

НАРУШЕНИЯ Т-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА ЧЕРЕЗ 6–12 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ ОСТРОЙ ФАЗЫ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ: СКРИНИНГОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

А.В. Зурочка^{1,2}, М.А. Добрынина^{1,2,3}, Э.А. Сафронова^{3,4}, В.А. Зурочка^{1,2}, А.А. Зуйкова²,
Г.П. Сарапульцев⁵, О.И. Забков², А.А. Мосунов^{2,6}, М.Д. Верховская^{2,6}, В.В. Дукардт²,
Л.О. Фомина², Е.Г. Костоломова⁷, Ю.В. Останкова⁸, И.В. Кудрявцев⁹, А.А. Тотолян⁸

¹ ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

² ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора,
г. Екатеринбург, Россия

³ ФГБУ Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр
им. А.И. Бурназяна Федерального научно-биологического агентства Российской Федерации, Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Челябинск, Россия

⁵ ФГКУ 354-й Военный клинический госпиталь ЦВО, г. Екатеринбург, Россия

⁶ ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия

⁷ ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия

⁸ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

⁹ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. При острой вирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, отмечается снижение уровня Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов, что, по-видимому, тесно связано с нарушениями функционирования тимуса, которые могут сохраняться длительное время после перенесенного заболевания. Поэтому целями данного исследования явились изучение уровня Т-клеточных эксцизионных колец (TREC, от англ. «T-cell receptor excision circles»), а также оценка состояния иммунной системы пациентов на основе скрининга по основным субпопуляциям лимфоцитов периферической крови человека после перенесенного COVID-19. Были сформированы следующие группы пациентов: пациенты, которые были обследованы через 6–12 месяцев после перенесенного острого COVID-19 с нормальным содержанием TREC (TRECn, n = 109); пациенты, которые также были обследо-

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-29-29. E-mail: igorek1981@yandex.ru

Contacts:

Igor V. Kudryavtsev
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Academician Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-29-29. E-mail: igorek1981@yandex.ru

Для цитирования:

Зурочка А.В., Добрынина М.А., Сафронова Э.А., Зурочка В.А., Зуйкова А.А.,
Сарапульцев Г.П., Забков О.И., Мосунов А.А., Верховская М.Д.,
Дукардт В.В., Фомина Л.О., Костоломова Е.Г., Останкова Ю.В.,
Кудрявцев И.В., Тотолян А.А. Нарушения Т-клеточного звена иммунитета
через 6–12 месяцев после острой фазы коронавирусной инфекции:
скрининговое исследование // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 4.
С. 756–768. doi: 10.15789/2220-7619-AIT-17646

Citation:

Zurochka A.V., Dobrynina M.A., Safronova E.A., Zurochka V.A., Zuykova A.A.,
Sarapultsev G.P., Zabkov O.I., Mosunov A.A., Verkhovskaya M.D., Ducardt V.V.,
Fomina L.O., Kostolomova E.G., Ostanokova Yu.V., Kudryavtsev I.V., Totolian A.A.
Alterations in T cell immunity over 6–12 months post COVID-19 infection
in convalescent individuals: a screening study // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 4, pp. 756–768.
doi: 10.15789/2220-7619-AIT-17646

Работа выполнена по теме госзаданий ИИФ УрО РАН: «Имунофизиологические и патофизиологические механизмы регуляции и коррекции функций организма», № госрегистрации 122020900136-4; НИИВИ «ВИРОМ»: «Изучение механизмов формирования хронической вирусной инфекции у пациентов с постковидным синдромом и нарушением функций иммунной системы. Разработка патогенетических подходов к эффективной профилактике и иммунокоррекции выявленных нарушений у пациентов с «постковидным синдромом», № госрегистрации 124031800093-5; ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»: «Исследование механизмов дифференцировки Т-лимфоцитов и молекулярно-клеточных основ регуляции иммунного ответа для разработки новых технологий клеточной иммунотерапии онкологических, инфекционных и аутоиммунных заболеваний», № госрегистрации 122020300186-5; ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»: «Изучение механизмов формирования иммунного ответа на новую коронавирусную инфекцию, вызванную SARS-CoV-2 у населения Северо-Западного федерального округа», № госрегистрации 121030200299-3.

The work was carried out on the theme of state orders of the Institute of Immunology and Physiology (Ural Branch of the RAS): "Immunophysiological and pathophysiological mechanisms of regulation and correction of body functions", No. of state registration 122020900136-4; Federal Research Institute of Viral Infections "ViroM": "Study of mechanisms of formation of chronic viral infection in patients with post-covid syndrome and immune system dysfunction. Development of pathogenetic approaches to effective prophylaxis and immunocorrection of the revealed disorders in patients with post-covid syndrome", No. of state registration 124031800093-5; Institute of Experimental Medicine: "Study of mechanisms of T-lymphocyte differentiation and molecular and cellular bases of immune response regulation for the development of new technologies for cellular immunotherapy of oncological, infectious and autoimmune diseases", No. of state registration 122020300186-5, St. Petersburg Pasteur Institute: "Study of mechanisms of immune response formation to a new coronavirus infection caused by SARS-CoV-2 in the population of the North-Western Federal District", No. of state registration 121030200299-3.

дованы через 6–12 месяцев после перенесенного острого COVID-19, но обладавшие сниженным содержанием ТREC в периферической крови (TREC_{low}, n = 29); условно здоровые добровольцы (HC, n = 18). Для оценки уровней ТREC применяли набор реагентов «TREC/KREC-AMP PS», для выявления основных субпопуляций лимфоцитов использовали многоцветную проточную цитометрию. Обследованные группы достоверно не различались по уровню CD3⁺ клеток. Однако в случае CD4⁺ Т-клеток было обнаружено, что обе группы пациентов TREC_{low} и TREC_n длительное время сохраняют сниженное относительное содержание этих клеток в циркулирующей крови по сравнению с контрольными значениями (40,8% (31,6; 50,1) и 46,4% (40,0; 53,0) против 53,5% (47,36; 56,9) при p < 0,001 и p = 0,004 соответственно). Абсолютное содержание CD4⁺ Т-лимфоцитов у TREC_{low} пациентов было снижено как HC, так и TREC_n (701 кл/1 мкл (478; 807) против 1005 кл/1 мкл (700; 1419) при p = 0,020 и 876 кл/1 мкл (661; 1046) при p = 0,008 соответственно). Содержания CD8⁺ Т-лимфоцитов было достоверно увеличено в обеих группах пациентов после острого COVID-19 — 29,4% (20,7; 39,7) в группе TREC_{low}, 26,5% (21,1; 32,7) в группе TREC_n против 21,3% (17,1; 26,0) в группе сравнения при p = 0,024 и p = 0,026 соответственно. Кроме того, в группе TREC_n абсолютное содержание CD8⁺ Т-клеток достоверно превосходило значения контроля (508 кл/1 мкл (372; 622) против 356 кл/1 мкл (247; 531) при p = 0,044). Полученные нами результаты указывают факт нарушения функционирования Т-клеточного звена приобретенного иммунитета у пациентов после перенесенной коронавирусной инфекции, которые могут быть тесно связаны с процессами созревания и дифференцировки Т-клеток в тимусе. Длительное снижение уровня ТREC в циркуляции может оказывать существенные влияния на состояние иммунной системы пациентов и нуждается в проведении иммунокорректирующей терапии.

Ключевые слова: проточная цитометрия, уровень ТREC, Т-лимфоциты, Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты, пост-COVID-19.

