

И.В. Нестерова^{1,3}, Е.О. Халтурина², В.Н. Нелюбин⁴, С.В. Хайдуков⁵, Г.А. Чудилова³,
В.В. Малиновская⁶

НЕОДНОЗНАЧНОСТЬ ВЛИЯНИЙ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА $\alpha 2B$ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VITRO НА УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ ЯДЕРНОГО ФАКТОРА NF-KB, РЕЦЕПТОРОВ IFN α | β R И IFN γ R (CD119) НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ ГЕРПЕС-ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

¹ФГАБОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки России, Москва, Россия

²ФГАОУ ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

³ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Россия

⁴ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия

⁵ФНЦ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», Москва, Россия

⁶ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме:

Введение. Нейтрофильные гранулоциты (НГ) и система интерферонов (IFN) играют ведущую роль в противовирусной иммунной защите. У пациентов, страдающих атипичными хроническими активными герпес-вирусными инфекциями (АХА-ГВИ), часто наблюдается нейтропения и нарушение индуцированной продукции IFN α / β и IFN γ . Не исключено, что у этих пациентов имеются различные нарушения внутриклеточного сигналинга на всех этапах синтеза IFN α / β клетками иммунной системы, в т. ч. и НГ, что приводит к дефициту IFN α / β . Адекватный уровень экспрессии ядерного фактора NF-kB на последних этапах сигналинга позитивно влияет на синтез IFN α / β , а нарушения экспрессии NF-kB могут приводить к дефектам синтеза IFN α / β .

Цель исследования: уточнить особенности экспрессии ядерного фактора NF-kB, мембранных рецепторов IFN α | β R и IFN γ R (CD119) НГ пациентов с АХА-ГВИ с последующей оценкой эффектов влияния на них рекомбинантного IFN $\alpha 2b$ (recIFN $\alpha 2b$) в экспериментальной системе in vitro.

Материалы и методы. В основную группу исследования (ОГИ) включены 25 пациентов с АХА-ГВИ обоего пола в возрасте 23-64 лет. В комплексе исследования для детекции герпес-вирусных инфекций и уровней IFN α и IFN γ использовали метод серодиагностики (ИФА), для обнаружения генома вирусов – PCR-RT. В системе in vitro исследованы 407 образцов крови. Для оценки количества (%) НГ экспрессирующих NF-kB, IFN α | β R, IFN γ R и уровня их экспрессии до и после инкубации с recIFN $\alpha 2b$ использовали метод проточной цитофлюориметрии. Применены адекватные статистические методы.

Результаты: у пациентов, страдающих АХА-ГВИ, был выявлен дефицит индуцированной продукции IFN α и IFN γ на фоне снижения плотности экспрессии ядерного фактора NF-kB НГ, а также нарушения экспрессии мембранных рецепторов IFN α | β R, IFN γ R. RecIFN $\alpha 2b$ в системе in vitro оказал неоднозначное влияние на экспрессию NF-kB, IFN α | β R и IFN γ R НГ.

Заключение: дефицит индуцированной продукции IFN α и IFN γ у пациентов с АХА-ГВИ ассоциирован с вариативными изменениями экспрессии NF-kB, IFN α | β R и IFN γ R НГ. RecIFN $\alpha 2b$ в системе in vitro оказывает неоднозначное влияние на измененную экспрессию NF-kB, IFN α | β и IFN γ НГ, что, по-видимому, зависит от врожденного или приобретенного характера этих нарушений.

Ключевые слова: герпес-вирусные инфекции, система интерферона, ядерный фактор NF-kB, нейтрофильные гранулоциты.

Образец цитирования: Нестерова И.В., Халтурина Е.О., Нелюбин В.Н., Хайдуков С.В., Чудилова Г.А., Малиновская В.В. Неоднозначность влияний рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ в эксперименте in vitro на уровни экспрессии ядерного фактора NF-kB, рецепторов IFN α | β R и IFN γ R (CD119) нейтрофильных гранулоцитов пациентов с хроническими герпес-вирусными инфекциями // Цитокины и воспаление. – 2022. – Т. 19, № 1-4. – С. 38-46.

Nesterova I.V.^{1,3}, Khalturina E.O.², Nelyubin V.N.⁴, Khaidukov S.V.⁵, Chudilova G.A.³

V.V. Malinovskaya⁶

AMBIGUITY EFFECTS OF RECOMBINANT INTERFERON $\alpha 2B$ IN AN IN VITRO EXPERIMENT ON THE EXPRESSION OF NUCLEAR FACTOR NF-KB, IFN α ' β R AND IFN γ R (CD119) RECEPTORS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES OF PATIENTS WITH CHRONIC HERPES VIRUS INFECTIONS

¹The Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia,

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

³Kuban state medical university, Krasnodar, Russia,

⁴Moscow State University of Medicine and Dentistry Moscow, Russia;

⁵Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry, Moscow, Russia

⁶National Research Centre for Epidemiology and Microbiology N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Neutrophil granulocytes (NGs) and the interferon's system (IFN) play a leading role in antiviral immune defense. At the same time, patients suffering from atypical chronic active herpes-viral infections (ACA-HVI) often have neutropenia and impaired induced IFN α/β and IFN γ production. It is possible that these patients have various disorders of intracellular signaling at all stages of IFN α/β synthesis by immune system cells, including NG, which leads to IFN α/β deficiency. An adequate level of nuclear factor NF-kB expression has positive effects on synthesis of IFN α/β in the last stages of signaling. The disturbances in the expression of NF-kB can lead to defects in the synthesis of IFN α/β .

The aim: to clarify the features of nuclear factor NF-kB, membrane receptors IFN α/β R and IFN γ R (CD119) expression on NG of patients with ACA-HVI, with the subsequent assessment of the recombinant IFN α 2b (recIFN α 2b) effects on them in the experimental system in vitro.

Materials and methods: 25 patients with ACA-HVI of both sexes aged 23-64 years were included in the main group of the study (MSG). In the complex of the study for the detection of herpes-viral infections: the method of serodiagnosis (ELISA), for the detection of the genome of viruses - PCR-RT. 407 blood samples were examined in the in vitro system. Flow cytofluorimetry was used to estimate the amount (%) of NG expressing NF-kB, IFN α/β R, IFN γ R, and their expression levels before and after incubation with recIFN α 2b. Adequate statistical methods were applied.

Results: In patients suffering from ACA-HVI, a deficiency of induced IFN α and IFN γ production was detected, due to a decrease in the expression density of nuclear factor NF-kB NG, as well as a violation of the expression of membrane receptors IFN α/β R, IFN γ R. RecIFN α 2b in the in vitro system had a mixed effect on the expression of NF-kB, IFN α/β R and IFN γ R NG.

Conclusion: The deficiency of induced IFN α and IFN γ production in patients with ACA-HVI is associated with variable changes in NF-kB, IFN α/β R and IFN γ R NG expression. RecIFN α 2b in the in vitro system has an ambiguous effect on altered expression of NF-kB, IFN α/β and IFN γ NG, which appears to depend on the innate or adaptive nature of these disorders. **Keywords:** herpesvirus infections, interferon system, nuclear factor NF-kB, neutrophilic granulocytes

Введение

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) и система интерферонов (IFN) играют ведущую роль в противовирусной иммунной защите. Активное развитие молекулярной иммунологии позволило расширить существующие представления о роли НГ, которые в настоящее время относят к ключевым регуляторным клеткам иммунной системы, способным регулировать работу врожденного и адаптивного иммунитета [1, 6]. Авторитетно доказана роль НГ в противовирусной иммунной защите, особенно на ранних стадиях контакта НГ с вирусами: фагоцитоз, формирование NETs, экзосом, реализация антителозависимой цитотоксичности, позитивная и негативная регуляция активности Т- и В-лимфоцитов, естественных киллерных клеток (ЕКК), экспрессия рецепторов и т. д. Эффекторная активность НГ зависит от уровня экспрессии различных рецепторов [7].

Многими авторами показано, что вирусы, в частности вирусы семейства Herpesviridae, способны негативно влиять на функции НГ, трансформировать их фенотип, активировать апоптоз, что приводит к нейтропении, депрессии функциональной активности НГ [1, 7].

После контакта с вирусами реализуется I этап синтеза IFN α/β , сопровождающийся экспрессией генов, ответственных за синтез IFN α плазматическими дендритными клетками. IFN α , связываясь с рецепторами IFN α/β R, запускает II этап синтеза

IFN α/β другими клетками иммунной системы (ИС). В сигнальном процессе, на всех этапах синтеза IFN α/β , участвует ядерный фактор NF-kB, уровень активации которого влияет на синтез IFN α/β . Эндогенный и экзогенный IFN α , в том числе и рекомбинантный IFN α 2b (recIFN α 2b), при связывании с рецепторами IFN α/β R и запускают II этап синтеза IFN α .

NF-kB/Rel-семейство транскрипционных факторов состоит из нескольких структурно родственных белков, образующих гомодимеры и гетеродимеры, и включает p50/p105, p52/p100, RelA (p65) и c-Rel/NF-kB. Члены этого семейства ответственны за регуляцию свыше 150 генов-мишеней, включая экспрессию генов провоспалительных цитокинов, иммунорецепторов и молекул клеточной адгезии. Вследствие чего NF-kB часто называют центральным медиатором иммунной системы человека. Действуя как димеры, эти факторы транскрипции связываются с ДНК в kB сайтах, тем самым регулируя экспрессию генов-мишеней. Показано, что в большинстве типов клеток, в т. ч. НГ, NF-kB может быть индуцирован в ядре при воздействии одного из индукторов: TNF α (фактора некроза опухолей), PMA (форболовых эфиров), LPS (липополисахаридов) и многих других. Участки связывания транскрипционного фактора NF-kB присутствуют в регуляторных областях большого количества различных генов. В основном это гены иммунного ответа и воспалительных реакций. NF-kB регулирует транскрипцию генов κ -цепи Ig,

интерлейкинов 2, 6 и 8 TCR (рецептора Т-клеток), ГКГС (главного комплекса гистосовместимости) I и II, факторов роста GM-CSF, G-CSF, цитокинов TNF α и TNF β , β -интерферона, C4 белка системы комплемента, онкогена c-шус [12, 13], вирусов HIV, SV-40, CMV, аденовирусов и других [8, 15]. NF- κ B принимает участие в регуляции таких процессов, как активация Т-лимфоцитов и терминальная дифференцировка В-лимфоцитов [13]. Классическим индуктором активации NF- κ B является фактор некроза опухоли (TNF α). Недавно было показано, что NF- κ B активирует транскрипцию генов TRAF1 и TRAF2, что приводит к подавлению активности каспазы-8 и блокировке апоптоза [14].

