

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

АКТИВНОСТЬ АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИНА ПРИ ИНФЕКЦИИ SARS-CoV-2 И В ПОСТКОВИДНОМ ПЕРИОДЕ

О.Е. Акбашева¹, Д.К. Митрофанова¹, Л.В. Спирина^{1,2},
Ю.Г. Самойлова¹, М.В. Матвеева¹, Д.В. Подчиненова¹, О.А. Олейник¹*

¹Сибирский государственный медицинский университет,
634050, Томск, Московский тракт, 2; *эл. почта: dmitrofanova54@gmail.com

²Научно-исследовательский институт онкологии,
Томский национальный исследовательский медицинский центр, 634009, Томск, пер. Кооперативный, 5

Универсальный ингибитор протеиназ α_2 -макроглобулин (α_2 -МГ) обладает противовирусными и иммуномодулирующими свойствами, что делает его важным участником инфекционного процесса. Активность α_2 -МГ при новой коронавирусной инфекции и постковидном синдроме (long COVID) не изучена. Обследовано 85 пациентов с диагнозом внебольничная двусторонняя полисегментарная пневмония на фоне новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2. Для оценки постковидного периода было обследовано 60 человек через 5,0 \pm 3,6 месяцев после перенесённой коронавирусной инфекции. Из них 40 человек имели осложнения, проявляющиеся в виде неврологических, кардиологических, гастроэнтерологических, дерматологических, бронхолёчных симптомов. В контрольную группу были включены 30 практически здоровых лиц с отрицательным результатом ПЦР на РНК SARS-CoV-2 и отсутствием антител к вирусу SARS-CoV-2. Активность α_2 -МГ в сыворотке крови пациентов с коронавирусной инфекцией сильно снижалась, составляя всего 2,5% от физиологического уровня, что сопровождалось увеличением активности α_1 -протеиназного ингибитора, эластазо- и трипсиноподобных протеиназ соответственно в 2,0 раза, 4,4 раза и в 2,6 раза по сравнению с показателями практически здоровых лиц. В постковидном периоде, несмотря на тенденцию к нормализации активности ингибиторов, активность эластазоподобных и особенно трипсиноподобных протеиназ в сыворотке крови оставалась повышенной. У лиц с избыточным весом увеличение активности трипсиноподобных протеиназ было наиболее выражено и коррелировало с увеличением титра антител к вирусу SARS-CoV-2. В постковидном периоде активность α_2 -МГ не только нормализовалась, но и превышала уровень контроля, особенно у лиц с дерматологическими и неврологическими симптомами. При жалобах неврологического характера активность α_2 -МГ была в 1,3 раза, а при дерматологических симптомах — в 2,1 раза выше, чем у лиц, не предъявлявших жалоб. Низкая активность α_2 -МГ в постковидном периоде сохранялась у лиц с избыточной массой тела. Полученные результаты могут быть использованы для мониторинга течения постковидного периода и выявления групп риска развития осложнений.

Ключевые слова: альфа-2-макроглобулин; альфа-1-протеиназный ингибитор; трипсиноподобные протеиназы; эластазоподобные протеиназы; постковидный период

DOI: 10.18097/PBMC20236904240

ВВЕДЕНИЕ

Альфа-2-макроглобулин (α_2 -МГ) — высокомолекулярный гликопротеин, являющийся ингибитором протеолитических ферментов [1]. Он обладает широкой специфичностью, ограничивая активность сериновых, цистеиновых, аспартильных протеиназ и металлопротеиназ.

Протеиназы имеют существенное значение в патогенезе коронавирусной инфекции. Для проникновения в организм вирус использует такие протеиназы человека, как мембранные трипсиноподобные (TMPRSS, ADAM17, фурин), внутриклеточные цистеиновые (катепсины) и внеклеточные сериновые протеиназы (трипсин, эластаза, фактор Хагемана, тромбин и др.) [2]. Протеиназы гидролизуют (праймируют) спайковый белок S, обеспечивая связывание с рецептором (роль которого играет ангиотензин-превращающий фермент 2; ACE2), слияние вируса с мембранами клеток и развитие инфекции [3]. Мутации вируса с появлением новых сайтов для гидролиза дополнительными

ферментами повышают контагиозность вируса [4]. При наличии сопутствующей патологии, связанной с воспалением и активацией нейтрофильной эластазы, протеиназ плазмы крови, повышается восприимчивость к вирусной инфекции с развитием тяжёлой формы COVID-19 [5, 6].

α_2 -МГ принимает участие в защите организма от вирусной, грибковой и бактериальной инфекции, блокируя активность ферментов и препятствуя проникновению патогенов в клетку [1, 7]. Ингибиторный потенциал α_2 -МГ относительно небольшой, но он является необходимым дополнением к функциям α_1 -протеиназного ингибитора (α_1 -ПИ, α_1 -антитрипсин), который обеспечивает 90% ингибиторной активности плазмы крови. И α_1 -ПИ, и α_2 -МГ обладают широким спектром регуляторных свойств, в том числе иммуномодулирующих. При этом, комплексы α_2 -МГ с протеиназами имеют короткий период полувыведения (1-3 мин), в то время как комплексы с α_1 -ПИ выводятся из циркуляции часами и эффекты носят отсроченный характер [8].

