

ПОЗИТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА $\alpha 2b$ НА ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИИ $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ И ГЕРПЕСВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Атажахова М.Г.¹, Нестерова И.В.^{1, 2}, Чудилова Г.А.¹,
Матушкина В.А.¹, Ковалева С.В.¹, Чапурина В.Н.¹

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Краснодар, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Резюме. Постковидный синдром (ПКС) – мультисистемное воспалительное состояние, протекающее с проявлениями синдрома хронической усталости (СХУ) и когнитивных расстройств (КР), на фоне реактивации хронических герпесвирусных инфекций (ГВИ). Проявления ПКС требуют изучения молекулярных механизмов, связанных с продукцией IFN и рецепторной функцией нейтрофильных гранулоцитов (НГ), что является актуальным и представляет интерес, для поиска иммунотерапевтических стратегий у пациентов с ПКС. Цель – изучить эффекты влияния рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ (рекIFN $\alpha 2b$) *in vitro* на фенотип субпопуляций $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ и функциональную активность НГ у пациентов с постковидным синдромом и герпесвирусными инфекциями.

Исследованы 45 пациентов (24-60 лет) с ПКС и ГВИ (ВПГ1, ВЭБ, ВЧГ6, ЦМВ) – группа исследования 1 (ГИ1). Проведено анкетирование с оценкой тяжести симптомов ПКС в баллах, исследование содержания и фенотипа субпопуляций НГ – $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$, фагоцитарная и NADPH-оксидазная функция НГ до инкубации и после инкубации *in vitro* с рекIFN $\alpha 2b$ (50 МЕ/мкл, 60 мин, Т 37 °С) – группа исследования 1а (ГИ1а). Группа сравнения (ГС) 30 добровольцев обследованных в доковидный период.

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов
имени Патриса Лумумбы»
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123, кв. 1.
Тел.: 8 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Address for correspondence:

Irina V. Nesterova
P. Lumumba Peoples' Friendship University
123 Leninsky Ave, Apt 1
Moscow
117513 Russian Federation
Phone: +7 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Образец цитирования:

М.Г. Атажахова, И.В. Нестерова, Г.А. Чудилова,
В.А. Матушкина, С.В. Ковалева, В.Н. Чапурина
«Позитивные эффекты рекомбинантного интерферона
 $\alpha 2b$ на фенотип субпопуляции $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-$
 $CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ нейтрофильных
гранулоцитов у пациентов с постковидным синдромом
и герпесвирусными инфекциями» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 647-656.
doi: 10.46235/1028-7221-13908-PEO

© Атажахова М.Г. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.G. Atazhakhova, I.V. Nesterova, G.A. Chudilova,
V.A. Matushkina, S.V. Kovaleva, V.N. Chapurina “Positive
effects of recombinant interferon $\alpha 2b$ on the phenotype of
 $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$
neutrophil granulocyte subset in patients with post-COVID
syndrome and herpesvirus infections”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,
Vol. 26, no. 4, pp. 647-656.
doi: 10.46235/1028-7221-13908-PEO

© Atazhakhova M.G. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-13908-PEO

У пациентов ГИ1 с микст-ГВИ установлены более выраженные клинические проявления СХУ и КР, чем при моно-ГВИ. Выявлено повышение плотности экспрессии всех рецепторов на CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻НГ и CD16⁺IFN α / β R1⁻CD119⁺НГ, свидетельствующих об активности НГ с инициацией цитотоксичности или NETosis, снижение фагоцитарной функции и напряженность NADPH-оксидазной активности с истощением резервных возможностей НГ в ГИ1. Получены данные о позитивном влиянии рекIFN α 2b *in vitro* (ГИ1а): в субпопуляции CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻ – снижение плотности экспрессии CD16 рецептора и усиление экспрессии IFN α / β R1 рецептора, в субпопуляции CD16⁺IFN α / β R1⁻CD119⁺ сохранение повышенной MFI CD16 и MFI CD119 рецепторов, восстановление дефектной фагоцитарной функции НГ и снижение чрезмерной активности NADPH-оксидаз.

Позитивные эффекты влияния рекIFN α 2b у пациентов с ПКС на дефектно функционирующие НГ, обосновывают возможность использования иммунотерапии лекарственным препаратом на основе рекIFN α 2b в комбинации с высокоактивными антиоксидантами в лечении различных проявлений ПКС, в том числе при СХУ, КР, ГВИ, что обеспечит адекватное функционирование противовирусных и регуляторных механизмов иммунной системы.