ALTERATIONS IN T CELL IMMUNITY OVER 6–12 MONTHS POST-COVID-19 INFECTION IN CONVALESCENT INDIVIDUALS: A SCREENING STUDY

Zurochka A.V.^{a,b}, Dobrynina M.A.^{a,b,c}, Safronova E.A.^{c,d}, Zurochka V.A.^{a,b}, Zuikova A.A.^b, Sarapultsev G.P.^e, Zabkov O.I.^b, Mosunov A.A.^{b,f}, Verkhovskaya M.D.^{b,f}, Ducardt V.V.^b, Fomina L.O.^b, Kostolomova E.G.^g, Ostankova Yu.V.^h, Kudryavtsev I.V.ⁱ, Totolian A.A.^h

^a Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

^b Federal Research Institute of Viral Infections “Virom”, Ekaterinburg, Russian Federation

^c State Research Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

^d South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

^e 354 Military Clinical Hospital of the Russian Ministry of Defense, Ekaterinburg, Russian Federation

^f Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

^g Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

^h St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

ⁱ Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Acute COVID-19 is a viral infection caused by a severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) that results in dramatically decreased peripheral blood CD3⁺ T cell count apparently due to alterations of thymic T cell maturation, that can persist long term afterwards. Therefore, we analyzed the levels of peripheral blood TRECs (T-cell receptor excision circles), and investigated the main alterations in peripheral blood T cell subsets in COVID-19 convalescents. We performed molecular quantification of TRECs with “TREC/KREC-AMP PS” kit and flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes from three groups of patients. The first group contained 109 samples from COVID-19 convalescents (6–12 month post-acute COVID-19) with normal levels of TRECs (TREC_n); the second was formed from COVID-19 convalescents (6–12 month post-acute COVID-19) with decreased levels of TRECs (TREC_{low}, n = 29), and healthy control group (HC, n = 18). We noticed no significant differences between all three groups in CD3⁺ T cell relative and absolute numbers. However, CD4⁺ T cell frequencies were decreased in TREC_{low} and TREC_n groups compared to HC (40.8% (31.6; 50.1) and 46.4% (40.0; 53.0) vs 53.5% (47.36; 56.9), p < 0.001 and p = 0.004, respectively). Furthermore, Th cell levels were decreased in TREC_{low} patients vs HC and TREC_n groups (701 cell/1 μL (478; 807) vs 1005 cell/1 μL (700; 1419), p = 0.020, and 876 cell/ 1 μL (661; 1046), p = 0.008, respectively). Finally, both groups of COVID-19 convalescents had increased frequencies of circulating CD8⁺ T cells — 29.4% (20.7; 39.7) in TREC_{low} group, 26.5% (21.1; 32.7) in TREC_n group vs 21.3% (17.1; 26.0) in healthy controls (p = 0.024 and p = 0.026, respectively). In TREC_n group, CD8⁺ T cell count was elevated vs control range (508 cell/1 μL (372; 622) vs 356 cell/1 μL (247; 531), p = 0.044). Thus, COVID-19 convalescents (6–12 month post-acute COVID-19) showed an imbalance in CD4⁺ and CD8⁺ T cell level even at 6–12 months post-acute SARS-CoV-2 infection, and the observed changes in peripheral blood T cells could be closely related to the alterations in thymic T cell maturation and differentiation. Such a long-term decline in TREC levels in the circulation may have a profound impact on immune system functions and requires immunocorrection therapy.

Key words: flow cytometry, TRECs level, T cells, Th cells, CD8⁺ T cells, post-COVID-19.

Введение

Одной из отличительных характеристик острой вирусной инфекции, вызванной инвазией вируса SARS-CoV-2, является выраженное снижение уровня лимфоцитов в периферической крови пациентов, что уже отмечалось в самых первых исследованиях. Так, в рамках общего пула лейкоцитов периферической крови у больных COVID-19 отмечалось снижение Т-лимфоцитов по мере увеличения тяжести заболевания, тогда как повышение доли этих клеток могло рассматриваться в качестве благоприятного признака [23]. Более того, содержание Т-лимфоцитов в периферической крови находилось в обратной зависимости от концентраций IL-6 и IL-10, уровень которых при инфицировании SARS-CoV-2 возрастал по мере увеличения тяжести течения заболевания [11]. Пониженный уровень Т-лимфоцитов в динамике наблюдений, равно как и CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ клеток, был характерен для больных тяжелой формой течения заболевания при сравнении со среднетяжелыми случаями [22]. Кроме того, была обнаружена зависимость между уровнем Т-клеток в циркуляции и тяжестью течения COVID-19, выраженной в баллах шкалы APACHE III [21]. Столь же важные результаты были получены при оценке степени зрелости CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, циркулирующих в периферической крови пациентов в острой фазе заболевания, выявившие, в первую очередь, снижение уровня «наивных» Т-клеток обеих популяций [9, 20, 24, 25].

Снижение уровня «наивных» Т-клеток, обладающих широким спектром уникальных специфичностей Т-клеточных рецепторов, характерно для различных вирусных и бактериальных инфекций, которые негативно влияют на функцию тимуса за счет прямого воздействия на клетки микроокружения тимуса, как это было показано для SARS-CoV-2 [31], или за счет системных эффектов растворимых факторов, высвобождаемых в кровотоке, таких как глюкокортикоиды и провоспалительные цитокины [13, 16]. Именно поэтому анализ содержания «наивных» Т-клеток, прошедших антигензависимую дифференцировку в тимусе и вышедших в периферическую кровь, может быть важнейшим методом для оценки эффективности тимопоэза. Для этих целей традиционно применяют несколько методических подходов, включая анализ экспрессии CD31, позволяющих выявить циркулирующие «ранние тимические мигранты» с фенотипом CD31⁺CD45R0⁻CD62L⁺ [18] при помощи проточной цитометрии или определение уровня Т-клеточных эксцизионных колец (TREC, от англ. «T-cell receptor excision circles») [5]. TREC — это внехро-

мосомные продукты кругового вырезания молекул ДНК при перестройке генов Т-клеточных рецепторов (TCR) в ходе соматической рекомбинации ДНК, которые образуются при созревании Т-клеток в тимусе. Кольцевые молекулы TREC образуются в дважды-негативных тимоцитах (DN4 тимоциты) на этапе перестройки α -цепи TCR при рекомбинации элементов δ Rec и ψ J α с последующей делецией локуса TCR δ . TREC обнаруживаются в тимоцитах и «наивных» Т-лимфоцитах при помощи методов молекулярной биологии, что делает данный подход к анализу эффективности функционирования тимуса удобным для использования в клинической лабораторной диагностике [1]. При оценке уровней молекул TREC у больных COVID-19 обнаружено их достоверное снижение по сравнению со здоровыми людьми [6]. При этом не только показана прямая корреляция уровней TREC с количеством CD3⁺ клеток, но и достоверное снижение количества молекул TREC у больных с тяжелым течением заболевания по сравнению со среднетяжелым в группе лиц в возрасте 30–49 лет [5].

Именно поэтому целью данного исследования явилось изучение уровня TREC, а также состояние иммунной системы пациентов на основе скрининга по основным субпопуляциям лимфоцитов периферической крови человека в норме и после перенесенной COVID-19 инфекции.

Материалы и методы

Характеристика пациентов. В основной части исследования нами были обследованы три группы пациентов, в том числе группа контроля, в которую вошли условно здоровые добровольцы на момент обследования, не имевшие острых или обострения хронических воспалительных заболеваний (НС, n = 18); группа пациентов, которые были обследованы через 6–12 месяцев после перенесенного острого COVID-19 с нормальным содержанием TREC (TREC_n, n = 109); а также группа пациентов, которые также были обследованы через 6–12 месяцев после перенесенного острого COVID-19, но обладавшие сниженным содержанием TREC в периферической крови (TREC_{low}, n = 29). Все три группы были в возрасте 45–65 лет и достоверно не отличались друг от друга по половому составу.

Во второй части исследования анализировали 25 образцов периферической крови, полученных от 25 пациентов, имевших в анамнезе перенесенный ранее COVID-19 с не менее чем 25%-м поражением легких, а также обострение хронических воспалительных заболеваний.

Все пациенты были предварительно обследованы врачом терапевтом и иммунологом-ал-

лергологом для выявления сопутствующих заболеваний. Все обследованные пациенты подписывали информированное согласие на обследование. Все исследования были одобрены независимым локальным этическим комитетом при ГАУЗ ОТКЗ «Городская клиническая больница № 1» г. Челябинска, протокол № 8 от 11.04.2022 на базе которой проводились данные исследования.

