

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА SARS-CoV-2-СПЕЦИФИЧНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 ПАЦИЕНТОВ В ПЕРИОД ДО 16 МЕСЯЦЕВ ОТ НАЧАЛА ЗАБОЛЕВАНИЯ

Владимиров И.С., Жданова А.С., Мухин В.Е., Макаров В.В.,
Юдин В.С., Краевой С.А.

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью»
Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Резюме. При респираторных вирусных инфекциях, наряду с механизмами врожденного иммунитета, важную роль в защите организма играет адаптивная иммунная система. Эффективность ее клеточного звена имеет решающее значение для элиминации патогена. Т-клеточный ответ выявляется практически во всех случаях COVID-19 и является одним из ключевых факторов контроля SARS-CoV-2 в организме и устойчивости к инфекции, в том числе и повторной. Однако к настоящему моменту остаются неясными многие аспекты клеточного иммунного ответа к вирусу SARS-CoV-2 спустя год и более после перенесенной инфекции. Цель — изучить динамику лабораторных показателей постинфекционного клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 в течение 16 месяцев от момента появления симптомов.

В исследование было включено 15 здоровых добровольцев и 87 пациентов, перенесших COVID-19. Переболевшие участники были разделены на 3 исследуемые группы в зависимости от времени, прошедшего с момента появления первых симптомов до момента взятия образцов крови для исследования (от 14 до 500 суток). Для всех образцов было выполнено определение количества S- и N-специфичных Т-лимфоцитов и профиль секретируемых цитокинов. Для обнаружения различных функциональных групп клеток был использован алгоритм автоматической кластеризации Phenograph.

Приблизительно 1 из 5×10^3 мононуклеарных клеток периферической крови была специфична к S-белку SARS-CoV-2, и 1 из 10^4 к N-белку. С первых недель инфекции количество специфичных CD8⁺ клеток у переболевших было достоверно выше, чем в группе не болевших участников. С увеличением постинфекционного периода количество специфичных CD4⁺ и CD8⁺ клеток постепенно снижается, но остается достоверно выше, чем в контрольной группе. Среди CD4⁺ клеток уменьшается доля IFN γ IL-2-TNF α ⁺ клеток и увеличивается доля IFN γ ⁺IL-2-TNF α ⁻. CD8⁺ лимфоциты в первые недели после начала заболевания представлены преимущественно IFN γ ⁺IL-2-TNF α ⁻ клетками, а к концу наблюдаемого периода — IFN γ IL-2-TNF α ⁺. По результатам кластеризации было показано, что

Адрес для переписки:

Владимиров Иван Сергеевич
ФГБУ «Центр стратегического планирования
и управления медико-биологическими рисками здоровью»
Федерального медико-биологического агентства
119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 1.
Тел.: 8 (495) 540-61-75 (доб. 4866).
E-mail: ISVladimirov@cspfmba.ru

Address for correspondence:

Ivan S. Vladimirov
Centre for Strategic Planning
and Management of Biomedical Health Risks
10 Pogodinskaya St, Bldg 1
Moscow
119121 Russian Federation
Phone: +7 (495) 540-61-75 (acc. 4866).
ISVladimirov@cspfmba.ru

Образец цитирования:

И.С. Владимиров, А.С. Жданова, В.Е. Мухин,
В.В. Макаров, В.С. Юдин, С.А. Краевой
«Идентификация и функциональная характеристика
SARS-CoV-2-специфичных Т-лимфоцитов у перенесших
COVID-19 пациентов в период до 16 месяцев от начала
заболевания» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26,
№ 3. С. 555-568. doi: 10.15789/1563-0625-IAF-2921

© Владимиров И.С. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.S. Vladimirov, A.S. Zhdanova, V.E. Mukhin, V.V. Makarov,
V.S. Yudin, S.A. Kraevoy "Identification and functional
characteristic of SARS-CoV-2-specific T lymphocytes in
COVID-19 patients up to 16 months after disease onset",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 3, pp. 555-568.
doi: 10.15789/1563-0625-IAF-2921

© Vladimirov I.S. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-IAF-2921

на ранних постинфекционных сроках вирус-специфичные Т-лимфоциты представлены популяциями $IFN\gamma$ - и $TNF\alpha$ -продуцирующих $CD4^+$ эффекторных клеток памяти, тогда как на поздних сроках значительную долю составляют $TNF\alpha$ -продуцирующие $CD8^+$ TEMRA и $IFN\gamma$ -продуцирующие $CD8^+$ Т-лимфоциты центральной памяти.

Т-клеточное звено адаптивного иммунитета играет важную роль в контроле и элиминации вирусных инфекций. В данной работе были продемонстрированы результаты, показывающие, что устойчивый клеточный иммунитет против SARS-CoV-2 присутствует у подавляющего большинства переболевших, начиная с первых недель и вплоть до 16 месяцев с момента появления первых симптомов COVID-19. Иммунная память к SARS-CoV-2 обеспечивается формированием Т-клеток центральной и эффекторной памяти, а полученные данные об их динамике за исследуемый период позволяют надеяться и на более продолжительную клеточную иммунную память к вирусу SARS-CoV-2.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, клеточный иммунитет, Т-лимфоциты, проточная цитометрия, кластеризация данных

IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF SARS-CoV-2-SPECIFIC T LYMPHOCYTES IN COVID-19 PATIENTS UP TO 16 MONTHS AFTER DISEASE ONSET

Vladimirov I.S., Zhdanova A.S., Mukhin V.E., Makarov V.V., Yudin V.S., Kraevoy S.A.

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russian Federation

Abstract. In cases of respiratory viral infection, along with innate immunity mechanisms, the adaptive immune system plays a crucial role in the body's defence. The efficiency of its cellular component is crucial for pathogen elimination. T cell response is detected in almost all cases of COVID-19, being among the key factors of the virus control and resistance to infection, including re-infection. So far, however, many aspects of cellular immune response to SARS-CoV-2 over one year or later after infection remain unclear. The aim of this study was to investigate the dynamics of laboratory parameters of post-infection cellular immunity to SARS-CoV-2 within 16 months from the symptoms' onset.

Fifteen healthy volunteers and 87 COVID-19 patients were included into the study. The patients were divided into 3 groups depending on the time elapsed from the onset of the first symptoms to the time when blood samples were collected (from 14 to 500 days). For all samples, the number of S- and N-specific T lymphocytes and the cytokines secreting profiles were determined. Also, the Phenograph automatic clustering algorithm was used to discern different functional groups of the cells.

Approximately 1 in 5×10^3 peripheral blood mononuclear cells was specific for SARS-CoV-2 S-protein, and 1 in 10^4 was specific for N-protein. Since the first weeks of infection, the number of specific $CD8^+$ cells was significantly higher in COVID-19 patients, as compared with the group of healthy volunteers. As the post-infection period increased, the number of virus-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ cells gradually decreased, but remained significantly higher than in control group. Among $CD4^+$ cell population, the proportion of $IFN\gamma$ -IL-2- $TNF\alpha^+$ cells decreased and the ratio of $IFN\gamma^+$ IL-2- $TNF\alpha^-$ cells increases. During first weeks of the disease, $CD8^+$ lymphocytes are represented predominantly by $IFN\gamma^+$ IL-2- $TNF\alpha^-$ cells and $IFN\gamma$ -IL-2- $TNF\alpha^+$ cells by the end of the observation period. The clustering results showed that, in the early post-infection period, virus-specific T lymphocytes were mostly presented by populations of $IFN\gamma^-$ and $TNF\alpha^-$ -producing $CD4^+$ effector memory cells. Meanwhile, in later time period, the most common populations were $TNF\alpha^-$ -producing $CD8^+$ TEMRA and $IFN\gamma^-$ -producing $CD8^+$ central memory T lymphocytes.

