

DOI: <https://doi.org/10.17816/CI635092>

Применение рекомбинантного интерлейкина-2 для коррекции фенотипа и функциональной активности НК-клеток у пациентов с постковидным синдромом

А.А. Савченко¹, И.В. Кудрявцев^{2,3}, Д.В. Исаков^{2,4}, И.С. Садовский¹, В.Д. Беленюк¹, А.Г. Борисов¹

¹ Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Красноярск, Россия;

² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

³ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия;

⁴ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Постковидный синдром развивается у 10–20% лиц, переболевших COVID-19, и характеризуется нарушением функции нервной, сердечно-сосудистой и иммунной систем. Ранее было установлено, что у пациентов, которые выздоровели после инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, наблюдалось снижение количества и функциональной активности НК-клеток. Целью исследования явилась оценка эффективности рекомбинантного человеческого интерлейкина-2, вводимого для коррекции фенотипа и функциональной активности НК-клеток, у пациентов с постковидным синдромом. Пациенты были обследованы через 3 месяца после острого COVID-19 различной степени тяжести. Фенотип НК-клеток периферической крови изучали методом проточной цитометрии. Установлено, что нарушения в составе субпопуляций клеток у больных с постковидным синдромом характеризовались низким уровнем зрелых ($p=0,001$) и цитотоксических НК-клеток ($p=0,013$) с повышенным содержанием незрелых НК-клеток ($p=0,023$). Функциональный дефицит НК-клеток при постковидном синдроме характеризовался снижением цитотоксической активности за счёт низкого уровня экспрессии CD57⁺ ($p=0,001$) и CD8⁺ ($p<0,001$) на поверхности НК-клеток. При лечении рекомбинантным интерлейкином-2 пациентов с постковидным синдромом восстанавливалось количество НК-клеток в периферической крови и их функциональный потенциал. Таким образом, доказана эффективность применения рекомбинантного интерлейкина-2 в лечении постковидного синдрома у пациентов с низким уровнем НК-клеток в крови.

Настоящая статья представляет собой перевод статьи: Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Isakov D.V., Sadowski I.S., Belenyuk V.D., Borisov A.G. Recombinant Human Interleukin-2 Corrects NK Cell Phenotype and Functional Activity in Patients with Post-COVID Syndrome // *Pharmaceuticals*. 2023. Vol. 16, N 4. P. 537. DOI: 10.3390/ph16040537

Публикуется с разрешения правообладателя.

Ключевые слова: постковидный синдром; НК-клетка; рекомбинантный человеческий интерлейкин-2; иммунореабилитация; субпопуляция; функциональная активность.

Как цитировать:

Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Исаков Д.В., Садовский И.С., Беленюк В.Д., Борисов А.Г. Применение рекомбинантного интерлейкина-2 для коррекции фенотипа и функциональной активности НК-клеток у пациентов с постковидным синдромом // *Цитокины и воспаление*. 2023. Т. 20, № 4. С. 49–66. DOI: <https://doi.org/10.17816/CI635092>

DOI: <https://doi.org/10.17816/CI635092>

Recombinant human interleukin-2 corrects NK cell phenotype and functional activity in patients with post-COVID syndrome

Andrei A. Savchenko¹, Igor V. Kudryavtsev^{2,3}, Dmitry V. Isakov^{2,4}, Ivan S. Sadowski¹, Vasily D. Belenyuk¹, Alexandr G. Borisov¹

¹ Research Institute of Medical Problems of the North — a separate division of the Federal Research Center “Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences”, Krasnoyarsk, Russia;

² Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

³ Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia;

⁴ Academician I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

Post-COVID syndrome develops in 10–20% of people who have recovered from COVID-19 and it is characterized by impaired function of the nervous, cardiovascular, and immune systems. Previously, it was found that patients who recovered from infection with the SARS-CoV-2 virus had a decrease in the number and functional activity of NK cells. The aim of the study was to assess the effectiveness of recombinant human interleukin-2 administered to correct NK cell phenotype and functional activity in patients with post-COVID syndrome. Patients were examined after 3 months for acute COVID-19 of varying severity. The phenotype of the peripheral blood NK cells was studied by flow cytometry. It was found that disturbances in the cell subset composition in patients with post-COVID syndrome were characterized by low levels of mature ($p=0.001$) and cytotoxic NK cells ($p=0.013$), with increased release of immature NK cells ($p=0.023$). Functional deficiency of NK cells in post-COVID syndrome was characterized by lowered cytotoxic activity due to the decreased count of CD57⁺ ($p=0.001$) and CD8⁺ ($p<0.001$) NK cells. In the treatment of patients with post-COVID syndrome with recombinant human interleukin-2, peripheral blood NK cell count and functional potential were restored. In general, the effectiveness of using recombinant human interleukin in treatment of post-COVID syndrome has been proven in patients with low levels of NK cells.

This article is a translation of the article by Savchenko AA, Kudryavtsev IV, Isakov DV, Sadowski IS, Belenyuk VD, Borisov AG. Recombinant Human Interleukin-2 Corrects NK Cell Phenotype and Functional Activity in Patients with Post-COVID Syndrome. *Pharmaceuticals*. 2023;16(4):537. DOI: 10.3390/ph16040537

Published with the permission of the copyright holder.

Keywords: post-COVID syndrome; NK cell; recombinant human interleukin-2; immunorehabilitation; subset composition; functional activity.

To cite this article:

Savchenko AA, Kudryavtsev IV, Isakov DV, Sadowski IS, Belenyuk VD, Borisov AG. Recombinant human interleukin-2 corrects NK cell phenotype and functional activity in patients with post-COVID syndrome. *Cytokines and Inflammation*. 2023;20(4):49–66. DOI: <https://doi.org/10.17816/CI635092>

1. ВВЕДЕНИЕ

Новая коронавирусная инфекция COVID-19, вызываемая SARS-CoV-2, представляет собой острое инфекционное респираторное заболевание, которое может протекать как в лёгкой форме (практически бессимптомно), заканчиваясь самостоятельным выздоровлением, так и в тяжёлой форме, при которой наблюдаются поражение лёгких, развитие полиорганной недостаточности и септического шока, что может привести к неблагоприятному исходу заболевания [1–3]. Однако проблема COVID-19 не ограничивается только тяжестью течения и исходом острого заболевания. Начиная с весны 2020 года у некоторых людей (10–20%), переболевших коронавирусной инфекцией, после выздоровления стали выявлять среднесрочные и долгосрочные последствия, которые реализуются широким спектром симптомов (головные боли, усталость, недомогание, гипертермия, одышка, паросмия, мышечная слабость, когнитивная дисфункция и др.) [4–6]. Данное состояние получило название «постковидный синдром», и оно характеризуется спектром стойких симптомов, связанных преимущественно с нарушениями функции нервной, сердечно-сосудистой и иммунной систем [7–9]. Причём в ряде случаев постковидный синдром может наблюдаться и у пациентов, перенёсших инфекцию, вызванную SARS-CoV-2, бессимптомно или в лёгкой форме [10]. В работе A. Nalbandian и соавт. (2021) последствия от перенесённой острой инфекции классифицируются на подострые, или персистирующие, симптомы COVID-19 (до 12 недель от начального острого эпизода) и хронический, или постковидный, синдром, симптомы которого проявляются более 12 недель [11]. Разработана порядковая шкала по ранжированию пациентов после перенесённого COVID-19 с целью выделения значимых критериев и объединения их в категории — шкала функционального состояния после COVID-19 (PCFS) [12]. Исходя из особенности течения и симптоматики постковидного синдрома разрабатываются методы реабилитации пациентов [13, 14].

Иммунная система принимает самое активное участие в защите организма от SARS-CoV-2 и формировании эффективного и оптимального постинфекционного иммунитета, что во многом определяет состояние здоровья после перенесённого COVID-19 [15, 16]. В то же время в ряде случаев результатом острого COVID-19, даже при полной элиминации вируса (по данным полимеразной цепной реакции — ПЦР), является формирование различных нарушений в иммунной системе, которые и вовлекаются в реализацию постковидного синдрома. Так, у выздоравливающих от COVID-19 пациентов описаны стойкие иммунные нарушения, которые проявляются в виде сниженного содержания NKT- и Vδ2 T-клеток и увеличения уровней нейтрофилов низкой плотности, неклассических моноцитов, гиперактивированных CD8⁺ T-клеток и повышения концентрации провоспалительных цитокинов [17]. Ассоциация ряда симптомов постковидного

синдрома с высоким уровнем IL-6 представлена в работе R. Ganesh и соавт. (2022) [8]. В ранее проведённом нами исследовании было показано, что у лиц, перенёсших COVID-19 (отрицательный ПЦР на SARS-CoV-2), выявлялось повышение процентного содержания общих T-лимфоцитов (за счёт субпопуляции Th-клеток) по сравнению с контрольными значениями, но при снижении абсолютного и относительного количества B-лимфоцитов (за счёт субпопуляций B1- и B2-клеток памяти) [18]. В работе L. Townsend и соавт. (2021) отмечается, что у выздоровевших от COVID-19 пациентов более чем 3 месяца сохранялись аномалии со стороны T-клеток, причём нарушения показателей T-клеточного иммунитета были более выражены у пожилых людей [19].

NK-клетки относятся к клеткам врождённого иммунитета с цитотоксической активностью [20, 21]. В связи с тем, что к функциям NK-клеток относится формирование как противоопухолевой, так и противовирусной защиты механизмами врождённого иммунитета, особенности функциональности этих клеток при COVID-19 вызывают значительный интерес. Так, в исследовании X. Deng и соавт. (2022) установлено, что скорость элиминации SARS-CoV-2 и уровень выработки антител к вирусу коррелировали с уровнем функциональной активности NK-клеток [22]. При этом в данной работе также отмечалось, что функциональная недостаточность NK-клеток определяла повышенную чувствительность пациентов к вирусу. В статье A.M. Pituch-Noworolska (2022) показано, что у больных COVID-19 выявлялось ингибирование синтеза IFN-γ NK-клетками и их функциональное истощение [23]. У выздоровевших пациентов количество NK-клеток в крови может быть представлено в широком диапазоне — от сниженного относительно нормального уровня до повышенного, однако даже при высоком уровне NK-клеток их функциональная активность снижена, что может быть причиной новых вирусных инфекций, включая COVID-19 [24–26]. В частности, у выздоровевших пациентов через две недели после COVID-19 наблюдалось низкое содержание NK-клеток [27]. Соответственно, восстановление количества и функциональной активности NK-клеток будет способствовать формированию эффективного противовирусного иммунитета, в том числе и к SARS-CoV-2 [23, 28].

Вместе с тем восстановление количества и функции NK-клеток у пациентов с постковидным синдромом необходимо не только для выздоровления, но и для дальнейшей противоопухолевой защиты, так как сформированная в результате COVID-19 функциональная недостаточность этих клеток может обусловить рост онкологических заболеваний. В связи с этим очень важным является восстановление количества и функции NK-клеток при проведении иммунореабилитации пациентов с постковидным синдромом. Известно, что интерлейкин-2 (IL-2) обладает положительным стимулирующим влиянием на функциональную активность NK-клеток [29–31].

Таким образом, **цель исследования** — оценка эффективности рекомбинантного человеческого интерлейкина-2, вводимого для коррекции фенотипа и функциональной активности NK-клеток, у пациентов с постковидным синдромом.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ клинических данных показал, что у пациентов с постковидным синдромом (по шкале функционального состояния после COVID-19 от 1 до 3) в основном наблюдались общеклинические проявления и поражение нервной системы (табл. 1). Помимо этого, в патологический процесс были вовлечены дыхательная и сердечно-сосудистая системы, желудочно-кишечный тракт.

При исследовании содержания NK-клеток у пациентов с постковидным синдромом обнаружено, что у больных до начала лечения рекомбинантным IL-2 было снижено относительное и абсолютное содержание NK-клеток, после лечения количество клеток восстанавливалось до уровня контрольного диапазона (рис. 1).