Определение уровней TREC в периферической крови. Взятие крови осуществляли в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА. Экстракцию тотальной ДНК из лейкоцитарной фракции венозной периферической крови проводили с использованием набора «РИБО-преп» (ЦНИИЭ, Москва, Россия). Для оценки уровней молекул TREC со всеми образцами тотальной ДНК проводили количественную мультиплексную Real-time ПЦР с одновременной амплификацией целевого фрагмента ДНК TREC и фрагментов двух нормировочных генов HPRT и RPP30 с использованием набора реагентов «TREC/KREC-AMP PS» (ФБУН НИИ Пастера, Санкт-Петербург), согласно инструкции производителя. Количественную оценку содержания молекул TREC проводили с помощью метода построения стандартных кривых [7]. Анализ полученных данных осуществляли в сравнении со значениями нормы, установленными ранее для взрослых людей разных возрастных групп [4].

Проточная цитометрия. Объектом исследования служила периферическая кровь, собранная в вакуумные пробирки с содержанием К₃ЭДТА в качестве антикоагулянта. Подготовку образцов для проведения проточной цитометрии осуществляли в день получения образцов (не более 6 часов после пункции локтевой вены). В рамках первой части исследования для выявления основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови применяли реактивы компании Beckman Coulter (США) под коммерческим названием TetraChrome. Так, для определения абсолютного и относительного содержания Т-лимфоцитов (фенотип CD3⁺CD19⁻), В-лимфоцитов (фенотип CD3⁻CD19⁺), NK-клеток (фенотип CD3⁻CD56⁺CD16⁺) и Т-NK лимфоцитов (фенотип CD3⁺CD56⁺CD16⁺) использовали следующую комбинацию флуорохром-меченных моноклональных антител: CD45-FITC, CD56-RD1+CD16-PE, CD19-ECD и CD3-PC5. Для выявления основных субпопуляций Т-клеток — Т-хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺ и цитотоксических Т-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD8⁺ — использовали смесь антител, включавшую CD45-FITC, CD4-RD1, CD8-ECD и CD3-PC5. Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter,

США). Абсолютные значения указанных выше популяций лимфоцитов были получены в одноплатформенной системе с использованием флуоресцентных частиц FlowCount™ (Beckman Coulter, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенный 488 и 638 нм лазерами. В каждом образце анализировали не менее 10 000 лимфоцитов.

Во второй части исследований проводили сравнение результатов анализа основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови, полученных при использовании набора реагентов TetraChrome компании Beckman Coulter (США), а также наборов реагентов «Статус Флоу-1 тетра BR» и «Статус Флоу-2 тетра BR» производства компании «Алкор Био» (Россия). При помощи реагентов «Статус Флоу-1 тетра BR», состоявших их антител против CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP-Cy5.5/CD4-APC, определяли основные субпопуляции Т-клеток. Тогда как с использованием набора «Статус Флоу-2 тетра BR», включавшего антитела против CD45-PerCP-Cy5.5/CD3-FITC/CD56⁺16-PE/CD19-APC определяли В- и NK-клетки. Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора «ВерсаФлоу» производства компании «Алкор Био» (Россия). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенный 488 и 638 нм лазерами. В каждом образце анализировали не менее 10 000 лимфоцитов.

Статистическая обработка полученных результатов. Обработку данных проточной цитометрии проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.2.0 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США) и R version 4.3.2 (2023-10-31 ucrt) Eye Holes RStudio version 2023.09.1+494 Desert Sunflower (The R Foundation, США). Результаты, полученные в ходе исследования абсолютного и относительного содержания лимфоцитов в периферической крови, выражали в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q₂₅ и Q₇₅). Корреляционный анализ проводили с использованием критерия Спирмена. Проверку данных на соответствие типа распределения нормальному проводили при помощи критерия Шапиро–Уилка в каждой группе отдельно. Гомогенность дисперсий в группах проверяли при помощи критерия Фишера. Для сравнения трех групп пациентов применяли непараметрический критерий Краскела–Уоллиса. При сравнении результатов по относительному и абсолютному содержанию лимфоцитов, полученных при помощи реагентов компаний Beckman Coulter и Алкор Био,

в двух связанных группах при соблюдении условий нормальности распределения значений и отсутствия в них значимых выбросов проводили при помощи парного теста Стьюдента. В случае нарушения условия нормальности распределения исследуемых параметров в группах или равенства дисперсий группы сравнивали при помощи критерия Вилкоксона для связанных наблюдений.

Результаты

При анализе относительного и абсолютного содержания CD3⁺ Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов сравниваемых групп и условно здоровых добровольцев нами не было отмечено достоверных различий по сравниваемым параметрам (рис. 1). Так, у пациентов с низким уровнем TREC в периферической крови эти значения составили 72,4% (69,4; 79,2) и 1251 кл/1 мкл (1001; 1611), для группы с нормальных содержанием TREC — 76,1% (71,1; 80,7) и 1501 кл/1 мкл (1180; 1765), а в группе контроля — 77,5% (74,1; 80,0) и 1666 кл/1 мкл (1033; 1926). Кроме того, в случае пациентов с нормальных содержанием TREC в периферической крови нами были выявлены положительные корреляции между относительным и абсолютным содержанием CD3⁺ Т-лимфоцитов и уровнем TREC ($r = 0,258$ при $p = 0,007$ и $r = 0,215$ при $p = 0,025$ соответственно).

Анализ отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов, выявленных в случае Т-хелперов на ос-

новании коэкспрессии CD3 и CD4, а в случае цитотоксических Т-лимфоцитов — на основании наличия CD3 и CD8 на поверхностной мембране клеток, показал существенные различия между анализируемыми группами. Так, в случае CD4⁺ Т-клеток было обнаружено (рис. 2), что обе группы пациентов, переболевших COVID-19, длительное время сохраняют сниженное относительное содержание этих клеток в циркулирующей крови по сравнению с контрольными значениями (40,8% (31,6; 50,1) в группе TREC^{low} и 46,4% (40,0; 53,0) в группе с нормальным уровнем TREC против 53,5% (47,36; 56,9) в группе сравнения при $p < 0,001$ и $p = 0,004$ соответственно). Более того, сниженная концентрация TREC в крови была связана с более низким содержанием CD4⁺ Т-клеток в циркуляции ($p = 0,027$) у пациентов, успешно перенесших COVID-19. Абсолютное содержание CD4⁺ Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов с низким уровнем TREC было снижено по сравнению как с группой контроля, так и пациентами с нормальным содержанием TREC (701 кл/1 мкл (478; 807) против 1005 кл/1 мкл (700; 1419) при $p = 0,020$ и 876 кл/1 мкл (661; 1046) при $p = 0,008$ соответственно). Кроме того, у пациентов со сниженным содержанием TREC была выявлена обратная зависимость между концентраций CD4⁺ Т-клеток и уровнем TREC в циркуляции ($r = -0,422$ при $p = 0,022$).

Вместе с тем при анализе содержания CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови нами

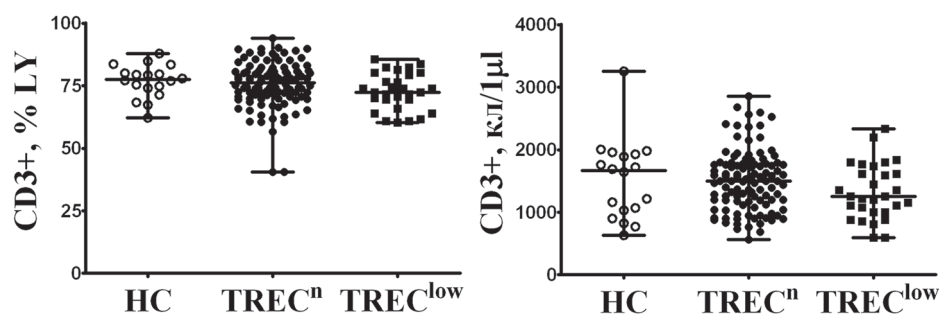


Рисунок 1. Содержание CD3⁺ клеток периферической крови у пациентов после острого COVID-19 с разными уровнями TREC

Figure 1. Peripheral blood T cell frequencies in COVID-19 convalescents with varying TRECs levels

Примечание. Результаты приведены в виде процента от общего числа лимфоцитов и абсолютных значений (кол-во клеток в 1 µl цельной крови) и представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [Med (Q₂₅; Q₇₅)]. Для сравнения полученных выборок использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса. Здесь и далее: белые круги — группа контроля (HC, n = 18); черные круги — пациенты, перенесшие COVID-19, с нормальным содержанием TREC (TRECn, n = 109); черные квадраты — пациенты, перенесшие COVID-19, со сниженным содержанием TREC (TREC^{low}, n = 29).

