosa, A.M. Zambito [et al.] // *Am J Gastroenterol.* – 2006. – Vol. 101(9). – P. 2060-2069. – doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00680.x.
55. Thomson, A.W. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment / A.W. Thomson, P.A. Knolle // *Nat Rev Immunol.* – 2010. – Vol. 10(11). – P. 753-766. – doi: 10.1038/nri2858.
56. Chiang, D.J. Obesity, diabetes mellitus, and liver fibrosis / D.J. Chiang, M.T. Pritchard, L.E. Nagy // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2011. – Vol. 300(5). – P. G697-G702. – doi: 10.1152/ajpgi.00426.2010.
57. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis / C.A. Rivera, P. Adegboyega, N. van Rooijen [et al.] // *J Hepatol.* – 2007. – Vol. 47(4). – P. 571-579. – doi: 10.1016/j.jhep.2007.04.019.
58. Регуляторное влияние мезенхимальных стромальных клеток на развитие фиброза печени: клеточно-молекулярные механизмы и перспективы клинического применения / О.В. Паюшина, Д.А. Цомартова, Е.В. Черешнева [и др.] // *Журнал общей биологии.* – 2020. – Т. 81, № 2. – С. 83-95. – doi: 10.31857/S0044459620020062.
59. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C / The French METAVIR Cooperative Study Group // *Hepatology.* – 1994. – Vol. 20. – P. 15-20.
60. Chitotriosidase Activity in Different Stages of Hepatitis C. It may a Possible Tumor Marker for Hepatocellular Carcinoma / E. Altintas, S. Yaras, B. Cimen [et al.] // *Journal of Cancer Treatment and Research.* – 2014. – Vol. 2(1). – P. 5-8. – doi: 10.11648/j.jctr.20140201.12.
61. Chitotriosidase in neonates with fungal and bacterial infections / I. Labadaridis, E. Dimitriou, M. Theodorakis [et al.] // *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition.* – 2005. – Vol. 90(6). – P. F531-F532. – doi: 10.1136/adc.2004.051284.

62. Elmonem, M.A. Immunomodulatory Effects of Chitotriosidase Enzyme / M.A. Elmonem, L.P. van den Heuvel, E.N. Levtchenko // *Enzyme Res.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 2682. – doi: 10.1155/2016/2682680.
63. A polymorphism in the chitotriosidase gene associated with risk of mycetoma due to *Madurella mycetomatis* mycetoma – a retrospective study / P.E. Verwer, C.C. Notenboom, K. Eadie [et al.] // *PLOS Neglected Tropical Diseases.* – 2015. – Vol. 9(9). – P. e0004061. – doi: 10.1371/journal.pntd.0004061.
64. A 24-bp duplication in exon 10 of human chitotriosidase gene from the sub-Saharan to the Mediterranean area: role of parasitic diseases and environmental conditions / L. Malaguarnera, J. Simporè, D.A. Prodi [et al.] // *Genes and Immunity.* – 2003. – Vol. 4(8). – P. 570-574. – doi: 10.1038/sj.gene.6364025.
65. Инсерционно-делеционный полиморфизм в гене хитотриозидазы (CHIT1) в четырех этно-территориальных группах России / С.В. Макаров, М.К. Карапетян, Н.В. Балинова [и др] // *Вестник Московского университета. Серия XXIII. Антропология.* – 2014. – № 2. – С. 38-45.
66. Plasma chitotriosidase activity in acute *Plasmodium falciparum* malaria / R. Barone, J. Simporè, L. Malaguarnera [et al.] // *J Trop Pediatr.* – 2003. – Vol. 49(1). – P. 63-64. – doi: 10.1093/tropej/49.1.63.
67. Synchronic Macrophage Response and *Plasmodium falciparum* Malaria / M. Musumeci, J. Simporè, R. Barone [et al.] // *Pakistan Journal of Biological Sciences.* – 2005. – Vol. 8. – P. 954-958. – doi: 10.3923/pjbs.2005.954.958.
68. Биличенко, Т.Н. Факторы риска, иммунологические механизмы и биологические маркеры тяжелого течения COVID-19 (обзор исследований) / Т.Н. Биличенко // *PMЖ. Медицинское обозрение.* – 2021. – Т. 5, № 5. – С. 237-244. – doi: 10.32364/2587-6821-2021-5-5-237-244.
69. Факторы риска тяжелого течения и летального исхода COVID-19 / С.Г. Щербак, Т.Л. Камилова, А.С. Голота, Д.А. Вологжакин // *Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация.* – 2022. – № 40. – С. 14-36. – doi: 10.36425/rehab104997.