T cell adaptive immunity plays an important role in the control and elimination of viral infections. In this study, we demonstrated that robust cellular immunity against SARS-CoV-2 is present in the vast majority of patients from the first weeks up to 16 months after the onset of the first symptoms of COVID-19. The immune memory to SARS-CoV-2 is provided by production of central and effector memory T cells, and the data on their time dynamics during the study period allow us to hope for a longer duration of cellular immune memory to SARS-CoV-2.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, cellular immunity, T lymphocytes, flow cytometry, data clustering

Введение

В последние годы научным сообществом было получено значительное количество информации о вирусе SARS-CoV-2, опубликовано множество результатов исследований его структурных и функциональных характеристик, а также эпидемиологических и клинических особенностей вызываемого им COVID-19 [1, 4, 14, 17, 31]. Наряду с механизмами врожденного иммунитета, важную роль в защите организма от SARS-CoV-2 играет адаптивная иммунная система. Она распознает вирусные антигены, в том числе при повторной инфекции, осуществляет их блокирование и предотвращает развитие заболевания. Адаптивный иммунитет состоит из двух основных компонентов: В-лимфоцитов, обеспечивающих выработку антител (в том числе нейтрализующих), и Т-лимфоцитов, непосредственно уничтожающих инфицированные вирусом клетки и выполняющих вспомогательные функции. Нейтрализующие антитела служат ключевым фактором сдерживания вируса в организме [2, 19], однако они могут демонстрировать сниженную нейтрализующую активность против вновь возникающих генетических вариантов SARS-CoV-2 [24, 33]. В то же время Т-клеточный ответ выявляется практически во всех случаях заражения SARS-CoV-2 [5, 15, 23, 25, 29] и коррелирует с величиной вирусной нагрузки [3]. Он, как правило, направлен против различных антигенов – как структурных, так и неструктурных белков [20] и, таким образом, является одним из ключевых факторов для контроля возбудителя COVID-19 и устойчивости организма к инфекции, в том числе и повторной.

Т-лимфоциты человека можно разделить на две основные субпопуляции, которые экспрессируют на своей поверхности молекулы CD4 или CD8. CD8⁺Т-лимфоциты при COVID-19 в дыхательных путях препятствуют вирусной репликации, непосредственно уничтожая инфицированные клетки, а также выделяют противовирусные цитокины, такие как IFN γ и TNF α . В других тканях организма CD8⁺Т-клетки также участвуют в клиренсе вирусных частиц благодаря своей способности уничтожать инфицированные клетки. При инфицировании SARS-CoV-2 высокий уровень вирус-специфичных CD8⁺Т-клеток ассоциирован с благоприятными исходами заболевания, а CD8⁺Т-клеточный ответ быстро развивается во время острого COVID-19 [25, 33]. Например, сообщается о вирус-специфичных клетках уже через 1 день после появления симптомов [28]. В остром периоде заболевания специфичные к SARS-CoV-2 CD8⁺Т-клетки демонстрируют высокий уровень экспрессии IFN γ , гранзима В, перфорина и CD107a, связанных с цитотоксическими эффекторными функциями [28, 29].

CD4⁺ клетки осуществляют множество ключевых функций для координации и регуляции противовирусного иммунитета. Они обладают способностью дифференцироваться в целый ряд хелперных и эффекторных подтипов, помогают в CD8⁺Т-клеточном ответе, рекрутируют другие эффекторные клетки в очаг инфекции, оказывают прямую противовирусную активность, способствуют восстановлению тканей [12, 22]. Кроме того, посредством секреции растворимых медиаторов и рецепторной ко-стимуляции фолликулярные Т-хелперные клетки способствуют выработке высокоаффинных антител и дифференцировке В-клеток герминативного центра в клетки памяти и долгоживущие плазматические клетки [14]. Отмечено, что CD4⁺Т-клеточный ответ на SARS-CoV-2 более выражен, чем ответ CD8⁺Т-клеток и в большей степени связан с контролем первичной инфекции [15, 25, 29]. Вирус-специфичные CD4⁺Т-клетки могут быть обнаружены уже через 2-4 дня после появления симптомов, а их быстрая индукция при остром COVID-19 обычно ассоциируется с легкой формой заболевания и быстрым клиренсом организма от вируса [32]. Примечательно, что в некоторых исследованиях уровень антиген-специфичных CD4⁺Т-клеток сильнее коррелировал с низкой тяжестью COVID-19 по сравнению с уровнем антител или CD8⁺Т-клеток [25]. Напротив, длительное отсутствие специфичных CD4⁺Т-клеток (в некоторых случаях более 22 дней от появления симптомов) было ассоциировано с тяжелой или летальной формой COVID-19 [25, 32]. По литературным данным, доминирующими цитокинами, продуцируемыми SARS-CoV-2-специфичными CD4⁺Т-клетками, являются IFN γ , TNF α , IL-2 [15, 21, 23, 29].

Целью данного исследования было изучить динамику лабораторных показателей постинфекционного клеточного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 в период до 16 месяцев с момента появления симптомов.

Материалы и методы

Этические требования

Данное исследование было проведено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта» от 1964 г. с последующими изменениями и дополнениями. Протокол исследования был одобрен Этическим Комитетом ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. В исследование были включены индивидуумы старше 18 лет, не прошедшие вакцинацию, с подтвержденным методом ПЦР COVID-19 в анамнезе и не пере-

несшие повторной инфекции SARS-CoV-2. Критериями исключения являлись: наличие любого онкологического заболевания в течение 1 года до включения в исследование, наличие в анамнезе системных аутоиммунных заболеваний, первичных иммунодефицитов, ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С, сифилиса, беременности и периода кормления грудью. Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в данном исследовании. Забор образцов крови производили в период с 20 марта по 30 августа 2021 года.

Получение мононуклеарных клеток периферической крови

Образцы периферической крови человека были получены посредством процедуры венопункции с использованием коммерческих систем BD Vacutainer (Becton Dickinson, США) с K₂EDTA в качестве антикоагулянта. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) производили методом центрифугирования в градиенте плотности с помощью раствора Фиколла плотностью 1077 г/л (НПП «ПанЭко», Россия) при 450 g 20 минут. Полученные МКПК дважды отмывали в 10 мл фосфатно-солевого буфера (Phosphate-buffered saline, PBS) и криоконсервировали в клеточной среде RPMI-1640 (НПП «ПанЭко», Россия) с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки (Capricorn Scientific, Германия) и 10% диметилсульфоксида (Sigma-Aldrich, США). Образцы хранили в парах жидкого азота при температуре -178 °С. Для проведения исследования клетки размораживали на водяной бане при 37 °С и отмывали от криоконсерванта в 10 мл RPMI-1640.

Анализ концентрации интерферон-γ-продуцирующих антиген-специфичных клеток методом Elispot

Определение концентрации антиген-специфических клеток осуществляли с помощью наборов пептидов SARS-CoV-2: PepTivator SARS-CoV-2 Prot_S1, PepTivator SARS-CoV-2 Prot_S+, PepTivator SARS-CoV-2 Prot_S, PepTivator SARS-CoV-2 Prot_N (все – Miltenyi Biotec, Германия) и набора реагентов ELSP Elispot Interferon-γ (AID, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. В качестве положительного контроля использовали лектин *Phytolacca americana* (GenID GmbH).

Исследуемые образцы МКПК помещали в количестве 2×10^5 клеток в 100 мкл клеточной среды AIM-V (Gibco, США) на одну лунку планшета Elispot Interferon-γ. Затем в лунки добавляли пулированные S- или N-пептиды (15-мерные последовательности с перекрытием в 11 аминокислот, покрывающие всю аминокислотную последовательность S- и N-белков) для активации

клеток с конечной концентрацией 0,6 нМ/мл. Клетки инкубировали в течение 18-24 ч при 37 °С и 5% CO₂. По окончании инкубации планшеты отмывали от клеток и вносили в лунки раствор конъюгата. После 2-часовой инкубации планшет промывали и вносили субстрат. После 20 минут инкубации планшет промывали и оставляли при 37 °С до полного высыхания мембраны. Подсчет пятен производили на микропланшетном анализаторе iSpot (AID, Германия). Результаты фиксировали как количество пятнообразующих единиц (ПОЕ) на 10^5 исследуемых МКПК.

Анализ концентрации цитокинпродуцирующих антиген-специфичных клеток методом проточной цитометрии

Стимуляция пептидными пулами SARS-CoV-2

Исследуемые образцы МКПК помещали в количестве 5×10^5 клеток в 100 мкл клеточной среды AIM-V (Gibco, США) на одну лунку 96-луночного круглодонного планшета. Затем в лунки добавляли S- или N-пептидные пулы для активации Т-клеток с конечной концентрацией каждого 0,6 нМ/мл. Клетки инкубировали в течение 18 ч при 37 °С и 5% CO₂. Через 2 часа от начала инкубации внутриклеточный транспорт блокировали путем добавления BD GolgiPlug™ Protein Transport Inhibitor (BD BioSciences, США). По окончании инкубации образцы переносили в цитометрические пробирки, добавляли 1 мл PBS и центрифугировали 300 g 5 мин. Затем производили фиксацию, пермеабелизацию и окраску флуоресцентно мечеными моноклональными антителами.

Окрашивание поверхностных и внутриклеточных маркеров

Для окраски поверхностных антигенов использовался коктейль моноклональных антител (табл. 1).

Клетки инкубировали в 100 мкл коктейля моноклональных антител в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте, а затем фиксировали 10 минут путем добавления 100 мкл реагента IntraPrep A (Beckman Coulter, США). После отмывки от поверхностных антител в 2 мл PBS, добавляли коктейль растворенных в 100 мкл реагента IntraPrep B моноклональных антител для цитоплазматического окрашивания (табл. 2). После 20-минутной инкубации клетки отмывали в 1 мл PBS и собирали данные на проточном цитометре.

Анализ данных

Данные всех образцов были записаны с использованием проточного цитометра Cytotflex LX (Beckman Coulter, США), оснащенный 375 нм, 405 нм, 488 нм, 561 нм, 638 нм лазерами. Ежедневный контроль качества выполнялся по рекомендациям производителя с помощью ПО

ТАБЛИЦА 1. СОСТАВ КОКТЕЙЛЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ПОВЕРХНОСТНОГО ОКРАШИВАНИЯ

TABLE 1. COMPOSITION OF MONOCLONAL ANTIBODY COCKTAIL FOR SURFACE CELL STAINING

Поверхностный маркер Surface marker	Клон Clone	Флуорохром Fluorochrome	Производитель Manufacturer
CD3	UCHT1	ECD	Beckman Coulter
CD4	13B8.2	APC	Beckman Coulter
CD8	B9.11	PC5.5	Beckman Coulter
CD45RA	2H4	PC7	Beckman Coulter
CD197	G043H7	PE	Beckman Coulter
Оценка жизнеспособности Viability Dye	–	Zombie Aqua™	Biolegend

ТАБЛИЦА 2. СОСТАВ КОКТЕЙЛЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ОКРАШИВАНИЯ

TABLE 2. COMPOSITION OF MONOCLONAL ANTIBODY COCKTAIL FOR CYTOPLASMIC STAINING

Цитоплазматический маркер Cytoplasmic marker	Клон Clone	Флуорохром Fluorochrome	Производитель Manufacturer
IL-2	IL2.39.1	FITC	Beckman Coulter
TNF α	IPM2	AF700	Beckman Coulter
IFN γ	45.15	PB	Beckman Coulter

CytExpert 2.4 и калибровочных частиц CytoFLEX Daily QC Fluorospheres. Настройки усиления фотодетекторов и создание матрицы компенсаций спектральных перекрытий осуществлялись с помощью единично-окрашенных клеточных образцов.

Для анализа записывалось не менее $1,2 \times 10^5$ событий в регионе жизнеспособных CD3⁺ клеток. Полученные данные анализировались в программном обеспечении CytExpert 2.4, Kaluza Analysis 2.1 (Beckman Coulter) и FlowJo 10.5.3 (TreeStar). Схема гейтирования представлена на рисунке 1.

Определение клеточных популяций с помощью алгоритма автоматической кластеризации Phenograph

Алгоритм автоматической кластеризации Phenograph был использован в виде пакета расширения функционала (плагина) ПО FlowJo 10.5.3. Данный пакет находится в свободном доступе на сайте разработчика ПО: <https://www.flowjo.com/exchange>.

Статистическая обработка

Для статистических расчетов и построения диаграмм использовался программный пакет GraphPad Prism 8.0.1 (Dotmatics). Для оценки значимости различий между группами использовался критерий Краскела–Уоллиса. Статистически значимым считалось р-значение менее 0,05.

Результаты

Клиническая характеристика исследуемых групп

В исследование было включено 15 здоровых добровольцев (Группа сравнения) без COVID-19 в анамнезе и 87 пациентов перенесших COVID-19. Переболевшие участники были разделены на 3 исследуемые группы в зависимости от времени, прошедшего с момента появления первых симптомов до момента взятия образцов крови для исследования (дни после инфекции, ДПИ): Группа 1 (от 14 до 70 дней), Группа 2 (от 121 до 285 дней), Группа 3 (от 315 до 500 дней). Подробная характеристика групп представлена в таблице 3.

Динамика изменения концентрации антиген-специфических клеток

Методом EliSpot была проведена оценка изменения концентрации антиген-специфических IFN γ -продуцирующих клеток к S- и N-белку в периферической крови. Результаты представлены на рисунке 2. Можно отметить, что концентрация S-специфических клеток была максимальной в группе 1, после чего в группах 2 и 3 наблюдалось ее снижение (рис. 2А). Интересно, что для N-специфических клеток была обнаружена противоположная динамика (рис. 2В). Тем не менее даже спустя 16 месяцев от момента появления первых симптомов уровень