Note. The obtained data are presented as percent of cells within total lymphocyte subset (%), as well as absolute numbers (the number of cells in 1 µL of whole peripheral blood, right). Each dot represents individual subjects, and horizontal bars depict the group medians and quartile ranges [Med (Q₂₅; Q₇₅)]. The statistical analysis was performed with the Mann–Whitney U test. Here and on the Fig. 2 and 3: white circles denote healthy control group (HC, n = 18); black circles — convalescent COVID-19 individuals with normal levels of TRECs (TRECn, n = 109); black squares — convalescent COVID-19 individuals with low levels of TRECs (TREC^{low}, n = 29).

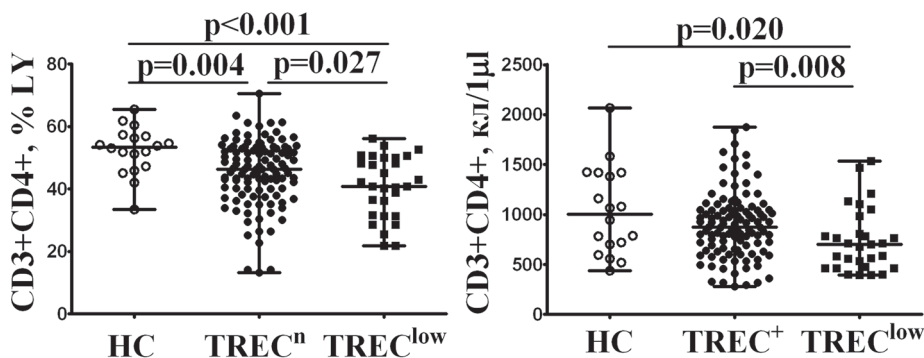


Рисунок 2. Содержание CD3⁺CD4⁺ клеток периферической крови у пациентов после острого COVID-19 с разными уровнями TREC

Figure 2. CD4⁺ T cells frequencies in peripheral blood samples from COVID-19 convalescents with different levels of TRECs

Примечание. Результаты приведены в виде процента от общего числа лимфоцитов и абсолютных значений (кол-во клеток в 1 μl цельной крови), и представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [Med (Q₂₅; Q₇₅)]. Для сравнения полученных выборок использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса.

Note. The obtained data are presented as percent of cells within total lymphocyte subset (%), as well as absolute numbers (the number of cells in 1 μL of whole peripheral blood, right). Each dot represents individual subjects, and horizontal bars depict the group medians and quartile ranges [Med (Q₂₅; Q₇₅)]. The statistical analysis was performed with the Mann–Whitney U test.

было показано (рис. 3) достоверное увеличение процентного содержания этих клеток в обеих группах пациентов после острого COVID-19 (29,4% (20,7; 39,7) в группе TREC^{low} и 26,5% (21,1; 32,7) в группе с нормальным уровнем TREC против 21,3% (17,1; 26,0) в группе сравнения при $p = 0,024$ и $p = 0,026$ соответственно). Кроме того, в группе с нормальным уровнем TREC в циркулирующей крови абсолютное содержание CD8⁺ Т-клеток достоверно превосходило значения контроля (508 кл/1 мкл (372; 622) против 356 кл/1 мкл (247; 531) при $p = 0,044$). Более того, нарушение содержания CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток

оказывали существенное влияние на соотношение CD4/CD8 в периферической крови пациентов, перенесших COVID-19, по сравнению со значениями, полученными для группы контроля. В обеих группах пациентов нами было отмечено достоверное снижение данного индекса (1,70 (0,90; 2,50) в группе TREC^{low} и 1,80 (1,30; 2,40) в группе с нормальным уровнем TREC против 2,40 (2,00; 3,20) в группе сравнения при $p = 0,004$ и $p = 0,005$ соответственно).

Кроме того, при исследовании лимфоцитов периферической крови пациентов, перенесших COVID-19, нами была проведена оценка CD19⁺

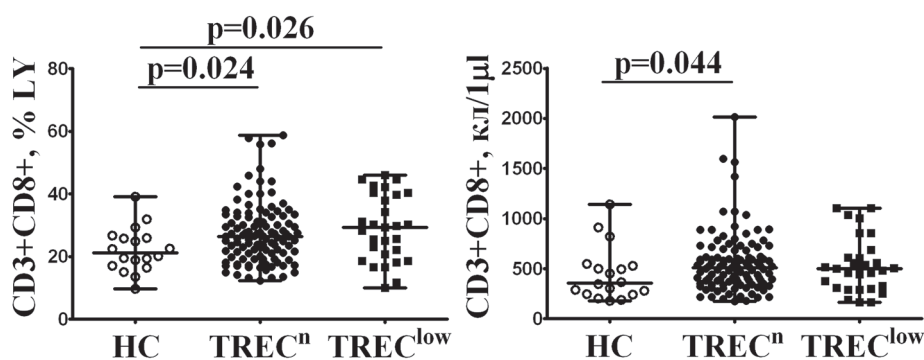


Рисунок 3. Содержание CD3⁺CD8⁺ клеток периферической крови у пациентов после острого COVID-19 с разными уровнями TREC

Figure 3. CD8⁺ T cells frequencies in peripheral blood samples from COVID-19 convalescents with different levels of TRECs

Примечание. Результаты приведены в виде процента от общего числа лимфоцитов и абсолютных значений (кол-во клеток в 1 μl цельной крови) и представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [Med (Q₂₅; Q₇₅)]. Для сравнения полученных выборок использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса.

Note. The obtained data are presented as percent of cells within total lymphocyte subset (%), as well as absolute numbers (the number of cells in 1 μL of whole peripheral blood, right). Each dot represents individual subjects, and horizontal bars depict the group medians and quartile ranges [Med (Q₂₅; Q₇₅)]. The statistical analysis was performed with the Mann–Whitney U test.

В-лимфоцитов и CD3-CD56⁺ натуральных киллеров. В случае В-клеток у пациентов с нормальным уровнем ТREC в крови отмечено достоверное увеличение доли клеток данной популяции (11,8% (8,6; 16,2) против 9,3% (6,5; 13,5) при $p = 0,032$), тогда как по другим показателям достоверных отличий показано не было. Более того, как относительное, так и абсолютное содержание CD3-CD56⁺ НК-клеток у пациентов вне зависимости от уровней ТREC в крови находилось в пределах значений контрольной группы (данные не приведены).

В рамках проведенного анализа пациентов ($n = 25$), перенесших COVID-19, нами была предпринята попытка сравнения моноклональных антител, полученных от разных фирм-производителей. Как показано в таблице, применение антител производства компании «Beckman Coulter» (США) и компании ООО «Алкор Био» (Россия) позволяло получить результаты, достоверных различий между которыми отмечено не было с использованием двух независимых критериев оценки. Сравнение непрерывных данных в двух связанных группах при соблюдении условий нормальности распределения значений и отсутствия в них значимых выбросов проводили при помощи парного теста Стьюдента (p_1). В случае нарушения условия нормальности распределения исследуемых параметров в группах или равенства дисперсий группы сравнивали при помощи критерия Вилкоксона

для связанных наблюдений (p_2). Проведенный анализ выявил отсутствие достоверных различий между сравниваемыми моноклональными антителами для проточной цитометрии, что позволило получить воспроизводимые результаты в рамках проведенного нами исследования.

Также нами была проведена оценка взаимосвязи результатов показателей клеточного иммунитета пациентов, перенесших COVID-19, полученных при использовании антител, произведенных компанией «Алкор Био» (Россия) и компанией «Beckman Coulter» (США). С помощью корреляционного анализа установлено наличие достоверных высоких положительных взаимосвязей между результатами, полученными при помощи антител двух разных фирм-производителей, по всем ключевым субпопуляциям лимфоцитов периферической крови (рис. 4).