70. Reduction of lymphocyte count at early stage elevates severity and death risk of COVID-19 patients: a hospital-based case-cohort study / J. Fei, L. Fu, Y. Li [et al.] // *Arch Med Sci.* – 2020. – Vol. 19(5). – P. 1303-1313. – doi: 10.5114/aoms.2020.99006.
71. Predictive Values of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio on Disease Severity and Mortality in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis / X. Li, C. Liu, Z. Mao, M. Xiao [et al.] // *Crit Care.* – 2020. – Vol. 24(1). – P. 647. – doi: 10.1186/s13054-020-03374-8.
72. Neutrophil-to-Lymphocyte and Platelet-to-Lymphocyte Ratios in COVID-19 Patients and Control Group and Relationship with Disease Prognosis / M. Eslamijouybari, K. Heydari, I. Maleki [et al.] // *Caspian J Intern Med.* – 2020. – Vol. 11(Suppl 1). – P. 531-535. – doi: 10.22088/cjim.11.0.531.
73. Eosinopenia as Predictor of Poor Outcome in Hospitalized COVID-19 Adult Patients from Waves 1 and 2 of 2020 Pandemic / R. Cauchois, L. Pietri, J.B. Dalmas [et al.] // *Microorganisms.* – 2022. – Vol. 10(12). – P. 2423. – doi: 10.3390/microorganisms10122423.
74. Биомаркеры клинической и рентгенологической тяжести новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, и их ассоциация с тяжелым вариантом ее течения / М.А. Карнаушкина, С.В. Тополянская, Е.В. Антонова [и др.] // *Бюллетень сибирской медицины.* – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 50-58. – doi: 10.20538/1682-0363-2021-1-50-58.
75. Kernan, K.F. Hyperferritinemia and inflammation / K.F. Kernan, J.A. Carcillo // *Int Immunol.* – 2017. – Vol. 29(9). – P. 401-409. – doi: 10.1093/intimm/dxx031.
76. Роль ферритина в оценке тяжести COVID-19 / Ю.С. Полушин, И.В. Шлык, Е.Г. Гаврилова [и др.] // *Вестник анестезиологии и реаниматологии* – 2021. – Т. 18, № 4. – С. 20-28. – doi: 10.21292/2078-5658-2021-18-4-20-28.
77. Ferritin in the coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis / L. Cheng, H. Li, L. Li [et al.] // *J Clin Lab Anal.* – 2020. – Vol. 34. – P. e23618. – doi: 10.1002/jcla.23618.