Ключевые слова: постковидный синдром, герпесвирусные инфекции, синдром хронической усталости, нейтрофильные гранулоциты, субпопуляции, рекомбинантный IFN α 2b

POSITIVE EFFECTS OF RECOMBINANT INTERFERON α 2b ON THE PHENOTYPE OF CD16⁺IFN α / β R1⁻CD119⁺, CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻ NEUTROPHIL GRANULOCYTE SUBSET IN PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME AND HERPESVIRUS INFECTIONS

Atazhakhova M.G.^a, Nesterova I.V.^{a, b}, Chudilova G.A.^a,
Matushkina V.A.^a, Kovaleva S.V.^a, Chapurina V.N.^a

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^b P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Post-COVID syndrome (PCS) is a multisystem inflammatory condition with manifestations of chronic fatigue syndrome (CFS) and cognitive disorders (CD), along with reactivation of chronic herpesvirus infections (HVI). The PCS manifestations require studying the molecular mechanisms associated with the production of IFN and receptor functions of neutrophil granulocytes (NG), which is relevant and promotes the search for immunotherapeutic strategies in patients with PCS. Our objective was to study the *in vitro* effects of recombinant interferon α 2b (recIFN α 2b) on the phenotype of CD16⁺IFN α / β R1⁻CD119⁺, CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻ subsets and functional activity of NG in patients with post-COVID syndrome and herpesvirus infections. Materials and methods: 45 patients (24–60 years old) with PCS and HVI (HSV 1, EBV, HHV6, CMV) comprised the study group 1 (SG1). A questionnaire was conducted to assess the severity of PCS symptoms using a point scale. We performed a study of the content and phenotype of NG subsets, i.e., the CD16⁺IFN α / β R1⁻CD119⁺, CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻, CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺ subpopulation, phagocytic and NADPH oxidase function of NG before and after *in vitro* incubation with recIFN α 2b (50 IU/ μ L, for 60 min, at 37 °C) in the study group 1a (SG1a). The comparison group (CG) of 30 volunteers examined during the pre-COVID period. Results: We revealed more pronounced clinical manifestations of CFS and CD in SG1 patients with mixed HVI, than in mono-HVI cases. Increased expression density of all receptors was registered on CD16⁺IFN α / β R1⁻CD119⁻NG and CD16⁺IFN α / β R1⁻CD119⁺ NG, thus suggesting the NG activation with initiation of cytotoxicity or NETosis, a decrease in phagocytic function and intensity of NADPH oxidase activity with depletion of NG reserve capacity in SG1. We have obtained some data on the positive effect of recIFN α 2b *in vitro* (SG1a), e.g., decreased CD16 expression density and enhancement of

IFN α / β R1 receptor expression in the CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻ subset. In the CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺ subset, we have found persistence of increased MFI CD16 and MFI CD119 receptors, restoration of defective NG phagocytic function and reduced excessive activity of NADPH oxidases. Conclusion: The positive effects of the recIFN α 2b influence on deficient function of NG in PCS patients suggest an opportunity of using immunotherapy with a recIFN α 2b-based drug, combined with highly active antioxidants for treatment of various PCS manifestations including CFS, CD, HVI, thus, probably, ensuring adequate functioning of antiviral and regulatory mechanisms of the immune system.

Keywords: post-COVID syndrome, herpesvirus infections, chronic fatigue syndrome, neutrophil granulocytes, subsets, recombinant IFN α 2b

Введение

Постковидный синдром (ПКС) стал актуальной проблемой врачей различных специальностей вследствие широкой распространенности и разнообразия клинических проявлений.

ПКС клиническое состояние, с сохраняющимися симптомами, которые способны со временем меняться, исчезать, вновь возникать, и отражают дисфункцию многих систем и органов организма [5].

Выделяют несколько механизмов, оказывающих влияние на развитие ПКС: иммунная дисрегуляция, аутоиммунные процессы, синдром системного воспалительного ответа, повреждение сосудов микроциркуляторного русла, вегетативная, нервная, эндокринная и метаболическая дисфункции, прямое цитотоксическое действие вируса на клетки, и длительная вирусная персистенция [9]. Кроме этого, большинство пациентов с ПКС могут подвергаться повышенному риску коинфекций, вызванных вирусными, бактериальными, грибковыми или другими патогенами [10].

Основные клинические проявления ПКС включают множество состояний и симптомов, при этом процесс носит длительный, волнообразный, часто рецидивирующий характер, что существенно снижает физическую активность и качество жизни пациентов. Развитие синдрома хронической усталости (СХУ) и стойкое ощущение когнитивных расстройств (КР), являются наиболее частыми жалобами пациентов с ПКС и характеризуется астенией различной степени тяжести. Проявления СХУ характеризуются стойким ощущением усталости, снижением работоспособности и толерантности к физическим нагрузкам. КР проявляются снижением процессов запоминания, усвоением новой информации, отмечаются трудности с концентрацией внимания, снижение умственной работоспособности, забывчивость, ощущение «тумана в голове», мигрирующие боли в суставах и мышцах [1]. Эти перечисленные осложнения встречаются у

30-50% реконвалесцентов, чаще у женщин, чем у мужчин, а их выраженность и стойкость более высока у больных с полиорганными и коморбидными формами патологии, находившихся на лечении в палатах интенсивной терапии и реанимационных отделениях [13].

Многочисленные исследования, связанные с индуцированной SARS-CoV-2 реактивацией герпесвирусных инфекций (ГВИ) показали, что острое течение COVID-19 сопровождается дефицитом выработки IFN, при этом происходит активация персистирующих ГВИ – вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), цитомегаловируса (ЦМВ), вируса герпеса человека 6-го типа (ВГЧ6) [12]. В первом систематическом обзоре с метаанализом 85 исследований из 18 стран мира приведены обобщенные результаты об активации ГВИ у пациентов с острой и перенесенной инфекцией COVID-19 [6]. Показано, что пациенты с ПКС имели реактивацию вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) – 42,6%, вируса герпеса человека 6-го типа (ВГЧ6) у 25% и ВЭБ/ВГЧ6 у 32,4% [7, 14].