Обсуждение

Полученные нами результаты указывают факт нарушения функционирования Т-клеточного звена приобретенного иммунитета у пациентов после перенесенной коронавирусной инфекции, которые могут быть тесно связаны с процессами созревания и дифференцировки Т-клеток в тимусе. Длительное снижение уровня ТREC в циркуляции может оказывать существенные влияния на состоя-

Таблица. Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациентов, перенесших COVID-19 ($n = 25$), при помощи моноклональных антител производства компаний «Алкор Био» и «Beckman Coulter»

Table. Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes from COVID-19 convalescents based on monoclonal antibodies, manufactured by "Alkor Bio" and "Beckman Coulter Inc."

Популяция лимфоцитов Lymphocytes subsets		Антитела производства «Алкор Био» Antibodies, manufactured by "Alkor Bio"	Антитела производства «Beckman Coulter» Antibodies, manufactured by "Beckman Coulter Inc."	
Т-лимфоциты (CD3⁺CD19⁻) T cells (CD3 ⁺ CD19 ⁻)	%	76,8 (70,3; 79,2)	75,3 (68,8; 79,6)	$p_1 = 0,845$
	#	1270 (922; 1817)	1173 (1019; 1755)	$p_1 = 0,934$
В-лимфоциты (CD3⁻CD19⁺) B cells (CD3 ⁻ CD19 ⁺)	%	9,0 (6,7; 10,9)	9,3 (8,0; 11,5)	$p_2 = 0,938$
	#	152 (101; 214)	150 (104; 220)	$p_1 = 0,772$
НК-клетки (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) NK-cells (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	%	11,8 (9,1; 18,1)	10,7 (6,6; 15,2)	$p_1 = 0,576$
	#	228 (150; 327)	196 (121; 2730)	$p_2 = 0,594$
Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺) Th cells (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	%	51,4 (47,2; 57,5)	51,9 (45,3; 56,9)	$p_1 = 0,691$
	#	790 (679; 1234)	790 (648; 1162)	$p_1 = 0,859$
Цитотоксические Т-клетки (CD3⁺CD8⁺) CD8 ⁺ T cells (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	%	24,0 (19,7; 27,5)	21,8 (17,1; 26,5)	$p_1 = 0,930$
	#	351 (250; 580)	347 (251; 531)	$p_1 = 0,983$
Соотношение CD4/CD8 CD4/CD8 ratio		2,3 (1,7; 2,7)	2,4 (2,0; 3,0)	$p_2 = 0,846$

Примечание. Результаты приведены в виде процентов в рамках общей популяции Т-лимфоцитов, а также в виде абсолютного (#) содержания клеток в 1 μ л цельной крови, результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [Med (Q_{25} ; Q_{75})]. Для сравнения полученных выборок использовали парный теста Стьюдента (p_1) или критерий Вилкоксона для связанных наблюдений (p_2).

Note. The obtained data are presented as percent of cells within total lymphocyte subset (%), as well as absolute numbers (#, the number of cells per 1 μ L of whole peripheral blood), and are shown as median and quartile ranges [Med (Q_{25} ; Q_{75})]. The statistical analysis was performed with the Student's t-test (p_1) or Wilcoxon test (p_2).

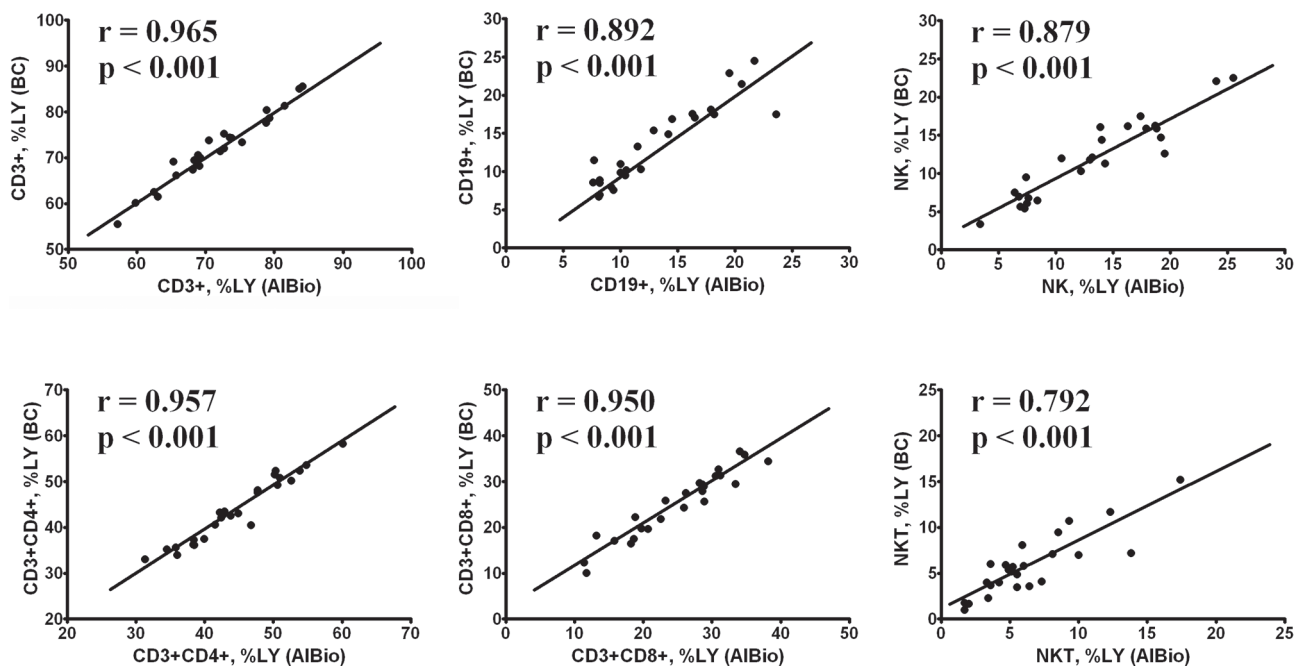


Рисунок 4. Сравнение относительного содержания основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови пациентов, перенесших COVID-19, выявленных при помощи моноклональных антител производства компаний «Алкор Био» (Россия) и «Beckman Coulter» (США)

Figure 4. Significant correlations between flow cytometric data based on monoclonal antibodies, manufactured by "Alkor Bio" (Russia) and "Beckman Coulter Inc." (USA)

Примечание. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену.

Note. Correlation analysis was performed using Spearman's correlation coefficient.

ние иммунной системы пациентов и нуждается в проведении иммунокорригирующей терапии.

При остром COVID-19 наблюдается нарушения как с субпопуляционным составе, так и в функциональной активности широчайшего спектра клеток организма человека, включая клетки иммунной системы и, в особенности, Т-лимфоциты [19, 34, 38]. Снижение функции тимуса и, как следствие, снижение выхода «наивных» Т-клеток может усугубить лимфопению у пациентов с острым заболеванием COVID-19 и увеличить время, необходимое для восстановления количества и функции циркулирующих Т-клеток после выздоровления. Так, при острой инфекции, вызванной SARS-CoV-2, низкой содержание TREC или их полное отсутствие в циркуляции служит одним из показателей неблагоприятного исхода заболевания, что было показано в целой серии независимых исследований. Так, в исследовании Khadzhieva M.B. и соавт. (2021) было показано, что при развитии респираторного дистресс-синдрома у больных COVID-19 уровни концентраций TREC и KREC значительно ниже, чем у больных без респираторного дистресс-синдрома [17]. Низкий уровень TREC у больных COVID-19 в острый период заболевания является критерием неблагоприятного исхода, тогда как повышение

концентрации TREC и KREC определяется благоприятным исходом данного инфекционного заболевания [33]. Сравнительно недавно было показано, что тимус человека является мишенью для вируса SARS-CoV-2, а функция тимуса существенно нарушается после заражения, поэтому мониторинг активности тимуса может быть важным маркером для прогнозирования тяжести и прогрессирования заболевания [31]. Наши собственные результаты также указывают на тот факт, что нарушения в работе тимуса сохраняются и после успешно перенесенного острого периода данного заболевания, что указывает на важности анализа функциональной активности тимуса после острой фазы инфекции. Более того, «замедленное» или «отсроченное» восстановление функции тимуса может способствовать развитию вторичных инфекций, которые могут усугубить тяжесть заболевания как в острой фазе [10], а также способствовать сохранению симптомов, связанных, например, с реактивацией герпесвируса в период реконвалесценции [14]. Все это приводит к тому, что у пациентов после острой коронавирусной инфекции отмечаются различные нарушения в работе иммунной системы, которые можно разделить на несколько подтипов [3], что нуждается в проведении иммунокоррекции [2].

