

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Кудлай Дмитрий Анатольевич, доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН.

Официальные оппоненты:

Цыбиков Намжил Нанзатович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой патологической физиологии;

Жданова Екатерина Васильевна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры патологической физиологии.

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «___» июня 2025 года в ___ часов на заседании диссертационного совета 24.2.318.01 Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С. И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» по адресу 295051, Симферополь, бульвар Ленина, 5/7.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С. И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» по адресу 295051, Симферополь, бульвар Ленина, 5/7 и на сайте <http://cfuv.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент

Е. Ю. Зяблицкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Эпидемическая вспышка новой коронавирусной инфекции COVID-19 (Corona Virus Disease 2019) в городе Ухань, вызванная вирусом SARS-CoV-2, дала начало пандемии с тяжелыми проявлениями респираторной инфекции, высокой контагиозностью, летальностью 1-5% и множеством отдаленных последствий для людей, здравоохранения, социальной сферы и экономики всех государств (Osti T. et al., 2024).

Исследования выявили ряд патофизиологических особенностей иммунного ответа при COVID-19, что связано с недостаточной или запоздалой выработкой IFN, дисбалансом CD4+, CD8+ Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, NK-клеток и моноцитов, что отражено в специфике клеточных реакций и синтеза вируснейтрализующих антител (Симбирцев А.С. и др., 2020). Интерес вызывает сравнение естественного и поствакцинального иммунитета при иммунизации распространенной в России векторной комбинированной вакциной «Гам-Ковид-Вак» ("Спутник V"), разработанной в Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (Logunov D.Y., 2021; Yu L. et al., 2024).

Врожденный иммунный ответ является первой линией борьбы с SARS-CoV-2, где главную роль играют интерфероны (Наровлянский А.Н., 2022). IFN-I индуцирует апоптоз, ограничивая репликацию вируса. SARS-CoV-2 изменяет экспрессию структурного гена ORF6 и подавляет выработку IFN-I, ослабляя защиту. Вследствие дефектного ответа IFN-I отмечается повышение концентрации других цитокинов и хемокинов, развитие цитокинового шторма – признака тяжелой формы COVID-19 (Алексеева Е.И., 2021).

Приобретенный иммунный ответ является второй линией борьбы посредством активированных В- и Т-лимфоцитов. Влияние вируса через ACE2 рецептор на В- и Т-клетки вызывает лимфопению и иммуносупрессию при тяжелых формах COVID-19 за счет супрессии тимуса, костного мозга (Knyazev E., 2021). Лимфопения способствует персистенции вируса (Jafarzadeh A., 2021).

Вакцины против COVID-19 вызывают Т-клеточный иммунитет, который способствует снижению частоты случаев госпитализации или смерти. Т-клеточный иммунитет играет главную роль в контроле над SARS-CoV-2, но его важность недооценена, а механизмы изучены не полностью (Shrotri M., 2022).

Таким образом, динамика иммунного ответа определяет иммунопатогенез COVID-19, а внимание к теме обусловлено практической ценностью для прогноза, диагностической оценки, патогенетической терапии и профилактики COVID-19. Для актуализации темы значимо и то, что иммунизация сыграла первостепенную роль в стихании пандемии и снижении заболеваемости и тяжести болезни. Поэтому исследование иммунного ответа у переболевших COVID-19 и вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», является актуальным.

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.

Задачи исследования:

1. Проанализировать демографические и клинико-anamнестические данные участников исследования.
2. Провести оценку Т-клеточного иммунного ответа путем определения IFN- γ -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. 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 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 рост продукции IFN γ отдельными Т клетками, сенсibilизированными вирусными антигенами, в случае стимуляции продукции цитокинов антигенными пептидами *in vitro*, не сопровождается ростом содержания 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 контроля уровня цитокинов и недопущения «цитокинового шторма».

Теоретическая и практическая значимость работы. Определение IFN- γ -секретирующих Т-клеток в ответ на стимуляцию антигенами вируса SARS-CoV-2 методом ELISPOT и исследование уровня специфических антител класса IgG к S- и N-белкам SARS-CoV-2 позволили изучить особенности иммунного ответа у переболевших COVID-19 и вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак».

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

Результаты исследования внесли вклад в изучение патогенеза COVID-19 и Т-клеточных и В-клеточных иммунных реакций после инфекции и вакцинации.

Методология и методы исследования. Работа клинико-экспериментальная. В клиническом исследовании приняли участие лица (n=205) 18-60 лет. Выполнено два этапа работы с оценкой Т-клеточного ответа и содержания антител у переболевших, вакцинированных и лиц без инфекционного и вакцинального анамнеза COVID-19. Проспективное одномоментное обсервационное исследование в 2020 году (n=103) и в 2021 году (n=102). Этапы имели схожий дизайн, отличались датами и штаммами вируса (<https://t-cov.hse.ru/> T-cell COVID-19 Atlas (T-CoV)). Проанализирована база данных об исследуемых (перенесших COVID-19, вакцинированных, не вакцинированных с отрицательным катамнезом выявления SARS-CoV-2 методом ПЦР). Для оценки иммунитета у указанных лиц применены лабораторные методы исследования образцов венозной крови. Определение содержания антител класса IgG к белкам SARS-CoV-2 методом ИФА. Исследование Т-клеточного иммунного ответа методом ELISPOT.

Проведен эксперимент определения цитокинов в среде культивирования МНПК при специфической и неспецифической стимуляции антигенами SARS-CoV-2 у тех же категорий обследуемых (n=37). Материалом были образцы культуральной среды МНПК, полученные при оценке Т-клеточного ответа. Определяли цитокины групп Th1 (IL 1 β , IL 2, IL 6, IL 12, IL 17, IFN- γ), Th2 (IL 4, IL 5, IL 10, IL 13, TNF α), хемокинов (IL 8, MCP 1, MIP 1 β) и ростовых факторов (IL 7, G CSF, GM CSF).

В биостатистике использовали непараметрические критерии, ROC (receiver operating characteristic) анализ, биоинформационный анализ, кластеризацию, расчет коэффициента корреляции Спирмена, анализ таблиц сопряженности (критерий χ^2 и коэффициент сопряженности Пирсона) и частот (z критерий).

Основные 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.

Степень достоверности и апробация результатов. Работа выполнена в лаборатории молекулярной диагностики АО «Генериум» и лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова», что обеспечило стандартизацию медицинских исследований и эксперимента.

О достоверности результатов и обоснованности выводов свидетельствует достаточный объём работ в клинической и экспериментальной части, использование современных методов исследований со статистическим и биоинформационным анализом показателей.

Результаты исследования представлены и обсуждены автором 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 Патифизиологии (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 работы состоялась на межотделенческой конференции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова», (Протокол №2 от 31.01.2025г.) г. Москва.

Личный вклад автора. Диссертант самостоятельно предложила направление темы работы, совместно с руководителем разработала дизайн и экспериментальную модель. Автор самостоятельно сделала аналитический обзор, разработала анкету и выполнила сбор анамнеза и систематизацию данных, определяла антитела в сыворотке крови, провела эксперимент, постановку ELISPOT и анализ результатов.

Автором лично написаны главы диссертации, совместно с руководителем сформулированы заключительные положения, выводы, практические рекомендации.

Автор благодарит к.мед.н. Городнову Е.А., к.мед.н., Кречетова С.П., к.биол.н. Потеряева Д.А. за методическую помощь в работе, к.соц.н. Щепкину Е.В. за помощь в статистической обработке данных.

Публикации. По материалам опубликовано 7 научных работ. Из них 4 статьи в журналах, индексируемых в международных наукометрических базах Web of Science, Scopus; 3 из них опубликованы в журналах перечня ВАК по специальности защищаемой работы, 1 – в международном журнале. 2 работы опубликованы в сборнике материалов международной конференции. 1 статья опубликована в журнале, рекомендованном ВАК не по шифру специальности.

Структура и объем диссертации. Работа имеет классическую структуру: введение, разделы обзор литературы, материал и методы исследования, пять глав с результатами исследований, обсуждение и заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы, содержащий 199 работ, изложена на 142 страницах, иллюстрирована 30 таблицами и 28 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы. Выполнено 2 этапа проспективного обсервационного исследования. Объект – образцы венозной крови и база данных групп лиц, отраженных на рисунке 1.

Первый этап (n=103) выполнен в 2020 году на базе ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум». Второй этап (n=102) выполнен в 2021 году на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

В группу 1 (переболевшие) включали лиц, перенесших заболевание не менее, чем через 30 дней после последнего положительного результата ПЦР-анализа на SARS-CoV-2. Кровь брали в интервале до 9 месяцев после исчезновения симптомов заболевания и отрицательного теста ПЦР.

В группу 2 (вакцинированные) включали лиц, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак» (рекомбинантные аденовирусные частицы с геном S белка вируса). Кровь брали в интервале 3–6 недель после получения всех доз вакцины.

В контрольную группу 3 (не вакцинированные и не болевшие, условно здоровые, контактные) включали субъектов, отрицающих COVID-19 в анамнезе и лиц, имеющих близкий контакт с больными COVID-19, не менее, чем через 15 дней после контакта с ПЦР-положительным больным.

Различие между первым и вторым этапами – в формировании выборки. В 2020 году контрольная группа представлена лицами, не имевшими контакт с вирусом, а в 2021 году она сформирована добровольцами, заболевание у которых не развивалось при подтвержденном контакте с больными COVID-19. Различие и в использовании доступных ИФА реагентов. Биоинформационный анализ и эксперимент выполнены на втором этапе (2021 г в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова»).

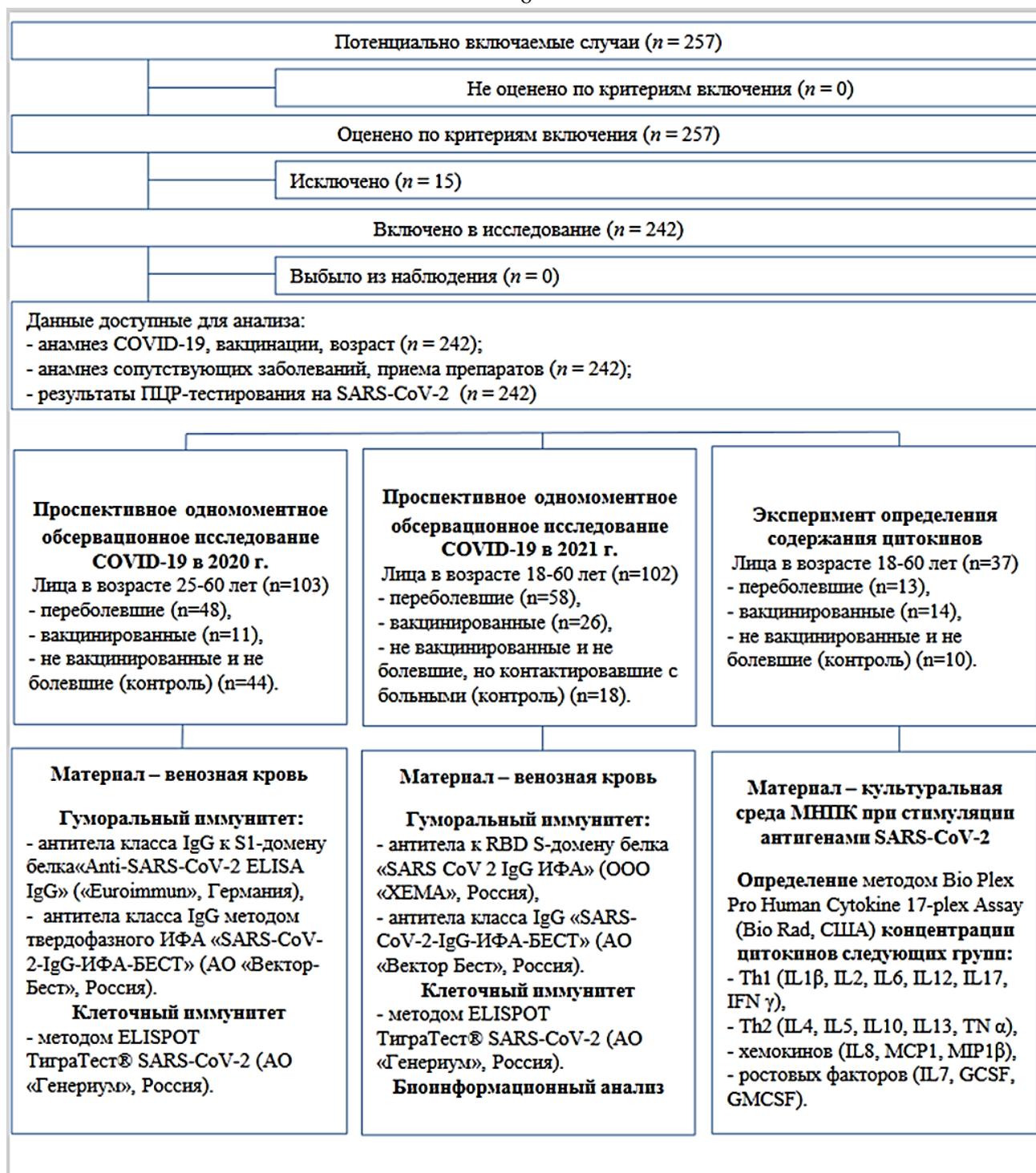


Рисунок 1. Дизайн исследования.

Эксперимент определения содержания цитокинов ($n=37$) в культуральной среде МНПК при специфической и неспецифической стимуляции антигенами SARS-CoV-2 выполнен на образцах среды, полученные в ходе оценки Т-клеточного иммунного ответа.

Изучение гуморального иммунного ответа (выявление антител к белкам SARS CoV 2 в сыворотке крови методом твердофазного ИФА) выполнено наборами 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 шипа «Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG», ИФА («Euroimmun», Германия);

антител IgG «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», Россия). Исследование проводили с измерением оптической плотности на микропланшетном анализаторе Infinite F50 (Tecan, Австрия).

Исследование Т-клеточного иммунного ответа методом ELISPOT в периферической крови выполнили в соответствии с инструкцией набора ТиграТест® SARS-CoV-2 (АО «Генериум», Россия), который предназначен для подсчёта Т-лимфоцитов, секретирующих IFN- γ . В основе метода лежит образование иммуноферментных пятен (ELISPOT, Enzyme Linked Spot Analysis) на мембране с антителами к IFN- γ вокруг секретирующих их Т-лимфоцитов (IFN- γ Release Assay, IGRA).

Для изучения цитокинов в эксперименте в пробирки Vacutainer («Becton Dickinson», США) с цитратом натрия отбирали 8 мл крови для выделения мононуклеаров (МНПК), а в сухие пробирки отбирали ещё по 1 мл для получения сыворотки. МНПК выделяли в градиенте плотности ($\rho=1,077$ г/см³) на основе раствора фиколла (НПП "ПанЭко", Россия). Сыворотку отделяли центрифугированием в течение 20 минут при 1000 g для осаждения сгустка компонентов свёртывающей системы. Определение концентрации цитокинов в образцах 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 обрабатывали Bio Plex Manager 6,0 (Bio Rad, США).

Методы статистической обработки результатов. Систематизация и визуализация результатов осуществлена в таблицах Microsoft Office Excel (2016). Статистическая обработка проведена средствами языка Python 3.11. Показатели оценены на соответствие нормальному распределению (критерий Шапиро-Уилка). Расчеты произведены методами непараметрической статистики. Посчитана медиана, в качестве показателей вариации – квартили (Me [Q1; Q3]). Для сравнения двух выборок использован U-критерий Манна-Уитни. Для сравнения трех и более выборок использован критерий Краскела-Уоллиса. Для изучения связи между явлениями рассчитан коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r), для дихотомических переменных – коэффициент Мэтьюса. Значения интерпретированы по Шкале Чеддока. Коэффициент корреляции дополнен расчетом 95% доверительного интервала методом Бутстреп. Данные сравнивали при помощи критерия χ^2 Пирсона, критерия Фишера. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$. Использован однофакторный логистический анализ и отношение шансов, анализ ROC-кривых, многофакторный логистический анализ.