Исследование содержания NK-клеток в крови у пациентов с постковидным синдромом в зависимости от экспрессии антигенов CD16 и CD56 позволило

установить, что до начала лечения у обследованных больных по сравнению с контрольными значениями было снижено содержание CD16⁺CD56⁺- и CD16⁺CD56^{dim}-клеток, но значительно повышено количество NK-клеток с фенотипами CD16⁺CD56^{dim} и CD16⁺CD56⁺ (табл. 2).

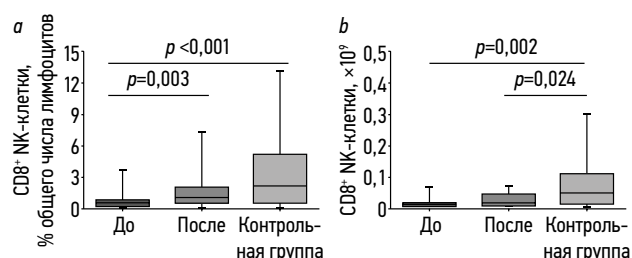


Рис. 1. Изменение относительного и абсолютного уровня NK-клеток у пациентов с постковидным синдромом до ($n=29$) и после ($n=29$) лечения рекомбинантным IL-2 по сравнению с показателями контрольной группы ($n=30$): *a, b* — относительное содержание NK-клеток (% общего количества лимфоцитов) и абсолютное содержание (количество клеток в 1 л) соответственно. Сравнение с показателями контрольной группы проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни, Сравнение показателей у пациентов до и после лечения рекомбинантным IL-2 проводили с помощью теста согласованных пар Вилкоксона.

Таблица 1. Клинические проявления в динамике иммунореабилитации с использованием рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 у больных с постковидным синдромом

Показатель	До лечения	После лечения
Недомогание после нагрузки, $n / \%$	29 / 100	1 / 3,45
Усталость, $n / \%$	29 / 100	2 / 6,90
Головные боли, $n / \%$	26 / 89,66	1 / 3,45
Субфебрильная температура, $n / \%$	18 / 62,07	0
Проблемы с памятью, неспособность сконцентрироваться, $n / \%$	22 / 75,86	1 / 3,45
Когнитивная дисфункция, $n / \%$	9 / 31,03	0
Нарушения сна, $n / \%$	7 / 24,14	0
Боль в мышцах, $n / \%$	1 / 3,45	0
Суставная боль, $n / \%$	6 / 20,69	1 / 3,45
Кашель, $n / \%$	10 / 34,48	0
Одышка, $n / \%$	3 / 10,34	0
Тахикардия, $n / \%$	3 / 10,34	0
Кожная сыпь, $n / \%$	4 / 13,79	0
Диарея, $n / \%$	1 / 3,45	0
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	5,69 (5,0–6,75)	5,25 (4,23–6,40)
Гранулоциты, %	56,0 (43,0–66,8)	57,1 (43,0–72,40)
Гранулоциты, $10^9/\text{л}$	2,48 (1,50–4,14)	3,0 (1,57–5,0)
Моноциты, %	7,0 (7,0–9,30)	7,40 (5,0–9,5)
Моноциты, $10^9/\text{л}$	0,38 (0,31–0,59)	0,38 (0,24–0,48)
Лимфоциты, %	33,65 (26,73–43,35)	29,95 (20,93–40,30)
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	2,36 (1,92–3,03)	1,62 (1,21–2,20)

Примечание. Количественные данные представлены в виде медианы и квартильного размаха [Me (IQR)].

Таблица 2. Основные субпопуляции NK-клеток периферической крови до и после лечения рекомбинантным человеческим интерлейкином-2 [Me (IQR)] у выздоравливающих пациентов с COVID-19, %

Субпопуляция NK-клеток	Здоровые люди из контрольной группы	До лечения	После лечения
CD16 ⁺ CD56 ⁺	0,80 (0,15–2,50)	0,13 (0,08–0,79) $p_1=0,013$	0,29 (0,11–0,55) $p_1=0,049$
CD16 ⁺ CD56 ⁺	5,88 (0,23–11,70)	0,21 (0,13–0,39) $p_1=0,001$	0,74 (0,44–1,23) $p_2<0,013$
CD16 ⁺ CD56 ^{dim}	0,46 (0,10–0,88)	0,91 (0,30–1,77) $p_1=0,023$	1,33 (0,65–2,12) $p_1=0,001$
CD16 ⁺ CD56 ^{dim}	0,69 (0,07–1,33)	0,97 (0,46–1,71)	4,19 (2,78–7,36) $p_{1,2}<0,001$

Примечание. Количественные данные (% субпопуляций NK-клеток в общей популяции лимфоцитов) представлены в виде медианы и квартильного размаха [Me (IQR)]; p_1 — статистически значимые различия по сравнению с контролем; p_2 — статистически значимые различия у пациентов до и после лечения. Сравнение с показателями контрольной группы проводилось с использованием U-критерия Манна–Уитни. Сравнение показателей у пациентов до и после лечения рекомбинантным человеческим IL-2 проводилось с использованием теста согласованных пар Вилкоксона.

После лечения рекомбинантным IL-2 процентное содержание CD16⁺CD56⁺-клеток повысилось более чем в 3,5 раза по сравнению с исходными значениями, но их количество оставалось значительно ниже, чем у лиц контрольной группы. Уровень CD16⁺CD56⁺- и CD16⁺CD56^{dim}-клеток после лечения практически не изменился. В то же время содержание NK-клеток с фенотипом CD16⁺CD56^{dim} при лечении рекомбинантным IL-2 увеличилось более чем в 4 раза относительно исходного уровня.

Мы исследовали содержание NK-клеток с экспрессией CD57-антигена в крови у пациентов с постковидным синдромом до и после лечения рекомбинантным IL-2. Обнаружено, что процентное содержание CD57⁺ NK-клеток у обследованных пациентов до начала лечения значительно ниже уровней контрольного диапазона [соответственно 0,52% (0,31; 1,56) и 1,88% (1,05; 4,50) при $p<0,001$], тогда как после лечения IL-2 повышается до уровней контрольных значений [соответственно 3,09% (2,04; 5,09) и 1,88% (1,05; 4,50) при $p=0,075$]. Сходная динамика была отмечена и для абсолютного содержания

NK-клеток в периферической крови: у пациентов до терапии уровень этих клеток был достоверно снижен относительно значений пациентов после терапии и группы контроля [0,015×10⁹ (0,009–0,033) и 0,053×10⁹ (0,037–0,063) и 0,036×10⁹ (0,022–0,085) при $p=0,004$ и $p=0,011$ соответственно]. Проведение курса терапии рекомбинантным IL-2 сопровождалось увеличением концентрации NK-клеток до значений группы контроля [0,053×10⁹ (0,037–0,063) и 0,036×10⁹ (0,022–0,085), $p=0,690$].

Процентное содержание CD16⁺CD56⁺CD57⁺-клеток у пациентов до и после лечения было значительно ниже, чем у лиц контрольной группы, но после лечения наблюдалось повышение содержания этих клеток в 3,2 раза по сравнению с исходным уровнем (табл. 3). Содержание NK-клеток с фенотипом CD16⁺CD56⁺CD57⁺ в крови у пациентов с постковидным синдромом до начала лечения было ниже, чем у лиц контрольной группы. После лечения рекомбинантным IL-2 их количество не менялось относительно исходного уровня и оставалось пониженным относительно контрольных значений. Процентное

Таблица 3. CD57, экспрессируемый на различных субпопуляциях NK-клеток, до и после лечения рекомбинантным человеческим интерлейкином-2 [Me (IQR)] у выздоравливающих пациентов с COVID-19, %

Субпопуляция NK-клеток	Здоровые люди из контрольной группы	До лечения	После лечения
CD16 ⁺ CD56 ⁺	0,24 (0,03–0,95)	0,03 (0,01–0,21)	0,05 (0,01–0,08) $p_1=0,008$
CD16 ⁺ CD56 ⁺	3,30 (0,12–5,35)	0,13 (0,09–0,25) $p_1<0,001$	0,42 (0,23–0,67) $p_2<0,001$
CD16 ⁺ CD56 ^{dim}	0,09 (0,03–0,13)	0,11 (0,04–0,85)	0,23 (0,05–0,47)
CD16 ⁺ CD56 ^{dim}	0,51 (0,06–1,02)	0,36 (0,18–1,16)	1,88 (1,35–4,22) $p_{1,2}<0,001$

Примечание. Количественные данные (% клеток, экспрессирующих CD57, от общего числа лимфоцитов) представлены в виде медианы и квартильного размаха [Me (IQR)]; p_1 — статистически значимые различия по сравнению с контролем; p_2 — статистически значимые различия у пациентов до и после лечения. Сравнение с показателями контрольной группы проводилось с использованием U-критерия Манна–Уитни. Сравнение показателей у пациентов до и после лечения рекомбинантным человеческим IL-2 проводилось с использованием теста согласованных пар Вилкоксона.

содержание CD16⁺CD56^{dim}CD57⁺- и CD16⁻CD56^{dim}CD57⁺-клеток у обследованных пациентов до начала лечения соответствовало уровням контрольного диапазона. После лечения IL-2 содержание CD16⁺CD56^{dim}CD57⁺-клеток значительно повысилось относительно как исходных значений, так и контрольного диапазона, тогда как количество NK-клеток с фенотипом CD16⁻CD56^{dim}CD57⁺ оставалось без изменений.

Необходимо отметить, что уровень экспрессии (выраженный в условных единицах флуоресценции MFI) CD57 на общих NK-клетках и большинстве представленных фракций у пациентов с постковидным синдромом до и после лечения рекомбинантным IL-2 не отличался от контрольных. Единственным исключением являлась субпопуляция NK-клеток с фенотипом CD16⁻CD56⁺. Уровень экспрессии CD57 на клетках данной субпопуляции у пациентов до начала лечения был значительно снижен по сравнению с контрольными значениями [0,32 (0,24; 0,38) и 0,36 (0,32; 0,45), $p=0,029$], после лечения IL-2 MFI CD57 восстанавливался до уровня контрольного диапазона [соответственно 0,36 (0,27; 0,44) и 0,36 (0,32; 0,45), $p=0,374$].

Дополнительно, в зависимости от экспрессии маркера CD57 и CD62L на мембране, общий пул NK-клеток можно разделить на четыре ключевые популяции, которые различаются не только по своей способности мигрировать в лимфоидные (CD62L⁺-клетки) или периферические (CD62L⁻-клетки) ткани, но и проявлять цитолитические свойства по отношению к клеткам-мишеням за счёт накопления перфорина и гранзимов в цитоплазме (CD57⁺-клетки) [32]. Было обнаружено, что процентное содержание CD57⁺ NK-клеток, экспрессирующих CD62L, у пациентов с постковидным синдромом до начала лечения рекомбинантным IL-2 было значительно ниже, чем у лиц контрольной группы, но после проведения иммунореабилитации повысилось относительно исходных значений до уровня контрольного диапазона (табл. 4).

Таблица 4. Субпопуляции NK-клеток, коэкспрессирующих CD57 и CD62L, до и после лечения рекомбинантным человеческим IL-2 [Me (IQR)] у выздоравливающих пациентов с COVID-19, %

Субпопуляция NK-клеток	Здоровые люди из контрольной группы	До лечения	После лечения
CD62L ⁺ CD57 ⁻	1,74 (0,85–4,11)	0,38 (0,23–1,52) $p_1=0,001$	2,62 (1,97–4,29) $p_2<0,001$
CD62L ⁺ CD57 ⁺	0,26 (0,14–0,63)	0,11 (0,08–0,19) $p_1=0,009$	0,62 (0,16–0,90) $p_2<0,001$
CD62L ⁻ CD57 ⁻	2,67 (0,34–4,90)	0,53 (0,33–0,92) $p_1=0,001$	2,18 (1,42–3,10) $p_2<0,001$
CD62L ⁻ CD57 ⁺	1,09 (0,65–1,66)	0,85 (0,53–1,64)	1,60 (0,99–3,28) $p_2=0,003$

Примечание. Количественные данные (% субпопуляций NK-клеток в общем количестве лимфоцитов) представлены в виде медианы и квартильного размаха [Me (IQR)]; p_1 — статистически значимые различия по сравнению с контролем; p_2 — статистически значимые различия у пациентов до и после лечения. Сравнение с показателями контрольной группы проводилось с использованием U-критерия Манна–Уитни. Сравнение показателей у пациентов до и после лечения рекомбинантным человеческим IL-2 проводилось с использованием теста согласованных пар Вилкоксона.