Нарушения в работе иммунной системы (ИС) в противовирусной защите при ПКС могут сопровождаться истощением и функциональной неполноценностью клеток врожденного и адаптивного иммунитета с последующим прогрессированием нарушений молекулярных механизмов, связанных с продукцией интерферона (IFN) возникших при остром COVID-19 [5]. В частности, было показано, что при COVID-19 наблюдается блокада продукции IFN α и IFN γ , повышение уровней цитокинов ассоциированных с активацией НГ, изменение содержания и фенотипа субпопуляций НГ, изменение их функций [2]. Также продемонстрированы эффекты позитивного влияния рекомбинантного IFN α 2b (рекIFN α 2b) *in vitro* на количественные и фенотипические характеристики субпопуляций НГ [3]. Кроме того установлены различные дисрегуляторные нарушения в системе противовирусной иммунной защиты и системе IFN у пациентов с атипичными хроническими активными ГВИ, которые формируют состояние иммунокомпрометированности

у пациентов с ПКС, имеют как локальные, так и системные проявления и является одним из основных признаков постковидного периода [4].

НГ являясь эффекторными и регуляторными клетками ИС экспрессируют поверхностные мембранные рецепторы к $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$, формируя субпопуляции с определенным фенотипом. Связываясь с этими рецепторами, $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ способны проявлять свои регуляторные действия и модулировать функциональную активность НГ [11]. Таким образом, изучение молекулярных механизмов нарушений не только в остром периоде COVID-19, но и в постковидном периоде, особенно у пациентов с проявлениями ПКС, связанных с продукцией IFN , рецепторной функцией НГ – $IFN\alpha/\beta R$, $CD119$ ($IFN\gamma$) на мембране НГ периферической крови (ПК), является актуальным и представляет несомненный интерес, что может помочь в поиске терапевтических стратегий, с целью восстановления и усиления врожденного иммунного ответа против перенесенного SARS-CoV-2.

Цель – изучить эффекты влияния рекомбинантного $IFN\alpha 2b$ *in vitro* на фенотип субпопуляций $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ и функциональную активность НГ у пациентов с постковидным синдромом и герпесвирусными инфекциями

Материалы и методы

Проведено исследование 45 пациентов (24 женщины, 21 мужчина), 24–60 лет, находившихся на диспансерном наблюдении с различными симптомами и проявлениями ПКС спустя 12 и более недель после перенесенной инфекции SARS-CoV-2, группа исследования 1 (ГИ1).

Пациенты прошли анкетирование по разработанной нами ранее шкале для оценки тяжести симптомов ПКС в баллах от 0 до 5 [4].

Кроме традиционных методов, включавших сбор анамнеза, методы физикального обследования, общий и биохимический анализы крови, использовали метод ПЦР в реальном времени для детекции ГВИ (ВПГ1, ВЭБ, ВГЧ6, ЦМВ) в соскобе с миндалин и задней стенки глотки, что имело значение для выявления реактивации хронических ГВИ.

Проведено исследование содержания НГ субпопуляций $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$, и их фенотипа по плотности экспрессии мембранных рецепторов – MFI (FC 500, Beckman Coulter, США), конъюгаты МКАТ: $IFN\alpha\beta R1$ -FITC, $CD119$ -PE, $CD16$ -ECD (Beckman Coulter Inter-

national S.A., Франция), до инкубации (ГИ1) и после инкубации с рек $IFN\alpha 2b$ (50 МЕ/мкл) в течение 60 мин при температуре 37 °C *in vitro* – группа исследования 1a (ГИ1a).

В ГИ1 и ГИ1a оценивали фагоцитарную функцию НГ: по доли активно-фагоцитирующих НГ (%ФАН); объему захваченного бактериального материала (*S. aureus*, штамм 209) по показателям: фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ) и завершения фагоцитарного акта по проценту переваривания (%П), индексу переваривания (ИП). Параллельно производился подсчет на 100 НГ доли клеток в апоптозе и клеток образующих нейтрофильные экстрацеллюлярные сети (NET). Активность NADPH-оксидазы НГ определяли в NBT-спонтанном тесте (NBTсп.) и в NBT-стимулированном *in vitro* *S. aureus* тесте (NBTст.) по показателям: средний цитохимический индекс (СЦИсп, СЦИст), процент формазан-позитивных клеток (%ФПКсп, %ФПКст) и коэффициент мобилизации (КМ) – %ФПКст/%ФПКсп. Группа сравнения (ГС) сформирована из 30 добровольцев сопоставимых по полу и возрасту, обследованных в доковидный период.

Исследование проведено согласно требованиям Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 2013 г. У всех пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании и на обработку персональных данных.

Для статистической обработки полученных данных использованы компьютерные программы Microsoft Excel. Результаты представляли в виде медианы (Me) и верхнего и нижнего квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$), применяли критерии Манна–Уитни и Вилкоксона. Достоверность различия определяли при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе анкетирования у 100% исследуемых пациентов ГИ1 с ПКС установлены клинические проявления СХУ и КР различной степени выраженности. Согласно разработанной нами 5-балльной шкале (0 баллов – отсутствие симптомов; 1 балл – минимальные симптомы; 2 балла – средняя выраженность симптомов; 3 балла – тяжелая степень; 4 балла – очень тяжелая степень; 5 баллов – крайне тяжелая степень), общее количество баллов в ГИ1 составило – 17,0 (15,25–19,75), что в 17 раз больше чем в ГС–1,0 балл (0,5–2,0) ($p < 0,05$) (табл. 1).

Наиболее беспокоящими жалобами пациентов ГИ1 являлись: снижение работоспособности,

повышенная утомляемость, снижение толерантности к физическим нагрузкам, стойкое ощущение хронической усталости. Также все пациенты предъявляли жалобы разной степени выраженности на нарушение когнитивных функций в виде снижения процессов запоминания, трудности с концентрацией внимания, ощущение «тумана в голове», артралгии, миалгии. Клинические признаки ГВИ у пациентов ГИ1 были выявлены с их последующей детекцией. Согласно полученным данным, выявлено, что в ГИ1 частота встречаемости моно и микст-ГВИ была следующей: у 57,8% пациентов отмечались клинические проявления ВПГ1-инфекции, орофациальной локализации; из них у 37,2% детектировалась моно-

ГВИ-ВПГ1-инфекция; у 62,8% детектировалась микст-ГВИ: ВПГ1-инфекция и ВЭБ-инфекция (36,8%); ВПГ1-инфекция и ВЧГ6-инфекция (21%); ВПГ1-инфекция, ВЭБ-инфекция и ВЧГ6-инфекция (5%). Стоит отметить, что наиболее выраженные клинические проявления ПКС в ГИ1 с лидирующими симптомами СХУ и КР отмечались среди пациентов, страдающих микст-ГВИ, а выраженность симптомов составляла 19 (17-21) баллов, тогда как при моно-ГВИ – 15 (14-16) баллов.

При исследовании НГ ПК ГС выявлены 3 субпопуляции НГ: CD16⁺IFN α / β R1-CD119⁺, CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻, CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺. Доля субпопуляции НГ CD16⁺IFN α / β R1-CD119⁺

ТАБЛИЦА 1. ВЫРАЖЕННОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 (В БАЛЛАХ), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. SEVERITY OF CLINICAL MANIFESTATIONS OF POST-COVID SYNDROME IN PATIENTS WHO UNDERWENT COVID-19 (IN POINTS), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Симптомы Symptoms	Группа сравнения (ГС) Comparison group n = 30	Пост-COVID-19 (ГИ1) Post-COVID-19 Study group 1 n = 45
Синдром хронической усталости, непереносимость физической нагрузки, снижение работоспособности, повышенная утомляемость Chronic fatigue syndrome, exercise intolerance, decreased performance, increased fatigue	0,5 (0,1-1,0)	3,0 (2,0-3,0)*
Снижение процессов запоминания, трудности с концентрацией внимания, ощущение тумана в голове Reduced memorization processes, difficulty concentrating, "brain fog"	0,0 (0,0-0,0)	3,0 (2,0-3,0)*
Головная боль, головокружение, мигрень Headache, dizziness, migraine	0,5 (0,1-1,0)	2,0 (2,0-3,0)*
Артралгии, миалгии Arthralgia, myalgia	0,0 (0,0-0,0)	2,0 (1,0-3,0)*
Панические атаки, расстройства настроения, эмоциональная лабильность, психогенная депрессия Panic attacks, mood disorders, emotional lability, psychogenic depression	0,0 (0,0-0,0)	2,0 (2,0-2,0)*
Нарушения засыпания и сна Falling asleep and sleep disorders	0,0 (0,0-0,0)	2,0 (2,0-2,0)*
Повышенная потливость, субфебрилитет Excessive sweating, subfebrility	0,0 (0,0-0,0)	1,0 (1,0-2,0)*
Кашель и одышка Cough and shortness of breath	0,0 (0,0-0,0)	1,0 (0,0-1,0)
Клинические проявления герпесвирусных инфекций Clinical manifestations of herpesvirus infections	0,0 (0,0-0,0)	1,0 (0,0-2,0)*
Общее количество баллов Total number of points	1,0 (0,5-2,0)	17,0 (15,25-19,75)*

Примечание. * – значимость отличий от показателей группы сравнения; p < 0,05.

Note. *, the significance of differences from the indicators of the comparison group; p < 0.05.

составляют 93,7 (89,8-96,5) % с плотностью экспрессии по MFI CD16 – 39,8 (20,4-51,3) и CD119⁺(IFN γ) – 2,8 (2,5-3,1). Субпопуляция CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻, не экспрессирующая рецептор к IFN γ , была представлена 1,4(0,5-2,4) % НГ с плотностью экспрессии по MFI IFN α / β R1 – 3,4 (2,6-4,1) и MFI CD16 – 39,9 (22,9-54,5). Также определялась малочисленная субпопуляция одновременно экспрессирующая IFN α / β и IFN γ рецепторы НГ CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺ составляющая 0,9 (0,4-1,8) % НГ, но при этом имеющая

более высокие значения плотности экспрессии IFN α / β R1 ($p > 0,05$) и CD119 молекул ($p > 0,05$).

Отличительной особенностью ГИ1 явилось отсутствие в 93% случаев (42 пациента) субпопуляции CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺, при этом только у 3 пациентов – в 7% случаев, с микст-ГВИ (ВПГ1-инфекция, ВЭБ-инфекция и ВЧГ6-инфекция) регистрировались 0,3 (0,3-0,7) % НГ субпопуляции CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺ с повышенными в 1,8 раза MFI IFN α / β R1-10,3 (9,82-10,5), в 6 раз CD119 – 18,4 (10,4-34,8) и в

ТАБЛИЦА 2. ЭФФЕКТЫ ВЛИЯНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО IFN α 2b НА ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РЕЦЕПТОРЫ К IFN I И II ТИПОВ И АКТИВАЦИОННЫЙ МАРКЕРНЫЙ РЕЦЕПТОР CD16, У ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. EFFECTS OF RECOMBINANT IFN α 2b ON THE PHENOTYPE OF NEUTROPHIL GRANULOCYTE SUBPOPULATIONS EXPRESSING TYPE I AND II IFN RECEPTORS AND CD16 ACTIVATION MARKER RECEPTOR IN PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Группа сравнения (ГС) Comparison group n = 30	Пост-COVID-19 до инкубации (ГИ1) Post-COVID-19 Study group 1 n = 45	Пост-COVID-19 после инкубации + рекIFN α 2b (ГИ1а) Post-COVID-19 + recombinant IFN α 2b Study group 1a n = 45
CD16⁺IFNα/βR1⁺CD119⁻НГ CD16 ⁺ IFN α / β R1 ⁺ CD119 ⁻ NG			
НГ, % NG, %	93,7 (89,8-96,5)	94,4 (92,6-96,1)	94,0 (92,4-95,0)
MFI CD16	39,8 (20,4-51,3)	103,5* (83,9-121,0)	110,0* (95,7-127,0)
MFI CD119	2,8 (2,5-3,1)	5,7* (5,4-6,8)*	5,0* (3,7-6,3)
CD16⁺IFNα/βR1⁺CD119⁻НГ CD16 ⁺ IFN α / β R1 ⁺ CD119 ⁻ NG			
НГ, % NG, %	1,4 (0,5-2,4)	0,5 (0,4-2,0)	1,6 (0,5-1,9)
MFI CD16	39,9 (22,9-54,5)	67,7* (58,5-100,3)*	50,0 (40,1-62,3)
MFI IFN α / β	3,4 (2,6-4,1)	15,3* (6,8-22,2)*	19,2* (13,9-26,1)
CD16⁺IFNα/βR1⁺CD119⁺НГ CD16 ⁺ IFN α / β R1 ⁺ CD119 ⁺ NG			
НГ, % NG, %	0,9 (0,4-1,8)	0	0
MFI CD16	39,1 (26,6-50,3)	0	0
MFI IFN α / β	5,7 (4,6-6,5)	0	0
MFI CD119	3,2 (2,9-5,8)	0	0

Примечание. * – значимость отличий от показателей группы сравнения; $p < 0,05$.

Note. *, the significance of differences from the indicators of the comparison group; $p < 0.05$.

1,4 раза CD16- 54,7 (38,4-91,8) по отношению к значениям ГС ($p_{1-3} < 0,05$). Содержание НГ субпопуляции CD16⁺IFN α / β R1-CD119⁺НГ в ГИ1 не отличалось от ГС ($p > 0,05$), но при этом отмечалось увеличение плотности экспрессии рецепторов по MFI в 2,6 раза CD16 ($p < 0,05$) и в 1,9 раза CD119 ($p < 0,05$). Также наблюдалась тенденция к снижению в 2,8 раза содержания субпопуляции CD16⁺IFN α / β R1-CD119⁺НГ ($p > 0,05$). Для этой субпопуляции были характерны повышенные уровни экспрессии в 4,5 раза рецептора

IFN α / β R1 ($p < 0,05$) и в 1,7 раза CD16 ($p < 0,05$) по отношению к показателям ГС (табл. 2).

Инкубация НГ-пациентов с ПКС (ГИ1а) с рекIFN α 2b *in vitro* не влияла на количество НГ субпопуляций CD16⁺IFN α / β R1-CD119⁺ и CD16⁺IFN α / β R1-CD119⁺ как по сравнению с показателями ГС ($p_{1,2} > 0,05$), так и по отношению к значениям до инкубации ГИ ($p_{1,2} > 0,05$). В то же время на НГ субпопуляции CD16⁺IFN α / β R1-CD119⁺ наблюдались незначительные тенденции увеличения плотности экспрессии по MFI CD16

ТАБЛИЦА 3. ЭФФЕКТЫ ВЛИЯНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО IFN α 2b НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. EFFECTS OF RECOMBINANT IFN α 2b ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES OF PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME IN THE *IN VITRO* SYSTEM, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Группа сравнения (ГС) Comparison group n = 30	Пост-COVID-19 до инкубации (ГИ1) Post-COVID-19 Study group 1 n = 45	Пост-COVID-19 после инкубации + рекIFN α 2b (ГИ1а) Post-COVID-19 + recombinant IFN α 2b Study group 1a n = 45
%ФАН %PhAN	65,8 (60,9-79,6)	49,0 (48,0-52,0)*	62,0 (57,5-67,0)^
ФЧ PhN	3,4 (2,1-4,2)	3,30 (3,1-3,4)	2,5 (2,3-2,6)^
ФИ PhI	1,8 (1,6-2,0)	1,6 (1,5-1,8)	1,63 (1,56-1,70)
%П %D	58,9 (51,3-78,3)	40,9 (40,5-41,7)*	47,2 (42,9-51,5)^
ИП ID	1,90 (1,10-2,40)	0,65 (0,61-0,72)*	1,0 (0,74-1,50)^
СЦИ сп. MCIsP	0,09 (0,06-0,10)	0,46 (0,41-0,49)	0,2 (0,18-0,21)^
СЦИ ст. MCPst	0,20 (0,08-0,30)	0,36 (0,33-0,39)	0,34 (0,32-0,37)
%ФПК сп. %FPCsp	2,4 (2,3-3,5)	8,0 (6,8-9,0)*	6,0 (6,0-6,5)*
%ФПК ст %FPCst	5,5 (2,8-6,3)	6,0 (5,8-7,0)	8,0 (8,0-9,0)* ^
КМ MC	1,8 (1,60-2,20)	0,86 (0,75-1,26)*	1,78 (1,58-1,92)^
NET	1,0 (0,0-1,0)	2,0 (1,75-2,50)*	1,0 (1,0-2,0)
Клетки в апоптозе Cells in apoptosis	1,0 (0,0-1,0)	2,0 (1,0-3,0)	2,0 (1,0-2,0)

Примечание. * – значимость отличий от показателей группы сравнения; $p < 0,05$. ^ – значимость отличий показателей ГИ1 до инкубации и ГИ1а после инкубации с рекIFN α 2b; $p < 0,05$.

Note. *, the significance of differences from the indicators of the comparison group; $p < 0.05$. ^, the significance of the differences in the indicators of Group 1 before incubation and Group 1a after incubation with рекIFN α 2b; $p < 0.05$.

до 110,0 (95,7-127,0) против 103,5 (83,9-121,0) в ГИ1 ($p > 0,05$) и снижения плотности экспрессии по MFI CD119 до 5,0 (3,7-6,3) против 5,7 (5,4-6,8) в ГИ1 ($p > 0,05$). При этом регистрируемые показатели MFI CD16 и MFI CD119 оставались повышенными по отношению к уровню экспрессии молекул на НГ данной субпопуляции в ГС ($p_{1,2} < 0,05$) (табл. 1).

Эффекты влияния рекIFN α 2b на фенотип субпопуляций CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻НГ заключались в снижении в 1,4 раза MFI CD16 по отношению к показателям ГИ1 ($p < 0,05$) до уровня, определяемого в ГС ($p > 0,05$), при этом плотность экспрессии IFN α / β R1 увеличилась в 1,3 раза от значений, регистрируемых в ГИ1 пациентов с ПКС, оставаясь в 5,6 раза выше значений в ГС ($p > 0,05$) (табл. 2).

Анализ функционального потенциала НГ при ПКС выявил значительное снижение в 1,3 раза доли активно фагоцитирующих НГ (%ФАН) ($p < 0,05$), %П в 1,4 раза и 2,9 раза ИП ($p_{1,2} < 0,05$) по отношению к показателям ГС, на фоне увеличения содержания НГ образующих NETs и клеток в апоптозе. При этом в этой группе пациентов отмечалось: в спонтанном NBT-тесте напряженность NADPH-оксидаз по показателям СЦИсп – 0,46 (0,41-0,49) и %ФПКсп – 8,0 (6,8-9,0) % по отношению к ГС ($p_{1,2} < 0,05$). В стимулированном NBT-тесте при дополнительной нагрузке *S. aureus* повышение показателей СЦИст – 0,36 (0,33-0,39) и %ФПК 6,0 (5,8-7,0), что демонстрирует истощение оксидантного микробицидного потенциала, КМ-0,86 (0,75-1,26) ($p_{1,2} < 0,05$) (табл. 3).

После инкубации НГ пациентов с ПКС в системе *in vitro* с рекIFN α 2b отмечалось увеличение доли ФАН ($p < 0,05$) и восстановление процессов киллинга и переваривания (%П, ИП) до уровня показателей ГС ($p_{1,2} > 0,05$), снижение спонтанной и усиление стимулированной активности NADPH-оксидаз, как по показателям %ФПК, так и по СЦИ с сохранением резервного микробицидного потенциала, КМ – 1,78 (1,58-1,92). РекIFN α 2b в системе *in vitro* не влиял на процессы образования NETs и апоптоз (табл. 3).