Следует также отметить и тот факт, что нарушение процесса развития Т-клеток в тимусе может сказаться не только на снижении возможностей организма в распознавании инфекционных агентов, но и влиять на формирование центральной толерантности к собственным антигенам организма, вызывая выход в кровоток аутореактивных клонов Т-лимфоцитов в следствие нарушения механизмов селекции. Взаимосвязь между вирусными инфекциями и развитием аутоиммунных патологических процессов, включая ревматоидный артрит, рассеянный склероз, диабет 1 типа и системную красную волчанку, в настоящее время хорошо описана [36, 37]. Более того, уже сообщалось о случаях развитии псориатического артрита на фоне перенесенного COVID-19 [12, 27], системной красной волчанки [26, 29], а также других органно-специфических и системных аутоиммунных заболеваний [8, 30, 32].

В настоящее время все чаще появляются работы, описывающие существенные изменения в составе циркулирующих иммунных клеток у пациентов после перенесенного COVID-19, которые сохраняются длительное время (как минимум от 3 до 7–9 месяцев, а то и 12 месяцев после острой фазы заболевания). В первую очередь следует остановиться на Т-лимфоцитах, отвечающих за все многообразие клеточных реакций специфического иммунитета. Нами было показано снижение уровня CD4⁺ Т-клеток на фоне повышение содержания CD8⁺ Т-лимфоцитов в циркулирующей крови в период после острой инфекции, вызванной SARS-CoV-2, причем выявленные изменения сохранялись у обследованных пациентов в интервале 6–12 месяцев после выздоровления. Так, относительное содержание CD4⁺ Т-клеток в периферической крови у переболевших COVID-19 (как в легкой, так и в тяжелой форме и выработавших вирус-специфические антител) было достоверно снижено относительно контрольных значений, тогда как уровень CD8⁺ Т-лимфоцитов был достоверно повышен [28]. Анализ пациентов спустя 6 месяцев после острой инфекции SARS-CoV-2 показал, что у больных, которые длительное время находились в условиях стационара и которым потребовалось около 4 месяцев для выздоровления (группа LCR, от англ. long-time clinically recovered), в циркуляции повышался уровень CD4⁺ Т-лимфоцитов как по сравнению с контролем, так и пациентами, время выздоровления которых составляло 1–2 месяца (группа SCR, от англ. short-time clinically recovered) [39]. При анализе уровня дифференцировки Th клеток было показано, что в группе SCR содержание Th центральной памяти с фенотипом CD45RO⁺CD27⁺ было снижено относительно значений контроля и па-

циентов группы LCR. Тогда как в случае CD8⁺ Т-лимфоцитов у SCR было показано снижение уровня «наивных» CD45RO⁻CD27⁺ клеток и прирост CD45RO⁺CD27⁻ клеток эффекторной памяти в циркулирующие крови относительно значений, полученных для двух других групп сравнения. В рамках другого исследования было отмечено увеличение доли зрелых эффекторных клеток с фенотипом CD45RA⁺CCR7⁺ в периферической крови у выздоравливающих пациентов [35], причем в случае CD8⁺ цитотоксических Т-клеток это еще было связано с увеличением доли зрелых перфорин- и гранзим-экспрессирующих лимфоцитов. В рамках другого исследования было показано, что уровень «наивных» CD45RA⁺CCR7⁺ Th достоверно не различался между группой переболевших пациентов и контролем. Тогда как Th центральной памяти с фенотипом CD45RA⁻CCR7⁺ у переболевших COVID-19 были снижены почти в 2 раза, а уровень CD45RA⁻CCR7⁻ Th эффекторной памяти был достоверно повышен по сравнению с контролем [15]. Важно отметить, что минимальные значения «наивных» Th в циркуляции, которые были достоверно ниже значений контроля, были характерны для пациентов, переболевших COVID-19 в тяжелой форме. Более того, именно у тяжелых больных отмечались минимальные значения CD45RA⁻CCR7⁺ Th в циркуляции, тогда как CD45RA⁻CCR7⁻ Th были представлены на высоком уровне. Тогда как относительное содержание указанных популяций клеток у пациентов, перенесших COVID-19 в легкой и средней форме, достоверно от контроля не отличались.

Заключение

Собственные результаты, а также анализ данных литературы свидетельствуют о наличии существенных изменений в функционировании Т-клеточного звена системы приобретенного иммунитета после острой фазы COVID-19. В настоящее время идет первичное накопление фактологического материала по изменениям в иммунной системе человека, вызванным SARS-CoV-2, а также определение тех промежутков времени, на которых указанные изменения могут влиять на эффективность функционирования иммунной системы на уровне всего организма. По-видимому, анализ функционирования тимуса как центрального органа иммунной системы, отвечающего за формирования различных субпопуляций Т-лимфоцитов, при помощи нескольких независимых методов исследования поможет выявить пациентов, находящихся в группах риска и требующих проведения специфической иммунотерапии, целью которой должно являться полное восстановление системы иммунитета.