Относительное и абсолютное содержание CD8⁺ NK-клеток в крови у пациентов с постковидным синдромом до проведения иммунореабилитации было значительно снижено по сравнению с контрольными значениями (рис. 2). После лечения рекомбинантным IL-2 относительное количество CD8⁺ NK-клеток восстанавливалось до контрольного уровня, тогда как изменения абсолютного количества этих клеток были статистически незначимы.

Процентное содержание CD16⁺CD56⁺CD8⁺-клеток у обследованных пациентов до начала лечения рекомбинантным IL-2 было значительно снижено относительно контрольного диапазона, тогда как после лечения количество этих клеток возрастало в 2 раза относительно исходного уровня, но оставалось пониженным по сравнению со значениями контрольной группы (табл. 5). В то же время количество NK-клеток с фенотипом CD16⁻CD56⁺CD8⁺ в крови у пациентов с постковидным синдромом не изменялось на фоне иммунореабилитации и в течение всего периода обследования было значительно ниже контрольного уровня.

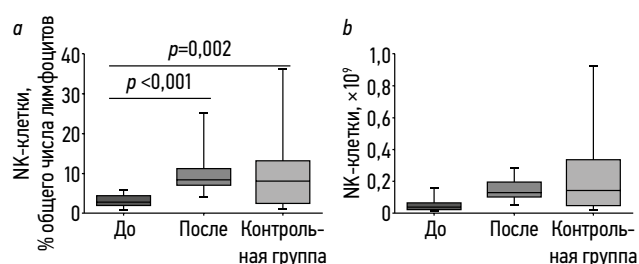


Рис. 2. Дисбаланс относительного и абсолютного количества CD8⁺ NK-клеток периферической крови у больных с постковидным синдромом до ($n=29$) и после ($n=29$) лечения рекомбинантным человеческим IL-2 по сравнению со здоровой контрольной группой ($n=30$): а, б — относительное содержание CD8⁺ NK-клеток (% общего количества лимфоцитов) и абсолютное содержание (количество клеток в 1 л) соответственно. Статистический анализ проводили с помощью U-критерия Манна–Уитни.

Таблица 5. Экспрессия CD8 различными субпопуляциями NK-клеток до и после лечения рекомбинантным человеческим IL-2 [Me (IQR)] у выздоравливающих пациентов с COVID-19, %

Субпопуляция NK-клеток	Здоровые люди из контрольной группы	До лечения	После лечения
CD16 ⁺ CD56 ⁺	0,24 (0,05–0,80)	0,05 (0,02–0,11) $p_1=0,014$	0,04 (0,01–0,05) $p_1=0,001$
CD16 ⁺ CD56 ⁺	1,48 (0,12–4,40)	0,05 (0,04–0,09) $p_1 < 0,001$	0,11 (0,06–0,33) $p_1=0,006$ $p_2=0,004$
CD16 ⁺ CD56 ^{dim}	0,07 (0,03–0,22)	0,06 (0,01–0,23)	0,08 (0,01–0,25)
CD16 ⁺ CD56 ^{dim}	0,24 (0,04–0,76)	0,21 (0,07–0,43)	0,50 (0,29–1,25) $p_1=0,022$ $p_2=0,002$

Примечание. Количественные данные (% клеток, экспрессирующих CD8, в общем количестве лимфоцитов) представлены в виде медианы и квартильного размаха [Me (IQR)]; p_1 — статистически значимые различия по сравнению с контролем; p_2 — статистически значимые различия у пациентов до и после лечения. Сравнение с показателями контрольной группы проводилось с использованием U-критерия Манна–Уитни. Сравнение показателей у пациентов до и после лечения рекомбинантным человеческим IL-2 проводилось с использованием теста согласованных пар Вилкоксона.

Содержание CD16⁺CD56^{dim}CD8⁺-клеток в крови у обследованных пациентов до начала лечения было более чем в 5 раз больше по сравнению с лицами контрольной группы. После лечения количество клеток с данным фенотипом увеличилось и относительно исходных, и относительно контрольных значений. При этом уровень CD16⁺CD56^{dim}CD8⁺-клеток у пациентов с постковидным синдромом до и после лечения IL-2 соответствовал уровню контрольного диапазона.

При исследовании количества NK-клеток с экспрессией CD94 обнаружено, что у пациентов с постковидным синдромом до проведения иммунореабилитации процентное содержание CD56⁺CD94⁺ NK-клеток было значительно снижено по сравнению с контрольными значениями, тогда как уровень CD56^{dim}CD94⁺ NK-клеток соответствовал уровню контрольного диапазона (табл. 6). После проведения иммунореабилитации количество NK-клеток

с фенотипом CD56⁺CD94⁺ повысилось более чем в 2 раза, однако оставалось на сниженном уровне по сравнению с контрольными показателями. Относительное количество CD56^{dim}CD94⁺ NK-клеток после проведения терапии IL-2 также увеличилось и стало значительно выше, чем у лиц контрольной группы. Уровень экспрессии CD94 на CD56⁺ NK-клетках у пациентов с постковидным синдромом повышен по сравнению с контрольными значениями ещё до начала проведения иммунореабилитации и остаётся на этом уровне после лечения IL-2, тогда как уровень экспрессии данного маркера на CD56^{dim} NK-клетках у обследованных пациентов до и после иммунореабилитации соответствовал значениям контрольной группы.

Ограничения исследования. Размер выборки в нашем исследовании был ограничен из-за доступности и готовности пациентов сдавать цельную кровь для анализов до и после лечения.

Таблица 6. Субпопуляции NK-клеток, коэкспрессирующих CD56 и CD94, до и после лечения рекомбинантным человеческим IL-2 [Me (IQR)] у выздоравливающих пациентов с COVID-19, %

Субпопуляция NK-клеток	Здоровые люди из контрольной группы	До лечения	После лечения
CD56 ⁺ CD94 ⁻	1,03 (0,06–2,91)	0,04 (0,02–0,64) $p_1=0,001$	0,09 (0,04–0,15) $p_1=0,007$
CD56 ⁺ CD94 ⁺	5,25 (0,13–8,22)	0,20 (0,11–0,36) $p_1=0,001$	0,48 (0,18–0,75) $p_1=0,047$ $p_2=0,004$
CD56 ^{dim} CD94 ⁻	0,50 (0,36–1,07)	1,01 (0,38–1,91)	2,57 (1,37–3,70) $p_1 < 0,001$ $p_2=0,001$
CD56 ^{dim} CD94 ⁺	0,69 (0,17–1,42)	1,25 (0,53–1,55)	3,60 (2,47–5,89) $p_{1,2} < 0,001$

Примечание. Количественные данные (% субпопуляций NK-клеток в общем количестве лимфоцитов) представлены в виде медианы и квартильного размаха [Me (IQR)]; p_1 — статистически значимые различия по сравнению с контролем; p_2 — статистически значимые различия у пациентов до и после лечения. Сравнение с показателями контрольной группы проводилось с использованием U-критерия Манна–Уитни. Сравнение показателей у пациентов до и после лечения рекомбинантным человеческим IL-2 проводилось с использованием теста согласованных пар Вилкоксона.

3. ОБСУЖДЕНИЕ

NK-клетки представляют собой гетерогенную популяцию, обладают естественной цитолитической активностью по отношению к вирус-инфицированным и малигнизированным клеткам и способны продуцировать цитокины и хемокины [20, 21, 33]. Определение субпопуляционного состава NK-клеток мы осуществляли по маркерам CD16 и CD56. CD16 — низкоаффинный рецептор иммуноглобулинов G III типа (FcγRIII), с помощью которого реализуется механизм клеточной цитотоксичности [34]. Маркер CD56 (NCAM, Leu-19, NKH-1) является гликопротеином, принадлежащим к суперсемейству иммуноглобулинов, и принимает участие в реализации межклеточных контактов [35, 36]. При этом NK-клетки, активно экспрессирующие CD16 и CD56, определяются как зрелые. NK-клетки с фенотипом CD16⁺CD56⁺ проявляют цитотоксическую активность [37, 38]. Большой интерес вызывают NK-клетки с фенотипами CD16⁺CD56^{dim} и CD16⁻CD56^{dim}. Показано, что CD16⁺CD56^{dim}-клетки проявляют повышенный уровень цитотоксичности, выявляются в крови, а также локализуются в лёгких и в зонах воспаления (за счёт уникального профиля экспрессии хемокиновых рецепторов), что позволяет характеризовать их как провоспалительные NK-клетки [39]. В то же время фракция CD16⁻CD56^{dim}-клеток является преобладающей в опухолях (возможно, с регуляторной активностью), они характеризуются как менее зрелые NK-клетки по сравнению с фракцией CD16⁺CD56^{dim} [39, 40].

Нами установлено, что у обследованных пациентов с постковидным синдромом до начала проведения IL-2-терапии выявляется снижение относительного количества зрелых и цитокин-продуцирующих NK-клеток, но увеличение содержания CD56^{dim} незрелых клеток. Необходимо отметить, что данные изменения в субпопуляционном составе NK-клеток развиваются на фоне снижения относительного и абсолютного содержания общих NK-клеток. После проведения иммунореабилитации рекомбинантным IL-2 количество общих NK-клеток полностью восстанавливается до контрольных значений. Содержание зрелых (CD16⁺CD56⁺) NK-клеток повышается в 3 раза относительно исходного уровня, но все равно значительно понижено относительно контрольных значений. Практически без изменений после лечения рекомбинантным IL-2 остаётся низкий уровень цитокин-продуцирующих NK-клеток и повышенные значения CD16⁻CD56^{dim}-клеток. При этом более чем в 4 раза повышается количество цитотоксических клеток. В целом можно заключить, что у пациентов с постковидным синдромом на фоне количественного восстановления до контрольных значений общих NK-клеток сохраняются нарушения в их субпопуляционном составе.