Ядерный фактор NF- κ B играет важную роль в реализации процессов острого и хронического воспаления и тем самым участвует в иммунопатогенезе многих иммунозависимых заболеваний. В связи с изложенным немаловажной проблемой является разработка новых экспериментальных и клинических, в том числе терапевтических, подходов направленных на восстановление его нормального функционирования.

Проблема лечения атипично протекающих активных хронических герпес-вирусных ко-инфекций (ВЭБ, ВЧГБ, ЦМВ, ВПГ1/2 тип) (АХА-ГВИ), ассоциированных с поствирусным синдромом хронической усталости, фибромиалгией, артралгией и различными когнитивными и мнестическими расстройствами, чрезвычайно актуальна и требует постоянного совершенствования подходов к ее решению. Показано, что у пациентов с АХА-ГВИ имеется интерферопатия: дефицит индуцированной в системе *in vitro* продукции IFN α [3, 10]. В то же время исследований, посвященных изучению экспрессии ядерного фактора NF- κ B в нейтрофильных гранулоцитах, играющих, с современной точки зрения, большую роль в противовирусной иммунной защите организма, до настоящего времени не проводилось. В связи с чем определенный интерес, с нашей точки зрения, представляет изучение особенностей индуцированной продукции IFN α и IFN γ , экспрессии ядерного фактора NF- κ B, экспрессии мембранных рецепторов IFN α | β R и IFN γ R НГ пациентов, страдающих АХА-ГВИ, и поиск различных иммуотропных субстанций в эксперименте *in vitro* с оценкой их одномоментного модулирующего влияния на восстановление нормальных уровней экспрессии ядерного фактора NF- κ B и плотности экспрессии мембранных IFN α | β R и IFN γ R НГ.

Цель исследования: уточнить особенности экспрессии ядерного фактора NF- κ B, мембранных рецепторов IFN α | β R и IFN γ R (CD119) НГ пациентов с АХА-ГВИ с последующей оценкой эффектов влияния на них рекомбинантного IFN α 2b (recIFN α 2b) в экспериментальной системе *in vitro*.

Материалы и методы

Под нашим наблюдением находились 25 пациентов обоего пола в возрасте от 23 до 64 лет (основная группа исследования – ОГИ), страдающих атипичными хроническими активными герпес-вирусными инфекциями (АХА-ГВИ), манифестирующими синдромом хронической усталости (СХУ), различными когнитивными и мнестическими расстройствами. Для этой группы пациентов характерен определенный симптомокомплекс, включающий в себя ряд симптомов, патогномоничных для нейроиммуновоспалительных процессов, сопровождающих течение АХА-ГВИ. Для оценки выраженности клинических симптомов СХУ использовалась разработанная нами 5-балльная шкала. Группу сравнения (ГС) составили 8 условно здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту.

В комплекс исследования помимо традиционных методов (сбор анамнеза, методы физикального обследования, ОАК и пр.) для детекции герпес-вирусных инфекций использовались методы серодиагностики (классов IgM VCA EBV, IgG VCA EBV, IgG EBNA, IgG HHV6, IgM CMV, IgG CMV, IgM HSV1/2, IgG HSV1/2) с помощью ИФА тест-систем НПО «Диагностические системы» (Россия). Для обнаружения генома вирусов в биоматериалах (кровь, слюна, моча, соскоб с миндалин и задней стенки глотки) был использован метод PCR-Real time тест-системы «АмплиСенс» (Россия). В системе *in vitro* исследованы 32 образца крови 8 условно здоровых взрослых лиц и 375 образцов крови от 25 пациентов, страдающих АХА-ГВИ. Индуцированная продукция IFN α и IFN γ определялась иммуноферментным методом после воздействия на мононуклеары специфических индукторов: вируса Ньюкасла и ФГА соответственно. Методом проточной цитометрии (проточный цитофлуориметр FC 500 Beckman Coulter, США) с использованием набора Amnis® NF- κ B Translocation Kit (Luminex Corporation, USA), а также конъюгатов МкАТ anti-hIFN- α / β , CD119 (RD Systems, USA) были исследованы: экспрессия ядерного фактора NF- κ B (метод был модифицирован для проточной цитометрии), а также мембранных IFN α | β R, IFN γ R (CD119) НГ. Оценивалось количество (%) НГ периферической крови, экспрессирующих ядерный фактор NF- κ B, мембранные рецепторы IFN α | β R, IFN γ R (CD119) и интенсивность их экспрессии по MFI до и после инкубации с рекомбинантным IFN α 2b (5 ME recIFN α 2b в 100 мкл фосфатного буфера в течение 60 мин., при температуре 37 °C). Рекомбинантный IFN α 2b был любезно предоставлен для экспериментального исследования ФГУП «ГосНИИ особо чистых препаратов» ФМБА РФ.

Исследование было одобрено комиссией по вопросам этики. Согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA

Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) у всех пациентов было получено 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 (верхний и нижний квартиль) Me [Q1; Q3], определялись критерии Манна-Уитни и Вилкоксона. Различия полагали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При анализе клинического материала было установлено, что все пациенты основной группы исследования (ОГИ) страдали микст АХА-ГВИ с доминированием ВЭБ. При этом лидирующими сочетаниями являлись: ВЭБ+ЦМВ+ВЧГ6 – 52 %, ВЭБ+ВПГ1 – 36 %; ВЭБ+ЦМВ – 12 % случаев. Выявлен ряд клинических особенностей, характерных для микст АХА-ГВИ, к которым относятся: длительное ощущение выраженной слабости, хронической усталости, плохая переносимость адекватной физической активности, кроме того, пациентов беспокоят потливость, непостоянные боли в горле, в мышцах и суставах (фибромиалгии и артралгии), головные боли, субфебрильная температура, лимфаденопатия, нарушение сна, снижение памяти, внимания, интеллекта, реже – психогенная депрес-

сия. Нередко имеют место вирус-ассоциированные рекуррентные ОРВИ, хронические бактериальные и грибковые инфекции, наблюдается выраженная коморбидность. Заболевания, ассоциированные с АХА-ГВИ, характеризуются упорно-рецидивирующим течением.