78. Early predictors of severity and mortality in COVID-19 hospitalized patients / S. Mustafić, E. Jusufović, F. Hukić [et al.] // *Med Glas (Zenica)*. – 2021. – Vol. 18(2). – P. 384-393. – doi: 10.17392/1349-21.
79. COVID-19: immunopathology, pathophysiological mechanisms, and treatment options / L.E. van Eijk, M. Binkhorst, A.R. Bourgonje [et al.] // *J Pathol*. – 2021. – Vol. 254(4). – P. 307-331. – doi: 10.1002/path.5642.
80. Yang, M. Thrombocytopenia in patients with severe acute respiratory syndrome (review) / M. Yang, M.H. Ng, C.K. Li // *Hematology*. – 2005. – Vol. 10(2). – P. 101-105. – doi: 10.1080/10245330400026170.
81. Lippi, G. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis / G. Lippi, M. Plebani, B.M. Henry // *Clin Chim Acta*. – 2020. – Vol. 506. – P. 145-148. – doi: 10.1016/j.cca.2020.03.022.
82. Новая коронавирусная инфекция COVID-19: клиническая и прогностическая значимость оценки фибриногена плазмы / А.Ю. Буланов, И.Б. Симарова, Е.Л. Буланова [и др.] // *Вестник интенсивной терапии им. А. И. Салтанова*. – 2020. – № 4. – С. 42-47. – doi: 10.21320/1818-474X-2020-4-42-47.
83. Облокулов, А.Р. Covid-ассоциированная коагулопатия у пациентов новой коронавирусной инфекции / А.Р. Облокулов, Г.Э. Ниезов, А.Р. Ражабов. // *Central Asian journal of medical and natural sciences*. – 2021. – Vol. 1. – P. 124-130.
84. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19 / M. Levi, J. Thachil, T. Iba, J.H. Levy // *Lancet Haematol*. – 2020. – Vol. 7. – P. e438-e440. – doi: 10.1016/S2352-3026(20)30145-9.
85. Shchelkanovtseva, E. Association of Respiratory System Disease Caused by SARS-CoV-2 Infection with Thrombosis / E. Shchelkanovtseva, O. Mironova // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2021. – Vol. 203. – P. A3022.
86. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19 / F.A. Klok, M.J.H.A. Kruip, N.J.M. van der Meer [et al.] // *Thromb Res*. – 2020. – Vol. 191. – P. 145-147. – doi: 10.1016/j.thromres.2020.04.013.

87. Хрыщанович, В.Я. Профилактика и лечение COVID-19-ассоциированной венозной тромбоемболии / В.Я. Хрыщанович // Кардиология в Беларуси. – 2020. – Т. 12, № 4. – С. 564-577. – doi: 10.34883/PI.2020.12.4.011.
88. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China / W.J. Guan, Z.Y. Ni, Y. Hu [et al.] // N Engl J Med. – 2020. – Vol. 382. – P. 1708-1720. – doi: 10.1056/NEJMoa2002032.
89. Identification of serum prognostic biomarkers of severe COVID-19 using a quantitative proteomic approach / Y. Kimura, Y. Nakai, J. Shin [et al.] // Nature. – 2021. – Vol. 11. – P. 20638. – doi: 10.1038/s41598-021-98253-9.
90. Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study / M. J. Cummings, M. R. Baldwin, D. Abrams [et al.] // Lancet. – 2020. – Vol. 395(10239). – P. 1763-1770. – doi: 10.1016/S0140-6736(20)31189-2.
91. Reed, S.C. CHIP Happens: Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential and Its Relationship to Solid Tumors / S. C. Reed, S. Croessmann, B. H. Park // Clin Cancer Res. – 2023. – Vol. 29(8). – P. 1403-1411. – doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-2598.
92. Age-dependent association of clonal hematopoiesis with COVID-19 mortality in patients over 60 years / M. Del Pozo-Valero, M. Corton, R. López-Rodríguez [et al.] // Geroscience. – 2023. – Vol. 45(1). – P. 543-553. – doi: 10.1007/s11357-022-00666-5.
93. Tian, D. Hepatic complications of COVID-19 and its treatment / D. Tian, Q. Ye // J. Med. Virol. – 2020. – Vol. 92(10). – P. 1818-1824. – doi: 10.1002/jmv.26036
94. Hepatic steatosis as an independent risk factor for severe disease in patients with COVID-19: A computed tomography study / A. Palomar-Lever, G. Barraza, J. Galicia-Alba, [et al.] // JGH Open. – 2020. – Vol. 4(6). – P. 1102-1107. – doi: 10.1002/jgh3.12395.
95. Характеристика паренхимы печени по данным нативной КТ на этапах лечения COVID-19 / А.Ш. Ревишвили, Г.Г. Кармазановский, М.Ю. Шантаревич [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. – 2020. – Т. 25, № 3. – С. 72-87.

96. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Временные методические рекомендации. Версия 9 (29.10.2020) / Министерства здравоохранения РФ. – Москва, 2020. – 165 с.
97. Порядки действий медицинских работников на стационарном этапе оказания помощи в условиях эпидемии COVID-19, разработанные на основе действующих нормативных документов по вопросам противодействия распространению коронавирусной инфекции в Российской Федерации. Версия от 21.05.2020. – Москва, 2020. – 39 с. – URL: <https://nmrc.ru/wp-content/uploads/2022/07/statsionar-2505.pdf>. – Текст : электронный.
98. Лучевая диагностика коронавирусной болезни (COVID-19): организация, методология, интерпретация результатов: методические рекомендации / Сост. С.П. Морозов, Д.Н. Проценко, С.В. Сметанина [и др.]. – М.: ГБУЗ «НПКЦ ДиТ ДЗМ», 2020. – 102 с.
99. Прогнозирование выживаемости госпитализированных пациентов с новой коронавирусной инфекцией: роль определения активности хитотриозидазы в периферической крови / Е.С. Щелкановцева, Г.О. Исаев, О.Ю. Миронова [и др.] // Терапевтический архив. – 2023. – Т. 95, № 7. – С. 543-547. – doi: 10.26442/00403660.2023.07.202280.
100. Определение активности хитотриозидазы для прогнозирования неблагоприятных исходов у госпитализированных пациентов с новой коронавирусной инфекцией / Е.С. Щелкановцева, О.Ю. Миронова, К.А. Соловьев [и др.] // Consilium Medicum. – 2023. – Т. 25, № 3. – С. 163-167. – doi: 10.26442/20751753.2023.3.202093.
101. Активность хитотриозидазы и динамика данных компьютерной томографии у пациентов с COVID-19 / Е.С. Щелкановцева, О.Ю. Миронова, К.А. Соловьев [и др.] // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. – 2023. – Т. 38, № 3. – С. 172-178. – doi: 10.29001/2073-8552-2022-602.

102. Post-COVID syndrome prevalence: a systematic review and meta-analysis / R.S. Abd Razak, A. Ismail, A.F. Abdul Aziz [et al.] // BMC Public Health. – 2024. – Vol. 24. – P. 1785. – doi: 10.1186/s12889-024-16614-6.
103. Aggressive and defensive roles for chitinases / G.W. Gooday // EXS. – 1999. – Vol. 87. – P. 157-169. – doi: 10.1007/978-3-0348-8757-1\_11.
104. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury / C.G. Lee, C.A. Da Silva, C.S.D. Cruz [et al.] // Annual Review of Physiology. – 2011. – Vol. 73. – P. 505-532. – doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142250.
105. Активность хитотриозидазы – фермента активированных макрофагов – при ювенильном ревматоидном артрите / Е.С. Ярыгина, М.К. Соболева, А.В. Богатырева [и др.] // Мать и дитя в Кузбассе. – 2004. – № 3(18). – С. 8-13.
106. Chitotriosidase levels in healthy elderly subjects / I. Kurt, D. Abasli, M. Cihan [et al.] // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2007. – Vol. 1100(1). – P. 185-188.
107. Lack of Association between Serum Chitotriosidase Activity and Arterial Stiffness in Type 2 Diabetes without Cardiovascular Complications / L. D'Onofrio, R. Amendolara, C. Mignogna [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24(21). – P. 15809.
108. Increased YKL-40 and Chitotriosidase in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease / A.J. James, L.E. Reinius, M. Verhoek [et al.] // Am J Respir Crit Care Med. – 2016. – Vol. 193(2). – P. 131-142.
109. The real impact of age on mortality in critically ill COVID-19 patients / A. Bakakos, E. Koukaki, S. Ampelioti [et al.] // Journal of Personalized Medicine. – 2023. – Vol. 13(6). – P. 908.
110. Прогностическое значение рентгенологических и лабораторных биомаркеров для оценки риска неблагоприятного исхода у пациентов с COVID-19 / А.Д. Струтынская, М.А. Карнаушкина, Л.И. Дворецкий [и др.] // Вестник рентгенологии и радиологии. – 2022. – Т. 103, № 4-6. – С. 78-87.

111. Chitotriosidase as a Potential Biomarker of Survival in Covid-19 Patients / E. Schelkanovtseva, G. Isaev, O. Mironova [et al.] // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2022. – Vol. 205. – P. A5754
112. Методы экстракорпоральной гемокоррекции в комплексном лечении новой коронавирусной инфекции: обзор возможностей / А.А. Соколов, Д.В. Соколов, Д.В. Певзнер [и др.] // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 31-40.