Мы исследовали распределение маркера CD57 на субпопуляциях NK-клеток у пациентов с постковидным синдромом. CD57-антиген (HNK-1,

NK-1 и Leu-7) представляет собой сульфатированный остатками глюкуроновой кислоты олигосахарид, который экспрессируется на различных белках, липидах и хондроитинсульфатных протеогликах и определяется как маркер терминально дифференцированных NK-клеток с повышенной функциональной активностью [41, 42]. У обследованных нами пациентов с постковидным синдромом до проведения иммунореабилитации снижено абсолютное и процентное количество NK-клеток, экспрессирующих CD57. Значительно снижено по сравнению с контрольными значениями содержание CD16⁺CD56⁺CD57⁻ и CD16⁻CD56⁺CD57⁺-клеток, в то время как уровень CD16⁻CD56^{dim}CD57⁺ был равен контрольным значениям. При этом выявляется выраженное снижение экспрессии (по MFI) маркера CD57 на мембране цитокин-продуцирующих NK-клеток. В обзоре Н. Kared и соавт. (2016) было отмечено, что CD16⁺CD57⁺ NK-клетки обладают максимальным цитотоксическим эффектом, тогда как CD57⁺ NK-клетки в целом способствуют созреванию дендритных клеток, а дополнительная стимуляция CD57⁺CD56^{dim}CD16⁺ NK-клеток провоспалительными цитокинами значительно повышает уровень синтеза и секреции IFN-γ на фоне реализации антителозависимой цитотоксичности [41]. Следовательно, функциональный потенциал NK-клеток у пациентов с постковидным синдромом был значительно снижен. После лечения рекомбинантным IL-2 у обследованных пациентов полностью восстанавливается количество общих NK-клеток в крови. Более чем в 3 раза повышается содержание CD16⁺CD56⁺CD57⁺-клеток, хотя при этом остаётся пониженным относительно контрольных значений. Восстанавливается уровень экспрессии CD57-антигена на цитокин-продуцирующих NK-клетках, но их количество остаётся без изменений. Значительно повышается уровень CD16⁺CD56^{dim}CD57⁺-клеток относительно как исходных, так и контрольных значений. Таким образом, иммунореабилитация пациентов с постковидным синдромом рекомбинантным IL-2 приводит к восстановлению количества NK-клеток, экспрессирующих CD57. Восстановление экспрессии данного маркера на цитокин-продуцирующих NK-клетках и увеличение содержания CD57⁺ цитотоксических NK-клеток также отражают повышение функциональной активности естественных киллеров. Следует отметить, что существенные нарушения в постковидный период регистрируются также и в субпопуляционном составе другой популяции цитолитических клеток — CD8⁺ Т-лимфоцитов. Так, было показано, что спустя 1–3 месяца после острой инфекции, вызванной SARS-CoV-2, в периферической крови увеличивается относительное и абсолютное содержание «наивных» CD8⁺ Т-клеток и клеток центральной памяти, тогда как эффекторные клетки популяции TEMRA снижаются относительно контрольных значений [43]. В рамках другого исследования было продемонстрировано, что в интервале от 2–4 недель до 2–3 месяцев после появления

симптомов уровень «наивных» и «переходных» CD8⁺ Т-клеток памяти снижался, тогда как доля CD8⁺ Т-клеток центральной и эффекторной памяти, а также зрелых эффекторов в циркуляции возрастала [44]. Долговременные нарушения в процессах созревания и дифференцировки NK-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов, наличие на их поверхности ингибиторных рецепторов или маркеров «клеточного старения», а также низкая эффективность уничтожения клеток-мишеней могут снижать эффективность противоопухолевого и противовирусного иммунитета [45, 46].

CD62L-маркер — L-селектин, определяющий миграцию клеток иммунной системы в периферические лимфоидные органы, так как лигандами данного рецептора являются GlyCAM-1 (молекула клеточной адгезии, экспрессированная на эндотелии лимфоузлов), MadCAM-1 (белок эндотелия в лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником) и CD34 (белок эндотелиальных клеток) [47, 48]. Нами установлено, что до начала проведения иммунореабилитации у пациентов с постковидным синдромом содержание CD57⁺CD62L⁺ NK-клеток значительно ниже, чем у лиц контрольной группы, что позволяет заключить о низкой миграционной активности лимфоцитов у обследованных пациентов. После лечения рекомбинантным IL-2 количество CD62L⁺ NK-клеток повышается до уровня контрольного диапазона, что характеризует восстановление их миграционной активности.

У пациентов с постковидным синдромом мы также исследовали содержание в крови CD8⁺ NK-клеток. Известно, что около 40% NK-клеток могут экспрессировать рецептор CD8 в α/α-гомодимерной форме, что определяет у них высокий уровень цитотоксической активности [49, 50]. Также предполагается, что взаимодействие рецепторов CD8αα на NK-клетках с молекулами семейства HLA-I может вызывать повышенную секрецию таких цитокинов, как TNF-α и IFN-γ [51]. Нами установлено, что у пациентов с постковидным синдромом в периферической крови значительно снижено абсолютное и относительное содержание CD8⁺ NK-клеток. При этом также понижается уровень экспрессии рецептора CD8 на клетках обследованных пациентов. При исследовании экспрессии данной молекулы на различных субпопуляциях NK-клеток обнаружено, что у пациентов с постковидным синдромом в крови относительно контрольных значений снижен уровень зрелых (CD16⁺CD56⁺) и цитотоксических (CD16⁺CD56⁺) NK-клеток, экспрессирующих CD8. В то же время содержание провоспалительных NK-клеток (CD16⁺CD56^{dim}) с экспрессией CD8 у обследованных пациентов было значительно выше, чем у лиц контрольной группы. Кроме перераспределения субпопуляционного состава NK-клеток у пациентов с постковидным синдромом мы также обнаружили, что субпопуляции зрелых и цитотоксических NK-клеток слабее экспрессируют данный маркер. После лечения пациентов с постковидным синдромом рекомбинантным IL-2 до контрольных значений

восстановился процентный уровень CD8⁺ NK-клеток, тогда как абсолютное количество повысилось в 2 раза, но при этом осталось ниже значений, выявленных у здоровых людей. Под влиянием цитокина также в 2 раза увеличивается содержание зрелых CD8⁺ NK-клеток, тогда как уровень цитотоксических NK-клеток с экспрессией рецептора CD8 не меняется. При этом количество провоспалительных NK-клеток, экспрессирующих CD8, у пациентов с постковидным синдромом после иммунореабилитации повышается более чем в 2 раза. Процентное содержание CD16⁺CD56^{dim} NK-клеток, экспрессирующих рецептор CD8, у пациентов с постковидным синдромом не реагирует на цитокинотерапию, как до, так и после иммунореабилитации соответствует контрольным значениям.

CD94 является интегральным мембранным белком типа II, относящимся к семейству Ca²⁺-зависимых лектинов (типа C), и способен связываться с 5 различными членами семейства NKG2 (NKG2A, B, C, E и H). Доказано, что рецепторы CD94/NKG2 проявляют специфичность в отношении HLA-E (неклассической молекулы ГКГС I класса) [52, 53]. При этом гетеродимеры CD94/NKG2A и CD94/NKG2B входят в состав рецепторов NK-клеток ингибирующего типа, а связь CD94 и NKG2C относится к рецептору активирующего типа. У обследованных нами пациентов с постковидным синдромом до проведения иммунореабилитации было снижено процентное содержание CD56⁺CD94⁺ NK-клеток более чем в 30 раз относительно контрольных значений, тогда как уровень экспрессии рецептора CD94 на этих клетках был выше в 1,8 раза по сравнению со значениями, выявленными у здоровых лиц. При этом количество CD56^{dim}CD94⁺ NK-клеток с экспрессией CD94 у обследованных пациентов соответствовало контрольным значениям, так же как и уровень экспрессии этого маркера на поверхности данной фракции клеток. После лечения рекомбинантным IL-2 у пациентов более чем в 2 раза повысился уровень CD56⁺CD94⁺ NK-клеток, хотя их содержание всё равно оставалось ниже контрольных значений. Уровень экспрессии рецептора CD94 на мембране этих клеток не изменялся. В то же время количество CD56^{dim}CD94⁺ NK-клеток после цитокинотерапии у пациентов с постковидным синдромом значительно повысилось, но отсутствовали изменения уровня экспрессии маркера CD94 на поверхности этих клеток. Необходимо отметить, что, исходя из спецификации (clone R34.34, cat. IM1980U, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США), моноклональное антитело CD94 с большей специфичностью связывается с NKG2A-рецептором. Соответственно, выраженное увеличение количества CD56^{dim}CD94⁺ NK-клеток можно связать с выходом в кровь незрелых клеток, среди которых также могут присутствовать NK-клетки с регуляторной активностью.

IL-2 является мощным индуктором пролиферации NK-клеток, в том числе и изменяя фенотип клеток и стимулируя синтез литических молекул, таких как перфорин

и гранзим В [53–56]. В частности, в исследовании R. Sharma и соавт. (2018) показано, что стимуляция IL-2 приводила к увеличению популяции NK-клеток и повышала уровень экспрессии активационных маркеров [55]. При проведении иммунореабилитации пациентов с постковидным синдромом рекомбинантным IL-2 также достигнуто восстановление абсолютного и относительного содержания NK-клеток в крови. При этом сохраняются нарушения в субпопуляционном составе клеток, проявляющиеся в снижении количества зрелых и цитотоксических NK-клеток при увеличении уровней провоспалительных и незрелых NK-клеток. Полностью восстанавливается количество CD57⁺ NK-клеток. Известно, что экспрессию CD57-маркера связывают с накоплением перфорина и гранзимов в цитотоксических клетках, что позволяет использовать данный маркер для определения количества клеток с высоким цитолитическим потенциалом [57]. После проведённой иммунореабилитации у пациентов с постковидным синдромом восстанавливается содержание CD8⁺ NK-клеток, которые также определяются как клетки с высоким уровнем цитотоксической активности. Также после проведённой цитокинотерапии восстанавливается миграционный потенциал NK-клеток (по маркеру CD62L) у пациентов с постковидным синдромом. В целом применение рекомбинантного IL-2 при иммунореабилитации пациентов с постковидным синдромом позволило значительно стимулировать функциональный потенциал NK-клеток, что, безусловно, важно для профилактики вирусных инфекций и развития онкологических заболеваний.

4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

4.1. Пациенты

Проведено обсервационное терапевтическое проспективное клиническое исследование среди пациентов, проходивших реабилитацию в клинике Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера (Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук») спустя 3 месяца после острой стадии COVID-19. В исследование включены 29 пациентов (15 женщин и 14 мужчин), перенёсших COVID-19 различной степени тяжести, в возрасте 40–65 лет. Клиническая и демографическая характеристика пациентов была описана на основании выписных эпикризов и выписок из амбулаторных карт (табл. 7).

Критериями включения в исследование являлись: перенесённый острый COVID-19 (со степенью тяжести от 3 до 7 по критериям Всемирной организации здравоохранения); клинические проявления постковидного синдрома (1–3 по шкале функционального состояния после COVID-19); подписанное информированное согласие в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека»

и Правилами клинической практики в Российской Федерации; наличие абсолютного количества NK-клеток менее $0,07 \times 10^9/\text{л}$ и/или их относительного числа менее 5% популяции лимфоцитов. Шкала клинического прогрессирования Всемирной организации здравоохранения и шкала функционального состояния после COVID-19 оценивались с использованием общепринятых методик [2, 12]. Из исследования были исключены пациенты с аутоиммунными заболеваниями, сердечной и лёгочно-сердечной недостаточностью, онкологическими заболеваниями, беременностью и кормящие грудью, с повышенной чувствительностью к дрожжам, IL-2 или любому компоненту препарата в анамнезе, а также пациенты с декомпенсированной печёночной и почечной недостаточностью.