Все эти характерные для АХА-ГВИ симптомы были оценены с использованием разработанной нами ранее 5-балльной шкалы для оценки выраженности клинических симптомов / критериальных признаков у пациентов, страдающих атипичной хронической активной герпес-вирусной ко-инфекцией, ассоциированной с синдромом хронической усталости (СХУ) и когнитивными расстройствами [10]. При оценке учитывалось наличие или отсутствие симптомов. Их ранжирование в зависимости от тяжести проявления производилось в баллах от 0 до 5, где: 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 [25, 26] (таб.1).

Выраженность симптомов, оцененная по этой шкале, составляла Me [Q1; Q3] 53,5 [45,0;61,5] баллов.

Диагноз АХА-ГВИ был подтвержден методами серодиагностики (ИФА), молекулярно-генетическими методами (ПЦР). Кроме того, были установлены нарушения индуцированной продукции IFN α в 100,0 % и дефицит индуцированной продукции IFN γ в 76,0% случаев.

Таблица 1

Степень выраженности клинических симптомов / критериальных признаков у пациентов, страдающих АХА-ГВИ (в баллах)

Симптом	Балл Me [Q1; Q3]
• Хроническая усталость	4,5 [3,5;5,0]
• Непереносимость адекватной физической нагрузки	4,0 [3,5; 4,5]
• Длительный субфебрилитет	3,5 [2,5; 4,5]
• Боль и дискомфорт в горле	4,0 [3,5; 4,5]
• Повышенная потливость, зябкость, чувствительность к холоду	4,5 [4,0; 5,0]
• Головная боль, мигрень	4,5 [4,0; 5,0]
• Регионарная лимфаденопатия	4,0 [3,5; 4,5]
• Повышенная утомляемость, снижение продуктивности труда	4,5 [4,0;5,0]
• Неврологические расстройства (парестезия, синестезия, расстройства чувствительности, низкий тонус мышц и т. д.)	3,5 [2,5; 4,5]
• Снижение памяти, концентрации внимания	4,0 [3,5; 4,5]
• Цефалгии, артралгии, миалгии	4,5 [4,0; 5,0]
• Нарушения сна (бессонница или повышенная сонливость)	4,5 [4,0; 5,0]
• Панические атаки, нарушения настроения, эмоциональная лабильность, психогенная депрессия и т. д.	3,5 [2,5; 4,5]
• Сумма баллов	53,5 [45,0;61,5]

Сравнительная характеристика экспрессии ядерного фактора NF-kB, мембранных рецепторов IFN α / β R и IFN γ R на НГ условно здоровых лиц и пациентов, страдающих АХА – ГВИ

Количество НГ, экспрессирующих ядерный фактор NF- kB, рецепторы IFN α / β R и IFN γ R						
Группы исследования	IFN γ R Me (Q1; Q2)		IFN α / β R Me (Q1; Q2)		NF- kB Me (Q1; Q2)	
Группа сравнения n=6	%	MFI	%	MFI	%	MFI
	29,65 (14,3;42,7)	1,48 (1,1; 2,2)	4,55 (2,3; 7,2)	1,19 (1,15;1,22)	100,0	8,9 (8,7;10,1)
Основная группа исследования n=25	%	MFI	%	MFI	%	MFI
	39,5 (27,2;52,0)	1,48 (1,4; 1,8)	1,0* (0,6;1,9)	1,71 (1,61;1,91)	100,0	6,3* (4,8;7,5)

Примечание: *достоверность различия между группой сравнения и основной группой исследования, $p < 0,05$.

В эксперименте in vitro было установлено, что в 100,0 % НГ пациентов основной группы исследования (ОГИ) и группы сравнения (ГС) экспрессировали NF-kB. При этом основные различия были выявлены между ОГИ и ГС при тестировании MFI NF-kB НГ (табл. 2, рис. 1).

Анализ полученных данных показал, что у условно здоровых лиц ГС НГ экспрессируют ядерный фактор NF-kB в 100,0 % случаев с MFI 8,68 [6,84;8,95]. Кроме того, было показано, что в основной группе исследования (ОГИ) также, как и в группе сравнения (ГС), 100,0% НГ экспрессируют ядерный фактор NF-kB. Однако в ОГИ по сравнению с ГС выявлено значительное и достоверное снижение уровня плотности экспрессии NF-kB по показателю MFI до 6,34 [4,82;7,54] ($p < 0,05$).

Кроме того, установлено, что у условно здоровых лиц ГС 4,55 [2,3;7,2] % НГ экспрессируют мембранные рецепторы IFN α / β R с уровнем плотности экспрессии по MFI 1,19 [1,15;1,22], 29,65 [14,3;42,7] % НГ - IFN γ R (CD119) с уровнем плотности экспрессии

по MFI 1,48 [1,14;2,22]. В основной группе исследования (ОГИ) НГ экспрессируют рецепторы IFN α / β R в 1,0 [0,6;1,9] % с уровнем плотности экспрессии по MFI 1,71 [1,61;1,91], IFN γ R (CD119) – в 39,5 [27,18;52,03] % с уровнем плотности экспрессии по MFI 1,48 [1,35;1,72].

Показано, что под влиянием recIFN α 2b происходит разделение популяции НГ основной группы (ОГИ) экспрессирующих NF-kB на две группы: группа исследования 1 (ГИ1) и группа исследования 2 (ГИ2). Так, в ГИ1 отмечается низкая плотность экспрессии NF-kB НГ по MFI 6,2 [5,13; 6,83], не отличающаяся от уровня такового до воздействия recIFN α 2b - MFI - 6,34 [4,82;7,54] ($p > 0,01$). В противоположность ГИ1 в ГИ2 отмечается достоверное повышение плотности экспрессии NF-kB под влиянием recIFN α 2b: число молекул NF-kB НГ по MFI увеличилось с 6,34 [4,82;7,54] до 8,11 [7,92; 9,78] ($p < 0,05$). (Таб.3, Рис.2.)

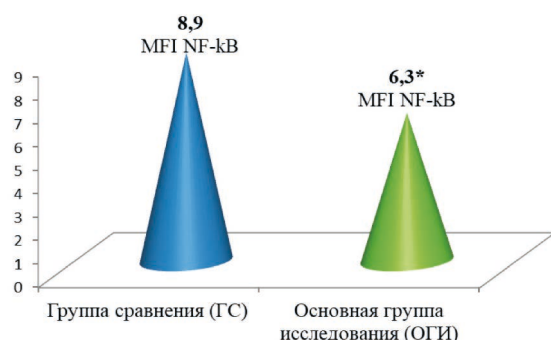


Рис. 1. Уровни экспрессии по MFI ядерного фактора NF-kB НГ у условно здоровых лиц (ГС) и пациентов, страдающих АХА-ГВИ (ОГИ).

*Достоверность различия между группой сравнения (ГС) и основной группой исследования (ОГИ) при $p < 0,05$

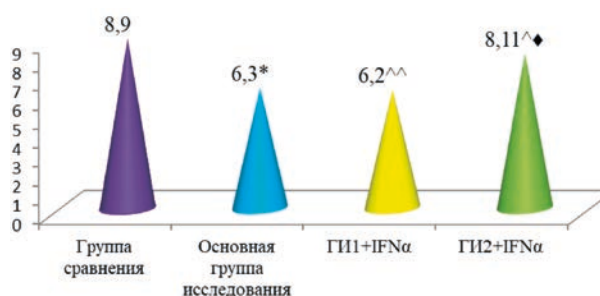


Рис. 2. Сравнение уровней экспрессии по MFI ядерного фактора NF kB НГ пациентов, страдающих АХА-ГВИ, до и после воздействия recIFN α 2b в экспериментальной системе in vitro.

* – достоверность различия между ГС и ОГИ; $p < 0.05$.

^^ – достоверность различия между ГС и ГИ1+IFN α 2; $p < 0.05$.

^ – достоверность различия между группами исследования ГИ1 и ГИ2 $p < 0.05$.

♦ – достоверность различия между ОГИ и ГИ2+IFN α 2b; $p < 0.05$.

Сравнительная характеристика экспрессии ядерного фактора NF-κB, мембранных рецепторов IFNα|βR и CD119 (IFNγR) НГ условно здоровых лиц и пациентов, страдающих АХА – ГВИ до и после воздействия recIFNα2b в эксперименте in vitro

До воздействия recIFNα2b в экспериментальной системе in vitro						
Группы исследования	IFNγR Me (Q1; Q2)		IFN α βR Me (Q1; Q2)		NF- κB Me (Q1; Q2)	
Группа сравнения (ГС) n=8	%НГ	MFI	%НГ	MFI	%НГ	MFI
	19,9 (14,3;27,6)	1,48 (1,1;2,2)	4,55 (2,3;7,2)	1,19 (1,15;1,22)	100,0	8,9 (8,7;10,1)
Основная группа исследования (ОГИ) n=25	39,5* (28,7;48,6)	1,48 (1,35;1,75)	1,0* (0,6;1,9)	1,71* (1,61;1,91)	100,0	6,3 (4,8;7,5)
После воздействия recIFNα2b в экспериментальной системе in vitro						
Группы исследования	IFNγR Me (Q1;Q2)		IFN α βR Me (Q1;Q2)		NF- κB Me (Q1;Q2)	
	%НГ	MFI	%НГ	MFI	%НГ	MFI
Группа исследования 1 (ГИ1) n=13	54,35* (44,25;66,78)	1,63 (1,43;1,83)	3,0^ (1,21;4,13)	1,61 (1,47;1,95)	100,0	6,2 (5,13; 6,83)
Группа исследования 2 (ГИ2) n=12	61,95* (21,6; 67,85)	1,58 (1,46;1,82)	0,9^^ (0,7; 1,4)	1,77 (1,65; 1,81)	100,0	8,11* (7,92; 9,78)

Примечание: * – достоверность различий от контроля $p < 0.05$; ^ – достоверность различия между ОГИ и ГИ1 $p < 0.05$; ^^ – достоверность различия между группами исследования ГИ1 и ГИ2 $p < 0.05$.

Принимая во внимание разделение основной группы исследования (ОГИ) на 2 группы ГИ1 и ГИ2, с ориентацией на низкий или высокий уровни экспрессии NF-κB по MFI после воздействия recIFNα2b, оценка влияния recIFNα2b на количество НГ, несущих мембранные IFNα|βR и IFNγR, и на уровни плотности экспрессии этих рецепторов была проведена также в группах исследования: ГИ1 и ГИ2.

В первой группе (ГИ1) (52 % случаев) под влиянием recIFNα2b выявлено достоверное увеличение по сравнению с исходными значениями % НГ, экспрессирующих как IFNα|βR – до 3,0 [1,21;4,13] %, так и IFNγR 54,35 [44,25;69,78] % ($p_{1,2} < 0,05$) (рис. 3, 4). Этот факт свидетельствует об увеличении уровня экспрессии рецепторов IFNα|βR и IFNγR на мембранной поверхности НГ на 300 и 37,5 % соответственно (увеличение в 3 раза и 1.37 раза), при этом плотность экспрессии рецепторов по показателю MFI не менялась ($p_{1,2} > 0,05$). Во второй группе (ГИ2) (48 % случаев) показано отсутствие динамики уровня НГ,

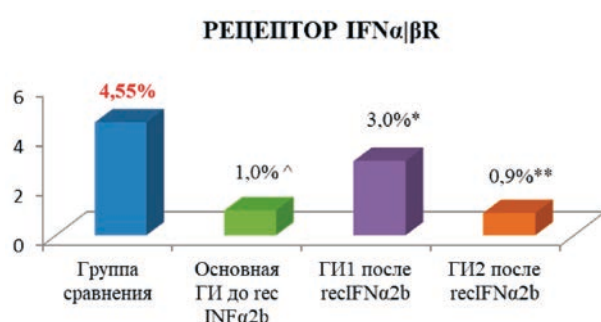


Рис. 3. Количество НГ, экспрессирующих мембранный рецептор IFNα|βR до и после воздействия recIFNα2b у пациентов, страдающих АГА-ГВИ (в %).

^ – достоверность различия между ГС и ОГИ, $p < 0.05$

* – достоверность различий между ОГИ и ГИ1 после recIFNα2b, $p < 0.05$.

** – достоверность различия между ГС и ГИ2 после recIFNα2b, $p < 0.05$



Рис. 4. Количество НГ, экспрессирующих мембранный рецептор IFNγR (CD119) до и после воздействия recIFNα2b у пациентов, страдающих АХА-ГВИ (в %).

* – статистически значимые различия по отношению к группе сравнения, $p < 0.05$

экспрессирующих под влиянием $reclFN\alpha 2b$, при этом плотность экспрессируемых $IFN\alpha|\beta R$ по MFI не менялись ($p_{1,2,3} > 0,05$). В тоже время под влиянием $reclFN\alpha 2b$ произошло увеличение % НГ, несущих мембранные рецепторы $IFN\gamma R$ с 39,5 [27,18;52,03] % до 61,95 [21,60;67,85] %, что составляет 56,8 %, при этом плотность экспрессии рецепторов по MFI 1,58 [1,46;1,82] не изменилась ($p > 0,05$).

Обсуждение

Принимая во внимание, что у пациентов, включенных в данное исследование (ОГИ), ВЭБ является доминирующим и присутствует во всех выявленных комбинациях герпес-вирусных ко-инфекций, необходимо учитывать особенности его негативного влияния на экспрессию ядерного фактора NF-kB и рецепторов $IFN\alpha|\beta R$, $IFN\gamma R$ на мембране НГ. По данным литературы, BGLF2 белок ВЭБ ингибируют два ключевых белка STAT1 и STAT2, которые участвуют в сигналинге II этапа синтеза $IFN I$ типа [4,5]. Кроме того, BGLF2 рекрутирует ферменты клетки-хозяина для удаления фосфатной группы из STAT1, тем самым инактивируя ее активность, и перенаправляет STAT2 на деградацию, что приводит к дефектной экспрессии интерферон стимулированных генов (ISG) и нарушению синтеза $IFN I$ типа, а следовательно, к снижению противовирусной и иммуномодулирующей активности $IFN I$ типа [2, 3, 4, 8, 11]. Эти данные подтверждают негативное повреждающее влияние ВЭБ, являющееся причиной возникновения вторичных дефектов экспрессии не только NF-kB, но и мембранных рецепторов $IFN\alpha|\beta R$, и не противоречат результатам, полученным нами при проведении настоящего исследования.

Необходимо отметить, что не исключена вероятность врожденных нарушений в системе интерферонов у пациентов с АХА-ГВИ, что обуславливает, во-первых, возникновение нетипично протекающих герпес-вирусных ко-инфекций и, во-вторых, подтверждается отсутствием адекватного ответа NF-kB на воздействие $reclFN\alpha 2b$ в системе *in vitro* в ГИ1.

По данным российских и зарубежных авторов, существуют также сведения о том, что хроническая ВЭБ инфекция может приводить к повышению экспрессии ядерного фактора NF-kB, что, в свою очередь, может провоцировать развитие аутоиммунных заболеваний и опухолевых процессов. Следует подчеркнуть, что у пациентов ОГИ мы не наблюдали аутоиммунных нарушений и опухолевых процессов, но при этом отмечали ведущий синдром хронической усталости, миалгии, артралгии и синдром малых когнитивных расстройств, которые являются клиническими критериями нейроиммуновоспалительных процессов.

В заключение хотелось бы отметить, что полученные в настоящем исследовании результаты позволяют уточнить иммунопатогенез атипичных хронических активных герпес-вирусных ко-инфекций, ассоциированных с доминированием ВЭБ инфекции. Эти данные свидетельствуют также о позитивном влиянии $reclFN\alpha 2b$ в эксперименте *in vitro* на статистически значимое восстановление уровня экспрессии ядерного фактора NF-kB, а также экспрессии мембранных рецепторов $IFN\alpha|\beta R$ НГ при, предположительно, вторичных дефектах системы интерферонов, сопровождающихся дефицитом $IFN I$ и II типа. Полученные результаты могут послужить основой для дальнейшей разработки стратегии и тактики применения иммуномодулирующих препаратов на основе безопасного как для детей, так и для взрослых, препарата интерферона $\alpha 2b$ в комплексе с антиоксидантами для локального и системного применения (гель Виферон®, суппозитории Виферон® Россия) при хронических герпес-вирусных инфекциях в клинической практике. В тоже время у пациентов, имеющих изначально низкий уровень экспрессии ядерного фактора NF-kB, НГ которых не ответили на воздействие $reclFN\alpha 2b$ в системе *in vitro*, по-видимому, имеются врожденные дефекты синтеза $IFN I$ типа, обусловленные неадекватно низким уровнем экспрессии ядерного фактора NF-kB. Для достижения позитивного клинического эффекта у таких пациентов с АХА-ГВИ будет необходимо применение заместительной интерферонотерапии длительными курсами, в высоких дозах. В то время как пациентам, у которых изначально низкий уровень экспрессии NF-kB, НГ достоверно повысился до уровня условно здоровых лиц, т. е. имеется позитивный ответ на воздействие $reclFN\alpha 2b$ в системе *in vitro*, будет полезным назначение интерферонотерапии в стандартных дозах.

Заключение

В результате проведенного исследования у пациентов, страдающих АХА-ГВИ, были выявлены дефекты противовирусной иммунной защиты: снижение плотности экспрессии одного из главных факторов внутриклеточного сигналинга, отвечающего за продукцию $IFN I$ типа – ядерного фактора NF-kB, на фоне установленного дефицита нарушения индуцированной продукции $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$, а также нарушения экспрессии мембранных рецепторов $IFN\alpha|\beta R$ и $IFN\gamma R$ НГ. Полученные данные позволили сформулировать определенные выводы:

1. У всех пациентов, страдающих АХА-ГВИ на фоне дефицита сывороточного $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$, имеет место нарушение экспрессии ядерного фактора NF-kB, ассоциированное со снижением уровня экспрессии мембранных рецепторов $IFN\alpha|\beta R$ НГ и повышением уровня экспрессии рецепторов $IFN\gamma R$ НГ.

2. Рекомбинантный IFN α 2b в системе *in vitro* оказывает неоднозначные вариативные эффекты влияния на экспрессию ядерного фактора NF- κ B и мембранных рецепторов IFN α | β и IFN γ НГ пациентов, страдающих АХА-ГВИ:

- У 52.0 % пациентов АХА-ГВИ (ГИ1) под влиянием recIFN α 2b в системе *in vitro* уровень экспрессии NF- κ B достоверно не изменился. В тоже время наблюдалось достоверное увеличение уровня экспрессии мембранных рецепторов IFN α | β НГ по сравнению с ОГИ (до воздействия recIFN α 2b), однако уровень экспрессии, характерный для НГ условно здоровых лиц ГС, достигнут не был. При этом имелось достоверное увеличение экспрессии рецепторов IFN γ НГ по сравнению с ОГИ и ГС.
- У 48.0 % пациентов АХА-ГВИ (ГИ2) под влиянием recIFN α 2b в системе *in vitro* наблюдалось достоверное восстановление экспрессии ядерного фактора NF- κ B до уровня такового у условно здоровых лиц группы сравнения. Параллельно произошло достоверное увеличение уровня экспрессии мембранных рецепторов IFN γ НГ, при этом уровень экспрессии рецепторов IFN α | β НГ не изменился.

3. Предположительно, у пациентов ГИ1 нарушения экспрессии NF- κ B имеют врожденный характер, поскольку воздействие recIFN α 2b не повлияло на уровень экспрессии NF- κ B, в то время как у пациентов ГИ2 нарушения экспрессии NF- κ B, по-видимому, носят приобретенный, вторичный характер, о чем свидетельствует восстановление уровня экспрессии NF- κ B под влиянием recIFN α 2b в эксперименте *in vitro*.

4. Полученные в настоящем исследовании результаты позволяют обосновать необходимость проведения интерферонотерапии у пациентов с АХА-ГВИ и разработать в дальнейшем дифференцированные терапевтические стратегии проведения интерферонотерапии у данной категории пациентов с врожденными или приобретенными дефектами системы интерферонов.

Список литературы / References

1. Нестерова И.В. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Г.А. Чудилова, Л.В. Ломтатидзе, С.В. Ковалева, А.А. Евлевский, Т.З.Л. Нгуен // Инфекция и иммунитет. – 2017. – Т. 7 (№ 3). – С. 219-230. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230.

2. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Халтурина Е.О., Малиновская В.В. Врожденные и

приобретенные интерферопатии, ассоциированные с нетипично протекающими вирусными инфекциями и с COVID-19 (монография) // СПб.: Диалог, 2022. – 600 с. ISBN:978-8469-0157-5

3. Татаурщикова Н.С., Летяева О.И., Федоскова Т.Г., Русанова А.С., Коваленко А.Л. Иммуномодулирующая терапия в лечении пациентов с реактивацией герпесвирусной инфекции на фоне COVID-19 // Эффективная фармакотерапия. – 2022. – Т. 18. № 12. – С. 64-67.

4. Charostad, J., Nakhaie, M., Dehghani, E. Faghihloo. The interplay between EBV and KSHV viral products and NF- κ B pathway in oncogenesis. // *Infect Agents Cancer* 15, 62 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13027-020-00317-4>.

5. de Oliveira DE, Ballon G, Cesarman E. NF- κ B signaling modulation by EBV and KSHV. // *Trends Microbiol.* 2010; 18(6):248–57. PubMed Article CAS PubMed Central Google Scholar].

6. Galli S.J. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils / S.J. Galli, N. Borregaard, T.A. Wynn // *Nat. Immunol.* – 2011. – V.12. – P. 1035–1044.

7. Geerdink R.J. Neutrophils in respiratory syncytial virus infection: A target for asthma prevention / R.J. Geerdink, J. Pillay, L. Meyaard, L. Bont // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* – 2015. – V.136(4). – P. 838-847.

8. Gimble JM, Duh E, Ostrove JM, Gendelman HE, Max EE, Rabson AB.

9. Activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 is associated with induction of a nuclear factor that binds to the NF-kappa B/core enhancer sequence.// *J Virol.* 1988 Nov;62(11):4104-12. doi: 10.1128/JVI.62.11.4104-4112.1988. PMID: 2845125

10. Jiang J, Zhao M, Chang C, Wu H, Lu Q. Type I Interferons in the Pathogenesis and Treatment of Autoimmune Diseases. // *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020 Oct; 59(2):248-272. doi: 10.1007/s12016-020-08798-2. PMID: 32557263 Review.

11. Nesterova I.V., Khalturina E. O., Malinovskaya V. V., Nguenduen L. Recombinant IFN α 2b in Complex with Immunotropic Drugs Restored Antiviral Functions of Subset IFN α /IFN γ +TLR4+NG Neutrophilic Granulocyte and Demonstrated Good Clinical Efficacy in Patients with Active Chronic Herpes-viral Infections and Chronic Fatigue Syndrome // *Allergy and Asthma, Covid-19 and Corp, Immunophysiology and Immunorehabilitation: Innovative Technologies. Filodiritto International Proceeding* P.69-79 (2021).

12. Patel A, Hanson J, McLean TI, Olgiate J, Hilton M, Miller WE, Bachenheimer SL. Herpes simplex type 1 induction of persistent NF-kappa B nuclear translocation increases the efficiency of virus

replication. // *Virology*. 1998 Aug 1; 247(2):212-22. doi: 10.1006/viro.1998.9243. PMID: 9705914

13. Paludan SR, Ellermann-Eriksen S, Kruys V, Mogensen SC. Expression of TNF-alpha by herpes simplex virus-infected macrophages is regulated by a dual mechanism: transcriptional regulation by NF-kappa B and activating transcription factor 2/Jun and translational regulation through the AU-rich region of the 3' untranslated region. // *J Immunol*. 2001 Aug 15; 167(4):2202-8. doi: 10.4049/jimmunol.167.4.2202. PMID: 11490006.

14. Poma P. NF-kB and Disease. // *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 2; 21(23):9181. doi: 10.3390/ijms21239181. PMID: 33276434; PMCID: PMC7730361.

15. Sun Q, Matta H, Chaudhary PM. The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein protects against growth factor withdrawal-induced apoptosis via NF-kappa B activation. // *Blood*. 2003 Mar 1; 101(5):1956-61. doi: 10.1182/blood-2002-07-2072. Epub 2002 Oct 24. PMID: 12406869

16. Vlach J, Pitha PM. Herpes simplex virus type 1-mediated induction of human immunodeficiency virus type 1 provirus correlates with binding of nuclear proteins to the NF-kappa B enhancer and leader sequence. // *J Virol*. 1992 Jun; 66(6):3616-23. doi: 10.1128/JVI.66.6.3616-3623.1992. PMID: 1316471

17. Wei H, Prabhu Lakshmi, Hartley Antja-Voy, Martin Matthew, Sun Emily, Jiang Guanglong, Liu Yunlong and Tao Lu. Methylation of NF-kB and its Role in Gene Regulation. // *Gene Expr Regulation Mamm Cells*. 2018:291.

Сведения об авторах:

Нестерова И.В., д-р мед. наук, проф., гл. науч. сотр. отд. клинической и экспериментальной иммунологии и

молекулярной биологии ЦНИЛ, ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, Краснодар; проф. каф. аллергологии и иммунологии ФНМО Мединститута ФГАОУ ВО РУДН Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация; e-mail: inesterova1@yandex.ru.

Халтурина Е.О., к.м.н., доцент, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. А.А. Воробьева ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия.

Нелюбин В.Н., д.м.н., профессор Научно-исследовательского медико-стоматологического института Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия.

Хайдуков С.В., д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории углеводов ФНЦ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия.

Чудилова Галина Анатольевна, д-р биол. наук, доцент, зав. отд. клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ, доц. каф. клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, Краснодар, Российская Федерация; e-mail: chudilova2015@yandex.ru.

Малиновская В.В., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории онтогенеза и коррекции системы интерферона ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия.

Автор для переписки

Нестерова Ирина Вадимовна, ФГАОУ ВО РУДН Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация, e-mail: inesterova1@yandex.ru.