

ЛАБОРАТОРНЫЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АДАПТИВНОГО Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА К ВИРУСУ SARS-CoV-2.

Мельник А.А., к.б.н.

В конце 2019 года в мире появился новый коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2), вызывающий заболевание COVID-19. После того как новый патоген распространился по всему миру ВОЗ (Всемирная Организация Здравоохранения) объявила о пандемии 11 марта 2020 года (1). Отсутствие ранее существовавшего иммунитета к этому новому вирусу связано с необычайным ростом заболевания. На момент написания статьи в мире зарегистрировано уже более 150 млн. подтвержденных случаев инфицирования и около 3 млн. смертей. Была предпринята беспрецедентная глобальная попытка охарактеризовать иммунный ответ на SARS-CoV-2, а также разработать и применить вакцины. Понимание закономерностей иммунитета на индивидуальном и популяционном уровнях будет ключом к решению вопросов по осуществлению задачи в области здравоохранения о возможности прекращении пандемии.

Для успеха в преодолении распространения вируса SARS-CoV-2 очень важное значение имеет надежность тестирования и гибкий подход к данному виду лабораторных исследований. На текущий момент пандемии COVID-19 очень важно исследовать силу и продолжительность иммунного ответа на вирус SARS-CoV-2. Понимание этих параметров критично для эпидемиологических прогнозов и оценки действия вакцины. Появляется все больше данных о том, что Т-клеточный ответ на вирус играет не меньшую роль, чем образование специфических антител. В то время как наблюдается быстро растущее количество литературы о реакции антител на SARS-CoV-2, гораздо меньше опубликовано о Т-клетках, которые имеют решающее значение для противовирусного иммунитета. Исследования подтверждают, что эпидемиологические данные, основанные только на обнаружении антител к SARS-CoV-2, могут привести к существенной недооценке предшествующего воздействия вируса.

Иммунная система организма человека.

Иммунная система организма человека состоит из врожденного (неспецифического) и приобретенного (специфического) иммунитета.

Под **неспецифическим иммунитетом** подразумевают систему предшествующих защитных факторов организма, присущих данному виду как наследственно обусловленное свойство. Так, первые антитела к различным инфекциям ребенок начинает получать еще находясь внутри матери – через плаценту, а после рождения антитела поступают вместе с грудным молоком. **Специфический иммунитет** – это реакция организма, направленная на дифференциацию всего «своего» от всего «чужого». В понятие защиты от «чужого» входят представления о том, что специфический иммунитет проявляется всегда, когда конкретный организм приходит в контакт с тем или иным антигенно чужеродным материалом (микроорганизмы, трансплантаты, мутационно измененные собственные клетки и др.), которым приданы иммуногенные свойства. Существенным признаком специфического иммунитета является способность сохранять память о первой встрече с антигеном. Именно это свойство лежит в основе вакцинации.

Приобретенный (специфический или адаптивный) иммунитет.

Адаптивный (приобретенный или специфический иммунитет) отсутствует при рождении. Этот процесс узнавания и обучения начинается тогда, когда иммунная система сталкивается с чужеродными веществами (антигенами) и распознает их. Затем

компоненты приобретенного иммунитета узнают, как лучше всего атаковать каждый антиген. Приобретенный иммунитет также называется специфическим иммунитетом, так как он адаптирует свою атаку на определенный ранее встреченный антиген. Его отличительными чертами являются способность учиться, приспосабливаться и запоминать. Иммунная система может запомнить каждый встреченный антиген, потому что после столкновения некоторые лимфоциты превращаются в клетки памяти. Эти клетки живут долго – годами или даже десятилетиями. Когда клетки памяти сталкиваются с антигеном во второй раз, они немедленно распознают его и быстро реагируют на этот конкретный антиген. Такой специфический иммунный ответ является причиной того, что люди не болеют корью или ветряной оспой более одного раза. Напротив, вирусы простуды или гриппа умеют «уходить от удара» за счет быстрой изменчивости, поэтому нельзя получить иммунитет против них раз и навсегда.

В таблице 1 представлена классификация клеток иммунной системы в соответствии с рецепторами на их мембране.