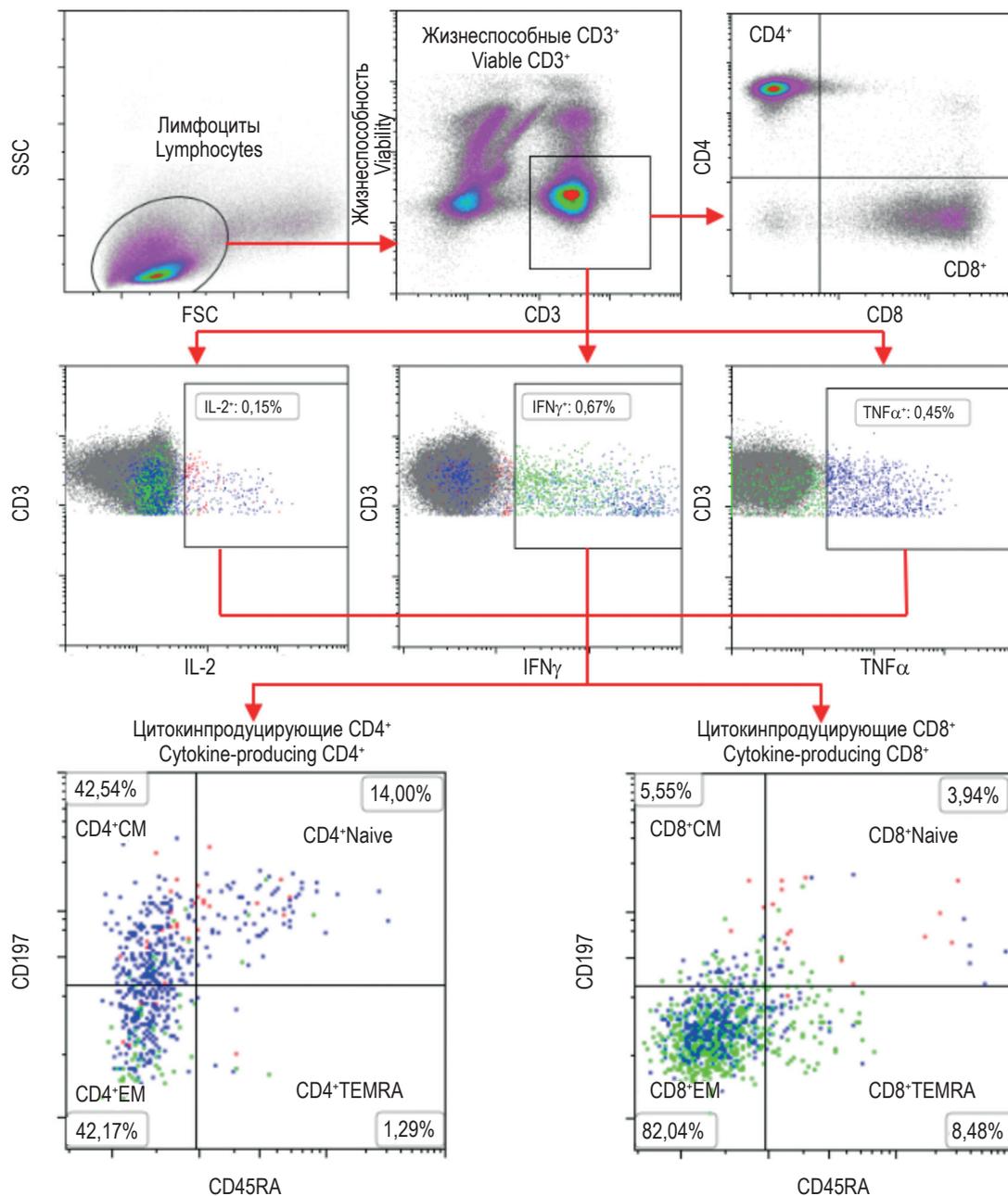


Рисунок 1. Стратегия гейтирования для определения субпопуляций Т-лимфоцитов

Примечание. По параметрам прямого и бокового светорассеяния отбирался лимфоцитарный пул (регион «Лимфоциты»). Далее из региона лимфоцитов выделялись жизнеспособные клетки, несущие на поверхности маркер CD3 («Жизнеспособные CD3⁺») и разделялись на CD4⁺ и CD8⁺ клетки. Также среди жизнеспособных CD3⁺ лимфоцитов определялись клетки, секретирующие цитокины – IL-2, IFN γ или TNF α . Объединенные вместе с помощью логического оператора, они составляют популяцию «Цитокин-продуцирующие». Затем все цитокинпродуцирующие клетки разделялись по присутствию маркеров CD4 или CD8, а также на 4 субпопуляции по экспрессии маркеров памяти CD45RA и CD197 (наивные клетки – Naïve (N), центральные клетки памяти – Central Memory (CM), эффекторные клетки памяти – Effector Memory (EM), терминальные эффекторные клетки памяти 45RA⁺ – Terminal Effector Memory RA (TEMRA)).

Figure 1. A gating strategy to determine T lymphocyte subpopulations

Note. The lymphocyte region (Lymphocytes) was selected accordingly to the parameters of forward and side light scattering. Then, viable CD3 cells ("Viable CD3⁺") were selected from the lymphocyte region as viability-dye negative events and divided into CD4⁺ and CD8⁺ cells. Also, among the viable CD3⁺ lymphocytes, cells secreting cytokines such as IL-2, IFN γ or TNF α were identified. Combined them together using a logical operator, they were named the "Cytokine-producing" population. All cytokine-producing cells were then divided into those carrying CD4 or CD8 marker and into 4 subpopulations based on the expression of CD45RA and CD197 memory markers (naïve cells – Naïve (N), Central Memory cells (CM), Effector Memory cells (EM), and Terminal Effector Memory RA cells (TEMRA)).

ТАБЛИЦА 3. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП

TABLE 3. CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE GROUPS

Параметр Parameter	Группа сравнения Reference group (n = 15)	Группа 1 Group 1 (n = 20)	Группа 2 Group 2 (n = 32)	Группа 3 Group 3 (n = 35)
Возраст, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) Age, MeMe ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	53,0 (43,0-57,0)	53,5 (41,3-65,0)	55,5 (42,8-60,8)	38,0 (30,0-48,0)
Пол, М/Ж, (%) Genger, M/F, (%)	8/7 (53/47%)	7/13 (35/65%)	12/20 (38/62%)	14/21 (40/60%)
ДПИ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) DPO, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	—	20 (17-23)	208 (171-235)	403 (381-430)

Примечание. Ме – медиана, $Q_{0,25}$ – первый квартиль, $Q_{0,75}$ – третий квартиль, ДПИ – дни после инфекции.

Note. Me is the median, $Q_{0,25}$ is the first quartile, $Q_{0,75}$ is the third quartile, DPO is the days post onset.

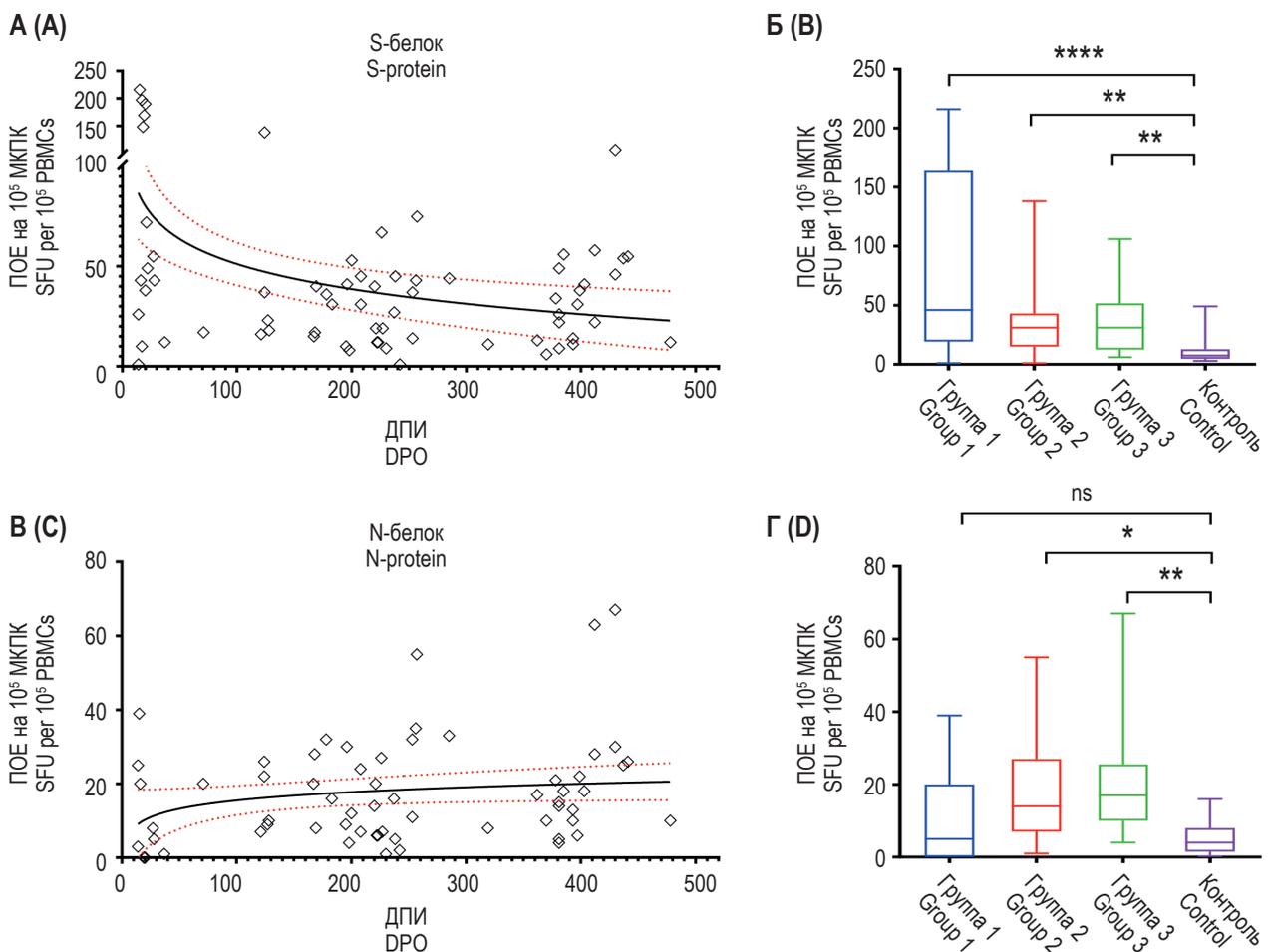


Рисунок 2. Концентрация антиген-специфических IFN γ -продуцирующих клеток к S- и N-белкам

Примечание. Отображены все наблюдения и построена регрессионная модель зависимости количества пятно-образующих единиц (ПОЕ) на 10^5 МКПК от количества дней после начала инфекции (ДПИ), пунктирной линией обозначен 95%-ный доверительный интервал (А, В). Продемонстрированы межгрупповые различия для S-белка (Б) и N-белка (Г), достоверность различий оценивалась с помощью критерия Краскела–Уоллиса. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$; ns – отсутствие значимых различий.

Figure 2. Concentration of antigen-specific IFN γ -producing cells against S- and N-proteins

Note. All observations are plotted, and a regression model of the relationship between the number of spot-forming units (SFU) per 10^5 PBMCs and the DPO is created. The dotted lines indicate the 95% confidence interval (A, C). Intergroup differences for S-protein (B) and N-protein (D) are also demonstrated; the significance of differences was assessed using the Kruskal–Wallis test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; ns, not significant.