Кроме ингибирования протеиназ, α_2 -МГ связывает цитокины IL-6 и IL-18, IL-4 и IL-10, принимает участие в деятельности иммунной системы [8, 9]. α_2 -МГ участвует в презентации антигена и антителообразовании, регулирует реакции неспецифического гуморального иммунитета, связывая гидролазы, лизоцим и пропердин. Взаимодействуя с цитокинами, α_2 -МГ выступает как посредник синтеза оксида азота и NO-индуцированной цитотоксичности макрофагов [7]. Интенсивность иммунного ответа зависит от концентрации α_2 -МГ. При его дефиците наблюдается явление ареактивности, а при избытке — супрессия за счёт блокирования главного комплекса гистосовместимости [10]. Важна роль α_2 -МГ в гемостазе как ингибитора тромбина [11]. Определение комплекса α_2 -МГ с тромбином можно использовать для оценки тромбинемии.

Противовирусные и иммунорегуляторные свойства α_2 -МГ делают его, как и α_1 -ПИ, важным фактором в патогенезе коронавирусной инфекции, связанной с гипервоспалением, цитокиновым штормом, тромбофилией, тромбозом и её осложнениями. Изучение активности α_2 -МГ при инфекции SARS-CoV-2 и в постковидном периоде имеет как теоретическое, так и практическое значение. Мета-анализ (n=50) показал повсеместную распространённость осложнений после COVID-19. Последствия постковидного синдрома для здоровья, по-видимому, являются достаточно длительными [12], что определяет важность изучения диагностических и прогностических параметров, в том числе баланса активности ингибиторов и протеиназ.

Цель исследования заключалась в определении активности α_2 -МГ, α_1 -ПИ, а также трипсино- и эластазоподобных протеиназ при COVID-19 и в постковидном периоде (long COVID).

МЕТОДИКА

Было обследовано 85 пациентов (46 женщин и 39 мужчин) в возрасте $46 \pm 8,5$ лет с диагнозом внебольничная двусторонняя полисегментарная пневмония на фоне новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, госпитализированных в Медико-санитарную часть №2 г. Томска в период с 16 марта по 5 июня 2021 г. Пневмония нетяжёлой степени была у 69,9%, средне-тяжёлой — 3,6% и тяжёлой — 26,5% пациентов. Диагностику и лечение больных проводили согласно временным методическим

рекомендациям по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (COVID-19) Минздрава РФ. РНК SARS-CoV-2 выявляли с применением методов амплификации нуклеиновых кислот в мазках из носоглотки. Тяжесть острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) оценивали по соотношению парциального давления артериального кислорода к фракции вдыхаемого кислорода (P_{aO_2}/F_{iO_2}). У 47% пациентов был выявлен ОРДС (p_{O_2} меньше 95%), а также дыхательная недостаточность (ДН) различной степени тяжести. Сопутствующими заболеваниями были артериальная гипертензия, сахарный диабет 2 типа, ожирение. Назначение глюкокортикоидов потребовалось 18% больных (табл. 1). Смертность пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, составила 9,4% (8 человек).

Для оценки развития осложнений COVID-19 было обследовано 60 человек (47 женщин и 13 мужчин) через $5,0 \pm 3,6$ месяцев после перенесённой коронавирусной инфекции. Следует отметить, что 62,5% лиц были вакцинированы. У всех обследованных измеряли индекс массы тела (ИМТ) как отношение веса (кг) к росту (м). Согласно международной классификации, избыток массы тела верифицируется при ИМТ в пределах 25,0-29,9, ожирение — при ИМТ $\geq 30,0$ (ВОЗ, 1997). Повышенный индекс массы тела был выявлен почти у 50% обследованных. У 40 человек (66,7%) в возрасте $36,8 \pm 6,7$ лет в постковидный период выявлены осложнения в виде неврологических, дерматологических, гастроэнтерологических, кардиологических и бронхолёгочных симптомов (табл. 2).

Все первичные данные по пациентам и контрольной группе приведены в дополнительных материалах.

В контрольную группу были включены 30 практически здоровых лиц (18 женщин и 12 мужчин) в возрасте $56,8 \pm 6,7$ лет. У данных лиц был отрицательный результат ПЦР на РНК SARS-CoV-2, а также в сыворотке крови отсутствовали антитела к вирусу SARS-CoV-2.

