

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии  
и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

КОЛЕСНИК СВЕТЛАНА ВЛАДИМИРОВНА

**ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА  
У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 И ФОРМИРОВАНИЕ ИММУНИТЕТА  
У ВАКЦИНИРОВАННЫХ «ГАМ-КОВИД-ВАК»**

3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки)

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
Кудлай Дмитрий Анатольевич  
доктор медицинских наук,  
член-корреспондент РАН

Москва, 2025

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	18
1.1. Современное состояние исследований врожденного иммунитета при контакте с вирусом SARS-CoV-2 .....	18
1.2. Современное состояние исследований приобретенного иммунитета при контакте с вирусом SARS-CoV-2 и вакцинации.....	28
1.3. Особенности иммунного ответа у переболевших COVID-19 и вакцинированных «Гам-Ковид-Вак».....	31
1.4. Существующие лабораторные методы оценки клеточного и гуморального иммунного ответа, их возможности и ограничения .....	33
1.5. Современные экспериментальные подходы к исследованию иммунного ответа в моделях <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> .....	36
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	41
2.1. Дизайн исследования .....	41
2.2. Методы изучения гуморального иммунного ответа .....	50
2.3. Методы изучения клеточного иммунного ответа.....	50
2.4. Методы изучения цитокинов в эксперименте.....	53
2.5. Методы математико-статистической обработки результатов.....	54
<b>ГЛАВА 3. ДЕМОГРАФИЧЕСКИЕ И КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ УЧАСТНИКОВ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> ..	57
<b>ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 И У ВАКЦИНИРОВАННЫХ «ГАМ-КОВИД-ВАК»</b> .....	66
4.1. Особенности Т-клеточного иммунного ответа .....	66
4.2. Особенности гуморального иммунного ответа .....	76
<b>ГЛАВА 5. СОПОСТАВЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-</b>	

<b>19 И У ВАКЦИНИРОВАННЫХ «ГАМ-КОВИД-ВАК» В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ПАНДЕМИИ .....</b>	<b>82</b>
<b>    ГЛАВА 6. РЕЗУЛЬТАТЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЦИТОКИНОВОГО ОТВЕТА НА БЕЛКИ SARS-COV-2 В ЭКСПЕРИМЕНТЕ .....</b>	<b>91</b>
<b>    ГЛАВА 7. БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА И ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 И ВАКЦИНИРОВАННЫХ «ГАМ-КОВИД-ВАК».....</b>	<b>96</b>
<b>    ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>105</b>
<b>    ВЫВОДЫ.....</b>	<b>115</b>
<b>    ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>117</b>
<b>    ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ ...</b>	<b>118</b>
<b>    СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>120</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Эпидемическая вспышка новой коронавирусной инфекции COVID-19 (Corona Virus Disease 2019) в городе Ухань (Китай), вызванная вирусом SARS-CoV-2, зафиксированная в декабре 2019 г., стала началом распространения вируса в течение года по всему миру [1, 2]. Возникла глобальная пандемия с тяжелыми проявлениями респираторной инфекции, высоким индексом контагиозности, летальностью 1-5 % и множеством ранних и отдаленных последствий для переболевших людей, здравоохранения, социальной сферы и экономики практически всех государств земного шара [3-7]. Фундаментальные и клинические исследования патогенеза COVID-19, а особенно иммунных реакций организма на вирус SARS-CoV-2, выполненные за период 2020 -2024 годов, выявили ряд специфических патофизиологических особенностей этого заболевания [8-10]. Большой интерес исследователей вызван своеобразием иммунологического ответа на COVID-19 с точки зрения фундаментальной медицины. При этом внимание к данной теме обусловлено и практической ценностью с точки зрения прогноза, диагностической оценки иммунного ответа, патогенетического подбора терапии и профилактики COVID-19 [8]. Для актуализации темы работы значимо и то, что иммунизация сыграла первостепенную роль в подавлении пандемии и резком снижении заболеваемости и тяжести проявления болезни.

Защитные реакции организма при инфицировании SARS-CoV-2 связаны с активацией врожденного и приобретенного иммунитета, однако при COVID-19 иммунный ответ может быть несбалансированным, что определяет различия его клинических проявлений и коррелирует со степенью тяжести инфекционного процесса. Это связано в первую очередь с недостаточной или запоздалой выработкой IFN, что приводит к развитию респираторного дистресс-синдрома и тяжелому нарушению функции легких с развитием ТОРС. Часто при COVID-19 выявляется дефицит или дисбаланс CD4+, CD8+ Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов,

NK-клеток и моноцитов, что отражено в специфике клеточных иммунных реакций и синтеза вируснейтрализующих антител [8]. При этом интерес вызывает и сравнение естественного и поствакцинального гуморального и клеточного иммунитета, особенно при иммунизации наиболее распространенной в России и эффективной комбинированной векторной вакциной «Гам-Ковид-Вак» ("Спутник V"), разработанной в Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи [11-15], что побудило нас к выполнению данной работы.

**Степень разработанности научной темы исследования.** SARS-CoV-2 вызывает активацию как врожденного, так и приобретенного иммунного ответа [8]. Врожденный иммунный ответ является первой линией иммунологической борьбы с SARS-CoV-2, и главную роль в противовирусной защите играют интерфероны [16]. Обычно IFN-I индуцирует апоптоз зараженных клеток, чтоб ограничить репликацию вируса. Однако SARS-CoV-2 изменяет экспрессию структурного гена *ORF6* и подавляет выработку IFN-I типа, ослабляя противовирусную защиту, что ассоциировано с тяжестью клинических проявлений заболевания [17-19]. Вследствие дефектного ответа IFN-I типа отмечается повышение концентрации других цитокинов и хемокинов, что связано с развитием цитокинового шторма – признака тяжелой формы COVID-19 [20].

Приобретенный (адаптивный) иммунный ответ является второй линией борьбы с SARS-CoV-2, что обеспечивается взаимодействием В- и Т-лимфоцитов, разрушением инфицированных клеток и элиминацией вирусных частиц. Влияние вируса SARS-CoV-2 через ACE2 рецептор, локализованный на В- и Т-клетках, вызывает лимфопению при тяжелых формах COVID-19. Причины возникновения лимфопении разнообразны: апоптоз, пироптоз, аутофагия лимфоцитов, супрессия тимуса, повреждение костного мозга; эти явления зафиксированы морфологическими методами в лимфоидных органах [21, 22]. Лимфопения может вызывать общую иммуносупрессию или способствовать цитокиновому шторму, оба фактора играют важную роль в вирусной персистенции, вирусной репликации [21, 22]. Наиболее важную роль в патогенезе и иммуногенезе COVID-19 играют

Т-лимфоциты. В инфильтратах интерстициальной ткани легких CD8+ Т-лимфоциты составляют до 75% среди всех клеток. Но при дисбалансе иммунных реакций, гиперовоспалении, недостатке IFN-I Т-клеточный иммунитет неэффективен. CD4+ Т-клетки являются вирус-специфическими Т-лимфоцитами, синтезирующими цитокины IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF, активирующими все звенья второй линии иммунной защиты, в том числе и гуморальный иммунный ответ, поэтому сильный Т-клеточный ответ коррелирует с высокими титрами нейтрализующих вирусы антител [18].

В опытах *in vitro* изучение клеточного иммунитета доступно при исследовании продукции IFN- $\gamma$  (например, в супернатанте культуры лимфоцитов) в ответ на стимуляцию антигеном вируса. Такая стимуляция специфична для активированных клеток иммунной системы: Т-хелперов 1 типа, цитотоксических лимфоцитов, натуральных киллеров (NK) и антиген-презентирующих клеток. Чаще используют методику ELISPOT. Из-за технических сложностей и ограниченных возможностей лабораторной диагностики изучение Т-клеток представляет собой достаточно трудную задачу, в литературе представлено не так много исследований данного звена адаптивного иммунитета. Т-клетки имеют критическое значение для генерации как эффективного гуморального, так и клеточного иммунного ответов.

При этом есть множество исследований вариативности иммуногенеза при COVID-19 в зависимости от наследственных факторов пациентов и генома вируса. В литературе представлены данные о том, что Т-клеточный иммунный ответ на разные штаммы коронавируса может быть разным [22]. Ученые оценили эффективность Т-клеточного иммунного ответа на 11 разных штаммах SARS-CoV-2 и создали онлайн-источник (T-cell COVID-19 Atlas (T-CoV) [23-25], позволяющий отслеживать влияние мутаций на взаимодействия коронавируса нового типа с белками HLA – ключевой частью приобретенного иммунитета.

Иммунный ответ и его динамика определяют иммунопатогенез COVID-19. Инфильтрация легочной ткани клетками врожденной и адаптивной иммунной системы сопровождается усилением воспаления и значительным увеличением

продукции IFN- $\gamma$  Т-лимфоцитами [20, 26]. В иммунопатогенезе COVID-19 можно выделить две фазы. В первой фазе вирус напрямую поражает клетки-мишени, приводящие к дисфункциям иммунной системы и последующему повреждению органов и систем макроорганизма. А во второй фазе размножение вируса, вызывающее местные воспалительные процессы с последующим развитием инфекции, приводит к повреждению тканей легких и исходам этого процесса [27].

Существующие вакцины против COVID-19 вызывают устойчивый Т-клеточный иммунный ответ, который способствует снижению частоты случаев госпитализации или смерти, а предлагаемые новые или гетерологичные схемы вакцинации представляют собой потенциал для дальнейшего усиления клеточного ответа. Т-клеточный иммунитет играет центральную роль в контроле над SARS-CoV-2, и его важность до сих пор была относительно недооценена [28, 29].

Т-клеточный иммунный ответ и его патогенетические механизмы при COVID-19 охарактеризованы далеко не полностью, поэтому необходимо их дальнейшее изучение для лучшего понимания иммунного ответа против вируса и особенностей формирования долгосрочного иммунитета, который обеспечивают вирус специфические Т-клетки. Кроме того, важно изучить роль вакцинации в запуске специфических Т-клеточных ответов против вируса, что поможет определить надежность и длительность защиты. Поэтому исследование Т-клеточного иммунного ответа у лиц, переболевших COVID-19 и лиц, вакцинированных «Гам-Ковид-Вак», является актуальной задачей.

**Связь работы с научными программами, планами, темами.** Работа является фрагментом НИР № 121090100039-0 «Исследование функциональных характеристик экспериментального образца набора реагентов «ТиграТест SARS-CoV-2» для *in vitro* определения Т-клеточного иммунного ответа на инфекцию COVID-19» Федерального государственного бюджетного учреждения «Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» (ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова») Минздрава России, где диссертант работала в должности

научного сотрудника. Работа позволила решить задачи 1 и 2 данной НИР: провести количественную оценку Т-клеточного иммунного ответа на стимуляцию антигенами вируса SARS-CoV-2 в образцах крови групп субъектов с различной напряженностью Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2; провести оценку гуморального ответа на основании уровня антител к SARS-CoV-2. При помощи «ТиграТест SARS-CoV-2» проводили клинические исследования эффективности вакцинации «Гам-Ковид-Вак» [30].

**Цель исследования** – изучить патофизиологические особенности иммунного ответа у переболевших COVID-19 и формирование иммунитета у вакцинированных «Гам-Ковид-Вак» путем оценки Т-клеточного и гуморального иммунитета методом ELISPOT и ИФА, а также путём экспериментального моделирования цитокинового ответа на разные белки SARS-CoV-2.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать демографические и клиничко-anamнестические данные участников исследования.
2. Провести оценку Т-клеточного иммунного ответа путем определения IFN- $\gamma$ -секретирующих Т-клеток в ответ на стимуляцию антигенами вируса SARS-CoV-2 методом ELISPOT у переболевших COVID-19 и у вакцинированных «Гам-Ковид-Вак».
3. Изучить параметры гуморального иммунного ответа путём измерения уровня антител класса IgG к SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19 и у вакцинированных «Гам-Ковид-Вак».
4. Оценить зависимость степени выраженности Т-клеточного и гуморального иммунного ответа от степени тяжести перенесенного заболевания.
5. Сопоставить показатели клеточного и гуморального иммунного ответа у переболевших COVID-19 в разные периоды пандемии.
6. Определить способность мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) вырабатывать цитокины у переболевших COVID-19 и у вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», а также в группе контроля при

специфической и неспецифической стимуляции антигенами SARS-CoV-2 в эксперименте.

7. Провести биоинформационный анализ с кластеризацией субъектов по показателям клеточного и гуморального иммунитета субъектов и их цитокинового профиля, у переболевших COVID-19 и у вакцинированных «Гам-Ковид-Вак».

**Научная новизна исследования.** В работе проведено комплексное исследование патофизиологических особенностей Т-клеточного иммунного ответа у переболевших COVID-19 и формирования иммунитета у вакцинированных «Гам-Ковид-Вак» при помощи: оценки Т-клеточного иммунного ответа методом ELISPOT и гуморального иммунного ответа путем определения уровня антител к SARS-CoV-2 с впервые примененным биоинформационным анализом полученных данных; впервые проведенного экспериментального моделирования цитокинового ответа на различные белки SARS-CoV-2 в среде культивирования МНПК; оценки площади пятен (спотов) впервые при работе методом ELISPOT.

Впервые установлено, что при наличии В-клеточного (гуморального) иммунного ответа у 90% и более инфицированных и вакцинированных, наличие Т-клеточного иммунного ответа выявлено у 70% переболевших и 50% вакцинированных. Рекомбинантный механизм появления специфических антиген-распознающих рецепторов наивных Т- и В-лимфоцитов приводит к разной силе клеточного и гуморального противовирусного иммунитета, возникающего после инфицирования вирусом SARS-CoV-2 или вакцинации «Гам-Ковид-Вак». Особенности клеточного и гуморального компонентов иммунного ответа в сенсibiliзируемом организме определяются презентацией всех антигенов полноценным вирусом SARS-CoV-2 и только антигенов S-белка вакциной «Гам-Ковид-Вак». Причиной обнаружения у вакцинированных субъектов значимого Т-клеточного ответа на антигены, не относящиеся к S-белку, является невыявленное инфицирование.

Впервые установлено, что, несмотря на такие общие реакции иммунной системы у вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак» и переболевших COVID-19, как формирование одновременно клеточного и гуморального иммунного ответа, существует и ключевое различие. При формировании гуморального иммунного ответа у переболевших имеет место превышение уровня антител как к S-белку, так и к N-белку, а у вакцинированных ведущую роль играет RBD-домен S-белка. А при формировании клеточного иммунного ответа к SARS-CoV-2 при оценке методом ELISPOT в группе переболевших медиана количества спотов выше только в ПАГ 2 (белки N, M, Orf7a, Orf3a), а у вакцинированных лиц Т-клеточный иммунитет вырабатывается преимущественно в ПАГ 1 (пептиды S-белка).

Впервые установлено, что формирование Т-клеточного иммунитета после перенесенного заболевания более эффективно, чем после вакцинации: в ответ на «Гам-КОВИД-Вак» Т-клеточный иммунитет к SARS-CoV-2 сохраняется более 6 месяцев лишь у 50% пациентов, а после перенесенного заболевания COVID-19 даже через 19 месяцев он сохраняется у 70% переболевших.

Впервые выявлено, что повышенное продуцирование IFN- $\gamma$  отдельными Т-клетками, сенсibilизированными вирусными антигенами, в случае стимуляции продукции цитокинов антигенными пептидами *in vitro*, не сопровождается ростом содержания этого и других цитокинов в среде культивирования, в отличие от неспецифической поликлональной стимуляции. Одновременно с ростом продукции цитокинов Т-лимфоцитами, отвечающими на стимуляцию, в не меньшей степени увеличивается их способность к утилизации цитокинов. В результате при специфическом иммунном ответе есть механизмы для обеспечения управляемого уровня цитокинов и недопущения развития «цитокинового шторма».

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Оценка Т-клеточного иммунного ответа путем определения IFN- $\gamma$ -секретирующих Т-клеток в ответ на стимуляцию антигенами вируса SARS-CoV-2 методом ELISPOT, а также исследование уровня специфических антител класса IgG к S- и N-белкам SARS-CoV-2 позволили охарактеризовать патогенетические особенности

иммунного ответа у переболевших COVID-19 и у вакцинированных «Гам-Ковид-Вак».

Выполнена оценка зависимости степени выраженности Т-клеточного и гуморального иммунного ответа от степени тяжести перенесенного заболевания, а также оценка разницы в специфичности ответа периферических мононуклеаров на стимуляцию S-N-M и структурными антигенами вируса SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19 и вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак».

Результаты исследования вносят вклад в изучение патогенеза COVID-19 и длительности Т-клеточного и гуморального иммунного ответа в ответ на инфекцию и вакцинацию.

Полученные нами результаты указывают на высокую степень обоснованности и достоверности применения метода ELISPOT в области инфекционной серологии.

*Объект исследования* – особенности иммунных реакций при вирусных инфекциях и вакцинации компонентами вирусных антигенов.

*Предмет исследования* – показатели клеточного и гуморального иммунитета, а также цитокинового профиля у переболевших COVID-19 и вакцинированных «Гам-Ковид-Вак».

**Материал и методы исследования.** Работа имеет клиничко-экспериментальный характер.

*В клиническом исследовании* приняли участие лица (n=205) возраста 18-60 лет с отсутствием сопутствующих заболеваний и состояний, связанных с нарушениями иммунитета, не принимающих иммуномодулирующие препараты, ПЦР-негативные в отношении COVID-19 в момент исследования и давшие согласие на него.

Выполнено два этапа работы с оценкой Т-клеточного иммунного ответа и содержания антител у переболевших, вакцинированных и лиц без инфекционного и вакцинального анамнеза COVID-19: 1) проспективное одномоментное обсервационное исследование (n=103) в 2020 году; 2) проспективное одномоментное обсервационное исследование (n=102) в 2021 году. Оба этапа

имели схожий дизайн, отличались лишь датами выполнения работ, и, вероятно, преобладающими патогенными штаммами вируса в эти периоды пандемии [23], а также формированием контрольных групп.

В каждом из этапов проанализирована база данных об исследуемых (перенесших COVID-19, вакцинированных от COVID-19, не вакцинированных от COVID-19 с отрицательным катамнезом выявления SARS-CoV-2 методом ПЦР). Материалом исследования явились образцы венозной крови.

Для оценки гуморального и клеточного иммунитета у указанных групп лиц применены лабораторные методы:

1. Определение содержания антител класса IgG к белкам SARS-CoV-2 в сыворотке крови наборами реагентов: «Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG» антитела к S1-домену белка, полуколичественное определение методом ИФА («Euroimmun», Германия); «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» методом твердофазного ИФА (АО «Вектор-Бест», Россия); к рецептор-связывающему домену (RBD) S белка «SARS CoV 2 IgG ИФА» (ООО «ХЕМА», Россия).

2. Исследование Т-клеточного иммунного ответа методом ELISPOT из образцов периферической венозной крови с использованием набора ТиграТест® SARS-CoV-2 (ООО «Генериум», Россия).

*Также проведен эксперимент* определения содержания цитокинов в среде культивирования МНПК при специфической и неспецифической их стимуляции антигенами SARS-CoV-2 у тех же трех категорий обследуемых (n=37). Материалом были образцы культуральной среды МНПК, полученные в ходе оценки Т-клеточного иммунного ответа. Концентрацию цитокинов определяли мультиплексным методом с использованием 17-плексной панели Bio Plex Pro Human Cytokine 17-plex Assay («Bio Rad», США) и проточного лазерного флуориметра Bio Plex 200 (Bio Rad, США). Определяли цитокины групп Th1 (IL 1 $\beta$ , IL 2, IL 6, IL 12, IL 17, IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL 4, IL 5, IL 10, IL 13, TNF  $\alpha$ ), хемокинов (IL 8, MCP 1, MIP 1 $\beta$ ) и ростовых факторов (IL 7, G CSF, GM CSF). Результаты анализировали приложением Bio Plex Manager 6,0 Properties (Bio Rad, США).

Для оценки количественных показателей выполнена *статистическая обработка результатов*. Определение достоверности различий между группами и ROC (receiver operating characteristic) анализ выполнены с использованием программ GraphPad Prizm 6, Microsoft Office Excel 2007, MedCalc® Software версия 14.8.1. Для оценки различий между группами по количественным параметрам использовали непараметрические критерии. Биоинформационный анализ проводили с использованием пакета программ WOLFRAM MATHEMATICA 13.0. Кластеризацию выполняли по алгоритму KMedoids. Указанный пакет программ использовали для расчёта рангового коэффициента корреляции Спирмена и построения тепловых диаграмм. Оценку распределения субъектов и показателей по кластерам выполняли посредством анализа таблиц сопряжённости (критерий  $\chi^2$  и коэффициент сопряжённости (CC) Пирсона) и частот (z-критерий) с использованием пакета программ MedCalc.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Характер, выраженность и сбалансированность иммунного ответа у лиц, переболевших COVID-19 и вакцинированных от COVID-19 имеет различия, заключающиеся в преобладании в иммунном ответе - Т- или В-звена, а также в изменении цитокинпродуцирующей способности МНПК.

2. Показатели иммунного ответа у пациентов с COVID-19 могут служить одним из критериев степени тяжести заболевания.

3. Новым объективным методом изучения количественных и функциональных характеристик Т-клеточного звена иммунной системы при COVID-19 является метод ELISPOT с использованием пептидов разных белков вируса SARS-CoV-2.

**Специальность, которой соответствует диссертационная работа.** Работа соответствует паспорту научной специальности 3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки), направлениям 2, 7 и 8 паспорта: 2. Изучение механизмов развития заболеваний, типовых патологических процессов и реакций организма на воздействие патогенных факторов, в том числе механизмов формирования патологических систем и нарушений информационного процесса,

обуславливающих развитие заболеваний. 7. Изучение реактивности и резистентности организма, комплекса его видовых, этнических, половых, возрастных, конституциональных, генетических и других индивидуальных особенностей, определяющих характер его реагирования на действие внешних патогенных факторов. 8. Изучение защитных, компенсаторных и приспособительных реакций организма, развивающихся в ответ на действие повреждающих факторов различной природы и при развитии патологических процессов.

**Степень достоверности полученных результатов.** Работа выполнена в лаборатории молекулярной диагностики Дирекции фармацевтического анализа Акционерного общества «Генериум» и в лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова». Условия лабораторий обеспечили соблюдение требований к стандартизации исследований и модельного эксперимента. Обе лаборатории имеют СЭЗ (санитарно-эпидемиологическое заключение) Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзора) на возможность осуществления деятельности в области использования возбудителей инфекционных заболеваний 3-4 группы патогенности (опасности). ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России имеет также Лицензию Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения (Росздравнадзора) регистрационный номер №ФС-99-01-009598 от 13.12.2018г. на осуществление медицинской деятельности в области клинической лабораторной диагностики. СЭЗ и Лицензия подразумевают соблюдение требований к помещениям, оборудованию и его техническому состоянию, подтвержденному метрологической поверкой и аттестацией, к соблюдению стандартных операционных процедур на преаналитическом и аналитическом этапах, требованиям к используемым реагентам с соответствующими рекомендованными протоколами работ, что обеспечивает достоверность полученных данных и качество исследований.

О достоверности полученных результатов и обоснованности заключений и выводов свидетельствует достаточный объём исследований в клинической и

экспериментальной части, использование современных серологических и молекулярно-биологических методов исследований со статистическим и биоинформационным анализом полученных количественных показателей.

**Апробация результатов.** Результаты исследования по теме работы представлены и обсуждены автором диссертации на: 13-ом Национальном конгрессе с международным участием «Экология и здоровье человека на Севере» 14 ноября 2022 г. в г. Якутск (Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова МЗ Республики Саха); научно-практической конференции «Лабораторные службы в кардиологической практике. Настоящее и будущее» 3 марта 2023 г. в г. Москва (ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского); 9-ом Международном Конгрессе по Патологической физиологии (9th International Congress of Pathophysiology) и 5-ом Конгрессе Физиологических наук Сербии с международным участием (5th Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation) 4-7 июля 2023 г. в Белграде (Сербия). Апробация диссертационной работы состоялась на межотделенческой конференции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова», (Протокол №2 от 31.01.2025г.) г., Москва.

**Внедрение результатов работы в практику.** Основные положения, вошедшие в исследование, внедрены в: 1) диагностическую работу лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, г. Москва; 2) практическую деятельность Центральной научно-исследовательской лаборатории Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Минобрнауки России, г. Симферополь; 3) диагностическую и исследовательскую деятельность ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора г. Казань. Базовые технологические решения и научные положения внедрены в научно-производственную деятельность АО «Генериум», г. Москва: результаты работы способствовали разработке тест-систем для определения Т-клеточного ответа – ТиграТест *in vitro* на антигены к цитомегаловирусу и вирусу папилломы человека.

**Публикации автора по теме диссертации.** По материалам диссертационного исследования опубликовано 7 научных работ, отражающих основные результаты, научные положения и выводы. Из них 4 статьи в журналах, индексируемых в международных наукометрических базах Web of Science, Scopus; 3 из них при этом опубликованы в специализированных рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК Российской Федерации и рекомендованных по специальности 3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки), а одна – в международном журнале. Две работы опубликованы в сборнике материалов профильной международной научной конференции. Одна статья опубликована в журнале, рекомендованном ВАК России, но не по шифру специальности защищаемой работы.

**Личный вклад автора в исследование.** Автор самостоятельно предложил направление темы работы, совместно с руководителем разработала дизайн исследования, экспериментальную модель. Самостоятельно сделал поиск литературы, написал аналитический обзор. Самостоятельно сформировал выборку пациентов, переболевших и вакцинированных против COVID-19, провел эксперимент по оценке Т-клеточного иммунного ответа в образцах венозной крови пациентов и определению концентрации цитокинов в образцах культуральной среды МНПК, полученных в ходе оценки Т-клеточного иммунного ответа. Самостоятельно разработал анкету и выполнял сбор анамнеза с систематизацией данных. При проведении серологических и молекулярно-биологических исследований автор выполнял обработку крови для выделения МНПК, проводил постановку метода ELISPOT, количественную оценку спотов. Автор выполнил определение антител в сыворотке крови пациентов. Автором лично написаны все главы диссертации, совместно с руководителем сформулированы заключительные положения, выводы, научные и практические рекомендации.

Автор выражает искреннюю признательность и благодарность заведующей центром научных и клинических исследований «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, к.м.н. Городновой Е.А. за практическую помощь на

протяжении всего процесса проведения научного исследования, к.мед.н., вед. науч. сотр. лаб. клинической иммунологии ФГБУ "НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова" МЗ РФ Кречетову С.П. за методическую помощь в оценке содержания цитокинов в среде культивирования МНПК, к.биол.н., советнику по науке АО «Генериум» Потеряеву Д.А. за консультативную помощь в разработке дизайна исследования при подготовке части работы с использованием ТиграТест® SARS-CoV-2, а также к.соц.н., заместителю начальника отдела по сводному контингенту и статистике, РАНХиГС при президенте РФ, Щепкиной Е.В. за выполнение статистической обработки данных, на основании которых автор провел анализ количественных показателей.

**Объём и структура диссертации.** Диссертационная работа имеет классическую структуру, согласно требованиям: содержит введение, разделы обзор литературы, материал и методы исследования, пять глав с результатами собственных исследований (клинических и экспериментальных), главу обсуждение результатов и заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы, содержащий 199 наименования работ. Работа изложена на 142 страницах машинописного текста, иллюстрирована 30 таблицами, 28 рисунками.

## ГЛАВА 1

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1.1. Современное состояние исследований врожденного иммунитета при контакте с вирусом SARS-CoV-2

COVID-19 большинство авторов рассматривают как заболевание с выраженным иммунным компонентом патогенеза. Для изучения ответа на вирус SARS-CoV-2 используют классические иммунологические, лабораторные методы, современные технологии (например, системная одноклеточная мультиомика) [31], что позволило выявить различные «эндотипы» течения заболевания, выделить дифференциальную динамику в контексте его тяжести и продемонстрировать отклонения в различных звеньях иммунной защиты. С 2020 года по настоящее время это позволяет разрабатывать перспективные биомаркеры для диагностики, прогнозирования исхода заболевания, оптимизировать лечебный подход к COVID-19. Изучение иммунного ответа человека на инфекцию SARS-CoV-2 выявило основные клеточные и молекулярно-генетические компоненты, участвующие в нормальном иммунном ответе и обуславливающие иммунные отклонения, особенно у пациентов с тяжелыми и критическими траекториями развития болезни. Исследование клеточного и гуморального звеньев врожденного и приобретенного иммунитета позволяет определить иерархию событий иммунного ответа, выявить потенциальные цели для лечения иммунопатологических состояний [32].

*Врожденный иммунный ответ* является первой линией борьбы с SARS-CoV-2. По сравнению с адаптивным иммунитетом в обезвреживании вируса он действует быстро, универсально вне зависимости от опыта контакта с возбудителем ранее, разнообразно по механизму действия, менее специфично по выявляемым признакам патогенов, из-за этого менее точно. Этот способ уничтожения разных возбудителей включает набор клеток и молекул, готовых к

обезвреживанию вируса. При этом он лежит в основе формирования адаптивного приобретенного специфического иммунитета. В связи с этим, два данных вида иммунного ответа, целесообразно рассматривать как взаимосвязанные этапы, включающиеся при любом контакте с патогеном, но явно с преобладанием врожденного механизма при первичном контакте и доминированием адаптивного иммунитета при повторных встречах с вирусом. Интеграция врожденных и адаптивных иммунных систем осуществляется через клеточные и молекулярные взаимодействия [33].

*Клеточный компонент* врожденного иммунитета представлен клетками макрофагального ряда (моноциты крови и специализированные тканевые эквиваленты), нейтрофильными гранулоцитами, натуральными киллерами, эозинофилами, тучными клетками. Все они, как известно, относятся как клеткам крови, так и к клеткам тканей, проникая в них через микрососуды гемокциркуляции в случае поступления из очага молекулярных сигналов, активирующих хемотаксис. Такие сигналы представлены веществами, выделяемыми вирусами и бактериями, а также гуморальными факторами неспецифической защиты. Изменчивость клеточных компонентов врожденного иммунного ответа у людей является основным фактором гетерогенного течения заболевания, наблюдаемого для спектра заболеваний, вызванных SARS-CoV-2 [34-36].

*Гуморальный компонент* врожденного иммунитета также разнообразен. Это молекулы, способные уничтожить патоген и активировать неспецифические и специфические звенья иммуногенеза. Это провоспалительные цитокины, медиаторы воспалительных реакций, интерфероны, лизоцим, многочисленные белки системы комплемента. Они стимулируют развитие воспаления как мезенхимально-сосудистую реакцию, привлекая иммунные клетки в место расположения патогена для включения системы приобретенного иммунитета и антигенпрезентации, изменяя проницаемость сосудов и активируя клетки стромы. Также они напрямую нейтрализуют вирусы, повышают синтез и эффективность действия антител, способствуют уничтожению выявленных чужеродных клеток и

иммунных комплексов [37-39]. Поэтому нет оснований разделять два данных вида иммунитета в пространственном и временном контексте развития иммуновоспалительной реакции при встрече с вирусом. Нарушение слаженной работы клеточной и гуморальной систем комплексно содействует неконтролируемой репликации вируса в дыхательных путях. Тяжелая форма COVID-19 обусловлена не только вирусной инфекцией, но и нерегулируемым иммунным и воспалительным ответом [40].

К настоящему времени выявлен ряд способностей вируса SARS-CoV-2 в нивелировании или ослаблении эффектов звеньев первичных защитных реакций организма, обеспечивших ему высокую вирулентность и патогенность. Это касается практически всех упомянутых элементов клеточных и молекулярных защитных факторов. На эту мишень нацелен и ряд терапевтических стратегий, поскольку эффективность их приближается к эффективности профилактики (развития болезни или препятствованию развития тяжелых форм).

*Интерферонам принадлежит важнейшая роль в защите организма при контакте с вирусом SARS-CoV-2, особенно на ранних этапах [38, 41] и эти гуморальные факторы лежат в основе профилактики и терапии COVID-19. Когда вирусы SARS-CoV-2 проходят первую линию защиты, обеспечиваемую эпителиальными клетками, вирусные частицы или фрагменты погибших клеток, инфицированных вирусом, доставляются в дренирующие лимфатические узлы, где находятся плазмоцитоподобные дендритные клетки. Они мигрируют к месту проникновения вирусов и за счет IFN типа I инициируют противовирусный эффект, блокируя репликацию вируса, а также способствуя активации и функционированию как врожденных, так и адаптивных иммунных клеток, тем самым создавая эффективный ответ (рис. 1). На рисунке отражено двустороннее взаимодействие первичного очага внедрения вируса с системами организма: центральными и периферическими органами иммуногенеза через посредство жидких сред путем транспортировки цитокинов, хемокинов, выступающих в роли факторов активации и ингибиторов различных иммунных клеточных реакций. Клетки представлены в иерархической взаимосвязи как участники каскада*

событий, нацеленных на защиту организма, где ключевая роль принадлежит дендритным клеткам, реализующим свой потенциал при участии всех компонентов клеточного иммунного звена и запускающая переход от неспецифического иммунитета к адаптивной фазе.

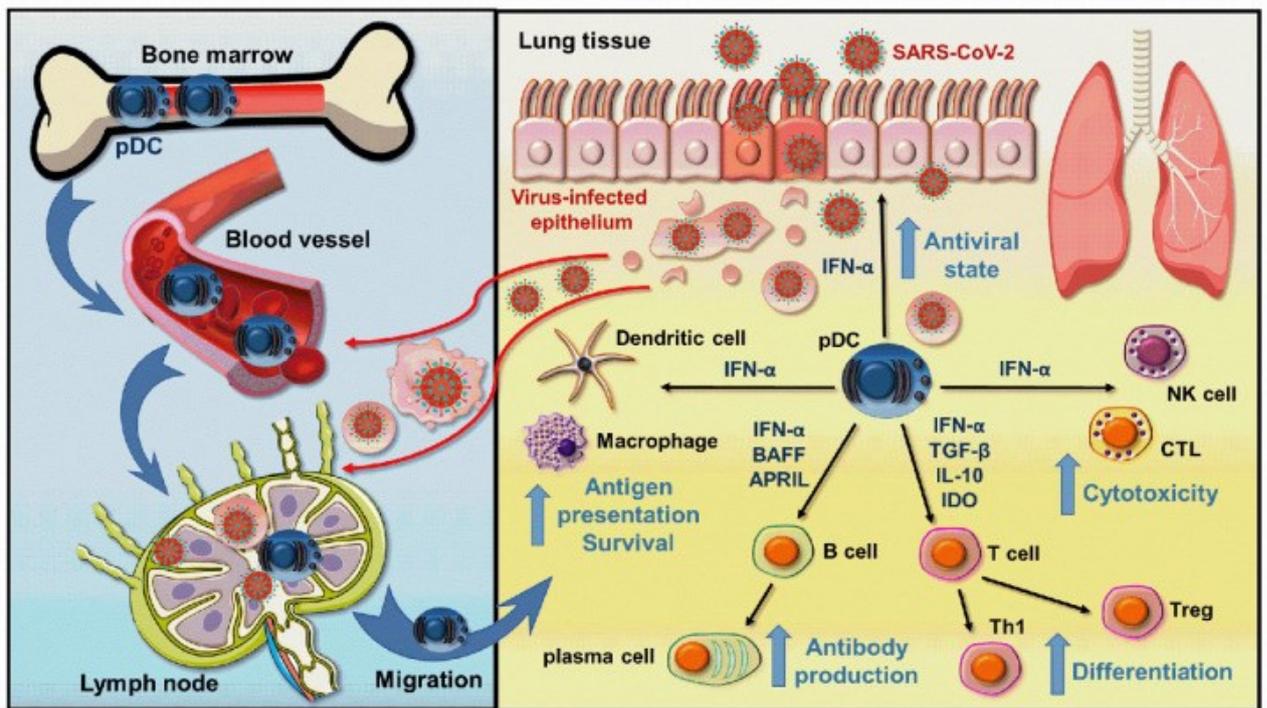


Рисунок 1. Эффекты интерферонов I типа в защите от SARS-CoV-2 [41].

Обозначения: APRIL – лиганд, индуцирующий пролиферацию; BAFF – фактор активации В-клеток; IL – интерлейкин; IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа; IFN – интерферон; NK – естественный киллер; pDC – плазмоцитодендритная клетка; TGF – трансформирующий фактор роста; T – Т-помощник; Treg – Т регуляторный; CTL – цитотоксические Т-клетки.

При респираторной SARS-CoV-2 инфекции в норме индуцируются сигнальные каскады, которые приводят к выработке интерферона. Эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, альвеолярные макрофаги, естественные клетки-киллеры, дендритные клетки являются продуцентами IFN при респираторных вирусных инфекциях. Вирусные промежуточные РНК распознаются рецепторами, их активация задействует нижестоящие в каскаде реакции белки, например,

митохондриальный противовирусный сигнальный белок (MAVS), фактор миелоидной дифференцировки 88 (MyD88), передающие эстафету белкам-факторам регуляции интерферона (IRF3 и IRF7). Эти белки в ядре связывают промоторы гена *IFN*, а вырабатываемые IFN-I и -III также рецепторным путем активируют сигнальный каскад JAK/STAT, а далее – ISGF3, активирующий промоторы синтеза IFN (ISRE), что повышает его продукцию [42, 43, 44].

В эксперименте и в клинике показано, что ограниченный и отсроченный ответ IFN-I и IFN-III (до пика репликации вируса) приводит к усилению выработки провоспалительных цитокинов и обширной патологии легких, коррелирует с развитием тяжелых форм ТОРС [42]. Вирус SARS-CoV-2 имеет механизмы инициации этого несбалансированного врожденного иммунного ответа. В структуре вируса есть различное количество дополнительных белков, необязательных для репликации, но способствующих иммунному антагонизму. Известно, что многие из кодирующих их генов противодействуют реакции интерферона у пациентов с COVID-19. Эти белки проявляют активность как до начала синтеза IFN, приостанавливая распознавание и сигналинг PRR, так и после его синтеза, блокируя пути передачи сигналов IFN, способствуя ранней быстрой репликации вируса (рис. 2).

Реакция интерферона – это краеугольный камень противовирусного врожденного иммунитета, играющая ключевую роль в определении исхода инфекции SARS-CoV-2. Многие авторы приводят доказательства того, что SARS-CoV-2 имеет молекулярные механизмы, с помощью которых противодействует действию IFN; что генетическая изменчивость SARS-CoV-2 и человека-хозяина влияет на реакцию IFN на уровне продукции или действия IFN, или того и другого [45-47]. Ключевым является понимание того, что дефицит эффективного ответа IFN является важным определяющим фактором, лежащим в основе тяжести заболевания COVID-19, и что IFN- $\lambda$  и IFN- $\alpha/\beta$  могут использоваться в качестве терапевтических средств для лечения инфекции SARS-CoV-2, и, соответственно, оценка способности вырабатывать их важна с точки зрения оценки потенциала иммунного ответа и прогноза [44].

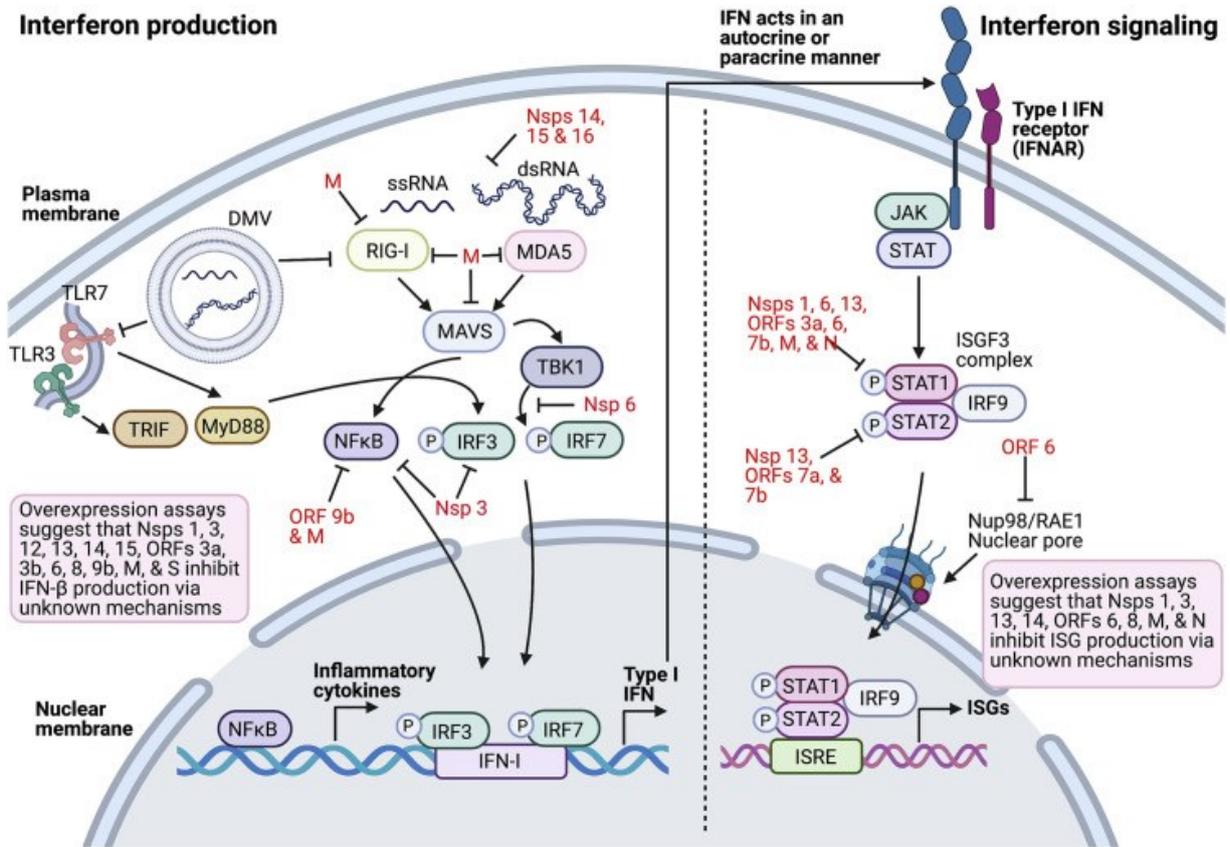


Рисунок 2. Врожденный иммунный антагонизм со стороны белков SARS-CoV-2 [42].

Описание рисунка. В двухмембранных везикулах (DMV), защищающих вирусную РНК от распознавания рецепторами TLR3, TLR7, RIG-I и MDA5 (группы PRR), происходит репликация вируса. Происходит последовательная активация каскада белковых молекул для инициации продукции IFN: TRIF и MyD88, TLR, MAVS и TBK1, RIG-I и MDA5. Через IRF3, IRF7 или NFκB белки эти факторы транслоцируются в ядре клетки и стимулируют транскрипцию генов, ответственных за выработку провоспалительных цитокинов и IFN. Пунктирная линия представляет переход к передаче сигналов IFN, начиная с IFN-I, связывающего IFNAR, чтобы инициировать передачу сигналов JAK/STAT и образование комплекса ISGF3 STAT1/STAT2/IRF9, который транслоцируется в ядро для активации транскрипции ISRE. Белки, кодируемые SARS-CoV-2 (красный цвет), ингибируют сигнальные пути, содействующие снижению выработки интерферона и экспрессии провоспалительных цитокинов [42].

Данные исследования являются итогом множества экспериментов *in vitro* и частично подтверждены на *in vivo* моделях.

*Цитокиновая и хемокиновая реакция на SARS-CoV-2.* Неадекватно низкая выработка IFN связана с повышением концентрации цитокинов и хемокинов, что сопровождается развитием тяжелой формы COVID-19 [48, 49]. Механизм этого следующий: когда рецепторы PRR встречают вирусную РНК в отсутствие IFN, выработка которого ингибирована вирусом, вырабатываются другие цитокины и хемокины, активирующие сигнальные каскады NFκB, потенцирующие дальнейшую экспрессию широкого спектра цитокинов и хемокинов [50]. Многие исследования пытались идентифицировать медиаторы воспаления, связанные с тяжелыми исходами COVID-19, установлен общий фенотип повышенного уровня IL-6, IL-8, IL-10, TNF, а также хемокинов, включая CCL2, CCL3 и CXCL8 [51-54].

*In vitro* аналогичный провоспалительный цитокиновый ответ на SARS-CoV-2 наблюдается в разных типах чувствительных клеток и их органоидных моделях. Встреча с вирусом усиливает выработку ими воспалительных цитокинов (IL-6 и TNF), хемокинов (CCL20, CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL2, CXCL10 и CXCL16) [55.]. Аналогичным образом, инфицирование макрофагов SARS-CoV-2 приводит к повышению выработки TNF, IL-8, IP-10 (CXCL10) и IL-1β [56]. При этом, как и в случае с сигнальными путями IFN (через упомянутое выше ингибирование ORF6), белки SARS-CoV-2 могут противодействовать и другим цитокиновым реакциям. Например, через дополнительный белок ORF9b SARS-CoV-2 взаимодействует с модулятором NFκB и нарушает передачу его сигналов, снижая выработку IL-6 и TNF – ключевых провоспалительных цитокинов [57].

Данные механизмы характерны не только для людей, болеющих COVID-19 и моделей *in vitro*, но и при моделировании инфекции SARS-CoV-2 на животных. Провоспалительные цитокины и хемокины при чрезмерной выработке инициируют развитие тяжелых форм заболевания [58-60]. В опыте на лабораторных мышах, инфицированных SARS-CoV-2, показано, что TNF и IFN-II работают как синергисты и способствуют паноптозу клеток [61, 62], а введение

нейтрализующих антицитокиновых антител, снижает смертность животных от инфекции [63]. Воспалительная массовая гибель клеток путем пироптоза, апоптоза и некроптоза, названная паноптозом также запускается указанными выше каскадами и блокируется при ингибировании цитокинов и хемокинов.

В исследованиях на павианах и макаках-резус также была подтверждена гипотеза о том, что иммуноопосредованная патология является усугубляющим фактором тяжести течения заболевания. На таком межвидовом примере при сравнении кинетики воспалительных реакций, реакции IFN, ответа Т-клеток с пиками репликации вируса, было установлено, что скоординированный ответ врожденного иммунитета и Т-клеток имеет решающее значение для предотвращения иммунопатологических изменений [61].

Термин цитокиновый шторм, известный и ранее до пандемии, прочно ассоциирован с патогенезом новой коронавирусной инфекции, так как во время прогрессирования заболевания COVID-19, нерегулируемая продолжительная воспалительная реакция часто ухудшает течение заболевания. Цитокиновый шторм характеризуют как чрезмерную реакцию со значительным повышением уровня многих провоспалительных цитокинов и хемокинов. Классические аналоги такой реакции встречаются при сепсисе, респираторном дистресс-синдроме (РДС), других вирусных инфекциях, в качестве побочного эффекта Т-клеточной терапии химерными антигенными рецепторами (CAR-T).

При этом, инфекция SARS-CoV-2 создает уникальный иммунный профиль по сравнению с другими вирусными инфекциями. Это подтверждено на клеточных моделях для 18 различных семейств вирусов. Был проведен многомерный статистический анализ, включающий исследования Coronaviridae, Orthomyxoviridae, Retroviridae, Flaviviridae и Hantaviridae и другие. Выводом исследования стало то, что профиль цитокинов-хемокинов при инфекции SARS-CoV-2 важен для диагностики, прогноза и понимания патогенеза болезни. Исследования, показавшие преимущественное повышение только уровня IL-6 и IL-8 у пациентов с COVID-19 и фактическое снижение других цитокинов по сравнению с пациентами с гриппом [64], в отличие от реакций с классическими

«цитокиновыми штормами» (при РДС и сепсисе), когда концентрации IL-6, IL-8, TNF и IFN-II в этих условиях многократно выше, чем у пациентов с COVID-19 [65, 66], позволили сделать вывод, что неправильно характеризовать заболевание COVID-19 как «цитокиновый шторм». Формулировка «значительная воспалительная дисрегуляция» может быть более точной характеристикой иммунного ответа у этих пациентов.

*Клеточный врожденный иммунный ответ на SARS-CoV-2.* Еще один характерный признак инфекции SARS-CoV-2 – лимфопения – фактор прогрессирования COVID-19, включая серьезные изменения в составе В-клеток и глубокое влияние на линию Т-клеток [67]. При COVID-19 усиленный синтез провоспалительных цитокинов может сопровождаться клиническими и лабораторными признаками цитокинового шторма и при этом – симптомами вторичной иммунодепрессии с поздним началом синтеза разных видов IFN и активацией воспалительного фактора NLRP3. Различные белки вируса, часть из которых выполняет также функцию структурных белков, может вызвать провоспалительный и иммунодепрессивный эффект. Эта особенность является важным фактором вирулентности, обеспеченной, по-видимому, эволюцией SARS-CoV-2. Несвоевременная выработка IFN сперва способствует репликации вируса, а в последствии утяжеляет течение инфекции. Такая десинхронизация цикла репликации вируса и ответа организма обеспечивает преимущества SARS-CoV-2, что характерно для инфекций с выраженным иммунопатологическим компонентом [67].

Помимо врожденного цитокинового ответа, инфекция SARS-CoV-2 приводит к интенсивному привлечению макрофагов, моноцитов, нейтрофилов в легкие; патологические данные показывают, что хемоаттрактанты нейтрофилов, такие как CXCL8, CXCL1 и CXCL2, а также хемоаттрактанты моноцитов CCL2 и CCL7, также индуцируются и активируются [68, 69]. Иммунофенотипические исследования инфильтрирующих моноцитов в смывах пациентов с COVID-19 и в легочной ткани мышей выявили обширную дифференцировку моноцитов с воспалительным фенотипом, потенциально обусловленную Т-клетками,

экспрессирующими гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) [70, 71]. Эти воспалительные моноциты являются важным источником IL-6 и других воспалительных цитокинов, вносящих вклад в патогенез COVID-19. В легких и трахеальных аспиратах пациентов с COVID-19 обнаружены продуцируемые нейтрофилами активные формы кислорода (АФК) и внеклеточные ловушки (NET), которые способствуют гибели клеток, в том числе и эпителиальных клеток легких [72].

NK-клетки участвуют во врожденном иммунном ответе, продуцируя цитокины, такие как IFN- $\gamma$  и TNF, и убивая инфицированные вирусом клетки. Тем не менее, широко сообщается, что общее количество NK-клеток в крови пациентов с COVID-19 существенно снижается по сравнению со здоровыми людьми [73]. Но выявленные NK-клетки демонстрируют мощную активацию выработки белков гранзима В и перфорина, участвующих в активности клеточного лизиса. Исследуя динамику выработки IL-6 NK-клетками и корреляцию с признаками тяжести заболевания, ученые предположили, что NK-клетки, играют роль в иммунопатологии пациентов с COVID-19.

Таким образом, система врожденного иммунного ответа служит первой линией защиты от вторжения патогенов; однако ее нерегулируемые реакции могут вызывать неконтролируемое воспаление и деструкцию тканей, губительные для хозяина. Иммунное восприятие SARS-CoV-2 множеством рецепторов приводит к выработке различных провоспалительных цитокинов и индукции инфламаторной гибели клеток. Эти процессы способствуют острому респираторному дистресс-синдрому. Лучшее понимание патофизиологических механизмов, наблюдаемых для клеток и растворимых медиаторов, участвующих во врожденном иммунитете, является предпосылкой для разработки диагностических маркеров и терапевтических стратегий, нацеленных на COVID-19, разработки целевых методов, которые могут улучшить результаты лечения пациентов за счет смягчения тяжелого течения заболевания [34, 74].

## 1.2. Современное состояние исследований приобретенного иммунитета при контакте с вирусом SARS-CoV-2 и вакцинации

*Приобретенный (адаптивный) иммунный ответ* является второй линией иммунологической борьбы с SARS-CoV-2 посредством разрушения инфицированных клеток хозяина и выработки вирус специфических антител активированными цитотоксическими Т-клетками и В-клетками, соответственно. В-клетки продуцируют антитела, а Т-клетки обеспечивают вспомогательные функции для других иммунных клеток и непосредственно уничтожают инфицированные вирусом клетки.

*Главными клетками* адаптивного противовирусного иммунитета являются Т-лимфоциты. В интерстиции легочной ткани пациентов с COVID-19 иммуноморфологическим методом в клеточном инфильтрате выявлено, что 80% клеток являются CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами. Дисбаланс иммунных реакций и недостаточная выработка IFN на первом этапе защиты от вируса, побуждает CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> к чрезмерному синтезу цитокинов, индуцирующих развитие гипервоспалительной реакции и повреждение ткани легких [74].

CD4<sup>+</sup> Т-клеткам также принадлежит важная роль, не смотря на их численное меньшинство при морфологическом исследовании инфильтрата легкого. В эксперименте по удалению этих клеток из процесса иммунного ответа на SARS-CoV-2 инактивировались функции других клеток лимфоцитарного ряда, прекращалась выработка нейтрализующих антител и течение заболевания протекало в более тяжелой форме. При попадании вируса SARS-CoV-2 виды вырабатываемых цитокинов имеют большое прогностическое значение. Например, вирус-специфические CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоциты продуцируют IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF, принадлежащие к клонам T $\alpha$  1 типа, а сильный Т-клеточный ответ коррелирует с высокими титрами нейтрализующих антител и благоприятным прогнозом заболевания. Напротив, преобладание синтеза цитокинов T $\alpha$  2 типа (IL-4, IL-5, IL-10) наблюдается у пациентов с летальным исходом и свидетельствует о плохом прогнозе [75].

Одним из подходов в изучении клеточного иммунного ответа является исследование реакции клеток *in vitro* в ответ на инфицирование (антиген-стимуляцию). К ожидаемым реакциям относятся продукция цитокинов, пролиферация и цитотоксичность. Если IFN-I и -III синтезируются разными клетками человека в ответ на стимуляцию вирусным антигеном, то продукция IFN- $\gamma$  (единственный представитель IFN II типа) специфична для активированных клеток иммунной системы: T $\chi$ 1, цитотоксические лимфоциты, NK и антиген-презентирующие клетки. IFN- $\gamma$  как один из центральных T $\chi$ 1 цитокинов может быть использован в качестве маркера клеточного иммунного ответа. Активированные первичным контактом лимфоциты инициируют формирование антиген-специфичных клеток памяти, способных при повторном контакте с антигеном продуцировать IFN- $\gamma$ . Его внеклеточная концентрация подлежит исследованию в опытах *in vitro* в супернатанте культуры клеток, что лежит в основе метода ELISPOT как показатель напряженности специфического T $\chi$ 1 клеточного иммунного ответа [76]. Из-за технических сложностей и ограниченных возможностей лабораторной диагностики T-клетки труднее изучать и, следовательно, в литературе представлено не так много исследований данного звена адаптивного иммунитета. T-клетки имеют критическое значение для генерации как эффективного гуморального, так и клеточного иммунного ответов.

Существуют данные о том, что T-клеточный иммунный ответ на разные штаммы коронавируса – разный [24, 25]. Ученые оценили эффективность T-клеточного иммунного ответа на 11 разных штаммах SARS-CoV-2 и создали онлайн-портал (T-cell COVID-19 Atlas (T-CoV)) [<https://t-cov.hse.ru/>], где можно отслеживать влияние мутаций на взаимодействия коронавируса нового типа с белками HLA – ключевой частью приобретенного иммунитета.

Инфильтрация легочной ткани клетками врожденной и адаптивной иммунной системы сопровождается усилением воспаления и значительным увеличением продукции IFN- $\gamma$  T-лимфоцитами. При исследовании геномных последовательностей коронавируса, вызвавшего пандемию COVID-19, выделены

боле агрессивный и менее агрессивный подтипы. Объяснить это можно тем, что, кодируемые геномом структурные белки, активируют иммунные клетки, от их продукции зависит интенсивность воспалительного и иммунопатологического ответа [77, 78].

Адаптивный иммунный ответ является не только основным фактором, определяющим клинический исход заражения SARS-CoV-2, но и лежит в основе эффективности вакцин. Подгруппа Т-клеток, подготовленных против сезонных коронавирусов, перекрестно реагирует с SARS-CoV-2 и может способствовать клинической защите. Память Т-клеток охватывает широкое распознавание вирусных белков, оцениваемое примерно в 30 эпитопов, что может ограничить влияние отдельных вирусных мутаций и, вероятно, лежит в основе защиты от вариантов, появившихся в период пандемии. Современные вакцины от COVID-19 вызывают надежные ответы Т-клеток, а новые или гетерологичные схемы предлагают потенциал для дальнейшего усиления клеточных ответов. Иммунитет Т-клеток играет центральную роль в борьбе с SARS-CoV-2, и его важность, возможно, была относительно недооценена до сих пор [79].

Т-клеточный иммунный ответ и его патогенетические механизмы при COVID-19 охарактеризованы далеко не полностью, необходимо их дальнейшее изучение для лучшего понимания иммунного ответа против вируса и особенностей формирования долгосрочного иммунитета, который обеспечивают вирус специфические Т-клетки. Кроме того, важно продолжать изучение роли вакцинации в запуске специфических Т-клеточных ответов против вируса, что поможет определить надежность и длительность защиты [80].

Комплексная оценка иммунного статуса, как его гуморального звена, так и клеточного иммунного ответа имеет важную роль в определении риска возникновения заболевания COVID-19 и прогнозе его течения. При комплексной оценке Т-клеточного иммунного ответа и выработки специфических антител на вирус SARS-COV-2 (методами ELISPOT и ИФА, измеряющим IgG против домена S1 белка SARS-CoV-2) у добровольцев работников здравоохранения и работников государственных служб выявлено, что ответы на шиповидные,

нуклеопротеиновые и мембранные белки (ответы SNM) коррелировали и сосуществовали с антителами против Spike и анти-нуклеопротеиновыми антителами у лиц с микробиологически подтвержденной инфекцией в анамнезе. В отличие от ответов на белки SNM, ответы Т-клеток на различные структурные белки были намного слабее и не повышались у лиц с инфекцией SARS-CoV-2 в анамнезе по сравнению с теми, у кого ее не было. Полученные данные предполагают соответствие между уровнями антител и числом циркулирующих Т-клеток, чувствительных к SARS-CoV-2, так что среди людей с низкими уровнями антител (индекс антител anti-Spike IgG от 0,35 до 3 наблюдается примерно у 40% людей), риск заболевания COVID-19 был самым низким у тех, у кого было более высокое количество Т-клеток. Самые высокие SNM-ответы Т-клеток наблюдались у лиц, у которых также обнаруживались анти-Spike IgG-антитела. У некоторых людей SNM-ответы Т-клеток сравнимы с теми, которые наблюдались у выживших после SARS-CoV-2 и наблюдались в отсутствие анти-Spike IgG [81].

Таким образом, показана роль Т-клеток в контроле над вирусом SARS-CoV-2, благодаря прямому контролю над вирусом, стимулированию выработки антител В-клетками и в качестве маркера популяции В-клеток памяти, инициированной естественной инфекцией. Показано, что у человека после воздействия вируса SARS-CoV-2 сохраняются реакции циркулирующих Т-клеток, когда серологические ответы снижаются до неопределяемых уровней [81]. Доступным методом изучения Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2 по мононуклеарным клеткам периферической крови является метод ELISPOT [82, 83].

### **1.3. Особенности иммунного ответа у переболевших COVID-19 и вакцинированных «Гам-Ковид-Вак»**

Большой интерес вызвало изучение Т-клеточного иммунитета при разработке вакцин [30, 84-86]. При оценке длительности клеточного

иммунного ответа после «Гам-Ковид-Вак» вакцинации отечественные ученые исследовали Т-клеточный иммунитет методом ELISPOT на 90 и 210 день после вакцинации. Даже в долгосрочной серии данной работы выявлена активная индукция иммунного ответа и высвобождение IFN- $\gamma$  Т-лимфоцитами у всех обследуемых при воздействии на них антигенов вируса SARS-CoV-2. Таким образом, «Гам-Ковид-Вак» по мнению авторов, обеспечивает Т-клеточный иммунитет более чем на полгода [84].

Ряд работ посвящен оценке приобретенного иммунитета против SARS-CoV-2 в сравнительном аспекте у переболевших и вакцинированных. Существенно преобладают публикации с исследованием эффектов российской вакцины «Гам-Ковид-Вак» («Спутник V» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»), как и работы с использованием метода IGRA ELISPOT (Interferon Gamma Release Assay, Enzyme Linked Spot Analysis). Результаты работ указывают на высокую эффективность вакцинации и активацию Т-клеточного иммунного ответа у более 90% обследуемых при внесении Spike-белка SARS-CoV-2 (антиген 1) у не болевших ранее лиц, и до 100% у вакцинированных пациентов и лиц, имевших заболевание в анамнезе. В 3-5 раз меньше не вакцинированных испытуемых демонстрируют иммунный ответ в остром периоде болезни, что прямо указывает на высокие риски тяжести заболевания. Контактировавшие и не привитые лица демонстрируют иммунный ответ при внесении протеина N коронавируса SARS-CoV-2 (антиген 2) с частотой порядка 50% случаев. В группе у не вакцинированных лиц, но перенесших COVID-19, реакция к Spike-белку (антиген 1) несколько уступает привитым пациентам, но преобладает по антигену 2 (белки N, M, ORF3a и ORF7a), демонстрируя положительный результат у 100% пациентов, сохраняя такие же цифры у лиц с двойным столкновением с антигеном в анамнезе (и привитых, и переболевших) [85].

Данные работы позволили оценить иммунный статус: гуморальное звено и клеточный иммунный ответ при заболевании и вакцинации. Показана важная роль всех компонентов иммунитета в определении риска возникновения заболевания COVID-19 и прогнозе его течения. В работах подчеркнута роль Т-клеток в

прямом устранении вируса, опосредованном через воздействие на Т-клетки, их длительная активность даже при отрицательных серологических результатах. Показано наличие перекрестно-реактивного иммунного ответа на SARS-CoV-2 с вирусами других штаммов и элементов вакцин. Все авторы сходятся во мнении, что Т-клеточное звено дольше сохраняет активность и его диагностика более демонстративна в длительные сроки после контакта с вирусом или его элементами в составе вакцин. Выявление параметров гуморального и клеточного иммунитета представляет в комплексе большой интерес для детализации: 1) нормального иммунного ответа, 2) иммунопатогенеза заболевания, важных для персонализации профилактических и терапевтических врачебных стратегий.

Однако не была выполнена оценка зависимости степени выраженности Т-клеточного и гуморального иммунного ответа от степени тяжести перенесенного заболевания, не было выполнено сравнительное исследование показателей клеточного и гуморального иммунного ответа у переболевших COVID-19 в разные периоды пандемии, ранее не был использован метод экспериментального изучения мононуклеаров крови и цитокинового профиля у переболевших COVID-19 и у вакцинированных «Гам-Ковид-Вак». Это подчеркивает актуальность выбранного нами исследования с комплексным математическим подходом у изучению иммунного ответа на SARS-CoV-2 и вакцинацию «Гам-Ковид-Вак».

#### **1.4. Существующие лабораторные методы оценки клеточного и гуморального иммунного ответа, их возможности и ограничения**

Структурные и молекулярные характеристики SARS-CoV-2, а также этапы адаптивного иммунного ответа явились основой для разработки различных лабораторных диагностических методов оценки иммунитета при COVID-19 [87, 88]. В результате перенесённого COVID-19 формируется иммунитет, упрощённая структура элементов которого включает: 1) иммуноглобулины (Ig) классов А, G, М; 2) SARS-CoV-2-специфичные Т-клетки CD8 + и CD4 + ; 3) В-клетки [89]. Они являются объектом исследования. Для изучения специфического иммунитета

наибольшее распространение получили методы определения специфических антител и выявления активированных Т-клеток. Базовыми объектами исследования стали SARS-CoV-2-специфичные антитела IgA, IgM, IgG, определяемые методом иммуноферментного анализа (ИФА), а также Т-клетки, синтезирующие IFN- $\gamma$  в ответ на антигены вируса SARS-CoV-2 [90, 91].

С развитием пандемии наблюдали быструю эволюцию ИФА-методов – от качественного скрининга суммарных антител IgA, IgM, IgG к вирусу до полуколичественного и количественного выявления нейтрализующих антител IgG в том числе к рецептор-связывающему домену (RBD, receptor-binding domain) белка S SARS-CoV-2 [92]. Позже в исследовательских целях для оценки нейтрализующей способности сыворотки стал применяться метод PNA (pseudovirus neutralization assay), когда псевдовирус SARS-CoV-2 инфицирует клетки, экспрессирующие рецептор ACE2, а после инкубации с тестируемой сывороткой на основе значения люминесценции производят расчёт степени нейтрализации псевдовируса [93]. Для исследования клеточного иммунного ответа актуальны три метода: проточная цитометрия (по пролиферативному ответу Т-хелперов (CD4 +) и Т-киллеров CD8 +) на рестимуляцию антигена *in vitro*); IGRA-ELISPOT (interferon-gamma release assay) (по количеству продуцирующих IFN- $\gamma$  антиген-специфических Т-клеток среди мононуклеаров периферической крови (PBMC, peripheral blood mononuclear cell) и ELISA (по изменению концентрации IFN- $\gamma$  в ответ на стимуляцию Т-клеток антигенами возбудителя) [94].

Крупные исследования, описанные в литературе, свидетельствуют, что на 21-й день от начала заболевания плазма около 30 % людей, перенесших COVID-19, имеет низкие титры нейтрализующих антител, специфичных для SARS-CoV-2, или не содержит их вовсе [93, 94]. COVID-19 вызывает выраженный Т-клеточный ответ, устойчивый до 15 месяцев [95], Т-клетки широко продуцируются в ответ на инфекцию и вакцинацию [96], а тест-системы на основе IGRA-ELISPOT выявляют на 51 % больше людей, перенесших COVID-19, чем ИФА-тесты на IgG [97]. В этой связи SARS-CoV-2-специфические Т-клетки могут быть более

чувствительным маркером перенесённого COVID-19, а методы их выявления дополняют серологию в комплексной лабораторной диагностике иммунного ответа на SARS-CoV-2.

Специфика эффективности применения лабораторных методов диагностики в разные периоды заболевания и пандемии COVID-19 отражена на рисунке 3.

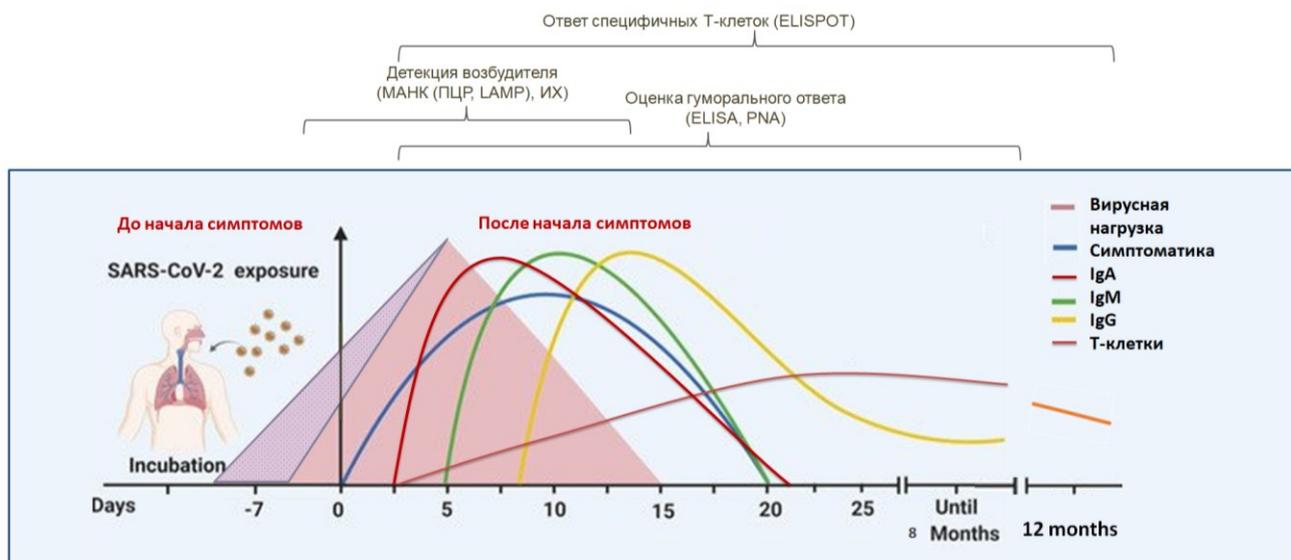


Рисунок 3. Эффективность основных диагностических лабораторных методов при исследовании компонентов SARS-CoV-2 [98-100 с изменениями].

Таким образом, из-за быстрого распространения нового коронавируса и связанного с ним заболевания COVID-19 для диагностики и отслеживания пациентов по всему миру были необходимы надежные, простые, быстрые и недорогие методы обнаружения. В настоящее время лабораторные методы обнаружения последствий контакта организма с вирусом или вирусными белками, путем оценки гуморального и клеточного иммунитета, становится более актуальным для прогнозов, эпидемиологических работ, оценки потребности в вакцинопрофилактике, а также в иммунологических фундаментальных трудах [98-100].

Эти базовые методические возможности нашли отражении в методологии нашей работы в разные периоды пандемии, а результаты тестирования указанных

методик также подчеркивают ценность комплексного исследования патофизиологических особенностей иммунного ответа у переболевших COVID-19 и вакцинированных «Гам-Ковид-Вак».

### **1.5. Современные экспериментальные подходы к исследованию иммунного ответа в моделях *in vivo* и *in vitro***

*Индукция путей активации IFN при инфицировании SARS-CoV-2 in vitro* изучена на ряде моделей. Отсутствие моделей человеческого альвеолярного эпителия *ex vivo* потенцировало разработку иных вариантов экспериментального изучения патогенеза COVID-19 и не только на чувствительных к вирусу млекопитающих, например сирийских хомяках, хорьках, генномодифицированных гуманизированных мышах линии B6.Cg-Tg (K18-ACE2) и приматах [101-103].

Есть работы о культивировании альвеолоцитов человека, экспрессирующих рецептор ангиотензинпревращающего фермента рецептора типа 2 (ACE2) в виде сферул (органоидная модель), которые позволяют моделировать воспалительные реакции, опосредованные IFN [101]. Несколько исследований показали, что SARS-CoV-2 очень чувствителен к предварительному лечению IFN-I и -III [101, 104]. Обработка альвеолосфер IFN повторяет особенности вирусной инфекции, потерю сурфактантных белков и апоптоз, включая гибель клеток. Напротив, альвеолосферы, предварительно обработанные низкими дозами IFN, показывают снижение репликации вируса, что свидетельствует о профилактической эффективности IFN против SARS-CoV-2. Таким образом, альвеолосферы на основе человеческих стволовых клеток дают новое представление о патогенезе COVID-19 и могут служить моделью для понимания респираторных заболеваний человека.

Получило распространение и направление исследования созданных в лабораторных условиях вирусов (icSARS-CoV-2) путем сборки фрагментов комплементарной ДНК (кДНК), охватывающих геном белков SARS-CoV-2. РНК,

транскрибированная с такой полногеномной кДНК, была высокоинфекционной, а ее генетические и белковые производные в эксперименте в клеточных культурах позволили получить новые данные и явились основой для биотехнологических разработок [104]. На моделях изучена молекулярная эволюция вируса в период с 2019 по 2022 год [105] и показано иммуноингибирующее направление его изменчивости [106]. Как и ожидалось, SARS-CoV-2 на основе нескольких белков-антагонистов IFN, которые он кодирует, уменьшает или задерживает экспрессию IFN (по сравнению с вирусом гриппа А, например). При этом он ингибирует не только выработку IFN, но и его сигнальные пути, что удалось продемонстрировать при лечении рекомбинантным IFN, после которого снижение экспрессии IFN и секреторных иммуноглобулинов сохранялось. Аналогичным образом, инфицирование культур легких человека *ex vivo* не приводит к экспрессии IFN-I, -II или -III в пневмоцитах 1 и 2 типа и альвеолярных макрофагах [106, 107]. Таким образом, хотя макрофаги продуцируют большое количество IFN при других вирусных инфекциях, SARS-CoV-2 ингибирует экспрессию IFN в этих клетках, нарушая ключевую противовирусную защиту и усугубляя течение заболевания [107, 108].

В отличие от этих результатов, демонстрирующих дефекты передачи сигналов IFN, другие исследователи обнаружили, что уровень IFN повышается после заражения первичных органоидных культур SARS-CoV-2. Также в органоидах на основе стволовых клеток легких человека (альвеолосферах) профилирование транскриптома через 48 часов после заражения выявило повышенную экспрессию IFN и хемокинов по сравнению с имитацией инфекции [55]. Подобная модельная система продемонстрировала устойчивую экспрессию иммуноглобулинов, несмотря на минимально повышенный уровень IFN-I, что указывает на то, что их экспрессия происходит независимо. Такие противоречивые результаты требуют дальнейших исследований.

*Реакция SARS-CoV-2 на IFN на животных моделях.* Животные модели, воспроизводящие особенности COVID-19 и иммунные реакции на SARS-CoV-2, необходимы для изучения патогенеза COVID-19 и разработки средств лечения.

Поскольку у людей не было ранее существовавшего иммунитета к SARS-CoV-2, в разгаре пандемии существовала острая необходимость в разработке терапевтических средств и вакцин. В феврале 2020 года Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) собрала международную группу для разработки животных моделей для COVID-19 с целью ускорения тестирования вакцин и терапевтических средств. Каждая из моделей млекопитающих различается по патогенезу и развитию противовирусного иммунного ответа.

Иммунокомпетентные мыши дикого типа устойчивы к заражению оригинальными штаммами SARS-CoV-2, поскольку вирус не может использовать мышиный ACE2 для проникновения в клетки. Для преодоления этой проблемы разработано множество моделей, включая трансдукцию мышей аденовирусными векторами, экспрессирующими человеческий ACE2, создание трансгенных мышей по ACE2 человека и заражение мышей адаптированным к мыши вирусом [109]. Также ученые создавали новые вирусы SARS-CoV-2, адаптированные к лабораторным мышам, которые охватывали множественные аспекты болезни COVID-19 у стандартных животных.

Эти модели SARS-CoV-2 позволяют выполнить весь необходимый спектр исследований. Получен ряд интересных данных, отражающих фундаментальные патогенетические механизмы иммунопатологии COVID-19, ранее не изученные у человека.

В опытах на мышах с моделью отсутствия рецепторов IFN-I и -II, при инфицировании SARS-CoV-2 показано более тяжелое течение заболевания по сравнению с животными с нормальным иммунитетом [110], что демонстрирует ключевую роль IFN в защите от COVID-19. Заражение трансгенных мышей K18-hACE2, у которых экспрессия ACE2 человека управляется промотором цитокератина 18 приводит к продолжительному увеличению IFN-I, -II и -. III, в динамике, коррелирующей с экспрессией IFN у пациентов в соответствии с фазой и тяжестью течения COVID-19 [111, 112]. Длительная экспрессия IFN у мышей, инфицированных SARS-CoV-2, также способствует гипервоспалительной реакции, усугубляет течение заболевания и потенцирует летальные исходы [113,

114], что схоже с человеком. Также у мышей линии K18-hACE2, инфицированных SARS-CoV-2, выявили инфильтраты иммунных клеток в интерстициальной ткани легких, что сопровождалось потерей веса и тяжелым течением COVID-19 [112]. Напротив, профилактическое и раннее терапевтическое лечение интерфероном защищает мышей BALB/c от SARS-CoV-2 [110]. То есть, ранняя активность IFN защищает от SARS-CoV-2, а низкая его выработка, спровоцированная вирусными белками и обусловленная иммунодефицитом, является опасной и неадаптивной стратегией борьбы с SARS-CoV-2 у млекопитающих животных и человека.

Не только мыши, но и другие различные лабораторные млекопитающие животные, в частности хомяки, хорьки и приматы (кроме человека), использовались для моделирования различных аспектов COVID-19 с целью разработки противовирусных препаратов и исследования патогенеза COVID-19 у людей. Хомяки и хорьки восприимчивы к инфекции SARS-CoV-2 и могут передавать вирус неинфицированным животным, что позволяет изучать передачу вируса. Приматы также естественно восприимчивы к SARS-CoV-2 и, будучи животными, наиболее близкими к человеку, представляют собой важную модель для доклинических испытаний терапевтических средств и вакцин [109].

Заражение хомяков, хорьков и приматов чаще приводит к легкой клинической форме заболевания, при этом летальная инфекция наблюдается только у хомяков старческого возраста в тяжелой форме, вплоть до летального исхода, что представляет собой первую летальную модель с использованием генетически не модифицированных животных [115]. Выздоровевшие и повторно зараженные хомяки не передавали вирус особям, ранее не сталкивавшимся с ним, и это сопровождалось наличием нейтрализующих антител у экспериментальной группы животных. Эти результаты показывают, что инфекция SARS-CoV-2 вызывает защитный иммунитет, который не только предотвращает повторное воздействие, но и ограничивает передачу, они были ценны в стратегиях здравоохранения и в разработке вакцин в первые годы пандемии. Заражение хомяков и хорьков SARS-CoV-2 не приводит к реакции IFN- $\beta$ . Также выполнены исследования, показавшие, что SARS-CoV-2 циркулирует в популяциях собак и

кошек, но его циркуляция слишком низкая, и домашние животные не выступают в качестве эпидемиологически значимого вирусного резервуара [116-118].

Изучение динамики системного ответа на SARS-CoV-2 у хомяков с помощью гистологического анализа и транскрипционного профилирования, показало, что инфекция приводит к стабильно высокому уровню вируса в верхних и нижних дыхательных путях и спорадическому появлению в других тканях. Усиление противовирусного ответа с помощью интраназального введения рекомбинантного IFN-I уменьшает вирусную нагрузку, предотвращает передачу и снижает воспаление в данной модели *in vivo*. В этом исследовании определяется системная реакция организма на инфекцию SARS-CoV-2 и обосновывается использование интраназального IFN-I в качестве эффективного средства раннего лечения.

У приматов наблюдается более сильный ответ IFN на инфекцию SARS-CoV-2, чем у других животных моделей [119, 120]. Необходимы дополнительные исследования, чтобы понять, почему у приматов развивается более устойчивая реакция IFN по сравнению с другими инфицированными животными. Следует отметить, что профилактическое лечение приматов, отличных от человека, IFN с последующим заражением SARS-CoV привело к снижению вирусной нагрузки и повреждению легких по сравнению с необработанными животными, что еще раз указывает на то, что ответ IFN-I является защитным [121].

Опираясь на материалы доступной литературы и не изученные ранее данные, учитывая современные клинические и экспериментальные методические возможности исследования иммунного ответа, нами запланировано комплексное клиничко-экспериментальное исследование патофизиологических особенностей иммунного ответа у переболевших COVID-19 и вакцинированных «Гам-Ковид-Вак».

## ГЛАВА 2

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1. Дизайн исследования

Работа клинико-экспериментальная. Общий дизайн исследования отражен на рисунке 4.

*В клиническом исследовании* приняли участие лица (n=205) возраста 18-60 лет с отсутствием сопутствующих заболеваний и состояний, связанных с нарушениями иммунитета, не принимающих иммуномодулирующие препараты, ПЦР-негативные в момент исследования и давшие согласие на него.

Выполнено два этапа работы с оценкой содержания антител и оценкой Т-клеточного иммунного ответа у переболевших, вакцинированных и лиц без инфекционного и вакцинального анамнеза COVID-19: 1) проспективное одномоментное обсервационное исследование (n=103) в 2020 году; 2) проспективное одномоментное обсервационное исследование (n=102) в 2021 году. Оба этапа имели схожий дизайн, отличались датами выполнения работ, вероятно, преобладающими патогенными штаммами вируса в эти периоды пандемии [23], а также формированием выборки контрольной группы.

В каждом из этапов проанализирована база данных об исследуемых (перенесших COVID-19, вакцинированных от COVID-19, не вакцинированных от COVID-19 и ранее не переболевших (группа контроля) с отрицательным катамнезом выявления SARS-CoV-2 методом ПЦР непосредственно перед проведением исследования). Материалом исследования были образцы венозной крови.

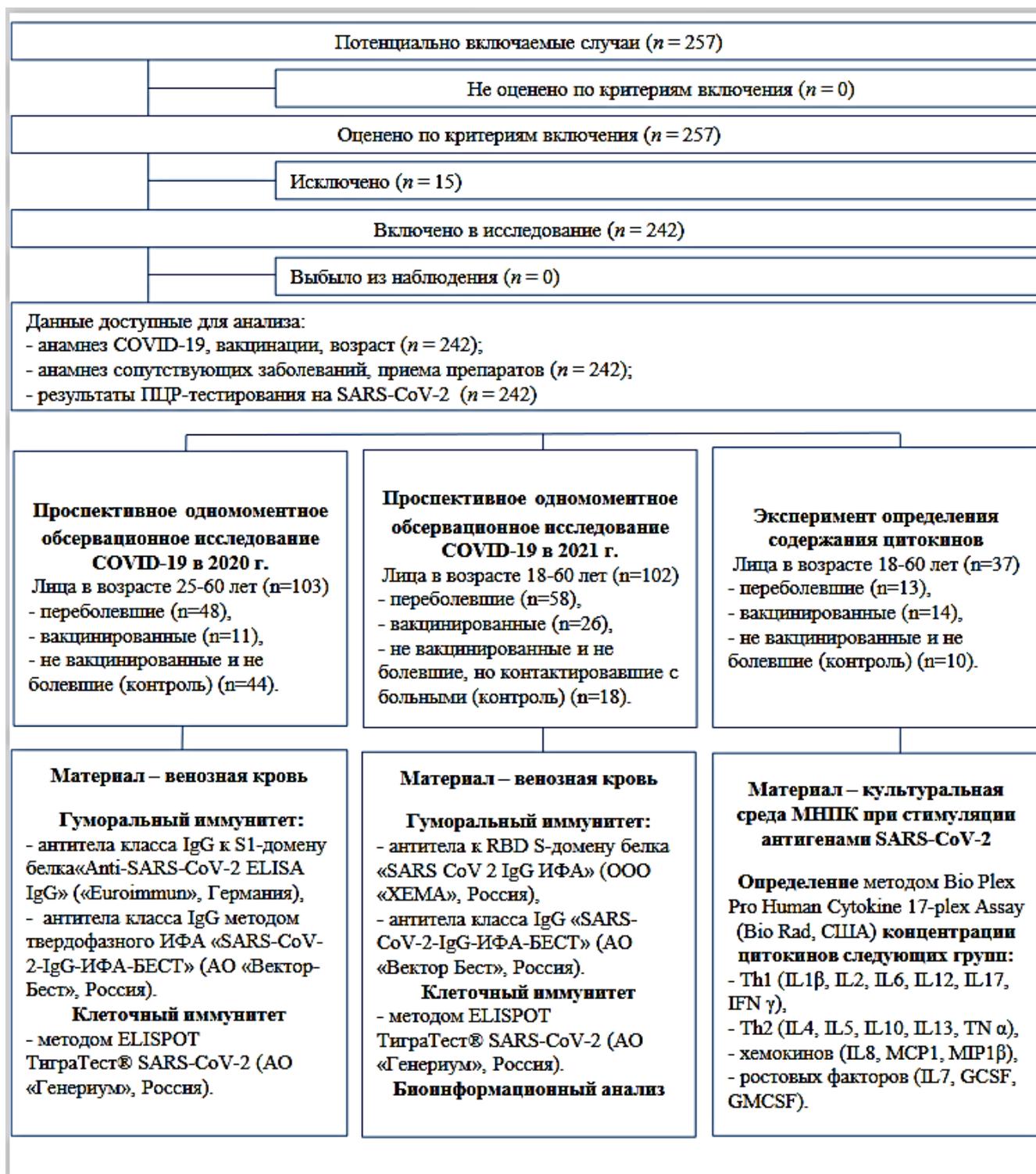


Рисунок 4. Дизайн исследования патофизиологических особенностей иммунного ответа у переболевших COVID-19 и вакцинированных «Гам-Ковид-Вак».

Для оценки гуморального и клеточного иммунитета у указанных групп лиц применены лабораторные методы:

1. Определение содержания антител класса IgG к белкам SARS-CoV-2 в сыворотке крови наборами реагентов: «Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG» антитела к S1-домену белка шипа, полуколичественное определение методом ИФА («Euroimmun», Германия); «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» методом твердофазного ИФА (АО «Вектор-Бест», Россия); к рецептор-связывающему домену (RBD) S белка «SARS CoV 2 IgG ИФА» (ООО «ХЕМА», Россия).

2. Исследование Т-клеточного иммунного ответа методом ELISPOT из образцов периферической венозной крови выполняли в соответствии с инструкцией производителя набора ТиграТест® SARS-CoV-2 (ООО «Генериум», Россия).

*Также проведен эксперимент* определения содержания цитокинов в среде культивирования МНПК при специфической и неспецифической их стимуляции антигенами SARS-CoV-2 у тех же трех категорий обследуемых. Также участвовали лица (n=37) возраста 18-60 лет аналогично трех категорий: переболевшие, вакцинированные и лица без инфекционного и вакцинального анамнеза COVID-19 с отсутствием сопутствующих заболеваний и состояний, связанных с нарушениями иммунитета, не принимающих иммуномодулирующие препараты, ПЦР-негативные в момент исследования и давшие согласие на него.

Материалом были образцы культуральной среды МНПК, полученные в ходе оценки Т-клеточного иммунного ответа. Определение концентрации цитокинов выполнено мультиплексным методом с использованием 17-плексной панели Bio Plex Pro Human Cytokine 17-plex Assay («Bio Rad», США). Определяли содержание цитокинов групп Th1 (IL 1 $\beta$ , IL 2, IL 6, IL 12, IL 17, IFN  $\gamma$ ), Th2 (IL 4, IL 5, IL 10, IL 13, TNF  $\alpha$ ), хемокинов (IL 8, MCP 1, MIP 1 $\beta$ ) и ростовых факторов (IL 7, G CSF, GM CSF). Для измерений использовали проточный лазерный флуориметр Bio Plex 200 (Bio Rad, США). Результаты измерений обработаны с помощью приложения Bio Plex Manager 6,0 Properties («Bio Rad», США).

*Детализация этапов работы.*

*1. Проспективное одномоментное обсервационное исследование (n=103) в 2020 году.*

*Объектом* исследования были образцы венозной крови и база данных лиц, перенёвших заболевание COVID-19, лиц, вакцинированных от COVID-19, а также лиц, не вакцинированных от COVID-19, у которых в анамнезе не было положительного анализа ПЦР на SARS-CoV-2.

*Базой* проведенного исследования был ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум».

*Группы субъектов и объем выборки составили:*

1) переболевшие (n=48) - лица с подтвержденным лабораторными методами (ПЦР и/или серологическими) или компьютерной томографией заболеванием COVID-19;

2) вакцинированные «Гам-Ковид-Вак» (n=11);

3) контрольная группа (n=44) – не вакцинированные и не болевшие «условно здоровые».

*Методы исследования.*

1. Определение содержания антител к белкам SARS-CoV-2 класса IgG в сыворотке крови наборами реагентов в соответствии с инструкцией производителя:

- антитела IgG к S1-домену белка шипа, «Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG», полуколичественное определение, ИФА («Euroimmun», Германия);

- антитела IgG «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» методом твердофазного иммуноферментного анализа («Вектор-Бест», Россия).

2. Исследование Т-клеточного иммунного ответа методом ELISPOT в периферической венозной крови в соответствии с инструкцией производителя набора ТиграТест® SARS-CoV-2 (АО «Генериум», Россия).

3. Статистическая обработка результатов, включая определение достоверности различий между группами и ROC (receiver operating characteristic) анализ, выполнялась с использованием программы GraphPad Prism 6.

*Критерии включения:* подписание информированного согласия на участие в исследовании, возраст 25 – 60 лет, отрицательный анализ ПЦР при взятии крови для исследования, отсутствие сопутствующих заболеваний и состояний,

связанных с нарушениями иммунитета (аутоиммунные заболевания, злокачественные новообразования, ВИЧ-инфекция), отсутствие лечения иммуномодулирующими препаратами в течение 3 месяцев до участия в исследовании.

В группу 1 («переболевшие») включали лиц, перенесших заболевание с различными степенями тяжести (легкой, средней и тяжелой степенью тяжести), не менее, чем через 30 дней после последнего положительного результата ПЦР-анализа на SARS-CoV-2. У переболевших COVID-19 кровь отбирали в интервале от 2 недель до 9 месяцев после исчезновения симптомов заболевания или наличия отрицательного теста ПЦР.

В группу 2 («вакцинированные») включали образцы крови лиц, вакцинированных полным курсом с использованием двухкомпонентной комбинированной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» (ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Россия), представляющей собой рекомбинантные аденовирусные частицы, содержащие ген S-белка этого вируса. В соответствии с рекомендациями производителя компоненты вакцины вводили с интервалом в 21 день. Взятие крови у вакцинированных происходило в интервале 3–6 недель после получения всех необходимых доз вакцины.

В контрольную группу 3 («не вакцинированные и не болевшие», «условно здоровые», возможно «контактные») включали субъектов, отрицающих перенесенное заболевание COVID-19 или его симптомы в анамнезе, а также лиц, заявляющих о близком и/или продолжительном контакте с больными COVID-19, не менее, чем через 15 дней после контакта с ПЦР-положительным больным COVID-19.

*Критерии невключения:* вакцинированные пациенты какой-либо другой вакциной против COVID-19, для женщин беременность или период лактации, наличие какого-либо аутоиммунного заболевания, злокачественного новообразования или ВИЧ-инфекции; лечение иммуномодулирующими препаратами в течение 3 месяцев до участия в исследовании.

*Критерии исключения:* отказ пациента от участия в исследовании, наличие положительного результата ПЦР-теста на COVID-19 в момент сдачи крови (на основании этого критерия исключены 10 участников).

*II. Проспективное одномоментное наблюдательное исследование (n=102) в 2021 году.*

*Объектом* исследования были образцы венозной крови и база данных лиц, перенёвших заболевание COVID-19, лиц, вакцинированных от COVID-19, а также лиц, не вакцинированных от COVID-19, у которых в анамнезе не было положительного анализа ПЦР на SARS-CoV-2.

*База* проведения научного исследования: ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Лаборатория клинической иммунологии.

*Группы субъектов и объем выборки составили:*

1) переболевшие (n=58) – лица с подтвержденным лабораторными методами (ПЦР и/или серологическими) или компьютерной томографией заболеванием COVID-19;

2) вакцинированные «Гам-Ковид-Вак» (n=26);

3) контрольная группа (n=18) – не вакцинированные и не болевшие «условно здоровые».

*Методы исследования:*

1. Определение содержания антител к белкам SARS-CoV-2 класса IgG в сыворотке крови наборами реагентов в соответствии с инструкцией производителя:

- антитела IgG к рецептор связывающему домену (RBD) S белка «SARS-CoV-2 IgG ИФА», (ООО «ХЕМА», Россия).

- IgG антител к S и N белкам SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-AT спектр ИФА БЕСТ» (АО «Вектор Бест», Россия).

2. Исследование Т-клеточного иммунного ответа методом ELISPOT в периферической венозной крови в соответствии с инструкцией производителя набора ТиграТест® SARS-CoV-2 (АО «Генериум», Россия).

3. Биоинформационный кластерный анализ проводили с использованием пакета программ WOLFRAM MATHEMATICA 13.0. Более подробно метод описан в соответствующем подразделе [122].

*Критерии включения:* возраст 18 лет и старше (среди обследуемых не было лиц старше 60 лет); отрицательный анализ ПЦР на SARS-CoV-2 при заборе крови для исследования; отсутствие сопутствующих заболеваний и состояний, связанных с нарушениями иммунитета (аутоиммунные заболевания, злокачественные новообразования, ВИЧ инфекция); отсутствие лечения иммуномодулирующими препаратами в течение 3 месяцев до участия в исследовании.

В группу 1 («переболевшие») включали субъектов, имевших в анамнезе клинический диагноз заболевания COVID-19, подтвержденный положительным ПЦР анализом на SARS-CoV-2. В обследование включали субъектов, перенесших заболевание со степенью тяжести, не потребовавшей лечения с использованием интенсивной терапии в условиях специализированного стационара. Это пациенты с легкой и средней степенью тяжести. Степень тяжести COVID-19 была установлена на основании временных методических рекомендаций Минздрава России «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Легкая степень течения COVID-19: температура тела  $< 38$  °С, кашель, слабость, боль в горле; отсутствие критериев среднетяжелой и тяжелой степени течения COVID-19. Среднетяжелая степень течения COVID-19: температура тела  $> 38$  °С; частота дыхания  $> 22$  в минуту; одышка при физической нагрузке; изменения на КТ (рентгенографии), характерные для вирусного поражения; SpO<sub>2</sub>  $< 95\%$ ; СРБ в сыворотке крови  $> 10$  мг/л.

В группу 2 («вакцинированные») включали лиц, вакцинированных против вируса SARS-CoV-2 полным курсом вакцинации с использованием двухкомпонентной комбинированной векторной вакцины «Гам-Ковид-Вак». В соответствии с рекомендациями производителя компоненты вакцины вводили с интервалом в 21 день в рамках вакцинации сотрудников ФГБУ «НМИЦ АГП им.

В.И. Кулакова» МЗ РФ. Взятие крови у вакцинированных происходило в интервале 3–6 недель после получения всех необходимых доз вакцины.

В контрольную группу 3 («не вакцинированные и не болевшие», «условно здоровые», «контактные») включали субъектов, у которых в анамнезе отсутствуют сведения о заболевании и вакцинации COVID-19. Для исключения неопределенности, вносимой возможными неучтенными контактами указанных субъектов с источником вируса, дополнительным требованием к включению в данную группу было наличие в анамнезе субъекта тесного контакта (семейного или профессионального) с больными COVID-19 во время наличия у последнего клинических проявлений заболевания и положительных ПЦР анализов на SARS-CoV-2.

*Критерии невключения:* вакцинированные пациенты какой-либо другой вакциной против COVID-19, для женщин беременность или период лактации, наличие какого-либо аутоиммунного заболевания, злокачественного новообразования или ВИЧ-инфекции, лечения иммуномодулирующими препаратами в течение 3 месяцев до участия в исследовании.

*Критерии исключения:* наличие положительного результата ПЦР-теста на COVID-19 в момент сдачи крови (на основании этого критерия исключены 5 участников).

Таким образом, на наш взгляд, различие между первым и вторым этапами наблюдений заключается преимущественно в формировании выборки и, если разницей по возрасту можно пренебречь, то отличие контрольной «условно здоровой» группы между исследованиями в 2020 и 2021 году является существенным. В 2020 году контрольная группа была представлена преимущественно лицами, не имевшими контакт с вирусом, а в 2021 году она целенаправленно сформирована добровольцами, заболевание у которых не развивалось при подтвержденном контакте с SARS-CoV-2 (ПЦР-верифицированными больными COVID-19). Несущественным различием является использование разных ИФА реагентов для оценки гуморального иммунитета, доступных в разные периоды. Использование биоинформационного кластерного

анализа позволило полнее охарактеризовать изменения во втором этапе наблюдений 2021 года. На этой же выборке выполнен третий этап работ – экспериментальный.

*III. Эксперимент определения содержания цитокинов (n=37) в культуральной среде МНПК при специфической и неспецифической их стимуляции антигенами SARS-CoV-2.*

*Объектом* исследования были образцы культуральной среды МНПК, полученные в ходе оценки Т-клеточного иммунного ответа и база данных лиц, перенесших заболевание COVID-19, лиц, вакцинированных от COVID-19, а также лиц, не вакцинированных от COVID-19, у которых в анамнезе не было положительного анализа ПЦР на SARS-CoV-2, но контактировавших с больными.

Базой, где выполнено исследование был ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России, Лаборатория клинической иммунологии.

*Группы субъектов и объем выборки составили:*

1) переболевшие (n=13) - лица с подтвержденным лабораторными методами (ПЦР и/или серологическими) или компьютерной томографией заболеванием COVID-19;

2) вакцинированные «Гам-Ковид-Вак» (n=14);

3) контрольная группа (n=10) – не вакцинированные и не болевшие «условно здоровые».

*Методы исследования:*

1. Определение концентрации цитокинов в образцах культуральной среды МНПК, полученных в ходе оценки Т-клеточного иммунного ответа, проводили мультиплексным методом. Определяли содержание цитокинов групп Th1 (IL 1 $\beta$ , IL 2, IL 6, IL 12, IL 17, IFN  $\gamma$ ), Th2 (IL 4, IL 5, IL 10, IL 13, TNF  $\alpha$ ), хемокинов (IL 8, MCP 1, MIP 1 $\beta$ ) и ростовых факторов (IL 7, G CSF, GM CSF).

2. Статистическая обработка полученных количественных данных с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007 и пакета статистических программ MedCalc® Software версия 14.8.1.

Контроль на наличие/отсутствие вируса у субъектов проводили в соскобе, полученном из носоглотки и ротоглотки пациентов с помощью одноразовых зондов (ООО «Алайф-Дафина», Россия). Для выделения РНК использовали набор реагентов ПРОБА–НК (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Амплификацию проводили на приборе ДТ-964 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Обработка результатов осуществлялась автоматически с помощью программного обеспечения к прибору.

## **2.2. Методы изучения гуморального иммунного ответа**

Определение содержания антител к белкам SARS-CoV-2 в сыворотке проводили методом твердофазного ИФА. В работе использовали наборы реагентов для определения IgG антител к рецептор связывающему домену (RBD) S-белка «SARS-CoV-2-IgG-ИФА» (ООО «ХЕМА», Россия) и IgG антител к S- и N-белкам SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-AT спектр-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор Бест», Россия), антител IgG к S1-домену белка шипа «Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG», полуколичественное определение, ИФА («Euroimmun», Германия).

Исследование проводили по инструкциям производителей с измерением оптической плотности на микропланшетном иммуноферментном анализаторе Infinite F50 (Tecan, Австрия). Результаты учитывали по индексу позитивности (ИП), рассчитываемому в соответствии с инструкциями производителей, и субъект считали серопозитивным в случае  $ИП > 1,1$ .

## **2.3. Методы изучения клеточного иммунного ответа**

Исследование Т-клеточного иммунного ответа методом ELISPOT-IGRA в периферической венозной крови в соответствии с инструкцией производителя набора ТиграТест® SARS-CoV-2 (АО «Генериум», Россия), который предназначен для подсчёта Т-лимфоцитов, секретирующих гамма-интерферон (IFN- $\gamma$ ). В основе метода лежит образование иммуноферментных пятен (ELISPOT,

Enzyme Linked SPOT Analysis) на мембране с пришитыми антителами к IFN- $\gamma$  вокруг секретирующих IFN- $\gamma$  Т-лимфоцитов (Interferon Gamma Release Assay, IGRA).

МНПК каждого обследуемого инкубировали в течение 16–24 ч с пептидными антигенами (концентрация каждого пептида в пуле составляла 2 мкг/мл). Индивидуальный тест для каждого донора состоял из 4 лунки:

- отрицательный контроль, без стимуляции МНПК (питательная среда AIM V + AlbuMAX);
- стимуляция пептидами S-белка (АГ1);
- стимуляция пептидами белков N, M, ORF3a и ORF7a (АГ2);
- положительный контроль (стимуляция всех жизнеспособных и функционально активных Т-клеток с помощью антитела к CD3, клон ОКТ-3).

В каждую лунку вносили 350000 МНПК. На поверхности иммунологического планшета для ELISPOT (MultiScreen HTS IP с мембраной Durapore PVDF Merck-Millipore, кат. № MVHVN4525) было предварительно сорбировано моноклональное антитело к IFN- $\gamma$  (производство МБЦ «Генериум», клон К48). После 20-ти часовой инкубации в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (при T=37°C) и отмывки пятна проявляли с помощью другого антитела к IFN- $\gamma$ , конъюгированного со щелочной фосфатазой (производство МБЦ «Генериум», клон 1G9) и хромогенного субстрата BCIP/NBT (5-бromo-4-хлоро-3-индолил-фосфат/нитросиний тетразолия хлорид, Sigma-Aldrich). Подсчет пятен (спотов) производили как визуально под стереомикроскопом, так и с помощью специализированного ELISPOT ридера AID Classic ELR08 (AID GmbH, Германия). Величину Т-клеточного ответа выражали как количество подсчитанных пятен в лунке АГ1 или АГ2 за вычетом количества пятен в отрицательном контроле (без стимуляции антигенами). Критерием приемлемости теста были результаты положительного и отрицательного контролей. В положительном контроле должно было быть не менее 100 пятен, в отрицательном контроле — не более 14 пятен. Наличие более 14 пятен в К- могло свидетельствовать об остром воспалительном процессе или о случайном

загрязнении образца клеток эндотоксинами. Наличие в К<sup>+</sup> менее 100 спотов могло свидетельствовать о функциональной недостаточности лимфоцитов. В обоих случаях донору предлагали повторно сдать кровь через 1–2 недели для исключения ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Схема выполненных работ отражена на рисунке 5.

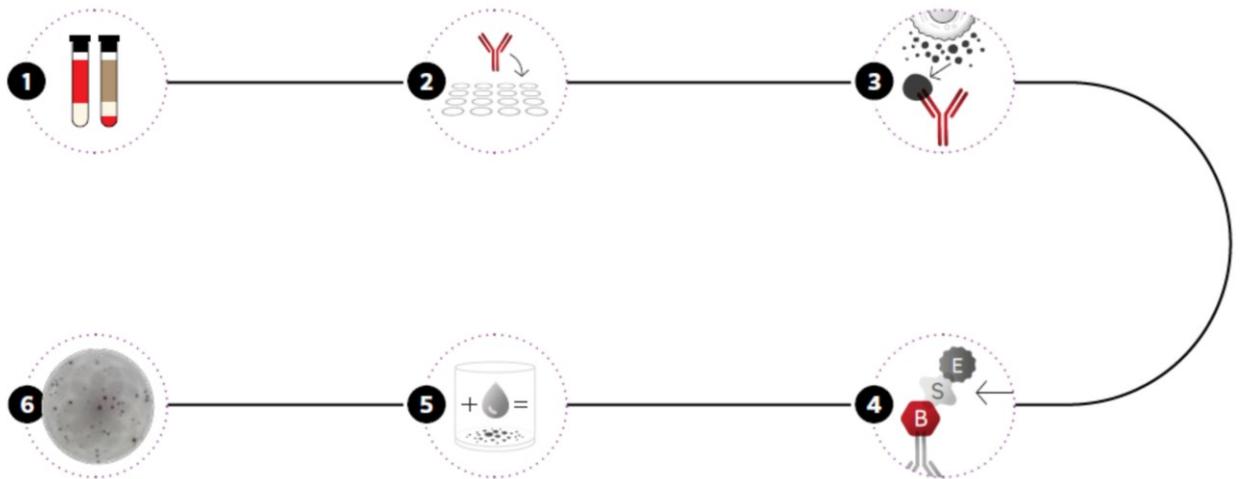


Рисунок 5. Общая схема выполнения испытания с использованием набора реагентов «ТиграТест SARS-CoV-2».

Обозначения к рисунку: 1 – взятие крови и выделение МНПК, 2 – добавление антигенов вируса SARS-CoV-2 к отмытым МНПК в лунках планшета, 3 – инкубация планшетов, в ходе которой активированные Т-клетки выделяют IFN- $\gamma$ , связывающийся с антителами, фиксированными на дне планшета, 4 – добавление вторичных конъюгированных антител к IFN- $\gamma$ , 5 – добавление хромогенного субстрата, развитие цветной реакции. Каждое пятно (спот) соответствует отдельной Т-клетке, вырабатывающей IFN- $\gamma$  в ответ на стимуляцию антигенами вируса SARS-CoV-2, 6 – подсчет количества пятен.

Выделение и анализ пятен в лунках проводили с помощью обработки электронных изображений средствами пакета программ ImageJ 153e (National Institutes of Health, США). Полученные черно-белые изображения с одинаковым разрешением подвергались анализу для частиц (Analyze Particles) с определением

количества частиц и их площадей в пикселах. В анализ включали пятна с площадью не менее 90% процентиля распределения площадей всей совокупности всех пятен, полученных в лунках без стимуляции субъектов контрольной группы. По рекомендациям производителя результат испытания на наличие Т-клеточного иммунного ответа на антигены вируса SARS-CoV-2 считали положительным, если разница между количеством пятен в лунках без стимуляции и при стимуляции МНПК антигенами хотя бы одним набором антигенов превышала 12.

Ответ большого количества клеток при неспецифической стимуляции ОКТ-3 (murine monoclonal anti-CD3 antibody) приводит к образованию слившихся пятен от нескольких клеток и искажению результатов испытания. Исходя из этого, соответствующие данные были исключены из анализа результатов определения количества активированных Т-лимфоцитов, продуцирующих INF- $\gamma$

#### **2.4. Методы изучения цитокинов в эксперименте**

Образцы венозной крови получали из биобанка сразу после его взятия у лиц, включённых в исследование. В пробирки BD Vacutainer («Becton Dickinson», NJ, США) с цитратом натрия отбирали 8 мл периферической венозной крови из локтевой вены субъекта для выделения мононуклеаров периферической крови (МНПК), а в сухие пробирки BD Vacutainer отбирали ещё по 1 мл той же крови для получения сыворотки. МНПК выделяли общепринятым методом в градиенте плотности ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>) на основе раствора фиколла (НПП "ПанЭко", Россия). Сыворотку крови отделяли центрифугированием в течение 20 минут при 1000 g для осаждения сгустка компонентов свёртывающей системы крови, образовавшегося при инкубации цельной крови в течение 30 минут при комнатной температуре.

Определение концентрации цитокинов в образцах культуральной среды МНПК, полученных в ходе оценки Т-клеточного иммунного ответа, проводили мультиплексным методом с использованием 17-плексной панели Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-plex Assay (Bio-Rad, США). Для измерений использовали

проточный лазерный флуориметр Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США). Результаты измерений обрабатывали с помощью приложения Bio-Plex Manager 6,0 Properties (Bio-Rad, США).

## 2.5. Методы статистической обработки результатов

Сбор данных, их последующую коррекцию, систематизацию исходной информации и визуализацию полученных результатов осуществляли в электронных таблицах Microsoft Office Excel (2016). Статистическую обработку результатов проводили средствами языка Питон (Python 3.11.).

Количественные показатели оценивали на предмет соответствия нормальному распределению, для этого использовался критерий Шапиро-Уилка. Проверка на нормальность распределения показала, что данные в исследовании не имеют нормального распределения. Поэтому в дальнейшем расчеты производили методами непараметрической статистики.

В качестве центра распределения была посчитана медиана, а в качестве показателей вариации – квартили (Me [Q1; Q3]). Для сравнения двух несвязанных выборок использовался U-критерий Манна-Уитни. Для сравнения трех и более несвязанных выборок использовали критерий Краскела-Уоллиса, являющийся непараметрической альтернативой однофакторного дисперсионного анализа.

С целью изучения взаимосвязи между явлениями, представленными количественными данными использовался непараметрический метод – *расчет коэффициента ранговой корреляции Спирмена* ( $r$ ), для дихотомических переменных – коэффициент корреляции Мэтьюса. Интерпретацию полученных значений корреляции производили по Шкале Чеддока: слабая — от 0,1 до 0,3; умеренная — от 0,3 до 0,5; заметная — от 0,5 до 0,7; высокая — от 0,7 до 0,9; весьма высокая (сильная) — от 0,9 до 1,0 [122]. Коэффициент корреляции дополнен 95% доверительным интервалом (ДИ). 95% доверительный интервал рассчитывали методом Бутстреп (Bootstrap) при выборке 1000 экземпляров.

Результаты качественных признаков выражены в абсолютных числах с указанием долей (%). Сравнение номинальных данных в группах проводили при помощи критерия  $\chi^2$  Пирсона. В тех случаях, когда число ожидаемых наблюдений в любой из ячеек четырехпольной таблицы было менее 10, для оценки уровня значимости различий использовали точный критерий Фишера.

Различия считались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

*Однофакторный логистический анализ и отношение шансов.* Оценку риска определенного исхода в зависимости от количественной переменной выполняли при помощи метода однофакторной логистической регрессии. Выбор метода обусловлен тем, что зависимая переменная является дихотомической, а независимые переменные характеризуют как категориальные, так и количественные признаки.

В качестве количественной меры эффекта при сравнении качественных (дихотомических) показателей использовали показатель отношения шансов (ОШ). С целью проецирования полученных значений ОШ на генеральную совокупность рассчитывали границы 95% доверительного интервала (95% ДИ). Исходя из полученных данных, значимость взаимосвязи исхода и фактора считали доказанной в случае нахождения доверительного интервала за пределами границы отсутствия эффекта, принимаемой за 1.

*Анализ ROC-кривых.* Для оценки диагностической значимости количественных признаков при прогнозировании определенного исхода, в том числе вероятности наступления исхода, рассчитанной с помощью регрессионной модели, применяли метод анализа ROC-кривых. С его помощью определяли оптимальное разделяющее значение (cut-off) количественного признака, позволяющее классифицировать пациентов по степени риска исхода, обладающее наилучшим сочетанием чувствительности и специфичности. Разделяющее значение количественного признака в точке cut-off определяли по максимальному значению чувствительности и специфичности.

Для оценки диагностической значимости качественных признаков при прогнозировании определенного исхода использовали расчет точности, чувствительности, специфичности и ROC AUC.

*Многофакторный логистический анализ.* Для построения модели предсказания наличия/отсутствия признака была использована множественная/многофакторная логистическая регрессия (МЛР). Выбор метода обусловлен тем, что зависимая переменная является дихотомической, а независимые переменные характеризуют как категориальные, так и количественные признаки. Отбор независимых переменных производили методом пошаговой обратной селекции с использованием в качестве критерия исключения статистики Вальда.

Статистическая значимость полученной модели определяли с помощью критерия  $\chi^2$ .

### ГЛАВА 3

## ДЕМОГРАФИЧЕСКИЕ И КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ УЧАСТНИКОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Расчет минимального объема выборки производили с помощью программы Microsoft 365 и основан на сравнении количества пятен в испытании с использованием тест-системы «ТиграТест SARS-CoV-2» в трех группах: переболевшие COVID-19, вакцинированные, имевшие контакт с больными COVID-19. Изучаемый признак количественный, объем генеральной совокупности не известен. Уровень значимости принят за 0,05 (или 95 %). Разницу считали статистически значимой при  $p < 0,05$ . По результатам проведенного исследования Oxford Immunotec Ltd [123] и по нашим предварительным оценкам, средние значения и среднеквадратичные отклонения количества пятен по лункам с АГ1 (N1) (S-белок) и АГ2 (N2) (микс М, N, ORF3, ORF7) представлены в таблице 1.

Таблица 1. Количество пятен в лунках при исследовании методом ELISPOT  
(указаны средние значения и среднеквадратичные отклонения)

Антиген	Переболевшие	Контактные	Вакцинированные
АГ1 (N1) (S-белок)	10-15±2	8-11±2	30-40±10
АГ2 (N2) (микс М, N, ORF3, ORF7)	30-45±10	12-20±10	20-30±7

Для расчета размеры выборки были использованы формулы (1, 2).

$$n_1 = \frac{\sigma_1^2 * t^2 + \sigma_2^2 * t^2}{X_1 - X_2} \quad (1),$$

$$n_2 = \frac{\sigma_2^2 * t^2}{(X_1 - X_2) - \frac{\sigma_1^2 * t^2}{n_1}} \quad (2),$$

где  $t$  при уровне значимости 0,05 равен 1,96.

При оценке минимального объема выборки при попарном сравнении исследуемых групп было определено, что минимальное значение объема выборки, подходящее для сравнения 3 групп (переболевшие, контактные и вакцинированные) по выбранным двум количественным показателям (с АГ1 (N1) и АГ2 (N2)), составило 9 человек в каждой группе. Учитывая, что число пациентов, выбывших из-под наблюдения, может составить не менее 20 %, общий минимальный объем выборки в каждой группе составляет  $9 \times 1,2 = 11$  участников. Итого,  $11 \times 3 = 33$  человека, число включенных в исследование пациентов должно быть не менее 33 человек, по 11 человек в каждой группе.

*Конечные точки исследования.*

1. Первичная конечная точка:

T-клеточный иммунный ответ у переболевших COVID-19 и у вакцинированных «Гам-Ковид-Вак». Подсчет количества спотов (пятен, точек) в ответ на стимуляцию МНПК антигенами вируса SARS-CoV-2: панель AG1 (пептиды с эпитопами S-белка шипа оболочки вируса) и панель AG2 (пептиды с эпитопами M-белка, N-белка и белков ORF3 и ORF7) методом ELISPOT.

2. Вторичные конечные точки:

А) Оценка наличия в сыворотке крови у переболевших COVID-19 и у вакцинированных «Гам-Ковид-Вак» антител класса IgG к рецептор-связывающему домену S белка (IgG S\_X), антител класса IgG ко всем эпитомам S белка (IgG S\_B), включая рецептор-связывающий домен, и антитела класса IgG к нуклеокапсидному N белку (IgG N\_B) вируса SARS-CoV-2. Индексы позитивности (ИП) по результатам ИФА.

В) Содержание цитокинов в среде культивирования МНПК у переболевших COVID-19 и у вакцинированных «Гам-Ковид-Вак» (относительная концентрация в %) при отсутствии стимуляции, при неспецифической стимуляции ОКТ3 и при специфической стимуляции пептидами вируса SARS-CoV-2 в виде наборов AG1 и AG2.

Расчет мощности критериев выборки был произведен с помощью программы G\*Power v.3.1.9.7. Необходимо определить Post hoc: achieved power –

given  $\alpha$ , sample size and effect size при сравнении количества пятен в испытании с использованием тест-системы «ТиграТест SARS-CoV-2» в трех группах: переболевшие COVID-19, вакцинированные и имевшие контакт с больными COVID-19. Изучаемый признак количественный, объем генеральной совокупности не известен. Уровень значимости ( $\alpha$  err prob) принят за 0,05 (или 95 %). Effect size рассчитывался исходя из данных имеющихся размеров выборок и средних по каждой группе и по среднеквадратичному отклонению отклонения количества пятен по лункам с АГ1 (N1) (S-белок) и АГ2 (N2) (микс M, N, ORF3, ORF7) в обеих группах на основании данных, приведенных в таблицах 2-5.

Таблица 2. Среднее значение количества пятен в группах

Номер группы	Название группы	Среднее по АГ1 (N1) (S-белок)	Среднее по АГ2 (N2) (микс M, N, ORF3, ORF7)
3	Контактные	12,3	20,2
1	Переболевшие	42,8	92,4
2	Вакцинированные	67,9	23,6

Таблица 3. Среднеквадратичное отклонение количества пятен в группах

Группы	Среднеквадратичное отклонение по АГ1 (N1) (S-белок)	Среднеквадратичное отклонение по АГ2 (N2) (микс M, N, ORF3, ORF7)
1-3	50,2	131,5
1-2	64,0	157,6
2-3	39,3	36,1

Итого, можно сделать вывод, что достаточный уровень мощности достигается при сравнении по АГ 1 при сравнении групп 1-3 и 2-3 (>80 %) и при сравнении по АГ 2 при сравнении групп 1-3. В остальных случаях уровень мощности недостаточен для подтверждения отсутствия статистически значимой разницы между группами. Однако, если требуется доказать наличие статистически значимой разницы, то размер выборок можно считать достаточным.

Таблица 4. Количество пациентов в группах

Номер группы	Название группы	1-3	1-2	2-3
3	контактные	44	-	44
1	переболевшие	48	48	
2	вакцинированные	-	11	11

Таблица 5. Количество пациентов в группах

Исследуемый параметр	1-3	1-2	2-3
ТиграТест® SARS-CoV-2 N1	89,30 %	31,30 %	99,30 %
Effect size	0,60	0,39	1,41
ТиграТест® SARS-CoV-2 N2	83,30 %	36,20 %	8,55 %
Effect size	0,55	0,44	0,09

*Проспективное одномоментное наблюдательное исследование 2020 года.* В исследование был отобран биоматериал 103 лиц. В группу контроля вошли 44 субъекта, в группу переболевших – 48 и в группу вакцинированных – 11. Всего в исследование были включены 64 женщины (62,1 %) и 39 мужчин (37,9 %). Средний возраст участников исследования без учёта групповой принадлежности составил 39,0 (35,0; 44,5) лет (табл. 6). Выделенные группы статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) различаются по полу.

На данном этапе работ было несколько обследуемых с тяжелой формой COVID-19, однако преобладали лица с заболеванием в легкой форме (табл. 7).

Особенности субъектов, перенесших COVID-19, с учётом рекомендаций МЗ РФ [123] обобщены в таблице 8. Отличительными признаками лёгкой формы COVID-19 были регистрация субфебрильной температуры, отсутствие поражения лёгких и других признаков тяжёлого и среднетяжёлого течения инфекции. Для заболевания средней степени тяжести отличительными признаками были регистрация температуры выше субфебрильной ( $38,0^{\circ}\text{C}$ ) и наличие поражения лёгких не более 50 % по данным компьютерной томографии, тяжелой – более 50% испытуемых.

Таблица 6. Характеристика групп обследованных лиц в 2020 году

Группа субъектов	Всего лиц (n)	Количество женщин, n (%)	Количество мужчин, n (%)	Возраст, лет Me (Q1; Q3)	Срок обследования субъекта от даты события, дни Me (Q1; Q3) **
Контроль	44	33 (75,0)	11 (25,0) *	40.0 (36,8; 45,0)	-
Переболевшие	48	28 (58,0)	20 (42,0)	36.0 (34,0; 43,0)	92,0 (38,0; 214,5)
Вакцинированные	11	3 (27,0)	8 (73,0) *	40.0 (35,5; 43,0)	57,5 (54,0; 61,8)

Примечание: \* - достоверные различия между группой мужчин и женщин при  $p \leq 0,05$ ; \*\* - у переболевших субъектов указан срок от первого положительного заключения по результатам анализа ПЦР, в случае вакцинированных субъектов указан период после введения второго компонента вакцины (второй компонент вакцины вводили через 21 день после первого).

Таблица 7. Степень тяжести заболевания COVID-19 обследованных в 2020 году

Параметр	Переболевшие, абсолютное число (%)	% (95 % ДИ)
Степень тяжести заболевания	(n=48)	-
1 – легкая	33 (69,0 %)	68,8 % (55,6 %; 81,9 %)
2 – средняя	10 (21,0 %)	20,8 % (9,3 %; 32,3 %)
3 – тяжелая	5 (10,0 %)	10,4 % (1,8 %; 19,1 %)

Среди клинических проявлений, наблюдаемых при разных степенях тяжести заболевания, регистрировали снижение/потерю обоняния, лихорадку, головную боль, общую слабость, миалгию и кашель. Размах длительности клинических проявлений заболевания у обследованных субъектов составил от 3 до 30 дней. Среди переболевших степень тяжести пневмонии по данным КТ составила – легкая форма КТ-1 - 40 (83,0 %), КТ-2 - 2 (4,0 %), КТ-3 - 6 (12,0 %).

Таблица 8. Клинические характеристики протекания заболевания у перенесших COVID-19 (n=48) в 2020 году

Снижение/потеря обоняния, n (%)	36 (75,0 %)
Головная боль, n (%)	17 (35,0 %)
Миалгия, n (%)	19 (40,0 %)
Кашель, n (%)	15 (31,0 %)
Поражение лёгких по данным КТ *, n (%)	8 (17,0 %)
Слабость, n (%)	23 (48,0 %)
Длительность заболевания, дни Me (Q1; Q3)	8,0 (5,0; 14,0)
Снижение/потеря обоняния, n (%)	36 (75,0 %)

Заслуживает внимание ключевой, на наш взгляд, показатель поражения легких, заболевание протекало без поражения легких у 83,0 % обследуемых.

Вакцинация субъектов, включённых в исследование, не сопровождалась серьёзными поствакцинальными осложнениями, побочными реакциями организма и в данном исследовании их не оценивали.

На данном этапе работ было несколько обследуемых с тяжелой формой COVID-19, однако преобладали лица с заболеванием в легкой форме (табл. 7).

Таким образом, добровольцы представлены женщинами (62,1 %) и мужчинами (37,9 %), их средний возраст 39,0 (35,0; 44,5) лет. Средняя длительность от момента заболевания до исследования иммунитета для группы заболевших составила 92 суток, а от момента полной вакцинации до исследования иммунитета для группы вакцинированных – 57,5 суток. Среди переболевших преобладали лица, перенесшие легкую форму тяжести заболевания (69,0 %), или реже – среднюю (21,0 %) и тяжелую (10,0 %) с признаками поражения легких. Среди вакцинированных лиц преобладало бессимптомное течение поствакцинального периода.

*Перспективное одномоментное наблюдательное исследование 2021 года.* В исследование был отобран биоматериал 102 лиц из коллекций биобанка. В группу

контрольных вошло 18 субъектов, в группу переболевших – 58 субъектов и в группу вакцинированных – 26 субъектов. Всего в исследование были включены 71 женщина (69,6 %) и 31 мужчина (30,4 %). Средний возраст участников исследования без учёта групповой принадлежности составил 49,0 (39,5; 54,8) лет.

*Характеристика лиц, включённых в исследование, по группам представлена в таблице 9. Значимые различия групп по половому составу и возрасту отсутствуют. Количество дней от момента контакта с антигеном вируса в данной выборке имеет большой диапазон вариантов, как внутри групп, так и между группами. На наш взгляд, это отражает популяционную ситуацию при пандемии и является корректным, особенно с учетом того, что выборку сформировали за период не более 4 недель.*

Таблица 9. Характеристика групп обследованных лиц в 2021 году

Группа субъектов	Всего лиц (n)	Количество женщин, n (%)	Количество мужчин, n (%)	Возраст, лет Me (Q1; Q3)	Срок обследования субъекта от даты события, дни Me (Q1; Q3) *
Контроль	18	11 (61,1)	7 (38,9)	48,0 (38,0; 55,5)	-
Переболевшие	58	40 (69,0)	18 (31,0)	49,0 (42,0; 57,0)	169 (109; 366)
Вакцинированные	26	20 (76,9)	6 (23,1)	49,0 (41,0; 57,0)	99 (46; 161)

*Примечание:* \* - у переболевших субъектов указан срок от первого положительного заключения по результатам анализа ПЦР, в случае вакцинированных субъектов указан период после введения второго компонента вакцины (второй компонент вакцины вводили через 21 день после первого).

Особенности субъектов, перенесших COVID 19, обобщены в таблице 11, а поствакцинальные осложнения – в таблице 12. По ключевому объективному, на наш взгляд, показателю поражения легких видно, что преобладала легкая форма заболевания (у 72,4 % обследуемых).

Таблица 10. Степень тяжести заболевания COVID-19, обследованных в 2021 году

Параметр	Переболевшие	% [95% ДИ]
Степень тяжести заболевания	(n=58)	-
1 – легкая	47 (81,0%)	81,0% [70,9%; 91,1%]
2 – средняя	11 (19,0%)	19,0% [8,9%; 29,1%]
3 – тяжелая	0 (0,0%)*	0,0% [0,0%; 0,0%]

*Примечание:* \* - среди группы не было пациентов с тяжелой формой заболевания (0%).

Таблица 11. Клинические характеристики протекания заболевания у перенесших COVID-19 (n=58) в 2021 году

Клиническая характеристика заболевания	Значение
Снижение/потеря обоняния, n (%)	46 (79,3)
Головная боль, n (%)	41 (70,7)
Миалгия, n (%)	26 (44,8)
Кашель, n (%)	24 (41,3)
Поражение лёгких по данным КТ *, n (%)	16 (27,6)
Слабость, n (%)	35 (60,3)
Длительность заболевания легкой степени, дни Me (Q1; Q3)	7 (5; 12,8)
Длительность заболевания средней степени, дни Me (Q1; Q3)	10 (8; 18,8)

*Примечание:* \* - поражение лёгких не более 50%.

Вакцинация субъектов, включённых в исследование, не сопровождалась серьёзными поствакцинальными осложнениями, побочными реакциями организма и представленность их была сходной у женщин и мужчин, что отражено в таблице 12. Продолжительность проявления осложнений после введения компонентов вакцины была кратковременной (1-2 дня) и значимо не различалась между первым и вторым этапом вакцинации (введение компонента 1 и компонента 2).

Таблица 12. Характеристика поствакцинальных осложнений (n=26) в 2021 году

Поствакцинальные осложнения	Количество субъектов с поствакцинальными осложнениями, n (%)	
	после введения компонента 1	после введения компонента 2
Местные реакции (болезненность, отёчность, покраснение)	3 (11,5)	5 (19,2)
Субфебрильная лихорадка (37,1-38,0°C)	8 (30,8)	7 (26,9)
Фебрильная лихорадка (38,1-39,0°C)	1 (3,8)	1 (3,8)
Системные реакции (недомогание, головная боль, миалгия)	5 (19,2)	5 (19,2)

Добровольцы представлены женщинами (61,1-76,9 % в различных группах) и мужчинами (23,1-38,9 %, соответственно), их средний возраст 48-49 лет. Средняя длительность от момента заболевания до исследования иммунитета для группы заболевших составила 169 суток, а от момента полной вакцинации до исследования иммунитета для группы вакцинированных – 99 суток. Среди переболевших преобладали лица, перенесшие легкую форму тяжести заболевания (72,4 %), или реже – среднюю (27,6 %). Среди вакцинированных лиц преобладало бессимптомное течение поствакцинального периода, а симптомы общего характера (недомогание, субфебрильная температура) составляли до 30,8 % случаев, при этом признаки местного воспаления в месте введения вакцины отмечены не более чем у 19,2 % обследованных.

Таким образом, исследование выполнено на однородной выборке в достаточном количестве обследованных добровольцев для используемых методов, а его результаты могут отражать статус выборки для лиц, переболевших COVID-19 и вакцинированных «Гам-Ковид-Вак».

## ГЛАВА 4

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 И У ВАКЦИНИРОВАННЫХ «ГАМ- КОВИД-ВАК»

#### 4.1. Особенности Т-клеточного иммунного ответа

*Перспективное одномоментное обсервационное исследование 2020 года.*

Суммарно доля субъектов с положительным заключением о Т-клеточным ответе на антигены составила в группе контроля 25,0 %, в группе переболевших – 79,0 % и в группе вакцинированных – 91,0 % (табл. 13).

Таблица 13. Общая доля лиц с позитивным Т-клеточным иммунным ответом в исследовании 2020 года

Параметр	Все	Переболевшие	Вакцинированные	Контроль	p	Попарное сравнение
АГ1и АГ2	(n=103)	(n=48)	(n=11)	(n=44)	p<0,001 *	p 1-2=0,367
0 - другой	44 (42,7%)	10 (21,0%)	1 (9,0%)	33 (75,0%)		p 1-3<0,001 *
1 - положительный	59 (57,3%)	38 (79,0%)	10 (91,0%)	11 (25,0%)		p 2-3<0,001 *

При исследовании клеточного иммунитета выделенные группы статистически значимо ( $p \leq 0,001$ ) различаются по двум критериям: позитивной реакции на АГ1 и АГ2 компонентов набора ТиграТест. Положительный ответ выявлен с АГ1 у 65,0 % переболевших, 91,0 % вакцинированных и 16,0 % условно здоровых лиц. Положительный ответ выявлен с АГ2 у 79,0 % переболевших, 27,0 % вакцинированных и 25,0 % условно здоровых лиц (табл. 14).

При исследовании клеточного иммунитета по критерию количества пятен в лунках с антигенами выделенные группы статистически значимо ( $p \leq 0,001$ ) различаются также по двум критериям: количеству пятен в лунках с АГ1 и АГ2

компонентов набора ТиграТест. При таких критериях оценки достоверна разница между группами переболевших и контролем и вакцинированных и контролем при  $p < 0,001^*$  по АГ1. И между группами переболевших и вакцинированных и переболевших и контролем при  $p < 0,001^*$  по АГ2. В группе вакцинированных преобладает количество пятен по АГ1 (46,0), тогда как в группе переболевших преобладает количество пятен по АГ2 (52,0) – (табл. 15).

Таблица 14. Т-клеточный иммунный ответ – оценка реакции Т-клеток на антигены в исследовании 2020 года

Параметр	Все	Переболевшие	Вакцинированные	Контроль	p	Попарное сравнение
АГ1	(n=103)	(n=48)	(n=11)	(n=44)	$p < 0,001^*$	$p_{1-2} = 0,223$
0 пограничный	3 (2,9%)	3 (6,0%)	0 (0%)	0 (0%)		$p_{1-3} < 0,001^*$
1 положительный	48 (46,6%)	31 (65,0%)	10 (91,0%)	7 (16,0%)		$p_{2-3} < 0,001^*$
-1 отрицательный	52 (50,5%)	14 (29,0%)	1 (9,0%)	37 (84,0%)		
АГ2	(n=103)	(n=48)	(n=11)	(n=44)	$p < 0,001^*$	$p_{1-2} = 0,003^*$
0 пограничный	3 (2,9%)	1 (2,0%)	1 (9,0%)	1 (2,0%)		$p_{1-3} < 0,001^*$
1 положительный	52 (50,5%)	38 (79,0%)	3 (27,0%)	11 (25,0%)		$p_{2-3} = 0,536$
-1 отрицательный	48 (46,6%)	9 (19,0%)	7 (64,0%)	32 (73,0%)		

При исследовании клеточного иммунитета выделенные группы статистически значимо различаются по двум критериям: позитивной реакции на АГ1 ( $p \leq 0,05$ ) и АГ2 ( $p \leq 0,001$ ) компонентов набора ТиграТест. Положительный ответ выявлен с АГ1 у 36,0 % переболевших, у 50,0 % вакцинированных и у 0 % условно здоровых людей (табл. 16).

Положительный ответ выявлен с АГ2 у 69,0 % переболевших, у 31,0 % вакцинированных и у 11,0 % условно здоровых людей (табл. 16).

Таблица 15. Т-клеточный иммунный ответ – количество пятен в лунках с антигенами в исследовании 2020 года

Параметр	Все	Переболевшие	Вакцинированные	Контроль	p	Попарное сравнение
АГ1 - К- количество пятен	11,0 [2,5; 27,0], (n=103)	19,0 [10,8; 29,0], (n=48)	46,0 [23,5; 55,0], (n=11)	2,0 [0,0; 5,2], (n=44)	p<0,001 *	p 1-2=0,018* p 1-3<0,001* p 2-3<0,001*
АГ2 - К- количество пятен	13,0 [3,0; 52,0], (n=103)	52,0 [16,8; 87,2], (n=48)	8,0 [2,5; 12,0], (n=11)	4,5 [1,0; 12,2], (n=44)	p<0,001 *	p 1-2<0,001* p 1-3<0,001* p 2-3=0,664

*Проспективное одномоментное обсервационное исследование 2021 года.*

Таблица 16. Т-клеточный иммунный ответ – оценка реакции Т-клеток на антигены в исследовании 2021 года

Параметр	Все	Переболевшие	Вакцинированные	Конт- роль	p	Попарное сравнение
АГ1	(n=102)	(n=58)	(n=26)	(n=18)	p=0,002 *	p 1-2=0,188
0 пограничный	8 (7,8%)	4 (7,0%)	4 (15,0%)	0 (0%)		p 1-3=0,004 *
1 положительный	34 (33,3%)	21 (36,0%)	13 (50,0%)	0 (0%)		p 2-3<0,001 *
X неопределенный	4 (3,9%)	1 (2,0%)	1 (4,0%)	2 (11,0%)		
-1 отрицательный	56 (54,9%)	32 (55,0%)	8 (31,0%)	16 (89,0%)		
АГ2	(n=102)	(n=58)	(n=26)	(n=18)	p<0,01 *	p 1-2=0,011 *
0 пограничный	3 (2,9%)	1 (2,0%)	2 (8,0%)	0 (0%)		p 1-3<0,001 *
1 положительный	50 (49,0%)	40 (69,0%)	8 (31,0%)	2 (11,0%)		p 2-3=0,198
X неопределенный	4 (3,9%)	1 (2,0%)	1 (4,0%)	2 (11,0%)		
-1 отрицательный	45 (44,1%)	16 (28,0%)	15 (58,0%)	14 (78,0%)		

Согласно полученным результатам, заболевание COVID-19 и вакцинация «Гам-Ковид-Вак» приводят к значимому увеличению содержания в организме Т-лимфоцитов, отвечающих повышенной выработкой INF- $\gamma$  в ответ на специфическую стимуляцию каждым из наборов пептидных антигенов в методе ELISPOT (рис. 6, 7). Это выражается в большем количестве пятен (равных числу активированных Т-лимфоцитов) в лунках со стимуляцией AG1 и AG2 у переболевших и вакцинированных субъектов по сравнению с контролем (рис. 6).

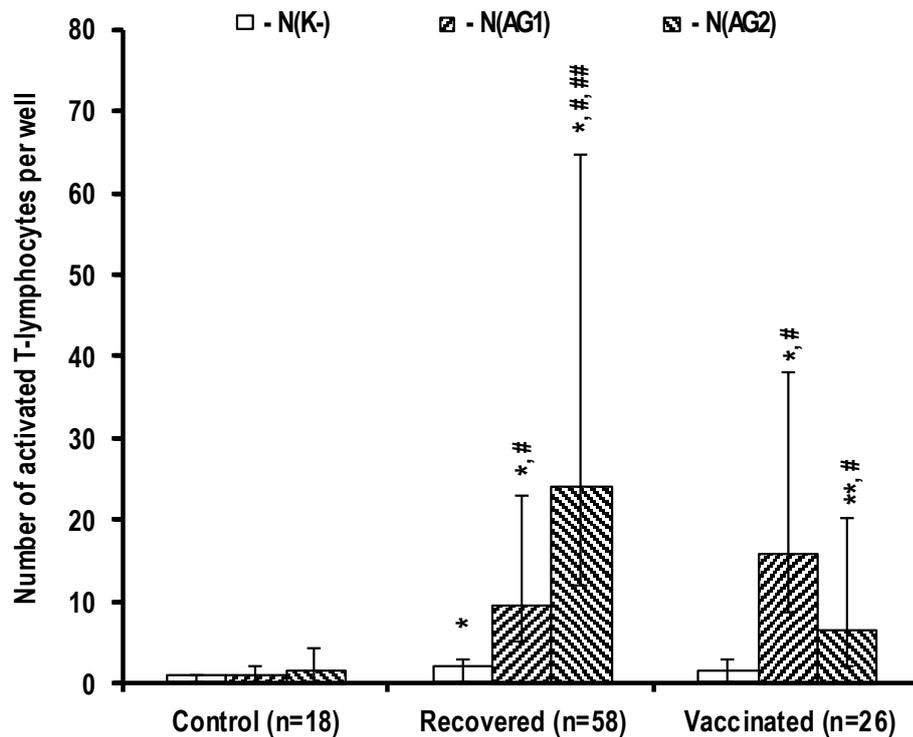


Рисунок 6. Результаты определения активированных Т-лимфоцитов в образцах МНПК в исследовании 2021 года. По вертикальной оси представлено количество Т-лимфоцитов, продуцирующих INF- $\gamma$ , в лунках без стимуляции (N(K-)) и при специфической стимуляции разными наборами антигенов (N(AG1), N(AG2)). Данные представлены в виде Me (Q1; Q3). По горизонтальной оси расположены основные группы испытуемых, для которых указана достоверность межгрупповых различий согласно примечанию.

*Примечание:* \* -  $p < 0,01$  при сравнении по тому же показателю с субъектами контрольной группы, \*\* -  $p < 0,01$  при сравнении по тому же показателю с переболевшими субъектами, # -  $p < 0,01$  при сравнении с

нестимулированными МНПК лиц одной группы, ## -  $p < 0,01$  при сравнении МНПК со стимуляцией разными наборами антигенов лиц одной группы.

В группе вакцинированных преобладает количество пятен по АГ1 (15,5), тогда как в группе переболевших преобладает количество пятен по АГ2 (22,5) – (табл. 17).

Таблица 17. Т-клеточный иммунный ответ – количество пятен в лунках с антигенами в исследовании 2021 года

Параметр	Все	Переболевшие	Вакцинированные	Контроль	p	Попарное сравнение
АГ1 - К- количество пятен	7,0 [2,0;20,8], (n=102)	8.0 [4,0; 21,5], (n=58)	15,5 [6,0; 31,8], (n=26)	0.0 [-0,8; 1,0], (n=18)	$p < 0,01$ *	p 1-2=0,138 p 1-3<0,001 * p 2-3<0,001 *
АГ2 – К- количество пятен	13,0 [1,0; 45,0], (n=102)	22.5 [10,0; 59,2], (n=58)	5.0 [0,0; 17,8], (n=26)	1.0 [0,0; 1,8], (n=18)	$p < 0,01$ *	p 1-2=0,002 * p 1-3<0,001 * p 2-3=0,072

У переболевших субъектов отмечено преобладание количества Т-лимфоцитов, активируемых пептидами набора АГ2 (пептиды с эпитопами N-белка, М-белка и белков ORF3 и ORF7). У вакцинированных субъектов при преобладании Т-лимфоцитов, активируемых пептидами набора АГ1 (пептиды с эпитопами S-белка шипа оболочки вируса), наблюдается наличие значимых количеств лимфоцитов, активируемых пептидами набора АГ2, эпитопы которых не должны были появляться в организме при вакцинации (рис. 6). Это возможно свидетельствует об их контакте с вирусом, например, в форме субклинического течения заболевания, либо о перекрестной реакции, причину которой однозначно определить нельзя, либо о взаимном потенцировании антигенами активности Т-клеток, приводящем к проявлению активных форм.

Оценка количества положительных результатов теста на наличие клеточного иммунного ответа на антигены вируса SARS-CoV-2 с помощью

критериев, предлагаемых производителем реагентов, аналогично характеризует отмеченные особенности представленности Т-лимфоцитов, отвечающих на разные составы антигенов в наборе, у субъектов обследованных групп (рис. 7).

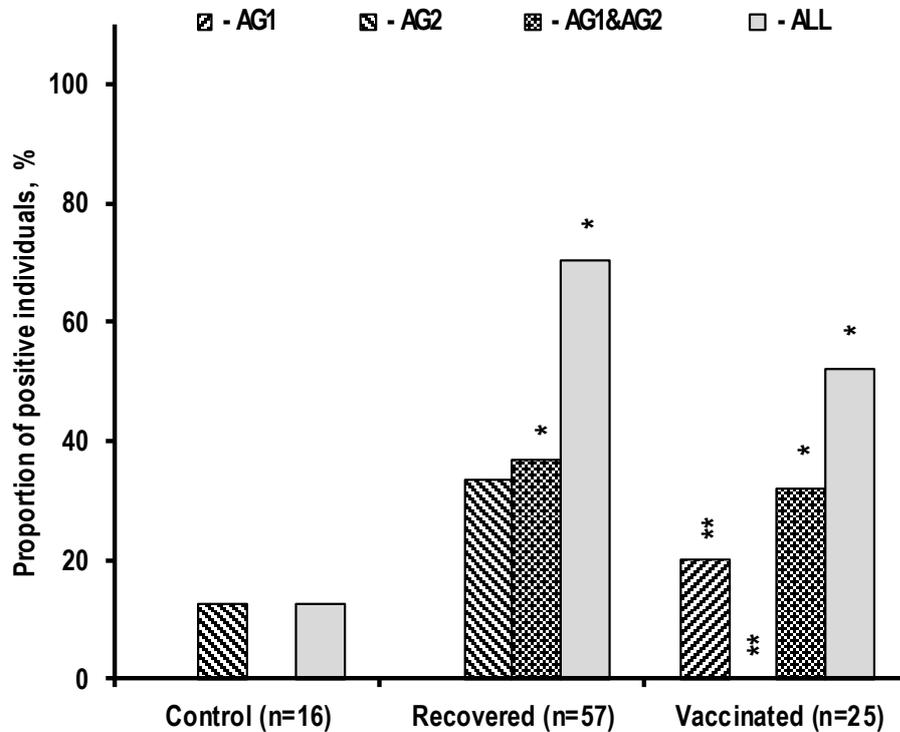


Рисунок 7. Пропорциональное распределение обследованных лиц с положительным результатом испытания на наличие Т-клеточного иммунного ответа на антигены вируса SARS-CoV-2 в исследовании 2021 года. По вертикальной оси представлен процент обследуемых, а по горизонтальной оси расположены основные группы испытуемых и их реакция на стимулирование различными антигенами (AG1 и AG2 – положительный ответ на антигены только одного набора, AG1&AG2 – положительный ответ одновременно на антигены обоих наборов, All – все обследуемые с позитивным результатом тестирования), для которых указана достоверность межгрупповых различий согласно примечанию.

*Примечание* – \* -  $p < 0,01$  при сравнении по тому же показателю с субъектами контрольной группы, \*\* -  $p < 0,01$  при сравнении по тому же показателю с переболевшими субъектами.

Важно отметить, что при такой оценке для состава антигенов, вызывающих пониженный ответ, в соответствующих группах отсутствуют субъекты с положительным заключением, основанным на значимом ответе только на эти антигены. Так, среди переболевших субъектов нет положительных только со значимым ответом на антигены набора AG1, а среди вакцинированных – только набора AG2. При этом в обеих этих группах у не менее половины положительных субъектов одновременно имеются как Т-лимфоциты, отвечающие на антигены набора AG1, так и Т-лимфоциты, отвечающие на антигены набора AG2. Суммарно доля субъектов с положительным заключением о Т-клеточном ответе на антигены составила в группе контрольных 11,0 %, в группе переболевших – 69,0 % и в группе вакцинированных – 50,0 % (рис. 7).

Площадь пятна, образующегося вокруг клетки на дне лунки, при использовании постоянного увеличения микроскопа и разрешения захвата изображения пропорциональна выработанному этой клеткой количеству INF- $\gamma$ . Поэтому общая площадь включённых в анализ пятен, измеренная с использованием программы Image J на изображениях лунок, является оценкой суммарного продуцирования этого цитокина активированными Т-лимфоцитами в лунке. Результаты измерения общей площади включённых в анализ пятен на изображениях лунок (рис. 8) указывают на те же групповые особенности Т-клеточного иммунного ответа у обследованных субъектов, что выявляются при оценке по количеству отвечающих МНПК (рис. 8). К этим особенностям относится у переболевших субъектов преобладание ответа Т лимфоцитов, активируемых антигенами набора AG2, а у вакцинированных – преобладание ответа Т лимфоцитов, активируемых антигенами набора AG1 и наличие невызываемого вакциной Гам Ковид-Вак значимого Т клеточного иммунного ответа на антигены набора AG2. Отмеченное сходство групповых особенностей Т клеточного иммунного ответа у обследованных при его оценке по количеству отвечающих МНПК и по суммарному продуцированию этими клетками INF  $\gamma$  обусловлено большим значением для суммарной продукции цитокина количества отвечающих лимфоцитов.

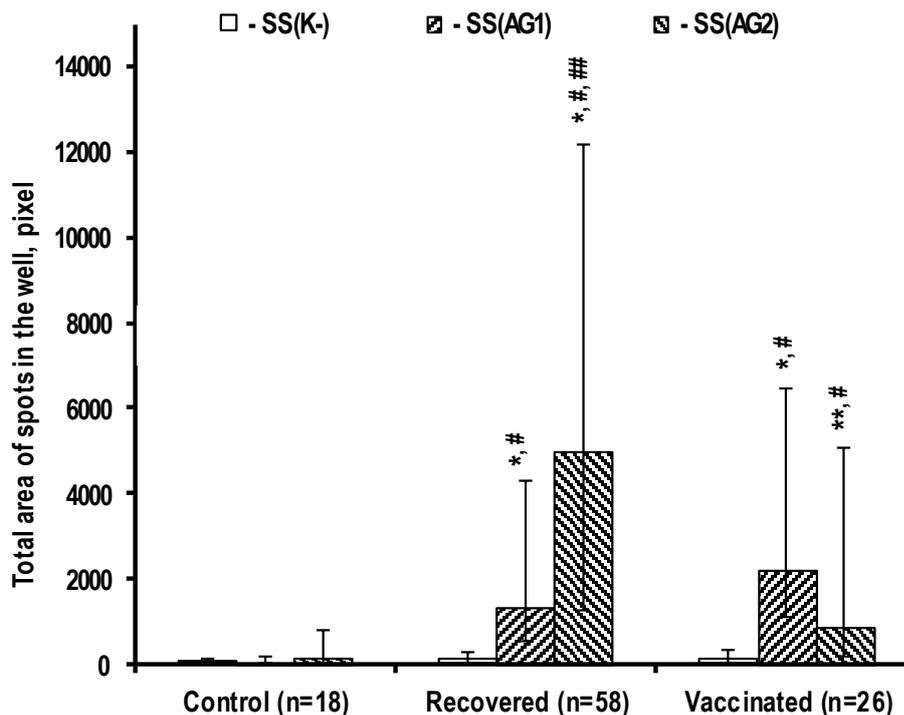


Рисунок 8. Результаты оценки интенсивности продуцирования  $INF \gamma$  МНПК обследованных субъектов при оценке общей площади пятен в лунке (при анализе площадь в лунках без пятен была принята равной нулю) без стимуляции (SS(K)) и при специфической стимуляции разными наборами антигенов (SS(AG1), SS(AG2)) в исследовании 2021 года.

*Примечание:* \* $p < 0,01$  при сравнении по тому же показателю с субъектами контрольной группы, \*\* $p < 0,01$  при сравнении по тому же показателю с переболевшими субъектами, # $p < 0,01$  при сравнении с нестимулированными МНПК субъектов одной группы, ##  $p < 0,01$  при сравнении МНПК со стимуляцией разными наборами антигенов субъектов одной группы.

Показатели продуцирования  $INF-\gamma$  отдельными сенсibilизированными Т-лимфоцитами при стимуляции вирусными антигенами разных наборов хотя и выше, но достаточно близки к продуцированию активированными Т-лимфоцитами в пробах без стимуляции, и только у переболевших это превышение достоверно (рис. 9).

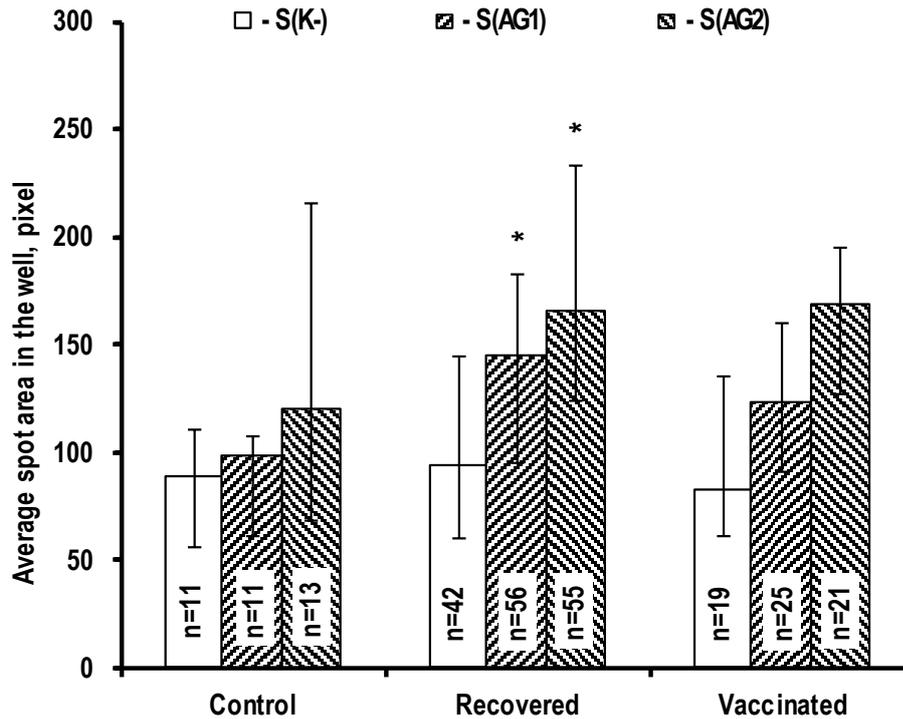


Рисунок 9. Средняя площадь пятен в лунке (при анализе лунки без пятен были исключены) без стимуляции (S(K-)) и при специфической стимуляции разными наборами антигенов (S(AG1), S(AG2)) в исследовании 2021 года.

*Примечание* \* -  $p < 0,01$  при сравнении по тому же показателю с субъектами контрольной группы.

Таким образом, заболевание COVID 19 и вакцинация «Гам Ковид Вак» приводят к увеличению содержания Т-лимфоцитов, отвечающих выработкой  $INF \gamma$  в ответ на специфическую стимуляцию наборами пептидных антигенов AG1 и AG2 в методе ELISPOT, что сопровождается увеличением числа спотов (равных числу активированных Т-лимфоцитов), их общей и средней площади в лунках со стимуляцией. При этом среди переболевших лиц нет положительных только со значимым ответом на антигены набора AG1, а среди вакцинированных – только набора AG2. В обеих этих группах у не менее половины положительных субъектов одновременно имеются как Т лимфоциты, отвечающие на антигены набора AG1, так и Т лимфоциты, отвечающие на антигены набора AG2.

Суммарно доля субъектов с положительным заключением о Т клеточном ответе на антигены составила в исследовании 2020 года 25,0 % в группе условно здоровых людей, 79,0 % в группе переболевших, 91,0 % в группе вакцинированных; а в исследованиях 2021 года в группе контрольных 11,0 %, в группе переболевших – 69,0 % и в группе вакцинированных – 50,0 % (табл. 18, 19, 20).

Таблица 18. Общая доля переболевших с позитивным Т-клеточным иммунным ответом в исследованиях 2020 года и 2021 года

Параметр	Все	2020 год	2021 год	p
АГ1и АГ2	(n=106)	(n=48)	(n=58)	p=0,236
0 – остальные	28 (26,4%)	10 (21,0%)	18 (31,0%)	
1 – положительный	78 (73,6%)	38 (79,0%)	40 (69,0%)	

Таблица 19. Общая доля вакцинированных с позитивным Т-клеточным иммунным ответом в исследованиях 2020 года и 2021 года

Параметр	Все	2020 год	2021 год	p
АГ1и АГ2	(n=37)	(n=11)	(n=26)	p=0,019*
0 – остальные	14 (38,0%)	1 (9,0%)	13 (50,0%)	
1 – положительный	23 (62,0%)	10 (91,0%)	13 (50,0%)	

Таблица 20. Общая доля лиц в группах контроля с позитивным Т-клеточным иммунным ответом в исследованиях 2020 года и 2021 года

Параметр	Все	2020 год	2021 год	p
АГ1и АГ2	(n=62)	(n=44)	(n=18)	p=0,223
0 – остальные	49 (79,0%)	33 (75,0%)	16 (89,0%)	
1 – положительный	13 (21,0%)	11 (25,0%)	2 (11,%)	

## 4.2. Особенности гуморального иммунного ответа

*Перспективное одномоментное наблюдательное исследование 2020 года.*

Установлено, что по содержанию антител IgG к S1-домену белка шипа вируса SARS-CoV-2, содержащий RBD (EUROIMMUN), группы переболевших пациентов, перенесших болезнь в легкой, средней и тяжелой степени тяжести статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) не отличаются (табл. 21). При этом группы не различаются и по другим параметрам (табл. 22).

Таблица 21. Показатели гуморального иммунного ответа у переболевших различной степени тяжести в исследовании 2020 года

Параметр	Все	Легкая степень тяжести	Средняя степень тяжести	Тяжелая степень тяжести	p	Попарное сравнение
IgG к S-1 домену (EUROIMMUN)	1,0 [0,7;3,1], (n=48)	1,0 [0,7;2,6], (n=33)	2,4 [0,6; 3,0], (n=10)	1,5 [1,5; 4,8], (n=5)	p=0,320	p 1-2=0,536 p 1-3=0,094 p 2-3=0,453

*Примечание:* в таблице отражены индексы позитивности (ИП) по результатам ИФА для групп обследуемых. Данные представлены в виде Me [Q1; Q3]. \* -  $p < 0,05$  при сравнении по тому же показателю между субъектами легкой и средней степени тяжести.

Таблица 22. Показатели гуморального иммунного ответа у переболевших различной степени тяжести в исследовании 2020 года

Параметр	Все	Легкая степень тяжести	Средняя степень тяжести	Тяжелая степень тяжести	p	Попарное сравнение
IgG к S-1 домену (EUROIMMUN)	(n=48)	(n=33)	(n=10)	(n=5)	p=0,206	p 1-2=0,356
1	20 (42,0%)	16 (48,0%)	4 (40,0%)	0 (0%)	-	p 1-3=0,121
2	5 (10,0%)	4 (12,0%)	0 (0%)	1 (20,0%)	-	p 2-3=0,122
3	23 (48,0%)	13 (39,0%)	6 (60,0%)	4 (80,0%)	-	-

*Примечание:* в таблице отражено количество лиц с 1 – отрицательным результатом, 2 – пограничным результатом и 3 – положительным результатом исследования методом ИФА для групп обследуемых, переболевших в разной степени тяжести. \* -  $p < 0,05$  при сравнении по тому же показателю между субъектами легкой и средней степени тяжести.

*Перспективное одномоментное наблюдательное исследование 2021 года.* Установлено, что по содержанию IgG к RBD S (ХЕМА) группы переболевших пациентов, перенесших болезнь в легкой и средней степени тяжести статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) отличаются (табл. 23).

Таблица 23. Показатели гуморального иммунного ответа у переболевших различной степени тяжести в исследовании 2021 года

Параметр	Все	Легкая степень тяжести	Средняя степень тяжести	p
IgG к RBD S (ХЕМА)	5,1 [2,6; 8,1], (n=56)	4,6 [2,2; 7,2], (n=45)	9,5 [4,2; 11,4], (n=11)	p=0,027*
IgG к S (ВЕКТОР)	15,0 [5,9; 16,1], (n=38)	15,0 [5,5; 16,1], (n=32)	13,9 [10,2; 16,1], (n=6)	p=0,903
IgG к N (ВЕКТОР)	7,3 [2,3; 14,7], (n=38)	7,8 [2,3; 14,3], (n=32)	5,6 [2,0; 13,6], (n=6)	p=0,810

*Примечание:* в таблице отражены индексы позитивности (ИП) по результатам ИФА для групп обследуемых и всех видов иммуноглобулинов. Данные представлены в виде Me [Q1; Q3]. \* -  $p < 0,05$  при сравнении по тому же показателю между субъектами легкой и средней степени тяжести.

У лиц, перенесших более тяжелую форму болезни, уровень IgG к RBD S (ХЕМА) выше более чем в два раза. При этом группы не различаются по другим параметрам (табл. 24).

Таблица 24. Показатели гуморального иммунного ответа у переболевших различной степени тяжести в исследовании 2021 года

Параметр и группы	Все	Легкая степень тяжести	Средняя степень тяжести	p
IgG к RBD S (ХЕМА)	(n=56)	(n=45)	(n=11)	p=0,511
1	4 (7,0%)	4 (9,0%)	0 (0%)	
2	1 (2,0%)	1 (2,0%)	0 (0%)	
3	51 (91,0%)	40 (89,0%)	11 (100,0%)	
IgG к S (БЕКТОР)	(n=38)	(n=32)	(n=6)	p=1,000
3	38 (100,0%)	32 (100,0%)	6 (100,0%)	
IgG к N (БЕКТОР)	(n=38)	(n=32)	(n=6)	p=0,797
1	4 (11,0%)	3 (9,0%)	1 (17,0%)	
2	1 (3,0%)	1 (3,0%)	0 (0%)	
3	33 (87,0%)	28 (88,0%)	5 (83,0%)	

*Примечание:* в таблице отражено количество лиц с 1 – отрицательным результатом, 2 – пограничным результатом и 3 – положительным результатом исследования методом ИФА для групп обследуемых, переболевших в разной степени тяжести, и всех видов иммуноглобулинов. \* -  $p < 0,05$  при сравнении по тому же показателю между субъектами легкой и средней степени тяжести.

Результаты оценки наличия в сыворотке крови антител класса IgG к рецептор-связывающему домену S белка (IgG S\_X), антител класса IgG ко всем эпитопам S белка (IgG S\_B), включая рецептор-связывающий домен, и антител класса IgG к нуклеокапсидному N белку (IgG N\_B) вируса SARS CoV 2 представлены на рисунке 10.

В соответствии с полученными значениями индекса позитивности (рис. 10) у субъектов контрольной группы искомые антитела выявляются очень слабо, тогда как у переболевших и вакцинированных имеет место значительно более высокий уровень антител, соответствующий антигенному составу вызвавшего гуморальный иммунный ответ источника антигена.

Так, у переболевших лиц, иммунная система которых взаимодействовала с полноценным вирусом SARS CoV 2, имеет место статистически значимое превышение уровня антител как к S белку, так и N, M, ORF3 и ORF7 белков. В

то же время у вакцинированных, источником антигенов для которых был искусственный вирус, продуцирующий фрагмент S белка вируса SARS CoV 2, высокий уровень обнаружен только для антител к этому белку, а антитела к N белку определяются на низком уровне.

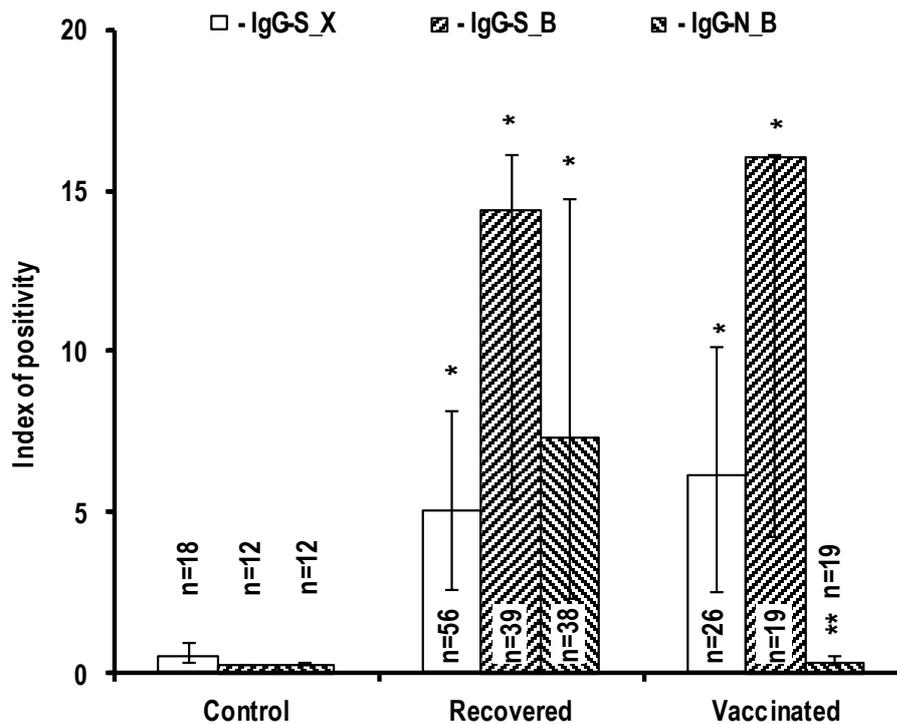


Рисунок 10. Результаты определения антител к антигенам белков SARS-CoV-2 в сыворотке крови обследованных субъектов в исследовании 2021 года. По вертикали отражены индексы позитивности (ИП) по результатам ИФА, по горизонтали представлены все группы обследуемых и распределены данные для всех видов иммуноглобулинов. Данные представлены в виде Me (Q1; Q3).

*Примечание:* \* -  $p < 0,01$  при сравнении с результатом оценки тем же методом в образцах сыворотки субъектов контрольной группы. \*\* -  $p < 0,01$  при сравнении результатом оценки тем же методом в образцах сыворотки переболевших субъектов.

Важно отметить следующее: нет перекрестной реакции или дискордантности по исследуемым антигенам в группах переболевших и

вакцинированных, как это наблюдалось при исследовании Т-клеточного иммунитета. Также, несмотря на большую длительность периодов между заболеванием (первым положительным ПЦР-тестом) или вакцинацией, в соответствующих группах составивших 169 и 99 суток, индексы позитивности соответствуют активному гуморальному иммунитету у значительного количества лиц.

Описанные особенности сероконверсии сохраняются при выделении серопозитивных субъектов в соответствии с критериями ИФА-методов (рис. 11).

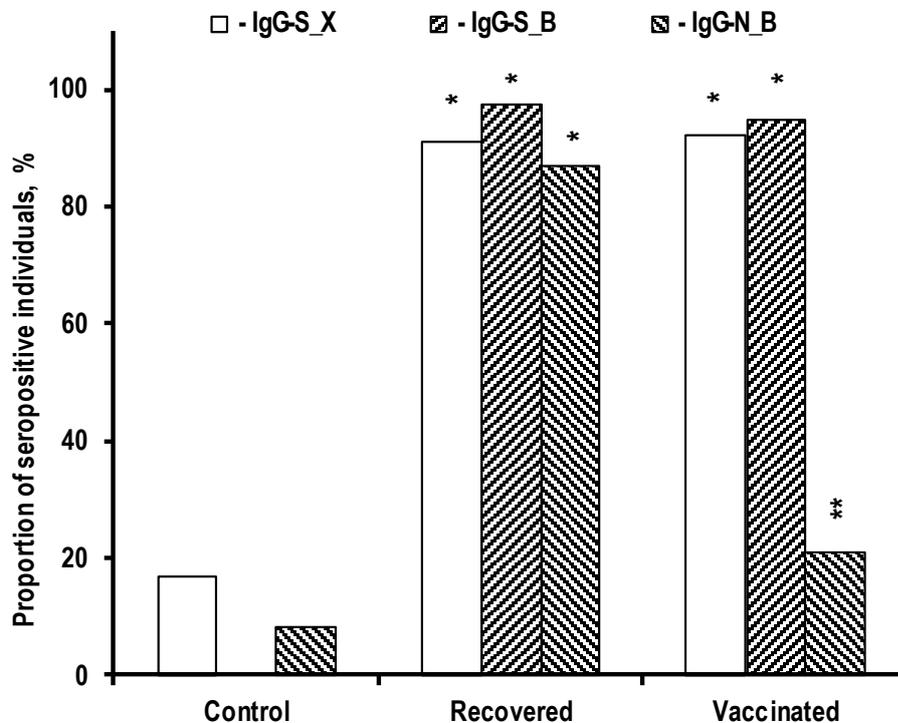


Рисунок 11. Доли серопозитивных субъектов (ИП > 1,1) в обследованных группах субъектов к антигенам белков SARS-CoV-2 в исследовании 2021 года.

*Примечание:* \* -  $p < 0,01$  при сравнении с результатом оценки тем же методом в образцах сыворотки субъектов контрольной группы. \*\* -  $p < 0,01$  при сравнении результатом оценки тем же методом в образцах сыворотки переболевших субъектов.

Таким образом, согласно полученным данным, к серопозитивным по антителам к антигенам S-белка относится основное количество (более 90 %) переболевших и вакцинированных, а субъекты, серопозитивные по антителам к антигенам N-белка, составляют около 90 % только в группе переболевших. По сравнению с переболевшими в группе вакцинированных доля субъектов, серопозитивных по антителам к антигенам N-белка, значительно меньше и находится на уровне контрольных субъектов, имеющих низкую серопозитивность и по антителам к S-белку.

## ГЛАВА 5

### СОПОСТАВЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 И У ВАКЦИНИРОВАННЫХ «ГАМ-КОВИД-ВАК» В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ПАНДЕМИИ

При сравнении групп переболевших лиц в 2020 и 2021 годах по показателям клеточного иммунитета выделенные группы статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) различаются по АГ1 по соотношению положительных и отрицательных результатов. В 2020 году преобладают положительные результаты, а в 2021-м – отрицательные. Группы не различаются по соотношению пограничных и неопределённых результатов (табл. 25).

При сравнении групп вакцинированных лиц в 2020 и 2021 годах по показателям клеточного иммунитета выделенные группы статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) различаются по АГ1 по соотношению положительных результатов. И не различаются по соотношению отрицательных, пограничных и неопределённых результатов (табл. 26).

При сравнении групп *переболевших лиц* в 2020 и 2021 годах по показателям гуморального иммунитета выделенные группы статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) различаются по IgG к RBD S и IgG к RBD S<sub>гр</sub> по соотношению отрицательных пограничных и положительных результатов. В отличие от клеточного иммунного ответа, при исследовании гуморального иммунитета в 2020 году индекс позитивности меньше, чем в 2021-м, в 2021-м положительные результаты теста почти вдвое больше по сравнению с 2020 годом (табл. 27).

При исследовании гуморального иммунитета в 2020 году индекс позитивности меньше, чем в 2021-м, в 2021-м положительные результаты теста почти в три раза больше по сравнению с 2020 годом (табл. 28).

Таблица 25. Показатели клеточного иммунного ответа у переболевших в исследованиях 2020 и 2021 года

Параметр	Все	2020 год	2021 год	p
АГ1	(n=106)	(n=48)	(n=58)	p=0,026*
1 - положительный	52 (49,1%)	31 (65,0%)	21 (36,0%)	
-1 - отрицательный	46 (43,4%)	14 (29,0%)	32 (55,0%)	
0 - пограничный	7 (6,6%)	3 (6,0%)	4 (7,0%)	
X - неопределенный	1 (0,9%)	0 (0%)	1 (2,0%)	
АГ1_1 - положительный	(n=106)	(n=48)	(n=58)	p=0,004*
0 – нет	54 (50,9%)	17 (35,0%)	37 (64,0%)	
1 – да	52 (49,1%)	31 (65,0%)	21 (36,0%)	
АГ1_2 - отрицательный	(n=106)	(n=48)	(n=58)	p=0,007*
0 – нет	60 (56,6%)	34 (71,0%)	26 (45,0%)	
1 – да	46 (43,4%)	14 (29,0%)	32 (55,0%)	
АГ1_3 - пограничный	(n=106)	(n=48)	(n=58)	p=0,894
0 – нет	99 (93,4%)	45 (94,0%)	54 (93,0%)	
1 – да	7 (6,6%)	3 (6,0%)	4 (7,0%)	
АГ1_4 - неопределенный	(n=106)	(n=48)	(n=58)	p=0,361
0 – нет	105 (99,1%)	48 (100,0%)	57 (98,0%)	
1 – да	1 (0,9%)	0 (0%)	1 (2,0%)	
АГ2	(n=106)	(n=48)	(n=58)	p=0,555
1 - положительный	78 (73,6%)	38 (79,0%)	40 (69,0%)	
-1 - отрицательный	25 (23,6%)	9 (19,0%)	16 (28,0%)	
0 - пограничный	2 (1,9%)	1 (2,0%)	1 (2,0%)	
X - неопределенный	1 (0,9%)	0 (0%)	1 (2,0%)	
АГ2_1 - положительный	(n=106)	(n=48)	(n=58)	p=0,236
0 – нет	28 (26,4%)	10 (21,0%)	18 (31,0%)	
1 – да	78 (73,6%)	38 (79,0%)	40 (69,0%)	
АГ2_2 - отрицательный	(n=106)	(n=48)	(n=58)	p=0,286
0 – нет	81 (76,4%)	39 (81,0%)	42 (72,0%)	
1 – да	25 (23,6%)	9 (19,0%)	16 (28,0%)	
АГ2_3 - пограничный	(n=106)	(n=48)	(n=58)	p=0,892
0 – нет	104 (98,1%)	47 (98,0%)	57 (98,0%)	
1 – да	2 (1,9%)	1 (2,0%)	1 (2,0%)	
АГ2_4 - неопределенный	(n=106)	(n=48)	(n=58)	p=0,361
0 – нет	105 (99,1%)	48 (100,0%)	57 (98,0%)	
1 – да	1 (0,9%)	0 (0%)	1 (2,0%)	

*Примечание:* в таблице отражено количество лиц с 1 – положительным, 2 – отрицательным, 3 – пограничным, 4 - неопределённым результатом ELISPOT для групп обследуемых, переболевших в разные периоды пандемии. \* -  $p < 0,05$  при сравнении между субъектами, включенными в исследования 2020 и 2021 года.

Таблица 26. Показатели клеточного иммунного ответа у вакцинированных в исследованиях 2020 и 2021 года

Параметр	Все	2020 год	2021 год	p
АГ1	(n=37)	(n=11)	(n=26)	p=0,128
1 - положительный	23 (62,0%)	10 (91,0%)	13 (50,0%)	
-1 - отрицательный	9 (24,0%)	1 (9,0%)	8 (31,0%)	
0 - пограничный	4 (11,0%)	0 (0%)	4 (15,0%)	
X - неопределенный	1 (3,0%)	0 (0%)	1 (4,0%)	
АГ1_1 - положительный	(n=37)	(n=11)	(n=26)	p=0,019*
0 – нет	14 (38,0%)	1 (9,0%)	13 (50,0%)	
1 – да	23 (62,0%)	10 (91,0%)	13 (50,0%)	
АГ1_2 - отрицательный	(n=37)	(n=11)	(n=26)	p=0,16
0 – нет	28 (76,0%)	10 (91,0%)	18 (69,0%)	
1 – да	9 (24,0%)	1 (9,0%)	8 (31,0%)	
АГ1_3 - пограничный	(n=37)	(n=11)	(n=26)	p=0,168
0 – нет	33 (89,0%)	11 (100,0%)	22 (85,0%)	
1 – да	4 (11,0%)	0 (0%)	4 (15,0%)	
АГ1_4 - неопределенный	(n=37)	(n=11)	(n=26)	p=0,51
0 – нет	36 (97,0%)	11 (100,0%)	25 (96,0%)	
1 – да	1 (3,0%)	0 (0%)	1 (4,0%)	
АГ2	(n=37)	(n=11)	(n=26)	p=0,915
1 - положительный	11 (30,0%)	3 (27,0%)	8 (31,0%)	
-1 - отрицательный	22 (59,0%)	7 (64,0%)	15 (58,0%)	
0 - пограничный	3 (8,0%)	1 (9,0%)	2 (8,0%)	
X - неопределенный	1 (3,0%)	0 (0%)	1 (4,0%)	
АГ2_1 - положительный	(n=37)	(n=11)	(n=26)	p=0,832
0 – нет	26 (70,0%)	8 (73,0%)	18 (69,0%)	
1 – да	11 (30,0%)	3 (27,0%)	8 (31,0%)	
АГ2_2 - отрицательный	(n=37)	(n=11)	(n=26)	p=0,736
0 – нет	15 (41,0%)	4 (36,0%)	11 (42,0%)	
1 – да	22 (59,0%)	7 (64,0%)	15 (58,0%)	
АГ2_3 - пограничный	(n=37)	(n=11)	(n=26)	p=0,887
0 – нет	34 (92,0%)	10 (91,0%)	24 (92,0%)	
1 – да	3 (8,0%)	1 (9,0%)	2 (8,0%)	
АГ2_4 - неопределенный	(n=37)	(n=11)	(n=26)	p=0,51
0 – нет	36 (97,0%)	11 (100,0%)	25 (96,0%)	
1 – да	1 (3,0%)	0 (0%)	1 (4,0%)	

*Примечание:* в таблице отражено количество лиц с 1 – положительным, 2 – отрицательным, 3 – пограничным, 4 - неопределённым результатом ELISPOT для групп обследуемых, вакцинированных в разные периоды пандемии. \* - p<0,05 при сравнении между субъектами, включенными в исследования 2020 и 2021 года.

Таблица 27. Показатели гуморального иммунного ответа у переболевших с положительным Т-клеточным иммунным ответом по АГ1 (S-белок) в исследованиях 2020 и 2021 года

Параметр	Все	2020 год	2021 год	p
IgG к RBD S	3,5 [1,0; 6,8], (n=52)	1,9 [0,8; 3,6], (n=31)	6,1 [4,3; 8,2], (n=21)	p<0,001*
IgG к RBD S_гр	(n=52)	(n=31)	(n=21)	p=0,012*
1	13 (25,0%)	12 (39,0%)	1 (5,0%)	
2	1 (2,0%)	1 (3,0%)	0 (0%)	
3	38 (73,0%)	18 (58,0%)	20 (95,0%)	

*Примечание:* в таблице отражено количество лиц с 1 – отрицательным, 2 – пограничным, 3 – положительным результатом исследования методом ИФА для групп обследуемых, переболевших в разные периоды пандемии. \* - P < 0,05 при сравнении по тому же показателю между субъектами, включенными в исследования 2020 и 2021 года.

Таблица 28. Показатели гуморального иммунного ответа у переболевших с положительным Т-клеточным иммунным ответом по АГ2 (M, N, ORF3a, ORF7a-белки) в исследованиях 2020 и 2021 года

Параметр	Все	2020 год	2021 год	p
IgG к RBD S	3,5 [1,1; 6,8], (n=77)	1,5 [0,8; 3,6], (n=38)	5,7 [3,5; 8,2], (n=39)	p<0,001*
IgG к RBD S_гр	(n=77)	(n=38)	(n=39)	p=0,001*
1	16 (21,0%)	13 (34,0%)	3 (8,0%)	
2	4 (5,0%)	4 (11,0%)	0 (0%)	
3	57 (74,0%)	21 (55,0%)	36 (92,0%)	

*Примечание:* в таблице отражено количество лиц с 1 – отрицательным, 2 – пограничным, 3 – положительным результатом исследования методом ИФА для групп обследуемых, переболевших в разные периоды пандемии. \* - p < 0,001 при сравнении по тому же показателю между субъектами, включенными в исследования 2020 и 2021 года.

При сравнении групп вакцинированных лиц в 2020 и 2021 годах по показателям гуморального иммунитета выделенные группы (по АГ1)

статистически значимо ( $p > 0.05$ ) не различаются по IgG к RBD S и IgG к RBD S\_гр по соотношению положительных результатов (табл. 29).

При сравнении групп переболевших лиц в 2020 и 2021 годах по показателям гуморального иммунитета выделенные группы (по АГ2) статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) различаются по IgG к RBD S и IgG к RBD S\_гр по соотношению положительных результатов. При исследовании гуморального иммунитета в 2020 году индекс позитивности меньше, чем в 2021-м, в 2021-м положительные результаты теста почти вдвое больше по сравнению с 2020 годом (табл. 30).

Таблица 29. Показатели гуморального иммунного ответа у вакцинированных с положительным Т-клеточным иммунным ответом по АГ1 (S-белок) в исследованиях 2020 и 2021 года

Параметр	Все	2020 год	2021 год	p
IgG к RBD S	8.0 [4,4; 11,3], (n=23)	4,8 [4,1; 6,6], (n=10)	10,6 [8,0; 11,9], (n=13)	p=0,088
IgG к RBD S_гр	(n=23)	(n=10)	(n=13)	p=1,000
3	23 (100,0%)	10 (100,0%)	13 (100,0%)	

*Примечание:* в таблице отражено количество лиц с 3 – положительным результатом исследования методом ИФА для групп обследуемых, переболевших в разные периоды пандемии. \* -  $p < 0,001$  при сравнении по тому же показателю между субъектами, включенными в исследования 2020 и 2021 года.

Таблица 30. Показатели гуморального иммунного ответа у вакцинированных с положительным Т-клеточным иммунным ответом по АГ2 (M, N, ORF3a, ORF7a-белки) в исследованиях 2020 и 2021 года

Параметр	Все	2020 год	2021 год	p
IgG к RBD S	8,5 [5,4; 11,9], (n=11)	4,6 [4,3; 4,8], (n=3)	11,2 [8,5; 12,1], (n=8)	p=0,019*
IgG к RBD S_гр	(n=11)	(n=3)	(n=8)	p=1,000
3	11 (100,0%)	3 (100,0%)	8 (100,0%)	

*Примечание:* в таблице отражено количество лиц с 3 – положительным результатом исследования методом ИФА для групп обследуемых, переболевших в

разные периоды пандемии. \* -  $p \leq 0.05$  при сравнении по тому же показателю между субъектами, включенными в исследования 2020 и 2021 года.

Результаты исследований иммунного ответа обобщены на графиках, отражающих корреляционные взаимосвязи. Графики демонстрируют наличие статистически значимых корреляционных взаимосвязей, где линии отражают значимую связь с коэффициентом корреляции  $> 0,7$  есть, а если линии нет - значит и связи с коэффициентом корреляции  $> 0,7$  нет (рис. 12, 13).

*Корреляционный анализ результатов исследований, проведенных в 2021 году* (рис. 13). Имеется умеренная положительная связь степени тяжести заболевания от возраста и уровня IgG к RBD S. Количество пятен к АГ1 и 2 изменяется синхронно. От умеренной до заметной корреляции наблюдается между числом пятен к АГ1 или 2, а также их средней площадью и уровнем иммуноглобулинов к различным белкам, что свидетельствует о синхронности работы двух звеньев иммунитета. Большее число клеток активируется на более ранних стадиях болезни, о чем свидетельствует умеренная отрицательная связь между этими показателями. Однако средняя площадь пятна роли не играет.

Количество пятен у вакцинированных, переболевших и здоровых контактировавших имеет сильную положительную корреляцию с их общей площадью (что не удивительно, чем больше число пятен, тем больше общая площадь, ими занимаемая).

*Корреляционный анализ результатов исследований, проведенных в 2020 году* (рис. 12). Аналогичные данные, но степень корреляции слабее (возможно это связано с меньшей выборкой и большим разбросом данных в ней, однако общая тенденция абсолютна такая же).

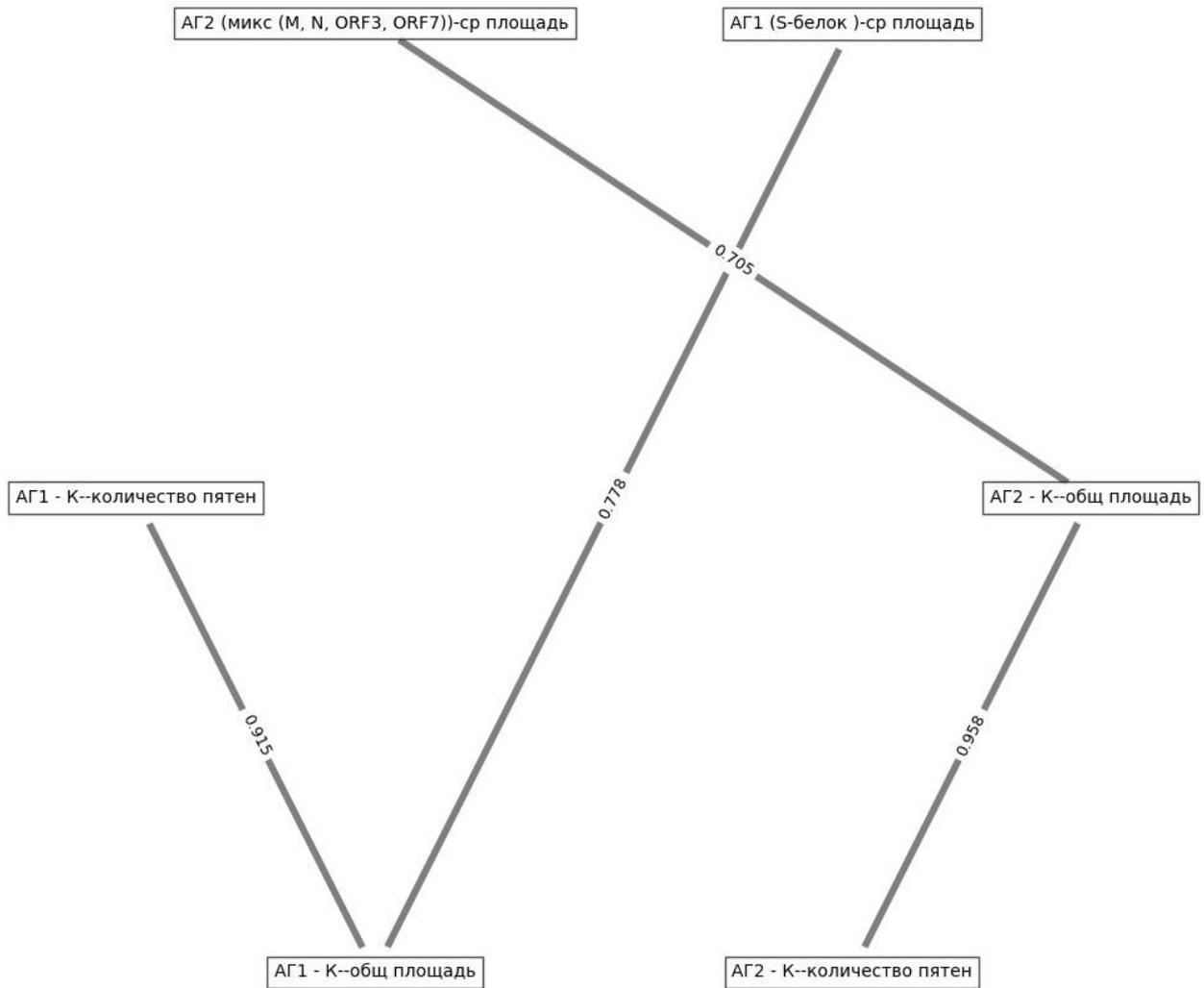


Рисунок 12. Корреляционный анализ различных параметров в исследованиях 2020 года: статистически значимые ( $|R| > 0,7$ ).

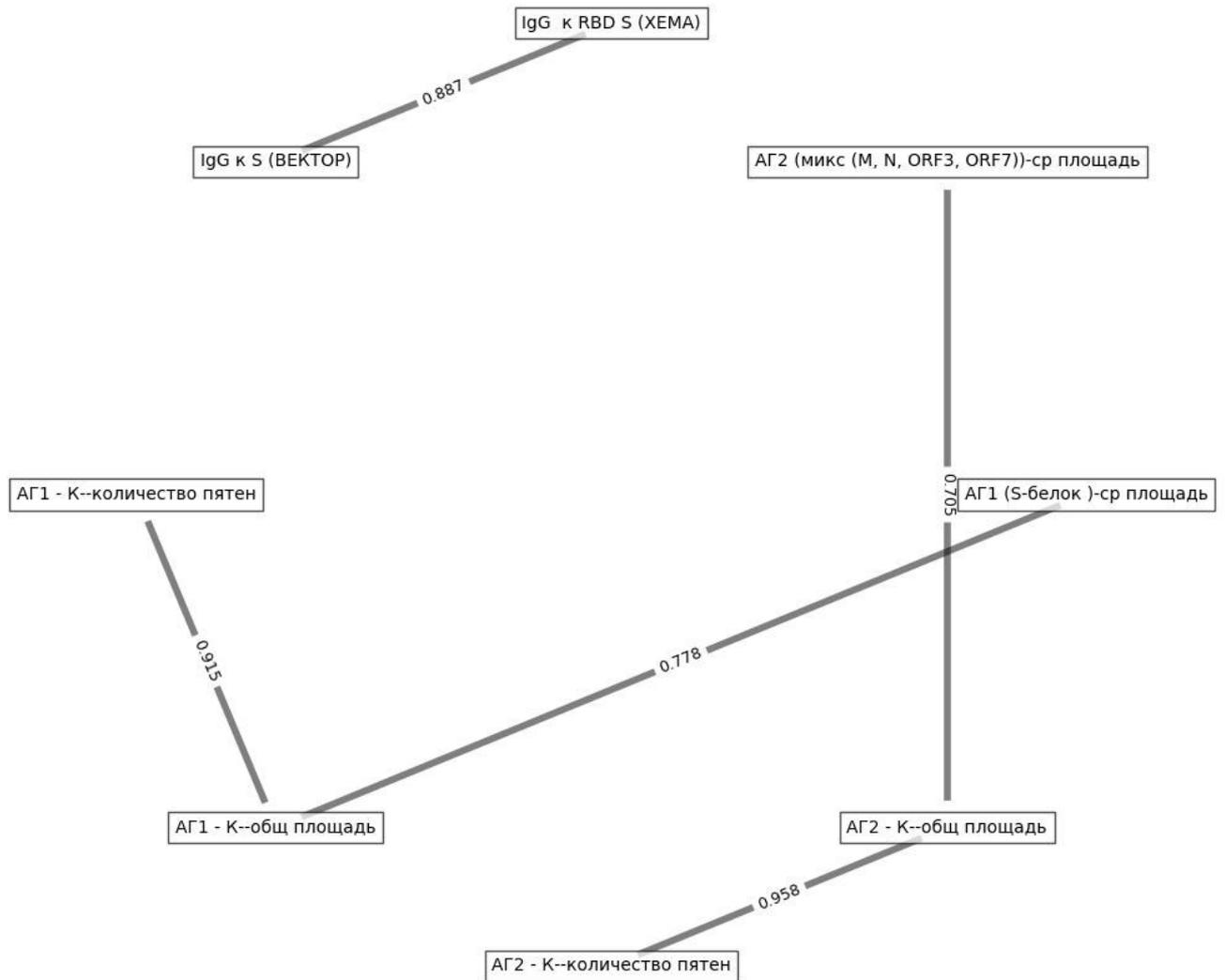


Рисунок 13. Корреляционный анализ различных параметров в исследованиях 2021 года: статистически значимые ( $|R| > 0,7$ ).

Среди переболевших положительных по АГ1 и отрицательных по АГ2 в 2021 году было статистически больше, чем в 2020. Среди вакцинированных в 2021 статистически чаще выявлялись положительные по АГ1.

*Регрессионный анализ результатов исследований, проведенных в 2021 году.* Были определены пороговые значения количества пятен, их общей и средней площади по обоим антигенам для возможности использования их в качестве

предиктора уровня тяжести заболевания. При этом в большинстве случаев вероятность прогноза статистически недостоверна, а зависимость тяжести от показателя слабо отрицательна, т.е. большее число пятен или их площади будет свидетельствовать о более легкой степени. Лишь при определении средней площади пятен по АГ1 отношения шансов оказались 1,62, что говорит о слабой прямой корреляции данного показателя с тяжестью болезни.

Более надежным оказался фактор уровня IgG к RBD S (Хема). По данному показателю группа с легкой степенью тяжести болезни статистически достоверно отличалась от более тяжелых форм, и степень тяжести прямо зависела от уровня иммуноглобулинов. Титры антител к другим белкам вируса также нецелесообразно использовать как предиктор тяжести ввиду отсутствия статистически значимых отличий между группами. При этом в группах с тяжелым течением антител вырабатывалось меньше, чем в группе с легким течением.

Можно предположить, что легкое течение болезни должно быть связано с более активной работой как клеточного, так и гуморального иммунитета (вырабатывается больше клеток памяти и антител к белкам вируса), однако статистически значимых различий выявлено не было.

*Регрессионный анализ результатов исследований, проведенных в 2020 году.* Количество пятен к АГ1 прямо зависит от степени тяжести, как и уровень IgG к S1 домену белка (основной вклад составил тот же белок, что и по данным 2021 года).

Обобщая данные обоих периодов, чувствительность и специфичность для всех изученных факторов редко оказывалась выше 60%, поэтому однозначно судить о степени тяжести болезни по значениям данных показателей не следует.

## ГЛАВА 6

РЕЗУЛЬТАТЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЦИТОКИНОВОГО ОТВЕТА НА  
БЕЛКИ SARS-COV-2 В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

*Данное экспериментальное наблюдение проводили только в проспективном одномоментном обсервационном исследовании 2021 года.*

Содержание цитокинов в среде культивирования МНПК в представленных группах обследуемых имеет свои особенности. В отсутствии стимуляции (рис. 14) обращает на себя внимание, имеющее место практически для всех цитокинов, систематичное, но недостоверно пониженное их содержание в среде культивирования с МНПК переболевших и вакцинированных. При этом у вакцинированных лиц эта особенность более выражена. Отмеченные тенденции отсутствуют только для хемокинов IL-8 и MCP-1, а также ростового фактора IL-7.

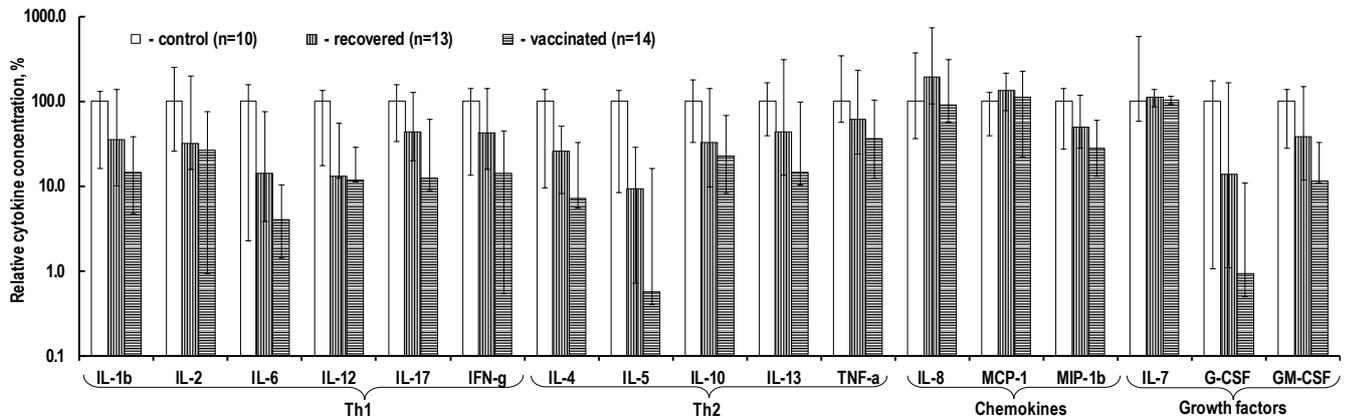


Рисунок 14. Содержание цитокинов в среде культивирования МНПК при отсутствии стимуляции. По вертикали – относительная концентрация цитокина (представляет собой величину, равную отношению измеренной истинной концентрации цитокина в образце к медиане результатов измерений истинной концентрации этого цитокина в образцах группы контрольных субъектов); по горизонтали – спектр цитокинов, хемокинов и факторов роста. Данные представлены в виде Me (Q1; Q3).

*Примечание:* статистически значимых отличий нет.

Неспецифическая поликлональная стимуляция с использованием ОКТ3 - моноклональных антител к поверхностному маркеру Т-лимфоцитов CD3, приводит к значимому повышению содержания большинства цитокинов в культуральной среде с МНПК субъектов всех групп (рис. 15). При этом больший прирост содержания цитокинов в среде с неспецифически стимулированными МНПК по сравнению с нестимулированными МНПК наблюдается и у переболевших, и у вакцинированных. При соответствии описанным особенностям ответа на неспецифическую стимуляцию основной части цитокинов, указанный сдвиг содержания цитокинов в культуральной среде с неспецифически стимулированными МНПК для упоминавшихся выше хемокинов IL-8 и MCP-1 и ростового фактора IL-7 носит недостоверный характер и не отвечает тенденции большего прироста содержания цитокина у переболевших и вакцинированных.

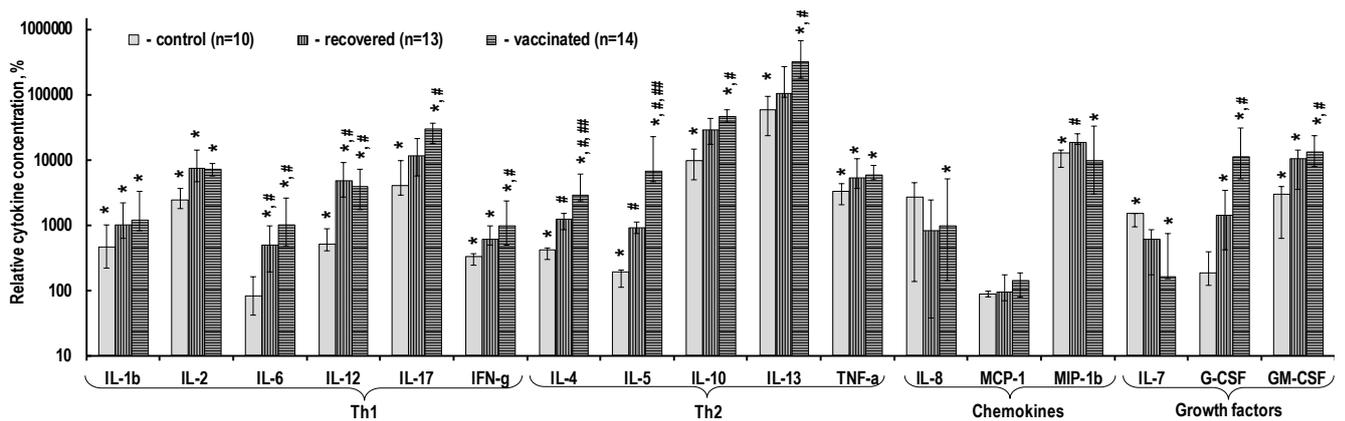


Рисунок 15. Содержание цитокинов в среде культивирования МНПК при неспецифической стимуляции ОКТ3. По вертикали - относительная концентрация цитокина (представляет собой величину, равную отношению измеренной истинной концентрации цитокина в образце к медиане результатов измерений истинной концентрации этого цитокина в образцах без стимуляции МНПК субъектов данной группы), по горизонтали – спектр цитокинов, хемокинов и факторов роста. Данные представлены в виде Me (Q1; Q3).

*Примечание:* \* -  $p < 0,01$  при сравнении образцов без стимуляции (Me относительной концентрации цитокина 100 %) с образцами с неспецифической стимуляцией внутри группы, # -  $p < 0,01$  при сравнении образцов с

неспецифической стимуляцией между данной и контрольной группами, ## -  $p < 0,01$  при сравнении образцов с неспецифической стимуляцией между группами вакцинированных и переболевших субъектов.

В отличие от неспецифической стимуляции ОКТЗ специфическая стимуляция пептидами вируса SARS-CoV-2 в виде наборов AG1 (рис. 16) и AG2 (рис. 17) не приводит к увеличению содержания цитокинов в среде культивирования МНПК всех групп субъектов. Все случаи повышения содержания цитокинов в культуральной среде в присутствии пептидов вируса по сравнению с нестимулированными МНПК являются недостоверными. При этом в подавляющем большинстве случаев в присутствии пептидов вируса содержание цитокинов ниже и во многих случаях достоверно ниже. Отмечавшееся при анализе содержания цитокинов в среде культивирования МНПК без стимуляции и при неспецифической стимуляции несоответствие общим тенденциям для IL-8 и IL-7 сохраняется при специфической стимуляции, но выражено в меньшей степени. В то же время особенности накопления MCP-1 в среде культивирования МНПК соответствуют основным особенностям, описанным для специфической стимуляции выше.

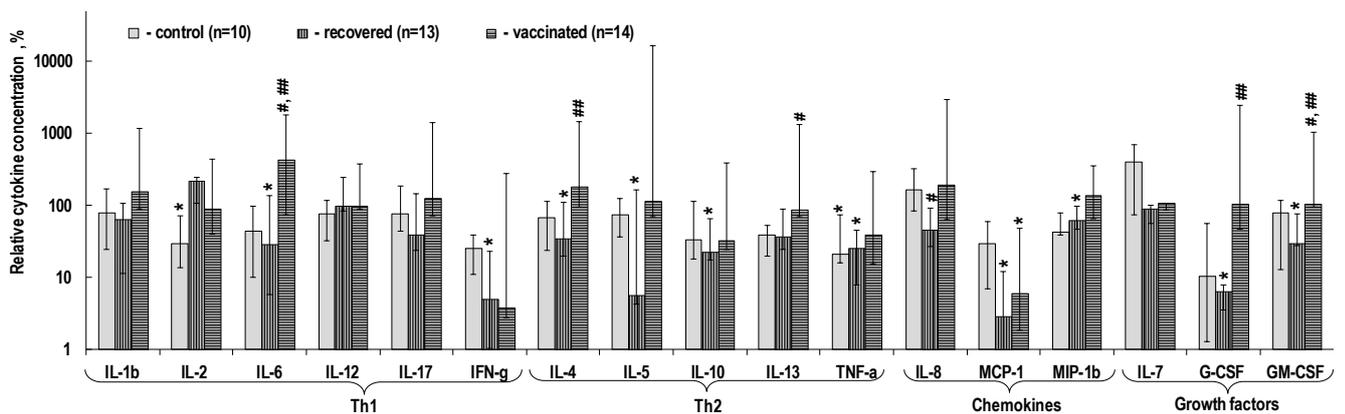


Рисунок 16. Содержание цитокинов в среде культивирования МНПК при специфической стимуляции пептидами вируса SARS-CoV-2 в виде наборов AG1.

По вертикали - относительная концентрация цитокина (представляет собой величину, равную отношению измеренной истинной концентрации цитокина в

образце к медиане результатов измерений истинной концентрации этого цитокина в образцах без стимуляции МНПК субъектов данной группы), по горизонтали – спектр цитокинов, хемокинов и факторов роста. Данные представлены в виде Ме (Q1; Q3).

*Примечание:* \* -  $p < 0,01$  при сравнении образцов без стимуляции (Ме относительной концентрация цитокина 100 %) с образцами со специфической стимуляцией внутри группы, \*\* -  $p < 0,01$  при сравнении образцов со специфической стимуляцией разными наборами пептидов SARS-CoV-2 внутри группы, # -  $p < 0,01$  при сравнении образцов с одинаковой специфической стимуляцией между данной и контрольной группами, ## -  $p < 0,01$  при сравнении образцов с одинаковой специфической стимуляцией между группами вакцинированных и переболевших субъектов.

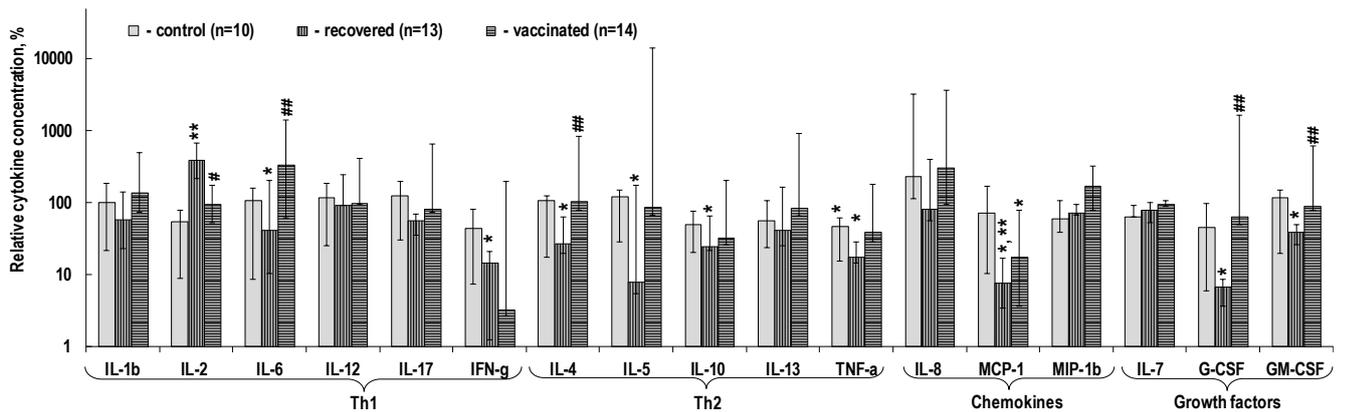


Рисунок 17. Содержание цитокинов в среде культивирования МНПК при специфической стимуляции пептидами вируса SARS-CoV-2 в виде наборов AG2. По вертикали - относительная концентрация цитокина (представляет собой величину, равную отношению измеренной истинной концентрации цитокина в образце к медиане результатов измерений истинной концентрации этого цитокина в образцах без стимуляции МНПК субъектов данной группы), по горизонтали – спектр цитокинов, хемокинов и факторов роста. Данные представлены в виде Ме (Q1; Q3).

*Примечание:* \* -  $p < 0,01$  при сравнении образцов без стимуляции (Ме относительной концентрация цитокина 100 %) с образцами со специфической

стимуляцией внутри группы, \*\* -  $p < 0,01$  при сравнении образцов со специфической стимуляцией разными наборами пептидов SARS-CoV-2 внутри группы, # -  $p < 0,01$  при сравнении образцов с одинаковой специфической стимуляцией между данной и контрольной группами, ## -  $p < 0,01$  при сравнении образцов с одинаковой специфической стимуляцией между группами вакцинированных и переболевших субъектов.

Таким образом, в отсутствие стимуляции отмечается систематическое, но недостоверное снижение содержания практически всех цитокинов в культуральной среде у выздоровевших и вакцинированных лиц. При неспецифической стимуляции почти все цитокины значительно увеличены у всех людей. В то же время специфическая стимуляция не приводит к увеличению содержания цитокинов во всех образцах культуральной среды. Все случаи повышения содержания цитокинов после специфической стимуляции по сравнению с нестимулированными МНПК недостоверны. Таким образом, согласно полученным данным, цитокиновый ответ на специфическую стимуляцию Т-лимфоцитов, сенсibilизированных у выздоравливающих от COVID-19 и поствакцинированных лиц, не сопровождается накоплением цитокинов в среде, окружающей лимфоциты, что обеспечивает сбалансированный иммунный ответ без нежелательных последствий, например, в виде цитокинового шторма.

## ГЛАВА 7

## БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА И ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 И ВАКЦИНИРОВАННЫХ «ГАМ-КОВИД-ВАК»

Биоинформационный анализ с кластеризацией субъектов показал, что при использовании только измерявшихся в данной работе параметров клеточного и гуморального иммунитета (рис. 18-21) каждый из трёх кластеров (количество кластеров выбрано, исходя из количества групп в исследовании), выделяемых алгоритмом с лучшей кластеризацией, включает представителей всех групп.

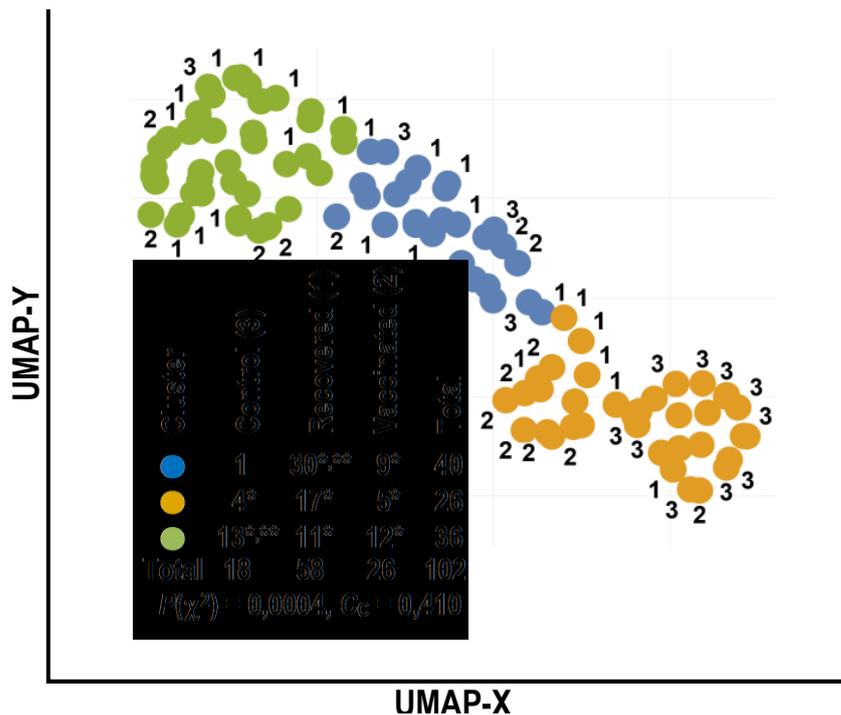


Рисунок 18. Биоинформационный анализ с кластеризацией субъектов по показателям клеточного и гуморального иммунитета субъектов.

*Примечание:* кружками одинакового цвета обозначены субъекты одного кластера. Числа около кружков отражают принадлежность субъекта к клинической группе: 1 - переболевшие субъекты, 2 - вакцинированные субъекты, 3 - контрольные субъекты. Представленные таблицы сопряженности содержат

количество представителей каждой клинической группы в составе кластеров.  
 \* - доля субъектов в кластере достоверно превышает 0,05 от количества субъектов с соответствующим клиническим статусом ( $p < 0,01$ ), \*\* - доля субъектов в кластере достоверно превышает доли субъектов с соответствующим клиническим статусом во всех остальных кластерах ( $p < 0,01$ ).

При этом, несмотря на невозможность принять гипотезу о совпадении состава кластеров по наличию субъектов разных клинических групп ( $P(\chi^2) = 0,0004$  и  $CC=0,410$  для соответствующей таблицы сопряжённости признаков на врезке, полученные достоверные различия не позволяют ни один кластер охарактеризовать как образованный представителями какой-либо клинической группы (отсутствие областей с высокой ранговой корреляцией на тепловой диаграмме рис. 18).

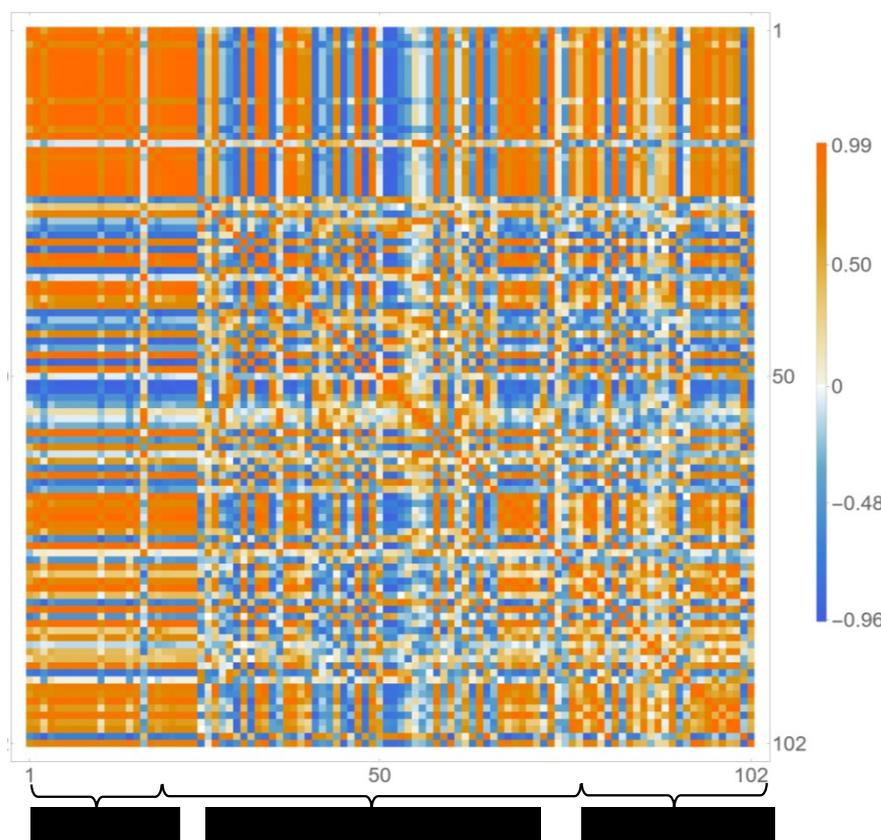


Рисунок 19. Тепловая диаграмма ранговой корреляции по показателям клеточного и гуморального иммунитета субъектов.

Так, в кластере, включающем большую часть (13 из 18) контрольных субъектов, присутствуют в значимых количествах переболевшие (11 из 58) и вакцинированные (12 из 26). В другом кластере, в который входит большая часть (30 из 58) переболевших присутствует значимое количество вакцинированных (9 из 26). Третий кластер включает представителей разных клинических групп в значимых количествах от 20 до 30 % от количества субъектов в группах.

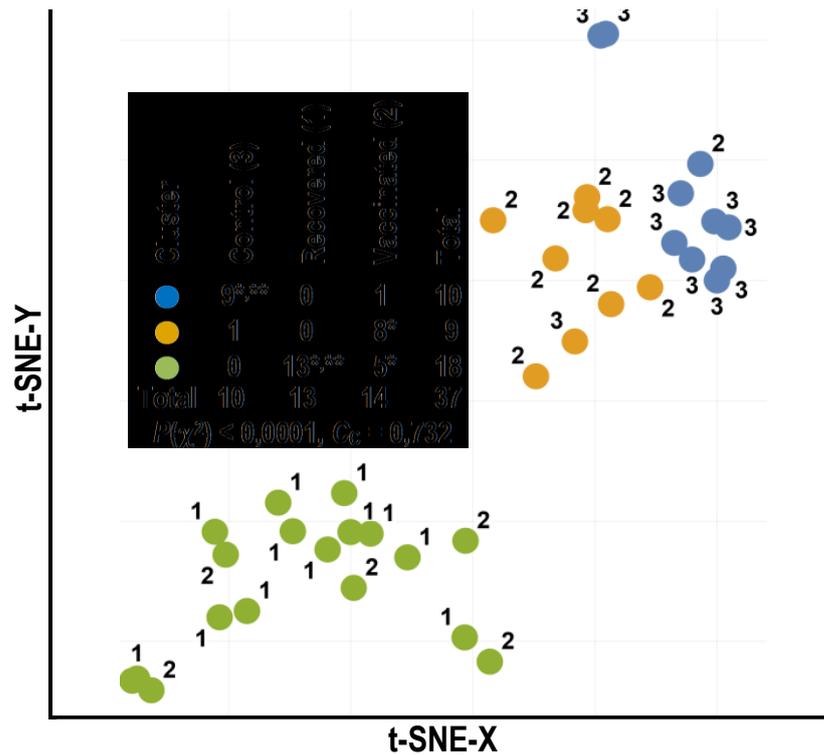


Рисунок 20. Биоинформационный анализ с кластеризацией субъектов по показателям цитокинового профиля. Кружками одинакового цвета обозначены субъекты одного кластера. Числа около кружков отражают принадлежность субъекта к клинической группе: 1 - переболевшие субъекты, 2 - вакцинированные субъекты, 3 - контрольные субъекты. Представленные таблицы сопряженности содержат количество представителей каждой клинической группы в составе кластеров. \* - доля субъектов в кластере достоверно превышает 0,05 от количества субъектов с соответствующим клиническим статусом ( $p < 0,01$ ), \*\* - доля субъектов в кластере достоверно превышает доли субъектов с соответствующим клиническим статусом во всех остальных кластерах ( $p < 0,01$ ).

При разделении субъектов на три кластера с включением клеточного и гуморального иммунитета вместе с показателями цитокинового профиля (рис. 20), кластеры характеризуются не только лучшей сопряжённостью таблицы представленности субъектов разных клинических групп ( $P(\chi^2) < 0,0001$  и  $SS=0,732$ ), но и лучшей привязанностью к клиническим группам (наличие соответствующих областей с высокой ранговой корреляцией на тепловой диаграмме рис. 21).

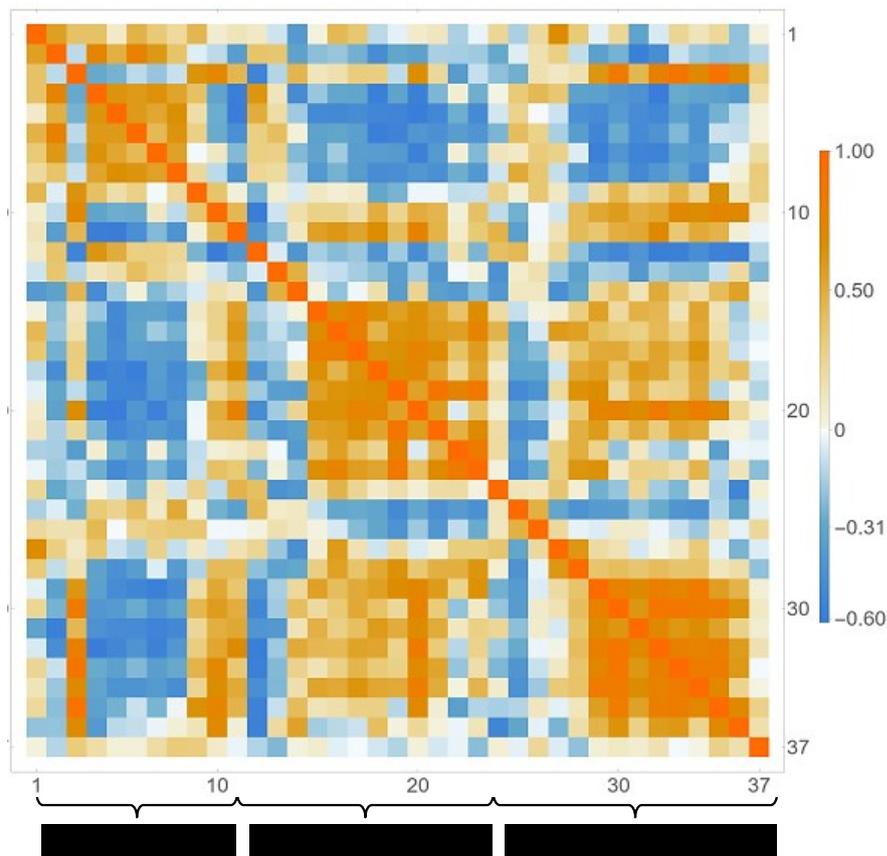


Рисунок 21. Тепловая диаграмма ранговой корреляции по показателям цитокинового профиля субъектов.

В кластере, включающем практически всех представителей контрольных субъектов (9 из 10), отсутствуют переболевшие и незначимо представлены вакцинированные (1 из 14). Все переболевшие входят в состав другого кластера, в котором их, как и в случае использования для кластеризации показателей клеточного и гуморального иммунитета, дополняет значимое количество

вакцинированных (5 из 14). Третий кластер образован практически только вакцинированными, при отсутствии переболевших и незначимом количестве контрольных (1 из 10) субъектов.

*Кластеризация показателей обследованных групп, ограниченная только показателями клеточного и гуморального иммунитета (рис. 22-25), была привязана к пяти кластерам, исходя из оцениваемых в методиках антиген-распознающих структур четырех специфичностей (антитела к S-белку, антитела к N-белку, Т-клетки к пептидам S-белка (AG1) или Т-клетки к пептидам N-, M-, ORF3-, ORF7 -белков (AG2)) и определения показателей нестимулированных лимфоцитов. В отдельные кластеры объединились показатели, оцениваемые через конкретные антиген-распознающие структуры и показатели нестимулированных лимфоцитов.*

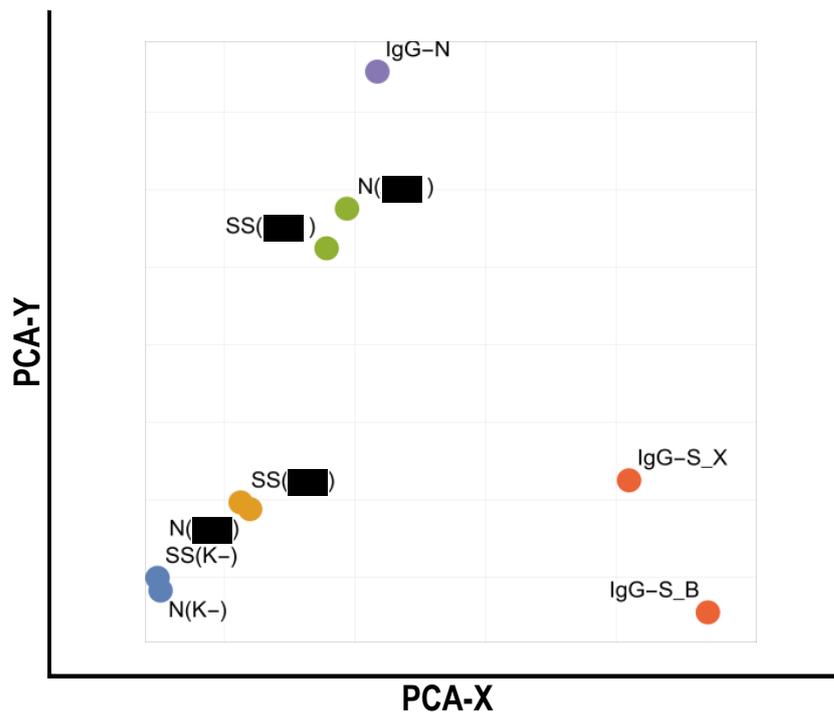


Рисунок 22. Кластеризация показателей клеточного (Т-клетки) и гуморального (Ig) иммунитета субъектов.

*Примечание:* кружками одинакового цвета обозначены показатели одного кластера. Обозначения около кружков отражают принадлежность показателя к группам цитокинов (Th1, Th2, CC, GF), клеточного (N, SS) и гуморального (IgG-S,

IgG-N) иммунитета с указанием в скобках используемой активации (K+, AG1, AG2) или её отсутствия (K-).

Кластеризация показателей субъектов с включением в него показателей продуцирования цитокинов лимфоцитами (рис. 24-25) также была привязана к пяти кластерам. Четыре кластера необходимы для оценки связи результатов кластеризации с группировкой цитокинов по их функциональной направленности (Th1, Th2, CC, GF) или по используемой активации лимфоцитов (K-, K+, AG1, AG2). Добавление пятого кластера отражает необходимость оценки возможного особого поведения показателей клеточного и гуморального иммунитета (NN, SS и Ig).

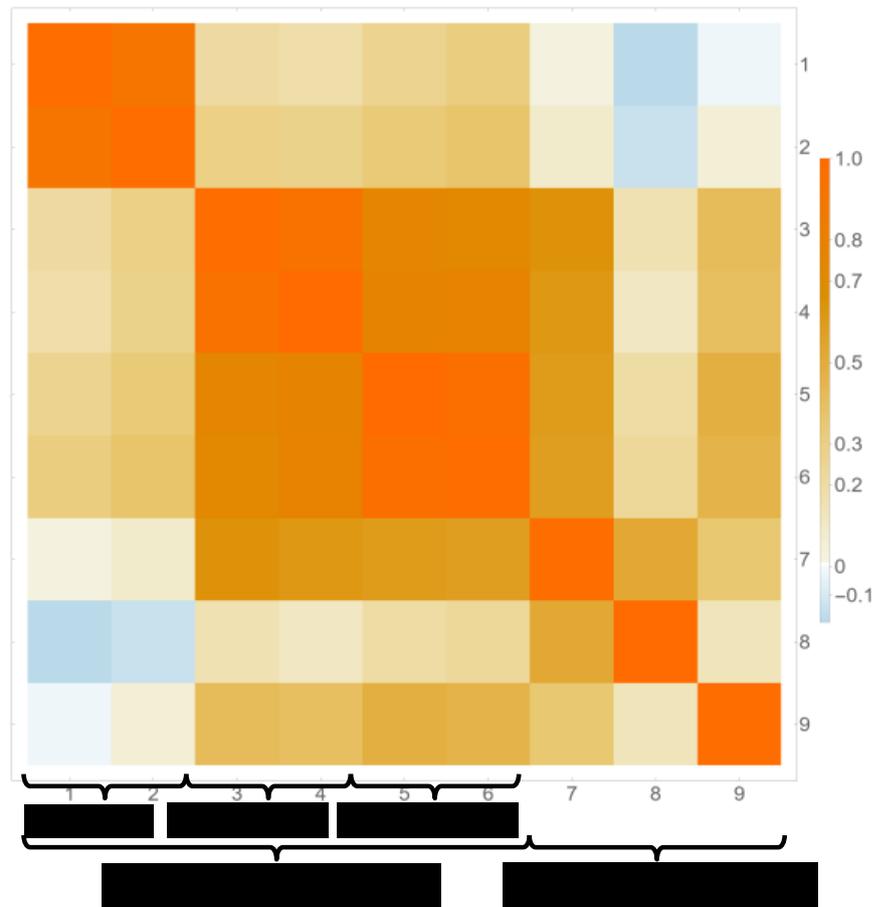


Рисунок 23. Тепловая диаграмма ранговой корреляции по показателям клеточного и гуморального иммунитета.

Статистическая оценка таблиц сопряженности показывает отсутствие достоверных различий между кластерами ( $P(\chi^2) = 0,6497$ ) при анализе представленности показателей с учётом функциональной направленности цитокинов. Однако при анализе цитокиновых показателей с учётом активации лимфоцитов различия между кластерами становятся значимыми ( $P(\chi^2) < 0,0001$ ,  $CC = 0,667$ ) и выделяется один кластер, содержащий практически все (14 из 17) показатели продуцирования цитокинов лимфоцитами без активации. В то же время нельзя выделить ни одного кластера со значимым преобладанием представленности показателей продуцирования цитокинов при активации лимфоцитов и показателей клеточного и гуморального иммунитета.

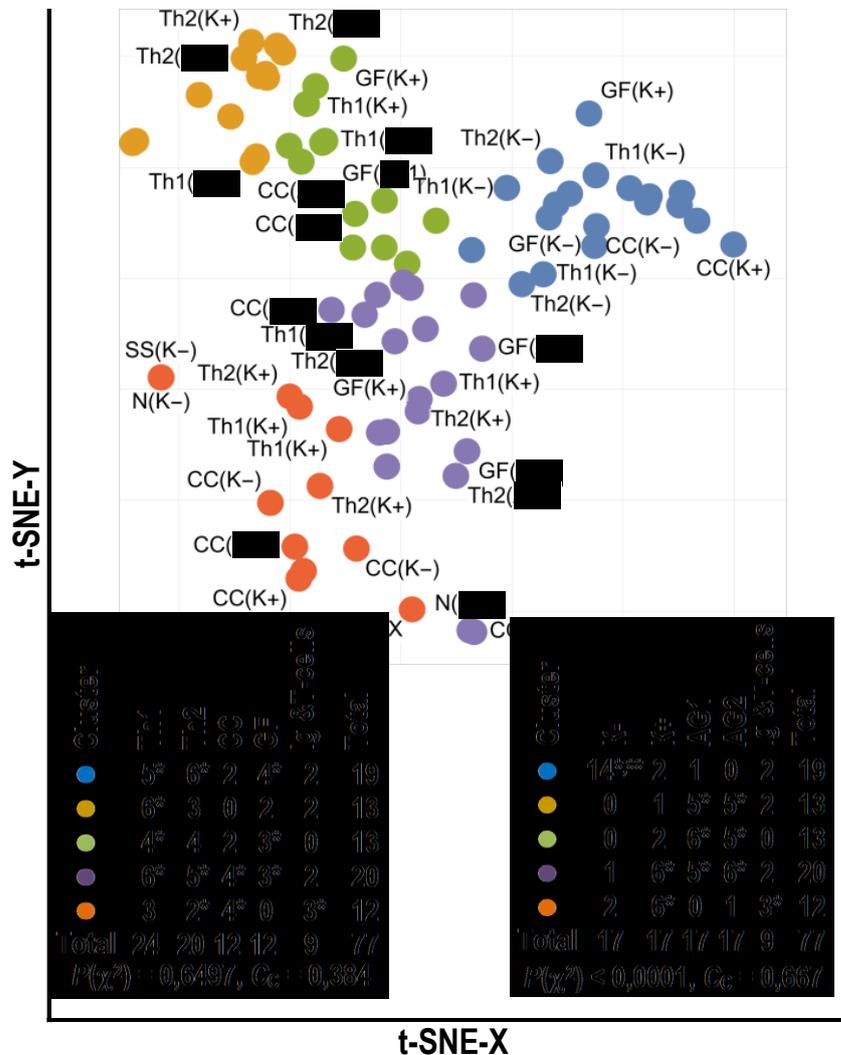


Рисунок 24. Кластеризация по показателям цитокинового профиля субъектов.

*Примечание:* кружками одинакового цвета обозначены показатели одного кластера. Обозначения около кружков отражают принадлежность показателя к группам цитокинов (Th1, Th2, CC, GF), клеточного (N, SS) и гуморального (IgG-S, IgG-N) иммунитета с указанием в скобках используемой активации (K+, AG1, AG2) или её отсутствия (K-). Представлены таблицы сопряженности с разной группировкой показателей. \* - доля показателей в кластере достоверно превышает 0,05 от количества показателей, принадлежащих к указанной группе ( $p < 0,01$ ), \*\* - доля показателей в кластере достоверно превышает доли показателей, принадлежащих к указанной группе, в остальных кластерах ( $p < 0,01$ ).

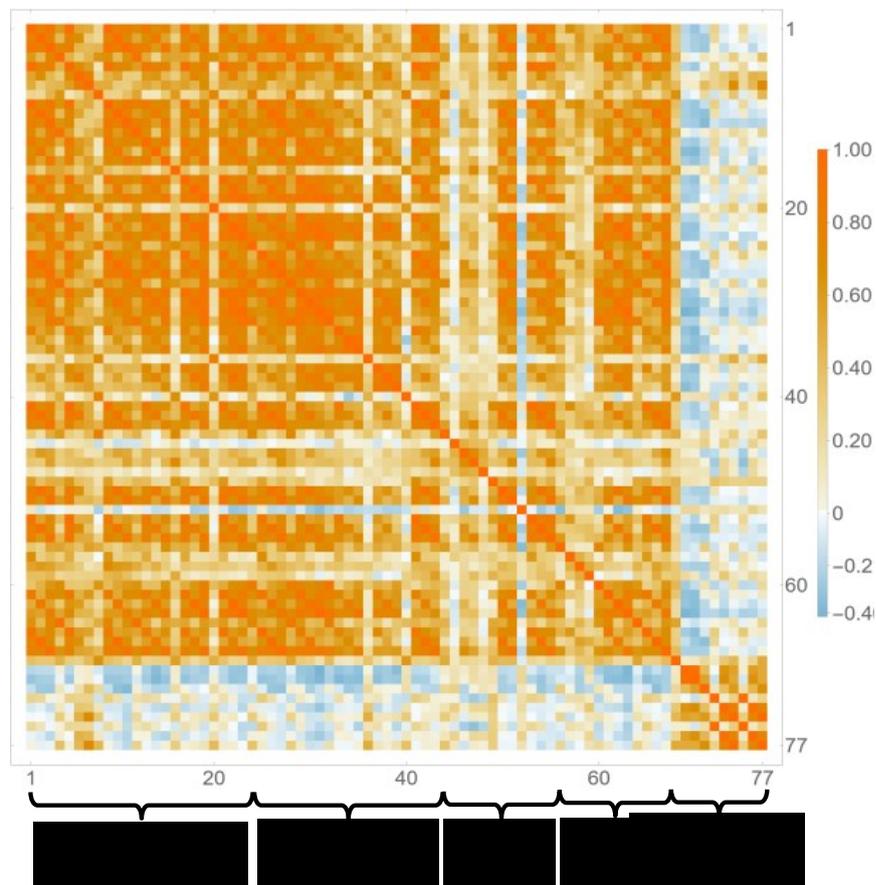


Рисунок 25. Тепловая диаграмма ранговой корреляции по показателям цитокинового профиля субъектов.

Таким образом, биоинформационный анализ показал, что комплексные данные параметров клеточного, гуморального иммунного ответа и исследования цитокинового профиля демонстрируют ряд закономерностей. Особенности

противовирусных клеточного и гуморального иммунного ответов в сенсibiliзируемом организме определяются презентацией всех антигенов полноценным вирусом SARS CoV 2 (заболевание) и только антигенов S белка векторной вакциной «Гам-Ковид-Вак» (вакцинация). Однако невозможность исключить невыявленное бессимптомное инфицирование во время пандемии, по видимому, является причиной обнаружения у вакцинированных субъектов значимого Т клеточного ответа на антигены, не относящиеся к S белку.

При наличии положительного заключения о наличии гуморального иммунного ответа у более 90 % инфицированных и вакцинированных, заключение о наличии Т-клеточного ответа может быть сделано для примерно 70 % переболевших и 50 % вакцинированных. Таким образом, рекомбинантный механизм появления в организме специфических распознающих антиген молекулярных структур (рецепторов) наивных Т и В лимфоцитов приводит к разной силе клеточного и гуморального противовирусного иммунитета, возникающего у субъекта после инфицирования вирусом SARS CoV 2 или вакцинации «Гам-Ковид-Вак».

Повышенное продуцирование IFN- $\gamma$  отдельными Т клетками, сенсibiliзированными вирусными антигенами, в случае стимуляции продукции цитокинов антигенными пептидами *in vitro*, не сопровождается ростом содержания этого и других цитокинов в среде культивирования, в отличие от неспецифической поликлональной стимуляции. Полученный результат указывает на то, что одновременно с ростом продуцирования цитокинов Т лимфоцитами, отвечающими на специфическую стимуляцию, в не меньшей степени увеличивается их способность к утилизации цитокинов. В результате при специфическом иммунном ответе создаются условия для обеспечения управляемого уровня цитокинов и недопущения развития «цитокинового шторма».

## ГЛАВА 8

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведена оценка иммунного ответа Т-клеток путем обнаружения лимфоцитов, секретирующих IFN- $\gamma$ , после стимуляции различными антигенами SARS-CoV-2 у реконвалесцентов COVID-19 и после вакцинации «Гам-Ковид-Вак». Кроме того, анализировали гуморальный иммунитет и сравнивали со специфическим Т-клеточным ответом (рис. 26-27). И при анализе особенностей специфического Т-клеточного иммунного ответа при инфицировании SARS-CoV-2 и после вакцинации наряду с другими авторами [124-126] отметили решающую роль Т-клеток.

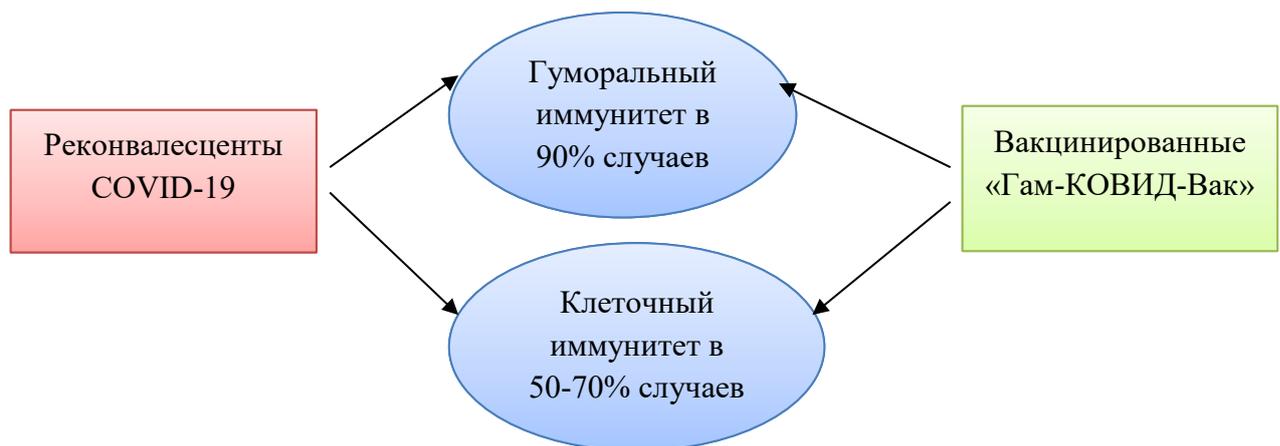


Рисунок 26. Общие черты противовирусного гуморального и клеточного иммунитета у реконвалесцентов COVID-19 и вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак».

При оценке Т-клеточного ответа к SARS-CoV-2 методом ELISPOT выявлены следующие особенности. В группе переболевших медиана количества спотов в ПАГ 2 (пептиды белков N, M, Orf7a, Orf3a) статистически значимо выше ( $p = 0,009$ ), чем у лиц, не переболевших COVID-19. Количество спотов в ПАГ 1 (пептиды S-белка) в группе переболевших имеет тенденцию к повышению ( $p = 0,081$ ). У вакцинированных лиц Т-клеточный иммунитет вырабатывается преимущественно в ПАГ 1 (пептиды S-белка), нежели в ПАГ 2 (пептиды N-, M-,

Orf7a-, Orf3a-белков). Медиана спотов в ПАГ 1 в группе вакцинированных статистически значимо выше ( $p = 0,014$ ), чем у невакцинированных.

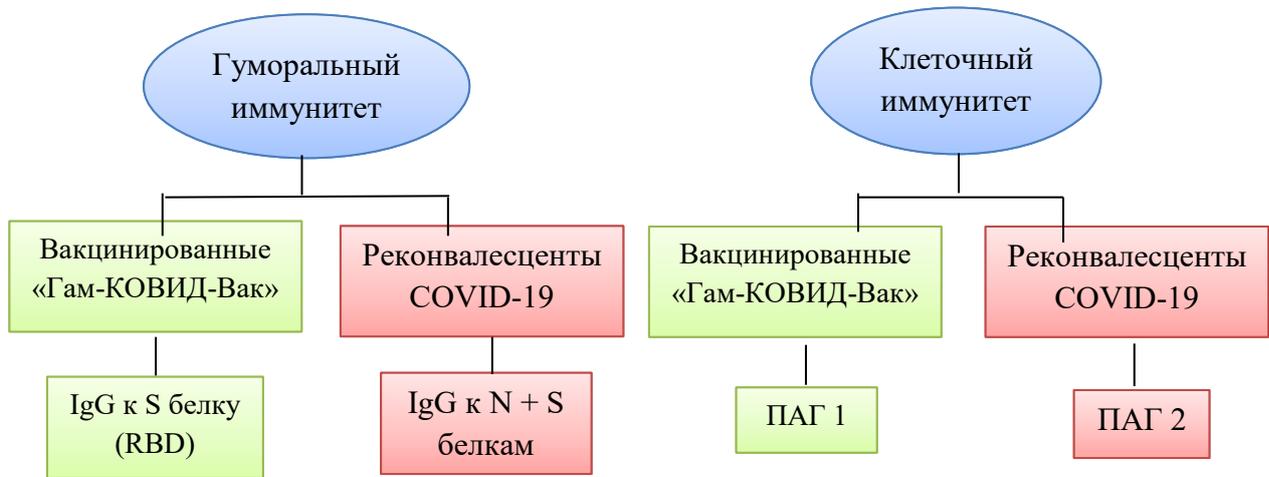


Рисунок 27. Различия противовирусного иммунитета у реконвалесцентов COVID-19 и вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак».

Формирование Т-клеточного иммунитета после заболевания более эффективно, чем после вакцинации: в ответ на «Гам-КОВИД-Вак» Т-клеточный иммунитет сохраняется более 6 месяцев лишь у 50% пациентов, а после перенесенного COVID-19 через 19 месяцев он сохраняется у 70% лиц (рис. 28).

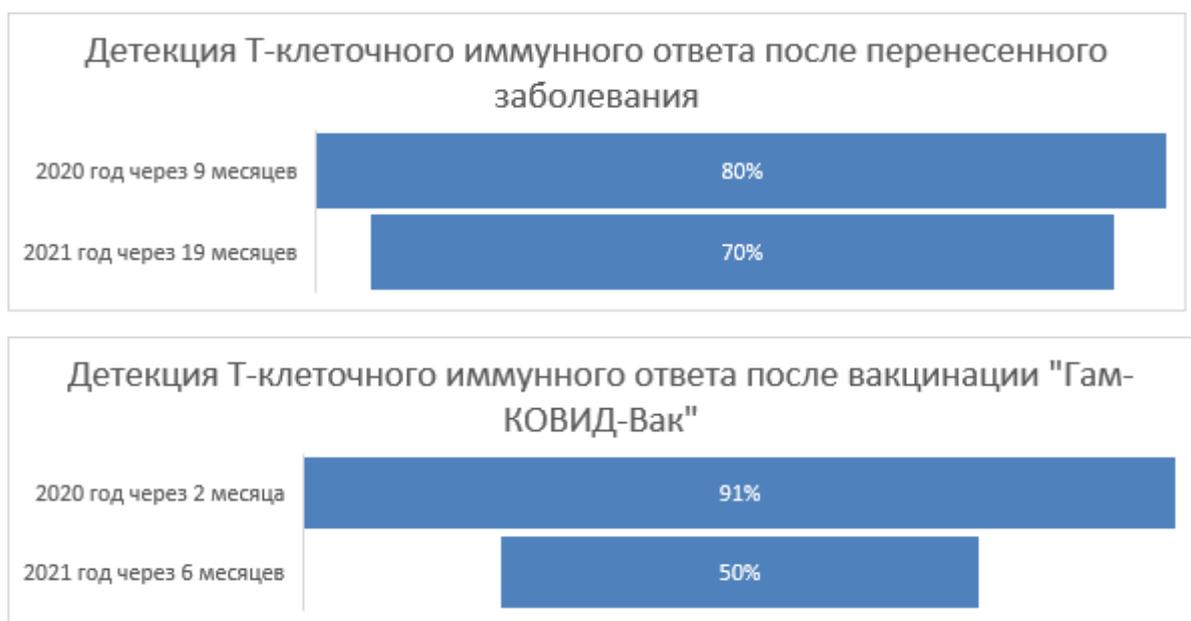


Рисунок 28. Длительность Т-клеточного иммунного ответа.

Максимальное значение медианы количества спотов отмечается у лиц с меньшим поражением лёгких (до 25 %). Таким образом, полученные нами результаты указывают на высокую степень обоснованности и достоверности метода ELISPOT. Высокая чувствительность и воспроизводимость метода дают основание для его широкого применения.

Повышенное продуцирование IFN- $\gamma$  отдельными Т-клетками, сенсibilизированными вирусными антигенами, в случае стимуляции продукции цитокинов антигенными пептидами *in vitro*, не сопровождается ростом содержания этого и других цитокинов в среде культивирования, в отличие от неспецифической поликлональной стимуляции. Полученный результат указывает на то, что одновременно с ростом продуцирования цитокинов Т-лимфоцитами, отвечающими на специфическую стимуляцию, в не меньшей степени увеличивается их способность к утилизации цитокинов. В результате при специфическом иммунном ответе создаются условия для обеспечения управляемого уровня цитокинов и недопущения развития «цитокинового шторма».

Приоритет Т-клеточной защиты связан с рядом особенностей вируса. Внутриклеточный паразитизм вирусов существенно ограничивает возможность иммунного противодействия вирусному заражению организма за счёт антител [127-129]. Неэффективность гуморального иммунитета для предотвращения заражения вирусами эпителиальных клеток усугубляется невозможностью постоянного поддержания высокого уровня специфических секреторных антител в области основных входных ворот вирусной инфекции - в слизистых оболочках и на их поверхности [130-132]. Однако презентация на поверхности зараженных клеток эпитопов синтезируемых вирусных белков в составе молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса [133-134] позволяет выявлять и подавлять заражённые клетки за счёт Т-клеточных механизмов распознавания и удаления клеток, внутри которых синтезируются чужие или свои видоизмененные белки [135-137]. После появления клеток с экспрессией чужеродных для организма вирусных эпитопов возникает Т-клеточная иммунная реакция с

образованием клеток памяти [138-140], позволяющими повысить скорость нарастания и силу Т-клеточного иммунного ответа при повторном заражении тем же возбудителем [141-142]. Поэтому присутствие в организме Т-лимфоцитов, специфически активируемых эпитопами определённого вируса, говорит о наличии необходимой составляющей противовирусного иммунитета, которая может быть следствием естественного (перенесённая инфекция) [143-144] или искусственного (вакцинация) [145-146] контакта иммунной системы с вирусом или его компонентами.

Продукция IFN- $\gamma$  является отличительной особенностью цитотоксических Т-лимфоцитов и Th1 Т-хелперов, активирующихся при взаимодействии с клетками, на поверхности которых молекулы МНС I и II класса представляют чужеродные эпитопы [147-148]. Поэтому способность лимфоцитов продуцировать IFN- $\gamma$  широко исследуется как для расширения понимания общих основ Т-клеточного иммунного ответа [149-150], так и для оценки участия Т-лимфоцитов в частных его проявлениях, в том числе, в противовирусном иммунитете [151-152]. Количество и особенности продуцирующих IFN- $\gamma$  лимфоцитов периферической крови, определяемые при специфической стимуляции антигенами вируса, выступают как показатели, которые должны отражать Т-клеточную составляющую иммунного ответа организма на вирусную инфекцию или вакцинацию [153-154].

Описанные особенности взаимодействия вирусов с организмом хозяина и особенности развития ответа иммунной системы хозяина на вирусную инфекцию указывают на ограниченные возможности вакцин, содержащих только белковые антигены вирусов. Отсутствие у таких вакцин способности к обеспечению внутриклеточного синтеза вирусных белков и отсутствие презентации эпитопов вирусных белков в составе МНС I класса приводит к возникновению только гуморального иммунного ответа [155-157]. Указанный недостаток отсутствует у вакцин, созданных на основе живого ослабленного вируса [158], нереплицирующегося ДНК вектора с встроенным фрагментом ДНК вируса [159], плазмиды с встроенным фрагментом ДНК вируса [160] и матричной РНК,

кодирующей белки вируса [161]. При этом только первая из перечисленных вакцин обладает возможностью полной презентации антигенов вируса, а возможности остальных ограничены одним или несколькими белками и даже эпитопами [162]. Однако высокие требования к ослабленному штамму вируса и его производству приводят к тому, что вакцины на основе ослабленного вируса, хотя и являются классическими, но оказываются не привлекательными для экстренного создания в условиях пандемий [163]. В этой связи получили развитие разработки и внедрение в практику противовирусных вакцин на основе генноинженерных конструкций, среди которых важное место занимают комбинированные аденовирусные векторные вакцины [164].

Выявленная в проведённых исследованиях представленность специфичностей Т-лимфоцитов, продуцирующих INF- $\gamma$  при антигенной стимуляции МНПК в культуре, после перенесённого заболевания соответствует презентации в комплексах МНС эпитопов всех белков развивающегося внутри клеток организма вируса SARS-CoV-2 и отражает более высокий уровень Т-клеточного ответа на антигены белков, входящих в набор AG2, в частности, N-белка [165] или белков ORF1 и ORF3 [166]. В то же время при вакцинации «Гам-КОВИД-Вак» белки, эпитопы которых представлены в наборе AG2, не продуцируются используемыми рекомбинантными аденовирусными частицами, содержащими только ген S-белка вируса. В таком случае обнаруженное присутствие Т-лимфоцитов, отвечающих на антигены панели AG2, может быть объяснено незамеченным бессимптомным инфицированием SARS-CoV-2 [167], которое может иметь место до, после и во время вакцинации.

Невозможность охарактеризовать Т-клеточный иммунный ответ как положительный у значительной доли переболевших (30 %) и вакцинированных (около 50 %) указывает на высокую вероятность существования невыявляемого слабого Т-клеточного иммунного ответа при инфицировании вирусом SARS-CoV-2, не сопровождающегося клиническими проявлениями заболевания COVID-19. Хотя количество положительных по Т-клеточному ответу среди контрольных субъектов оказалось незначимым, интересно отметить, что

положительный ответ в этой группе наблюдался на антигены набора AG2. Это сближает данную группу с группой переболевших и отражает возможность развития слабого Т-клеточного иммунного ответа при бессимптомном протекании инфицирования вирусом SARS-CoV-2, обнаруживаемого только очень высокочувствительными методами [168].

Отсутствие достоверных внутригрупповых различий в продуцировании INF- $\gamma$  отдельными МНПК без стимуляции и при стимуляции вирусными антигенами, можно рассматривать как признак слабой зависимости ответа лимфоцитов на стимулы от вида антигена и специфичности взаимодействия с ним антиген-распознающих молекул. Достижение порогового уровня активирующим сигналом, вызываемым взаимодействием антигена с распознающими специфическими молекулярными рецепторами лимфоцитов, приводит к запуску синтеза цитокинов [169-170] с интенсивностью, определяемой биохимическими возможностями клеток организма [171-172]. Большое значение могут иметь метаболические особенности стимулируемых клеток, которые они приобретают в ходе своего созревания при первичной антигенной стимуляции и при переходе в состояние клеток памяти (инфицирование или вакцинация). Последнее положение подтверждает полученная достоверная разница в площади пятен вокруг клеток, продуцирующих INF- $\gamma$ , у контрольных и переболевших при стимуляции антигенами.

В отличие от Т-клеточного иммунитета у переболевших и вакцинированных высокий уровень антител полностью соответствует антигенному составу вызвавшего гуморальный иммунный ответ источника антигена. У переболевших, иммунная система которых взаимодействовала с полноценным вирусом SARS-CoV-2, имеет место статистически значимое повышение уровня антител как к S-белку, так и N-белку, тогда как у вакцинированных, источником антигенов для которых был искусственный вирус, высокий уровень обнаружен только для антител к S-белку. По антителам к антигенам N-белка доля серопозитивных вакцинированных лиц находится на уровне контрольных субъектов.

*Продуцирование цитокинов Т-лимфоцитами, сенсibilизированными при инфицировании SARS-CoV-2 и после вакцинации.* Полученные в данном исследовании результаты нестимулированного и стимулированных цитокиновых профилей в среде культивирования МНПК согласуются с тем, что содержание цитокина в среде культивирования является следствием наложения на продуцирование цитокина активированными клетками процессов его выведения из среды в результате поглощения культивируемыми клетками, рецепторного и неспецифического связывания с поверхностью клеток, разрушения в культуральной среде [173-174]. В связи с этим, отмеченное отсутствие роста и даже тенденция к снижению содержания цитокинов в среде культивирования МНПК при специфической стимуляции пептидами вируса SARS-CoV-2, по-видимому, отражает особенность отвечающих Т-лимфоцитов, заключающуюся в том, что при специфической стимуляции их способность к поглощению цитокинов увеличивается не меньше способности к продуцированию цитокинов. Это хорошо видно на примере INF- $\gamma$ , для которого показано повышение количества Т-лимфоцитов, отвечающих повышенным продуцированием этого цитокина на стимуляцию наборами пептидов AG1 и AG2 у переболевших и вакцинированных субъектов. Однако на фоне увеличения суммарного продуцирования INF- $\gamma$  отдельными клетками его содержание в среде культивирования специфически стимулированных МНПК оказывается даже ниже, чем в среде нестимулированных МНПК. Поскольку отток INF- $\gamma$  от одного лимфоцита за счёт связывания с мембраной на дне лунки, а также общий отток из среды за счёт поглощения не отвечающими на стимуляцию МНПК в лунке должен оставаться неизменным, то в качестве причины отсутствия прироста содержания этого цитокина в среде культивирования стимулированных МНПК выступает одновременное повышенное поглощение цитокина Т-лимфоцитами, ответившими на стимуляцию. Сделанный вывод об одновременном повышении интенсивности процессов как продуцирования, так и поглощения цитокинов активированными клетками соответствует необходимости обеспечения управляемого цитокинового ответа как условия предотвращения развития

гиперцитокинемии и «цитокинового шторма» [175-176]. Высказанное положение об увеличении захвата цитокинов сенсibilизированными Т-лимфоцитами при специфической стимуляции дополняют данные, полученные при отсутствии стимуляции, когда наблюдается недостоверное, но систематически пониженное содержание большей части цитокинов в среде культивирования МНПК переболевших и вакцинированных субъектов. Полученный результат может указывать на то, что более интенсивное поглощение цитокинов сенсibilизированными Т-лимфоцитами после интенсивной антигенной нагрузки проявляется не только в активированном, но и неактивированном состоянии клеток. Однако ответ на неспецифическую стимуляцию, согласно полученным данным, сопровождается преобладанием продуцирования цитокинов над их поглощением всеми МНПК в культуре. С одной стороны, к этому могут приводить особенности молекулярных перестроек Т-клеточного рецептора, лежащих в основе активации сигнальных путей Т-лимфоцитов при неспецифической стимуляции [177-178], отличные от таковых при специфической стимуляции [179]. С другой стороны, это может быть связано с наличием среди МНПК большого количества незрелых наивных Т-лимфоцитов [180-181], отвечающих на неспецифическую стимуляцию не так, как зрелые Т-лимфоциты, и, возможно, с преобладанием процессов продуцирования цитокинов над их поглощением.

Полученная при *биоинформационном анализе* низкая сопряжённость состава выделяемых кластеров с клиническими особенностями групп при кластеризации субъектов по показателям клеточного и гуморального иммунитета согласуется с наличием рекомбинантного механизма появления в организме специфических распознающих антиген молекулярных структур (рецепторов) наивных Т- и В-лимфоцитов [182, 183]. Этот механизм обуславливает разброс сродства антиген-распознающих молекул к разным эпитопами у одного субъекта [184], является причиной различного сродства к одним и тем же эпитопам у разных субъектов [185, 186], предопределяет наличие поликлональности Т- и В-клеток памяти у одного субъекта [187, 188], а также приводит к разной

поликлональности и количеству отвечающих на антиген клеток у разных субъектов [189, 190]. Вместе, изложенное приводит к взаимной независимости распределений показателей специфического клеточного и гуморального иммунного ответа у переболевших и вакцинированных, а также к наличию довольно большого количества субъектов с низкими показателями иммунного ответа в этих группах. В результате имеет место значимое присутствие представителей разных иммуностимулированных групп во всех кластерах и даже в кластере, содержащем основное количество субъектов контрольной группы.

Более высокая связь с клиническими группами у кластеров, получаемых с привлечением цитокинового профиля субъектов согласуется с тем, что продуцирование цитокинов лимфоцитами, отвечающими на стимулы, опосредованные антиген-распознающими молекулами, в большей степени зависит от метаболических особенностей стимулируемых клеток, которые они приобретают в ходе своего созревания при инфицировании или вакцинации. В результате достоверно выделяется кластер, состоящий практически только из контрольных пациентов (без первичной антигенной стимуляции), кластер, состоящий практически только из вакцинированных, и кластер, объединяющий всех переболевших и значимое количество вакцинированных.

При кластеризации показателей субъектов ограничение только показателями клеточного и гуморального иммунитета приводит к ожидаемому составу кластеров. Показатели одного кластера или характеризуют одно и то же свойство субъекта (содержание антител к S-белку) или сильно связанные его свойства (количество клеток, продуцирующих INF- $\gamma$ , и суммарное количество INF- $\gamma$ , продуцируемого этими клетками). Кластеризация показателей с включением в анализ цитокинового профиля субъектов не обнаруживает привязки выделенных кластеров к группам цитокинов. Полученный результат может отражать несовпадение и несогласованность путей восприятия и передачи управляющих сигналов, запускающих продуцирование отдельных цитокинов в клетке [191, 192], что приводит к несогласованности в продуцировании разных цитокинов даже внутри одной группы. Однако при группировке цитокиновых

показателей по наличию и виду стимуляции их продуцирования МНПК в культуре проявляется привязка нестимулированного продуцирования цитокинов к общему уровню биосинтеза в клетках субъекта, обсуждавшаяся при анализе результатов кластеризации субъектов с привлечением цитокиновых показателей. Это приводит к сосредоточению в одном кластере основной части показателей нестимулированного продуцирования цитокинов МНПК с незначимым присутствием показателей стимулированного продуцирования. В то же время все показатели стимулированного продуцирования цитокинов не систематично распределяются по оставшимся кластерам. Последнее ещё раз отражает упомянутую выше разобщённость между сигнальными метаболическими путями, ответственными за восприятие и передачу управляющих сигналов, а также последующий синтез разных цитокинов [193-195].

В целом полученные результаты ещё раз указывают на то, что рекомбинантный механизм появления специфичности распознающих антиген рецепторов Т- и В-клеток при формирования адаптивного противовирусного иммунитета приводит к возникновению разных сочетаний способности иммунной системы организма к клеточному и гуморальному ответу. В большинстве случаев возникающие сочетания обеспечивают устойчивость организма к вирусной инфекции. Однако в ряде случаев возникающее сочетание составляющих иммунного ответа оказывается несбалансированным [166]. Это может привести к неспособности возникающего противовирусного иммунитета полностью избавить организм от повторного инфицирования вирусом и его неблагоприятных последствий [196], в частности, тяжёлому протеканию заболевания у вакцинированных и при повторном инфицировании переболевших [197, 198]. В этой связи не менее важным для медицинского противодействия инфекционным заболеваниям, вызываемым SARS-CoV-2 и другими респираторными вирусами, остается создание условий для полноценного медикаментозного и аппаратного обеспечения лечения пациентов с симптоматикой, требующей госпитализации [199].

## ВЫВОДЫ

1. Данные клинико-anamнестического исследования групп выборки женщин и мужчин, переболевших COVID-19 и вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», показали, что среди переболевших преобладали лица, перенесшие легкую форму тяжести заболевания (69,0 % в 2020 г. и 72,4 % в 2021 г.), реже – среднюю (21,0 % в 2020 г. и 27,6 % в 2021 г.) и тяжелую с признаками поражения легких (10 % в 2020 г.); в группе вакцинированных преобладало бессимптомное течение поствакцинального периода (у 69,2% обследуемых).

2. Заболевание COVID-19 и вакцинация «Гам-КОВИД-Вак» приводят к увеличению содержания Т-лимфоцитов, отвечающих выработкой INF $\gamma$  в ответ на специфическую стимуляцию наборами пептидных антигенов AG1 и AG2 в методе ELISPOT, что сопровождается увеличением числа спотов (активированных Т-лимфоцитов), их общей и средней площади. Среди переболевших и вакцинированных (в обеих группах) у не менее половины положительных субъектов одновременно имеются как Т лимфоциты, отвечающие на антигены набора AG1, так и Т лимфоциты, отвечающие на антигены набора AG2.

3. У лиц, перенесших тяжелую форму болезни, IgG к RBD S выше более чем в два раза, по сравнению с лицами, перенесшими болезнь в более легкой форме. Выявлено, что нет перекрестной реакции и дискордантности по исследуемым антигенам в группах переболевших и вакцинированных, причем у переболевших значимо превышен уровень антител ко всем белкам, а у вакцинированных – только к S-белку. К серопозитивным по антителам к S-белку относится более 90 % переболевших и вакцинированных, а позитивные по антителам к N-белку, составляют 90% только среди переболевших. В группе вакцинированных доля серопозитивных лиц по антителам к N-белку, значимо меньше и находится на уровне контрольной группы, имеющей низкую серопозитивность и по антителам к S белку, что составляет менее 20%.

4. Корреляционный анализ результатов исследования 2020 и 2021 года показал, что имеется умеренная положительная связь степени тяжести заболевания от возраста и уровня IgG к RBD S. Количество пятен к АГ1 и АГ2 изменяется синхронно. Средняя или сильная корреляция наблюдается и между их средней площадью и уровнем иммуноглобулинов к различным белкам, что свидетельствует о синхронности работы двух звеньев иммунитета.

5. При наличии положительного заключения о наличии гуморального иммунного ответа у более 90% инфицированных и вакцинированных, заключение о наличии Т-клеточного иммунного ответа может быть сделано для примерно 70% переболевших и 50% вакцинированных. Особенности клеточного и гуморального компонентов противовирусного иммунного ответа в сенсibiliзируемом организме определяются презентацией всех антигенов полноценным вирусом SARS-CoV-2 (при заболевании) и только антигенов S белка векторной вакциной «Гам-КОВИД-Вак» (при вакцинации).

6. В отсутствие стимуляции отмечается недостоверное снижение содержания цитокинов в культуральной среде у выздоровевших и вакцинированных лиц. При неспецифической стимуляции почти все цитокины значительно увеличены у всех обследуемых. Специфическая стимуляция не приводит к увеличению содержания цитокинов во всех образцах культуральной среды. Цитокиновый ответ на специфическую стимуляцию Т-лимфоцитов, сенсibiliзированных у выздоровевших от COVID-19 и вакцинированных лиц, не сопровождается накоплением цитокинов в среде, окружающей лимфоциты, что обеспечивает сбалансированный иммунный ответ.

7. Рекомбинантный механизм формирования адаптивного иммунитета в ответ на инфекцию и вакцинацию приводит к возникновению разных сочетаний способности иммунной системы к клеточному и гуморальному ответу. В большинстве случаев возникающие сочетания обеспечивают устойчивость к вирусной инфекции. Однако в ряде случаев возникающее сочетание составляющих иммунного ответа оказывается несбалансированным.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенного исследования позволили сформулировать практические рекомендации для врачей инфекционистов, иммунологов и других специальностей.

1. Оценка Т-клеточного иммунного ответа путем определения IFN-секретирующих Т-клеток в ответ на стимуляцию антигенами вируса SARS-CoV-2 методом ELISPOT дополняет оценку уровня специфических антител класса IgG к S- и N-белкам SARS-CoV-2 в исследовании патофизиологических особенностей иммунного ответа у переболевших COVID-19 и у вакцинированных «Гам-Ковид-Вак».

2. Комплексная оценка гуморального и клеточного иммунного ответа может быть рекомендована в практической медицине как один из критериев степени тяжести заболевания, прогноза и определения дальнейшей тактики ведения пациентов, патогенетической терапии, а также для оценки эффективности вакцинации.

3. Для оценки активности Т-клеточного звена иммунной системы наиболее специфичным методом является метод ELISPOT, который можно использовать при любых других вирусных заболеваниях.

**ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ**

АГ 1 – панель антигенов 2

АГ 2 – панель антигенов 1

ДИ – доверительный интервал

ИП – индекс позитивности

ИФА – иммуноферментный анализ

КТ – компьютерная томография

МЛР – множественная/многофакторная логистическая регрессия

МНПК – мононуклеары периферической крови

ОКТ3 – моноклональное антитело к CD-3 на Т-лимфоцитах человека

ОШ – отношение шансов

ПАГ – панель антигенов

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

ТОРС – тяжелый острый респираторный синдром

АСЕ2 – рецептор ангиотензин-превращающего фермента 2

AUC – area under the curve – площадь под кривой ошибок

CD4+ - Т-лимфоциты хелперы

CD8+ - Т-лимфоциты супрессоры

COVID-19 – Corona Virus Disease 2019, коронавирусная инфекция 2019 года

ELISPOT – Enzyme-Linked ImmunoSpot –метод иммуноферментных пятен исследования клеточного иммунного ответа

G CSF – нейтрофильный колониестимулирующий фактор

GM CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

HLA – человеческий лейкоцитарный антиген

IFN – интерферон

IFN-I, II, III – интерферон первого, второго, третьего типа

IFN- $\gamma$  – интерферон гамма

IGRA – Interferon Gamma Release Assay – анализ высвобождения гамма-интерферона

IgG – иммуноглобулины класса G

IL-2 – интерлейкин 2

MCP – моноцитарный хемоаттрактантный белок

MHC – главный комплекс гистосовместимости

MIP – хемокин макрофагальный воспалительный белок

NK-клетки – натуральные киллеры

ORF 3, 6, 7 – структурные белки вируса SARS-CoV-2

P – P-значение по результатам статистической обработки экспериментальных данных

ROC – receiver operating characteristic – кривая ошибок

PRR - pattern recognition receptor - рецептор распознавания паттернов

S-белок – белок шипа вируса SARS-Cov-2

SARS-Cov-2 – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2

TNF – фактор некроза опухоли

V1, V2 – первая и вторая вакцинации соответственно

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Tang, J. W. Emergence of a novel coronavirus causing respiratory illness from Wuhan, China / J. W. Tang, P. A. Tambyah, D. S. C. Hui. – Текст: непосредственный // *J Infect.* – 2020. – Vol.80(3). – P. 350–371.
2. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China / F. Wu, S. Zhao, B. Yu [et al.]. – Текст: непосредственный // *Nature.* – 2020. – Vol. 579 (7798). – P. 265–269.
3. Prediction models for COVID-19 disease outcomes / C. Y. Tang, C. Gao, K. Prasai [et al.]. – Текст: электронный // *Emerg Microbes Infect.* – 2024. – Vol.13(1). – doi: 10.1080/22221751.2024.2361791.
4. Public health leadership in the COVID-19 era: how does it fit? A scoping review / T. Osti, A. Valz Gris, V. F. Corona [et al.]. – Текст: непосредственный // *BMJ Lead.* – 2024. – Vol.8(2). – P.174–182.
5. A Review of Persistent Post-COVID Syndrome (PPCS) / B. Oronsky, C. Larson, T. C. Hammond [et al.]. – Текст: непосредственный // *Clin Rev Allergy Immunol.* – 2023. – Vol.64(1). – P. 66–74.
6. Последствия пандемии COVID-19 / Н. А. Беляков, С. Ф. Багненко, Т. Н. Трофимова [и др.]. – Санкт-Петербург : Балтийский медицинский образовательный центр, 2022. – 463 с. – Текст: непосредственный.
7. Эволюция пандемии COVID-19 / Н. А. Беляков, С. Ф. Багненко, В. В. Рассохин [и др.]. – Санкт-Петербург : Балтийский медицинский образовательный центр, 2021. – 410 с. – Текст: непосредственный.
8. Симбирцев, А. С. Иммунопатогенез и перспективы иммунотерапии коронавирусной инфекции / А. С. Симбирцев. – Текст: непосредственный // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2020. – Т. 12, No 4. – С. 7–22.
9. Characterization of Spike Glycoprotein of SARS-CoV-2 on Virus Entry and Its Immune Cross-Reactivity With SARS-CoV / X. Ou, Y. Liu, X. Lei [et al.]. – Текст : непосредственный // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11 (1). – P. 1620.

10. Natural Immunomodulators Treat the Cytokine Storm in SARS-CoV-2 / H. S. Abbas, M. M. Abd-Elhakeem, R. M. Abd El Galil [et al.]. – Текст: непосредственный // *Adv Pharm Bull.* – 2023. – Vol.13(1). – P.79–87.

11. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia / D. Y. Logunov, I. V. Dolzhikova, O. V. Zubkova [et al.]. – Текст: непосредственный // *Lancet.* – 2020. – Vol. 396(10255). – P. 887–897.

12. Gam-COVID-Vac Vaccine Trial Group. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia / D. Y. Logunov, I. V. Dolzhikova, D. V. Shcheblyakov [et al.]. – Текст: непосредственный // *Lancet.* – 2021. – Vol.397(10275). – P. 671–681.

13. Top 100 cited research on COVID-19 vaccines: A bibliometric analysis and evidence mapping / L. Yu, C. Xu, M. Zhang [et al.]. – Текст: электронный // *Hum Vaccin Immunother.* – 2024. – Vol.20(1). – doi: 10.1080/21645515.2024.2370605.

14. Афридонова, З. Э. Клеточный и гуморальный иммунитет у привитых вакциной «Спутник V» / З. Э. Афридонова, А. П. Топтыгина. – Текст : непосредственный // *Актуальные вопросы профилактической медицины и санитарно-эпидемиологического благополучия населения: факторы, технологии, управление и оценка рисков: Сборник научных трудов. Специальный выпуск: по материалам межрегиональной научно-практической конференции, Нижний Новгород (07–08 июня 2022 г.).* – Нижний Новгород : Медиаль, 2022. – С. 245–249.

15. COVID-19 age-dependent immunology and clinical outcomes: implications for vaccines / A. Sarfraz, S. Hasan Siddiqui, J. Iqbal [et al.]. – Текст: непосредственный // *J Dev Orig Health Dis.* – 2022. – Vol.13(3). – P.277–283.

16. Система интерферона при COVID-19 / А. Н. Наровлянский, Ф. И. Ершов, А. В. Санин, А. В. Пронин. – Текст: непосредственный // *Иммунология.* – 2022. –Т. 43, No 3. – С. 245–254.

17. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19 / Q. Zhang, P. Bastard, Z. Liu [et al.] . – Текст: электронный // Science. – 2020. – Vol. 370 (6515). – DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abd4570>.
18. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. / P. Bastard, L. B. Rosen, Q. Zhang [et al.]. – Текст: электронный // Science. – 2020. – Vol. 370 (6515). – DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abd4585>.
19. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19 / C. Lucas, P. Wong, J. Klein [et al.]. – Текст: непосредственный // Nature. –2020. – Vol.584 (7821). – P. 463–9.
20. COVID-19-индуцированный «цитокиновый шторм» — особая форма синдрома активации макрофагов / Е. И. Алексеева, Р. Ф. Тепаев, И. Ю. Шилькрот [и др.]. – Текст: непосредственный // Вестник РАМН. – 2021. – Т. 76, No 1. – С. 51–66.
21. Lymphopenia an important immunological abnormality in patients with COVID-19: Possible mechanisms / A. Jafarzadeh, S. Jafarzadeh, P. Nozari [et al.]. – Текст: электронный // Scand J Immunol. – 2021. – Vol.93(2):e12967. – doi: [10.1111/sji.12967](https://doi.org/10.1111/sji.12967).
22. Knyazev, E. Endocytosis and Transcytosis of SARS-CoV-2 Across the Intestinal Epithelium and Other Tissue Barriers / E. Knyazev, S. Nersisyan, A. Tonevitsky. – Текст: электронный // Front Immunol. – 2021. – Vol.7. 12. – doi: [10.3389/fimmu.2021.636966](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.636966).
23. <https://t-cov.hse.ru/> T-cell COVID-19 Atlas (T-CoV). – Текст: электронный.
24. T-CoV: a comprehensive portal of HLA-peptide interactions affected by SARS-CoV-2 mutations / S. Nersisyan, A. Zhiyanov, M. Shkurnikov, A. A. Tonevitsky. – Текст: непосредственный // Nucleic Acids Research. – 2022. –Vol. 7. – P. D883-D887.
25. Alterations in SARS-CoV-2 Omicron and Delta peptides presentation by HLA molecules / S. Nersisyan, A. Zhiyanov, M. Zakharova [et al.]. – Текст: электронный // Peer J. – 2022. – Vol.27. – doi: [10.7717/peerj.13354](https://doi.org/10.7717/peerj.13354).

26. Unique) implicate special control measures / Y. Wang, Y.Wang, Y.Chen, Q. Qin. – Текст: непосредственный // *J Med Virol.* – 2020. – Vol.92(6). – P. 568–576.
27. Особенности иммунопатогенеза новой коронавирусной инфекции / Б. Ю. Гумилевский, А. В. Москалев, О. П. Гумилевская [и др.]. – Текст: непосредственный // *Вестник Российской Военно-медицинской академии.* – 2021. – Т. 23, No 1. – С. 187–198.
28. Vaccine effectiveness of the first dose of ChAdOx1 nCoV-19 and BNT162b2 against SARS-CoV-2 infection in residents of long-term care facilities in England (VIVALDI): a prospective cohort study / M. Shrotri, M. Krutikov, T. Palmer [et al.]. – Текст: непосредственный // *Lancet Infect Dis.* – 2021. – Vol.21(11). – P. 1529–1538.
29. Clinical Effectiveness of SARS-CoV-2 Booster Vaccine Against Omicron Infection in Residents and Staff of Long-term Care Facilities: A Prospective Cohort Study (VIVALDI) / O. Stirrup, M. Shrotri, N. L. Adams, [et al.]. – Текст: электронный // *Open Forum Infect Dis.* – 2022. – Vol.10(1). –doi: 10.1093/ofid/ofac694.
30. An open, non-randomised, phase 1/2 trial on the safety, tolerability, and immunogenicity of single-dose vaccine “Sputnik Light” for prevention of coronavirus infection in healthy adults / A. I. Tukhvatulin, I. V. Dolzhikova, D. V. Shcheblyalov [et al.]. – Текст: электронный // *The Lancet Regional Health Europe.* – 2021. –Vol. 11. – <https://doi.org/10.1016/j.lanpe.2021.100241> 2666-7762.
31. Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response / L. Sun, X. Wang, J. Saredy [et al.]. – Текст: электронный // *Redox Biol.* – 2020. – Vol.37. – doi: 10.1016/j.redox.2020.101759.
32. Deutsche COVID-19 OMICS Initiative (DeCOI). Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment / J. Schulte-Schrepping, N. Reusch, D. Paclik [et al.]. – Текст: непосредственный // *Cell.* – 2020. –Vol.182(6). – P. 1419–1440.
33. Müller, S. Systems analysis of human innate immunity in COVID-19 / S. Müller, J. L. Schultze. – Текст: электронный // *Semin Immunol.* – 2023. –Vol.68. – doi: 10.1016/j.smim.2023.101778.

34. Schultze, J. L. COVID-19 and the human innate immune system / J. L. Schultze, A. C. Aschenbrenner. – Текст: непосредственный // Cell. – 2021. – Vol.184(7). – P.1671–1692.
35. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses / H. Li, L. Liu, D. Zhang [et al.]. – Текст: непосредственный // Lancet. – 2020. – Vol.395(10235). – P. 1517–1520.
36. HLH Across Speciality Collaboration, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression / P. Mehta, D. F. McAuley, M. Brown [et al.]. – Текст: непосредственный // Lancet. – 2020. – Vol.395(10229). – P.1033–1034.
37. Matricardi, P. M. The first, holistic immunological model of COVID-19: Implications for prevention, diagnosis, and public health measures / P. M. Matricardi, R. W. Dal Negro, R. Nisini. – Текст: непосредственный // Pediatr Allergy Immunol. – 2020. – Vol.31(5). – P. 454–470.
38. Park, A. Type I and Type III Interferons - Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19 / A. Park, A. Iwasaki. – Текст: непосредственный // Cell Host Microbe. – 2020. – Vol.27(6). – P. 870–878.
39. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention / M. Z. Tay, C. M. Poh, L. Rénia [et al.]. – Текст: непосредственный // Nat Rev Immunol. – 2020. – Vol.20(6). – P. 363–374.
40. The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology - Current perspectives / J. L. Boechat, I. Chora, A. Morais, L. Delgado. – Текст: непосредственный // Pulmonology. – 2021. – Vol.27(5). – P.423–437.
41. Bencze, D. Correlation between Type I Interferon Associated Factors and COVID-19 Severity/ D. Bencze, T. Fekete, K. Pázmándi. – Текст: электронный // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol.23(18). – doi: 10.3390/ijms231810968.
42. Lowery, S. A. Innate immune and inflammatory responses to SARS-CoV-2: Implications for COVID-19 / S. A. Lowery, A. Sariol, S. Perlman. – Текст: непосредственный // Cell Host Microbe. – 2021. – Vol.29(7). – P. 1052–1062.
43. Intranasal type I interferon treatment is beneficial only when administered before clinical signs onset in the SARS-CoV-2 hamster model / P. Bessière, M.

Wasniewski, E. Picard-Meyer [et al.]. – Текст: электронный // PLoS Pathog. – 2021. – Vol.17(8). – doi: 10.1371/journal.ppat.1009427.

44. Samuel, C. E. Interferon at the crossroads of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease / C. E. Samuel. – Текст: электронный // J Biol Chem. – 2023. – Vol.299(8). – doi: 10.1016/j.jbc.2023.104960

45. Minkoff, J. M. Innate immune evasion strategies of SARS-CoV-2 / J. M. Minkoff, B. tenOever. – Текст: непосредственный // Nat Rev Microbiol. – 2023. – Vol.21(3). – P.178–194.

46. SARS-CoV-2 viral persistence in lung alveolar macrophages is controlled by IFN- $\gamma$  and NK cells / N. Huot, C. Planchais, P. Rosenbaum [et al.]. – Текст: непосредственный // Nat Immunol. – 2023. – Vol.24(12). – P. 2068–2079.

47. An overview on the treatments and prevention against COVID-19 / Y. Panahi, A. M. Gorabi, S. Talaei [et al.]. – Текст: электронный // Virol J. – 2023. – Vol. 20(1).23. – doi: 10.1186/s12985-023-01973-9.

48. Non-transcriptional IRF7 interacts with NF- $\kappa$ B to inhibit viral inflammation / S. Fan, S. Popli, S. Chakravarty [et al.]. – Текст:электронный // J Biol Chem. –2024. – Vol.300(4). – doi: 10.1016/j.jbc.2024.107200.

49. Jefferies, C. A. Regulating IRFs in IFN Driven Disease / C. A. Jefferies. – Текст : непосредственный // Front Immunol. – 2019. – Vol.10. – P.325.

50. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients / T. S. Rodrigues, K. S. G. de Sá, A. Y. Ishimoto [et al.]. – Текст: электронный // J. Exp. Med. – 2021. – Vol.218. – doi: 10.1084/jem.20201707.

51. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19 / D. Blanco-Melo, B. E. Nilsson-Payant, W.-C. Liu [et al.]. – Текст: непосредственный // Cell. – 2020. – Vol.181. – P. 1036–1045.

52. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study / C. Huang, L. Huang, Y. Wang [et al.]. – Текст : непосредственный // Lancet. – 2021. – Vol.397. – P. 220–232.

53. Mulchandani, R. Deciphering the COVID-19 cytokine storm: Systematic

review and meta-analysis / R. Mulchandani., T. Lyngdoh, A. K. Kakkar. – Текст : электронный // Eur. J. Clin. Invest. – 2021. – Vol.51.– doi: 10.1111/eci.13429.

54. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients / Y. Zhou, B. Fu, X. Zheng [et al.]. – Текст: непосредственный // Natl. Sci. Rev. – 2020. – Vol.7. – P.998–1002.

55. Human Lung Stem Cell-Based Alveolospheres Provide Insights into SARS-CoV-2-Mediated Interferon Responses and Pneumocyte Dysfunction / H. Katsura, V. Sontake, A. Tata [et al.]. – Текст: непосредственный // Cell Stem Cell. – 2020. – Vol.27. – P. 890–904.

56. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Induced Immune Activation and Death of Monocyte-Derived Human Macrophages and Dendritic Cells / J. Zheng, Y. Wang, K. Li [et al.]. – Текст: непосредственный // J. Infect. Dis. – 2021. – Vol.223. – P. 785–795.

57. Lowery, S. A. Innate immune and inflammatory responses to SARS-CoV-2: Implications for COVID-19 / S. A. Lowery, A. Sariol, S. Perlman. – Текст : непосредственный // Cell Host Microbe. – 2021. – Vol.29(7). – P. 1052–1062.

58. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19/ D. Blanco-Melo, B. E. Nilsson-Payant, W-C. Liu [et al.]. – Текст: непосредственный // Cell. – 2020. – Vol.181. – P. 1036–1045.

59. STAT2 signaling restricts viral dissemination but drives severe pneumonia in SARS-CoV-2 infected hamsters / R. Boudewijns, H. J. Thibaut, S. J. F. Kaptein [et al.]. – Текст: непосредственный // Nat. Commun. – 2020. – Vol.11. – P.5838.

60. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. / K. H. Dinno, 3rd, S. R. Leist, A. Schäfer [et al.]. – Текст: непосредственный // Nature. – 2020. – Vol.586. – P. 560–566.

61. Responses to acute infection with SARS-CoV-2 in the lungs of rhesus macaques, baboons and marmosets / D. K. Singh, B. Singh, D. R. Ganatra [et al.]. – Текст: непосредственный // Nat. Microbiol. – 2021. – Vol.6. – P.73–86.

62. Chen, Q. A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis / Q. Chen. – Текст: непосредственный // Cell Host Microbe. – 2020. – Vol.28. – P.124–

133.

63. Karki, R. The 'cytokine storm': molecular mechanisms and therapeutic prospects / R. Karki, T. D. Kanneganti. – Текст: непосредственный // Trends Immunol. – 2021. – Vol.42(8). – P.681–705.

64. Distinct inflammatory profiles distinguish COVID-19 from influenza with limited contributions from cytokine storm / P. A. Mudd, J. C. Crawford, J. S. Turner [et al.]. – Текст: электронный // Sci Adv. – 2020. – Vol.6(50). – doi: 10.1126/sciadv.abe3024.

65. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes / D. E. Leisman, L. Ronner, R. Pinotti [et al.]. – Текст: непосредственный // Lancet Respir Med. – 2020. – Vol.8(12). – P. 1233–1244.

66. Kaur, A. Immunoprofiles of COVID-19 uniquely differentiated from other viruses: A machine learning investigation of multiplex immunoassay data / A. Kaur, V. V. Krishnan. – Текст: непосредственный // PNAS Nexus. – 2024. – Vol.3(8). – P. 327.

67. Смирнов, В. С. Врожденный иммунитет при коронавирусной инфекции / В. С. Смирнов, А. А. Тоголян. – Текст: непосредственный // Инфекция и иммунитет. – 2020. – Т. 10, No 2. – С. 259–268.

68. STAT2 signaling restricts viral dissemination but drives severe pneumonia in SARS-CoV-2 infected hamsters / R. Boudewijns, H. J. Thibaut, S. J. F. Kaptein [et al.]. – Текст: непосредственный // Nat. Commun. – 2020. – Vol.11. – P. 5838.

69. COVID-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE2 mice / J. Zheng, L. R. Wong, K. Li [et al.]. – Текст: непосредственный // Nature. – 2021. – Vol.589. – P.603–607.

70. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice / R. Channappanavar, A. R. Fehr, R. Vijay [et al.]. – Текст: непосредственный // Cell Host Microbe. – 2016. – Vol.19. – P.181–193.

71. A distinct innate immune signature marks progression from mild to severe

COVID-19 / S. Chevrier, Y. Zurbuchen, C. Cervia [et al.]. – Текст: электронный // Cell Rep Med. – 2020. – Vol.2. – doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100166.

72. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology / F. P. Veras, M. C. Pontelli, C. M. Silva [et al.]. – Текст: электронный // J. Exp. Med. – 2020. – Vol.217. – doi: 10.1084/jem.20201129.

73. COVID-19 Study Group Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity / C. Maucourant, I. Filipovic, A. Ponzetta. – Текст: электронный [et al.] // Sci. Immunol. – 2020. – Vol.5. – doi: 10.1126/sciimmunol.abd6832..

74. Détresse respiratoire aiguë révélatrice d'un syndrome des antisynthétases [Acute respiratory distress revealing antisynthetase syndrome] / Q. Maloir, K. Ghysen, C. von Frenckell [et al.]. – Текст: непосредственный // Rev Med Liege. – 2018. – Vol.73(7–8). – P. 370–375.

75. Le Gros, G. Non-cytotoxic, IL-4, IL-5, IL-10 producing CD8+ T cells: their activation and effector functions / G. Le Gros, F. Erard. – Текст: непосредственный // Curr Opin Immunol. – 1994. – Vol.6(3). – P. 453–7.

76. Интерферон  $\gamma$ : биологическая функция и значение для диагностики клеточного иммунного ответа / А. А. Луцкий, А. А. Жирков, Д. Ю. Лобзин [и др.]. – Текст : непосредственный // Журнал инфектологии. – 2015. – Т.7, No 4. – С.10–22.

77. Интерфероны лямбда – возможности терапевтического применения / Н. А. Кихтенко, Л.А. Олейник, В. К. Макаров [и др.]. – Текст: непосредственный // Сибирский научный медицинский журнал. – 2020. – N. 40, No 2. – С.15–23.

78. Особенности иммунопатогенеза новой коронавирусной инфекции / Б. Ю. Гумилевский, А. В. Москалев, О. П. Гумилевская [и др.]. – Текст: непосредственный // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2021. – Т. 23, No 1. – С. 187–198.

79. Moss, P. The T cell immune response against SARS-CoV-2 / P. Moss. – Текст: непосредственный // Nat Immunol. –2022. –Vol.23(2). –P. 186–193.

80. Characteristics of patients discharged and readmitted after COVID-19 hospitalisation within a large integrated health system in the United States / C. W.

Huang, P. P. Desai, K. K. Wei [et al.]. – Текст: непосредственный // *Infect Dis (Lond)*. – 2021. – Vol.53(10). – P. 800–804.

81. SARS-CoV-2 responsive T cell numbers and anti-Spike IgG levels are both associated with protection from COVID-19: A prospective cohort study in keyworkers. / David Wyllie, Hayley E Jones, Ranya Mulchandani [et al.]. – Текст: электронный // *Med Rxiv*. – 2020. – doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.02.20222778>)

82. SARS-CoV-2 specific T-cell immunity in COVID-19 convalescent patients and unexposed controls measured by ex vivo ELISpot assay/ Irene Cassaniti, Elena Percivalle, Federica Bergami [et al.]. – Текст: непосредственный // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2021. – Vol. 27, No 7. – P. 1029–1034.

83. Определение специфического Т-клеточного иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2 у людей, переболевших COVID-19 / М. С. Бляхер, И. М. Федорова, Е. А. Тульская [и др.]. – Текст: непосредственный // *Вопросы вирусологии*. – 2022. – Т. 67, No 6. – С. 527–537.

84. Длительность иммунного ответа после вакцинации Sputnik-V / Ekaterina Martynova, Shaimaa Hamza, Ekaterina E. Garanina, Emmanuel Kabwe. – Текст: электронный // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – <https://doi.org/10.3390/ijms222011211>)

85. Оценка специфического Т-клеточного иммунного ответа к SARS-CoV-2 при коронавирусной инфекции COVID-19 и вакцинопрофилактике Гам-КОВИД-Вак / Н. Г. Плехова, Т. С. Ситдикова, А. А. Дубий [и др.] . – Текст: непосредственный // *Российский иммунологический журнал*. – 2022. – Т. 25, No 3. – С. 267–274.

86. Оценка специфического Т-клеточного иммунитета у переболевших и вакцинированных против COVID-19 / Т. А. Платонова, М. С. Скляр, А. А. Голубкова, Т. А. Семененко. – Текст: непосредственный // *Журнал Инфектологии*. – 2022. – Т. 14, No 1. – С. 96–104.

87. Current and innovative methods for the diagnosis of COVID19 infection (Review) / L. Falzone, G. Gattuso, A. Tsatsakis [et al.]. – Текст: электронный // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2021. – Vol.47.100. –

<https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4933>

88. Клиническая иммунология : Практическое пособие для инфекционистов / В. А. Козлов, Е. П. Тихонова, А. А. Савченко [и др.]. – Красноярск : Поликор, 2021. – 563 с. – Текст: непосредственный.

89. Cox, R. J. Not just antibodies: B cells and T cells mediate immunity to COVID-19 / R. J. Cox, K. A. Brokstad. – Текст: непосредственный // *Natural Reviews Immunology*. – 2020. – Vol.20. – P. 581–582.

90. Distinct features of SARSCoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients/ Y. Hai-qiong, S. Bao-qing, F. Zhang-fu [et al.]. – Текст: электронный // *European Respiratory Journal*. – 2020. – Vol.56(2). – <https://doi.org/10.1183/13993003.01526-2020>.

91. Kudlay, D. Peculiarities of the T Cell Immune Response in COVID-19 / D. Kudlay, I. Kofiadi, M. Khaitov. – Текст: электронный // *Vaccines*. – 2022. – Vol.10(2). – <https://doi.org/10.3390/vaccines10020242>

92. A Simplified SARS-CoV-2 Pseudovirus Neutralization Assay/ G. Donofrio, V. Franceschi, F. Macchi [et al.]. – Текст: непосредственный // *Vaccines (Basel)*. – 2021. – Vol.9(4). – P. 389.

93. Long Term Immune Response Produced by the Sputnik V Vaccine. International / E. Martynova, S. Hamza, E. E. Garanina [et al.]. – Текст: электронный // *Journal of Molecular Science*. – 2021. – Vol. 22(20). – <https://doi.org/10.3390/ijms222011211>

94. An open, non-randomised, phase 1/2 trial on the safety, tolerability, and immunogenicity of single-dose vaccine “Sputnik Light” for prevention of coronavirus infection in healthy adults / A. I. Tikhvatulina, I. V. Dolzhikova, D. V. Shcheblyakova [et al.]. – Текст: электронный // *The Lancet Regional Health – Europe*. – 2021. – Vol.11. – <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2021.100241>.

95. Immunity to SARS-CoV-2 up to 15 months after infection / H. Marcotte, A. Piralla, F. Zuo [et al.]. – Текст: электронный // *bioRxiv*. 2021. – <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.08.463699v1>

96. Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и

вакцинированных против COVID-19 лиц с помощью ELISPOT набора ТиграТест® SARS-CoV-2 / Д. А. Потеряев, С. Г. Аббасова, П. Е. Игнатъева [и др.]. – Текст: непосредственный // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2021. –Т. 21, No 3 . – С.178–192.

97. Differences in Characteristics of T-Cell Immunity to SARS-CoV-2 in Clinically Healthy Subjects / N. N. Sushentseva, O. S. Popov, I. A. Polkovnikova [et al.]. – Текст: непосредственный // Cell Technologies in Biology and Medicine. – 2022. – Vol.1. – P. 133–138.

98. Current and innovative methods for the diagnosis of COVID19 infection (Review) / [Luca Falzone](#) , [Giuseppe Gattuso](#) , [Аристидис Цацакис](#) [et al. ]. – Текст: электронный // International Journal of Molecular Medicine. –2021. –Vol.47. 100. – <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4933>

99. Cox, R. Not just antibodies: B cells and T cells mediate immunity to COVID-19 / R. Cox, [Karl A Brokstad](#). – Текст: непосредственный // Nat Rev Immunol. –2020. – Vol.20. –P. 581–582.

100. Distinct features of SARSCoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients / Yu H-qiong, Sun B-qing, Fang Z-fu [et al.]. – Текст: электронный // Eur Respir J. – 2020.– in press <https://doi.org/10.1183/13993003.01526-2020>

101. Human Lung Stem Cell-Based Alveolospheres Provide Insights into SARS-CoV-2-Mediated Interferon Responses and Pneumocyte Dysfunction / H. Katsura, V. Sontake, A. Tata [et al.]. – Текст: непосредственный // Cell Stem Cell. – 2020. – Vol.27(6). – P. 890–904.

102. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters / S. F. Sia, L. M. Yan, A. W. H. Chin [et al.]. – Текст: непосредственный //Nature. – 2020. – Vol.583(7818). – P.834–838.

103. Cellular tropism of SARS-CoV-2 in the respiratory tract of Syrian hamsters and B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J transgenic mice / H. L.Yen, S. Valkenburg, S. F. Sia [et al.]. – Текст: непосредственный // Vet Pathol. – 2022. – Vol.59(4). – P. 639–647.

104. An Infectious cDNA Clone of SARS-CoV-2 / X. Xie, A. Muruato, K. G.

Lokugamage [et al.]. – Текст: непосредственный // Cell Host Microbe. – 2020. – Vol.27(5). – P.841–848.

105. Molecular evolution of SARS-CoV-2 from December 2019 to August 2022 / J. M. Wolf, L. M. Wolf, G. L. Bello [et al.]. – Текст: электронный // J Med Virol. – 2023. – Vol.95(1). – doi: 10.1002/jmv.28366. PMID: 36458547; PMCID: PMC9877913.

106. Do monogenic inborn errors of immunity cause susceptibility to severe COVID-19? / C. Cotsapas, J. Saarela, J. R. Farmer [et al.]. – Текст: электронный // J Clin Invest. – 2021. – Vol.131(14). – doi: 10.1172/JCI149459.

107. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19 / Q. Zhang, P. Bastard, Z. Liu [et al.]. – Текст: электронный // Science. – 2020. – Vol.370(6515). – doi: 10.1126/science.abd4570.

108. Higher expression of monocyte chemotactic protein 1 in mild COVID-19 patients might be correlated with inhibition of Type I IFN signaling / X. Xi, Y. Guo, M. Zhu [et al.] – Текст: электронный // Virol J. –2021. – Vol.18(1).12. – doi: 10.1186/s12985-020-01478-9.

109. Animal models for COVID-19/ C. Muñoz-Fontela, W. E. Dowling, S. G. P. Funnell [et al.]. – Текст: непосредственный // Nature. – 2020. – Vol. 586(7830). – P.509–515.

110. A Mouse-Adapted SARS-CoV-2 Induces Acute Lung Injury and Mortality in Standard Laboratory Mice / S. R. Leist, K. H. Dinnon A. 3rd, A. Schäfer [et al.]. – Текст: непосредственный // Cell. – 2020. – Vol.183(4). – P.1070–1085.

111. Structural basis of RNA cap modification by SARS-CoV-2 / T. Viswanathan, S. Arya, S. H. Chan [et al.]. – Текст: электронный // Nat Commun. – 2020. – Vol.11(1). – doi: 10.1038/s41467-020-17496-8.

112. Real-world effectiveness of COVID-19 vaccines: a literature review and meta-analysis / C. Zheng, W. Shao, X. Chen [et al.]. – Текст: непосредственный // Int J Infect Dis. – 2022. – Vol.114. – P.252–260.

113. Fehr, A. R. Middle East Respiratory Syndrome: Emergence of a Pathogenic Human Coronavirus / A. R. Fehr, R. Channappanavar, S. Perlman. – Текст: непосредственный // Annu Rev Med. –2017. – Vol.68. –P. 387–399.

114. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice / R. Channappanavar, A. R. Fehr, R. Vijay [et al.]. – Текст: непосредственный // Cell Host Microbe. – 2016. – Vol.19. – P.181–193.

115. SARS-CoV-2 infection induces protective immunity and limits transmission in Syrian hamsters / P. Selvaraj, C. Z. Lien, S. Liu [et al.]. – Текст: электронный // Life Sci Alliance. – 2021. – Vol.4(4). – doi: 10.26508/lsa.202000886.

116. SARS-CoV-2 Infection in Companion Animals: Prospective Serological Survey and Risk Factor Analysis in France / P. Bessière, T. Vergne, M. Battini [et al.]. – Текст: электронный // Viruses. – 2022. – Vol.14(6). – doi: 10.3390/v14061178.

117. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19 / D. Blanco-Melo, B. E. Nilsson-Payant, W. C. Liu [et al.]. – Текст: непосредственный // Cell. – 2020. – Vol.181(5). – P. 1036–1045.

118. Leveraging the antiviral type I interferon system as a first line of defense against SARS-CoV-2 pathogenicity / D. A. Hoagland, R. Møller, S. A. Uhl [et al.]. – Текст: непосредственный // Immunity. – 2021. – Vol.54(3). – P. 557–570.

119. Prior infection with SARS-CoV-2 WA1/2020 partially protects rhesus macaques against reinfection with B.1.1.7 and B.1.351 variants / A. Chandrashekar, J. Liu, J. Yu [et al.]. – Текст: электронный // Sci Transl Med. – 2021. – Vol.13(618). – doi: 10.1126/scitranslmed.abj2641. Epub 2021 Nov 3.

120. Singh, D. On the origin and evolution of SARS-CoV-2 / D. Singh, X. V. Yi. – Текст: непосредственный // Exp Mol Med. – 2021. – Vol.53(4). – P. 537–547.

121. Pegylated interferon-alpha protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques / B. L. Haagmans, T. Kuiken, B. E. Martina [et al.]. – Текст: непосредственный // Nat Med. – 2004. – Vol.10(3). – P.290–3.

122. Баврина, А. П. Современные правила применения корреляционного анализа / А. П. Баврина, И. Б. Борисов. – Текст: непосредственный // Медицинский альманах. – 2021. – No 3(68). – С. 70–79.

123. Временные методические рекомендации "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19) Версия 11" (утв. МЗ РФ 7

мая 2021 г.). –Текст: электронный. – Sudact.ru.

124. Single-cell immunology of SARS-CoV-2 infection / Yuan Tian, Lindsay N. Carpp, Helen E. R. Miller [et al.]. – Текст: непосредственный // Nature Biotechnology. – 2022. – Vol. 40. –P. 30–41.

125. Immunity to SARS-CoV-2 up to 15 months after infection / H. Marcotte, A. Piralla, F. Zuo, Du Likum. – Текст: электронный 2021. –<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.08.463699v1>

126. Jordan, S.C. Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: relevance to acquired immunity and vaccine responses / S. C. Jordan. – Текст: непосредственный // Clin. Exp. Immunol. –2021. –Vol. 204, No3. – P. 310–320.

127. Cucinotta, D. WHO declares COVID-19 a pandemic / D. Cucinotta, M. Vanelli . – Текст: непосредственный // Acta Bio Medica: Atenei Parmensis. – 2020. – Vol.91, No. 1. – P. 157–160.

128. Lavelle, E. C., Mucosal vaccines–fortifying the frontiers / E. C. Lavelle, R. W. Ward. – Текст: непосредственный // Nature Reviews Immunology. – 2021. – Vol. 22(4). – P. 1–15.

129. Sette, A. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19 / A. Sette, S. Crotty. – Текст: непосредственный // Cell. – 2021. – Vol. 184, No 4. – P.861–880.

130. Longitudinal profile of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies against the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in patients with pneumonia due to the SARS coronavirus. / P. C. Woo, S. K. Lau, B. H. Wong [et al.]. – Текст: непосредственный // Clin Diagn Lab Immunol. – 2004. – Vol.11(4). –P.665–8.

131. Brian R. Murphy. Chapter 43 - Mucosal Immunity to Viruses / Brian R. Murphy. – Текст: непосредственный / Editor(s): Jiri Mestecky, Michael E. Lamm, Jerry R. McGhee [et al.] Mucosal Immunology. – (Third Edition), Academic Press, 2005. –P. 799–813.

132. Systemic and mucosal IgA responses are variably induced in response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination and are associated with protection against subsequent infection / S. Sheikh-Mohamed, B. Isho, G. Y. C. Chao [et al.]. – Текст:

непосредственный // *Mucosal Immunol.* – 2022. – Vol. 25. – P.1–10.

133. Viruses, cancer and non-self recognition / M. Padariya, S. Mikac, K. Dziubek, U. Kalathiya. – Текст: электронный // *Open Biology.* – 2021. – Vol. 11, No 3. – doi: 10.1098/rsob.200348. Epub 2021 Mar 31.

134. Antigen Presentation of mRNA-Based and Virus-Vectored SARS-CoV-2 Vaccines / [Ger T Rijkers](#), [Nynke Weterings](#), [Andres Obregon-Henao](#) [et al.]. – Текст : непосредственный // *Vaccines.* – 2021. – Vol. 9, No 8. – P. 848.

135. Miyazawa, M. Immunopathogenesis of SARS-CoV-2-induced pneumonia: lessons from influenza virus infection / M. Miyazawa. – Текст: непосредственный // *Inflammation and Regeneration.* – 2020. – Vol. 40, No 1. – P. 1–13.

136. Sadarangani, M. Immunological mechanisms of vaccine-induced protection against COVID-19 in humans / M. Sadarangani, A. Marchant, T. R. Kollmann. – Текст: непосредственный // *Nature Reviews Immunology.* – 2021. – Vol. 21, No 8. – P. 475–484.

137. SARS-CoV-2-specific T cells in infection and vaccination / A. Bertoletti, [Nina Le Bert](#), [Martin Qui](#), [Энтони Тан](#). – Текст: непосредственный // *Cell Mol Immunol.* – 2021. – Vol. 18(10). – P. 2307–2312.

138. Schmidt, A. T Cell Immunity against Influenza: The Long Way from Animal Models Towards a Real-Life Universal Flu Vaccine / A. Schmidt, D. Lapuente. – Текст: непосредственный // *Viruses.* – 2021. – Vol.13(2). –P.199.

139. Lange, J. Human mucosal tissue-resident memory T cells in health and disease / J. Lange, O. Rivera-Ballesteros, M. Buggert. – Текст: непосредственный // *Mucosal Immunol.* – 2022. –Vol.15(3). – P.389–397.

140. Tissue-resident memory CD8<sup>+</sup> T cells possess unique transcriptional, epigenetic and functional adaptations to different tissue environments / J. T. Crowl, M. Heeg, A. Ferry [et al.]. – Текст: электронный // *Nat Immunol.* –2022. –Vol. 27. – doi: 10.1038/s41590-022-01229-8.

141. Paik, D. H. Anti-viral protective capacity of tissue resident memory T cells / D. H. Paik, D. L. Farber. – Текст: непосредственный // *Curr Opin Virol.* – 2021. – Vol.46. – P. 20–26.

142. Combinatorial Herpes Simplex Vaccine Strategies: From Bedside to Bench and Back / A. A. Chentoufi, N. R. Dhanushkodi, R. Srivastava [et al.]. – Текст: электронный // Front Immunol. –2022. –Vol.13. – doi: 10.3389/fimmu.2022.849515.

143. How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests / [David S Y Ong](#), [Paraskevi C Fragkou](#), [Valentijn A Schweitzer](#) [et al.]. – Текст : непосредственный // Clinical Microbiology and Infection. – 2021. – Vol. 27, No 7. – P. 981–986.

144. Long-Term, CD4+ Memory T Cell Response to SARS-CoV-2 / S. Wirsching, L. Harder, M. Heymanns [et al.]. – Текст: электронный // Front Immunol. – 2022 . –Vol.13. – doi: 10.3389/fimmu.2022.800070.

145. Promising Cytomegalovirus-Based Vaccine Vector Induces Robust CD8+ T-Cell Response / J. Liu, D. K. Jaijyan, Q. Tang, H. Zhu. – Текст: электронный // Int J Mol Sci. – 2019. Vol.20(18). – doi: 10.3390/ijms20184457.

146. Struzik, J. NF- $\kappa$ B as an Important Factor in Optimizing Poxvirus-Based Vaccines against Viral Infections / J. Struzik, L. Szulc-Dąbrowska. – Текст: электронный // Pathogens. – 2020. – Vol.9(12). – doi: 10.3390/pathogens9121001.

147. de Araújo-Souza, P. S. Epigenetic control of interferon-gamma expression in CD8 T cells / P. S. de Araújo-Souza, S. C. H. Hanschke, J. P. B. Viola // Journal of immunology research. – 2015. – Vol. 2015. – P. 849573.

148. Nash, G. Structural aspects of the MHC expression control system / G. Nash, B. Paidimuddala, L. Zhang. – Текст: электронный // Biophys Chem. –2022. – Vol.284. – doi: 10.1016/j.bpc.2022.106781.

149. Schoenborn, J. R. Regulation of interferon- $\gamma$  during innate and adaptive immune responses / J. R. Schoenborn., C. B. Wilson. – Текст: непосредственный //Advances in immunology. – 2007. – Vol. 96. – P. 41–101.

150. Targeting interferon- $\gamma$  in hyperinflammation: opportunities and challenges / De Benedetti, F. [Giusi Prencipe](#), [Claudia Bracaglia](#) [et al.]. – Текст: непосредственный // Nature Reviews Rheumatology. – 2021. – Vol.17(11). – P.678–691.

151. Pannus, P. Viral Inhibitory Activity of CD8+ T Cells in HIV Infection / P.

Pannus, G. Vanham. – Текст: непосредственный // AIDS reviews. – 2019. – Vol. 21, No 3. – P. 115–125.

152. Prompt Antiviral Action of Pulmonary CD8<sup>+</sup> TRM Cells Is Mediated by Rapid IFN- $\gamma$  Induction and Its Downstream ISGs in the Lung / L. Jiang, L. Liu, M. Zhang [et al.]. – Текст : электронный // Front Immunol. – 2022. –Vol.13. – doi: 10.3389/fimmu.2022.839455.

153. Characterisation of the T-cell response to Ebola virus glycoprotein amongst survivors of the 2013-16 West Africa epidemic / T. R. W. Tipton, Y. Y. Hall, J. A. Bore [et al.]. – Текст: непосредственный // Nat Commun. –2021. –Vol.12(1). –P. 1153.

154. T Cell Immunogenicity, Gene Expression Profile, and Safety of Four Heterologous Prime-Boost Combinations of HIV Vaccine Candidates in Healthy Volunteers: Results of the Randomized Multi-Arm Phase I/II ANRS VRI01 Trial / L. Richert, J. D. Lelièvre, C. Lacabaratz [et al.]. – Текст: непосредственный // J Immunol. – 2022 . –Vol. 208(12). –P. 2663–2674.

155. Zepp, F. Principles of vaccine design-Lessons from nature / F. Zepp. – Текст : непосредственный // Vaccine. – 2010. –Vol.28, Suppl 3. –P.14–24.

156. OVX836 Heptameric Nucleoprotein Vaccine Generates Lung Tissue-Resident Memory CD8<sup>+</sup> T-Cells for Cross-Protection Against Influenza / J. Del Campo, J. Bouley, M. Chevandier [et al.]. – Текст: электронный // Front Immunol. – 2021. – Vol.12. – doi: 10.3389/fimmu.2021.678483.

157. Korenkov, D. Basics of CD8 T-cell immune responses after influenza infection and vaccination with inactivated or live attenuated influenza vaccine / D. Korenkov, I. Isakova-Sivak, L. Rudenko. – Текст: непосредственный // Expert Rev Vaccines. – 2018. –Vol.17(11). – P. 977–987.

158. Coughlan, L. Factors Which Contribute to the Immunogenicity of Non-replicating Adenoviral Vected Vaccines / L. Coughlan. – Текст: электронный // Front Immunol. –2020. – Vol.11. – doi: 10.3389/fimmu.2020.00909.

159. Hobernik, D. DNA Vaccines-How Far From Clinical Use? / D. Hobernik, M. Bros. – Текст: электронный // Int J Mol Sci. – 2018. Vol.19(11). – doi: 10.3390/ijms19113605.

160. mRNA vaccines: the most recent clinical applications of synthetic Mrna / S. Kwon, M. Kwon, S. Im [et al.]. – Текст: непосредственный // Arch Pharm Res. – 2022. – Vol.45(4). – P. 245–262.

161. Vaccine Technologies and Platforms for Infectious Diseases: Current Progress, Challenges, and Opportunities / M. Ghattas, G. Dwivedi, M. Lavertu, M. G. Alameh. – Текст: электронный // Vaccines (Basel). – 2021. – Vol.9(12). – doi: 10.3390/vaccines9121490.

162. Samaranayake, L. P. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) vaccines: A concise review / L. P. Samaranayake, C. J. Seneviratne, K. S. Fakhruddin. – Текст: электронный // Oral Dis. – 2021. – Vol.15. – doi: 10.1111/odi.13916.

163. Viral vector vaccines / N. McCann, D. O'Connor, T. Lambe, A. J. Pollard. – Текст: электронный // Curr Opin Immunol. – 2022. – Vol.77. – doi: 10.1016/j.coi.2022.102210.

164. Identification of cross-reactive CD8<sup>+</sup> T cell receptors with high functional avidity to a SARS-CoV-2 immunodominant epitope and its natural mutant variants / C. Hu, M. Shen, X. Han [et al.]. – Текст: непосредственный // Genes Dis. – 2022. – Vol.9(1). – P. 216–229.

165. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases / A. Tarke, J. Sidney, C. K. Kidd [et al.]. – Текст: электронный // Cell Rep Med. – 2021. – Vol.2(2). – doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100204.

166. Discordant neutralizing antibody and T cell responses in asymptomatic and mild SARS-CoV-2 infection / C. J. Reynolds, L. Swadling, J. M. Gibbons [et al.] – Текст: электронный // Sci Immunol. – 2020. – Vol.5(54). – doi: 10.1126/sciimmunol.abf3698.

167. Diagnostic Tools for Rapid Screening and Detection of SARS-CoV-2 Infection / S. K. Pandey, G. C. Mohanta, V. Kumar, K. Gupta. – Текст: электронный // Vaccines (Basel). – 2022. – Vol.10(8). – doi: 10.3390/vaccines10081200.

168. Normal human CD4<sup>+</sup> memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis / S. L. Waldrop, K. A. Davis, V. C. Maino,

L. J. Picker. – Текст: непосредственный // *J Immunol.* –1998. –Vol.161(10). – P. 5284–95.

169. Farber, D. L. Biochemical signaling pathways for memory T cell recall / D. L. Farber. – Текст : непосредственный // *Semin Immunol.* – 2009. –Vol.21(2). –P. 84–91.

170. Kelso, A. Cytokines: principles and prospects / A. Kelso. – Текст: непосредственный // *Immunol Cell Biol.* –1998. –Vol.76(4). –P. 300–17.

171. Human CD8<sup>+</sup> T Cells Exhibit a Shared Antigen Threshold for Different Effector Responses / E. Abu-Shah, N. Trendel, P. Kruger [et al.]. – Текст: непосредственный // *J Immunol.* –2020. –Vol.205(6). – P. 1503–1512.

172. Cytokine production in cell culture by peripheral blood mononuclear cells from immunocompetent hosts / R. K. Katial, D. Sachanandani, C. Pinney, M. M. Lieberman. – Текст : непосредственный // *Clin Diagn Lab Immunol.* –1998. – Vol.5(1). –P.78–81.

173. Hoekstra, M. E. Modulation of the tumor micro-environment by CD8<sup>+</sup> T cell-derived cytokines / M. E. Hoekstra, S. V. Vijver, T. N. Schumacher. – Текст: непосредственный // *Curr Opin Immunol.* – 2021. – Vol.69. – P.65–71.

174. The cytokine storms of COVID-19, H1N1 influenza, CRS and MAS compared. Can one sized treatment fit all? / G. Morris, C. C. Bortolasci, B. K. Puri [et al.]. – Текст: электронный // *Cytokine.* –2021. – Vol.144. –doi: 10.1016/j.cyto.2021.155593.

175. Wei, F. The role of influenza A virus-induced hypercytokinemia / F. Wei, C. Gao, Y. Wang. – Текст: непосредственный // *Crit Rev Microbiol.* –2022. –Vol.48(2). – P.240–256.

176. Chatenoud, L. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity / L. Chatenoud, J. A. Bluestone. – Текст: непосредственный // *Nat Rev Immunol.* – 2007. –Vol.7(8). – P. 622–32.

177. Ngoenkam, J. Selected signalling proteins recruited to the T-cell receptor-CD3 complex / J. Ngoenkam, W. W. Schamel, S. Pongcharoen. – Текст: непосредственный // *Immunology.* –2018. –Vol.153(1). – P. 42–50.

178. Pishesha, N. A guide to antigen processing and presentation / N. Pishesha, T. J. Harmand, H. L. Ploegh. – Текст: электронный // *Nat Rev Immunol.* –2022. –Vol. 13. – doi: 10.1038/s41577-022-00707-2.

179. Clement, L. T. Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation / L. T. Clement. – Текст : непосредственный // *J Clin Immunol.* –1992. –Vol.12(1). –P.1–10.

180. Jackola, D. R. Age-associated changes in human T cell phenotype and function / D. R. Jackola, J. K. Ruger, R. A. Miller. – Текст: непосредственный // *Aging (Milano).* –1994. – Vol.6(1). – P. 25–34.

181. Davis, M. M. The evolutionary and structural 'logic' of antigen receptor diversity / M. M. Davis. – Текст: непосредственный // *Semin Immunol.* –2004. – Vol.16(4). –P.239–43.

182. The shape of the lymphocyte receptor repertoire: lessons from the B cell receptor / K. J. Jackson, M. J. Kidd, Y. Wang, A. M. Collins. – Текст: электронный // *Front Immunol.* –2013. – Vol. 2(4). – doi: 10.3389/fimmu.2013.00263.

183. BCR selection and affinity maturation in Peyer's patch germinal centres. / H. Chen, Y. Zhang, A. Y. Ye [et al.]. – Текст: непосредственный // *Nature.* – 2020. – Vol.582(7812). –P.421–425.

184. More than one antibody of individual B cells revealed by single-cell immune profiling / Z. Shi, Q. Zhang, H. Yan [et al.]. – Текст: непосредственный // *Cell Discov.* –2019. –Vol.5. –P. 64.

185. Martinez, R. J. Lower Affinity T Cells are Critical Components and Active Participants of the Immune Response / R. J. Martinez, B. D. Evavold. – Текст : непосредственный // *Front Immunol.* –2015. –Vol.6. – P.468.

186. How Naive T-Cell Clone Counts Are Shaped By Heterogeneous Thymic Output and Homeostatic Proliferation / R. Dessalles, Y. Pan, M. Xia [et al.]. – Текст: электронный // *Front Immunol.* – 2022. – Vol.12. – doi: 10.3389/fimmu.2021.735135.

187. Kavazovi, I. Cheating the Hunger Games; Mechanisms Controlling Clonal Diversity of CD8 Effector and Memory Populations / I. Kavazović, B. Polić, F. M. Wensveen. – Текст: электронный // *Front Immunol.* – 2018. –Vol.9. – doi:

10.3389/fimmu.2018.02831.

188. A hierarchy of selection pressures determines the organization of the T cell receptor repertoire / M. Mark, S. Reich-Zeliger, E. Greenstein [et al.]. – Текст: электронный // *Front Immunol.* –2022. – Vol.13. – doi: 10.3389/fimmu.2022.939394.

189. Merckenschlager, J. Narrowing the Gap: Preserving Repertoire Diversity Despite Clonal Selection during the CD4 T Cell Response / J. Merckenschlager, G. Kassiotis. – Текст: электронный // *Front Immunol.* –2015. –Vol.6. – doi: 10.3389/fimmu.2015.00413.

190. High Frequency of Shared Clonotypes in Human T Cell Receptor Repertoires / C. Soto, R. G. Bombardi, M. Kozhevnikov [et al.]. – Текст: электронный // *Cell Rep.* –2020. Vol.32(2). – doi: 10.1016/j.celrep.2020.107882.

191. Lavender, P. Regulation of Th2 cytokine gene transcription / P. Lavender, D. Cousins, T. Lee. – Текст: непосредственный // *Chem Immunol.* –2000. –Vol.78. – P.16–29.

192. Sungnak, W. Multilayer regulation of CD4 T cell subset differentiation in the era of single cell genomics / W. Sungnak, C. Wang, V. K. Kuchroo. – Текст: непосредственный // *Adv Immunol.* –2019. –Vol.141. –P.1–31.

193. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry / L. J. Picker, M. K. Singh, Z. Zdraveski [et al.]. – Текст: непосредственный // *Blood.* – 1995. – Vol.86(4). –P.1408–19.

194. Simultaneous production of interleukin 2, interleukin 4 and interferon-gamma by activated human blood lymphocytes / U. Andersson, J. Andersson, A. Lindfors [et al.]. – Текст: непосредственный // *Eur J Immunol.* –1990. –Vol.20(7). – P.1591–6.

195. Anderson, P. Post-transcriptional control of cytokine production / P. Anderson. – Текст: непосредственный // *Nat Immunol.* –2008. – Vol.9(4). –P.353–9.

196. Vaccine-Associated Enhanced Disease and Pathogenic Human Coronaviruses / C. Gartlan, T. Tipton, F. J. Salguero [et al.]. – Текст: электронный // *Front Immunol.* –2022. –Vol.13. – doi: 10.3389/fimmu.2022.882972.

197. Clinical recurrences of COVID-19 symptoms after recovery: Viral relapse,

reinfection or inflammatory rebound? / M. Gousseff, P. Penot, L. Gallay [et al.]. – Текст: непосредственный // J Infect. –2020. – Vol.81(5). –P. 816–846.

198. Disease severity during SARS-COV-2 reinfection: a nationwide study / A. A. Mensah, J. Lacy, J. Stowe [et al.]. – Текст: непосредственный // J Infect. – 2022. –Vol.84(4). –P. 542–550.

199. Persistence of SARS-CoV-2: a new paradigm of COVID-19 management / L. B. Alhusseini, L. T. Yassen, E. Kouhsari, M. F. Al Marjani. – Текст: непосредственный // Ann Ig. – 2021. –Vol.33(5). –P.426–432.