Клетки иммунной системы			Их некоторые особенности и функции	
Гранулоциты	Базофилы		Отвечают за аллергические реакции немедленного типа. В тканях превращаются в тучные клетки (лаброциты), содержащие гистамин	
	Нейтрофилы		Фагоциты (микрофаги), противостоят в основном бактериальным и грибковым инфекциям	
	Эозинофилы		Фагоциты (микрофаги), противостоят паразитарным инвазиям. Связывают и высвобождают гистамин и другие медиаторы воспаления, таким образом регулируют аллергические процессы	
Агранулоциты	Моноциты		Фагоциты (макрофаги), синтезируют биологически активные факторы, обеспечивают иммунитет против вирусов, микробов, паразитов, противостоят развитию опухолей.	
	Лимфоциты	В-лимфоциты	Плазматические клетки	После контакта с антигеном активно вырабатывают антитела к нему
			В-клетки памяти	Сохраняют память о контактах с антигенами, активируются при повторном контакте
		Т-лимфоциты	Т-хелперы	Предъявляют антигены макрофагам и другим клеткам, выделяют цитокины
			Т-супрессоры (Т-регуляторы)	Регулируют силу иммунного ответа, контролируя Т-хелперы и Т-киллеры
			Т-киллеры (цитотоксические Т-лимфоциты)	Убивают собственные клетки организма, пораженные бактериями или вирусами, а также опухолевые клетки (в отличие от NK-клеток, специфически распознают определенные антигены). Играют важную роль в антивирусном иммунитете
			Т-клетки памяти	Сохраняют память о контактах с антигенами, формируют вторичный иммунный ответ
	NK-лимфоциты		Разрушают собственные клетки организма, отличные от нормы, например раковые или зараженные вирусами	
Дендритные клетки (дендроциты)			Предъявляют антигены Т- и В-лимфоцитам. Выделяют цитокины.	

Табл.1. Классификация клеток иммунной системы по иммунофенотипированию.

Как видно из таблицы 1 лимфоциты могут быть Т-клетками или В-клетками, которые работают в организме вместе, чтобы уничтожить чужеродный антиген.

Т-клетки.

Т-клетки происходят из стволовых клеток костного мозга, которые попадают в орган грудной клетки, называемый тимусом. Там они учатся отличать свои антигены от чужих, чтобы не атаковать собственные ткани организма. Обычно только Т-клетки, которые научились игнорировать собственные антигены (аутоантигены), созревают и покидают вилочковую железу. Т-клетки потенциально могут распознать почти неорганическое количество различных антигенов. Зрелые Т-клетки хранятся во вторичных лимфоидных органах (лимфатических узлах, селезенке, миндалинах, аппендиксе и пейеровых бляшках в слизистой оболочке тонкой кишки). Эти клетки циркулируют в кровотоке и лимфатической системе. После того, как они впервые сталкиваются с инфицированной или аномальной клеткой, они активируются и ищут именно эти клетки. Обычно для активации Т-клеткам требуется помощь другой иммунной клетки, которая разбивает антигены на фрагменты (так называемый процессинг антигена), а затем представляет антиген из

инфицированной или аномальной Т-клетки. Далее Т-клетки размножаются и специализируются в различные типы Т-клеток. Эти типы включают:

- Киллерные (цитотоксические) Т-клетки прикрепляются к антигенам инфицированных или аномальных (например, раковых клеток). Т-киллеры убивают эти клетки, проделывая отверстие в их клеточной мембране и вводя в клетки ферменты.
- Т-хелперы помогают другим иммунным клеткам. Некоторые хелперные Т-клетки способствуют В-клеткам вырабатывать антитела против чужеродных антигенов. Другие помогают активировать Т-киллеры для уничтожения инфицированных или аномальных клеток, а также активировать макрофаги.
- Супрессорные (регуляторные) Т-клетки вырабатывают вещества, которые помогают остановить иммунный ответ или иногда предотвращают возникновение определенных нежелательных реакций.

Когда Т-клетки первоначально сталкиваются с антигеном, большинство из них выполняет предназначенную им функцию, но некоторые из них развиваются в клетки памяти, которые запоминают антиген и более энергично реагируют на него, когда сталкиваются с ним снова.

В-клетки.

В-клетки образуются в костном мозге. Они имеют определенные участки (рецепторы) на своей поверхности к которым могут прикрепиться антигены и распознают почти неограниченное количество различных антигенов. Основная цель В-клеток - продуцировать антитела, которые маркируют антиген для атаки или напрямую его нейтрализуют.

Роль Т-клеток в иммунном ответе против вируса SARS-CoV-2.

Т-клетки играют решающую роль в иммунном ответе на вирусные инфекции из-за их способности избирательно уничтожать инфицированные вирусом клетки (2,3). Недавние исследования на моделях трансгенных мышей подтвердили, что Т-клетки также важны для уничтожения вирусов и борьбы с заболеванием после заражения SARS-CoV-2 (4). Следовательно, активация Т-клеток является признаком раннего SARS-CoV-2 специфического клеточного иммунного ответа (5-9). Генерация Т-клеток памяти может обеспечить пожизненную защиту от заражения. Предыдущие исследования показали, что Т-клетки, специфичные для SARS-CoV и MERS-CoV можно обнаружить через много лет после инфицирования (10-13).