Определение активности ингибиторов протеиназ в сыворотке крови

Активность α_2 -МГ определяли по сохраняющейся аргинин-эстеразной активности комплекса трипсин- α_2 -МГ [13]. Для этого к 1,8 мл 0,05 М трис-HCl

Таблица 1. Клинико-anamnestическая характеристика пациентов, инфицированных SARS-CoV-2

Критерий		Наличие критерия, количество пациентов (%)	Отсутствие критерия, количество пациентов (%)
Острый респираторный дистресс-синдром		40 (47,0%)	45 (53,0%)
Артериальная гипертензия		51 (60,0%)	34 (40,0%)
Сахарный диабет 2 типа		14 (16,5%)	71 (83,5%)
Ожирение		6 (7,1%)	79 (92,9%)
Дыхательная недостаточность	I степень	18 (21,2 %)	49 (57,6%)
	II степень	8 (9,4%)	
	III степень	10 (11,8%)	
Применение глюкокортикоидов (дексаметазон в/в струйно)		16 (18,8%)	69 (81,2%)

α_2 -МАКРОГЛОБУЛИН ПРИ ИНФЕКЦИИ SARS-CoV-2

Таблица 2. Процентное соотношение клинических симптомов в постковидном периоде

Симптомы	Проявления	%
Дерматологические	сухость кожи, выпадение волос	90
Гастроэнтерологические	расстройства деятельности желудочно-кишечного тракта, тошнота	55
Неврологические	когнитивные расстройства, головная боль, артралгия, торакалгия, аносмия, агевзия	43
Кардиологические	резкие перепады артериального давления, синдром постуральной ортостатической тахикардии, головокружение	30
Бронхолёгочные	одышка	5

Таблица 3. Активность α_2 -МГ, α_1 -ПИ и протеиназ в острый и постковидный период

Показатель	Контроль n=30	COVID-19 n=85	Long COVID n=60
α_2 -Макроглобулин, ИЕ/мл	2,2 (1,7; 2,5)	0,055* (0,03; 0,09)	3,11*/** (2,0; 3,6)
α_1 -Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	27,3 (20,7; 27,3)	54,8* (34,9; 78,96)	39,9*/** (21,8; 52,3)
Трипсиноподобные протеиназы, нмоль БАЭЭ/мин·мл	45,5 (45,5; 90,3)	200,1* (62,8; 518,7)	335,7*/** (163,9; 531,8)
Эластазоподобные протеиназы, нмоль БАНЭ/мин·мл	93,9 (90,3; 109,6)	245,7* (163,8; 330,3)	125,6** (54,6; 382,2)

Примечание: */** — статистическая значимость отличий по сравнению с контролем и между группами соответственно ($p < 0,05$).

буфера (рН 8,0) добавляли 0,1 мл разведённой в 10 раз сыворотки крови и 0,05 мл 0,1% раствора трипсина ("SAMSON-MED", Россия). После инкубирования в течение 5 мин при 25°C и добавления 0,1 мл 0,3% раствора ингибитора трипсина из сои ("Sigma-Aldrich", США) пробы инкубировали 5 мин и добавляли 1 мл 1,5 мМ раствора N-бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ, "Sigma-Aldrich"). Прирост оптической плотности при длине волны 253 нм измеряли на спектрофотометре ("United Products and Instruments", США). Активность α_1 -ПИ оценивали по торможению гидролиза БАЭЭ трипсином [13]. Готовили две опытные пробы, одна из которых содержала 1,9 мл 0,05 М трис-НСl буфера и 0,1 мл 0,01% раствора трипсина, а вторая — 1,8 мл 0,05 М трис-НСl буфера, 0,1 мл 0,01% раствора трипсина и 0,1 мл разведённой в 50 раз сыворотки крови. После инкубации в течение 5 мин при 25°C и добавления по 1 мл 1,5 мМ раствора БАЭЭ измеряли прирост оптической плотности при длине волны 253 нм. Активность ингибиторов протеиназ выражали в ингибиторных единицах на 1 мл биологической жидкости (ИЕ/мл). 1 ИЕ соответствует количеству ингибитора, которое тормозит расщепление 1 мкмоль БАЭЭ за 1 мин.

Определение активности протеиназ

Активность трипсиноподобных и эластазоподобных протеиназ оценивали по гидролизу, соответственно, БАЭЭ и *n*-нитрофенилового эфира N-бутил-оксикарбонил-L-аланина (БАНЭ, "Sigma-Aldrich") [14]. Для определения активности эластазоподобных протеиназ в кювете спектрофотометра смешивали 0,2 мл разведённой в 10 раз сыворотки и 2,7 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера (рН 6,5).

После добавления 0,1 мл 0,01 М раствора БАНЭ в ацетонитриле измеряли прирост оптической плотности при длине волны 347,5 нм. Активность выражали в нмоль БАНЭ/мин на 1 мл биологического материала. Для измерения активности трипсиноподобных протеиназ к 0,1 мл разведённой в 10 раз сыворотки добавляли 1,9 мл 0,05 М трис-НСl буфера (рН 7,8), 1 мл 1,5 ммоль/л раствора БАЭЭ и измеряли прирост оптической плотности при 253 нм. Активность трипсиноподобных протеиназ выражали в нмоль БАЭЭ/мин на 1 мл биологической жидкости.