Результаты исследования и обсуждение. Данные *клинико-anamnestического исследования* переболевших COVID 19 и вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», показали (табл. 1), 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 (69,2%).

Таблица 1. Степень тяжести заболевания COVID-19

Степень тяжести заболевания	Исследование 2020 года переболевшие (%)	Исследование 2021 года переболевшие (%)
1 – легкая	69,0%	72,4%
2 – средняя	21,0%	27,6%
3 – тяжелая	10,0%	-

Результаты исследования Т-клеточного иммунитета. Заболевание COVID 19 и вакцинация «Гам-КОВИД-Вак» приводят к увеличению Т-лимфоцитов, отвечающих выработкой INF γ в ответ на стимуляцию наборами антигенов AG1 и AG2 в методе ELISPOT, это сопровождается ростом 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 (табл. 2).

Таблица 2. Общая доля лиц с позитивным Т клеточным ответом на антигены

Группа обследуемых	Исследование 2020 года (%)	Исследование 2021 года (%)
Условно здоровые	25,0 %	11,0 %
Переболевшие	79,0 %	69,0 %
Вакцинированные	91,0 %	50,0 %.

В обеих группах у большинства положительных субъектов одновременно имеются Т- лимфоциты, отвечающие на антигены набора AG1 и набора AG2.

Результаты исследования гуморального иммунитета. IgG к RBD S у лиц, перенесших тяжелую форму болезни, выше более чем в 2 раза, по сравнению с лицами, перенесшими болезнь в более легкой форме. У лиц контрольной группы антитела выявляются слабо (рис. 2).

У переболевших превышен уровень антител как к S-белку, так и N-, M-, ORF3, ORF7. У вакцинированных высокий уровень обнаружен только для антител к S-белку. Нет перекрестной реакции или дискордантности по исследуемым антигенам в группах переболевших и вакцинированных, как это наблюдалось при исследовании Т-клеточного иммунитета. К серопозитивным к антигенам S белка относится более 90 % переболевших и вакцинированных, а субъекты, серопозитивные к антигенам N белка, составляют 90% только среди переболевших. По сравнению с переболевшими, доля вакцинированных серопозитивных лиц по антителам к N белку, меньше и находится на уровне контрольных лиц, имеющих низкую серопозитивность и по антителам к S белку (менее 20%) (рис. 3).

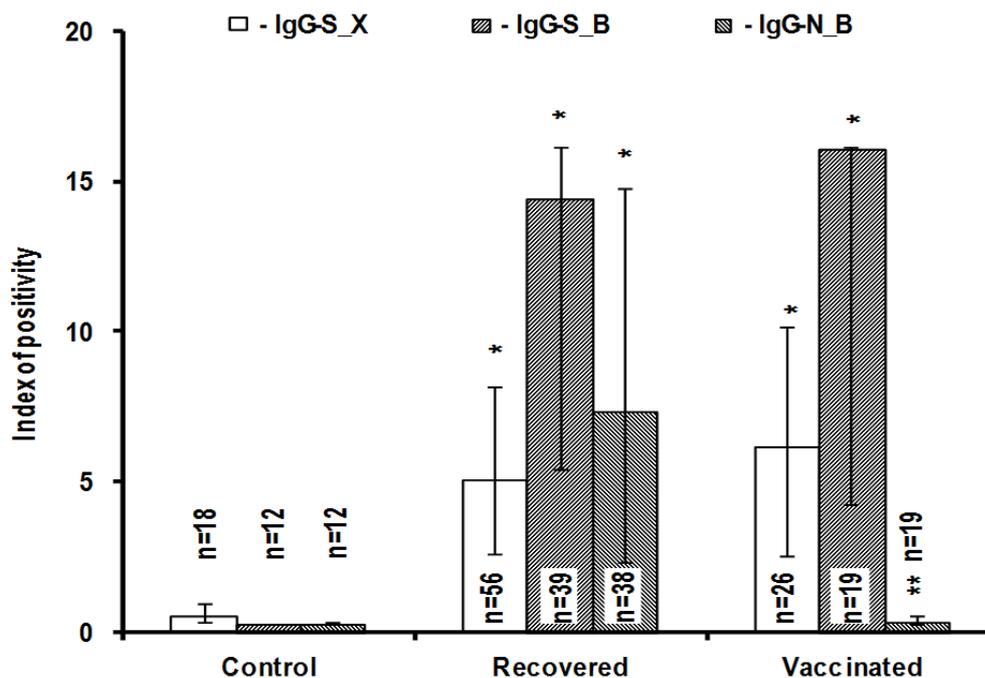


Рисунок 2. Результаты определения антител к антигенам белков SARS-CoV-2 в сыворотке крови. По вертикали отражены индексы позитивности (ИП) по результатам ИФА, по горизонтали представлены группы обследуемых и данные для всех видов иммуноглобулинов в виде Me (Q1; Q3).

Примечание для рис. 2 и рис. 3: * - $P < 0,01$ при сравнении с результатом оценки тем же методом в образцах сыворотки субъектов контрольной группы. ** - $P < 0,01$ при сравнении с результатом оценки тем же методом в образцах сыворотки переболевших.

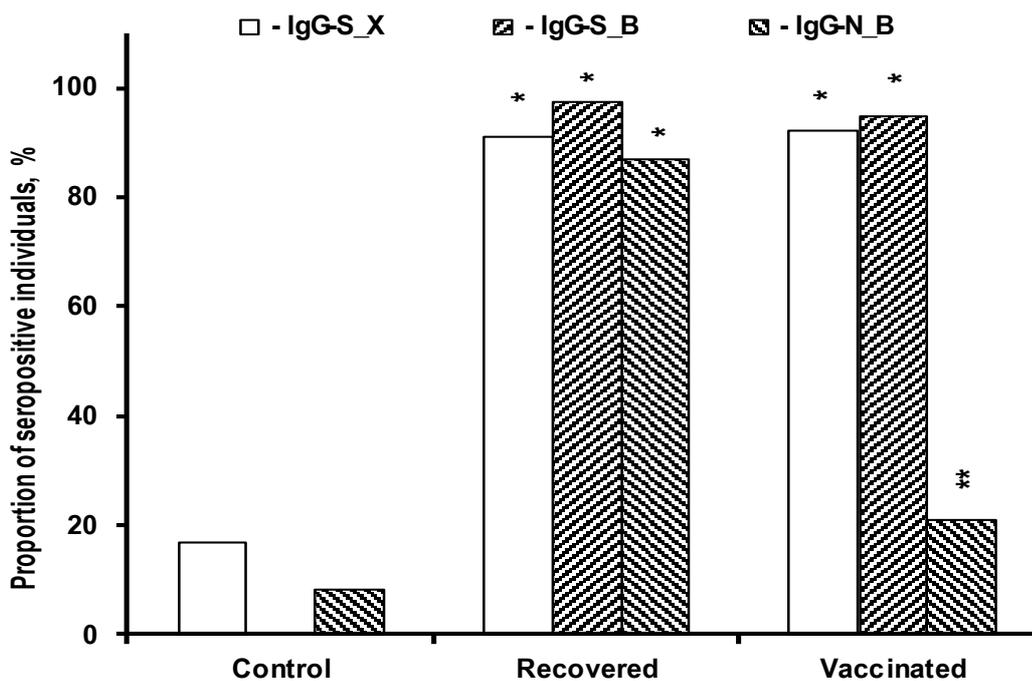


Рисунок 3. Доли серопозитивных субъектов (ИП > 1,1) в обследованных группах субъектов к антигенам белков SARS-CoV-2.

Корреляционный анализ результатов исследования 2020 и 2021 года выявил умеренную положительную связь тяжести заболевания от возраста и уровня IgG к RBD S. Количество пятен к АГ1 и АГ2 изменяется синхронно. От умеренной до заметной корреляции между числом пятен к АГ1 или АГ2, их площадью и уровнем Ig к различным белкам, что говорит о синхронности работы звеньев иммунитета. Однако среди переболевших положительных по АГ1 и отрицательных по АГ2 в 2021 году было больше (64,0% положительных по АГ1 и 55,0% отрицательных по АГ2), чем в 2020 (35,0% и 29,0%, соответственно). Среди вакцинированных в 2020 году чаще выявлялись положительные по АГ1 (90%) по сравнению с исследованиями 2021 года (50%).

Количество пятен у вакцинированных, переболевших и контактировавших имеет сильную положительную корреляцию с их общей площадью.

Регрессионный анализ результатов исследований, проведенных в 2021 году, ставил целью определить пороговые значения количества пятен, их общей и средней площади по обоим антигенам для возможности использования в качестве предиктора уровня тяжести заболевания. При этом в большинстве случаев вероятность прогноза 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 Ig. Титры антител к другим белкам вируса нецелесообразно использовать как предиктор тяжести ввиду отсутствия значимых отличий между группами. При этом в группах с тяжелым течением антител вырабатывалось меньше, чем в группе с легким течением.

Регрессионный анализ результатов исследований, проведенных в 2020 году показал, что количество пятен к АГ1 прямо зависит от степени тяжести, как и уровень IgG (вероятно, что основной вклад составил тот же белок, что и в 2021). Обобщая данные обоих периодов, чувствительность и специфичность для всех изученных факторов редко оказывалась выше 60%, поэтому судить о степени тяжести болезни по значениям данных показателей не следует.

Результаты моделирования цитокинового ответа на белки SARS-Cov-2 в эксперименте. 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. 4).

В отличие от неспецифической, специфическая стимуляция пептидами вируса SARS-CoV-2 в виде наборов АГ1 (рис. 5) и АГ2 (рис. 6) не приводит к увеличению содержания цитокинов в среде у всех групп субъектов. Все случаи роста содержания цитокинов в 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.

Таким образом, цитокиновый ответ на специфическую стимуляцию Т-лимфоцитов, сенсibilизированных у выздоровевших от COVID-19 и вакцинированных лиц, не сопровождается накоплением цитокинов в среде, окружающей лимфоциты, что обеспечивает сбалансированный иммунный ответ без нежелательных последствий, например, в виде цитокинового шторма.

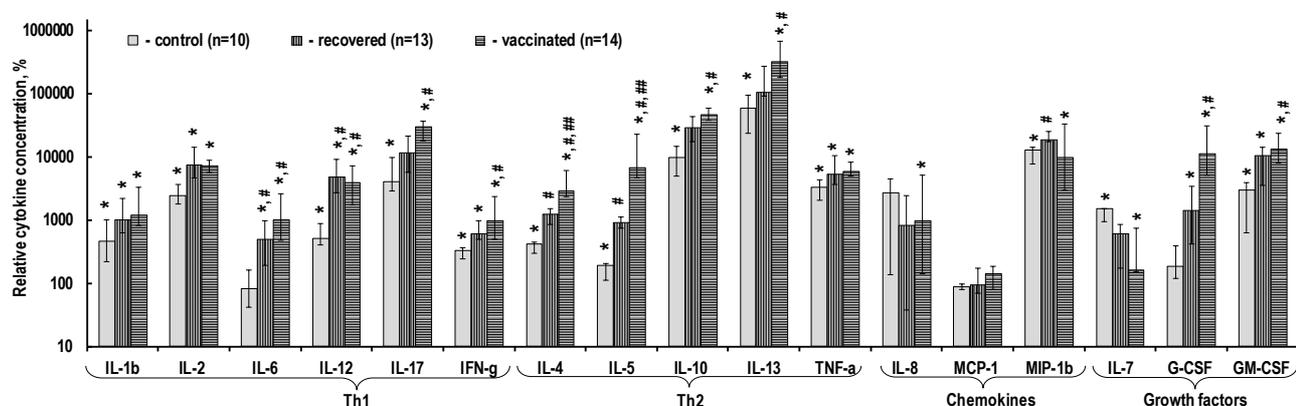


Рисунок 4. Содержание цитокинов в среде культивирования МНПК при неспецифической стимуляции. По вертикали - относительная концентрация цитокина, по горизонтали – спектр цитокинов, хемокинов и факторов роста. Данные представлены в виде Ме (Q1; Q3).

Примечание: * $P < 0,01$ при сравнении образцов без стимуляции с образцами с неспецифической стимуляцией внутри группы, # $P < 0,01$ при сравнении образцов с неспецифической стимуляцией между данной и контрольной группами, ## $P < 0,01$ – между группами вакцинированных и переболевших.

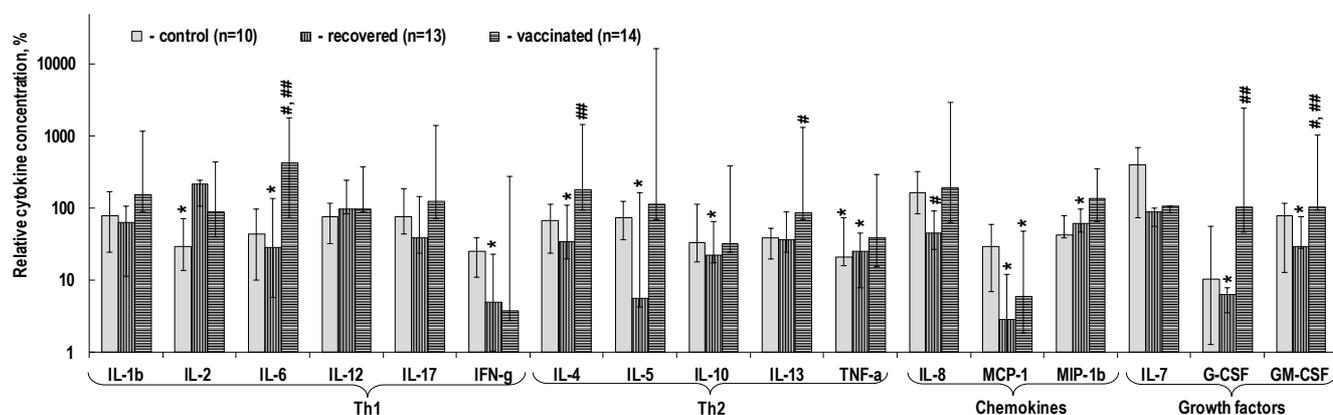


Рисунок 5. Содержание цитокинов в среде культивирования МНПК при специфической стимуляции пептидами вируса SARS-CoV-2 в виде наборов AG1. По вертикали - относительная концентрация цитокина, по горизонтали – спектр цитокинов, хемокинов и факторов роста. Ме (Q1; Q3).

Примечание для рис. 5 и 6: * - $P < 0,01$ при сравнении образцов без 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, ## - $P < 0,01$ – между группами вакцинированных и переболевших.

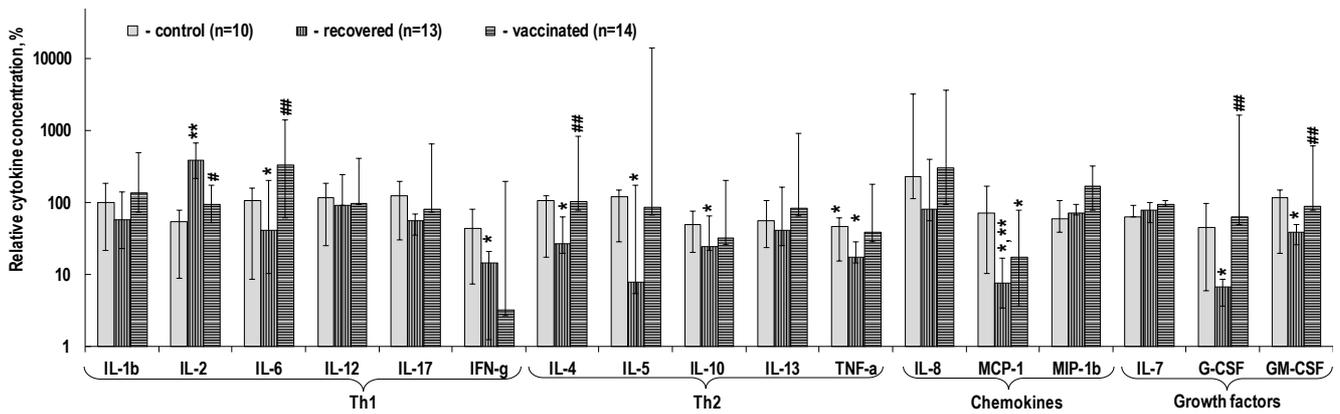


Рисунок 6. Содержание цитокинов в среде культивирования МНПК при специфической стимуляции пептидами вируса SARS-CoV-2 в виде наборов AG2. По вертикали - относительная концентрация цитокина, по горизонтали – спектр цитокинов, хемокинов и факторов роста. Ме (Q1; Q3).

Биоинформационный анализ показателей клеточного и гуморального иммунитета и цитокинового профиля у переболевших и вакцинированных. Особенности клеточного и гуморального иммунитета в сенсibiliзируемом организме определяются презентацией всех антигенов полноценным вирусом SARS CoV 2 (заболевание) и только антигенов S белка вакциной «Гам-Ковид-Вак» (вакцинация) (рис. 7). Но нельзя исключить невыявленное инфицирование в пандемию, что является причиной наличия у вакцинированных Т-клеточного ответа на антигены, не относящиеся к S белку. При позитивном заключении о гуморальном иммунитете у 90% инфицированных и вакцинированных, наличие Т-клеточного ответа может быть сделано для 70% переболевших и 50% вакцинированных. Так, рекомбинантный механизм появления специфических распознающих антиген молекулярных структур наивных Т- и В-лимфоцитов приводит к разной силе клеточного и гуморального противовирусного иммунитета, возникающего после инфицирования или вакцинации.

При оценке Т-клеточного ответа к SARS-CoV-2 методом ELISPOT 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 (рис. 8). 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.

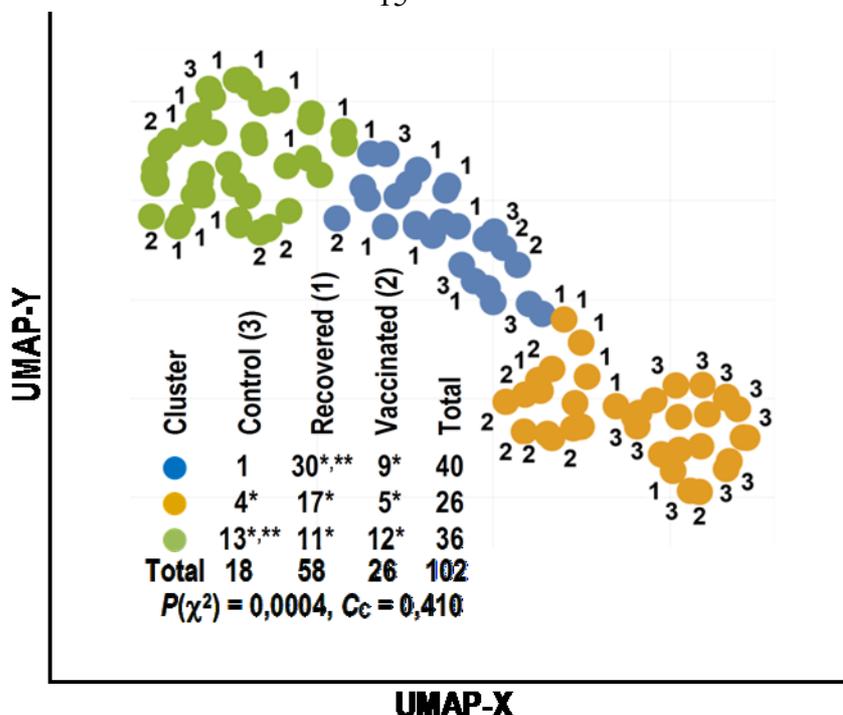


Рисунок 7. Биоинформационный анализ с кластеризацией субъектов по показателям клеточного и гуморального иммунитета субъектов.

Примечание: кружками одинакового цвета обозначены субъекты одного кластера. Числа рядом отражают принадлежность лиц к группе: 1 – переболевшие, 2 – вакцинированные, 3 – контроль. Таблицы сопряженности содержат количество представителей каждой клинической группы в составе кластеров. * – доля субъектов в кластере превышает 0,05 от количества субъектов с соответствующим клиническим статусом, ** – доля субъектов в кластере превышает доли субъектов с соответствующим клиническим статусом во всех остальных кластерах (все при $p < 0,01$).

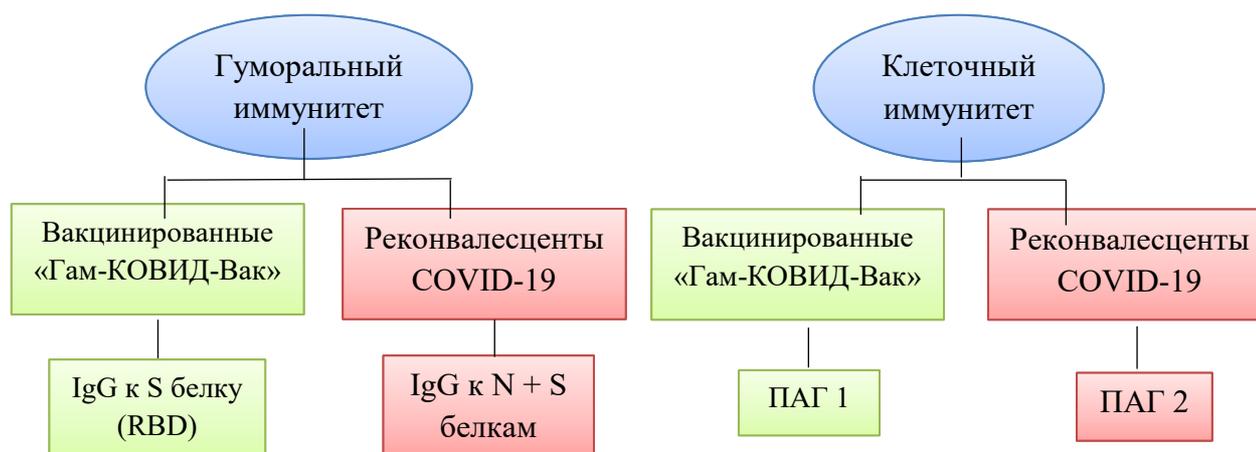


Рисунок 8. Различия противовирусного иммунитета у реконвалесцентов COVID-19 и после вакцинации «Гам-КОВИД-Вак».

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.9).



Рисунок 9. Длительность Т-клеточного иммунного ответа.

Повышенное продуцирование IFN γ отдельными Т клетками, сенсibilизированными вирусными антигенами, в случае стимуляции продукции цитокинов антигенами *in vitro*, не сопровождается ростом содержания цитокинов в среде, в отличие от неспецифической поликлональной стимуляции. То есть одновременно с ростом продукции цитокинов Т-лимфоцитами, также увеличивается их способность к утилизации цитокинов, и при специфическом иммунном ответе создаются условия для обеспечения управляемого уровня цитокинов и недопущения «цитокинового шторма». 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 обеспечивается устойчивость организма к вирусной инфекции, а в ряде случаев возникающее сочетание составляющих иммунного ответа оказывается несбалансированным.

Заключение. В работе проведена оценка иммунного ответа Т-клеток путем обнаружения лимфоцитов, секретирующих IFN- γ , после стимуляции различными антигенами SARS-CoV-2 у реконвалесцентов COVID-19 и после вакцинации «Гам-Ковид-Вак». Кроме того, исследован гуморальный иммунитет и его сравнение со специфическим Т-клеточным ответом. Отмечена решающая роль Т-клеток и приоритет клеточного механизма иммунного ответа. Полученные результаты легли в основу выводов и практических рекомендаций работы.

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 γ 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 AG1 и AG2 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 отсутствии 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, сенсibilизированных 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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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.] // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2021. – Т. 21, № 3. – С. 178-192.
2. Оценка иммунного ответа SARS-CoV-2-специфичных Т-клеток методом ELISPOT / В. В. Герасимова, С. В. Колесник, Д. А. Кудлай, А. С. Гольдерова // Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal). – 2022. – Т. 7, № 5-2. – С. 96-102.
3. Влияние специфического Т-клеточного и гуморального иммунного ответа к SARS-CoV-2 на выживаемость пациентов, впервые болеющих COVID-19 / О. С. Попов, Н. Н. Сушенцева, И. А. Полковникова [и др.] // Иммунология. – 2023. – Т. 44, № 1. – С. 53-62.
4. T-cell immunity in COVID-19-recovered individuals and individuals vaccinated with the combined vector vaccine Gam-COVID-Vac / S. P. Krechetov, V. V. Vtorushina, E. V. Inviyaeva [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24, No. 3. – P. 1930.
5. Клеточный и гуморальный иммунитет при COVID-19 в Республике Крым / Е. Ю. Зяблицкая, Д. А. Кудлай, С. В. Колесник [и др.] // Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal). – 2023. – Т. 8, № 1. – С. 12-19.
6. Experimental modeling of the cytokine response in COVID-19 and in vaccinated individuals in specific and non-specific stimulation with CONVALESCENTS SARS-COV-2 antigens / S. Kolesnik, D. Kudlay, E. A. Gorodnova [et al.] // 9th International Congress of Pathophysiology and 5th Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation: Final Program and Abstract Book, Belgrade, 2023. – Kragujevac: Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, 2023. – P. 133.
7. T-cell immune response in COVID-19 convalescents and following vaccination / S. V. Kolesnik, D. A. Kudlay, E. A. Gorodnova [et al.] // 9th International Congress of Pathophysiology and 5th Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation: Final Program and Abstract Book, Belgrade, 2023. – Kragujevac: Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, 2023. – P. 99.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АГ 1 – панель антигенов 2
АГ 2 – панель антигенов 1
ИП – индекс позитивности
ИФА – иммуноферментный анализ
МНПК – мононуклеары периферической крови
ПАГ – панель антигенов
ПЦР – полимеразная цепная реакция.
ACE2 – рецептор ангиотензин-превращающего фермента 2
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
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- γ – 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 данных
S-белок – белок шипа вируса SARS-Cov-2
SARS-Cov-2 – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2
TNF – фактор некроза опухоли