Таблица 7. Клинико-демографическая характеристика обследуемых пациентов с постковидным синдромом

Характеристики	Показатели
Женщины, <i>n</i> / %	15 / 51,72
Мужчины, <i>n</i> / %	14 / 48,28
Средний возраст, лет	57,0
<i>Возрастная группа, <i>n</i> / %</i>	
<45	8 / 27,59
45–59	15 / 51,72
≥ 60	6 / 20,69
<i>Шкала клинического прогрессирования Всемирной организации здравоохранения, <i>n</i> / %</i>	
1–3	13 / 44,83
4–5	12 / 41,38
6–7	4 / 13,79
<i>Симптомы, <i>n</i> / %</i>	
Лихорадка	29 / 100
Другие признаки интоксикации	29 / 100
Кашель	24 / 82,76
Другие респираторные признаки	29 / 100
Дыхательная недостаточность с респираторной поддержкой	4 / 13,79
Дыхательная недостаточность с интубацией и искусственной вентилацией лёгких	2 / 6,90
Аносмия	5 / 17,24
Поражения желудочно-кишечного тракта	11 / 37,93
Диарея	3 / 10,34
<i>Биомаркеры, <i>Me</i> (IQR)</i>	
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	5,38 (4,21–7,53)
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	0,80 (0,47–1,53)
С-реактивный белок	62,4 (25,2–98,5)
D-димеры	653 (435,7–904,8)
Лактатдегидрогеназа	638 (417–811)

Таблица 7. Окончание

Характеристики	Показатели
<i>Осложнения, n / %</i>	
Пневмония	22 / 75,86
В том числе:	
• КТ1	12 / 50,0
• КТ2	8 / 40,91
• КТ3	2 / 9,09
Синдром системного воспалительного ответа	29 / 100
Поражения сердечно-сосудистой системы	3 / 10,34
Острая почечная недостаточность	1 / 3,45
Острая печёночная недостаточность	3 / 10,34
Депрессия, тревога	6 / 20,69
Несколько осложнений	23 / 79,31
<i>Сопутствующие заболевания, n / %</i>	
Гипертоническая болезнь	23 / 79,31
Другие сердечно-сосудистые заболевания	9 / 31,03
Цереброваскулярная недостаточность	6 / 20,69
Сахарный диабет	2 / 6,9
Хроническая болезнь лёгких	1 / 3,45
Хроническая болезнь печени	3 / 10,3
Ожирение	9 / 31,03
Прочие болезни	5 / 17,24
Несколько заболеваний	27 / 93,10
<i>Шкала функционального состояния после COVID-19, n / %</i>	
1	9 / 31,03
2	14 / 48,28
3	6 / 20,69

Для коррекции иммунологических параметров и увеличения числа NK-клеток в качестве иммунокорригирующей терапии все пациенты с постковидным синдромом получали рекомбинантный IL-2 в дозе 0,5 мг (эквивалентно 500 000 ME), подкожно, 3 инъекции с интервалом 48 ч, на фоне базовой терапии (детоксикационная,

метаболическая, симптоматическая). Иммунологические исследования проводились дважды — до лечения и после терапии рекомбинантным IL-2. В качестве контрольной группы было обследовано 35 здоровых добровольцев аналогичного возрастного диапазона. Протокол исследования одобрен этическими комитетами Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера (Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук») (протокол № 02/2022 от 17.02.2022).

4.2. Исследование фенотипа NK-клеток методом проточной цитометрии

Образцы венозной крови собирали в вакуумные пробирки с содержанием K₃ЭДТА (Becton Dickinson, Франклин-Лейкс, Нью-Джерси, США). Исследование фенотипа NK-клеток осуществляли не позднее 2 ч после взятия крови. Подготовку образцов крови и настройку проточного цитометра проводили в соответствии с рекомендациями производителей антител. Для исследования фенотипа NK-клеток применяли две панели моноклональных антител (MAT), конъюгированных с различными флуорохромами (все MAT производства Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США) (табл. 8).

Первая панель подготовила следующие MAT: ФИТЦ-меченые антитела мыши к CD57 человека (клон NC1, кат. IM0466U, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США), меченые фикоэритрином антитела мыши к CD94 человека (клон R34.34, кат. IM1980U, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США), ECD-меченые антитела мыши к CD62L человека (клон DREG5, кат. IM2276, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США), PC5-меченые антитела мыши к CD56 человека (клон N901, кат. A07789, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США), PC7-меченые антитела мыши к CD16 человека (клон 3G8, кат. 6607118, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США), APC-меченые антитела мыши к CD8 человека (клон B9.11, кат. IM2469, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США), A-A700-меченые антитела мыши к CD3 человека (клон UCHT1, кат. B10823, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США) и A-A750-меченые

Таблица 8. Основные характеристики антител, используемых для проточной цитометрии

№	CD	Флуорохром	Клон	Кат.	Разведение	Субпопуляция NK-клеток
1	CD57	FITC	NC1	IM0466U	1:4	Эффекторные NK-клетки
2	CD94	PE	R34.34	IM1980U	1:2	Незрелые NK-клетки
3	CD62L	ECD	DREG5	IM2276	1:4	Незрелые NK-клетки
4	CD56	PC5.5	N901	A07789	1:2	Маркер линии NK-клеток
5	CD16	PC7	3G8	6607118	1:4	Субпопуляции NK-клеток
6	CD8	APC	B9.11	IM2469	1:8	Маркер субпопуляции NK-клеток
7	CD3	APC-A700	UCHT1	B10823	1:4	Исключение T-клеток
8	CD45	APC-A750	J33	A79392	1:4	Маркер лимфоцитов линии, исключение клеточного детрита

антитела мыши к CD45 человека (клон J33, кат. A79392, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США).

Вторая панель включала следующие МАТ: ФИТЦ-меченые антитела мыши к CD38 человека (клон T16, кат. A07778, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США), меченые фикоэритрином антитела мыши к CD73 человека (клон AD-2, кат. B68176, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США), ECD-меченые антитела мыши к CD56 человека (клон N901, кат. B49214, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США), A-A700-меченые антитела мыши к CD3 человека (клон UCST1, кат. B10823, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США) и A-A750-меченые антитела мыши к CD45 человека (клон J33, кат. A79392, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США).

Дополнительно по средней интенсивности флуоресценции (СИФ) оценивались уровни экспрессии функциональных антигенов. Указанными коктейлями МАТ окрашивали 100 мкл образца крови в соответствии с рекомендациями производителя. Удаление эритроцитов из образцов производили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора VersaLyse Lysing Solution (кат. A09777, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США), к 975 мкл которого добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (кат. A07800, Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США) в Красноярском краевом центре научного оборудования Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук». В каждой пробе анализировали не менее 50 000 лимфоцитов.

4.3. Статистический анализ

Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.2.2 (Beckman Coulter, Индианаполис, Индиана, США). Стратегия гейтирования показана на рис. 3.

Описание выборки производили с помощью подсчёта медианы (Me) и квартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C_{25} и C_{75}). Качественные переменные клинических показателей были представлены в абсолютных (n) и относительных (%) значениях. Достоверность различий количественных показателей несвязанных выборок оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney U test). Достоверность различий количественных показателей пациентов с постковидным синдромом до и после лечения рекомбинантным IL-2 определяли по тесту согласованных пар Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Сравнение качественных переменных проводилось с использованием точного χ^2 . Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft, Талса, Оклахома, США, 2007 г.).

5. ВЫВОДЫ

Во время острой инфекции SARS-CoV-2 вирус препятствует правильному иммунному ответу 1-го типа, тем самым нарушая функциональность клеток Th1, CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток [15, 16]. В свою очередь, после острого COVID-19 многие пациенты столкнулись с постковидным синдромом, который повлиял на функционирование различных иммунных органов и клеток у выздоравливающих пациентов с острым COVID-19 [14, 17]. В настоящее время уже существуют рекомендации по реабилитации состояния после COVID-19 [58, 59]. Однако доказательств эффективности этих вмешательств у лиц с постковидным синдромом всё ещё нет. Наши данные указывают на то, что у пациентов с постковидным синдромом количество и функциональная активность NK-клеток периферической крови были снижены. Нарушения в составе подмножества клеток характеризовались низким уровнем зрелых и цитотоксических NK-клеток с повышенным высвобождением незрелых NK-клеток. Функциональная недостаточность NK-клеток при постковидном синдроме характеризовалась снижением цитотоксической активности за счёт снижения количества CD57⁺ и CD8⁺ NK-клеток. Кроме того, у пациентов с постковидным синдромом миграционный потенциал NK-клеток был снижен. При лечении таких пациентов рекомбинантным IL-2 количество и функциональный потенциал NK-клеток периферической крови восстанавливались. Следует отметить, что цитокиновая терапия не приводила к восстановлению состава субпопуляции NK-клеток, а уровень NKG2A⁺CD56^{dim} NK-клеток, включая регуляторные клетки, у пациентов также был повышен. В целом эффективность использования рекомбинантного человеческого IL-2 в лечении постковидного синдрома доказана у пациентов с низким уровнем NK-клеток. В дальнейшем необходимо оценить влияние лечения рекомбинантным человеческим IL-2 на другие иммунные клетки, которые принимают участие в иммунном ответе 1-го типа. Соответственно, следует дополнительно оценить эффективность такой иммунотерапии при постковидном синдроме для восстановления других звеньев иммунной системы.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Настоящая статья представляет собой перевод статьи: Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Isakov D.V., Sadowski I.S., Belenyuk V.D., Borisov A.G. Recombinant Human Interleukin-2 Corrects NK Cell Phenotype and Functional Activity in Patients with Post-COVID Syndrome // *Pharmaceuticals*. 2023. Vol. 16, N 4. P. 537. DOI: 10.3390/ph16040537

Публикуется с разрешения правообладателя.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную

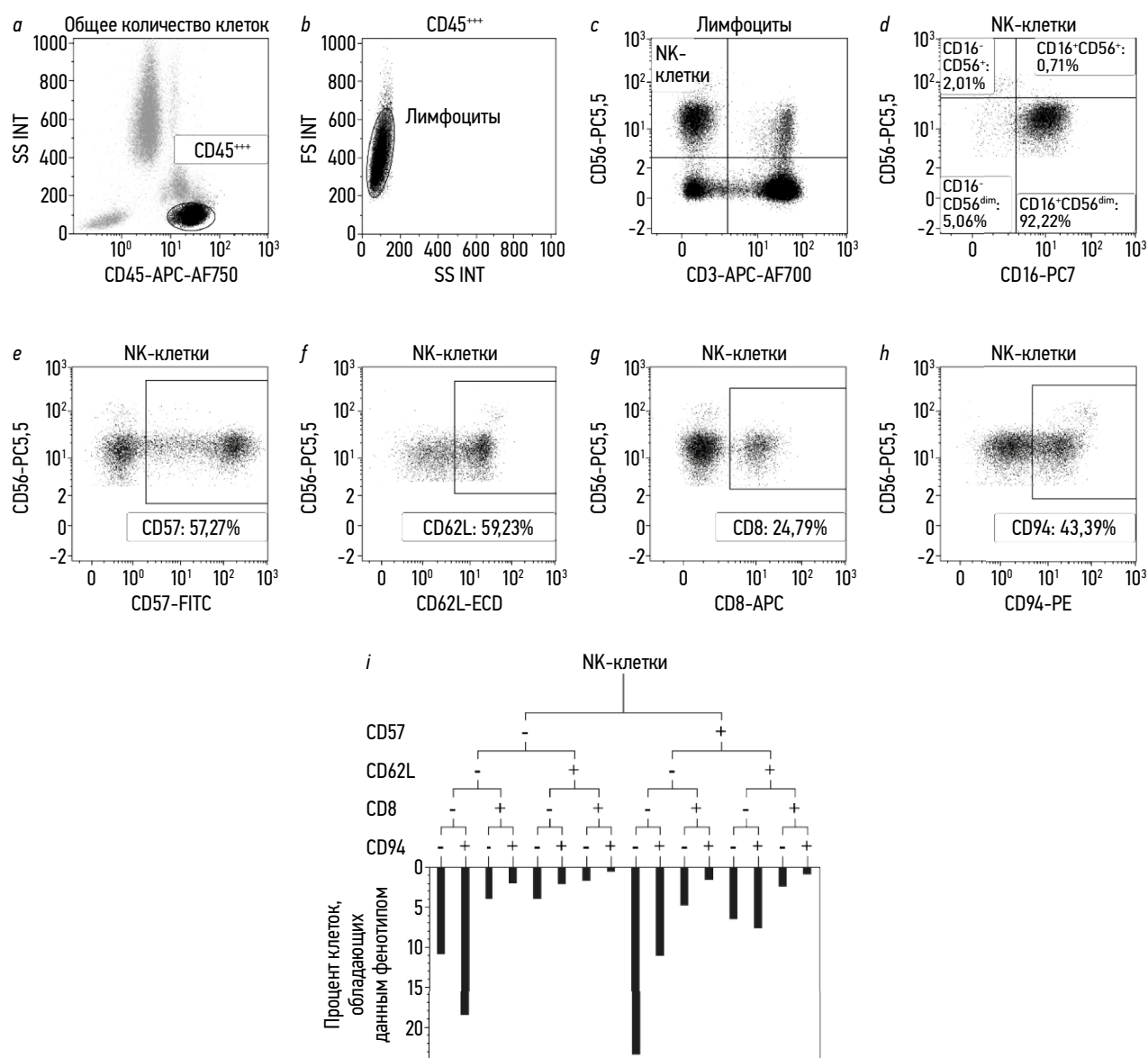


Рис. 3. Стратегия гейтирования иммунофенотипирования проточной цитометрии для субпопуляций НК-клеток: *a* — идентификация общей субпопуляции лимфоцитов на основе бокового рассеивания и яркой экспрессии CD45; *b* — различение отдельных лимфоцитов, дублетов и клеточного детрита; *c* — общая субпопуляция НК-клеток, определённая как CD3⁺CD56⁺; *d* — коэкспрессия CD16 и CD56 на основных субпопуляциях НК-клеток, включая НК-клетки CD16⁺CD56⁺, CD16⁺CD56^{dim} и CD16⁺CD56^{dim}; *e*–*h* — экспрессия CD57, CD62L, CD8 и CD94 НК-клетками; эти гейты использовались в качестве ветвей для иерархической древовидной гистограммы; *i* — иерархическая древовидная гистограмма, гейтированная на общих субпопуляциях НК-клеток в качестве примера. Гистограмма частот под деревьями показывает относительную долю клеток с различными паттернами совместной экспрессии CD57, CD62L, CD8 и CD94 в общем количестве НК-клеток.

версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: А.А. Савченко, А.Г. Борисов — концептуализация; И.В. Кудрявцев — методология, курирование данных, визуализация; И.С. Садовский — программное обеспечение; Д.В. Исаков, А.Г. Борисов — валидация; А.А. Савченко — формальный анализ, написание и подготовка первоначального черновика, администрирование проекта; В.Д. Беленюк — проведение исследования, работа с источниками; Д.В. Исаков — написание, рецензирование и редактирование; А.Г. Борисов — руководство.

Источник финансирования. Работа проведена в рамках плановой темы НИР Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера (№ ЕГИСУ 121022600088-4)

и государственного задания Института экспериментальной медицины (ФГВГ-2022-0005, № 122020300186-5).

Заявление институционального наблюдательного совета.

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено этическими комитетами Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера (Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук») (протокол № 02/2022 от 17 февраля 2022 г.).

Информированное согласие на участие в исследовании. Информированное согласие было получено от всех субъектов, принимавших участие в исследовании.

Заявление о доступности данных. Данные содержатся в статье. **Благодарности.** Авторы выражают благодарность медицинским работникам Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера (Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук») за помощь в сборе данных.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов.

ADDITIONAL INFORMATION

This article is a translation of the article by Savchenko AA, Kudryavtsev IV, Isakov DV, Sadowski IS, Belenyuk VD, Borisov AG. Recombinant Human Interleukin-2 Corrects NK Cell Phenotype and Functional Activity in Patients with Post-COVID Syndrome. *Pharmaceuticals*. 2023;16(4):537. DOI: 10.3390/ph16040537

Published with the permission of the copyright holder.

Authors' contribution. All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work). A.A. Savchenko, A.G. Borisov — conceptualization; I.V. Kudryavtsev — methodology, data curation, visualization; I.S. Sadowski — software; D.V. Isakov, A.G. Borisov — validation;

A.A. Savchenko — formal analysis, writing and original draft preparation, project administration; V.D. Belenyuk — investigation, resources; D.V. Isakov — writing, review and editing; A.G. Borisov — supervision.

Funding. The work was carried out in the frames of the planned research topic of "Research Institute of Medical Problems of the North" (No. EGISU 121022600088-4) and of the State Assignment of Institute of Experimental Medicine (FGWG-2022-0005, no. 122020300186-5).

Institutional review board statement. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committees of Scientific Research Institute of Medical Problems of the North (Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences) (protocol 02/2022 dated of 17 February 2022).

Informed consent statement. Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data availability statement. Data is contained within the article.

Acknowledgments. We acknowledge the healthcare professionals from the Scientific Research Institute of Medical Problems of the North (Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences) for assistance in collecting the data.

Conflicts of interest. The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Iba T., Connors J.M., Levy J.H. The coagulopathy, endotheliopathy, and vasculitis of COVID-19 // *Inflamm Res*. 2020. Vol. 69, N 12. P. 1181–1189. doi: 10.1007/s00011-020-01401-6
- WHO Working Group on the Clinical Characterisation and Management of COVID-19 Infection. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research // *Lancet Infect Dis*. 2020. Vol. 20, N 8. P. e192–e197. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30483-7 Erratum in: *Lancet Infect Dis*. 2020. Vol. 20, N 10. P. e250. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30637-X
- Williamson E.J., Walker A.J., Bhaskaran K., et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY // *Nature*. 2020. Vol. 584, N 7821. P. 430–436. doi: 10.1038/s41586-020-2521-4
- Ahmed H., Patel K., Greenwood D.C., et al. Long-term clinical outcomes in survivors of severe acute respiratory syndrome and Middle East respiratory syndrome coronavirus outbreaks after hospitalisation or ICU admission: A systematic review and meta-analysis // *J. Rehabil Med*. 2020. Vol. 52, N 5. P. jrm00063. doi: 10.2340/16501977-2694
- Huang C., Huang L., Wang Y., et al. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: A cohort study // *Lancet*. 2021. Vol. 397, N 10270. P. 220–232. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32656-8
- Patel K., Straudi S., Yee Sien N., et al. Applying the WHO ICF Framework to the Outcome Measures Used in the Evaluation of Long-Term Clinical Outcomes in Coronavirus Outbreaks // *Int J Environ Res Public Health*. 2020. Vol. 17, N 18. P. 6476. doi: 10.3390/ijerph17186476
- Carod-Artal F.J. Post-COVID-19 syndrome: epidemiology, diagnostic criteria and pathogenic mechanisms involved // *Rev Neurol*. 2021. Vol. 72, N 11. P. 384–396. doi: 10.33588/rn.7211.2021230
- Ganesh R., Grach S.L., Ghosh A.K., et al. The Female-Predominant Persistent Immune Dysregulation of the Post-COVID Syndrome // *Mayo Clin Proc*. 2022. Vol. 97, N 3. P. 454–464. doi: 10.1016/j.mayocp.2021.11.033
- Orendáčová M., Kvašňák E., Vránová J. Effect of neurofeedback therapy on neurological post-COVID-19 complications (A pilot study) // *PLoS One*. 2022. Vol. 17, N 7. P. e0271350. doi: 10.1371/journal.pone.0271350
- Malkova A., Kudryavtsev I., Starshinova A., et al. Post COVID-19 Syndrome in Patients with Asymptomatic/Mild Form // *Pathogens*. 2021. Vol. 10, N 11. P. 1408. doi: 10.3390/pathogens10111408
- Nalbandian A., Sehgal K., Gupta A., et al. Post-acute COVID-19 syndrome // *Nat Med*. 2021. Vol. 27, N 4. P. 601–615. doi: 10.1038/s41591-021-01283-z
- Klok F.A., Boon G.J.A.M., Barco S., et al. The Post-COVID-19 Functional Status scale: a tool to measure functional status over time after COVID-19 // *Eur Respir J*. 2020. Vol. 56, N 1. P. 2001494. doi: 10.1183/13993003.01494-2020
- O'Connor R.J., Preston N., Parkin A., et al. The COVID-19 Yorkshire Rehabilitation Scale (C19-YRS): Application and psychometric analysis in a post-COVID-19 syndrome cohort // *J Med Virol*. 2022. Vol. 94, N 3. P. 1027–1034. doi: 10.1002/jmv.27415
- Sivan M., Parkin A., Makower S., Greenwood D.C. Post-COVID syndrome symptoms, functional disability, and clinical severity phenotypes in hospitalized and nonhospitalized individuals: A cross-sectional evaluation from a community COVID rehabilitation service // *J Med Virol*. 2022. Vol. 94, N 4. P. 1419–1427. doi: 10.1002/jmv.27456
- Kudryavtsev I., Rubinstein A., Golovkin A., et al. Dysregulated Immune Responses in SARS-CoV-2-Infected Patients: A Comprehensive Overview // *Viruses*. 2022. Vol. 14, N 5. P. 1082. doi: 10.3390/v14051082
- Moga E., Lynton-Pons E., Domingo P. The Robustness of Cellular Immunity Determines the Fate of SARS-CoV-2 Infection // *Front Immunol*. 2022. Vol. 13. P. 904686. doi: 10.3389/fimmu.2022.904686
- Lim J., Puan K.J., Wang L.W., et al. Data-Driven Analysis of COVID-19 Reveals Persistent Immune Abnormalities in Convalescent