Определение содержания антител к SARS-CoV-2

Содержание антител к SARS-CoV-2 определяли с помощью иммуноферментного анализа набором "Вектор Бест" (Россия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием теста Колмогорова-Смирнова, критерия Манна-Уитни, корреляционного анализа Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде медианы и квартилей, Me (Q₂₅; Q₇₅).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активность α_2 -МГ в сыворотке крови больных коронавирусной инфекцией снижалась и составила всего 2,5% от уровня контроля. При этом активность α_1 -ПИ, трипсиноподобных и эластазоподобных протеиназ возрастала соответственно в 2,0 раза, 4,4 раза и в 2,6 раза, по сравнению с контрольной группой (табл. 3). Более высокая активность трипсиноподобных протеиназ наблюдалась у пациентов с ОРДС и составила 546,0 (264,81; 655,20) нмоль БАЭЭ/мин·мл

против 207,5 (117,39; 464,10) нмоль БАЭЭ/мин·мл у лиц без ОРДС. При летальном исходе активность трипсиноподобных протеиназ была максимальна и составила 582,86 (505,05; 750,80) нмоль БАЭЭ/мин·мл.

В постковидном периоде активность α_2 -МГ возрастала и статистически значимо превышала уровень контроля. Активность α_1 -ПИ и эластазоподобная активность хотя и снижались по сравнению с госпитальным периодом, но оставались выше контроля. Обращает на себя внимание тот факт, что активность трипсиноподобных протеиназ в постковидном периоде не только не снижалась, но ещё дополнительно возрастала, превышая в 1,7 раз показания при острой фазе инфекции и в 7,4 раза — контроль (табл. 3).

В целом, при COVID-19 развивается дисбаланс ингибиторов протеиназ, проявляющийся в снижении активности α_2 -МГ и увеличении активности α_1 -ПИ на фоне возрастания активности эластазоподобных и, особенно, трипсиноподобных протеиназ. В постковидном периоде, несмотря на нормализацию уровня активности ингибиторов протеиназ, сохраняется повышенная активность трипсиноподобных протеиназ.

Для оценки системы «протеиназы-ингибиторы» были рассчитаны ингибиторные коэффициенты отношения активности протеиназ к их ингибиторам. Повышение коэффициента свидетельствует о снижении ингибиторной активности на фоне высокой активности протеиназ и рассматривается как нарушение контроля протеиназ крови.

α_2 -МГ способен контролировать активность эластазоподобных протеиназ: коэффициент в острую фазу инфекции повышался в 105 раз, а в постковидный период снижался и не отличался от уровня контроля. Однако по отношению к трипсиноподобным протеиназам контроль со стороны α_2 -МГ нарушался: коэффициент возрастал в 193 раза, а в постковидном периоде оставался выше контроля в 5 раз. Аналогичная динамика выявлена и для α_1 -ПИ, который контролировал активность эластазоподобных протеиназ, и не смог урегулировать повышение активности трипсиноподобных протеиназ (табл. 4).

Дисбаланс активности ингибиторов может лежать в основе неконтролируемого протеолиза и повреждения органов и тканей. В связи с этим на следующем этапе была проанализирована активность α_2 -МГ в зависимости от клинических проявлений постковидного периода. Установлено, что у лиц с неврологическими и дерматологическими симптомами наблюдается более высокая активность α_2 -МГ (табл. 5). Активность протеиназ не зависела от наличия/отсутствия клинических симптомов, за исключением трипсиноподобной активности, которая была увеличена при одышке и составила 896,0 (867,20; 924,80) нмоль БАЭЭ/мин·мл.

Для течения коронавирусной инфекции и постковидного синдрома существенное значение имеет коморбидная патология. Активность ингибиторов и протеиназ была проанализирована в зависимости от наличия избыточной массы тела и ожирения, которые были выявлены у 50% обследованных.

Таблица 4. Ингибиторные коэффициенты и коэффициенты корреляции ($r_{x,y}$) между протеиназами и ингибиторами

Коэффициент	Контроль	COVID-19	Long COVID
Эластазоподобные протеиназы / α_2 -макроглобулин	42,70 $r_{x,y} = 0,172$	4500 $r_{x,y} = -0,215$	40,40 $r_{x,y} = 0,689$
Трипсиноподобные протеиназы / α_2 -макроглобулин	20,70 $r_{x,y} = -0,039$	4002 $r_{x,y} = -0,156$	107,90 $r_{x,y} = 0,076$
Эластазоподобные протеиназы / α_1 -протеиназный ингибитор	3,40 $r_{x,y} = 0,066$	4,50 $r_{x,y} = -0,013$	3,15 $r_{x,y} = -0,605^*$
Трипсиноподобные протеиназы / α_1 -протеиназный ингибитор	1,67 $r_{x,y} = 0,163$	3,65 $r_{x,y} = -0,422^*$	8,41 $r_{x,y} = -0,143$

Таблица 5. Активность α_2 -МГ (ИЕ/мл) с различной симптоматикой в постковидный период

Симптомы	отсутствуют	присутствуют
Неврологические	n=23 2,72 (2,02; 3,18)	n=17 3,66 (3,31; 4,05)*
Кардиологические	n=28 2,91 (2,07; 3,645)	n=12 3,52 (3,15; 3,72)
Бронхолёгочные	n=38 3,14 (2,12; 3,70)	n=2 3,745 (3,57; 3,92)
Дерматологические	n=4 1,77 (1,485; 2,21)	n=36 3,275 (2,54; 3,76)*
Гастроэнтерологические	n=18 3,24 (2,09; 3,93)	n=22 3,19 (2,38; 3,70)

Примечание: * — статистическая значимость отличий между группами ($p < 0,05$).

Таблица 6. Активность протеиназ и их ингибиторов в зависимости от индекса массы тела

Показатель	ИМТ<25 n=31	ИМТ>25 n=29
α_2 -МГ, ИЕ/мл	3,275 (2,82; 3,68)	2,540 (1,77; 3,52)*
α_1 -ПИ, ИЕ/мл	44,10 (32,30; 54,80)	29,75 (20,83; 49,24)
Эластазоподобная активность, нмоль БАНЭ/мин·мл	363,09 (72,35; 578,76)	109,20 (54,60; 327,60)
Трипсиноподобная активность, нмоль БАЭЭ/мин·мл	300,30 (136,50; 374,01)	382,20 (303,70; 683,20)*

Примечание: * — статистическая значимость отличий между группами ($p<0,05$).

У лиц с ИМТ>25 наблюдается снижение активности α_2 -МГ на фоне возрастания активности трипсиноподобных протеиназ (табл. 6).

Корреляционный анализ выявил обратную зависимость активности α_2 -МГ от ИМТ. Сила связи увеличивается при наличии клинических проявлений (коэффициент корреляции составил -0,421, $p<0,05$). Напротив, активность трипсиноподобных протеиназ зависела от ИМТ прямо пропорционально: коэффициент корреляции составил 0,372 ($p<0,05$). Также обнаружена положительная связь активности трипсиноподобных протеиназ с содержанием антител к SARS-CoV-2 с коэффициентом корреляции 0,518. Следует отметить, что концентрация антител была выше у лиц с жалобами, по сравнению с обследованными, у которых постковидный период протекал бессимптомно, и составила соответственно 838,0 (631,4; 856,7) BAU/мл против 643,5 (468,3; 838,9) BAU/мл.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что α_2 -МГ и α_1 -ПИ играют важную роль в защите организма от избыточной активации протеолиза [8]. α_2 -МГ ингибирует активность основных протеаз, высвобождаемых из стимулированных нейтрофилов человека, в частности, нейтрофильной эластазы [9].

Чрезмерный приток и активация нейтрофилов в лёгких во время COVID-19 приводит к формированию нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET), высвобождению протеиназ нейтрофилов, которые, как известно, участвуют в повреждении тканей и способствуют распространению инфекции [15]. Кроме α_2 -МГ, протеолитическая активность нейтрофильной эластазы регулируется α_1 -ПИ, выполняющим защитную роль против COVID-19. Известно, что мутация в гене α_1 -ПИ SERPINA-1 способствует более тяжёлому течению коронавирусной инфекции. Например, высокую смертность от COVID-19 в Италии, в Ломбардии связывают с высокой частотой дефицитного аллеля α_1 -ПИ у лиц, проживающих на этой территории [16].

В проведённом исследовании увеличение активности α_1 -ПИ сопровождалось снижением ингибиторной активности α_2 -МГ в плазме крови, что согласуется с данными литературы о реципрокном характере изменения этих ингибиторов при патологических процессах [1, 7]. Как известно, α_2 -МГ является отрицательно реагирующим “белком

острой фазы” [10]. Широкий спектр ингибиторной активности α_2 -МГ обусловлен его необычным механизмом действия, суть которого заключается в создании тетрамерной “клетки-ловушки” вокруг активных протеаз, ограничивающей их взаимодействие с высокомолекулярными субстратами с сохранением возможности гидролизовать низкомолекулярные субстраты [9]. В отличие от α_1 -ПИ, который полностью ингибирует активность протеиназ, α_2 -МГ частично сохраняет их литическую активность. В структуре α_2 -МГ есть рецептор-связывающие домены (RBDs, receptor binding domains), с помощью которых он взаимодействует с рецепторами клеточной поверхности. В нативном α_2 -МГ эти домены скрыты, но при связывании ингибитора с протеиназами RBD выходят на поверхность комплекса α_2 -МГ-протеиназа и способствуют его поглощению клетками через LRP-1 (low-density lipoprotein receptor-related protein-1; белок 1, родственник рецептору липопротеинов низкой плотности) [9, 10]. В нашем случае снижение активности α_2 -МГ может быть связано с усиленным выведением протеиназ из кровотока и снижением пула нативного α_2 -МГ в циркуляции.

Ограничение биосинтеза α_2 -МГ при хроническом воспалении может способствовать санации поражённых тканей посредством протеолиза [17]. Однако в условиях гиперпротеолиза, характерного для коронавирусной инфекции, чрезмерная активность протеиназ оказывает в большей степени повреждающее действие, чем защитное. Так, активность эластазо- и трипсиноподобных протеиназ в острый период инфекции возрастала в 2-4 раза (табл. 3). Возрастание активности трипсиноподобных протеиназ отражает явления гиперпротеолиза плазмы крови с активацией тромбина, плазмина, ренина, калликреина, компонентов системы интегративного и может рассматриваться как интегративный показатель риска развития сердечно-сосудистых событий, тромбофилии или гемофилии [6].

В постковидном периоде происходит нормализация уровня ингибиторов: увеличение активности α_2 -МГ и снижение α_1 -ПИ, по сравнению с острым периодом. Однако по сравнению с контролем уровень активности ингибиторов протеиназ оставался высоким (табл. 3), что сопровождалось дополнительным увеличением активности трипсиноподобных протеиназ. Ингибиторные коэффициенты отношения трипсиноподобных протеиназ к α_2 -МГ и α_1 -ПИ в постковидном периоде оставались высокими по сравнению с практически здоровыми лицами (табл. 4). С учётом того, что активность ферментов

в постковидном периоде остаётся высокой, это может рассматриваться как неблагоприятный фактор. Высокая активность эластазоподобных протеиназ (в том числе нейтрофильной) также может свидетельствовать о наличии воспалительного процесса [5].

С учётом того, что активность ферментов в постковидном периоде остаётся высокой, уровень активности α_2 -МГ может рассматриваться как показатель, свидетельствующий о наличии воспалительных, в том числе аутоиммунных процессов, поражающих кожу и нервную систему, что сопровождается появлением дерматологических и неврологических симптомов (табл. 5). Ранее установлено, что SARS-CoV-2 провоцирует развитие аутоиммунных заболеваний. Нарушения активности α_2 -МГ могут быть как следствием, так и одной из причин развития аутоиммунных реакций у некоторых больных.

Известно, что α_2 -МГ выполняет функции нейромодулятора, связывая нейропептиды, основной белок миелина и пептиды амилоида [17]. Существенное значение в развитии нейродегенеративных заболеваний имеет способность α_2 -МГ связывать цинк [18], накопление которого при нейродегенеративных процессах общепризнано [17]. При этом, гиперовоспаление может приводить к повреждению молекул α_2 -МГ, нарушению их функциональной активности и сродства к рецепторам, а также к синтезу аутоантител к данному белку [1].

Известно, что активность ингибиторов α_2 -МГ и α_1 -ПИ может изменяться при ожирении. В нашем исследовании показана обратная зависимость активности α_2 -МГ от ИМТ, что согласуется с данными литературы [19]. В отличие от α_2 -МГ, активность α_1 -ПИ снижается, вероятно, за счёт повышения содержания лептина и развития лептинорезистентности у пациентов с ожирением [20].

При избыточной массе тела обнаружена высокая активность трипсиноподобных протеиназ и снижение активности α_2 -МГ (табл. 6), что может быть связано с увеличением протеолиза при неспецифической реакции воспаления. Предполагается, что у людей с избыточным весом наблюдается более высокий уровень воспаления за счёт повышенного синтеза провоспалительных цитокинов в жировой ткани [21]. В постковидном периоде обнаружена положительная связь активности трипсиноподобных протеиназ с антителами к SARS-CoV-2, концентрация последних была более высокой при наличии осложнений. Вероятно, высокий уровень антител и повышенная активность трипсиноподобных протеиназ являются следствием интенсивности иммунологического процесса и воспаления во время острого периода коронавирусной инфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При коронавирусной инфекции наблюдаются реципрокные изменения активности α_2 -МГ и α_1 -ПИ на фоне возрастания активности эластазо- и трипсиноподобных протеиназ. В постковидный период,

несмотря на нормализацию уровня ингибиторов, активность эластазоподобных и особенно трипсиноподобных протеиназ остаётся повышенной. У лиц с избыточной массой тела выявлено снижение активности α_2 -МГ и увеличение активности трипсиноподобных протеиназ пропорционально возрастанию уровня антител к SARS-CoV-2. Высокая активность α_2 -МГ в постковидном периоде сопровождается появлением неврологических и дерматологических симптомов. Полученные результаты могут быть использованы для мониторинга течения постковидного периода и выявления групп риска развития осложнений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Сибирского государственного медицинского университета.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все обследованные, включённые в исследование, подписали информированное согласие на участие в нём. Исследование было одобрено Этическим комитетом при Сибирском государственном медицинском университете (протокол № 8785 от 21.09.2021 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. Зорина В.Н., Трофименко Н.А., Архипова С.В., Зорина Р.М., Зорин Н.А. (2005) Комплексы альфа-2-макроглобулина с антителами класса IgG, плазмином и их взаимосвязь с другими факторами гуморального иммунитета при развитии ревматоидного артрита. Медицинская иммунология, 7(5-6), 557-562. [Zorina V.N., Trofimenko N.A., Arkhipova S.V., Zorina R.M., Zorin N.A. (2005) Alpha-2-macroglobulin complexes with IgG class antibodies, plasmin and their relationship with other humoral immunity factors in the development of rheumatoid arthritis. Medical Immunology, 7(5-6), 557-562.] DOI: 10.15789/1563-0625-2005-5-6-557-562
2. Luan B., Huynh T., Cheng X., Lan G., Wang H.R. (2020) Targeting proteases for treating COVID-19. J. Proteome Res., 19(11), 4316-4326. DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c00430
3. Majchrzak M., Poreba M. (2022) The roles of cellular protease interactions in viral infections and programmed cell death: A lesson learned from the SARS-CoV-2 outbreak and COVID-19 pandemic. Pharmacological Reports, 74(6), 1149-1165. DOI: 10.1007/s43440-022-00394-9
4. Sinha S., Tam B., Wang S.M. (2021) RBD double mutations of SARS-CoV-2 strains increase transmissibility through enhanced interaction between RBD and ACE2 receptor. Viruses, 14(1), 1. DOI: 10.3390/v14010001

5. Karampoor S., Hesamizadeh K., Maleki F., Farahmand M., Zahednasab H., Mirzaei R., Banoun, H., Zamani F., Hajibaba M., Tabibzadeh A., Bouzari B., Bastani M.N., Laali A., Keyvani H. (2021) A possible pathogenic correlation between neutrophil elastase (NE) enzyme and inflammation in the pathogenesis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Int. Immunopharmacol.*, **100**, 108137. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.108137
6. Kim Y., Jang G., Lee D., Kim N., Seon J.W., Kim Y.H., Lee C. (2022) Trypsin enhances SARS-CoV-2 infection by facilitating viral entry. *Arch. Virology*, **167**(2), 441-458. DOI: 10.1007/s00705-021-05343-0
7. Дубровин С.М., Муромцева А.В., Новикова Л.И. (2000) α_2 -Макроглобулин: современное состояние вопроса. Клиническая лабораторная диагностика, 6, 3-7. [Dubrovina S.M., Muromtseva A.V., Novikova L.I. (2000) α_2 -macroglobulin: The current state of the issue. *Clinical Laboratory Diagnostics*, 6, 3-7.]
8. Костинов М.П., Зорин Н.А., Кажарова С.В., Зорина В.Н. (2020) Сравнительный эффект влияния иммуномодуляторов на концентрации ингибиторов гидролаз и лактоферрина при внебольничных пневмониях у взрослых. Медицинская иммунология, **22**(4), 791-798. [Kostinov M.P., Zorin N.A., Kazharova S.V., Zorina V.N. (2020) Comparative effect of the influence of immunomodulators on the concentrations of hydrolase and lactoferrin inhibitors in community-acquired pneumonia in adults. *Medical Immunology*, **22**(4), 791-798.] DOI: 10.15789/1563-0625-CEO-1548
9. Vandooren J., Itoh Y. (2021) Alpha-2-macroglobulin in inflammation, immunity and infections. *Front. Immunol.*, **12**, 803244. DOI: 10.3389/fimmu.2021.803244
10. Зорин Н.А., Зорина В.Н., Зорина Р.М. (2006) Роль белков семейства макроглобулинов в регуляции воспалительных реакций. Биомедицинская химия, **52**(3), 229-238. [Zorin N.A., Zorina V.N., Zorina R.M. (2006) The role of macroglobulin family proteins in the regulation of inflammatory reactions. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **52**(3), 229-238.]
11. Lagrange J., Lecompte T., Knopp T., Lacolley P., Regnault V. (2022) Alpha-2-macroglobulin in hemostasis and thrombosis: An underestimated old double-edged sword. *J. Thromb. Haemost.*, **20**(4), 806-815. DOI: 10.1111/jth.15647
12. Chen C., Haupert S.R., Zimmermann L., Shi X., Fritsche L.G., Mukherjee B. (2022) Global prevalence of post-coronavirus disease 2019 (COVID-19) condition or long COVID: A meta-analysis and systematic review. *J. Infect. Dis.*, **226**(9), 1593-1607. DOI: 10.1093/infdis/jiac136
13. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. (1989) Унифицированный метод определения активности альфа1-протеиназного ингибитора, альфа2-макроглобулина в сыворотке крови человека. Вопросы Медицинской Химии, **25**(4), 494-499. [Nartikova V.F., Pashkina T.S. (1989) Unified method for determining the activity of alpha 1-proteinase inhibitor, alpha 2-macroglobulin in human serum. *Problems of Medical Chemistry*, **25**(4), 494-499.]
14. Оглоблина О.Г., Платонова Л.В., Пасхина Т.С. (1984) Измерение активности трипсино- и эластазоподобных протеаз полиморфноядерных лейкоцитов и уровня их кислотостабильных ингибиторов в бронхиальном секрете человека: Методические рекомендации. Изд-во МГУ, Москва, 14 с. [Ogoblina O.G., Platonova L.V., Pashkina T.S. (1984) Measuring the activity of trypsin- and elastase-like proteinases of polymorphonuclear leukocytes and the level of their acid-stable inhibitors in human bronchial secretions: Methodical Recommendations. Izd-vo MGU, Moscow, 14 p.]
15. Wang J., Li Q., Yin Y., Zhang Y., Cao Y., Lin X., Huang L., Hoffmann D., Lu M., Qiu Y. (2020) Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps in COVID-19. *Front. Immunol.*, **11**, 2063. DOI: 10.3389/fimmu.2020.02063
16. Vianello A., Braccioni F. (2020) Geographical overlap between alpha-1 antitrypsin deficiency and COVID-19 infection in Italy: Casual or causal? *Archivos de Bronconeumologia*, **56**(9), 609-610. DOI: 10.1016/j.arbr.2020.05.011
17. Varma V.R., Varma S., An Y., Hohman T.J., Seddighi S., Casanova R., Beri A., Dammer E.B., Seyfried N.T., Pletnikova O., Moghekar A., Wilson M.R., Lah J.J., O'Brien R.J., Levey A.I., Troncoso J.C., Albert M.S., Thambisetty M. (2017) Alpha-2 macroglobulin in Alzheimer's disease: A marker of neuronal injury through the RCAN1 pathway. *Molecular Psychiatry*, **22**(1), 13-23. DOI: 10.1038/mp.2016.206
18. Mocchegiani E., Malavolta M. (2007) Zinc dyshomeostasis, ageing and neurodegeneration: implications of A2M and inflammatory gene polymorphisms. *J. Alzheimer's Dis.*, **12**(1), 101-109. DOI: 10.3233/jad-2007-12110
19. Rugsarash W., Tungtrongchitr R., Petmitr S., Phonrat B., Pongpaew P., Harnroongroj T., Tungtrongchitr A. (2006) The genetic association between alpha-2-macroglobulin (A2M) gene deletion polymorphism and low serum A2M concentration in overweight/obese Thais. *Nutritional Neuroscience*, **9**(1-2), 93-98. DOI: 10.1080/10284150600771777
20. Rehman Khan A., Awan F.R. (2016) Leptin resistance: A possible interface between obesity and pulmonary-related disorders. *Int. J. Endocrinol. Metab.*, **14**(1), e32586. DOI: 10.5812/ijem.32586
21. Павлова З.Ш., Голодников И.И. (2020) Ожирение = воспаление. Патогенез. Чем это грозит мужчинам? Медицинский вестник Юга России, **11**(4), 6-23. [Pavlova Z.Sh., Golodnikov I.I. (2020) Obesity = inflammation. Pathogenesis. How does this threaten men? *Medical Herald of the South of Russia*, **11**(4), 6-23.] DOI: 10.21886/2219-8075-2020-11-4-6-23