Таким образом, у пациентов с ПКС на фоне моно- и микст-ГВИ выявлена трансформация фенотипа субпопуляций НГ CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻НГ и CD16⁺IFN α / β R1⁻CD119⁺НГ, несущих рецепторы к IFN α и IFN γ и активационный рецептор CD16, отвечающий, за цитотоксичность НГ по отношению к инфицированным вирусом клеткам. Выявлено значимое повышение плотности экспрессии всех

изучаемых рецепторов свидетельствующее об активации НГ с предположительной инициацией антителозависимой клеточной цитотоксической реакции или NETosis. При этом установлено снижение функциональной активности НГ проявляющееся в снижении процессов захвата и переваривания бактериальных антигенов и напряженности NADPH-оксидазной активности с истощением резервных возможностей НГ. Ранее нами были получены данные об аналогичных вариантах трансформации фенотипа субпопуляций НГ CD16⁺IFN α / β R1⁻CD119⁺, CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻, CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺ на фоне неадекватно низкого уровня IFN I и II типов у пациентов в острый период COVID-19 [3].

Учитывая, что IFN I и II типов усиливают NETosis [11], возможно предположить, что значительное повышение экспрессии рецепторов, отмечаемое в ГИ1, может усугубить нейтрофильную инфильтрацию и нетоз, а также связанные с этими процессами проявления ПКС, показано, что рекIFN α 2b в системе *in vitro* не влиял на процессы образования NETs и апоптоз.

Получены позитивные эффекты влияния рекIFN α 2b *in vitro* на фенотип субпопуляций и функции НГ. РекIFN α 2b *in vitro* не влиял на количество и соотношение 2 субпопуляций CD16⁺IFN α / β R1⁻CD119⁺, CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺. При этом на НГ субпопуляций CD16⁺IFN α / β R1⁻CD119⁺ сохранялись повышенные показатели MFI CD16 и MFI CD119 по отношению к уровню в ГС; на НГ субпопуляций CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻ отмечено снижение MFI CD16 до уровня ГС, и усилении экспрессии IFN α / β R1 по сравнению с показателями пациентов с ПКС и ГС. Такая модуляция фенотипа возможно необходима для восприятия цитокиновых сигналов и осуществления адекватного противовирусного ответа на ГВИ. На фоне воздействия *in vitro* с рекIFN α 2b отмечалось: увеличение доли ФАН и восстановление процессов киллинга и переваривания (%П, ИП) до уровня показателей ГС, снижение спонтанной и усиление стимулированной активности NADPH-оксидаз, как по показателям %ФПК, так и по СЦИ с сохранением резервного микробицидного потенциала.

Заключение

Анализ полученных результатов позволяет предположить, что у пациентов с ПКС сохраняется дефицит IFN, что способствует активации ГВИ. Полученные в настоящем исследовании позитивные эффекты влияния

рекIFN α 2b в системе *in vitro* на дефектно функционирующие НГ в виде изменения фенотипа субпопуляций НГ: CD16⁺IFN α / β R1⁻CD119⁺, CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻, восстановления баланса восприятия IFN, восстановления эффекторных функций НГ с уменьшением их агрессивного действия, спровоцированного перенесенным COVID-19 и реактивацией ГВИ, у пациентов с

ПКС, дополняют известные сведения об иммунопатогенезе ПКС и молекулярные механизмы позитивного влияния интерферонотерапии, и обосновывают целесообразность использования лекарственного препарата на основе рекIFN α 2b в комбинации с высокоактивными антиоксидантами у пациентов с проявлениями ПКС и ГВИ [4].

Список литературы / References

1. Ковальчук В.В., Дроздова М.С., Чепель Ю.А., Нестерин К.В. Постковидный синдром. Мифы и реалии // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 23. С. 20-26. [Kovalchuk V.V., Drozdova M.S., Chepel Yu.A., Nesterin K.V. Postcovid syndrome. Myths and realities. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18, no. 23, pp. 20-26. (In Russ.)]
2. Нестерова И.В., Городин В.Н., Матушкина В.А., Чудилова Г.А., Чапурина В.Н., Халтурина Е.О., Тетерин Ю.В., Ломтатидзе Л.В., Пирогова А.И. Неоднозначная роль нейтрофильных гранулоцитов в иммунопатогенезе COVID-19: взаимосвязь с дисбалансом провоспалительных нейтрофил-ассоциированных цитокинов и дефицитом интерферона- α // Инфекционные болезни, 2022. Т. 20, № 4. С. 12-24. [Nesterova I.V., Gorodin V.N., Matushkina V.A., Chudilova G.A., Chapurina V.N., Khalturina E.O., Teterin Yu.V., Lomtadidze L.V., Pirogova A.I. The ambiguous role of neutrophil granulocytes in the immunopathogenesis of COVID-19: the relationship with the imbalance of pro-inflammatory neutrophil-associated cytokines and interferon- α deficiency. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2022, Vol. 20, no. 4, pp. 12-24. (In Russ.)]
3. Нестерова И.В., Городин В.Н., Чудилова Г.А., Чапурина В.Н., Матушкина В.А., Габдрахманова Р.Ю., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Малиновская В.В., Семенов Т.А. Эффекты влияния рекомбинантного интерферона α -2b на фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов пациентов с COVID-19 // Инфекционные болезни, 2022. Т. 20, № 1. С. 43-51. [Nesterova I.V., Gorodin V.N., Chudilova G.A., Chapurina V.N., Matushkina V.A., Gabdrakhmanova R.Yu., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Malinovskaya V.V., Semenenko T.A. Effects of recombinant interferon α -2b on the phenotype of neutrophil granulocyte subpopulations of patients with COVID-19. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2022, Vol. 20, no. 1, pp. 43-51. (In Russ.)]
4. Нестерова И.В., Халтурина Е.О., Малиновская В.В. Клинико-иммунологическая эффективность интеграционной программы реабилитации иммунной системы у пациентов с атипичной хронической активной герпесвирусной коинфекцией до и во время COVID-19, а также в постковидном периоде // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 37. С. 30-41. [Nesterova I.V., Khalturina E.O., Malinovskaya V.V. Clinical and immunological effectiveness of the integration program for the rehabilitation of the immune system in patients with atypical chronic active herpesvirus coinfection before and during COVID-19, as well as in the postcovid period. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18, no. 37, pp. 30-41. (In Russ.)]
5. Хасанова Д.Р., Житкова Ю.В., Васкаева Г.Р. Постковидный синдром: обзор знаний о патогенезе, нейропсихиатрических проявлениях и перспективах лечения // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика, 2021. Т. 13, № 3. С. 93-98. [Khasanova D.R., Zhitkova Yu.V., Maskaeva G.R. Postcovid syndrome: a review of knowledge about pathogenesis, neuropsychiatric manifestations and treatment prospects. *Nevrologiya, neyropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*, 2021, Vol. 13, no. 3, pp. 93-98. (In Russ.)]
6. Banko A., Miljanovic D., Cirkovic A. Systematic review with meta-analysis of active herpesvirus infections in patients with COVID-19: Old players on the new field. *Int. J. Infect. Dis.*, 2023, Vol. 130, pp. 108-125.
7. Chen J., Song J., Dai L., Post S.R., Qin Z. SARS-CoV-2 infection and lytic reactivation of herpesviruses: a potential threat in the postpandemic era? *J. Med. Virol.*, 2022, Vol. 94, pp. 5103-5111.
8. Chua R.L., Lukassen S., Trump S., Hennig B.P., Wendisch D., Pott F., Debnath O., Thürmann L., Kurth F., Völke M. T., Kazmierski J., Timmermann B., Twardziok S., Schneider S., Machleidt F., Müller-Redetzky H., Maier M., Krannich A., Schmidt S., Balzer F., Liebig J., Loske J., Suttorp N., Eils J., Ishaque N., Liebert U. G., von Kalle C., Hocke A., Witzernath M., Goffinet C., Drosten C., Laudi S., Lehmann I., Conrad C., Sander L.-E., Eils R. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat. Biotechnol.*, 2020, Vol. 38, pp. 970-979.
9. Inoue S., Hatakeyama J., Kondo Y., Hifumi T., Sakuramoto H., Kawasaki T., Taito S., Nakamura K., Unoki T., Kawai Y., Kenmotsu Y., Saito M., Yamakawa K., Nishida O. Post-intensive care syndrome: its pathophysiology, prevention, and future directions. *Acute Med. Surg.*, 2019, Vol. 6, no. 3, pp. 233-246.
10. Lescure F.X., Bouadma L., Nguyen D., Parisey M., Wicky P.H., Behillil S., Gaymard A., Bouscambert-Duchamp M., Donati F., Le H.Q., Enouf V., Houhou-F.N., Valette M., Mailles A., Lucet J.-C., Mentre F., Duval X.,

Descamps D., Malvy D., Timsit J.-F., Lina B., van-der-Werf S., Yazdanpanah Y. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: A case series. *Lancet Infect. Dis.*, 2020, Vol. 20, no. 6, pp. 697-706.

11. Reusch N., de Domenico E., Bonaguro L., Schulte-Schrepping J., Baßler K., Schultze J.L., Aschenbrenner A.C. Neutrophils in COVID-19. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 652470. doi: 10.3389/fimmu.2021.652470.

12. Simonnet A., Engelmann I., Moreau A.S., Garciaa B., Sixa S., Kalioubie A.E., Robriquet L., Hober D., Jourdain M. High incidence of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human-herpes virus-6 reactivations in critically ill patients with COVID-19. *Infect. Dis.*, 2021, Vol. 51, no. 3, pp. 296-299.

13. Yang J., Zheng Y., Gou X., Pu K., Chen Z., Guo Q., Ji R., Wang H., Wang Y., Zhou Y. Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 94, pp. 91-95.

14. Zubchenko S., Kril I., Nadizhko O., Matsyura O., Chopyak V. Herpesvirus infections and post-COVID-19 manifestations: a pilot observational study. *Rheumatol. Int.*, 2022, Vol. 42, no. 9, pp. 1523-1530.

Авторы:

Атажыхова М.Г. — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Нестерова И.В. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар; профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адаптологии факультета непрерывного медицинского образования Медицинского института, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Чудилова Г.А. — д.б.н., доцент, заведующая отделом клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Матушкина В.А. — ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Ковалева С.В. — д.м.н., старший научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Чапурина В.Н. — ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Authors:

Atazhakhova M.G., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar; Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, Medical Institute, P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Chudilova G.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Research Laboratory, Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Matushkina V.A., Assistant Professor, Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Kovaleva S.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chapurina V.N., Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation