

Афридонова Зульфия Энгелевна

**ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ИНФЕКЦИЮ ВИРУСОМ SARS-CoV-2 И
ВАКЦИНАЦИЮ ПРОТИВ НЕГО**

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

**Топтыгина
Анна Павловна**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Калюжин
Олег Витальевич**

доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева»

**Радаева
Ольга Александровна**

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2026 г. в _____ часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 21.2.058.15 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ (Пироговский Университет) по адресу: 117513, г. Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова» МЗ РФ (Пироговский Университет) по адресу: 117513, г. Москва, ул. Островитянова, 1, стр.5 и на сайте (<http://rsmu.ru>).

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.2.058.15,
доктор медицинских наук, профессор

Панина

Панина Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень научной разработанности темы. Пандемия вируса SARS-CoV-2 предъявила серьезные требования к медико-биологической науке в плане экстренной разработки диагностических систем и средств иммунопрофилактики, одновременно дав уникальный шанс исследователям изучить формирование первичного противовирусного иммунного ответа у наивной в отношении этого вируса человеческой популяции и проследить особенности сохранения иммунитета к SARS-CoV-2 в условиях вакцинации и прорывных инфекций мутантными штаммами вируса.

Традиционно противоинфекционный и поствакцинальный иммунитет оценивают по наличию специфических антител. Известно два варианта адаптивного гуморального иммунного ответа. Экстрафолликулярный путь активации и дифференциации В-клеток в короткоживущие плазмоциты идет за пределами зародышевых центров лимфатических узлов с синтезом преимущественно IgM-антител [Elsner RA, 2020; Lam JH, 2020]. Иммунный ответ в зародышевых центрах лимфоузлов требует кооперации Tfh-хелперов и В-клеток, клональной пролиферации последних, созревания аффинитета с дифференциацией в долгоживущие плазматические или В-клетки памяти с синтезом IgG-антител [Cañete PF, 2020]. У переболевших COVID-19 обнаружены вирусспецифические долгоживущие плазмоциты и В-клетки памяти [Turner JS, 2021]. Показано, что субкласс IgG3 связан с ранним противовирусным ответом во время заражения SARS-CoV-2 [Korobova ZR, 2022]. IgG1 и IgG3 были основными субклассами [Tandhavanant S, 2021], показавшими высокую способность к нейтрализации вируса SARS-CoV-2 [Goyins KA, 2022]. Нейтрализующая активность антител сохранялась у большинства пациентов до 15 месяцев [Yousefi Z, 2022]. Специфичные к вирусу SARS-CoV-2 IgA, защищающие слизистые от вируса, обнаружены в слюне переболевших [Isho B, 2020; Chen K, 2020].

Клеточный иммунитет – ключевое звено противовирусного иммунного ответа [Moga E, 2022]. Показано формирование ответов CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток практически на все белки SARS-CoV-2 [Tarke A, 2021], даже у бессимптомных лиц [Le Bert N., 2021]. Важная функция адаптивной иммунной системы – сохранение памяти о предыдущих антигенных контактах. У переболевших COVID-19 среди CD4⁺ Т-клеток преобладает фенотип центральной памяти, а среди CD8⁺ Т-клеток – фенотип эффекторной памяти [Sekine T, 2020; Meckiff BJ., 2020]. Оценка вирусспецифического клеточного иммунного ответа проводится рутинно методом ELISpot по продукции IFN- γ [Saad Albichr I, 2023].

Массовая вакцинация и бустеры вследствие нескольких волн пандемии сформировали популяционный иммунитет [Suryawanshi YN, 2023]. Однако высокий уровень анти-S IgG не обеспечивает защиту от заражения новыми VOC из-за частых мутаций в S-белке SARS-CoV-2 [Aschwanden C., 2021]. Это подтверждают новые подъемы заболеваемости COVID-19. За счет мутаций вирус оказался способным уходить от атаки иммунной системы [Minkoff JM, 2023], выживая в человеческой популяции [Carabelli AM,

2023]. Риск значительного подъема заболеваемости существует спустя 4 года с момента первой встречи вируса SARS-CoV-2 с иммунной системой человека [Malato J, 2023].

Таким образом, исследование динамики развития адаптивного иммунного ответа и сохранения иммунологической памяти на антигены вируса SARS-CoV-2 у переболевших, привитых, ревакцинированных вакциной «Спутник V» и перенесших прорывную инфекцию, вызванную мутантными штаммами, дает возможность детализировать фундаментальные знания о специфическом противовирусном иммунном ответе. Результаты нашего исследования гуморального и клеточного иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2 могут быть использованы при создании вакцин нового поколения, при отборе отдельных групп пациентов на вакцинацию или ревакцинацию против вируса SARS-CoV-2 и разработке новых терапевтических препаратов.

Цель работы: исследовать особенности формирования и поддержания специфического гуморального и клеточного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19 и привитых от этой инфекции.

Задачи исследования:

1. Проанализировать наличие антител к N- и S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших COVID-19.
2. Выявить наличие клеточного иммунитета на N- и S-белок вируса SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19.
3. Проанализировать формирование гуморального и клеточного ответа после вакцинации против COVID-19.
4. Провести математическое моделирование динамики изменения концентрации IgG-антител к N- и S-белку SARS-CoV-2.
5. Оценить продолжительность сохранения адаптивного иммунитета у переболевших и привитых от COVID-19.
6. Оценить эффект ревакцинации или повторного заболевания COVID-19 на уровень гуморального и клеточного иммунитета у переболевших и привитых от COVID-19.

Научная новизна. Впервые исследовано формирование у первично бионаивных лиц и поддержание на протяжении 4 лет гуморального и клеточного иммунного ответа на антигены вируса SARS-CoV-2 в условиях продолжающейся циркуляции его мутантных штаммов.

Показано, что у переболевших COVID-19 антитела класса IgM к антигенам SARS-CoV-2 постепенно исчезают из кровотока, но у отдельных людей могут сохраняться на высоком уровне более 1 года.

Обнаружено, что по уровню антител в сыворотке крови к S-белку SARS-CoV-2 классов IgA и IgG реконвалесцентов COVID-19 можно разделить на людей с высоким (57%) и низким (43%) гуморальным ответом на данный антиген. Уровень гуморального ответа не зависит от тяжести перенесенного заболевания. Несмотря на постепенное снижение уровня антител и последующие бустеры, как за счет вакцинации, так и

повторных контактов с вирусом SARS-CoV-2, такое разделение сохраняется на протяжении 4 лет наблюдения.

Выявлено формирование Т-клеточного ответа, определяемого по экспрессии CD107a на CD8^{high} лимфоцитах после распознавания антигенов S-белка SARS-CoV-2 у 100% переболевших COVID-19. По уровню Т-клеточного ответа переболевших можно разделить на людей с высоким (50%) и низким (50%) клеточным ответом. Уровень Т-клеточного ответа не зависит от тяжести перенесенного заболевания. Такое разделение сохраняется на протяжении 4 лет наблюдения.

Продemonстрировано формирование специфического Т-клеточного ответа на S-белок без сероконверсии у части переболевших COVID-19.

Установлено формирование гуморального и Т-клеточного ответа на S-белок у 100% не болевших COVID-19 дважды привитых вакциной «Спутник V». Привитые вакциной «Спутник V» так же были разделены на людей с высоким и низким уровнем гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на S-белок SARS-CoV-2. При этом уровень Т-клеточного ответа у привитых сопоставим с таковым у переболевших, а уровень гуморального иммунного ответа у привитых немного ниже, чем у переболевших, что особенно выражено в уровне IgA-антител.

Доказано, что гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ на антигены SARS-CoV-2 формируются и поддерживаются независимо друг от друга, как у привитых вакциной «Спутник V», так и у переболевших COVID-19. Выявлено 4 варианта соотношения гуморального и клеточного ответа: высокий гуморальный и клеточный ответ, низкий гуморальный и клеточный ответ, высокий гуморальный и низкий клеточный ответ и низкий гуморальный и высокий клеточный ответ, включающие примерно по четверти индивидуумов обследованных групп.

Продemonстрировано, что у привитых вакциной «Спутник V» и у переболевших COVID-19 уровень анти-S IgG-антител постепенно снижается и выходит на плато через 9 месяцев после контакта с антигеном. Концентрация анти-S IgA-антител быстро нарастает при заболевании и снижается после выздоровления быстрее, чем уровень IgG-антител. Т-клеточный иммунитет меньше подвержен изменениям. Последующие контакты с S-белком как за счет вакцинации, так и за счет повторных инфекций, поддерживают уровень антител и клеточного иммунитета в течение 4 лет наблюдения. Наибольший прирост уровней гуморального и Т-клеточного иммунных ответов установлен в группе прорывного иммунитета, у перенесших COVID-19 как минимум дважды.

Обнаружено неполное созревание авидности анти-S IgG-антител. Индекс авидности нарастает со временем, но лишь слегка превышает 50% через 1-1,5 года после заболевания. Последующие бустеры индуцируют повышение индекса авидности до 70% у привитых вакциной «Спутник V» и 80% и более при повторных контактах с мутантными штаммами SARS-CoV-2.

Выявлено формирование Т-клеточного ответа на N-белок вируса SARS-CoV-2 без сероконверсии у части привитых вакциной «Спутник V». Продемонстрированы стабильные Т-клеточные ответы на N-белок у перенесших COVID-19 как минимум дважды в течение 4 лет наблюдения.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость работы заключается в получении новых данных, вносящих вклад в понимание процессов формирования у бионаивной в отношении SARS-CoV-2 популяции взрослых людей иммунного ответа к антигенам SARS-CoV-2, как у привитых вакциной «Спутник V», так и у переболевших COVID-19, а также созревания и поддержания гуморального и клеточного иммунитета в условиях продолжающейся циркуляции и активного мутационного процесса в S-белке вируса. Выявлены различия в динамике формирования и поддержания уровней антител к N- и S-белку SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19 в легкой и среднетяжелой форме. Установлено, что IgG-антитела к N-белку SARS-CoV-2 формируются преимущественно короткоживущими плазмócитами, о чем свидетельствует быстрый подъем и снижение концентрации этих антител во времени и высокий процент антител IgG3 субкласса, что типично для профиля синтеза антител короткоживущими плазмócитами. Тогда как IgG-антитела к S-белку SARS-CoV-2 формируются преимущественно долгоживущими плазмócитами, о чем свидетельствует длительное поддержание уровня этих антител (4 года наблюдения) и доминирование антител IgG1 субкласса, типичного для профиля синтеза антител долгоживущими плазмócитами.

Выявлены различия в созревании ответа антител на N- и S-белок во времени. С помощью математического моделирования предложены формулы, описывающие изменение концентраций IgG-антител во времени к N-белку (на основе распределения Фишера) и к S-белку (на основе распределения Фишера и Эрланга).

С использованием предложенных формул рассчитана динамика концентрации IgG-антител к S-белку. Вычислено, что уровень IgG-антител к S-белку снизился бы до отрицательного через 4 года после элиминации вируса, что совпадает по срокам с реальными наблюдениями за уровнем IgG-антител после элиминации вирусов SARS-CoV-1 и MERS. Полученное совпадение расчетных и реальных сроков снижения антител подтверждает правильность предложенных формул и пригодность использованных моделей для исследования динамики концентрации IgG-антител к S-белку.

Разработан способ оценки клеточного иммунитета к N-белку SARS-CoV-2 (Патент RU 2818080 C1 Российской Федерации). Несмотря на то, что антитела к N-белку считают не протективными, для Т-клеточного иммунитета не важно, из какого именно белка вируса получен антигенный пептид. Консервативность N-белка является основанием для разработки и применения вакцин, направленных на поддержание Т-клеточного ответа к антигенам N-белка для защиты от новых вариантов вируса SARS-CoV-2.

В результате сопоставления разных методов оценки Т-клеточного иммунного ответа на антигены SARS-CoV-2 показано, что методы, основанные на ELISpot и на определении

процента CD8^{hi}CD107a⁺ не коррелируют, так как оценивают активацию разных субпопуляций Т-клеток, вовлеченных в иммунный ответ на SARS-CoV-2. Результаты даже в пределах метода ELISpot различаются в зависимости от состава вирусных антигенов, используемых для активации Т-клеточного ответа, и могут меняться в процессе появления новых мутаций в S-белке. Следует учитывать результаты сопоставления этих методов при выборе метода для оценки клеточного иммунитета на антигены SARS-CoV-2.

Рассчитаны пороговые разделяющие значения (cut-off) для параметров Т-клеточного (6%) и гуморального, IgG-антитела, (600 BAU/мл) иммунитета к S- и N-белку SARS-CoV-2, позволяющие разделять высокий и низкий уровень ответа на этот антиген.

Методология и методы исследования. Было проведено простое открытое сравнительное проспективное исследование иммунологических параметров гуморального и клеточного иммунитета у переболевших COVID-19 легкой и средней степени тяжести или привитых вакциной «Спутник V». Взятие биологического материала (венозная кровь) проводилось согласно положениям Хельсинской Декларации ВМА (2000) и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999), а также согласно с «Российскими и международными требованиями по надлежащей клинической практике» – ГОСТ Р. 52379-2005, GOOD CLINICAL PRACTICE (GCP). В процессе выполнения работы применяли формально-логические методы для анализа научной литературы, клиничко-анамнестические, иммунологические и статистические методы исследования.

Внедрение результатов работы. Результаты диссертационной работы внедрены в работу КДЦ ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского и ООО «Клиника Семейное Здоровье».

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов проведенных исследований определяется достаточным объемом выборки пациентов, количеством проведенных исследований, выполненными современными методами, обладающими высокой чувствительностью и объективностью на высокоточном, автоматизированном диагностическом оборудовании и использованием корректных методов статистической обработки материала.

Материалы диссертационной работы были доложены на: Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва, 2021 г.); II, III и IV Международных научно-практических конференциях по вопросам противодействия новой коронавирусной инфекции и другим инфекционным заболеваниям (Санкт-Петербург, 2021, 2022 и 2023 гг.); Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы профилактической медицины и санитарно-эпидемиологического благополучия населения: факторы, технологии, управление и оценка рисков» (Нижний Новгород, 2022 г.); Конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность», (Москва, 2023 г.); XVII Всероссийском форуме с международным участием им. Акад. В.И.Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-

Петербург, 2023 г.); 9-й Научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая иммунология» (Сочи, 2023 г.); V Объединенном иммунологическом форуме (Пушкинские Горы, 2024 г.); 2-ом Гомельском международном конгрессе «Инфекционные болезни, микробиология и иммунология» (Гомель, Республика Беларусь, 2024 г.). Аprobация диссертации состоялась на расширенном заседании секции Ученого совета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора «Общая и прикладная иммунология» 14.11.2024 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 работ, из них статей в журналах, входящих в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий», рекомендуемых ВАК Министерства образования и науки РФ для публикаций основных результатов диссертационных исследований – 5, в том числе статей в журналах, включенных в базу Scopus и Web of science – 5, тезисов в материалах конференций – 7 и патент – 1.

Личный вклад автора. Автор лично собирала биологический материал, определяла параметры гуморального иммунитета методом ИФА и клеточного иммунитета методом ELISpot, выполняла пробоподготовку для цитофлуориметрии, проводила анализ литературы, анализ и описание полученных результатов, статистическую обработку. Цитофлуориметрия мононуклеаров на проточном цитометре выполнена совместно с сотрудниками централизованной клинико-диагностической лаборатории ФГАУ НМИЦ здоровья детей МЗ РФ (зав. лабораторным отделом д.м.н. Е.Л.Семикина). Математическое моделирование выполнено совместно с сотрудником ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский университет «МЭИ»», доцентом, к.т.н. Михайловым И.С.

Положения, выносимые на защиту

1. У переболевших COVID-19 и привитых вакциной «Спутник V» формируется гуморальный и клеточный иммунитет разного уровня на антигены SARS-CoV-2. Четыре варианта соотношения высокого и низкого гуморального и клеточного иммунитета свидетельствуют о независимости процессов формирования этих иммунных ответов.
2. Изменения концентраций IgG-антител к N- и S-белку в сыворотке крови в зависимости от времени аппроксимируются с помощью распределений Фишера и Эрланга. Анти-N антитела синтезируются преимущественно короткоживущими плазмócитами, а уровень анти-S антител является суммой антител, синтезируемых коротко- и долгоживущими плазмócитами.
3. В условиях свободной циркуляции и активных мутаций SARS-CoV-2 повторные бустеры препятствуют снижению гуморального и клеточного иммунитета к N- и S-белку. Динамика уровней иммунных ответов зависит от антигена, класса антител, количества бустеров и индивидуальных особенностей реакций иммунной системы.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 209 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы характеристики обследованных лиц и методов

исследования, главы результатов собственных исследований, заключения, выводы, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 37 рисунками. Список литературы содержит 334 источника, из них работ отечественных авторов – 28, зарубежных авторов – 306.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ ЛИЦ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика когорты обследованных лиц.

В простом открытом сравнительном проспективном исследовании были обследованы 107 переболевших COVID-19 взрослых (42 мужчины и 65 женщин), в возрасте 18-73 года. Когорту обследованных составили сотрудники ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского, их родные и близкие. Также обследовано 30 взрослых, дважды привитых вакциной «Спутник V» сотрудников ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского (11 мужчин и 19 женщин), в возрасте 18-59 лет. Люди из этих когорт были обследованы от 1 до 10 раз в течение 4-х лет наблюдения (2021-2024 гг). Из числа обследованных реконвалесцентов 27 человек через 6-12 мес. после перенесенного COVID-19 были дважды привиты вакциной «Спутник V» и составили группу с гибридным иммунитетом и 32 человека перенесли повторный COVID-19: первый раз в 2020-2021 гг. и повторно в 2022 г. (штамм Омикрон) и составили группу с прорывным иммунитетом. В контрольную группу вошли 18 практически здоровых взрослых (8 мужчин и 10 женщин), не болевших и не привитых от COVID-19, обследованных в начале 2020 г., в возрасте 28-60 лет.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского (протокол № 58 от 15.12.2021), обследованные подписывали информированное согласие на участие в исследовании.

Сбор и обработка проб крови.

Взятие проб венозной крови у участников исследования производили утром натощак в две вакуумные пробирки Vacutainer® по 4 мл с гепарином и активатором свертывания. Сыворотку крови получали центрифугированием, разливали в микропробирки типа эппендорф по 500 мкл, замораживали при температуре -70°C и хранили до использования.

Мононуклеары периферической крови выделяли градиентным центрифугированием (фиколл-верографин, $\rho = 1,077$). После отмывки добавляли 1 мл среды RPMI-1640 с добавлением 2мМ L-глутамина, гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

Иммуноферментный анализ.

Определение количества специфических иммуноглобулинов классов IgM и IgG.

Антитела классов IgM и IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови определяли методом ИФА с помощью тест-систем «SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ», «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ», «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» (АО Вектор-Бест, Новосибирск, РФ), IgG-антитела к N-белку вируса SARS-CoV-2 с помощью тест-системы (N-CoV-2-IgG PS)» (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, РФ).

Определение специфических IgA и субклассов специфических IgG.

Специфические IgA к S-белку и субклассы специфических IgG к S- и N-белку вируса SARS-CoV-2 проводили по разработанной ранее модификации ИФА [Топтыгина А.П. с соавт., 2004]. Были использованы 96-луночные планшеты с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок рекомбинантным S-антигеном SARS-CoV-2 набора «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» и N-белком SARS-CoV-2 набора (N-CoV-2-IgG PS)». В качестве конъюгатов использовали меченные пероксидазой моноклональные антитела к IgA (клон 14A/1H9) или к IgG1 (клон 10G/2C11), IgG2 (клон 23G/3C7), IgG3 (клон 22G/5G12) и IgG4 (клон 20G/5C7) (Полигност, Санкт Петербург, РФ) в концентрации 1 мкг/мл. Результат при определении субклассов IgG выражали в процентах от общего специфического IgG.

Определение индекса avidности специфических антител.

Индекс avidности анти-S-IgG определяли по отработанной нами методике, добавляя сыворотку в лунки двух соседних стрипов тест-системы «SARS-CoV-2-IgG-количественный-ИФА-Бест», дополнительно инкубировали стрипы с добавлением 6М раствора мочевины, 10 мин при комнатной температуре, или без такового. Индекс avidности анти-S-IgG оценивали по проценту диссоциации комплекса антиген-антитело образцов, обработанных 6М мочевиной. Разделение гуморального иммунного ответа на первичный и вторичный проводили по спектру субклассов IgG и индексу avidности анти-S-IgG.

Определение специфического клеточного иммунитета к S- и N-белку SARS-CoV-2 с помощью антиген-индуцированной дегрануляции цитотоксических Т-клеток. Мононуклеары в количестве $2,5 \times 10^5$ добавляли в лунки 96-луночной стерильной панели (Nunc, Дания), вносили раствор моненсина в конечной концентрации 10 мкМ, моноклональные антитела к антигену CD107a-PE-Cy5 в разведении 1:100 (отрицательный контроль). Клетки опытной пробы стимулировали S- и N-антигенами SARS-CoV-2, сорбированными на лунках панелей наборов «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» и «N-CoV-2 IgG PS», инкубировали 20 часов при 37°C во влажной атмосфере и 5% CO₂ с последующей отмывкой и окрашиванием антителами к антигену CD8-FITC. Иммунофенотипирование проводили на проточном цитометре BD FACS CantoII (Becton Dickinson, США) с выделением лимфоидного гейта лимфоцитов CD8 (CD8^{high}) и подсчитывали процент клеток CD8^{high}CD107a⁺, распознавших антигены SARS-CoV-2 и ответивших на это распознавание цитотоксической атакой.

Определение клеточного иммунитета методом ELISpot. Для оценки продукции мононуклеарами крови IFN-γ применяли две модификации метода ELISpot.

В первом случае мононуклеары крови стимулировали S-белком, сорбированным на лунках панели набора «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» 4 часа при 37°C во влажной атмосфере и 5% CO₂, после инкубации переносили в лунки ELISpot-набора («Human IFN-γ ELISpot», Mabtech, Швеция), следующие этапы проводились в соответствии с инструкцией к набору до появления пятен-клеток продуцентов IFN-γ.

Во втором случае моноклеары стимулировали пептидами S- и N-белков SARS-CoV-2 набора Corona-T-test (ФГБУ «НМИЦ гематологии», Россия) 20 часов при 37°C во влажной атмосфере и 5% CO₂, следующие этапы проводились в соответствии с инструкцией к набору до появления пятен-клеток продуцентов IFN-γ. Подсчет пятен проводили на автоматизированном ELISpot-ридере AID (AID GmbH, Германия).

Методы математической обработки полученных результатов. Полученные результаты были исследованы на предмет соответствия нормальному распределению методом Колмогорова-Смирнова. В случае соответствия нормальному распределению использовали параметрическую статистику с вычислением среднего арифметического и стандартной ошибки ($M \pm SE$). При несоответствии распределения параметра нормальному применяли непараметрическую статистику с вычислением медианы, первой и третьей квартили (Me (LQ-HQ)). Для сравнения групп использовали t-критерий (параметрическая статистика) или тест Манна-Уитни (непараметрическая статистика). Различия при $p < 0,05$ расценивали как значимые. Корреляции рассчитывали методом Пирсона. Для выяснения информативности выявленных параметров и для вычисления уровня пороговых значений показателей (cut-off) использовали метод построения ROC-кривых. Рассчитывали площади под ROC-кривыми, значимость, чувствительность, специфичность и значение cut-off. Моделирование процессов изменения уровня IgG-антител к S- и N-белку вируса SARS-CoV-2 в зависимости от времени от начала заболевания проводили путем аппроксимации полученных результатов с помощью распределений Эрланга и Фишера. Расчеты проводились с использованием компьютерных программ «Statgraf», «Microsoft Office Excel 16», «SPSS 16.0» и «Statistica 6.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование гуморального и клеточного иммунного ответа к N- и S-белку вируса SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19. IgM-антитела к антигенам SARS-CoV-2 обнаружены у 59 из 84 (70,2%) участников исследования, перенесших COVID-19 в легкой и среднетяжелой форме, спустя 2 месяца после инфекции, с последующим снижением IgM с уровня $3,7 \pm 0,35$ КП до неопределяемого в течение 12 месяцев наблюдения. Другими исследователями получены похожие результаты [Guo L. et al., 2020; Han J. et al., 2022; Pušnik J. et al., 2022].

Наши исследования были начаты до появления единого стандарта [NIBSC code: 20/136, 2021], поэтому анти-S-IgA и анти-S-IgG ранних реконвалесцентов COVID-19 были измерены полуколичественным методом, в коэффициентах позитивности, с последующим ретестированием и выражением в ВАУ/мл. Поперечное исследование уровня IgG к S-белку SARS-CoV-2 сыворотки крови 88 реконвалесцентов COVID-19 (1-3 месяца после заболевания, вызванного уханьским штаммом) позволило поделить их на группу с высоким уровнем антител – 50 человек (57%), средний уровень IgG-антител $27,39 \pm 2,25$, и группу с низким уровнем антител – 38 человек (43%), уровень IgG-антител $4,46 \pm 0,53$ КП. Разделение проведено по уровню анти-S-IgG 10 единиц КП, или 1724 (1094-1988) и 355

(188-481) ВАУ/мл соответственно. Robbiani et al. (2020) также выявили высокий и низкий уровень гуморального ответа у переболевших. Защитным уровнем IgG-антител до появления штамма Омикрон считали 150 ВАУ/мл. Для анти-S-IgA средний уровень в группе высокого гуморального ответа составил $15,09 \pm 1,95$ и $6,94 \pm 0,67$ КП в группе низкого ответа. Вероятно, сила гуморального ответа на вирус определяется особенностями иммунной системы индивидуума, и, в частности, системы HLA [Rottmayer K. et al., 2023]. Не было обнаружено корреляции между временем, прошедшим после заболевания, его тяжестью и уровнем гуморального иммунитета. В работе Feng C. с соавторами (2021) также показано, что уровень IgA и IgG не зависел от тяжести заболевания COVID-19. Индекс авидности анти-S-IgG у ранних реконвалесцентов COVID-19 в нашей работе был низким ($29,7 \pm 1,59\%$), что совпадает с данными других исследователей [Pichler D. et al., 2021]. Спектр субклассов IgG-антител к S-белку был представлен анти-S-IgG1 (преобладал и нарастал во времени) и IgG3 (снижался со временем). Не обнаружено антител субклассов IgG2 и IgG4, специфичных к S-белку вируса SARS-CoV-2.

Как спонтанный, так и индуцированный S-белком уровень экспрессии CD107a на CD8^{high}-лимфоцитах, в группе здоровых обследуемых, не болевших COVID-19, оказались ниже cut-off, не более 1%. Рассчитанный cut-off составил 6% CD8^{high}CD107a⁺ и позволил разделить пациентов на 2 равные группы, по 44 человека с высоким ($11,23 \pm 0,72\%$) и низким ($3,85 \pm 0,36\%$) уровнем специфического клеточного ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2. Подобные результаты получили Stephens DS et al. (2020). На рисунке 1 сопоставлены уровни специфического гуморального, анти-S-IgG, анти-S-IgA, и клеточного CD8^{high}CD107a⁺ иммунных ответов. Были выделены группы высокого гуморального и клеточного ответа – 28 (32%), низкого гуморального и клеточного – 22 (25%), высокого гуморального и низкого клеточного – 22 (25%) и низкого гуморального и клеточного ответа – 16 (18%) переболевших, что свидетельствует о независимости формирования гуморального и клеточного иммунного ответа на антигены вируса SARS-CoV-2.

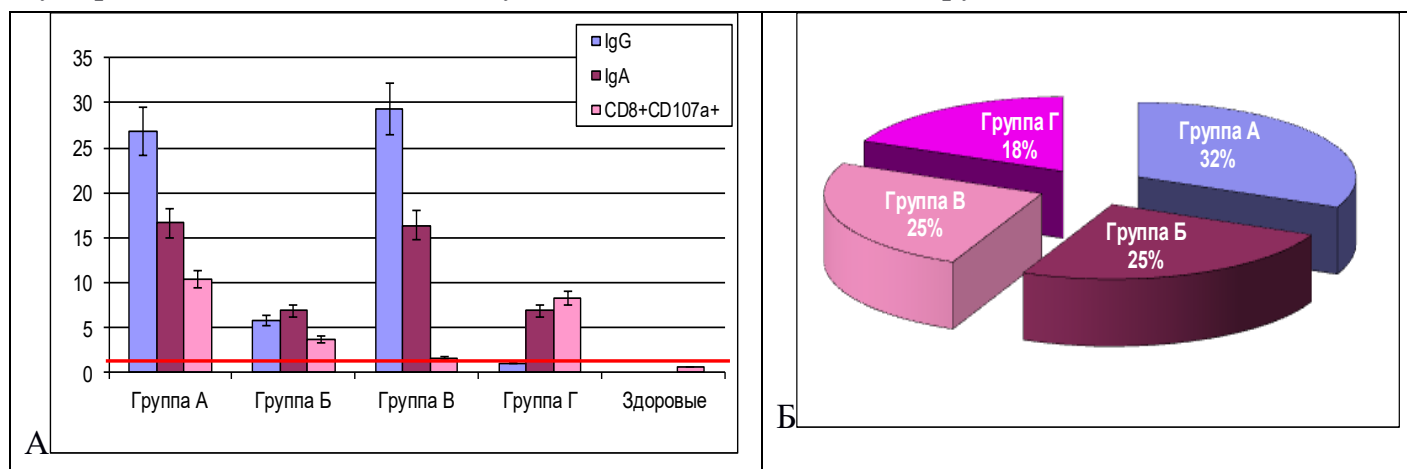


Рисунок 1 – Сопоставление гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 после заболевания COVID-19

Примечание А – 4 группы соотношения гуморального и клеточного иммунитета;

Б – распределение переболевших COVID-19 по соотношению уровней гуморального и клеточного иммунитета к S-антигену вируса SARS-CoV-2.

Формирование гуморального и клеточного ответа после вакцинации от COVID-19. У 30 дважды привитых вакциной «Спутник V», через 3 месяца после второй прививки в 100% случаев был выявлен гуморальный и клеточный ответ на антигены S-белка SARS-CoV-2. Уровень IgG был сопоставим с таковым у переболевших COVID-19, привитые имели более низкий уровень анти-S IgA, что связано с различиями в дозе и путях поступления антигена в организм человека. У 5 человек (16,7%) были выявлены анти-S IgM-антитела с КП $2,16 \pm 0,22$. Оценка уровней ответа анти-S-IgG и анти-S-IgA выявила группу с высоким уровнем ответа 16 человек (53,3%), $1563 (1199-1819)$ BAU/мл и $4,04 \pm 0,63$ КП, и группу 14 человек (46,7%) с низким уровнем ответа антител, $432 (245-523)$ BAU/мл и $1,2 \pm 0,52$ КП, соответственно. Похожие результаты были получены другими авторами [Чистякова ГН с соавт., 2022; Astakhova EA. et al., 2022]. Поствакцинальный иммунный ответ, как и постинфекционный, был представлен только субклассами анти-S IgG1 и IgG3, индекс авидности, как и у переболевших, был низким, $32,5 \pm 1,39\%$. На рисунке 2 представлено соотношение гуморального и клеточного иммунитета к S-белку у привитых вакциной «Спутник V». По проценту $CD8^{hi}CD107a^{+}$ -лимфоцитов, ответивших на S-белок у дважды привитых вакциной «Спутник V», выделена группа 17 человек (56,7%) с высоким, $11,77 \pm 1,01\%$, и низким 13 человек (43,3%), $3,31 \pm 0,37\%$, уровнями ответа. При сопоставлении гуморального и клеточного иммунного ответов дважды привитых вакциной «Спутник V», как и переболевших COVID-19, удалось разделить на 4 группы с высоким гуморальным и клеточным ответом (26,7%), с низким гуморальным и клеточным ответом (16,6%), с высоким гуморальным и низким клеточным (26,7%), с низким гуморальным и высоким клеточным ответом (30%). Это подтверждает гипотезу о независимости формирования гуморального и клеточного иммунитета друг от друга.

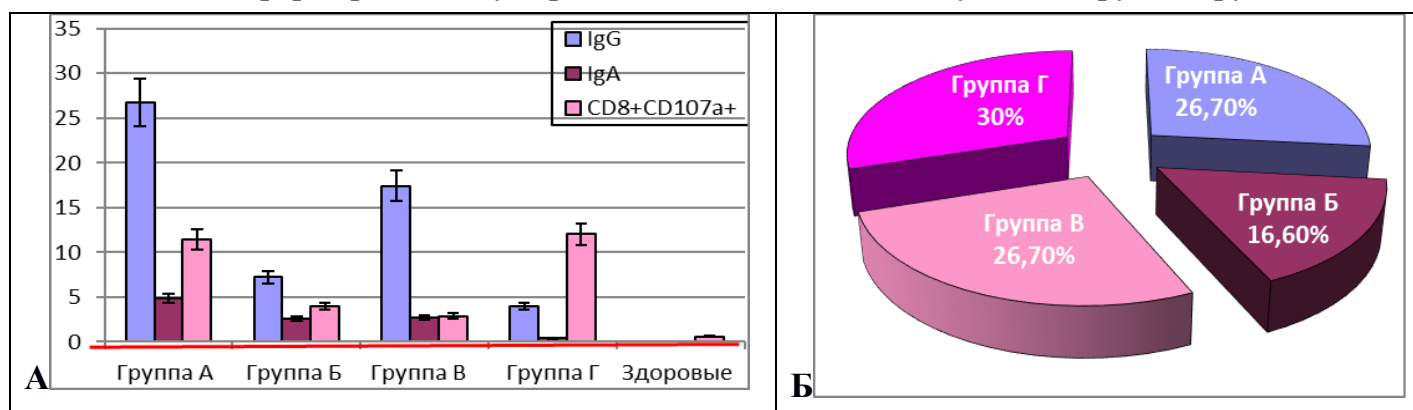


Рисунок 2 – Сопоставление гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 у привитых вакциной «Спутник V»

Примечание А – 4 группы соотношения гуморального и клеточного иммунитета Б – распределение привитых от COVID-19 по соотношению уровней гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2.

Динамика изменений параметров иммунитета у переболевших и привитых к S-белку вируса SARS-CoV-2 с течением времени (до появления штамма Омикрон). Продольное исследование в течение 15 мес. 38 переболевших (рисунок 3) показало

быстрое снижение уровня анти-S IgG в группе с высоким уровнем ответа, средний уровень 1592 (1175–1862) BAU/мл., 23 человека (60,5%), с выходом на плато на сроке 9 мес. В группе с низким уровнем ответа, 15 человек (39,5%), средний уровень анти-S IgG 366 (284–467) BAU/мл, отмечалась та же тенденция, но не ниже 150 BAU/мл. Индекс avidности анти-S IgG вырос до $50,88 \pm 1,52\%$ в течение года, превысив рассчитанный нами cut off = 48,5%, что говорит о созревании гуморального ответа. Клеточный иммунитет (процент $CD8^{hi}CD107a^{+}$) сохранялся в обеих группах на одном уровне, в то время как уровни анти-S IgG и анти-S IgA у тех же людей за это время значительно снизились.

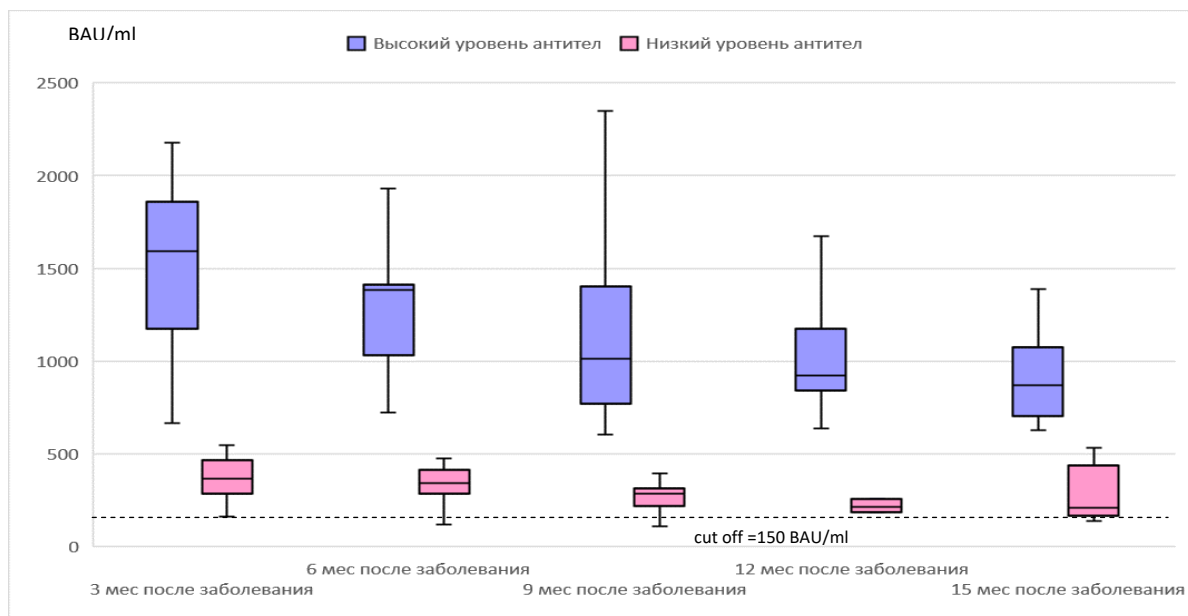


Рисунок 3 – Изменение уровня IgG-антител в зависимости от времени, прошедшего после заболевания

Продольное исследование ответа анти-S IgG 30 дважды привитых вакциной «Спутник V», не болевших ранее COVID-19, на сроках от 3 до 12 месяцев от второй прививки, показало аналогичную тенденцию изменения уровня антител в зависимости от времени, прошедшего после вакцинации, что и у перенесших COVID-19 (рисунок 4).

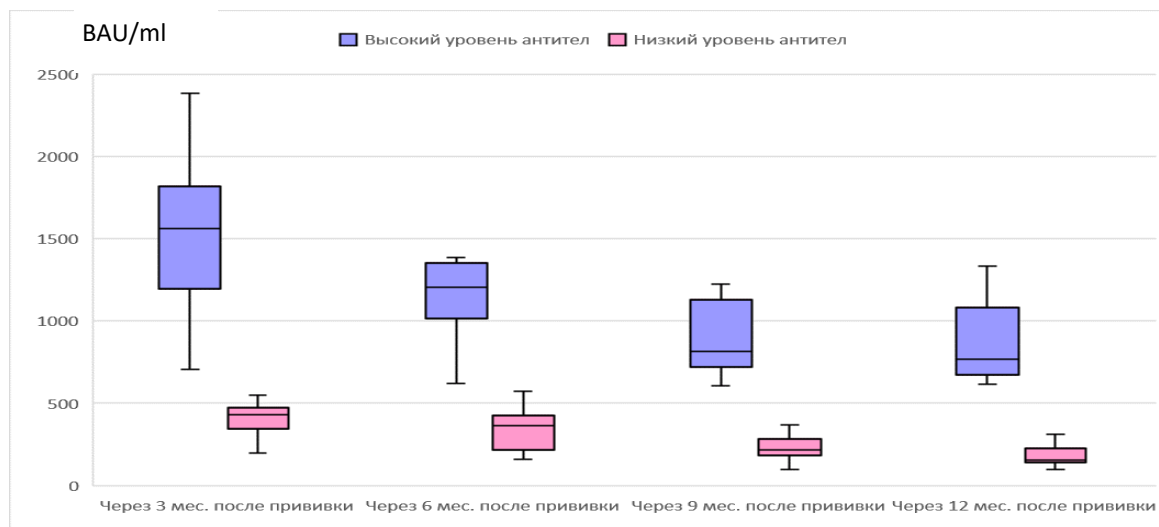


Рисунок 4 – Изменение уровня IgG-антител в зависимости от времени, прошедшего после вакцинации «Спутник V»

Уровень анти-S IgG оставался не ниже защитного в группах с высоким и низким уровнем антител в 150 ВАУ/мл, индекс авидности постепенно нарастал до $47,3 \pm 1,42\%$ в течение года наблюдения. Процент $CD8^{high}CD107a^{+}$ в группе с высоким уровнем клеточного ответа снижался в течение года после вакцинации с $11,77 \pm 1,01\%$ через 3 мес. после вакцинации до $7,67 \pm 0,80\%$ через 12 мес., тогда как в группе с низким клеточным ответом практически не менялся, оставаясь выше отметки cut-off в 1% у 100% привитых вакциной «Спутник V» в обеих группах.

Динамика изменений параметров адаптивного иммунитета к S-белку при бустировании за счет вакцинации или повторного заболевания COVID-19. В таблице 1 представлены результаты сопоставления уровней гуморального и клеточного иммунного ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2 до ревакцинации и спустя 3 месяца у 23 ревакцинированных вакциной «Спутник Лайт». Анти-S-IgM не обнаружены ни у одного из них. Ревакцинация послужила бустером и привела к значимому приросту уровня анти-S IgG, их индекса авидности до $67,6 \pm 2,7\%$ и процента $CD8^{hi}CD107a^{+}$ в группах высокого и низкого гуморального и клеточного ответов.

Таблица 1 – Гуморальный и клеточный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2 до и после ревакцинации вакциной «Спутник V»

	IgG-антитела к S-белку вируса SARS-CoV-2, ВАУ/мл (Me(LQ-HQ))		Клеточный иммунитет (процент $CD8^{hi}CD107a^{+}$ от $CD8^{hi}$) к S-белку вируса SARS-CoV-2, % (M $\pm$ SE)	
	До ревакцинации	Через 3 мес. после ревакцинации	До ревакцинации	Через 3 мес. после ревакцинации
Высокий уровень	671 (336-1134)	1368,45 (930,51-1640,23) [#]	$7,67 \pm 0,80$	$10,98 \pm 0,97^{\#}$
Низкий уровень	156 (112,3-328,5)*	476,35 (283,65-963,50) ^{#*}	$3,24 \pm 0,33^{*}$	$5,19 \pm 0,41^{\#*}$

Примечание: [#] $p < 0,05$ по сравнению с уровнем до ревакцинации; * $p < 0,05$ по сравнению с высоким уровнем

Спустя год после перенесенного COVID-19 27 участников исследования были дважды привиты вакциной «Спутник V», составив группу гибридного иммунитета (таблица 2). У этих лиц первичный иммунный ответ возник на уханьский штамм вируса SARS-CoV-2, а вторичный иммунный ответ – на вакцину.

Таблица 2 – Сопоставление поствакцинального, постинфекционного и гибридного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2

	IgG-антитела к S-белку вируса SARS-CoV-2, ВАУ/мл (Me(LQ-HQ))	Индекс авидности антител к S-белку вируса SARS-CoV-2, % (M $\pm$ SE)	Клеточный иммунитет (процент $CD8^{hi}CD107a^{+}$ от $CD8^{hi}$) к S-белку вируса SARS-CoV-2, % (M $\pm$ SE)
Поствакцинальный иммунитет (n=30)	707,73 (585,10-932,33)	$47,30 \pm 1,42$	$7,77 \pm 0,68$
Постинфекционный иммунитет (n=27)	972,58 (612,51-1384,37)	$50,20 \pm 2,12$	$8,19 \pm 0,73$
Гибридный иммунитет (n=27)	1218,21 (724,50-2212,43)*	$69,85 \pm 3,47^{*}$	$9,94 \pm 0,75^{*}$

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с постинфекционным и поствакцинальным иммунитетом

Сопоставление результатов исследования поствакцинального, постинфекционного и гибридного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 показало значимо более высокий уровень анти-S-IgG, их индекса авидности и клеточного иммунного ответа, у группы гибридного иммунитета.

Большое количество мутаций в S-белке штамма Омикрон в 2022 году привело к прорыву сформированного ранее иммунитета, как поствакцинального, так и постинфекционного (таблица 3). При сопоставлении результатов исследования группы постинфекционного и прорывного (32 человека, повторно перенесших COVID-19 в феврале-марте 2022 года) иммунитета выявлен значимый прирост уровня анти-S IgG, индекса авидности, что подтверждает продолжающиеся гипермутации Fab-фрагментов антител в зародышевых центрах и формирование новых долгоживущих плазмоцитов. Прирост процента $CD8^{hi}CD107a^{+}$, ответивших на распознавание S-белка вируса, можно объяснить формированием дополнительных $CD8^{hi}$ цитотоксических Т-лимфоцитов к новым эпитопам S-белка.

Таблица 3 – Сопоставление постинфекционного и прорывного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2

	IgG-антитела к S-белку вируса SARS-CoV-2, BAU/мл (Me(LQ-HQ))	Индекс авидности антител к S-белку вируса SARS-CoV-2, % (M $\pm$ SE)	Клеточный иммунитет (процент $CD8^{hi}CD107a^{+}$ от $CD8^{hi}$) к S-белку вируса SARS-CoV-2, % (M $\pm$ SE)
Постинфекционный иммунитет (n=32)	719,57 (407,51-961,73)	50,1 $\pm$ 2,21	8,38 $\pm$ 0,83
Прорывной иммунитет (n=32)	1601,22 (1011,93-2335,44)*	81,58 $\pm$ 3,41*	13,71 $\pm$ 1,07*

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с постинфекционным иммунитетом

Моделирование гуморального иммунного ответа на S- и N- белок вируса SARS-CoV-2. Среди белков коронавируса самыми иммуногенными являются S- и N-белок. У 27 человек, переболевших COVID-19 был определен уровень анти-S и анти-N IgG в сыворотке крови от 4 до 7 раз за период от 1 до 15 месяцев от начала заболевания. Сопоставление динамики развития гуморального ответа на S- и N-белок SARS-CoV-2 обнаружило различия (рисунок 5). Уровни анти-N-IgG быстро нарастали, доходили до пика своей концентрации к 3 месяцам наблюдения после COVID-19, резко снижались в течение года, и к 15 месяцам наблюдения их уровень был низким, но определяемым. Анти-S-IgG нарастали более плавно, с максимумом к 4 месяцам, и сохранялись на одном уровне до года наблюдения. Затем они постепенно снижались, оставаясь выше защитного уровня на сроке до 15 месяцев. Динамика уровней анти-S-IgG является результатом двух процессов: синтеза ранних анти-S IgG короткоживущими плазмоцитами и поздних анти-S IgG долгоживущими плазмоцитами. Короткоживущие плазмоциты обеспечивают быстрый рост уровней анти-N-IgG и ранних анти-S-IgG во времени, а из апоптоз - быстрое снижению концентрации анти-N-IgG. Эти процессы хорошо описывает распределение

Фишера. Долгоживущие плазмциты формируются в зародышевых центрах и синтезируют пул поздних анти-S-IgG, выявляемых в крови до 1,5 лет наблюдения. Формирование и апоптоз долгоживущих плазмцитов хорошо описывает распределение Эрланга.

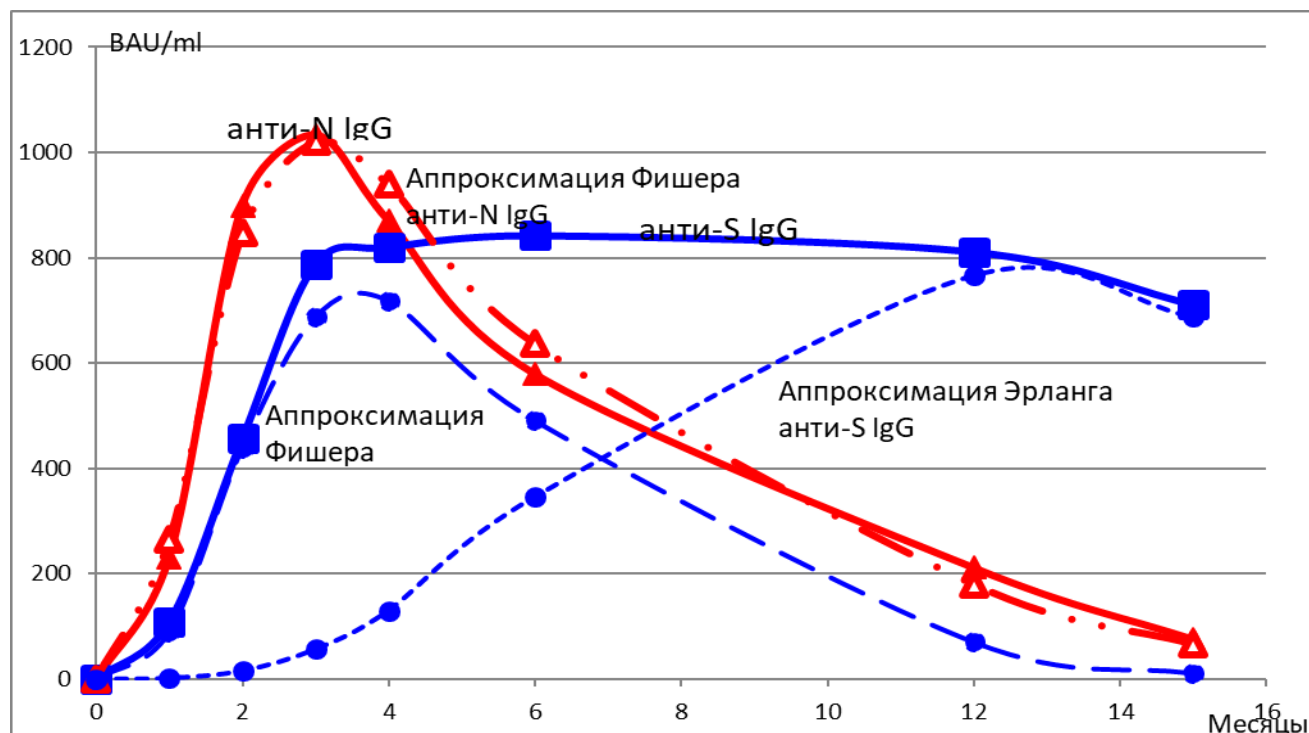


Рисунок 5 – Уровень IgG-антител к антигенам вируса SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19

Примечание:

Сплошная красная линия – анти-N-IgG, экспериментальные данные

Сплошная синяя линия – анти-S-IgG, экспериментальные данные

Штриховая красная линия – аппроксимация Фишера уровня анти-N-IgG,

Штриховая синяя линия – аппроксимация Фишера уровня анти-S-IgG

Пунктирная синяя линия – аппроксимация Эрланга уровня анти-S-IgG,

Рассчитаны формулы, описывающие изменение концентрации анти-N и анти-S IgG-антител во времени, с помощью которых проведена экстраполяция динамики антител к антигенам SARS-CoV-2. При отсутствии бустирования через 2 года после перенесенного COVID-19 уровень антител снизился бы до 300 BAU/мл, а за 4 года наблюдения – до уровня менее 10 BAU/мл, что совпадает с наблюдениями за антителами против SARS-CoV-1 и MERS [Alhabbab RY, 2023].

Известно, что короткоживущие плазмциты синтезируют преимущественно антитела IgG3, а долгоживущие – антитела IgG1 субкласса. Созревание ответа антител на N- и S-белок вируса имеет отличия. В спектре анти-N IgG представлены все субклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, с превалированием IgG3, субклассы IgG2 и IgG4 – минорные. Спектр анти-S IgG представлен только субклассами IgG1 и IgG3, с преобладанием антител IgG1 субкласса, с полным замещением антител IgG3 субкласса на IgG1 к году наблюдения (таблица 4). Анти-S IgG являются защитными в отличие от анти-N IgG. Возможно, эти различия - причина разной кинетики ответа анти-S-IgG и анти-N-IgG.

Таблица 4 – Изменение спектра субклассов IgG-антител к антигенам вируса SARS-CoV-2 в зависимости от времени после заболевания (% от общего уровня IgG-антител, специфичных к N- и S-белку коронавируса) (M±SE)

	N-белок				S-белок			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
1 мес	35,2±1,73	3,2±0,15	57,8±2,83	3,8±0,20	54,6±4,23	0	45,4±3,98	0
2 мес	60,5±2,98	3,5±0,17	32,2±1,77	3,8±0,19	83,0±3,78	0	17,0±2,26	0
3 мес	63,5±3,27	3,3±0,16	29,7±1,53	3,5±0,17	92,5±2,21	0	7,5±1,81	0
4 мес	65,88±3,31	3,0±0,15	28,22±1,49	2,9±0,17	95,3±1,18	0	4,7±0,99	0
6 мес	68,35±3,45	2,3±0,14	26,65±1,37	2,7±0,15	97,4±1,1	0	2,6±0,73	0
12 мес	71,38±3,68	2,4±0,13	23,62±1,34	2,6±0,13	100	0	0	0
15мес	72,88±3,71	2,3±0,15	22,32±1,26	2,5±0,14	100	0	0	0

Сопоставление иммунного ответа на S- и N- белок вируса SARS-CoV-2. Сопоставлены иммунные ответы на S- и N- белок вируса SARS-CoV-2 (рисунок 6) через 3 месяца от момента начала COVID-19 у группы 1 (постинфекционный иммунитет, 27 чел.), через 3 месяца после второй дозы вакцины «Спутник V» у группы 2 дважды привитых (поствакцинальный иммунитет, 23 чел.), у группы 3 перенесших COVID-19, затем вакцинированных вакциной «Спутник V» (гибридный иммунитет, 22 чел.) и через 3 месяца от момента повторного заболевания, вызванного штаммом Омикрон у группы 4 перенесших первично COVID-19 в 2020-2021 годах (прорывной иммунитет, 25 чел.).

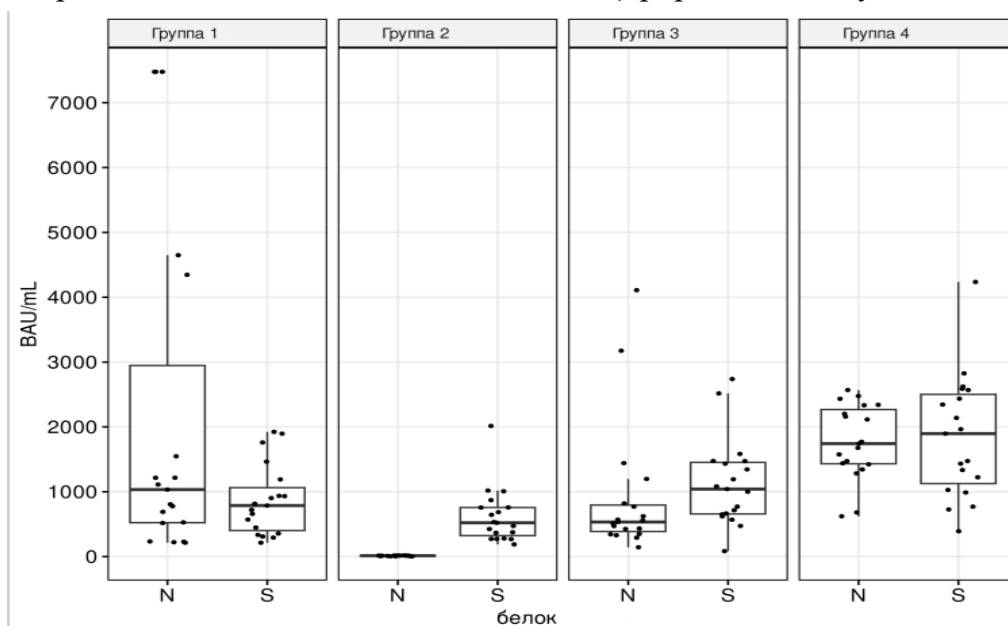


Рисунок 6 – Сопоставление уровней IgG антител к N- и S-белку

Анти-N-IgG не обнаружены в группе 2 в связи с отсутствием N-белка в составе вакцины «Спутник V». Уровни анти-S-IgG у лиц, имевших первый контакт с вирусом в виде естественной инфекции и вакцинации, значимо не отличались. Вакцинация после первичного COVID-19 привела к значимому ($p=0,004$) приросту уровней анти-S-IgG. Повторная инфекция, вызванная штаммом Омикрон, вызвала значимый прирост ответов как анти-S-IgG ($p=0,0006$), так и анти-N-IgG ($p=0,042$) в сравнении с группой 1. Процент

цитотоксических $CD8^{high}CD107a^{+}$ Т-лимфоцитов, ответивших на распознавание S-белка вируса SARS-CoV-2, не имел значимых различий по группам. В группе 2 поствакцинального иммунитета у 17 человек ожидаемо не было клеточных ответов на N-белок, у 6 человек выявлены высокие клеточные ответы на него ($5,94 \pm 2,3\%$) при отсутствии анти-N-IgG и анти-S-IgG до вакцинации у всех членов этой группы, что может быть связано с бессимптомным заболеванием COVID-19 после вакцинации или ранее перенесенным заболеванием простудным коронавирусом.

Сопоставление разных методов оценки клеточного иммунного ответа на антигены вируса SARS-CoV-2. До сих пор не существует единого, признанного стандартным, метода оценки специфического клеточного ответа против вируса SARS-CoV-2, доступного и воспроизводимого в рутинной работе лабораторий. Были сопоставлены два способа оценки Т-клеточного ответа методом ELISpot по продукции IFN- γ мононуклеарами, стимулированными в первом способе полноразмерным S-белком вируса SARS-CoV-2, во втором – смесью пептидов вируса, отличавшихся своей консервативностью и иммуногенностью и результаты оценки по проценту $CD8^{hi}CD107a^{+}$. Различий между уровнями клеточного иммунитета, оцененного как $CD8^{hi}CD107a^{+}$, так и по количеству пятен в группах с постинфекционным, поствакцинальным и гибридным иммунитетом выявлено не было, а по продукции IFN- γ группа с гибридным иммунитетом значимо отличалась ($317,29 \pm 19,04$ пг/мл) от групп с постинфекционным и поствакцинальным иммунитетом $454,95 \pm 20,32$ и $470,77 \pm 26,24$ пг/мл, соответственно ($p = 0,048$). Обнаружено значимое снижение количества пятен в группе с прорывным иммунитетом $30,59 \pm 2,29$ против $58,97 \pm 4,47$ в группе с гибридным иммунитетом ($p = 0,0034$). Не выявлено корреляций между уровнями клеточного иммунного ответа, измеренного тремя способами, за исключением умеренной положительной корреляции ($r = 0,341$) между относительным количеством пятен, индуцированных пептидным комплексом и полноразмерным S-белком. Обнаружена сильная положительная корреляционная связь между количеством пятен и уровнем продукции IFN- γ при стимуляции полноразмерным S-белком ($r = 0,79$) и очень сильная положительная корреляция при стимуляции пептидным комплексом ($r = 0,95$). При оценке клеточного иммунитета методом ELISpot выявляется суммарный эффект, поскольку IFN- γ синтезируют Th1-хелперы, цитотоксические $CD8^{+}$ лимфоциты, NK-, NKT-клетки и $\gamma\delta$ -Т клетки. При этом NK, NKT-клетки и $\gamma\delta$ -Т клетки, по-видимому, являются спонтанными продуцентами IFN- γ , тогда как Th1-хелперы и цитотоксические $CD8^{+}$ лимфоциты способны распознать антигенные детерминанты S-белка коронавируса и являются индуцированными продуцентами IFN- γ [Moss P., 2022], а при оценке по экспрессии $CD8^{hi}CD107a^{+}$ выявляются именно цитотоксические Т-лимфоциты, распознавшие S-белок вируса и ответившие цитотоксической атакой.

Динамика ответов анти-N-IgG и анти-S-IgG в течение 4-х лет исследования. Уровень анти-S-IgG в период от 6 до 12 месяцев после COVID-19, вызванного уханьским штаммом SARS-CoV-2, сохранялся в пределах 700-900 BAU/мл, а уровень анти-N-IgG

снижался с 1112 (748-5268) до 291 (199-819) BAU/мл (рисунок 7). Повторный COVID-19, вызванный штаммом Омикрон, привел к повышению концентрации как анти-S-IgG до 1524 (725-2213) BAU/мл, так и анти-N-IgG до 3117 (575-7119) BAU/мл на сроке 1,5 года.

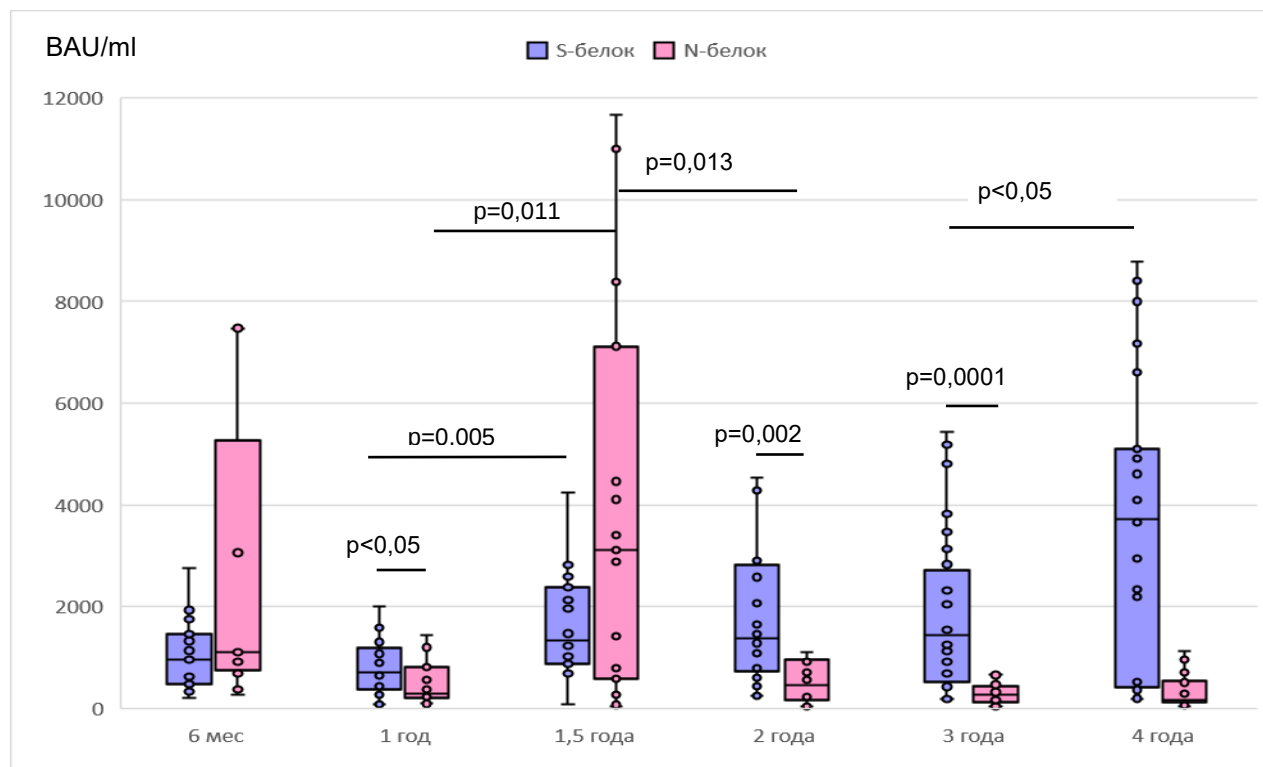


Рисунок 7 – Изменение уровней IgG-антител в зависимости от времени после заболевания

За последующие 6 месяцев наблюдения уровень анти-N-IgG показал быстрое снижение до 454 (162-950) BAU/мл и еще через год составил 267 (126-441) BAU/мл, а через 4 года – 163 (102-406) BAU/мл. Концентрация анти-S-IgG держалась на высоком уровне 1572 (784-2819) BAU/мл на сроке 2 года и 1569 (751-2719) BAU/мл на сроке 3 года и значительно приросла через 4 года до 3721 (416-5095) BAU/мл. Индекс avidности антител нарастал до 74,41 (66,51-85,88)% после повторного заболевания COVID-19 и достиг 83,11 (66,81-92,68)% через 4 года после первого COVID-19. Динамика ответов анти-S-IgA имела сходство с ответами антител против N-белка вируса. После повторной инфекции штаммом Омикрон среди анти-N антител субкласс IgG1 стал преобладающим, что характерно для их синтеза долгоживущими плазмócитами. Это говорит о формировании вторичного иммунного ответа на антигены N-белка (таблица 5). Однако в точке наблюдения 2 года, снова начал прирастать процент анти-N IgG3, что можно объяснить гибелью ранее сформированных короткоживущих плазмócитов и образованием новых.

Изменения во времени спектра субклассов анти-S-IgG отличались. В 1 год после первичного COVID-19 100% анти-S-IgG было представлено субклассом IgG1. Инфекция, вызванная штаммом Омикрон, привела к появлению в спектре ответов антител на S-белок вируса анти-S-IgG3, что говорит о формировании первичных иммунных ответов на мутировавшие эпитопы S-белка вируса. Анти-S-IgG1 оставались преобладающими, составив 92% от общего уровня анти-S-IgG в точке наблюдения 4 года.

Таблица 5 – Динамика спектра субклассов IgG к S- и N-белку SARS-CoV-2 во времени после заболевания (% от общего уровня IgG к этим белкам) (M±SE)

	N-белок				S-белок			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
6 мес.	68,35±3,45	2,3±0,14	26,65±1,37	2,7±0,15	97,4±1,1	0	2,6±0,73	0
1 год	71,38±3,68	2,4±0,13	23,62±1,34	2,6±0,13	100	0	0	0
1,5 года	83,37 ±3,94	0,6 ±0,02	14,03 ±1,15	2 ±0,18	74,44 ±2,78	5,52 ±0,87	9,36 ±1,26	10,68 ±0,93
2 года	55,35 ±2,73	0,58 ±0,10	42,43 ±1,17	1,64 ±0,12	77,54 ±2,15	4,42 ±0,68	12,36 ±1,47	5,68 ±0,65
2,5 года	41,61 ±2,12	0,61 ±0,11	55,23 ±2,84	2,55 ±0,25	69,76 ±2,07	3,04 ±0,35	20,61 ±1,88	6,59 ±0,84
3 года	48,42 ±2,29	0,85 ±0,23	48,03 ±2,26	2,7 ±0,23	73,7 ±2,95	0,65 ±0,11	22,73 ±1,87	2,92 ±0,27
4 года	86,35 ±2,95	0,53 ±0,10	11,02 ±0,97	2,1 ±0,17	91,9 ± 2,18	1,4 ± 0,27	3,2 ± 0,31	3,5 ± 0,33

Динамика клеточного иммунного ответа на антигены S- и N-белка SARS-CoV-2 у переболевших отличалась (рисунок 8). Спустя 6 месяцев после первичного COVID-19 уровень $CD8^{hi}CD107a^{+}$, распознавших антигены N-белка, составил 15,49 (7,39-18,76)%, снижаясь на протяжении последующих 2,5 лет до 5,55 (3,60-12,75)% в точке наблюдения 3 года. Ответ $CD8^{hi}CD107a^{+}$ на антигены S-белка на сроке 6 месяцев после первичного COVID-19 составил 5,81 (2,11-6,86)%, был значительно ниже уровня клеточного иммунного ответа на антигены N-белка. В точке наблюдения 1,5 года после повторного COVID-19, вызванного штаммом Омикрон, уровень ответа $CD8^{hi}CD107a^{+}$ на S-белок вырос до 13,59 (4,52-17,54)%, снизившись через полгода до 8,79 (4,02-15,59)%. Несмотря на продолжающиеся мутации вируса SARS-CoV-2 и контакты с ними обследуемых, уровень клеточных ответов Т-лимфоцитов как на N-белок, так и на S-белок постепенно снижался в последующие 2 года наблюдения, оставаясь выше уровня cut-off в течение 4 лет.

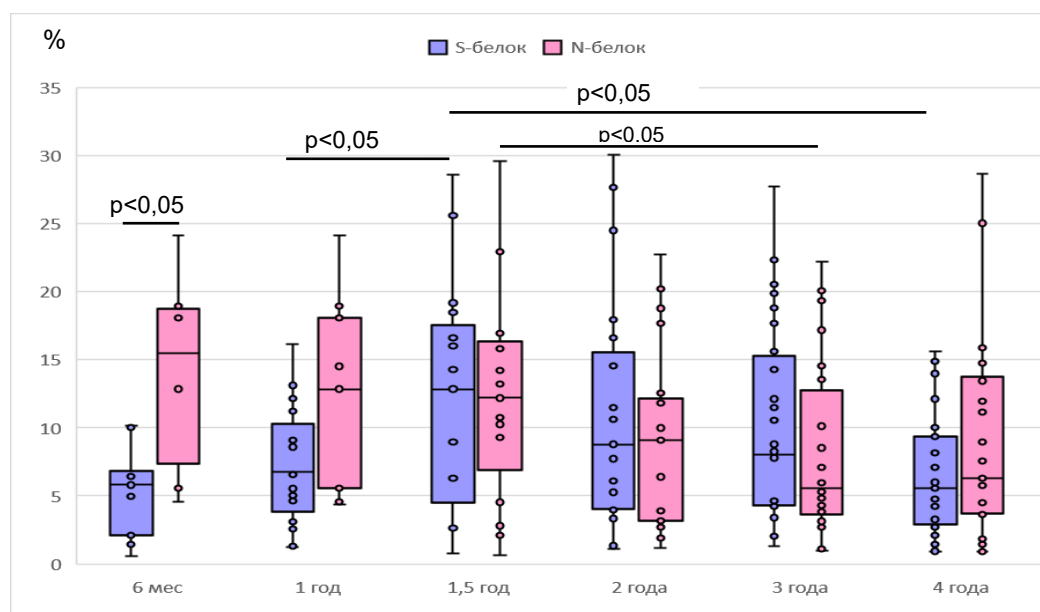


Рисунок 8 – Изменение уровней клеточного иммунного ответа на N- и S-белок вируса SARS-CoV-2 в зависимости от времени после заболевания

ВЫВОДЫ

1. У перенесших COVID-19 формируются антитела M, A и G классов к N- и S-белку SARS-CoV-2 разного уровня. Выявленный высокий или низкий тип гуморального иммунного ответа на S-белок не зависит от давности и тяжести перенесенного заболевания.
2. У переболевших COVID-19 формируется клеточный иммунитет на N- и S-белок SARS-CoV-2, определяемый как методом ELISpot, так и по экспрессии CD107a на CD8^{high} Т-лимфоцитах. Выявлено 4 варианта соотношения высокого и низкого уровней гуморального и клеточного иммунитета, что свидетельствует о независимости процессов формирования этих иммунных ответов.
3. У привитых вакциной «Спутник V» формируется гуморальный и клеточный иммунитет к S-белку SARS-CoV-2 разного уровня. Выявлено 4 варианта соотношения высокого и низкого уровней гуморального и клеточного иммунитета, сопоставимые с распределением таковых у переболевших COVID-19.
4. Динамика изменения во времени концентрации IgG-антител к N-белку в сыворотке крови аппроксимируется с помощью распределения Фишера, эти антитела синтезируют преимущественно короткоживущие плазмocyты. Динамика изменения во времени концентрации IgG-антител к S-белку в сыворотке крови является суммой двух процессов: синтеза ранних антител короткоживущими плазмocyтами, этот процесс аппроксимируется с помощью распределения Фишера, и синтеза антител долгоживущими плазмocyтами, который аппроксимируется с помощью распределения Эрланга.
5. С помощью математического моделирования рассчитаны сроки сохранения защитного уровня анти-S-IgG. При отсутствии бустирования через 2 года после перенесенного COVID-19 уровень антител снизился бы до 300 BAU/мл, а за 4 года наблюдения – до уровня менее 10 BAU/мл.
6. В условиях продолжающейся циркуляции вируса SARS-CoV-2 и постоянных мутаций в его S-белке, сопровождающихся прорывными инфекциями как у первично переболевших, так и у привитых против COVID-19, и гуморальный, и клеточный иммунитет к антигенам SARS-CoV-2 сохраняется на протяжении 4 лет наблюдения.
7. Повторные бустеры, как за счет ревакцинации, так и повторных встреч с активно мутирующим SARS-CoV-2, препятствуют снижению гуморального и клеточного иммунитета к N- и S-белку, однако динамика уровней иммунных ответов зависит от антигена (S- или N-белок), класса антител (IgG или IgA), индивидуальных особенностей реакций иммунной системы и количества бустеров у отдельных лиц.
8. Сохранение Т-клеточных ответов на высококонсервативный N-белок на протяжении 4 лет наблюдения выше уровня cut-off 1% позволяет предположить, что Т-клеточные ответы на N-белок со временем займут ведущее место в иммунной защите против инфекций, вызванных новыми мутантными вариантами вируса SARS-CoV-2.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью оценки силы гуморального ответа на S- и N-белок SARS-CoV-2 использовать рассчитанный нами пороговый критерий в 600 BAU/мл. Концентрацию IgG-антител ниже 600 BAU/мл оценивать как низкий уровень ответа, выше 600 BAU/мл – как высокий уровень ответа антител.
2. Использовать для описания динамики ответа анти-N-IgG и анти-S-IgG, синтезируемых короткоживущими плазмócитами, распределение Фишера, а динамики анти-S-IgG, синтезируемых долгоживущими плазмócитами, распределение Эрланга.
3. Рекомендовать разработанный метод оценки клеточного иммунитета к N-белку SARS-CoV-2 (Патент RU 2818080 C1 Российской Федерации), основанного на экспрессии CD107a на CD8^{high} Т-лимфоцитах, распознавших эпитопы N-белка, поскольку возможно формирование клеточного иммунного ответа на N-белок без сероконверсии, а ответы Т-клеток остаются стабильными в сравнении с ответом антител.
4. Оценивать силу клеточного иммунного ответа на S- и N-белок, используя полученное значение порогового разделяющего (cut-off) в 6%. Уровень клеточного ответа ниже 6% оценивать как низкий, выше 6% – как высокий.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В силу продолжающегося процесса формирования новых мутантных штаммов представляет интерес дальнейшее исследование эффективности защиты против новых антигенов вируса SARS-CoV-2 и продолжительности сохранения иммунологической памяти с целью оценки рисков эпидемических вспышек инфекции. Сформированный популяционный иммунитет ведет к выживанию штаммов вируса, способных уклониться от иммунных реакций. На данный момент заболевание имеет легкий или бессимптомный характер течения, тем не менее, продолжающийся мутационный процесс в S-белке вируса может привести к прорыву имеющейся иммунной защиты и вызвать тяжелые варианты течения. Имеющиеся в литературе сведения об изменениях в иммунном статусе перенесших COVID-19 делает актуальным исследования иммунитета в рамках постковидного синдрома.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в международных базах данных WoS, Scopus, RSCI:

1. Афридонова З.Э. Сопоставление гуморального и клеточного иммунитета у переболевших COVID-19 / А.П. Топтыгина, Е.Л. Семикина, Р.Ш. Закиров, З.Э. Афридонова // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т. 12. № 3. – С. 495-504. (ИФ РИНЦ – 0,676; K-1; IF Scopus – 1,4; IF Web of science – 0,4; Q-4; Белый список У3).
2. Афридонова З.Э. Поддержание иммунологической памяти к вирусу SARS-COV-2 в условиях пандемии / А.П. Топтыгина, З.Э. Афридонова, Р.Ш. Закиров, Е.Л. Семикина // Инфекция и иммунитет. – 2023. – Т. 13. № 1. – С. 55-66. (ИФ РИНЦ – 0,676; K-1; IF Scopus – 1,4; IF Web of science – 0,4; Q-4; Белый список У3).
3. Афридонова З.Э. Сопоставление разных методов оценки клеточного иммунитета к вирусу SARS-COV-2 / З.Э. Афридонова, А.П. Топтыгина, А.В. Боголюбова, Е.Л. Семикина

//Медицинская иммунология. – 2023. – Т. 25. № 6. – С. 1431-1440. (ИФ РИНЦ – 0,907; K-1; IF Scopus – 0,7; Q-4; Белый список У3).

4. Афридонова З.Э. Сохранение иммунологической памяти к антигенам SARS-COV-2. Три года наблюдения / З.Э. Афридонова, А.П. Топтыгина, Е.Л. Семикина // Инфекция и иммунитет. – 2024. – Т. 14. № 1. – С. 35-45. (ИФ РИНЦ – 0,676; K-1; IF Scopus – 1,4; IF Web of science – 0,4; Q-4; Белый список У3).

5. Afridonova Z.E. Humoral and cellular immune response to SARS-CoV-2 S and N proteins. / Z.E.Afridonova, A.P.Toptygina, I.S. Mikhailov // Biochemistry (Moscow). – 2024. – Vol. 89, No. 5. – pp. 872-882 (ИФ РИНЦ – 2,4; K-1; IF Scopus – 4,7; Q-3; Белый список У2).

Публикации в других изданиях:

1. Афридонова З.Э. Сопоставление специфического клеточного и гуморального иммунитета у привитых вакциной «Спутник V» / А.П.Топтыгина, З.Э. Афридонова // Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы. Москва. – 2021. – С. 73.

2. Афридонова З.Э. Гуморальный и клеточный иммунитет у перенесших COVID-19. / А.П. Топтыгина, З.Э. Афридонова // Сборник тезисов II Международной научно-практической конференции по вопросам противодействия новой коронавирусной инфекции и другим инфекционным заболеваниям. Санкт-Петербург. – 2021. – С. 144-149.

3. Афридонова З.Э. Клеточный и гуморальный иммунитет у привитых вакциной «Спутник V» / З.Э. Афридонова, А.П. Топтыгина // 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. – 2022. – С. 245-249.

4. Афридонова З.Э. Формирование и поддержание адаптивного иммунитета на вирус SARS-CoV-2. / А.П., Топтыгина, З.Э. Афридонова // В сборнике материалов III Международной научно-практической конференции по вопросам противодействия новой коронавирусной инфекции и другим инфекционным заболеваниям/ под ред. А.Ю.Поповой и В.В.Кутырева. – Саратов: Амирит, 2022. – С. 216-219.

5. Афридонова З.Э. Клеточный иммунитет к антигенам вируса SARS-COV-2 / З.Э. Афридонова, А.П. Топтыгина // Сборник тезисов Конгресса с международным участием. Молекулярная диагностика и биобезопасность - 2023. Москва. – 2023. – С. 214-215.

6. Афридонова З.Э. Особенности поддержания иммунологической памяти на вирус SARS-COV-2 / А.П. Топтыгина, З.Э. Афридонова // Сборник материалов IV Международной научно-практической конференции "Противодействие новой коронавирусной инфекции и другим инфекционным заболеваниям". / под ред. А.Ю.Поповой и В.В.Кутырева. – Саратов: Амирит. – 2023. – С. 320-323.

7. Афридонова З.Э. Поддержание иммунологической памяти к антигенам SARS-CoV-2 как последствие контакта с вирусом / З.Э. Афридонова, А.П. Топтыгина // Журнал инфектологии. – 2024. – Т.16, №3, Приложение 1. Материалы Второго гомельского международного конгресса «Инфекционные болезни, микробиология и иммунология». – С.17-18.

Патент:

1. Патент RU 2804243 C1 Российской Федерации СПК G01N 33/48 (2023.02); G01N 33/577 (2023.02) Способ определения и количественной оценки специфического клеточного иммунитета к антигенам N-белка вируса SARS-COV-2/ А.П.Топтыгина, З.Э.Афридонова; заявитель и патентообладатель ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (RU), заявл. 22.09.2023, опубл. 24.04.2024 Бюл. № 12 -, 10 с.: с ил.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВАК – высшая аттестационная комиссия	MERS-CoV - коронавирус ближневосточного респираторного синдрома
ВМА – всемирная медицинская ассоциация	NK – натуральные киллеры
ЗФР – забуференный физиологический раствор	NKT – клетки, экспрессирующие маркеры NK-клеток и Т-лимфоцитов
ИФА – иммуноферментный анализ	RPMI-1640 – среда для культивирования лимфоцитов
КП – коэффициент позитивности	SARS-CoV-1 – возбудитель тяжёлого острого респираторного синдрома 1
BAU – Binding antibody units	SARS-CoV-2 (2019-nCoV) – коронавирус, возбудитель тяжелого острого респираторного синдрома 2
CD4+ – кластер дифференцировки, маркер Т-хелперов	γδ-T – Т-лимфоциты, несущие γδ-T-клеточный рецептор
CD8+ – кластер дифференцировки, маркер Т-цитотоксических лимфоцитов	Tfh – Т-фолликулярный хелпер
COVID-19 – коронавирусная инфекция 2019 года	VOC – варианты вируса SARS-CoV-2, вызывающие озабоченность
ELISpot – иммуноферментный анализ, используемый для детекции клеток, секретирующих IFN-γ	
HLA – группа антигенов гистосовместимости	
IFN α, β, γ – интерферон α, β, γ	
Ig A, M, G – иммуноглобулины класса A, M, G	
Ig G1,2,3,4 – субклассы иммуноглобулина G1,2,3,4	

Афридонова Зульфия Энгелевна

ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ИНФЕКЦИЮ ВИРУСОМ SARS-CoV-2 И ВАКЦИНАЦИЮ ПРОТИВ НЕГО

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук