

РОЛЬ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА В ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ КОРОНАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Филиппенко А.В., Труфанова А.А., Носков А.К.

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,

г. Ростов-на-Дону

Вирусы, относящиеся к семейству *Coronaviridae*, способны вызывать у человека в верхних и нижних дыхательных путях патологические процессы различной степени тяжести. Коронавирусы 229E, NL63, OC43, HKU1 являются причиной ОРВИ. Коронавирус SARS-CoV – этиологический агент атипичной пневмонии или тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС) или SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome), а MERS-CoV - ближневосточного острого респираторного синдрома (ОРДС) или MERS (Middle East Respiratory Syndrome). В 2019 г. идентифицирован и охарактеризован новый коронавирус nCoV-2019, позднее переименованный в SARS-CoV-2. Он явился причиной пандемии острого респираторного синдрома (COVID-19 – Corona Virus Disease 2019) [46; 66]

Данные, накопленные при исследовании пато-и иммуногенеза SARS-CoV и MERS-CoV, свидетельствуют о том, что создание эффективных лекарственных и профилактических средств невозможно без расшифровки различных иммунных механизмов и реакций между коронавирусами и клетками макроорганизма – от взаимодействия вирусных частиц с рецепторами до формирования специфического иммунитета.

Потребность в разработке тестов для диагностики и оценки иммунной прослойки населения обусловили многочисленные исследования гуморального иммунного ответа к новым коронавирусам. Однако, результаты, полученные при изучении возбудителей MERS и SARS, доказывают, что наличие антител не является гарантом формирования стойкого протективного иммунитета [7], а важную роль играет клеточный иммунный ответ на эти коронавирусы [8;76]. Исследования, которые проводились учеными во всем мире в течение текущей пандемии, демонстрируют, что у больных COVID-19 регистрируется как В- клеточный, так и

T- клеточный иммунитет [24; 47; 54; 77]. Кроме того, выявленная у возбудителей MERS, SARS и COVID-19 высокая степень гомологии белков S, М, Е и N, являющихся антигенными эпитопами, способными индуцировать иммунный ответ, свидетельствует о возможности формирования перекрестного иммунитета к коронавирусам [71]. В связи с вышеизложенным, обобщение полученных в течение предыдущих эпидемий сведений о механизмах формирования адаптивного иммунитета к коронавирусам, может быть полезным для совершенствования стратегии лечения и профилактики в условиях текущей пандемии.

Как и другие патогены, коронавирусы активируют в организме врожденную систему иммунитета.

Проникновение в цитоплазму клеток хозяев у коронавирусов начинается со связывания S-белка с рецепторами этих клеток [33; 80]. Для SARS-CoV и SARS-CoV-2 доминирующим рецептором хозяина является ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) [31; 38; 48]. Причем ACE2 имеет более высокое сродство к SARS-CoV-2, чем к SARS-CoV [67]. Для SARS-CoV ко-рецепторами служат также DC-SIGN (CD209) и L-SIGN (CD209L) [11; 27]. Кроме того, показано, что инвазия SARS-CoV-2 может осуществляться с помощью CD147 [60;63;68]. Для MERS-CoV клеточным рецептором является дипептидилпептидаза 4 (DPP4, CD26) [42].

На стадии адсорбции на клеточной мембране вирус идентифицирует Toll-подобные рецепторы (TLR) 3, 7 и 8, а позднее - на стадии репликации вирусного генома - цитозольные рецепторы RIG-I и MDA5 из семейства RIG-подобных рецепторов (RLR). В результате активации этих рецепторов индуцируется выработка интерферонов (IFN) I и III типов, а также провоспалительных цитокинов [2; 55]. Однако SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 способны подавлять раннюю продукцию IFN, что является как механизмом уклонения от иммунной системы, так и одним из важных факторов вирулентности [2; 41; 58;]. Позднее высвобождение IFN I типа вызывает массивную секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов [23; 53; 80], миграцию макрофагов, нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов из кровотока в очаг инфекции. Гиперпродукция цитокинов приводит к

гиперактивации иммунных клеток и усилению патологического процесса в нижних дыхательных путях [3; 10; 61].

Далее в организме запускаются механизмы специфической иммунной защиты. Со своей стороны, коронавирусы способны подавлять формирование адаптивного иммунного ответа еще на стадии его индукции. Например, белок nsr6 SARS-CoV ингибирует слияние аутофагосом с лизосомами [2; 15], что препятствует представлению вирусных антигенов дендритными клетками в комплексе с молекулами МНС II класса. Ранее показано, что из-за генетического полиморфизма системы HLA, некоторые гаплотипы восприимчивы, а некоторые защищены от возбудителя атипичной пневмонии [34; 64]. Также обнаружена уязвимость HLA-DRB1*11 и HLA-DQB1*02 к возбудителю MERS [29]. У пациентов с COVID-19 описана способность блокировать экспрессию HLA-DR на CD14⁺ моноцитах, что может являться одной из причин нарастания гипервоспалительных состояний [25; 55].

При анализе антигенов, представляемых комплексом МНС Т-Лф, установлено, что у пациентов с атипичной пневмонией Т-клетки могут быть стимулированы четырнадцатью белками, но основную роль играет S-белок [65]. Показано, что только он активировал CD8⁺Т-Лф [32]. У больных с ближневосточным респираторным синдромом ответ цитотоксических Лф был направлен против S и N-белков и некоторых эпитопов М - и Е-белков [76]. У выздоравливающих пациентов с COVID-19 обнаружены CD4⁺Т-клетки, специфичные S, М и N-белкам возбудителя [20, 45]. Иммуногенные эпитопы этих белков активировали CD8⁺Т-Лф [26]. Интересно, что подобный Т-клеточный ответ был выявлен не только у выздоровевших пациентов, но также присутствовал у 40-60% лиц, не инфицированных SARS-CoV-2, что свидетельствует о наличии у них перекрестно-реактивных CD4⁺Т-клеток, которые сформировались в ответ на какую-то предыдущую коронавирусную инфекцию и могли, возможно, обеспечить защитный иммунитет против SARS-CoV-2 [55].

О важности специфического Т-клеточного иммунного ответа при инфекциях, вызванных коронавирусами, свидетельствуют данные, полученные в результате

экспериментальных [16] и клинических исследований [17] во время изучения патогенов и иммуногенеза MERS-CoV и SARS-CoV. Выявлено, что эти коронавирусы выработали механизмы, позволяющие им влиять на количество и функциональную активность эффекторов клеточного иммунитета - лимфоцитов. Они способны вызывать нарушение лимфопоэза, индукцию апоптоза, приводящую к более длительному течению заболевания и увеличению вирусной нагрузки [71], адгезию лимфоцитов к эндотелию сосудов и снижению их циркуляции в сосудистом русле [52].

Т. Li et al. (2004) обнаружили резкое уменьшение субпопуляций Т-клеток периферической крови у пациентов с SARS в острой фазе заболевания при неизменном содержании лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов. В процессе реконвалесценции нарушенные показатели восстанавливались [37]. Показано, что острая фаза атипичной пневмонии у людей сопровождалась резким снижением $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток и выраженной лейкопенией у 80% пациентов [28]. Причем количество $CD8^+$ Т-Лф нормализовалось через 2-3 месяца, $CD4^+$ Т-клеток памяти - через год после начала заболевания, а число $CD3^+$ и $CD4^+$ Т-Лф оставалось достоверно ниже, чем у здоровых из контрольной группы [39].

Лимфоцитопения также наблюдалась у пациентов с MERS, хотя и в меньшей степени, чем у заболевших атипичной пневмонией [28]. Было выявлено, что в инфицированных MERS-CoV Т-клетках под влиянием белка Е наружной мембраны возбудителя происходит активация апоптоза, ингибция эффекторной стадии Т-клеточного ответа [53, 70].

Выраженная лимфоцитопения и подавление клеточного иммунного ответа регистрировались при тяжелом и среднетяжелом течении COVID-19. Также у заболевших отмечались нейтрофилия (74,3%) и тромбоцитопения (24,3%) [53]. Развитие лимфоцитопении у тяжелых пациентов, особенно в течение первой недели заболевания, было связано со снижением абсолютного количества $CD4^+$ и, особенно, $CD8^+$ Т-Лф [43, 55, 62, 72] и, в меньшей степени, В-Лф и естественных киллеров. Минимальные уровни $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток наблюдались на 4-6 день после начала заболевания. При благоприятном исходе количество Т-Лф восстанавливалось

до таковых у пациентов с легким течением болезни [40]. С. Qin et al. (2020) получены данные, свидетельствующие об уменьшении у больных COVID-19 хелперных и супрессорных Т-Лф, а также Т-клеток памяти [50]. У многих заболевших были зарегистрированы нарушение баланса $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-Лф [56], снижение способности продуцировать TNF- α и IFN- γ [43].

Описан вызываемый SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 феномен лимфоцитарного «истощения» у инфицированных [5, 51], обусловленный как прямой атакой коронавирусов на лимфоциты, так и индукцией апоптоза этих клеток [13, 49, 72].

Течение SARS сопровождается «истощением» $CD4^+$ Т-клеток, снижением количества $CD8^+$ Лф и нарушением ими продукции IFN- γ , а также, в конечном итоге, синтеза нейтрализующих антител [11, 12, 53, 73]. При экспериментальном изучении MERS получены доказательства того, что «истощение» $CD8^+$ Т-Лф ухудшает клиническую картину заболевания, но не влияет на титр противовирусных антител [14]. SARS-CoV-2 способен подавлять иммунный ответ, вызывая «истощение» $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$ -Лф и NK-клеток [18, 55]. М. Zheng et al. (2020) показано, что усиление экспрессии NKG2A на NK-клетках и $CD8^+$ Т-клетках у пациентов с тяжелым течением COVID-19 приводило к снижению их функциональной активности. Сделан вывод о том, что экспрессия NKG2A коррелирует с «истощением» эффекторных лимфоцитов на ранней стадии заболевания, усугубляя его течение [78].

У пациентов с тяжелым течением атипичной пневмонии выявлялось снижение активации Т-клеток [6, 30]. Тогда как у больных COVID-19 в некоторых случаях наблюдалась их гиперактивация [35], проявляющаяся увеличением числа Th17, высокой цитотоксичностью $CD8^+$ Т-Лф и избыточным иммунным ответом на SARS-CoV-2 [72].

При экспериментальной атипичной пневмонии выявлено, что специфичные $CD4^+$ Т-Лф, локализованные в дыхательных путях, имеют решающее значение для защиты от SARS, обеспечивая у животных иммунный ответ в ранние и поздние сроки после заражения, в том числе и через продукцию IFN- γ [75]. Специфичные

CD4⁺T-клетки продуцируют также TNF-α и IL-2, что характеризует Th1-клеточный ответ и свидетельствует о формировании клеточного иммунитета [12, 32]. Иммунизация мышей дендритными клетками, несущими пептиды штамма SARS-CoV, адаптированного для этих животных, вызвала увеличение числа специфических CD4⁺ и CD8⁺T-клеток, которые накапливались в легких и способствовали увеличению выживаемости. Также на мышинной модели показано, что интраназальное введение CD4⁺T-Лф памяти обеспечивало защиту от этого коронавируса. Повторное применение CD4⁺T-клеток памяти стимулировало выработку IFN-γ и активизацию специфических CD8⁺T-Лф, обеспечивающих элиминацию возбудителя атипичной пневмонии [8, 9].

При MERS T-клетки также выполняют главную защитную функцию. Так, экспериментально доказано, что у животных, лишенных T-Лф, наблюдается длительная персистенция возбудителя [74]. Показана решающая роль в элиминации MERS-CoV специфичных CD8⁺T-Лф как во время первичной, так и во время вторичной инфекции.

Анализ данных пациентов с COVID-19 показал, что у заболевших количество и функциональная активность CD8⁺T-Лф были выше по сравнению с CD4⁺T-клетками [36]. При тяжелых случаях заболевания отмечена высокая продукция IFN-γ, TNF-α, IL-2 специфическими CD4⁺T-Лф, а CD8⁺T-клетками - IFN-γ, TNF-α. У умерших пациентов было диагностировано большое количество IL-4, IL-5, IL-10, характерных для Th2-клеточного иммунного ответа [52]. Экспериментальные данные, полученные S. Elizaldi et al. (2020), свидетельствуют о накоплении на 7-е сутки в крови, легких и лимфатических узлах макак-резусов Th1 и Th17 лимфоцитов. SARS-CoV-2-специфические CD4⁺T-клетки обнаруживались также в периферической крови выздоровевших пациентов [20].

После элиминации вируса большая часть эффекторных T-клеток подвергается апоптозу. Остальные образуют пул T-клеток памяти. При повторном заражении CD4⁺T-Лф памяти активируют B-Лф и другие иммунокомпетентные клетки, в то время как цитотоксические T-Лф памяти участвуют в уничтожении инфицированных клеток [55].

J. Zhao et al. (2016) показали, что CD4⁺T-клетки памяти дыхательных путей препятствовали заражению SARS-CoV и MERS-CoV [75]. R. Channappanavar et al. (2014) показана способность специфичных CD8⁺T-клеток памяти защищать мышей от возбудителя SARS в отсутствие CD4⁺T-Лф или В-клеток, хотя наличие специфичных для SARS-CoV CD4⁺T-клеток и антител способствует наиболее полноценной защите [9].

У пациентов, переболевших SARS, CD4⁺- и CD8⁺T-клетки памяти регистрировались от нескольких месяцев до нескольких лет [22]. Так, CD4⁺T-Лф выявлялись у выздоровевших от 4 до 6 лет [57, 69], а специфические CD8⁺T-Лф - через 6 [9] и даже через 11 лет после заболевания [44]. Продолжительность сохранения Т-клеток памяти коррелировала с тяжестью перенесенной инфекции [57]. Следует отметить, что специфические для SARS-CoV IgM и IgA обнаруживались около 6 месяцев, а IgG в течение одного года, это свидетельствует о недостаточной роли В-клеточного звена иммунитета в обеспечении длительной протективной защиты от этой инфекции [10, 21].

У выздоровевших после инфицирования MERS-CoV Т-клетки памяти сохранялись до 2 лет, в том числе у пациентов с низким титром антител, что позволяет говорить о важной роли клеточного иммунного ответа в обеспечении иммунитета к данному возбудителю [76]. Тем более, что специфические для MERS антитела не выявляются или регистрируются кратковременно у пациентов с легкой и бессимптомной формой инфекции [4, 19].

При легком течении COVID-19 также наблюдается активация Т-клеточного звена иммунитета, образование популяции Т-клеток памяти на фоне низкой продукции антител [24, 59]. У большинства пациентов при тяжелом и длительном заболевании вырабатываются и антитела, и Т-клеточный ответ, причем величина этих двух факторов часто коррелирует с тяжестью инфекции [45]. Достаточен ли ответ Т-клеток памяти для защиты от реинфекции COVID-19, нуждается в дальнейшем изучении [52]. В недавних сообщениях показано, что наряду со снижением регуляторных популяций Т-Лф низкое количество Т-клеток памяти

может усугублять воспалительную реакцию, приводящую к цитокиновому шторму, и, следовательно, повреждению тканей и органной недостаточности [50, 55].

Таким образом, коронавирусы запускают в макроорганизме формирование адаптивного иммунитета по гуморальному и клеточному типу. Причем, синтез специфических иммуноглобулинов еще не свидетельствует о наличии стойкого протективного иммунитета. Полученные во время прошлых эпидемий и в ходе текущей пандемии сведения доказывают не менее важную роль клеточного иммунного ответа на эти коронавирусы [10, 24, 47, 54, 76]. Число серологически подтвержденных случаев новой коронавирусной инфекции говорит о том, что фактическая заболеваемость значительно выше, и определение только продукции специфических иммуноглобулинов при коронавирусных инфекциях не может служить надежным маркером, отражающим всю полноту формирования адаптивного иммунного ответа [1]. В настоящее время существует настоятельная необходимость в разработке информативных тестов для изучения Т-клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2. Расшифровка механизмов CD4⁺ и CD8⁺Т-клеточных реакций, определение белков и эпитопов, распознаваемых Т-лимфоцитами человека, позволит осуществлять мониторинг иммунных реакций при COVID-19, определять их роль в пато-и иммуногенезе возбудителя, в том числе и у разных возрастных категорий пациентов. Кроме того, полученные данные будут полезны как при создании новых вакцинных препаратов, так и при оценке их иммуногенности.