- Severe Individuals // *Front Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 710217. doi: 10.3389/fimmu.2021.710217
18. Savchenko A.A., Tikhonova E., Kudryavtsev I., et al. TREC/KREC Levels and T and B Lymphocyte Subpopulations in COVID-19 Patients at Different Stages of the Disease // *Viruses.* 2022. Vol. 14, N 3. P. 646. doi: 10.3390/v14030646
19. Townsend L., Dyer A.H., Naughton A., et al. Longitudinal Analysis of COVID-19 Patients Shows Age-Associated T Cell Changes Independent of Ongoing Ill-Health // *Front Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 676932. doi: 10.3389/fimmu.2021.676932
20. Bernard N.F., Alsulami K., Pavay E., Dupuy F.P. NK Cells in Protection from HIV Infection // *Viruses.* 2022. Vol. 14, N 6. P. 1143. doi: 10.3390/v14061143
21. Fionda C., Scarno G., Stabile H., et al. NK Cells and Other Cytotoxic Innate Lymphocytes in Colorectal Cancer Progression and Metastasis // *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, N 14. P. 7859. doi: 10.3390/ijms23147859
22. Deng X., Terunuma H., Nieda M. Exploring the Utility of NK Cells in COVID-19 // *Biomedicines.* 2022. Vol. 10, N 5. P. 1002. doi: 10.3390/biomedicines10051002
23. Pituch-Noworolska A.M. NK cells in SARS-CoV-2 infection // *Cent Eur J Immunol.* 2022. Vol. 47, N 1. P. 95–101. doi: 10.5114/ceji.2022.113078
24. Di Vito C., Calcaterra F., Coianiz N., et al. Natural Killer Cells in SARS-CoV-2 Infection: Pathophysiology and Therapeutic Implications // *Front Immunol.* 2022. Vol. 13. P. 888248. doi: 10.3389/fimmu.2022.888248
25. Herrera L., Martin-Inaraja M., Santos S., et al. Identifying SARS-CoV-2 'memory' NK cells from COVID-19 convalescent donors for adoptive cell therapy // *Immunology.* 2022. Vol. 165, N 2. P. 234–249. doi: 10.1111/imm.13432
26. Zheng M., Gao Y., Wang G., et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients // *Cell Mol Immunol.* 2020. Vol. 17, N 5. P. 533–535. doi: 10.1038/s41423-020-0402-2
27. Hasichaolu, Zhang X., Li X., Li X., Li D. Circulating Cytokines and Lymphocyte Subsets in Patients Who Have Recovered from COVID-19 // *Biomed Res Int.* 2020. Vol. 2020. P. 7570981. doi: 10.1155/2020/7570981
28. Van Eeden C., Khan L., Osman M.S., Cohen Tervaert J.W. Natural Killer Cell Dysfunction and Its Role in COVID-19 // *Int J Mol Sci.* 2020. Vol. 21, N 17. P. 6351. doi: 10.3390/ijms21176351
29. Prinz D., Klein K., List J., et al. Loss of NKG2D in murine NK cells leads to increased perforin production upon long-term stimulation with IL-2 // *Eur J Immunol.* 2020. Vol. 50, N 6. P. 880–890. doi: 10.1002/eji.201948222
30. Rosenstock P., Bork K., Massa C., et al. Sialylation of Human Natural Killer (NK) Cells is Regulated by IL-2 // *J Clin Med.* 2020. Vol. 9, N 6. P. 1816. doi: 10.3390/jcm9061816
31. Sönmez C., Wölfer J., Holling M., et al. Blockade of inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptors and IL-2 triggering reverses the functional hypoactivity of tumor-derived NK-cells in glioblastomas // *Sci Rep.* 2022. Vol. 12, N 1. P. 6769. doi: 10.1038/s41598-022-10680-4
32. Eller M.A., Currier J.R. OMIP-007: phenotypic analysis of human natural killer cells // *Cytometry A.* 2012. Vol. 81, N 6. P. 447–449. doi: 10.1002/cyto.a.22033
33. Barnes S., Schilizzi O., Audsley K.M., Newnes H.V., Foley B. Deciphering the Immunological Phenomenon of Adaptive Natural Killer (NK) Cells and Cytomegalovirus (CMV) // *Int J Mol Sci.* 2020. Vol. 21, N 22. P. 8864. doi: 10.3390/ijms21228864
34. Gonzalez J.C., Chakraborty S., Thulin N.K., Wang T.T. Heterogeneity in IgG-CD16 signaling in infectious disease outcomes // *Immunol Rev.* 2022. Vol. 309, N 1. P. 64–74. doi: 10.1111/imr.13109
35. Van Acker H.H., Capsomidis A., Smits E.L., Van Tendeloo V.F. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? // *Front Immunol.* 2017. Vol. 8. P. 892. doi: 10.3389/fimmu.2017.00892
36. Van Acker H.H., Van Acker Z.P., Versteven M., et al. CD56 Homodimerization and Participation in Anti-Tumor Immune Effector Cell Functioning: A Role for Interleukin-15 // *Cancers (Basel).* 2019. Vol. 11, N 7. P. 1029. doi: 10.3390/cancers11071029
37. Adib Rad H., Basirat Z., Mostafazadeh A., et al. Evaluation of peripheral blood NK cell subsets and cytokines in unexplained recurrent miscarriage // *J Chin Med Assoc.* 2018. Vol. 81, N 12. P. 1065–1070. doi: 10.1016/j.jcma.2018.05.005
38. Papak I., Chruściel E., Dziubek K., et al. What Inhibits Natural Killers' Performance in Tumour // *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, N 13. P. 7030. doi: 10.3390/ijms23137030
39. Vujanovic L., Chuckran C., Lin Y., et al. CD56^{dim} CD16⁺ Natural Killer Cell Profiling in Melanoma Patients Receiving a Cancer Vaccine and Interferon-α // *Front Immunol.* 2019. Vol. 10. P. 14. doi: 10.3389/fimmu.2019.00014
40. Corvino D., Kumar A., Bald T. Plasticity of NK cells in Cancer // *Front Immunol.* 2022. Vol. 13. P. 888313. doi: 10.3389/fimmu.2022.888313
41. Kared H., Martelli S., Ng T.P., Pender S.L., Larbi A. CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes // *Cancer Immunol Immunother.* 2016. Vol. 65, N 4. P. 441–452. doi: 10.1007/s00262-016-1803-z
42. Liu B., Yang G.X., Sun Y., et al. Decreased CD57 expression of natural killer cells enhanced cytotoxicity in patients with primary sclerosing cholangitis // *Front Immunol.* 2022. Vol. 13. P. 912961. doi: 10.3389/fimmu.2022.912961
43. Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., et al. Heterogenous CD8⁺ T Cell Maturation and 'Polarization' in Acute and Convalescent COVID-19 Patients // *Viruses.* 2022. Vol. 14, N 9. P. 1906. doi: 10.3390/v14091906
44. Rajamanickam A., Pavan Kumar N., Pandiaraj A.N., et al. Characterization of memory T cell subsets and common γ-chain cytokines in convalescent COVID-19 individuals // *J Leukoc Biol.* 2022. Vol. 112, N 1. P. 201–212. doi: 10.1002/JLB.5COVA0721-392RR
45. Gosain R., Abdou Y., Singh A., et al. COVID-19 and Cancer: a Comprehensive Review // *Curr Oncol Rep.* 2020. Vol. 22, N 5. P. 53. doi: 10.1007/s11912-020-00934-7
46. Gelmez, Gelmez M.Y., Oktelik F.B., Tahrali I., et al. Immune modulation as a consequence of SARS-CoV-2 infection // *Front Immunol.* 2022. Vol. 13. P. 954391. doi: 10.3389/fimmu.2022.954391
47. Ito Y., Nakahara F., Kagoya Y., Kurokawa M. CD62L expression level determines the cell fate of myeloid progenitors // *Stem Cell Reports.* 2021. Vol. 16, N 12. P. 2871–2886. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.10.012
48. Ran G.H., Lin Y.Q., Tian L., et al. Natural killer cell homing and trafficking in tissues and tumors: from biology to application // *Signal Transduct Target Ther.* 2022. Vol. 7, N 1. P. 205. doi: 10.1038/s41392-022-01058-z
49. Geng J., Raghavan M. CD8αα homodimers function as a coreceptor for KIR3DL1 // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019. Vol. 116, N 36. P. 17951–17956. doi: 10.1073/pnas.1905943116
50. McKinney E.F., Cuthbertson I., Harris K.M., et al. A CD8⁺ NK cell transcriptomic signature associated with clinical outcome in relapsing remitting multiple sclerosis // *Nat Commun.* 2021. Vol. 12, N 1. P. 635. doi: 10.1038/s41467-020-20594-2
51. Schulte-Wrede U., Sörensen T., Grün J.R., et al. An explorative study on deep profiling of peripheral leukocytes to identify predictors

for responsiveness to anti-tumour necrosis factor alpha therapies in ankylosing spondylitis: natural killer cells in focus // *Arthritis Res Ther.* 2018. Vol. 20, N 1. P. 191. doi: 10.1186/s13075-018-1692-y

52. Halma J., Pierce S., McLennan R., Bradley T., Fischer R. Natural killer cells in liver transplantation: Can we harness the power of the immune checkpoint to promote tolerance? // *Clin Transl Sci.* 2022. Vol. 15, N 5. P. 1091–1103. doi: 10.1111/cts.13208

53. Khalil M., Wang D., Hashemi E., Terhune S.S., Malarkannan S. Implications of a 'Third Signal' in NK Cells // *Cells.* 2021. Vol. 10, N 8. P. 1955. doi: 10.3390/cells10081955

54. Abel A.M., Yang C., Thakar M.S., Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization // *Front Immunol.* 2018. Vol. 9. P. 1869. doi: 10.3389/fimmu.2018.01869

55. Sharma R., Das A. IL-2 mediates NK cell proliferation but not hyperactivity // *Immunol Res.* 2018. Vol. 66, N 1. P. 151–157. doi: 10.1007/s12026-017-8982-3

56. Dhawan M., Rabaan A.A., Fawarah M.M.A., et al. Updated Insights into the T Cell-Mediated Immune Response against SARS-CoV-2: A Step towards Efficient and Reliable Vaccines // *Vaccines (Basel).* 2023. Vol. 11, N 1. P. 101. doi: 10.3390/vaccines11010101

57. Chattopadhyay P.K., Betts M.R., Price D.A., et al. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression // *J Leukoc Biol.* 2009;85(1):88–97. doi: 10.1189/jlb.0208107

58. Fugazzaro S., Contri A., Esseroukh O., et al. Rehabilitation Interventions for Post-Acute COVID-19 Syndrome: A Systematic Review // *Int J Environ Res Public Health.* 2022. Vol. 19, N 9. P. 5185. doi: 10.3390/ijerph19095185

59. Maley J.H., Alba G.A., Barry J.T., et al. Multi-disciplinary collaborative consensus guidance statement on the assessment and treatment of breathing discomfort and respiratory sequelae in patients with post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection (PASC) // *PM R.* 2022. Vol. 14, N 1. P. 77–95. doi: 10.1002/pmrj.12744

REFERENCES

1. Iba T, Connors JM, Levy JH. The coagulopathy, endotheliopathy, and vasculitis of COVID-19. *Inflamm Res.* 2020;69(12):1181–1189. doi: 10.1007/s00011-020-01401-6

2. WHO Working Group on the Clinical Characterisation and Management of COVID-19 Infection. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(8):e192–e197. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30483-7 Erratum in: *Lancet Infect Dis.* 2020;20(10):e250. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30637-X

3. Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature.* 2020;584(7821):430–436. doi: 10.1038/s41586-020-2521-4

4. Ahmed H, Patel K, Greenwood DC, et al. Long-term clinical outcomes in survivors of severe acute respiratory syndrome and Middle East respiratory syndrome coronavirus outbreaks after hospitalisation or ICU admission: A systematic review and meta-analysis. *J Rehabil Med.* 2020;52(5):jrm00063. doi: 10.2340/16501977-2694

5. Huang C, Huang L, Wang Y, et al. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *Lancet.* 2021;397(10270):220–232. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32656-8

6. Patel K, Straudi S, Yee Sien N, et al. Applying the WHO ICF Framework to the Outcome Measures Used in the Evaluation of Long-Term Clinical Outcomes in Coronavirus Outbreaks. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(18):6476. doi: 10.3390/ijerph17186476

7. Carod-Artal FJ. Post-COVID-19 syndrome: epidemiology, diagnostic criteria and pathogenic mechanisms involved. *Rev Neurol.* 2021;72(11):384–396. doi: 10.33588/rn.7211.2021230

8. Ganesh R, Grach SL, Ghosh AK, et al. The Female-Predominant Persistent Immune Dysregulation of the Post-COVID Syndrome. *Mayo Clin Proc.* 2022;97(3):454–464. doi: 10.1016/j.mayocp.2021.11.033

9. Orendáčová M, Kvašňák E, Vránová J. Effect of neurofeedback therapy on neurological post-COVID-19 complications (A pilot study). *PLoS One.* 2022;17(7):e0271350. doi: 10.1371/journal.pone.0271350

10. Malkova A, Kudryavtsev I, Starshinova A, et al. Post COVID-19 Syndrome in Patients with Asymptomatic/Mild Form. *Pathogens.* 2021;10(11):1408. doi: 10.3390/pathogens10111408

11. Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A, et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med.* 2021;27(4):601–615. doi: 10.1038/s41591-021-01283-z

12. Klok FA, Boon GJAM, Barco S, et al. The Post-COVID-19 Functional Status scale: a tool to measure functional status over time after COVID-19. *Eur Respir J.* 2020;56(1):2001494. doi: 10.1183/13993003.01494-2020

13. O'Connor RJ, Preston N, Parkin A, et al. The COVID-19 Yorkshire Rehabilitation Scale (C19-YRS): Application and psychometric analysis in a post-COVID-19 syndrome cohort. *J Med Virol.* 2022;94(3):1027–1034. doi: 10.1002/jmv.27415

14. Sivan M, Parkin A, Makower S, Greenwood DC. Post-COVID syndrome symptoms, functional disability, and clinical severity phenotypes in hospitalized and nonhospitalized individuals: A cross-sectional evaluation from a community COVID rehabilitation service. *J Med Virol.* 2022;94(4):1419–1427. doi: 10.1002/jmv.27456

15. Kudryavtsev I, Rubinstein A, Golovkin A, et al. Dysregulated Immune Responses in SARS-CoV-2-Infected Patients: A Comprehensive Overview. *Viruses.* 2022;14(5):1082. doi: 10.3390/v14051082

16. Moga E, Lynton-Pons E, Domingo P. The Robustness of Cellular Immunity Determines the Fate of SARS-CoV-2 Infection. *Front Immunol.* 2022;13:904686. doi: 10.3389/fimmu.2022.904686