Поступила в редакцию: 26. 05. 2023.
После доработки: 13. 06. 2023.
Принята к печати: 29. 06. 2023.

ALPHA-2 MACROGLOBULIN ACTIVITY IN SARS-CoV-2 INDUCED INFECTION AND IN THE POST-COVID-19 PERIOD

O.E. Akbasheva¹, D.K. Mitrofanova¹, L.V. Spirina^{1,2},
Yu.G. Samoilova¹, M.V. Matveeva¹, D.V. Podchinenova¹, O.A. Oleynik¹*

¹Siberian State Medical University,
2 Moskovsky trakt, Tomsk, 634050 Russia; *e-mail: dmitrofanova54@gmail.com

²Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center,
5 Koorepativny per., Tomsk, 634009 Russia

The universal proteinase inhibitor α_2 -macroglobulin (α_2 -MG) exhibiting antiviral and immunomodulatory activities, is considered as an important participant in the infectious process. The activity of α_2 -MG in the new coronavirus infection and post-covid syndrome (long COVID) has not been studied yet. We examined 85 patients diagnosed with community-acquired bilateral polysegmental pneumonia developed under conditions of a new coronavirus infection SARS-CoV-2. For assessment of the post-COVID period, 60 patients were examined 5.0±3.6 months after the coronavirus infection. Among these patients, 40 people had complications, manifested in the form of neurological, cardiological, gastroenterological, dermatological, bronchopulmonary symptoms. The control group included 30 conditionally healthy individuals with a negative PCR result for SARS-CoV-2 RNA and lack of antibodies to the SARS-CoV-2 virus. The α_2 -MG activity in serum samples of patients with coronavirus infection dramatically decreased, up to 2.5% of the physiological level. This was accompanied by an increase in the activity of the α_1 -proteinase inhibitor, elastase- and trypsin-like proteinases by 2.0-, 4.4- and 2.6-fold respectively as compared with these parameters in conditionally healthy individuals of the control. In the post-COVID period, despite the trend towards normalization of the activity of inhibitors, the activity of elastase-like and especially trypsin-like proteinases in serum remained elevated. In overweight individuals, the increase in the activity of trypsin-like proteinases was most pronounced and correlated with an increase in the antibody titer to the SARS-CoV-2 virus. In the post-COVID period, the α_2 -MG activity not only normalized, but also exceeded the control level, especially in patients with dermatological and neurological symptoms. In patients with neurological symptoms or with dermatological symptoms, the α_2 -MG activity was 1.3 times and 2.1 times higher than in asymptomatic persons. Low α_2 -MG activity in the post-COVID period persisted in overweight individuals. The results obtained can be used to monitor the course of the post-COVID period and identify risk groups for complications.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: alpha-2-macroglobulin; alpha-1-proteinase inhibitor; trypsin-like proteases; elastase-like proteases; post-COVID period

Funding. The study was supported by the Siberian State Medical University.

Received: 26.05.2023; revised: 13.06.2023; accepted: 29.06.2023.