Список литературы/References

- Гордукова М.А., Корсунский И.А., Чурсинова Ю.В., Бяхова М.М., Оскорбин И.П., Продеус А.П., Филипенко М.Л. Определение референсных интервалов TREC и KREC для скрининга новорожденных с иммунодефицитными состояниями в РФ // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21, № 3. С. 527–538. [Gordukova M.A., Korsunsky I.A., Chursinova Yu.V., Byakhova M.M., Oskorbin I.P., Prodeus A.P., Filipenko M.L. Determining reference ranges for TREC and KREC assays in immune deficiency screening of newborns in Russian Federation. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, vol. 21, no. 3, pp. 527–538. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-527-538
- Добрынина М.А., Зурочка А.В., Зурочка В.А., Рябова Л.В., Сарапульцев А.П. Формирование подходов к иммунокоррекции нарушений иммунной системы у постковидных пациентов // Российский иммунологический журнал. 2023. Т. 26, № 4. С. 641–646. [Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Zurochka V.A., Ryabova L.V., Sarapultsev A.P. Approaches to correction of immune system disturbances in post-COVID patients. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2023, vol. 26, no. 4, pp. 641–646. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-13492-ATC
- Добрынина М.А., Ибрагимов Р.В., Крицкий И.С., Верховская М.Д., Мосунов А.А., Сарапульцев Г.П., Зурочка А.В., Зурочка В.А., Сарапульцев А.П., Комелькова М.В., Рябова Л.В., Праскурничий Е.А. Постковидный синдром иммунопатологии. Характеристика фенотипических изменений иммунной системы у постковидных пациентов // Медицинская иммунология. 2023. Т. 25, № 4. С. 791–796. [Dobrynina M.A., Ibragimov R.V., Kritsky I.S., Verkhovskaya M.D., Mosunov A.A., Sarapultsev G.P., Zurochka A.V., Zurochka V.A., Sarapultsev A.P., Komelkova M.V., Ryabova L.V., Praskurnichiy E.A. Post-COVID immunopatology syndrome: characteristics of phenotypical changes in the immune system in post-COVID patients. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, vol. 25, no. 4, pp. 791–796. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PCI-2707
- Сайтгалина М.А., Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян Арег А. Определение референтных интервалов циркулирующих в крови эксцизионных колец TREC и KREC у лиц старше 18 лет // Медицинская иммунология. 2022. Т. 24, № 6. С. 1227–1236. [Saitgalina M.A., Liubimova N.E., Ostankova Yu.V., Kuznetzova R.N., Totolian A.A. Determination of reference values for TREC and KREC in circulating blood of the persons over 18 years. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, vol. 24, no. 6, pp. 1227–1236. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-DOR-2587
- Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Арсентьева Н.А., Коробова З.Р., Любимова Н.Е., Кашенко В.А., Куликов А.Н., Певцов Д.Э., Станевич О.В., Черных Е.И., Тотолян А.А. Оценка уровней молекул TREC и KREC у больных COVID-19 с разной степенью тяжести течения заболевания // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 5. С. 873–884. [Saitgalina M.A., Ostankova Yu.V., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., Liubimova N.E., Kashchenko V.A., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Stanevich O.V., Chernykh E.I., Totolian A.A. Assessment of trec and krec levels in COVID-19 patients with varying disease severity. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 5, pp. 873–884. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-AOT-16937
- Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Арсентьева Н.А., Коробова З.Р., Любимова Н.Е., Кашенко В.А., Куликов А.Н., Певцов Д.Э., Станевич О.В., Черных Е.И., Тотолян А.А. Значимость определения уровней молекул TREC и KREC в периферической крови для прогноза исхода заболевания COVID-19 в острый период // Российский иммунологический журнал. 2023. Т. 26, № 4. С. 611–618. [Saitgalina M.A., Ostankova Yu.V., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., Liubimova N.E., Kashchenko V.A., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Stanevich O.V., Chernykh E.I., Totolian A.A. Levels of TREC and KREC molecules significance determining in peripheral blood for predicting the outcome of COVID-19 disease in the acute period. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2023, vol. 26, no. 4, pp. 611–618 (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-14714-LOT
- Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян А.А. Модифицированный метод количественного определения уровней TREC и KREC в периферической крови у больных с иммунодефицитными состояниями // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 981–996 [Saitgalina M.A., Ostankova Yu.V., Liubimova N.E., Semenov A.V., Kuznetsova R.N., Totolian A.A. Modified quantitative approach for assessing peripheral blood TREC and KREC levels in immunodeficient patients. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 981–996. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MMF-2039
- Ahmed S., Zimba O., Gasparyan A.Y. COVID-19 and the clinical course of rheumatic manifestations. *Clin. Rheumatol.*, 2021, vol. 40, no. 7, pp. 2611–2619. doi: 10.1007/s10067-021-05691-x
- De Biasi S., Meschiari M., Gibellini L., Bellinazzi C., Borella R., Fidanza L., Gozzi L., Iannone A., Lo Tartaro D., Mattioli M., Paolini A., Menozzi M., Milić J., Franceschi G., Fantini R., Tonelli R., Sita M., Sarti M., Trenti T., Brugioni L., Cicchetti L., Facchinetti F., Pietrangelo A., Clini E., Girardis M., Guaraldi G., Mussini C., Cossarizza A. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat. Commun.*, 2020, vol. 11, no. 1: 3434. doi: 10.1038/s41467-020-17292-4
- De Bruyn A., Verellen S., Bruckers L., Geebelen L., Callebaut I., De Pauw I., Stessel B., Dubois J. Secondary infection in COVID-19 critically ill patients: a retrospective single-center evaluation. *BMC Infect. Dis.*, 2022, vol. 22, no. 1: 207. doi: 10.1186/s12879-022-07192-x
- Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., Chen L., Li M., Liu Y., Wang G., Yuan Z., Feng Z., Zhang Y., Wu Y., Chen Y. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.*, 2020, vol. 11: 827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827
- Essien F., Chastant L., McNulty C., Hubbard M., Lynette L., Carroll M. COVID-19-induced psoriatic arthritis: a case report. *Ther. Adv. Chronic Dis.*, 2022, vol. 13: 20406223221099333. doi: 10.1177/20406223221099333
- Ferrando-Martinez S., De Pablo-Bernal R.S., De Luna-Romero M., De Ory S.J., Genebat M., Pacheco Y.M., Parras F.J., Montero M., Blanco J.R., Gutierrez F., Santos J., Vidal F., Koup R.A., Muñoz-Fernández M.Á., Leal M., Ruiz-Mateos E.

- Thymic function failure is associated with human immunodeficiency virus disease progression. *Clin. Infect. Dis.*, 2017, vol. 64, no. 9, pp. 1191–1197. doi: 10.1093/cid/cix095.
14. Gold J.E., Okyay R.A., Licht W.E., Hurley D.J. Investigation of long COVID prevalence and its relationship to Epstein–Barr virus reactivation. *Pathogens*, 2021, vol. 10, no. 6: 763. doi: 10.3390/pathogens10060763
 15. Gong F., Dai Y., Zheng T., Cheng L., Zhao D., Wang H., Liu M., Pei H., Jin T., Yu D., Zhou P. Peripheral CD4+ T cell subsets and antibody response in COVID-19 convalescent individuals. *J. Clin. Invest.*, 2020, vol. 130, no. 12, pp. 6588–6599. doi: 10.1172/JCI141054
 16. Hartling H.J., Gaardbo J.C., Ronit A., Salem M., Laye M., Clausen M.R., Skogstrand K., Gerstoft J., Ullum H., Nielsen S.D. Impaired thymic output in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Scand. J. Immunol.*, 2013, vol. 78, no. 4, pp. 378–386. doi: 10.1111/sji.12096
 17. Khadzhieva M.B., Kalinina E.V., Larin S.S., Sviridova D.A., Gracheva A.S., Chursinova J.V., Stepanov V.A., Redkin I.V., Avdeikina L.S., Rumyantsev A.G., Kuzovlev A.N., Salnikova L.E. TREC/KREC Levels in Young COVID-19 Patients. *Diagnostics (Basel)*, 2021, vol. 11, no. 8: 1486. doi: 10.3390/diagnostics11081486
 18. Kohler S., Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and CD31– human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 4, pp. 769–774. doi: 10.1182/blood-2008-02-139154
 19. Kudryavtsev I., Rubinstein A., Golovkin A., Kalinina O., Vasilyev K., Rudenko L., Isakova-Sivak I. Dysregulated immune responses in SARS-CoV-2-infected patients: a comprehensive overview. *Viruses*, 2022, vol. 14, no. 5: 1082. doi: 10.3390/v14051082
 20. Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., Isakov D.V., Rubinstein A.A., Batsunov O.K., Khamitova I.V., Kuznetsova R.N., Savin T.V., Akisheva T.V., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Sharapova M.A., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Heterogenous CD8+ T cell maturation and ‘polarization’ in acute and convalescent COVID-19 patients. *Viruses*, 2022, vol. 14, no. 9: 1906. doi: 10.3390/v14091906
 21. Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., Meng W., Rosenfeld A.M., Ittner C.A.G., Weisman A.R., Agyekum R.S., Mathew D., Baxter A.E., Vella L.A., Kuthuru O., Apostolidis S.A., Bershaw L., Dougherty J., Greenplate A.R., Pattekar A., Kim J., Han N., Gouma S., Weirick M.E., Arevalo C.P., Bolton M.J., Goodwin E.C., Anderson E.M., Hensley S.E., Jones T.K., Mangalmurti N.S., Luning Prak E.T., Wherry E.J., Meyer N.J., Betts M.R. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci. Immunol.*, 2020, vol. 5, no. 49: eabd7114 doi:10.1126/sciimmunol.abd7114
 22. Liu J., Li S., Liu J., Liang B., Wang X., Wang H., Li W., Tong Q., Yi J., Zhao L., Xiong L., Guo C., Tian J., Luo J., Yao J., Pang R., Shen H., Peng C., Liu T., Zhang Q., Wu J., Xu L., Lu S., Wang B., Weng Z., Han C., Zhu H., Zhou R., Zhou H., Chen X., Ye P., Zhu B., Wang L., Zhou W., He S., He Y., Jie S., Wei P., Zhang J., Lu Y., Wang W., Zhang L., Li L., Zhou F., Wang J., Dittmer U., Lu M., Hu Y., Yang D., Zheng X. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*, 2020, vol. 55: 102763. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102763.
 23. Mann E.R., Menon M., Knight S.B., Konkel J.E., Jagger C., Shaw T.N., Krishnan S., Rattray M., Ustianowski A., Bakerly N.D., Dark P., Lord G., Simpson A., Felton T., Ho L.P., NIHR Respiratory TRC, Feldmann M., CIRCO, Grainger J.R., Hussell T. Longitudinal immune profiling reveals key myeloid signatures associated with COVID-19. *Sci. Immunol.*, 2020, vol. 5, no. 51: eabd6197. doi: 10.1126/sciimmunol.abd6197
 24. Martín-Sánchez E., Garcés J.J., Maia C., Inogés S., López-Díaz de Cerio A., Carmona-Torre F., Marin-Oto M., Alegre F., Molano E., Fernandez-Alonso M., Perez C., Botta C., Zabaleta A., Alcaide A.B., Landecho M.F., Rua M., Pérez-Warnisher T., Blanco L., Sarvide S., Vilas-Zornoza A., Alignani D., Moreno C., Pineda I., Sogbe M., Argemi J., Paiva B., Yuste J.R. Immunological biomarkers of fatal COVID-19: a study of 868 patients. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 659018. doi: 10.3389/fimmu.2021.659018
 25. 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
 26. Mok C.C., Chu C.S., Tse S.M. De novo lupus nephritis after SARS-CoV-2 infection. *Lupus*, 2023: 9612033231175280. doi: 10.1177/09612033231175280
 27. Novelli L., Motta F., Ceribelli A., Guidelli G.M., Luciano N., Isailovic N., Vecellio M., Caprioli M., Clementi N., Clementi M., Mancini N., Selmi C., De Santis M. A case of psoriatic arthritis triggered by SARS-CoV-2 infection. *Rheumatology (Oxford)*, 2021, vol. 60, no. 1, pp. e21–e23. doi: 10.1093/rheumatology/keaa691
 28. Orogas-Stavrou N., Politou M., Rousakis P., Kostopoulos I.V., Ntanasis-Stathopoulos I., Jahaj E., Tsiligeridou E., Gavriatopoulou M., Kastritis E., Kotanidou A., Dimopoulos M.A., Tsitsilonis O.E., Terpos E. Peripheral blood immune profiling of convalescent plasma donors reveals alterations in specific immune subpopulations even at 2 months post SARS-CoV-2 infection. *Viruses*, 2020, vol. 13, no. 1: 26. doi: 10.3390/v13010026
 29. Ramachandran L., Dontaraju V.S., Troyer J., Sahota J. New onset systemic lupus erythematosus after COVID-19 infection: a case report. *AME Case Rep.*, 2022, vol. 6: 14. doi: 10.21037/acr-21-55
 30. Ramos-Casals M., Brito-Zerón P., Mariette X. Systemic and organ-specific immune-related manifestations of COVID-19. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2021, vol. 17, no. 6, pp. 315–332. doi: 10.1038/s41584-021-00608-z
 31. Rosichini M., Bordoni V., Silvestris D.A., Mariotti D., Matusali G., Cardinale A., Zambruno G., Condorelli A.G., Flamini S., Genah S., Catanoso M., Del Nonno F., Trezzi M., Galletti L., De Stefanis C., Ciccolani N., Petrini S., Quintarelli C., Agrati C., Locatelli F., Velardi E. SARS-CoV-2 infection of thymus induces loss of function that correlates with disease severity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2023, vol. 151, pp. 911–921. doi: 10.1016/j.jaci.2023.01.022
 32. Rubinstein A., Kudryavtsev I., Malkova A., Mammedova J., Isakov D., Isakova-Sivak I., Kudlay D., Starshinova A. Sarcoidosis-related autoimmune inflammation in COVID-19 convalescent patients. *Front. Med.*, 2023, vol. 10: 1271198. doi: 10.3389/fmed.2023.1271198