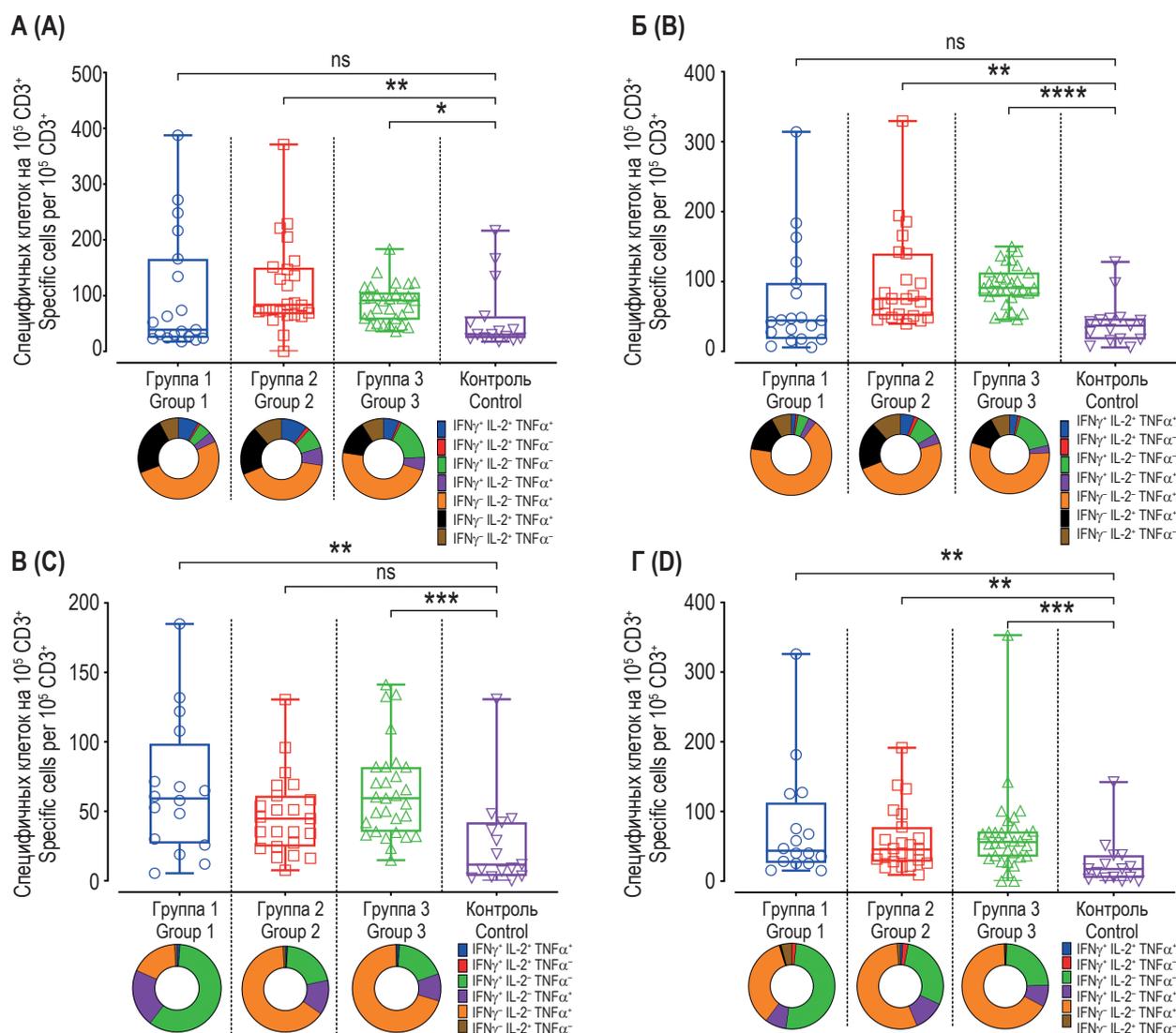


Рисунок 3. Сравнение исследуемых групп по уровню антиген-специфичных цитокинсекретирующих CD4⁺ и CD8⁺T-лимфоцитов и профилю секретируемых ими цитокинов

Примечание. Доля S- (А) и N-специфичных (Б) CD4⁺ клеток в группах 2 и 3 достоверно выше, чем в группе сравнения. Доля специфичных CD8⁺ клеток во всех исследуемых группах для S- и N-пептидов достоверно выше, чем в группе сравнения (В, Г). Также, доля N-специфичных CD4⁺ клеток в 1 группе достоверно выше, чем в 3 группе (Б). Секреторный профиль для каждой группы представлен на круговых диаграммах. Других достоверных изменений уровня антиген-специфичных CD4⁺ и CD8⁺ между группами выявлено не было (не отмечено дополнительно). Для межгрупповых сравнений использовался критерий Краскела–Уоллиса. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$.

Figure 3. Comparison between the groups by the levels of antigen-specific cytokine-secreting CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes and the profile of cytokines secreted by them

Note. The proportion of S- (A) and N-specific (B) CD4⁺ cells in groups 2 and 3 was significantly higher than in the reference group. The proportion of specific CD8⁺ cells in all studied groups for S and N peptides is significantly higher than in the reference group (C, D). Also, the proportion of N-specific CD4⁺ cells in group 1 is significantly higher than in group 3 (B). The secretory profile for each group is shown in the pie charts. There were no other significant changes observed in the levels of antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ between the groups (not shown). The significance of differences was assessed using the Kruskal–Wallis test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; ns, not significant.

SARS-CoV2 S-специфичных клеток был достоверно выше, чем в группе сравнения (рис. 2Б). Уровень N-специфичных клеток, напротив, был минимальным в группе 1 и не отличался от группы сравнения, тогда как в группах 2 и 3 был достоверно выше (рис. 2Г).

Определение концентрации антиген-специфичных клеток памяти к SARS-CoV-2 и секретируемых цитокинов методом проточной цитометрии

Используя метод проточной цитометрии, мы смогли более детально изучить популяционный состав SARS-CoV-2-специфичных

T-лимфоцитов, а также профиль секретируемых ими цитокинов. На рисунке 3 представлены диаграммы изменения концентрации цитокинпродуцирующих ($IFN\gamma$, IL-2 и $TNF\alpha$) S- и N-специфичных T-лимфоцитов, а также отражены изменения спектра вырабатываемых ими цитокинов между исследуемыми группами. Комбинации секретируемых цитокинов представлены на круговых диаграммах для каждой группы.

Концентрация S- и N-специфичных $CD4^+$ лимфоцитов у пациентов из первой группы не отличается от группы сравнения. С увеличением постинфекционного периода (во 2-й и 3-й группах) концентрация антиген-специфичных $CD4^+$ клеток достоверно повышается в сравнении с группой сравнения. Состав клеток по цитокиновому профилю также изменяется. С увеличением времени, прошедшего от момента появления симптомов инфекции, уменьшается доля $IFN\gamma^+IL-2-TNF\alpha^+$ клеток и увеличивается доля $IFN\gamma^+IL-2-TNF\alpha^-$ (рис. 3А, Б).

Концентрация S- и N-специфичных $CD8^+$ лимфоцитов достоверно повышается по сравнению со здоровыми добровольцами уже в первые недели после манифестации заболевания и сохраняется выше, чем в группе сравнения на всем протяжении периода наблюдения. Состав $CD8^+$ клеток по цитокиновому профилю претерпевает более выраженные изменения: цитотоксические лимфоциты в первые недели после начала заболевания представлены преимущественно $IFN\gamma^+IL-2-TNF\alpha^-$ клетками, в то время как к концу наблюдения $IFN\gamma^+IL-2-TNF\alpha^+$ (рис. 3В, Г).

Оценка фенотипа цитокинпродуцирующих T-лимфоцитов с помощью алгоритма кластеризации Phenograph

С помощью алгоритма кластеризации Phenograph были проанализированы изменения фенотипа цитокинпродуцирующих T-лимфоцитов с увеличением времени от момента появления первых симптомов (рис. 4А, Б). Каждый кластер был охарактеризован по экспрессии маркеров клеток памяти ($CD45RA$ и

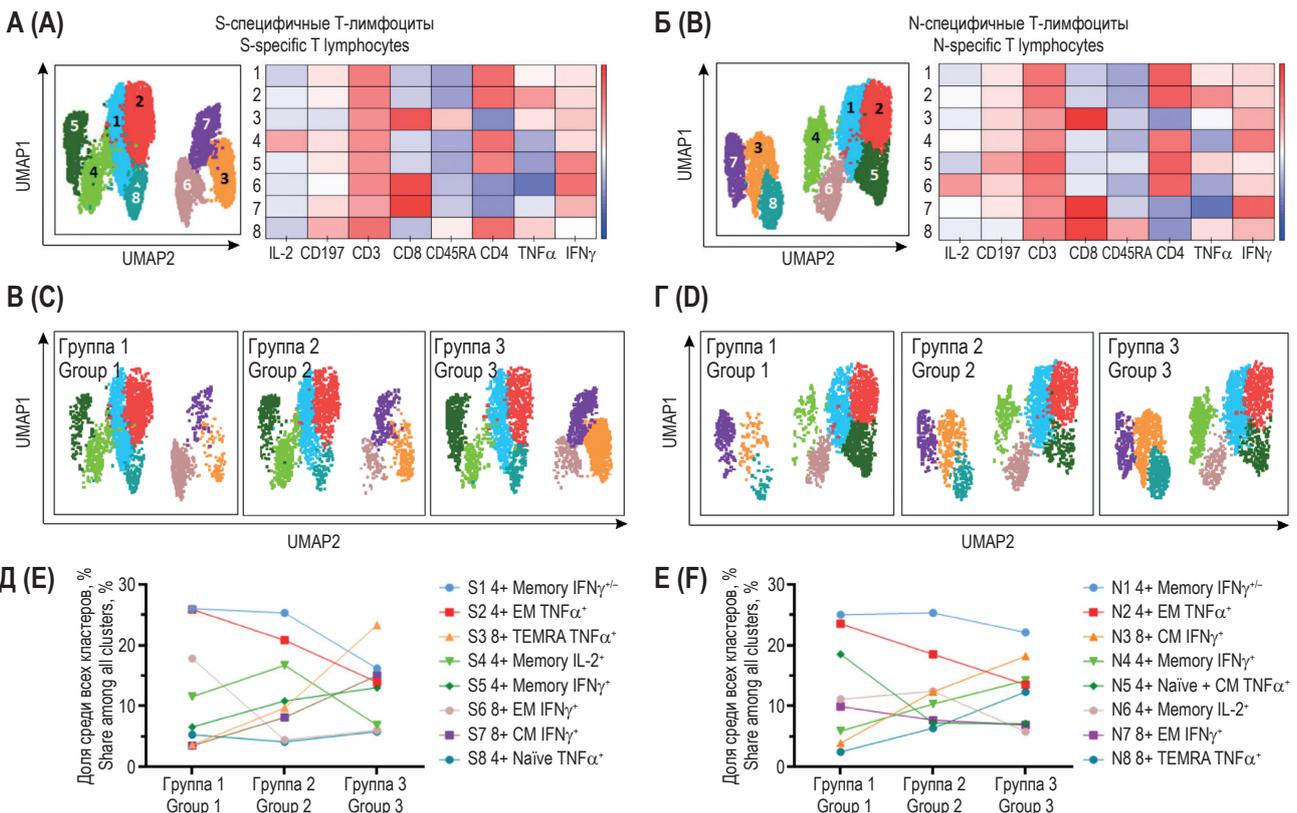


Рисунок 4. Результаты применения алгоритма кластеризации Phenograph

Представлены UMAP-диаграммы, отображающие состав кластеров и тепловые карты, характеризующие степень экспрессии поверхностных маркеров и цитокинов в T-лимфоцитах для белков S (А) и N (Б). Также представлены изменения соотношения кластеров между исследуемыми группами в виде графиков UMAP (В, Г) и линейных графиков (Д, Е) для S- и N-белков соответственно.

Figure 4. Results of application of the Phenograph clustering algorithm

Note. UMAP diagrams show the composition of clusters and heat maps characterize the expression of surface markers and cytokines in T lymphocytes for S (A) and N (B) proteins. Changes in the cluster ratio between the studied groups are also presented as UMAP plots (C, D) and line charts (E, F) for S- and N-proteins, respectively.

CD197) и преимущественно продуцируемому цитокину (IL-2, IFN γ или TNF α). Изменения в соотношении кластеров между группами изображены на рисунке 4B-E. Можно отметить, что на ранних постинфекционных сроках Т-лимфоциты представлены преимущественно IFN γ - и TNF α -продуцирующими CD4⁺ эффекторными клетками памяти для S- (рис. 4D) и N-белков (рис. 4E), тогда как на поздних сроках значительную долю составляют TNF α -продуцирующие CD8⁺ терминальные RA (TEMRA) и IFN γ -продуцирующие CD8⁺ лимфоциты центральной памяти.

Обсуждение

Количественный и качественный состав клеток иммунной памяти к SARS-CoV-2 имеет решающее значение для предотвращения повторного заражения. Клеточное звено иммунной системы оказывает прямое защитное действие против тяжелой формы коронавирусной инфекции [8], а также необходимо для нормальной выработки антител. Мы провели оценку специфического для SARS-CoV-2 Т-клеточного иммунного ответа в течение 16 месяцев от момента появления симптомов. По результатам ELISPOT, приблизительно 1 из 5000 клеток среди МКПК была специфична к S-белку SARS-CoV-2 и 1 из 10000 к N-белку, что сопоставимо с имеющимися литературными данными [7, 13]. Что касается субпопуляций Т-лимфоцитов, мы показали, что SARS-CoV-2-специфичные CD4⁺Т-клетки преимущественно имеют фенотипы центральной памяти CCR7⁺CD45RA⁻ или эффекторной памяти CCR7⁻CD45RA⁻, а специфичные для SARS-CoV-2 CD8⁺Т-клетки преимущественно относятся к лимфоцитам эффекторной памяти. Это также согласуется с уже опубликованными данными [13].

Известно, что после быстрой экспансии CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток во время острой фазы, их концентрация снижается с периодом полужизни около 200 дней [11]. Согласно нашим результатам ELISPOT, концентрация IFN-продуцирующих S-специфичных клеток снижается с увеличением постинфекционного периода, тогда как уровень N-специфичных клеток, наоборот, повышается. Было высказано предположение, что уровень SARS-CoV-2-специфических Т-клеток со временем выходит на плато, что, вероятно, связано с увеличением доли стволовых Т-клеток памяти [18].

В последние годы с развитием методов машинного обучения для анализа данных проточной цитометрии широко применяются алгоритмы автоматической идентификации клеточных популяций [10]. Они, в том числе, включают в себя инструменты для уменьшения размерности

(например, t-SNE, UMAP) и кластеризации данных (например, FlowSOM, SPADE, Phenograph и др.) [26]. В нашей работе для обнаружения различных субпопуляций Т-лимфоцитов мы использовали алгоритм автоматической кластеризации Phenograph. Его преимуществом перед другими алгоритмами является автоматическое определение итогового количества кластеров. Phenograph строит граф для ближайших «соседей» из исходных многомерных данных, а затем использует алгоритм Лувена для разбиения его на сообщества (популяции). Данные инструменты позволяют отображать многомерные данные в удобной форме и упрощают их анализ, что становится особенно актуальным при использовании современных проточных цитометров с большим количеством каналов детекции.

При использовании алгоритма Phenograph на наших данных мы получили по 8 кластеров для S- и N-специфичных цитокинпродуцирующих Т-лимфоцитов, различающихся степенью экспрессии поверхностных маркеров и типом секретируемых цитокинов. Одновременно, используя традиционный метод гейтирования, мы интерпретировали каждый кластер по отношению его к различным типам клеток памяти и определили его секреторный профиль. Анализ секретируемых цитокинов показал, что IFN γ и TNF α были основными цитокинами, продуцируемым вирусспецифическими Т-клетками на разных стадиях после инфекции, что указывает на преобладание Th1-пула лимфоцитов, который может способствовать формированию долгосрочной иммунной памяти. Цитокинпродуцирующие клетки были представлены в подавляющем большинстве центральными и эффекторными клетками памяти (CD45RA⁻CD197^{+/+}), что не противоречит ранее опубликованным данным [9, 21, 30]. Для N- и S-пептидов доля CD4⁺ антиген-специфичных клеток центральной памяти повышалась с увеличением времени с момента заражения, в то время как доля клеток эффекторной памяти снижалась. Доля CD8⁺ антиген-специфичных центральных клеток памяти и терминальных эффекторных клеток памяти также увеличивалось, а доля эффекторных CD8⁺ клеток памяти уменьшалась для N- и S-белков. Снижение выработки IL-2 на более поздних сроках от момента появления симптомов позволяет предположить постепенное замещение эффекторных популяций Т-лимфоцитов, наиболее многочисленных на ранних сроках, клетками центральной памяти, осуществляющими контроль за потенциально возможной реинфекцией, что согласуется с ранее опубликованными данными [8, 16, 27].

Заключение

Т-клеточное звено адаптивного иммунитета играет важную роль в контроле и элиминации вирусных инфекций. В данной работе были продемонстрированы результаты, показывающие, что устойчивый клеточный иммунитет против SARS-CoV-2 присутствует у подавляющего большинства переболевших, начиная с первых не-

дель и вплоть до 16 месяцев с момента появления первых симптомов COVID-19. Иммунная память к SARS-CoV-2 обеспечивается формированием Т-клеток центральной и эффекторной памяти, а полученные данные об их динамике за исследуемый период позволяют надеяться и на более продолжительную клеточную иммунную память к вирусу SARS-CoV-2.

Список литературы / References

1. Гудима Г.О., Хаитов Р.М., Кудлай Д.А., Хаитов М.Р. Молекулярно-иммунологические аспекты диагностики, профилактики и лечения коронавирусной инфекции // Иммунология, 2021. Т. 42, № 3. С. 198-210. [Gudima G.O., Khaitov R.M., Kudlay D.A., Khaitov M.R. Molecular immunological aspects of diagnostics, prevention and treatment of coronavirus infection. *Immunologiya = Immunologiya*, 2021, Vol. 42, no. 3, pp. 198-210. (In Russ.)]
2. Закурская В.Я., Сизякина Л.П., Харитонов М.В., Шлык С.В. Динамика специфического гуморального ответа у пациентов, перенесших COVID-19 // Иммунология, 2022. Т. 43, № 1. С. 71-77. [Zakurskaya V.Ya., Sizyakina L.P., Kharitonova M.V., Shlyk S.V. Dynamics of specific humoral response in COVID-19 patients. *Immunologiya = Immunologiya*, 2022, Vol. 43, no. 1, pp. 71-77. (In Russ.)]
3. Никитин Ю.В., Александрова Е.В., Криворучко А.Б., Мешкова М.Е., Минаева Л.В., Жданов К.В., Артамонов А.А., Козлов К.В., Иванов А.М., Мальцев О.В., Иванов К.С., Ляшенко Ю.И., Масалов Е.Б. Взаимосвязь вирусной нагрузки и показателей клеточного звена иммунной системы у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 167-180. [Nikitin Yu.V., Aleksandrova E.V., Krivoruchko A.B., Meshkova M.E., Minaeva L.V., Zhdanov K.V., Artamonov A.A., Kozlov K.V., Ivanov A.M., Maltsev O.V., Ivanov K.S., Lyashenko Yu.I., Masalov E.B. Interrelations between viral load and cellular immunity in patients with COVID-19 of varying severity. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 167-180. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IBV-2586.
4. Пащенко М.В., Хаитов М.Р. Иммунный ответ против эпидемических коронавирусов // Иммунология, 2020. Т. 41, № 1. С. 5-18. [Pashenkov M.V., Khaitov M.R. Immune response against epidemic coronaviruses. *Immunologiya = Immunologiya*, 2020, Vol. 41, no. 1, pp. 5-18. (In Russ.)]
5. Попов О.С., Сушенцева Н.Н., Полковникова И.А., Апалько С.В., Рудник А.Ю., Анисенкова А.Ю., Колесник С.В., Кудлай Д.А., Мосенко С.В., Щербак С.Г. Влияние специфического Т-клеточного и гуморального иммунного ответа к SARS-CoV-2 на выживаемость пациентов, впервые болеющих COVID-19 // Иммунология, 2023. Т. 44, № 1. С. 53-62. [Popov O.V., Sushentseva N.N., Polkovnikova I.A., Apalko S.V., Rudnik A.Yu., Anisenkova A.Yu., Kolesnik S.V., Kudlay D.A., Mosenko S.V., Shcherbak S.G. Impact of SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immunity on survival in patients with COVID-19 for the first time. *Immunologiya = Immunologiya*, 2023, Vol. 44, no. 1, pp. 53-62. (In Russ.)]
6. Braun J., Loyal L., Frentsch M., Wendisch D., Georg P., Kurth F., Hippenstiel S., Dingeldey M., Kruse B., Fauchere F., Baysal E., Mangold M., Henze L., Lauster R., Mall M.A., Beyer K., Röhmel J., Voigt S., Schmitz J., Miltenyi S., Demuth I., Müller M.A., Hocke A., Witzentrath M., Suttorp N., Kern F., Reimer U., Wenschuh H., Drosten C., Cormann V.M., Giesecke-Thiel C., Sander L.E., Thiel A. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*, 2020, Vol. 587, no. 7833, pp. 270-274.
7. Cassaniti I., Percivalle E., Bergami F., Piralla A., Comolli G., Bruno R., Vecchia M., Sambo M., Colaneri M., Zuccaro V., Benazzo M., Robotti C., Calastri A., Maiorano E., Ferrari A., Cambiè G., Baldanti F. SARS-CoV-2 specific T-cell immunity in COVID-19 convalescent patients and unexposed controls measured by ex vivo ELISpot assay. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2021, Vol. 27, no. 7, pp. 1029-1034.
8. Channappanavar R., Fett C., Zhao J., Meyerholz D.K., Perlman S. Virus-specific memory CD8 T cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J. Virol.*, 2014, Vol. 88, no. 19, pp. 11034-11044.
9. Chen Z., John Wherry E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, no. 9, pp. 529-536.
10. Cheung M., Campbell J.J., Whitby L., Thomas R.J., Braybrook J., Petzing J. Current trends in flow cytometry automated data analysis software. *Cytometry Part A*, 2021, Vol. 99, no. 10, pp. 1007-1021.
11. Cohen K.W., Linderman S.L., Moodie Z., Czartoski J., Lai L., Mantus G., Norwood C., Nyhoff L.E., Edara V.V., Floyd K., de Rosa S.C., Ahmed H., Whaley R., Patel S.N., Prigmore B., Lemos M.P., Davis C.W., Furth S., O'Keefe J.B., Gharpure M.P., Gunisetty S., Stephens K., Antia R., Zarnitsyna V.I., Stephens D.S., Edupuganti S., Roupheal N., Anderson E.J., Mehta A.K., Wrammert J., Suthar M.S., Ahmed R., McElrath M.J. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells. *Cell Rep. Med.*, 2021, Vol. 2, no. 7, 100354. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100354.

12. Crotty S. T follicular helper cell biology: a decade of discovery and diseases. *Immunity*, 2019, Vol. 50, no. 5, pp. 1132-1148.
13. Dan J.M., Mateus J., Kato Y., Hastie K.M., Yu E.D., Faliti C.E., Grifoni A., Ramirez S.I., Haupt S., Frazier A., Nakao C., Rayaprolu V., Rawlings S.A., Peters B., Krammer F., Simon V., Saphire E.O., Smith D.M., Weiskopf D., Sette A., Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*, 2021, Vol. 371, no. 6529, eabf4063. doi: 10.1126/science.abf4063.
14. DiPiazza A.T., Graham B.S., Ruckwardt T.J. T cell immunity to SARS-CoV-2 following natural infection and vaccination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2021, Vol. 538, pp. 211-217.
15. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., Moderbacher C.R., Rawlings S.A., Sutherland A., Premkumar L., Jadi R.S., Marrama D., de Silva A.M., Frazier A., Carlin A.F., Greenbaum J.A., Peters B., Krammer F., Smith D.M., Crotty S., Sette A. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*, 2020, Vol. 181, no. 7, pp. 1489-1501.
16. Hanna S.J., Codd A.S., Gea-Mallorqui E., Scourfield D.O., Richter F.C., Ladell K., Borsa M., Compeer E.B., Moon O.R., Galloway S.A.E., Dimonte S., Capitani L., Shepherd F.R., Wilson J.D., Uhl L.F.K.; Oxford-Cardiff COVID-19 Literature Consortium; Gallimore A.M., Milicic A. T cell phenotypes in COVID-19 – a living review. *Oxford Open Immunol.*, 2021, Vol. 2, no. 1, iqaa007. doi: 10.1093/oxfimm/iqaa007.
17. Jordan S.C. Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: relevance to acquired immunity and vaccine responses. *Clin. Exp. Immunol.*, 2021, Vol. 204, no. 3, pp. 310-320.
18. Jung J.H., Rha M.S., Sa M., Choi H.K., Jeon J.H., Seok H., Park D.W., Park S.H., Jeong H.W., Choi W.S., Shin E.C. SARS-CoV-2-specific T cell memory is sustained in COVID-19 convalescent patients for 10 months with successful development of stem cell-like memory T cells. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 4043. doi: 10.1038/s41467-021-24377-1.
19. Khoury D.S., Wheatley A.K., Ramuta M.D., Reynaldi A., Cromer D., Subbarao K., O'Connor D.H., Kent S.J., Davenport M.P. Measuring immunity to SARS-CoV-2 infection: comparing assays and animal models. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, no. 12, pp. 727-738.
20. Lehmann A.A., Kirchenbaum G.A., Zhang T., Reche P.A., Lehmann P.V. Deconvoluting the T Cell response to SARS-CoV-2: specificity versus chance and cognate cross-reactivity. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 635942. doi: 10.3389/fimmu.2021.635942.
21. Mathew D., Giles J.R., Baxter A.E., Oldridge D.A., Greenplate A.R., Wu J.E., Alanio C., Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., D'Andrea K., Manne S., Chen Z., Huang Y.J., Reilly J.P., Weisman A.R., Ittner C.A.G., Kuthuru O., Dougherty J., Nzingha K., Han N., Kim J., Pattekar A., Goodwin E.C., Anderson E.M., Weirick M.E., Gouma S., Arevalo C.P., Bolton M.J., Chen F., Lacey S.F., Ramage H., Cherry S., Hensley S.E., Apostolidis S.A., Huang A.C., Vella L.A.; UPenn COVID Processing Unit; Betts M.R., Meyer N.J., Wherry E.J. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*, 2020, Vol. 369, no. 6508, eabc8511. doi: 10.1126/science.abc8511.
22. Meckiff B.J., Ramírez-Suástegui C., Fajardo V., Chee S.J., Kusnadi A., Simon H., Eschweiler S., Grifoni A., Pelosi E., Weiskopf D., Sette A., Ay F., Seumois G., Ottensmeier C.H., Vijayanand P. Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4⁺ T Cells in COVID-19. *Cell*, 2020, Vol. 183, no. 5, pp. 1340-1353.
23. Peng Y., Mentzer A.J., Liu G., Yao X., Yin Z., Dong D., Dejnirattisai W., Rostron T., Supasa P., Liu C., López-Camacho C., Slon-Campos J., Zhao Y., Stuart D.I., Paesen G.C., Grimes J.M., Antson A.A., Bayfield O.W., Hawkins D.E.D.P., Ker D.S., Wang B., Turtle L., Subramaniam K., Thomson P., Zhang P., Dold C., Ratcliff J., Simmonds P., de Silva T., Sopp P., Wellington D., Rajapaksa U., Chen Y.L., Salio M., Napolitani G., Paes W., Borrow P., Kessler B.M., Fry J.W., Schwabe N.F., Semple M.G., Baillie J.K., Moore S.C., Openshaw P.J.M., Ansari M.A., Dunachie S., Barnes E., Frater J., Kerr G., Goulder P., Lockett T., Levin R., Zhang Y., Jing R., Ho L.P.; Oxford Immunology Network Covid-19 Response T cell Consortium; ISARIC4C Investigators; Cornall R.J., Conlon C.P., Klenerman P., Sreaton G.R., Mongkolsapaya J., McMichael A., Knight J.C., Ogg G., Dong T. Broad and strong memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat. Immunol.*, 2020, Vol. 21, no. 11, pp. 1336-1345.
24. Planas D., Veyer D., Baidaliuk A., Staropoli I., Guivel-Benhassine F., Rajah M.M., Planchais C., Porrot F., Robillard N., Puech J., Prot M., Gallais F., Gantner P., Velay A., Le Guen J., Kassis-Chikhani N., Edriss D., Belec L., Seve A., Courtellemont L., Péré H., Hocqueloux L., Fafi-Kremer S., Prazuck T., Mouquet H., Bruel T., Simon-Lorière E., Rey F.A., Schwartz O. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*, 2021, Vol. 596, no. 7871, pp. 276-280.
25. Rydyznski Moderbacher C., Ramirez S.I., Dan J.M., Grifoni A., Hastie K.M., Weiskopf D., Belanger S., Abbott R.K., Kim C., Choi J., Kato Y., Crotty E.G., Kim C., Rawlings S.A., Mateus J., Tse L.P.V., Frazier A., Baric R., Peters B., Greenbaum J., Ollmann Saphire E., Smith D.M., Sette A., Crotty S. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*, 2020, Vol. 183, no. 4, pp. 996-1012.
26. Saeyns Y., van Gassen S., Lambrecht B.N. Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 7, pp. 449-462.
27. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, pp. 745-763.

28. Schulien I., Kemming J., Oberhardt V., Wild K., Seidel L.M., Killmer S., Sagar, Daul F., Salvat Lago M., Decker A., Luxenburger H., Binder B., Bettinger D., Sogukpinar O., Rieg S., Panning M., Huzly D., Schwemmler M., Kochs G., Waller C.F., Nieters A., Duerschmied D., Emmerich F., Mei H.E., Schulz A.R., Llewellyn-Lacey S., Price D.A., Boettler T., Bengsch B., Thimme R., Hofmann M., Neumann-Haefelin C. Characterization of pre-existing and induced SARS-CoV-2-specific CD8⁺ T cells. *Nat. Med.*, 2021, Vol. 27, no. 1, pp. 78-85.

29. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullmann D.J., Kammann T., Emgård J., Parrot T., Folkesson E.; Karolinska COVID-19 Study Group; Rooyackers O., Eriksson L.L., Henter J.L., Sönnnerborg A., Allander T., Albert J., Nielsen M., Klingström J., Gredmark-Russ S., Björkström N.K., Sandberg J.K., Price D.A., Ljunggren H.G., Aleman S., Buggert M. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell*, 2020, Vol. 183, no. 1, pp. 158-168.

30. Sibbertsen F., Glau L., Paul K., Mir T.S., Gersting S.W., Tolosa E., Dunay G.A. Phenotypic analysis of the pediatric immune response to SARS-CoV-2 by flow cytometry. *Cytometry Part A*, 2022, Vol. 101, no. 3, pp. 220-227.

31. Swadling L., Maini M.K. T cells in COVID-19-united in diversity. *Nat. Immunol.*, 2020, Vol. 21, no. 11, pp. 1307-1308.

32. Tan A.T., Linster M., Tan C.W., Le Bert N., Chia W.N., Kunasegaran K., Zhuang Y., Tham C.Y.L., Chia A., Smith G.J.D., Young B., Kalimuddin S., Low J.G.H., Lye D., Wang L.F., Bertoletti A. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep.*, 2021, Vol. 34, no. 6, 108728. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108728.

33. Wang M., Zhang L., Li Q., Wang B., Liang Z., Sun Y., Nie J., Wu J., Su X., Qu X., Li Y., Wang Y., Huang W. Reduced sensitivity of the SARS-CoV-2 Lambda variant to monoclonal antibodies and neutralizing antibodies induced by infection and vaccination. *Emerg. Microbes Infect.*, 2022, Vol. 11, no. 1, pp. 18-29.

Авторы:

Владимиров И.С. — аналитик 2-й категории отдела медицинской геномики ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Жданова А.С. — аналитик 2-й категории отдела анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Мухин В.Е. — к.м.н., заместитель начальника отдела анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Authors:

Vladimirov I.S., The 2nd Category Analyst, Medical Genomics Department, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russian Federation

Zhdanova A.S., The 2nd Category Analyst, Department of Analysis and Forecasting of Biomedical Health Risks, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russian Federation

Mukhin V.E., PhD (Medicine), Deputy Head, Department of Analysis and Forecasting of Biomedical Health Risks, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russian Federation

Макаров В.В. — к.б.н., начальник отдела анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Юдин В.С. — к.б.н., начальник отдела медицинской геномики ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Краевой С.А. — д.м.н., первый заместитель генерального директора ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Makarov V.V., PhD (Biology), Head, Department of Analysis and Forecasting of Biomedical Health Risks, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russian Federation

Yudin V.S., PhD (Biology), Head, Department of Medical Genomics, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russian Federation

Kraevoy S.A., PhD, MD (Medicine), 1st Deputy General Director, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russian Federation

Поступила 26.10.2023
Принята к печати 14.11.2023

Received 26.10.2023
Accepted 14.11.2023