17. Lim J, Puan KJ, Wang LW, et al. Data-Driven Analysis of COVID-19 Reveals Persistent Immune Abnormalities in Convalescent Severe Individuals. *Front Immunol.* 2021;12:710217. doi: 10.3389/fimmu.2021.710217

18. Savchenko AA, Tikhonova E, Kudryavtsev I, et al. TREC/KREC Levels and T and B Lymphocyte Subpopulations in COVID-19 Patients at Different Stages of the Disease. *Viruses.* 2022;14(3):646. doi: 10.3390/v14030646

19. Townsend L, Dyer AH, Naughton A, et al. Longitudinal Analysis of COVID-19 Patients Shows Age-Associated T Cell Changes Independent of Ongoing Ill-Health. *Front Immunol.* 2021;12:676932. doi: 10.3389/fimmu.2021.676932

20. Bernard NF, Alsulami K, Pavey E, Dupuy FP. NK Cells in Protection from HIV Infection. *Viruses.* 2022;14(6):1143. doi: 10.3390/v14061143

21. Fionda C, Scarso G, Stabile H, et al. NK Cells and Other Cytotoxic Innate Lymphocytes in Colorectal Cancer Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(14):7859. doi: 10.3390/ijms23147859

22. Deng X, Terunuma H, Nieda M. Exploring the Utility of NK Cells in COVID-19. *Biomedicines.* 2022;10(5):1002. doi: 10.3390/biomedicines10051002

23. Pituch-Noworolska AM. NK cells in SARS-CoV-2 infection. *Cent Eur J Immunol*. 2022;47(1):95–101. doi: 10.5114/ceji.2022.113078
24. Di Vito C, Calcaterra F, Coianiz N, et al. Natural Killer Cells in SARS-CoV-2 Infection: Pathophysiology and Therapeutic Implications. *Front Immunol*. 2022;13:888248. doi: 10.3389/fimmu.2022.888248
25. Herrera L, Martin-Inaraja M, Santos S, et al. Identifying SARS-CoV-2 'memory' NK cells from COVID-19 convalescent donors for adoptive cell therapy. *Immunology*. 2022;165(2):234–249. doi: 10.1111/imm.13432
26. Zheng M, Gao Y, Wang G, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(5):533–535. doi: 10.1038/s41423-020-0402-2
27. Hasichaolu, Zhang X, Li X, Li X, Li D. Circulating Cytokines and Lymphocyte Subsets in Patients Who Have Recovered from COVID-19. *Biomed Res Int*. 2020;2020:7570981. doi: 10.1155/2020/7570981
28. Van Eeden C, Khan L, Osman MS, Cohen Tervaert JW. Natural Killer Cell Dysfunction and Its Role in COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21, N 17. P. 6351. doi: 10.3390/ijms21176351
29. Prinz D, Klein K, List J, et al. Loss of NKG2D in murine NK cells leads to increased perforin production upon long-term stimulation with IL-2. *Eur J Immunol*. 2020;50(6):880–890. doi: 10.1002/eji.201948222
30. Rosenstock P, Bork K, Massa C, et al. Sialylation of Human Natural Killer (NK) Cells is Regulated by IL-2. *J Clin Med*. 2020;9(6):1816. doi: 10.3390/jcm9061816
31. Sönmez C, Wölfer J, Holling M, et al. Blockade of inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptors and IL-2 triggering reverses the functional hypoactivity of tumor-derived NK-cells in glioblastomas. *Sci Rep*. 2022;12(1):6769. doi: 10.1038/s41598-022-10680-4
32. Eller MA, Currier JR. OMIP-007: phenotypic analysis of human natural killer cells. *Cytometry A*. 2012;81(6):447–449. doi: 10.1002/cyto.a.22033
33. Barnes S, Schilizzi O, Audsley KM, Newnes HV, Foley B. Deciphering the Immunological Phenomenon of Adaptive Natural Killer (NK) Cells and Cytomegalovirus (CMV). *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8864. doi: 10.3390/ijms21228864
34. Gonzalez JC, Chakraborty S, Thulin NK, Wang TT. Heterogeneity in IgG-CD16 signaling in infectious disease outcomes. *Immunol Rev*. 2022;309(1):64–74. doi: 10.1111/imr.13109
35. Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Front Immunol*. 2017;8:892. doi: 10.3389/fimmu.2017.00892
36. Van Acker HH, Van Acker ZP, Versteven M, et al. CD56 Homodimerization and Participation in Anti-Tumor Immune Effector Cell Functioning: A Role for Interleukin-15. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7):1029. doi: 10.3390/cancers11071029
37. Adib Rad H, Basirat Z, Mostafazadeh A, et al. Evaluation of peripheral blood NK cell subsets and cytokines in unexplained recurrent miscarriage. *J Chin Med Assoc*. 2018;81(12):1065–1070. doi: 10.1016/j.jcma.2018.05.005
38. Papak I, Chruściel E, Dziubek K, et al. What Inhibits Natural Killers' Performance in Tumour. *Int J Mol Sci*. 2022;23(13):7030. doi: 10.3390/ijms23137030
39. Vujanovic L, Chuckran C, Lin Y, et al. CD56^{dim} CD16⁺ Natural Killer Cell Profiling in Melanoma Patients Receiving a Cancer Vaccine and Interferon- α . *Front Immunol*. 2019;10:14. doi: 10.3389/fimmu.2019.00014
40. Corvino D, Kumar A, Bald T. Plasticity of NK cells in Cancer. *Front Immunol*. 2022;13:888313. doi: 10.3389/fimmu.2022.888313
41. Kared H, Martelli S, Ng TP, Pender SL, Larbi A. CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*. 2016;65(4):441–452. doi: 10.1007/s00262-016-1803-z
42. Liu B, Yang GX, Sun Y, et al. Decreased CD57 expression of natural killer cells enhanced cytotoxicity in patients with primary sclerosing cholangitis. *Front Immunol*. 2022;13:912961. doi: 10.3389/fimmu.2022.912961
43. Kudryavtsev IV, Arsentieva NA, Korobova ZR, et al. Heterogenous CD8+ T Cell Maturation and 'Polarization' in Acute and Convalescent COVID-19 Patients. *Viruses*. 2022;14(9):1906. doi: 10.3390/v14091906
44. Rajamanickam A, Pavan Kumar N, Pandiaraj AN, et al. Characterization of memory T cell subsets and common γ -chain cytokines in convalescent COVID-19 individuals. *J Leukoc Biol*. 2022;112(1):201–212. doi: 10.1002/JLB.5COVA0721-392RR
45. Gosain R, Abdou Y, Singh A, et al. COVID-19 and Cancer: a Comprehensive Review. *Curr Oncol Rep*. 2020;22(5):53. doi: 10.1007/s11912-020-00934-7
46. Gelmez MY, Oktelik FB, Tahrili I, et al. Immune modulation as a consequence of SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol*. 2022;13:954391. doi: 10.3389/fimmu.2022.954391
47. Ito Y, Nakahara F, Kagoya Y, Kurokawa M. CD62L expression level determines the cell fate of myeloid progenitors. *Stem Cell Reports*. 2021;16(12):2871–2886. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.10.012
48. Ran GH, Lin YQ, Tian L, et al. Natural killer cell homing and trafficking in tissues and tumors: from biology to application. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):205. doi: 10.1038/s41392-022-01058-z
49. Geng J, Raghavan M. CD8 α homodimers function as a coreceptor for KIR3DL1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(36):17951–17956. doi: 10.1073/pnas.1905943116
50. McKinney EF, Cuthbertson I, Harris KM, et al. A CD8+ NK cell transcriptomic signature associated with clinical outcome in relapsing remitting multiple sclerosis. *Nat Commun*. 2021;12(1):635. doi: 10.1038/s41467-020-20594-2
51. Schulte-Wrede U, Sörensen T, Grün JR, et al. An explorative study on deep profiling of peripheral leukocytes to identify predictors for responsiveness to anti-tumour necrosis factor alpha therapies in ankylosing spondylitis: natural killer cells in focus. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1):191. doi: 10.1186/s13075-018-1692-y
52. Halma J, Pierce S, McLennan R, Bradley T, Fischer R. Natural killer cells in liver transplantation: Can we harness the power of the immune checkpoint to promote tolerance? *Clin Transl Sci*. 2022;15(5):1091–1103. doi: 10.1111/cts.13208
53. Khalil M, Wang D, Hashemi E, Terhune SS, Malarkannan S. Implications of a 'Third Signal' in NK Cells. *Cells*. 2021;10(8):1955. doi: 10.3390/cells10081955
54. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol*. 2018;9:1869. doi: 10.3389/fimmu.2018.01869
55. Sharma R, Das A. IL-2 mediates NK cell proliferation but not hyperactivity. *Immunol Res*. 2018;66(1):151–157. doi: 10.1007/s12026-017-8982-3
56. Dhawan M, Rabaan AA, Fawarah MMA, et al. Updated Insights into the T Cell-Mediated Immune Response against SARS-CoV-2: A Step towards Efficient and Reliable Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(1):101. doi: 10.3390/vaccines11010101
57. Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, et al. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol*. 2009;85(1):88–97. doi: 10.1189/jlb.0208107

58. Fugazzaro S, Contri A, Esseroukh O, et al. Rehabilitation Interventions for Post-Acute COVID-19 Syndrome: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(9):5185. doi: 10.3390/ijerph19095185

59. Maley JH, Alba GA, Barry JT, et al. Multi-disciplinary collaborative consensus guidance statement on the assessment and treatment of breathing discomfort and respiratory sequelae in patients with post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection (PASC). *PM R*. 2022;14(1):77–95. doi: 10.1002/pmrj.12744

ОБ АВТОРАХ

*** Кудрявцев Игорь Владимирович**, канд. биол. наук;
адрес: Россия, 197376, Санкт-Петербург,
улица Академика Павлова, д. 12;
ORCID: 0000-0001-7204-7850;
eLibrary SPIN: 4903-7636;
e-mail: igorek1981@yandex.ru

Савченко Андрей Анатольевич, д-р мед. наук, профессор;
ORCID: 0000-0001-5829-672X;
eLibrary SPIN: 3132-8260;
e-mail: aasavchenko@yandex.ru

Исаков Дмитрий Валерьевич, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0002-7510-7537;
eLibrary SPIN: 3513-3519;
e-mail: issakovd71@gmail.com

Садовский Иван Сергеевич;
ORCID: 0000-0003-0338-4647;
eLibrary SPIN: 3624-9788;
e-mail: sadovskii24@rambler.ru

Беленюк Василий Дмитриевич, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0003-2848-0846;
eLibrary SPIN: 6195-6630;
e-mail: dyh.88@mail.ru

Борисов Александр Геннадьевич, канд. мед. наук;
ORCID: 0000-0002-9026-2615;
eLibrary SPIN: 9570-2254;
e-mail: 2410454@mail.ru

AUTHORS' INFO

*** Igor V. Kudryavtsev**, Cand. Sci. (Biology);
address: 12 Akademika Pavlova street, 197376 Saint Petersburg,
Russia;
ORCID: 0000-0001-7204-7850;
eLibrary SPIN: 4903-7636;
e-mail: igorek1981@yandex.ru

Andrei A. Savchenko, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor;
ORCID: 0000-0001-5829-672X;
eLibrary SPIN: 3132-8260;
e-mail: aasavchenko@yandex.ru

Dmitry V. Isakov, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0002-7510-7537;
eLibrary SPIN: 3513-3519;
e-mail: issakovd71@gmail.com

Ivan S. Sadowski;
ORCID: 0000-0003-0338-4647;
eLibrary SPIN: 3624-9788;
e-mail: sadovskii24@rambler.ru

Vasily D. Belenyuk, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0003-2848-0846;
eLibrary SPIN: 6195-6630;
e-mail: dyh.88@mail.ru

Alexandr G. Borisov, MD, Cand. Sci. (Medicine);
ORCID: 0000-0002-9026-2615;
eLibrary SPIN: 9570-2254;
e-mail: 2410454@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author