33. Savchenko A.A., Tikhonova E., Kudryavtsev I., Kudlay D., Korsunsky I., Beleniuk V., Borisov A. TREC/KREC Levels and T and B Lymphocyte Subpopulations in COVID-19 Patients at Different Stages of the Disease. *Viruses*, 2022, vol. 14, no. 3: 646. doi: 10.3390/v14030646
34. Sette A., Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 2021, vol. 184, no. 4, pp. 861–880. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.007
35. Shuwa H.A., Shaw T.N., Knight S.B., Wemyss K., McClure F.A., Pearmain L., Prise I., Jagger C., Morgan D.J., Khan S., Brand O., Mann E.R., Ustianowski A., Bakerly N.D., Dark P., Brightling C.E., Brij S., CIRCO, Felton T., Simpson A., Grainger J.R., Hussell T., Konkel J.E., Menon M. Alterations in T and B cell function persist in convalescent COVID-19 patients. *Med (N Y)*, 2021, vol. 2, no. 6, pp. 720–735.e4. doi: 10.1016/j.medj.2021.03.013
36. Smatti M.K., Cyprian F.S., Nasrallah G.K., Al Thani A.A., Almishal R.O., Yassine H.M. Viruses and autoimmunity: a review on the potential interaction and molecular mechanisms. *Viruses*, 2019, vol. 11, no. 8, pp. 762 doi: 10.3390/v11080762
37. Sundaresan B., Shirafkan F., Ripperger K., Rattay K. The role of viral infections in the onset of autoimmune diseases. *Viruses*, 2023, vol. 15, no. 3: 782. doi: 10.3390/v15030782
38. Yuki K., Fujiogi M., Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: a review. *Clin. Immunol.*, 2020, vol. 215: 108427. doi: 10.1016/j.clim.2020.108427
39. Zhao B., Zhong M., Yang Q., Hong K., Xia J., Li X., Liu Y., Chen Y.Q., Yang J., Huang C., Yan H. Alterations in phenotypes and responses of T cells within 6 months of recovery from COVID-19: a cohort study. *Virol. Sin.*, 2021, vol. 9, pp. 1–10. doi: 10.1007/s12250-021-00348-0

Авторы:

Зурочка А.В., д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии Института иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Вирум» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;

Authors:

Zurochka A.V., DSc (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Leading Researcher, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology Ural Regional Branch of the RAS, Yekaterinburg, Russian Federation; Leading Researcher, Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russian Federation;

Добрынина М.А., к.м.н., доцент, научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии Института иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; старший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия; доцент кафедры терапии Медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования ФГБУ Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА РФ, Москва, Россия;

Сафронова Э.А., к.м.н., доцент, доцент кафедры поликлинической терапии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия; преподаватель кафедры терапии ФГБУ Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА РФ, Москва, Россия;

Зурочка В.А., д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; старший научный сотрудник лаборатории биотехнологий Научно-образовательного Российско-Китайского Центра системной патологии Южно-Уральского государственного университета (Научного исследовательского университета), г. Челябинск, Россия;

Зуйкова А.А., стажер лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;

Сарапульцев Г.П., зав. эндоскопическим отделением 354-й Военный клинический госпиталь ЦВО, г. Екатеринбург, Россия;

Забков О.И., научный сотрудник лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;

Мосунов А.А., студент ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия; стажер лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;

Верховская М.Д., студент ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия; стажер лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;

Дукардт В.В., старший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;

Фомина Л.О., научный сотрудник лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия;

Костоломова Е.Г., к.б.н., доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Тюмень, Россия;

Останкова Ю.В., к.б.н., зав. лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Кудрявцев И.В., к.б.н., зав. лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Тотolian А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Dobrynina M.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Researcher, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Regional Branch of the RAS, Yekaterinburg, Russian Federation; Senior Researcher, Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Internal Medicine, Medical and Biological University of Innovation and Continuing Education, State Research Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan, Federal Medical and Biological Agency of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Safronova E.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Polyclinic Therapy and Clinical Pharmacology, Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation; Lecturer at the Department of Therapy, State Research Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Zurochka V.A., DSc (Medicine), Senior Researcher, Institute of Immunology and Physiology, Ural Regional Branch of the RAS, Yekaterinburg, Russian Federation; Senior Researcher, Biotechnology Laboratory, Russian-Chinese Center, South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation;

Zuikova A.A., Intern of the Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russian Federation;

Sarapultsev G.P., Head of Endoscopy Department, 354 Military Clinical Hospital of the Russian Ministry of Defense, Ekaterinburg, Russian Federation;

Zabkov O.I., Researcher, Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russian Federation;

Mosunov A.A., Student, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation; Intern of the Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russian Federation;

Verkhovskaya M.D., Student, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation; Intern of the Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russian Federation;

Ducardt V.V., Senior Researcher, Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russian Federation;

Fomina L.O., Researcher, Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russian Federation;

Kostolomova E.G., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Ostankova Yu.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of immunology and Virology HIV Infection, Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Head of the Cell Immunology Laboratory, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Totolian A.A., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.