Механизм Т-клеточного иммунитета против SARS-CoV-2 представлен на рисунке 1.

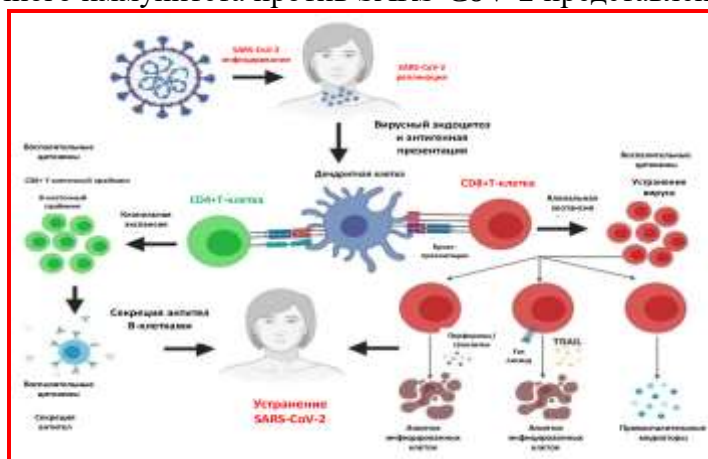


Рис.1. Механизм Т-клеточного иммунитета против SARS-CoV-2.

Как видно из рисунка 1 CD^{8+} Т-клетки распознают вирусные антигены через их презентацию молекулами основного класса гистосовместимости I (МНС I) на инфицированных вирусом клетках, а также на неинфицированных дендритных клетках и макрофагах в лимфоузлах (процесс, известный как перекрестное представление). После того как только Т-клетки активируются после распознавание антигена, они подвергаются процессу, называемому «клональной экспансией», в котором активированные Т-клетки быстро пролиферируют с образованием большого количества Т-клеток с идентичными TCR (Т-клеточный рецептор) и также распознают антиген. При элиминирования инфицированных вирусом клеток, наблюдается увеличение клонов CD^{8+} Т-клеток с TCR, специфичными для вирусных антигенов. Этот процесс осуществляется непосредственно путем их лизирования с высвобождением перфоринов/гранзимов, которые индуцируют апоптоз через лиганд, связанный с TNF-лигандом, индуцирующим апоптоз (TRAIL) или Fas лигандом (апоптозный антиген 1) и секретируют провоспалительные медиаторы, такие как интерферон- γ (IFN- γ) (14-16).

Таким образом, Т-клетки являются решающими медиаторами противовирусного адаптивного иммунитета и представляют огромный интерес и важность для их анализа в контексте заболевания COVID-19.

Методы оценки Т-клеточного иммунного ответа к COVID-19 широко используются как для диагностики заболевания у пациентов с наличием симптомов, так и для определения общего количества людей, перенесших данное заболевание, в том числе бессимптомно. Данные тесты эффективны для оценки иммунного ответа после проведения вакцинации, а также оценки напряженности специфического иммунитета в группах риска и ранее переболевших. Кроме того, Т-клетки отвечают на попадание вируса в организм раньше, чем антитела, клеточный иммунитет обеспечивает долговременную защиту от коронавирусной инфекции. Одного только исследования на антитела недостаточно для комплексной защищенности от COVID-19 (Рис.2).



Рис.2. Т-клетки сохраняются в крови еще долгое время после ослабления антител.

В настоящее время для определения адаптивного Т-клеточного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 разработаны и успешно внедрены в практику такие методы как ELISPOT и T-Detect Covid.

1. Метод ELISPOT.

Среди методов оценки Т-клеточного иммунного ответа наиболее перспективным является IGRA-ELISPOT (Interferon-Gamma Release Assay - Enzyme Linked Spot Analysis или секрета гамма-интерферона - иммуноферментный анализ пятен). Этот тест основанный на выбросе гамма-интерферона под действием специфических антигенов коронавируса (17). ELISPOT - чувствительный и надежный инструмент для измерения функционального отклика иммунитета путем оценки наличия антиген-специфических цитокин-секретирующих лимфоцитов. Данная технология впервые была применена для диагностики туберкулеза компанией Oxford Immunotec (Великобритания) и сейчас используется как один из методов оценки Т-клеточного иммунитета.

Набор T-SPOT Discovery SARS-CoV-2.

Набор для анализа T-SPOT Discovery SARS-CoV-2 предназначен для обнаружения клеточного COVID-19 опосредованного иммунитета с использованием пулов пептидов из вируса SARS-CoV-2 (рис.3).

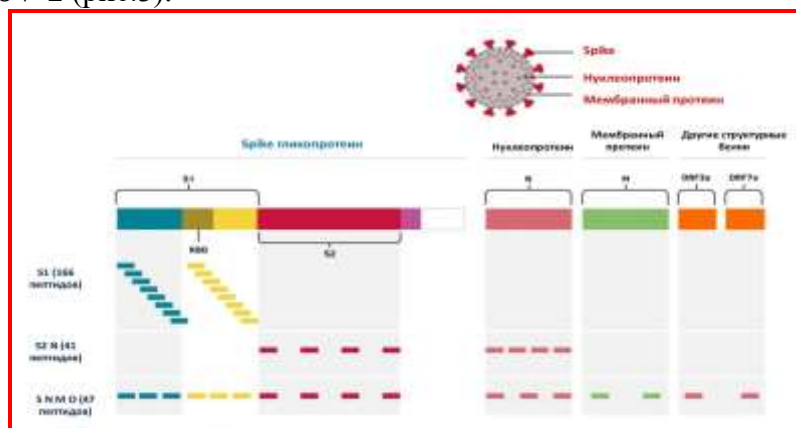


Рис.3. Пептиды из вируса SARS-CoV-2.

Принцип анализа.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяют из образца цельной крови и промывают для удаления любых источников фона. PBMC включают лимфоциты (Т, В и NK-клетки), моноциты и дендритные клетки.

Затем PBMC подсчитывается таким образом, чтобы в анализе использовалось стандартное количество клеток. Это гарантирует то, что в лунки для микротитрования будет добавлено адекватное количество образца с PBMC даже с низкими титрами Т-лимфоцитов в случае ослабленной иммунной системы (ослабленный иммунитет или иммуносупрессия).

Для каждого образца требуется шесть лунок:

1. Нулевой контроль для выявления неспецифической активации клеток;
2. COVID19-Панель 1: Панель специфических антигенов SARS-CoV-2;
3. COVID19-Панель 3: Панель специфических антигенов SARS-CoV-2;
4. COVID19. Панель 4: Панель специфических антигенов SARS-CoV-2;
5. COVID19-Панель 13: Панель, содержащая эпитопы SARS-CoV-2 с высокой степенью гомологии с эндемичными коронавирусами;
6. Положительный контроль: раствор митогена, содержащий фитогемагглютинин (ФГА) для подтверждения функциональности PBMC.

Анализ включает три панели специфических антигенов SARS-CoV-2, а также четвертую панель (Панель 13), которая содержит пул эпитопов SARS-CoV-2 с высокой степенью гомологии к эндемичным коронавирусам. Панель 13 позволяет исследовать перекрестную реактивность к эндемичным штаммам коронавирусов.

Процедура анализа.

1. Забор образца осуществляется с помощью стандартной флеботомии в пробирки для крови из которой выделяют мононуклеарные клетки периферической крови. Клетки

промывают, подсчитывают и нормализуют для создания стандартной клеточной суспензии.

2. Стандартное количество клеток добавляется в специальные планшеты и стимулируется антигенами, специфичными для изучаемого заболевания. Клетки, отвечающие на эти антигены, выделяют химический посредник, известный как цитокин.

3. Цитокиновые антитела используются для непосредственного захвата цитокина по мере его высвобождения клетками. Далее добавляется вторичное меченое антитело, которое связывается с захваченным цитокином.

4. Добавляется детекторный реагент, который вступает в реакцию с вторичным меченым антителом. В результате этой реакции образуются пятна, которые являются следствием высвобождения цитокина. Затем производится подсчет пятен (рис.4).

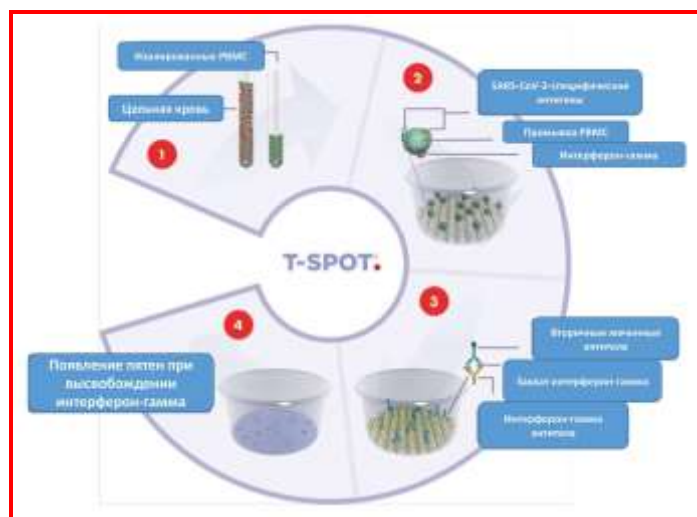


Рис.4. Общая схема проведения анализа.

В тесте подсчитываются эффекторные Т-клетки, реагирующие на стимуляцию с использованием двух отдельных пептидных пулов, измеренных параллельно в отдельных лунках. Панели антигенов T-SPOT COVID разработаны как перекрывающиеся пептиды, охватывающие последовательности белков Spike и Nucleocapsid. Этот дизайн предлагает максимальное покрытие эпитопа для более точного обнаружения реактивности Т-клеток. Антигенные препараты из 253 пептидов, покрывающие наиболее иммуногенные области вирусного генома, позволяют измерять широту иммунитета и сводят к минимуму влияние точечных мутаций. Специфичность к SARS-CoV-2 была увеличена за счет удаления потенциально перекрестно-реактивных пептидных последовательностей с высокой гомологией с другими коронавирусами.

Каждое пятно представляет собой след в виде отдельной цитокин-секретирующей Т-клетки. Производится подсчет количества полученных пятен, что показывает количество антиген-специфических эффекторных Т-клеток в периферической крови (рис.5).

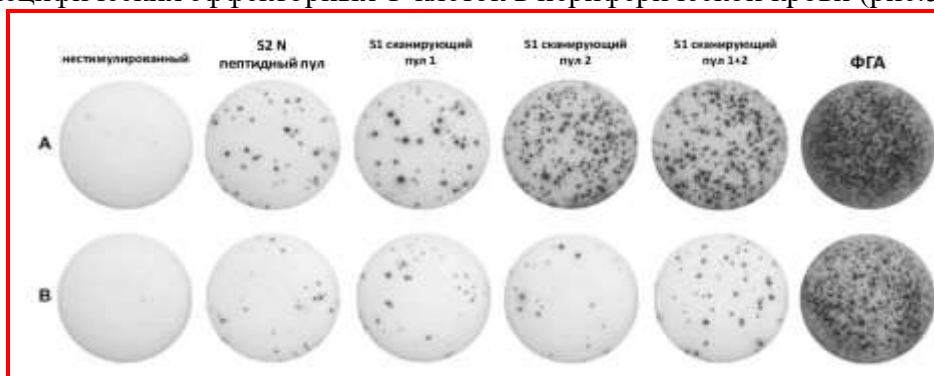


Рис.5. Пример получения различных результатов при использовании метода ELISpot.

Интерпретация результатов.

Результаты теста на Т-лимфоциты:

- > 8 пятен – «реактивные» Т-клетки ;
- 5-7 пятен – пограничный;
- < 4 пятен – «нереактивные» Т-клетки

- что означает результат теста - «реактивные» Т-клетки?

У Вас есть Т-клетки, которые реагируют на пептиды, специфичные для SARS-CoV-2, используемые в тесте. Весьма вероятно, что они подверглись воздействию вируса SARS-CoV-2.

- что означает результат теста - «нереактивные» Т-клетки?

У Вас нет Т-клеток, которые реагируют на пептиды, специфичные для SARS-CoV-2, используемые в тесте. Поэтому маловероятно, что они подверглись воздействию вируса SARS-CoV-2.

Результаты следует использовать вместе с информацией, полученной в результате клинической оценки и других диагностических процедур. Положительная корреляция с предыдущим положительным результатом ПЦР: 96,6% < 60 дней, 83,3% > 60 дней. Отрицательная корреляция с популяцией низкого риска: 98,0%.

2. T-Detect COVID.

Тест T-Detect COVID - это анализ на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования следующего поколения (NGS) для обнаружения и идентификации последовательностей гена реаранжированного Т-клеточного рецептора бета (TCR β) из геномной ДНК человека (гДНК), выделенной из венозной цельной крови с использованием дикалия этилендиаминтетрауксусной кислоты (K2-EDTA) в качестве антикоагулянта. T-Detect COVID предназначен для использования в качестве средства идентификации людей с адаптивным Т-клеточным иммунным ответом на SARS-CoV-2 и указывает на недавнее или предшествующее заражение вирусом SARS-CoV-2.

Тестирование с помощью теста T-Detect COVID предназначено специально для использования квалифицированным клиническим лабораторным персоналом, который проинструктирован и обучен на работе с использованием систем секвенирования Illumina NextSeq 500 и NextSeq 550 и рабочих процессов секвенирования нового поколения.

5 марта 2021 года FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) выдало разрешение на использование в экстренных случаях (EUA, Emergency Use Authorization или Разрешение на использование в экстренных ситуациях) для теста T-Detect COVID, разработанного компанией Adaptive Biotechnologies (США).

Принцип теста

T-Detect COVID Test - это целевой подход NGS, который определяет последовательность и количественно определяет реаранжированный TCR β последовательности из гДНК, экстрагированной из цельной венозной крови. В анализе используется машинный алгоритм для выявления пациентов с иммунным ответом на SARS - CoV - 2 на основе наблюдаемых перестроенных β -последовательностей TCR. Имеется база данных по перестроенным последовательностям β TCR, связанных с пациентами, у которых они ранее были идентифицированы.

Выделение ДНК из образца крови выполняется с помощью системы Kingfisher Flex 711 и MagMax DNA. Наборы реагентов Ultra 2.0 для нескольких проб. Минимум 18 мкг гДНК извлекается из 2 мл крови. образец. Геномная ДНК, выделенная из каждого биологического образца, разделяется на 4 реплики для реакционных лунок ПЦР. Поскольку известное количество синтетических молекул добавляются к каждой реакции ПЦР, эти молекулы используются для расчета абсолютного количества последовательности TCR β . Стратегия мультиплексной ПЦР используется при амплификации реаранжированных β -

последовательностей TCR из гДНК, референсного локуса, синтетической β-молекулы TCR и синтетических референсных молекул (рис.6).

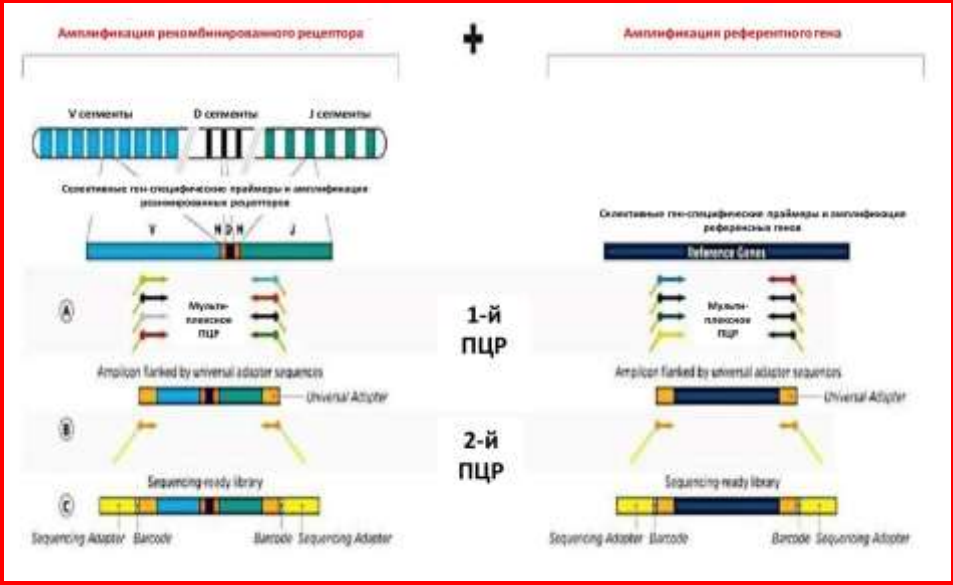


Рис.6. Стратегия мультиплексной ПЦР.

Специфичный для COVID алгоритм (классификатор) применяется к результатам основного анализа каждого образца и генерирует COVID положительный/отрицательный результат. Классификатор идентифицирует и количественно определяет любые SARS-CoV-2-связанные последовательности рецепторов Т-клеток (TCR) из заранее определенного списка из нескольких тысяч SARS-CoV-2 связанных TCR, а также количественно определяет все уникальные идентифицированные TCR. Эти факторы математически оценивают последовательности β-TCR, связанные с SARS-CoV-2. Применяется пороговое значение, чтобы классифицировать образец пациента как положительный или отрицательный на иммунный ответ на SARS CoV-2. Общее количество уникальных последовательностей TCR должно находиться в пределах порогового значения, чтобы алгоритм предоставил результат.

Интерпретация результатов.

Перед интерпретацией результатов пациента следует проверить все контроли. Если контроли недействительны, результаты пациента не могут быть интерпретированы.

Интерпретация результатов для образцов пациентов представлена в таблице 2.

Оценка	Результат контроля качества	Результат контроля качества	Пороговое значение уникальных TCR последовательностей	Клинический результат	Действие
≥ 2.23	Подтвержден	Подтвержден	≥ ниже позитивного порогового значения	Положительный	Положительный отчет
			≤ выше порогового значения	Положительный	Повторить тест с более низким входом
			> выше порогового значения	Положительный	Повторить тест с более низким входом
			< ниже положительного порогового значения	Положительный	Нет отчета о результатах
	Не подтвержден	Не подтвержден	≥ ниже позитивного порогового значения	Положительный	CLD обзор
			< ниже положительного порогового значения	Положительный	Нет отчета о

			ного порогового значения	ный	результатах
	Не подтвержден	Подтвержден или не подтвержден	Не определено	Нет результата	Повторить тест
< 2.23	Подтвержден	Подтвержден	$\geq$ ниже позитивного порогового значения	Отрицательный	Положительный отчет
			$\leq$ выше порогового значения	Отрицательный	Повторить тест с более низким входом
			$>$ выше порогового значения	Отрицательный	Повторить тест с более низким входом
		Не подтвержден	$<$ ниже положительного порогового значения	Отрицательный	Нет отчета о результатах
			$\geq$ ниже позитивного порогового значения	Отрицательный	CLD обзор
			$<$ ниже положительного порогового значения	Отрицательный	Нет отчета о результатах
	Не подтвержден	Подтвержден или не подтвержден	Не определено	Нет результата	Повторить тест

Табл.2. Интерпретация результатов для образцов пациентов при выполнении теста T-Detect COVID.

Таким образом, тест T-Detect COVID является новой технологией, которая оценивает иммунный ответ Т-клеток на COVID-19. Когда компания Adaptive Biotechnologies и технологический гигант Microsoft впервые объединились в 2018 году, они использовали облачные вычисления для «декодирования» иммунной системы. Целью партнерства было использование возможностей биотехнологической компании по определению последовательности иммунитета в сочетании с облачными вычислениями Microsoft для создания универсального анализа крови, который считывает данные об иммунной системе человека для диагностики и лечения заболеваний. В настоящее время в рамках своего исследовательского партнерства Microsoft и Adaptive Biotechnologies уже запустили базу данных ImmuneCODE, которая обеспечивает подробное представление об адаптивном иммунном ответе на вирус. База данных находится в свободном доступе для исследователей. Технологии машинного обучения и облачных вычислений Microsoft сыграли ключевую роль в разработке теста на основе Т-клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Коллективные усилия большой группы исследователей во всем мире значительно расширили научное понимание роли Т-клеток в отношении вируса SARS-CoV-2. Так, у определенной части людей в силу особенностей иммунитета (возможно при инфицировании низкой дозой возбудителя) Т-клеточное звено элиминирует вирус из организма без значимой активации В-клеточного звена, то есть с низким уровнем антителообразования, которое иногда не определяется лабораторными методами. При этом у этих людей клинические симптомы не развиваются (инфекционный процесс без развития болезни).

Предполагается, что у части людей есть приобретенная невосприимчивость к SARS-CoV-2, обусловленная, вероятнее всего Т-клетками, которые ранее «активировались» другими коронавирусами и сохранили иммунологическую память. Недавно ученые проверили старые образцы крови, взятые у людей в период 2015-2018 гг. Оказалось, что иммунная система некоторых из них научилась распознавать COVID-19 задолго до начала пандемии, что свидетельствует о том, что их организм уже сталкивался в прошлом с вирусами, имевшие похожие поверхностные белки. До конца данный феномен пока не изучен, но наиболее вероятной является теория о том, что Т-лимфоциты у данных пациентов перекрестно активированы предыдущим воздействием широко циркулирующих в популяции «простудных» коронавирусов. Если человек ранее сталкивался с какими-то коронавирусами, то эти клетки сохранили информацию обо всем семействе коронавируса, так как у них на 70% совпадает генетический состав. Эти клетки памяти помогают определенной части населения сохранить иммунитет.

Функцией Т-клеток является уничтожение вируса и формирование клеточной памяти. Память Т-клеток во время повторного воздействия может остановить развитие тяжелого заболевания. По данным исследований у 93% людей, которые встречались с вирусом SARS-CoV-2, формировался устойчивый Т-клеточный ответ, несмотря на то что антитела были обнаружены только у 60% из них. Исследование только гуморального звена иммунитета (определение в крови антител) не может дать полноценной картины иммунного статуса человека. С целью комплексной оценки иммунного ответа, совместно с тестами на оценку уровня антител, следует определять Т-клетки, специфично отвечающие на антигены вируса SARS-CoV-2.

Что касается возрастных различий, было высказано предположение, что дети могут получать защиту от разнообразного репертуара Т-лимфоцитов, причем взрослые в более старшем возрасте подвержены риску из-за иммунного старения. Снижение числа Т-клеток с возрастом также объясняет, почему пожилые люди гораздо тяжелее переносят Covid-19 (после 30 лет тимус уменьшает производство Т-клеток в организме человека). Было показано, что истощение и сниженное функциональное разнообразие Т-клеток в периферической крови могут предсказывать серьезное ухудшение состояния пациентов с COVID-19 (18). В подобных публикациях (19,20) подчеркивается, что необходим дальнейший анализ защитного иммунитета к данной инфекции для понимания патогенеза COVID-19, особенно в тяжелых случаях. Это также имеет значение при разработке эффективной вакцины для защиты и лечения инфекции COVID-19.

Показаниями с целью проведения исследования определения Т-клеточного иммунитета являются:

- люди с признаками коронавирусной инфекции и симптомами (без антител);
- контактировавшие с больными COVID-19 (на работе или дома);
- перенесшие COVID-19, в крови которых антитела (IgG) не определяются;
- с антителами (для комплексной оценки иммунитета к COVID-19);
- без антител (без признаков коронавирусной инфекции для оценки защищенности от COVID-19);
- после проведения вакцинации.

Изучение Т-клеточного ответа к инфекциям достаточно трудоемкий процесс и чаще выполняется в специализированных научно-исследовательских лабораториях. Тем не менее, за короткий промежуток времени (всего один год с начала пандемии) разработаны и внедрены в практику для определения Т-клеточного иммунитета такие лабораторные платформы как T-SPOT Discovery SARS-CoV-2 и T-Detect COVID. К сожалению, существенным фактором, ограничивающим их широкое использование в клинических лабораториях является высокая стоимость одного исследования, которая составляет ~ 200 US-\$.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. COVID-19 timeline. 2020 [cited 20 Aug 2020]. Available from: <https://www.who.int/news-room/detail/29-06-2020-covidtimeline>.
2. Ranasinghe, S. et al. (2016) Antiviral CD8(+) T cells restricted by human leukocyte antigen class II exist during natural HIV infection and exhibit clonal expansion. *Immunity* 45, 917–930.
3. M. E. Schmidt, S. M. Varga, The CD8 T cell response to respiratory virus infections. *Front. Immunol.* 9, 678 (2018).
4. J. Sun, Z. Zhuang, J. Zheng, K. Li, R. L.-Y. et al. Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination, and treatment. *Cell* 182, 734–743.e5 (2020).
5. I. Thevarajan, T. H. O. Nguyen, M. Koutsakos et al. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: A case report of non-severe COVID-19. *Nat. Med.* 26, 453–455 (2020).
6. A. J. Wilk, A. Rustagi, N. Q. Zhao, et al. J. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat. Med.* 26, 1070–1076 (2020).
7. T. Sekine, A. Perez-Potti, O. Rivera-Ballesteros, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell* 183, 158–168.e14 (2020).
8. D. Weiskopf, K. S. Schmitz, M. P. Raadsen, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci. Immunol.* 5, eabd2071 (2020).
9. Y. Peng, A. J. Mentzer, G. Liu, X. et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat. Immunol.* 21, 1336–1345 (2020).
10. N. Le Bert, A. T. Tan, K. Kunasegaran, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* 584, 457–462 (2020).
11. H. S. Shin, Y. Kim, G. Kim, et al. Immune responses to middle east respiratory syndrome coronavirus during the acute and convalescent phases of human infection. *Clin. Infect. Dis.* 68, 984–992 (2019).
12. F. Tang, Y. Quan, Z.-T. Xin, et al. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: A six-year follow-up study. *J. Immunol.* 186, 7264–7268 (2011).
13. Karlsson et al., *Sci. Immunol.* 5, eabe8063 (2020) 18 November 2020. The known unknowns of T cell immunity to COVID-19.
14. Tang-Huau, T.L. et al. (2018) Human in vivo-generated monocyte-derived dendritic cells and macrophages cross-present antigens through a vacuolar pathway. *Nat. Commun.* 9, 2570.
15. Huang, H. et al. (2019) Select sequencing of clonally expanded CD8(+) T cells reveals limits to clonal expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 8995–9001.
16. Braciale, T.J. et al. (2012) Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 295–305.
17. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2020;396(10249):467–78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31604-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31604-4).
18. Hong-Yi Zheng, Mi Zhang, Cui-Xian Yang, Nian Zhang, Xi-Cheng Wang, Xin-Ping Yang, et al. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood

may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(5):541–3. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0401-3>.

19. Chen Dong, Ling Ni, Fang Ye, Meng-Li Chen, Yu Feng, Yong-Qiang Deng, et al. Characterization of anti-viral immunity in recovered individuals infected by SARS-CoV-2. *medRxiv.* 2020.03.17.20036640. <https://doi.org/10.1101/2020.03.17.20036640>

20. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin J-B, Olsson A, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell.* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017>