

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«МОСКОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ им. Г.Н.ГАБРИЧЕВСКОГО»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

Афридонова Зульфия Энгелевна

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

3.2.7. Иммунология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ

Доктор медицинских наук, доцент

Топтыгина Анна Павловна

Москва 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	С. 5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Коронавирусы и новая коронавирусная инфекция.....	15
1.1.1 Структурные особенности SARS-CoV-2.....	17
1.1.2 Эпидемиология COVID-19.....	19
1.1.3 Текущая ситуация пандемии COVID-19 в мире и России.....	19
1.2 Иммунопатогенез COVID-19.....	23
1.2.1 Реакции врожденного иммунитета на SARS-CoV-2.....	23
1.2.2 Клеточный иммунитет к антигенам вируса SARS-CoV-2.....	27
1.2.3 Гуморальный иммунитет к антигенам вируса SARS-CoV-2.....	31
1.3 Вакцинация против вируса SARS-CoV-2.....	38
1.3.1 Вакцины, содержащие нереплицирующийся вирусный вектор.....	39
1.3.2 Вакцины на основе нуклеиновых кислот.....	41
1.3.3 Белковые вирусные вакцины.....	42
1.3.4 Вакцины, содержащие инактивированный вирус.....	43
1.3.5 Вакцинация и мутация SARS-CoV-2.....	43
1.3.6 Сопоставление гуморального ответа при инфекции и вакцинации.	44
1.3.7 Снижение эффективности существующих вакцин против вариантов вируса SARS-CoV-2.....	46
ГЛАВА 2 ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ ЛИЦ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	47
2.1 Характеристика когорты обследованных лиц.....	47
2.2 Сбор и обработка проб крови.....	50
2.3 Определение количества иммуноглобулинов классов А, М и G к S- белку коронавируса.....	51
2.4 Определение количества иммуноглобулинов класса G к N-белку коронавируса.....	57
2.5 Определение субклассов IgG-антител к антигенам вируса SARS- CoV-2.....	60

2.6 Определение avidности антител к антигенам вируса SARS-CoV-2...	61
2.7 Определение клеточного иммунитета с помощью антиген-индуцированной дегрануляции цитотоксических Т-клеток.....	64
2.8 Определение клеточного иммунитета методом ELISpot.....	69
2.9 Методы математической обработки полученных результатов.....	72
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	74
3.1 Параметры гуморального иммунитета, специфичного к S-белку вируса SARS-CoV-2 у реконвалесцентов COVID-19.....	74
3.1.1 IgM антитела к S-белку вируса SARS-CoV-2.....	74
3.1.2 IgA и IgG антитела к S-белку вируса SARS-CoV-2 у ранних реконвалесцентов COVID-19.....	75
3.2. Показатели клеточного иммунитета, специфичного к S-белку вируса SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19.....	78
3.3. Параметры гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 у привитых от COVID-19.....	80
3.4 Динамика изменений параметров иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 с течением времени (до появления штамма омикрон).....	83
3.5 Динамика изменений параметров адаптивного иммунитета к S-белку при бустировании за счет вакцинации или повторного инфицирования.....	89
3.6 Моделирование гуморального иммунного ответа на S- и N- белок вируса SARS-CoV-2.....	96
3.7 Сопоставление иммунного ответа на S- и N- белок вируса SARS-CoV-2.....	106
3.8 Сопоставление разных методов оценки клеточного иммунного ответа на антигены вируса SARS-CoV-2.....	109
3.9 Динамика иммунных ответов на N- и S-белок вируса SARS-CoV-2..	116
РЕЗЮМЕ	125
Список работ, опубликованных по материалам, изложенным в главе 3.	126
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	129

ВЫВОДЫ.....	150
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	152
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	152
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	153
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	156

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Пандемия вируса SARS-CoV-2 оказалась неожиданной проблемой для системы здравоохранения всего мира и предъявила серьезные требования к медико-биологической науке в плане экстренной разработки диагностических систем и средств иммунопрофилактики. Ввиду тяжести заболевания COVID-19 [254], отсутствия знаний о жизненном цикле вируса и иммунопатогенезе заболевания был использован существующий арсенал антимикробных и иммунобиологических лекарственных препаратов с разным уровнем эффективности [7, 238, 265]. Быстрое выявление инфицированных лиц и их изоляция были единственным способом прервать передачу вируса и ограничить число заболевших [321]. Тем не менее, за три года пандемии признана гибель от COVID-19 около 20 миллионов человек по данным ВОЗ [314]. В то же время пандемия COVID-19 дала уникальный шанс исследователям изучить формирование первичного противовирусного иммунного ответа у наивной в отношении этого вируса человеческой популяции, а также проследить особенности сохранения иммунитета к SARS-CoV-2 в условиях вакцинации и прорывных инфекций мутантными штаммами вируса.

Традиционно противоиnфекционный иммунитет оценивают по наличию специфических антител к патогену. Выделяют два варианта адаптивного гуморального иммунного ответа на вирусную инфекцию или вакцины. При экстрафолликулярном пути активация и дифференциация В-клеток в короткоживущие плазматические клетки идет за пределами зародышевых центров лимфатических узлов [98]. Короткоживущие плазматические клетки продуцируют преимущественно IgM-антитела, способные нейтрализовать вирус [154]. Иммунный ответ в зародышевых центрах лимфоузлов требует помощи T_h-хелперов и ведет к клональной пролиферации В-клеток, созреванию аффинитета и

их дифференциации в долгоживущие плазматические или В-клетки памяти, синтезирующие IgG-антитела [65]. У переболевших COVID-19 обнаружено достаточное количество вирусспецифических резидентных клеток костного мозга: долгоживущих плазматических клеток и В-клеток памяти [291]. Показано, что субкласс IgG3 связан с ранним противовирусным ответом, предполагается, что IgG3 является первым высокоаффинным IgG-антителом, которое вырабатывается во время заражения COVID-19 [151]. IgG1 и IgG3 были основными субклассами, обнаруженными при инфекции SARS-CoV-2 [278], демонстрируя самую высокую способность к нейтрализации вирусов [114]. Нейтрализующая активность антител сохранялась у большинства пациентов до 15 месяцев [322]. Специфичный к вирусу SARS-CoV-2 IgA, играющий решающую роль в защите слизистых от вируса SARS-CoV-2, обнаружен в слюне инфицированных индивидуумов [74, 131].

Клеточный иммунитет – ключевое звено противовирусного иммунного ответа [200]. Даже бессимптомные лица, инфицированные SARS-CoV-2, имеют высокофункциональный специфичный к антигенам вируса клеточный иммунный ответ [156]. Показано формирование ответов CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток практически на все белки SARS-CoV-2, включая неструктурные [281]. Одной из важных функций адаптивной иммунной системы является 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 [194, 261]. Рутинно исследователи проводят оценку клеточного иммунного ответа, индуцированного антигенами вируса SARS-CoV-2, методом ELISpot по продукции IFN- γ [250]. Этот метод отражает суммарные ответы врожденного и адаптивного иммунитета. IFN- γ способны производить НК-, НКТ-, $\gamma\delta$ -Т-клетки, CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоциты [34, 202, 205].

Благодаря массовой вакцинации и бустированию вследствие множественных волн пандемии, сформировался популяционный иммунитет [274]. Почти не осталось лиц с первичным иммунным ответом [275]. Однако из-за частых мутаций в S-белке SARS-CoV-2 даже высокий уровень анти-S антител

может не обеспечивать защиты от заражения новыми VoC [35]. Новые подъемы заболеваемости COVID-19 служат тому подтверждением. За счет частых мутаций вирус оказался способным уходить от атаки иммунной системы [197], продолжая выживать в человеческой популяции [66]. Естественный отбор идет в сторону появления штаммов вируса, способных наиболее эффективно уклоняться от иммунного ответа [57, 259]. Очевидно, что оценка продолжительности сохранения иммунной защиты в текущих условиях остается реальной проблемой. Состояние эндемии на данный момент не достигнуто, риск значительного подъема заболеваемости существует даже спустя 4 года с момент первой встречи вируса SARS-CoV-2 с иммунной системой человека [187].

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 изучено 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.

Продемонстрировано 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.

Продемонстрировано, 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 avidности анти-S IgG-антител. Индекс avidности 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 на антигены 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 плазмочитами, 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 плазмочитами. Тогда как IgG-антитела к S-белку SARS-CoV-2 формируются преимущественно долгоживущими плазмочитами, о чем свидетельствует длительное поддержание уровня этих антител (4 года наблюдения) и доминирование антител IgG1 субкласса, типичного для профиля синтеза антител долгоживущими плазмочитами.

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).

Используя предложенные формулы, 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 T-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 T-клеточного ответа к антигенам N-белка для защиты от новых вариантов вируса SARS-CoV-2.

В результате сопоставления разных методов оценки T-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 T-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 T-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 T-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, клинико-anamнестические, 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 высокоточных, автоматизированных диагностических приборах, оснащенных системами автоматизированного сбора, учета и анализа данных, 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 моноклеаров на проточном цитометре выполнена совместно с сотрудниками централизованной клиничко-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 плазмочитами, а уровень анти-S антител является суммой антител, синтезируемых коротко- и долгоживущими плазмочитами.
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, выводов, 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.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Коронавирусы и новая коронавирусная инфекция

В декабре 2019 года в Ухане, Китай, было зарегистрировано сообщение о пациентах с вирусной пневмонией, вызванной неопознанным инфекционным агентом [128]. Впоследствии в качестве возбудителя был идентифицирован новый коронавирус, предварительно названный новым коронавирусом 2019 года (2019-nCoV или уханьский штамм (WT)) [307]. Вирус, названный SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), оказался высоконтагиозным, заболевание им вызванное, COVID-19 (Coronavirus Infectious Disease 2019), быстро распространилось на более чем 200 стран и территорий. В марте 2020 года ВОЗ объявила пандемию COVID-19. [308]. До 2002 года многочисленные коронавирусы вызывали эпизоотии в разных частях мира, считалось, что угрозу для человечества они собой не являют. Первый случай инфекции, вызванной коронавирусом, описан в 1931 году американскими ветеринарами A.F. Schalk и M.C. Hawn как «новое респираторное заболевание» у цыплят [256]. Далее последовательно были описаны случаи заболеваний с разными органами поражениями и разными уровнями смертности у свиней, собак, птиц, земноводных и прочих представителей животного мира [28].

Известно нескольких патогенных для человека коронавирусов. Большинство из них связаны с легкими клиническими симптомами. Существует четыре циркулирующих вируса сезонной "обычной простуды", которые включают два бета-коронавируса, OC43 и HKU-1, а также альфа-коронавирусы 229E и NL63. Они широко распространены, причем предыдущее воздействие каждого вируса наблюдалось более чем у 90% взрослых [113]. Однако коронавирус, вызывавший тяжелый острый респираторный синдром, SARS-CoV, новый бета-коронавирус, который появился в Гуандуне, южный Китай, в ноябре 2002 года [220], привел к эпидемии. В конце эпидемии в июне 2003 года общее

число случаев заболевания в мире составило 8422 случая с 916 смертельными исходами, показатель летальности составил 11% [72]. Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома, MERS-CoV, который был впервые обнаружен в Саудовской Аравии в 2012 году, стал причиной 2494 лабораторно подтвержденных случаев заражения и 858 смертельных случаев с сентября 2012 года [121]. Показатель летальности составил около 36% [89]. Вирусы оказались не столь высоко контагиозными и, благодаря проведенным противоэпидемическим мерам, эпидемии удалось локализовать. Были предприняты попытки создать вакцину против коронавируса SARS-CoV и MERS-CoV. Антителозависимое усиление инфекции у вакцинированных привело к прекращению испытаний этих вакцин [289].

Коронавирусы вызывают широко распространенные заболевания органов дыхания, желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы у людей и других животных, угрожая здоровью людей и нанося экономический ущерб. Они относительно легко адаптируются к новым условиям путем мутации и рекомбинации и, следовательно, запрограммированы на эффективное изменение ареала обитания хозяина и тропизма тканей [92, 219]. Таким образом, угрозы здоровью, исходящие от коронавирусов, являются постоянными и долгосрочными. Межвидовая передача вирусов людям явно происходила на протяжении всей истории человечества [204].

COVID-19, заболевание, вызванное новым вирусом SARS-CoV-2, потребовало инновационных разработок в диагностике, терапии и вакцинах, и глубокого понимания вирусологии коронавирусов, структурно-функциональных взаимосвязей вирусных белков и соответствующих рецепторов хозяина, особенностей их взаимодействия, которые определяют характер иммунного ответа. Эволюция вируса в настоящее время интенсивно продолжается, начинают формироваться его географические варианты, которые, возможно, лягут в основу его будущей гетерогенности [12, 224]. Контроль за распространением коронавирусов имеет важные последствия для глобального здравоохранения и экономической стабильности.

1.1.1 Структурные особенности SARS-CoV-2

Коронавирусы относятся к подсемейству *Coronavirinae* семейства *Coronaviridae*, и это подсемейство включает четыре рода: альфа-коронавирус, бета-коронавирус, гамма-коронавирус и дельта-коронавирус. Коронавирусы – это крупные, покрытые оболочкой РНК-вирусы с одноцепочечной положительной цепью [180]. Они имеют самый большой геном среди всех РНК-вирусов. Геном вируса составляет 29 881 bp (GenBank no. MN908947), он кодирует 9860 аминокислотных остатков [75]. Геном упакован внутри спирального капсида, образованного нуклеокапсидным белком (N), и дополнительно окружен оболочкой. N-белок длиной 419 аминокислот является единственным структурным белком внутри вириона, связанным с вирусной геномной РНК посредством электростатических взаимодействий, приводимых в действие положительно заряженными аминокислотными остатками. Он модулирует раскручивание РНК после попадания в клетку [235]. С вирусной оболочкой связаны еще три структурных белка: мембранный белок (M) и белок оболочки (E) участвуют в сборке вируса, а спайковый белок (S, белок шипа) опосредует проникновение вируса в клетки-хозяева. S-белок образует большие выступы (пепломеры) на поверхности вируса, придавая коронавирусам вид коронок (отсюда и их название; *corona* по-латыни означает корона) [162]. Они связываются с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (Angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) клетки-хозяина, опосредуя проникновение вируса в клетку [160]. Поэтому антитела к S-белку способны нейтрализовать вирус. Шипы покрыты молекулами полисахаридов, чтобы избежать ответа иммунной системы хозяина во время проникновения [301]. S-белок является критическим фактором, определяющим диапазон хозяев и тканевой тропизм, и основным индуктором иммунных реакций хозяина. Считается, что S-белок относится к белкам слияния вирусных мембран класса I [56], включая белки вируса гриппа, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и вируса Эбола. Для всех оболочечных вирусов связывание с рецептором и слияние мембран является ключевым ранним шагом для проникновения в клетки хозяина и возникновения инфекции [43]. Эти этапы

могут послужить точкой приложения лекарственных средств. SARS-CoV-2 имеет шестнадцать неструктурных белков (Nonstructural protein, nsp1–16), обладающих ферментативной активностью и блокирующих распознавание PAMP клетками хозяина [178].

Структура тримерного S-белка SARS-CoV-2 была определена с помощью криоэлектронной микроскопии на атомном уровне [294]. Полноразмерный S-белок уханьского штамма содержит 1273 аминокислотных остатка, включая N-концевой сигнальный пептид, рецепторсвязывающую субъединицу S1 и субъединицу слияния S2 [327].

В структуре S1 можно выделить N-концевой домен, рецептор-связывающий домен (Receptor binding domain, RBD) и C-концевые домены. Были выявлены различные конформации RBD в открытом и закрытом состояниях и его соответствующие функции. На поверхности вирусной мембраны S-белок представлен в виде тримера. Три RBD образуют вершину S-тример, с возможностью двух различных конформаций, up, "вверх", представляющий доступное для рецептора ACE2 состояние, и down, "вниз", представляющий недоступное для рецептора ACE2 состояние. Показано что S-тример может связывать один, два или три ACE2 в конформациях RBD-up [319]. RBD является частью области с высокой степенью изменчивости и не может служить идеальным сайтом-мишенью для разработки противовирусных ингибиторов широкого спектра действия [179]. В то же время область RBD является критической мишенью для нейтрализующих антител. Функция субъединицы S1 заключается в связывании с рецептором на клетке-хозяине.

Функция субъединицы S2 заключается в слиянии мембран вирусов и клеток-хозяев. S2 включает в себя пептид слияния, проксимальную область пептида слияния, гептадный повтор 1, центральную спираль, соединительный домен, гептадный повтор 2, трансмембранный сегмент и цитоплазматический хвост [327].

1.1.2 Эпидемиология COVID-19

Летучие мыши, по-видимому, являются естественным резервуаром SARS-CoV-2 [325]. Показано, что бетакоронавирус, выделенный из панголинов, имеет сходство последовательности до 98% с идентифицированным уханьским штаммом человека [318]. Сходство генов между этими двумя вирусами с точки зрения генов E, M, N и S составляет 100, 98,6, 97,8 и 90,7% соответственно, это позволяет предположить, что панголины могут быть промежуточным хозяином [318]. SARS-CoV-2 может передаваться от человека к животному. Установлено, что такие животные, как тигр, собака, кошка и хорек, заражаются вирусом при тесном контакте с инфицированными людьми [264, 266].

SARS-CoV-2 передается воздушно-капельным путем [196]. К сожалению, даже бессимптомные пациенты являются источником инфекции [125]. Вирус также может распространяться путем непрямой контактной передачи. Существует возможность передачи инфекции воздушно-капельным путем в медицинских учреждениях из-за аэрозолей, образующихся в результате медицинских процедур. В некоторых случаях инфекции SARS-CoV-2 у детей с отрицательными анализами ПЦР из носоглотки, мазки из прямой кишки оказывались положительными, что указывает на возможность фекально-оральной передачи [320]. Было показано, что SARS-CoV-2 может эффективно размножаться в кишечном эпителии. В результате SARS-CoV-2 может распространяться через желудочно-кишечный тракт [288]. Вирус SARS-CoV-2 выделен из мочи пациента с COVID-19 [273]. Некоторые исследования продемонстрировали возможность вертикальной передачи SARS-CoV-2 от матери к плоду [215]. Риск перинатальной передачи SARS-CoV-2 относительно низок.

1.1.3 Текущая ситуация пандемии COVID-19 в мире и России

Пандемия COVID-19 прошла уже девять волн подъема заболеваемости. Статистические данные по заболеваемости и смертности в мире не обновляются. По данным Университета Джона Хопкинса на 03.10.2023 г., 676 609 955 подтвержденных случаев заболеваний COVID-19, 6 881 955 смертей. В Российской Федерации зарегистрировано почти 25 миллионов подтвержденных

случаев заболевания COVID-19, и более 400 тысяч смертей от этого заболевания, 51,42% населения было полностью вакцинировано [25]. На рисунке 1.1 представлены данные по Российской Федерации.

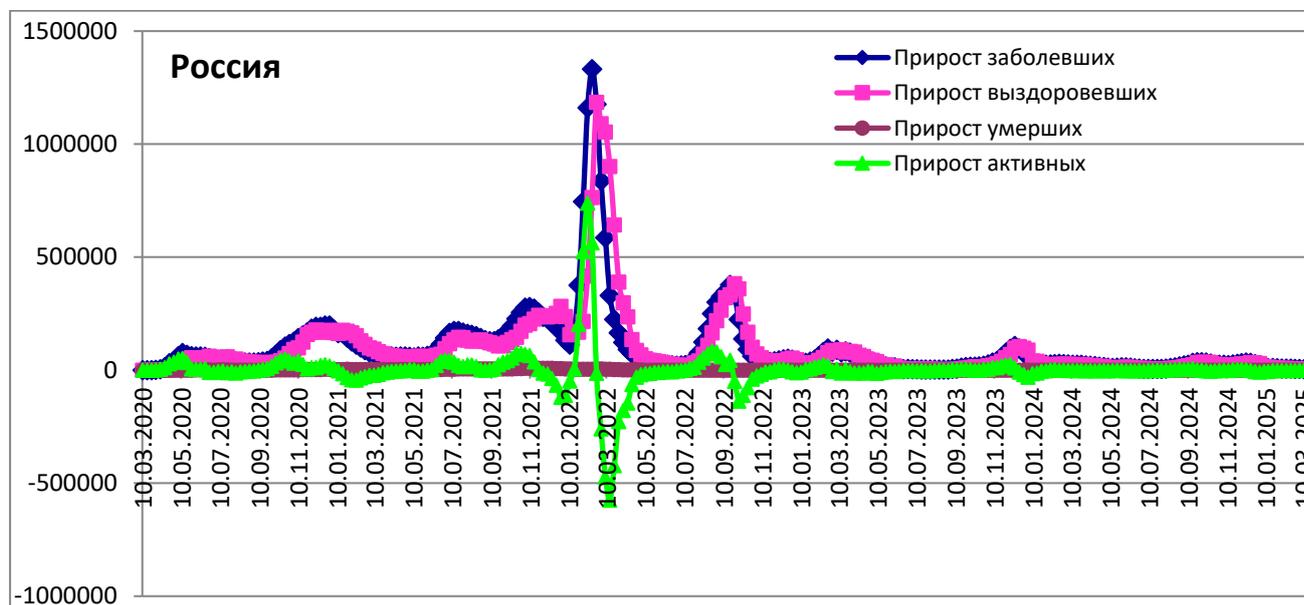


Рисунок 1.1 – Течение пандемии COVID-19 в Российской Федерации
(по данным Роспотребнадзора)

Первая волна пандемии была вызвана уханьским штаммом вируса SARS-CoV-2, вторая, третья, и четвертая в 2020-2021 году – его субвариантами Альфа (В. 1.1.7), Бета (В.1.351) и Дельта (В.1.617.2), пятая, с беспрецедентным количеством заболевших, – штаммом Омикрон (В.1.1.529), после которой практически не осталось лиц с первичным иммунным ответом, постинфекционным или поствакцинальным. Шестой, седьмой, восьмой и девятый подъемы заболеваемости обусловлены субвариантами штамма Омикрон.

Первоначально предполагали, что SARS-CoV-2 имеет медленную скорость эволюции. Как впоследствии было установлено, скорость мутации в S-белке SARS-CoV-2 в 2-2,5 раза выше, чем у вируса гриппа А/Н3N2 НА1 и в 7–10 раз быстрее, чем в субъединице S1 сезонных коронавирусов 229Е и OC43 [149]. SARS-CoV-2 активно мутировал и некоторые его штаммы оказались более заразными и/или смертоносными, ввиду чего они были названы вирусами, вызывающими озабоченность, virus of concern или VOC [311]. Все эти штаммы

внесли свою лепту в формирование последующих волн пандемии в разных странах и континентах [284]. Мутации вируса привели к увеличению сродства к ACE2-рецептору человека. Следующие штаммы вируса SARS-CoV-2 были названы Альфа, Бета, Гамма (B.1.1.28), Дельта. У варианта Дельта Плюс (B.1.617.2.1), была выявлена мутация P871R как одна из наиболее критических мутаций вируса SARS-CoV-2, в сайте связывания фурина, который повышает эффективность проникновения в клетку через сам сайт расщепления фурина. Он индуцировал формирование синцития, так что вирус заражал несколько клеток по механизму передачи от клетки к клетке, не выходя в жидкие среды организма. [284]. Штамм Омикрон - результат рекомбинации двух совместно циркулирующих линий Стелс (BA.2) и субвариантов Омикрона (BJ.1 и BM.1.1.1) [276]. Это может происходить, если человек заражается двумя вариантами одновременно. Омикрон отличается от предыдущих штаммов наибольшим зафиксированным количеством мутаций в S-белке. Омикрон имеет уже несколько вариантов с формированием новой ветви в филогенетическом дереве S-белка SARS-CoV-2 [234]. Их относят к VBM (Variants being monitored) вариантам, подлежащим мониторингу [311]. Филогенетическое дерево штаммов SARS-CoV-2 представлено на рисунке 1.2. Субвариант Пирола (BA.2.86) появился в отчетах в августе 2023 года, он несет более 40 новых мутаций, из них 34 в S-белке. Пирола имеет очень высокое сродство к рецептору ACE2 [297]. Субвариант Пирола не склонен к образованию синцитиев в сравнении со штаммом Дельта или другими субвариантами штамма Омикрон, во всяком случае, в протестированных клеточных линиях, а существующие терапевтические моноклональные антитела не связываются с субвариантом Омикрона BA.2.86.1 *in vitro* [234]. По состоянию на октябрь 2024 года актуальный субвариант Омикрона (KP.3.1.1) имеет уже 61 мутацию в S-белке [324].

Новые варианты коронавируса появляются в результате антигенной эволюции циркулирующих промежуточных мутантов у переболевших, вакцинированных [127, 149] и хронически инфицированных пациентов с ослабленным иммунитетом, поддерживающих высокую репликацию вируса во

время лечения иммунной плазмой или моноклональными антителами [62, 95, 144].

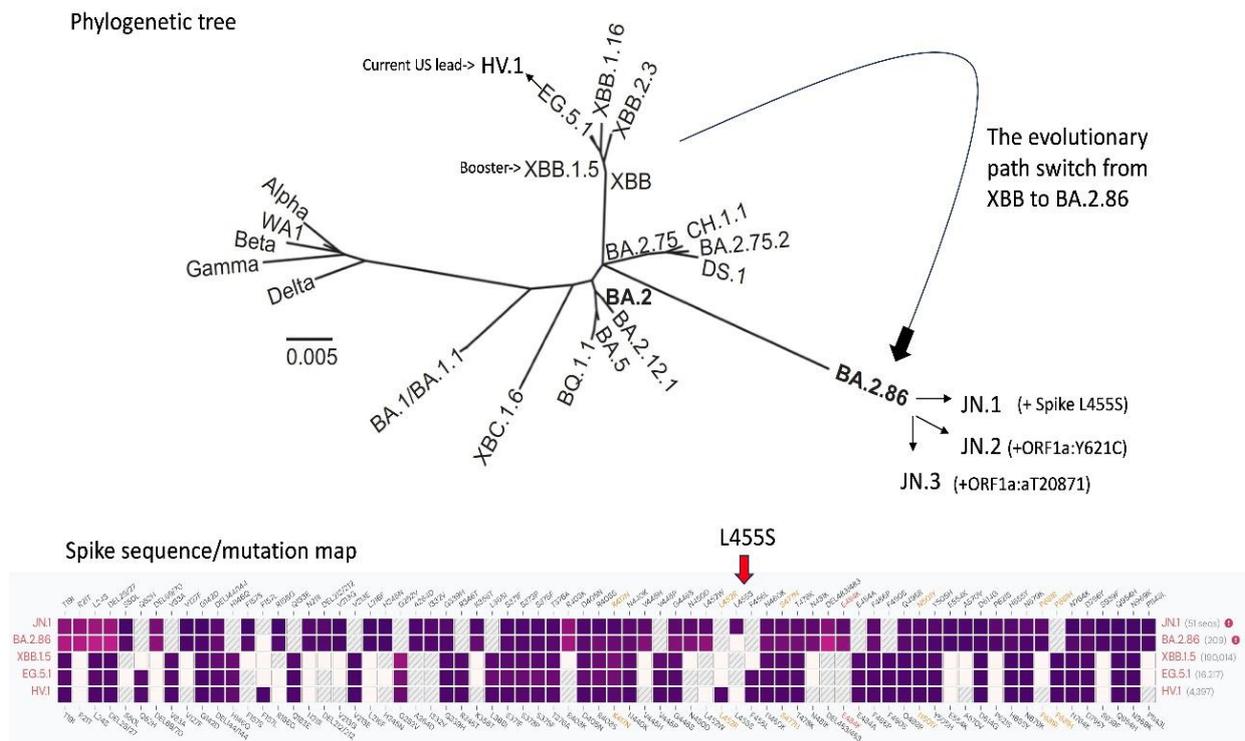


Рисунок 1.2 – Карта мутаций в спайке SARS-CoV-2

Примечание: BA (1-5), BQ и Омикрон XBB (B.1.1.529); его субварианты XBB – Грифон (XBB), Арктур (XBB 1.16), Кракен (XBB.1.5), Цербер (BQ.1.1), Стелс (BA.2), Кентавр (BA.2.75), Эрис (EG.5.1), Пирола (BA.2.86) – новая ветвь XBB, включая JN.1 с заменой L455S [287].

Есть основания считать, что вирус будет длительно циркулировать в человеческой популяции, мутировать и давать вспышки. Этому может способствовать также и сохранение резервуаров вируса в природе. Результаты исследований показывают, что белохвостые олени [68] – наиболее распространенное крупное млекопитающее в Северной Америке – могут служить резервуаром для вариантных штаммов SARS-CoV-2, которые больше не циркулируют в популяции человека. Норки, которых разводят в Европе, Северной Америке и Китае, также могут являться источником будущих вспышек заболеваний, вызванных вирусом SARS-CoV-2 [218]. Не исключается возникновение новых штаммов в результате перехода вируса от человека к животному и обратно.

1.2 Иммунопатогенез COVID-19

1.2.1 Реакции врожденного иммунитета на SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 проникает в альвеолярные клетки 2-ого типа легких через рецептор ACE2. ACE2 экспрессируется различными органами тела, такими как мозг, легкие, почки, печень и кишечник. SARS-CoV-2 часто поражает и эти органы, но патогенез инфекции SARS-CoV-2 начинается с легких и вызывает их серьезные повреждения. Врожденный иммунитет функционирует как первая линия защиты хозяина от патогенов, включая SARS-CoV-2. Врожденные иммунные реакции ограничивают проникновение, трансляцию, репликацию и сборку вируса, помогают идентифицировать и удалять инфицированные клетки, а также координируют и ускоряют развитие адаптивного иммунитета [93].

Клетки врожденного иммунитета, включая макрофаги, моноциты, дендритные клетки, нейтрофилы и врожденные лимфоидные клетки (Innate lymphoid cells, ILC), такие как естественные киллеры (Natural killers, NK), имеют паттерн-распознающие рецепторы (Pattern recognition receptor, PRR), которые обнаруживают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (Pathogen associated patterns, PAMP) или молекулярные паттерны, связанные с повреждением (Danger associated patterns, DAMPs), и индуцируют воспалительные сигнальные пути и иммунные реакции. Пять основных семейств PRR включают Toll-подобные рецепторы (TLR), рецепторы, индуцируемые ретиноевой кислотой, подобные гену I (Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors, RLRs), рецепторы, подобные нуклеотидсвязывающему домену олигомеризации (Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors, NLRs), рецепторы лектина С-типа и отсутствующие при меланоме 2 (Absent in melanoma, AIM2) [138]. Передача сигналов через эти рецепторы в клетках врожденного иммунитета в ответ на патогены, PAMPs или DAMPs приводит к выработке воспалительных цитокинов и хемокинов, а также к индукции клеточной гибели для очистки организма от инфицированных клеток. На сегодняшний день было показано, что несколько PRR, в частности, TLR, RLR, NLR, активируют свои сигнальные пути в ответ на SARS-CoV-2 [77]. Обнаружение чужеродной РНК вируса в цитоплазме

клетки хозяина и/или в составе эндосомы является для иммунной системы хозяина сигналом присутствия инфекции. Последующий запуск синтеза интерферонов и провоспалительных цитокинов - важная составляющая воспалительной защитной противовирусной реакции.

Врожденный иммунитет распознает РНК-вирусы, такие как коронавирусы, с помощью двух отдельных стратегий [186]. В рамках одной стратегии плазмоцитоподобные дендритные клетки (Plasmacytoid dendritic cell, pDC) распознают поступающую одноцепочечную вирусную геномную РНК в эндосоме через TLR7. Миелоидные дендритные клетки (mDC) экспрессируют эндосомальные TLR3 и TLR8, которые могут распознавать двухцепочечную РНК или одноцепочечную РНК соответственно. Вторая стратегия включает распознавание вируса во время репликации. Промежуточные продукты двухцепочечной РНК могут быть распознаны цитозольными РНК-сенсорами. Активация TLR в эндосоме через молекулы MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) и TRAF6 (TNF receptor activating factor 6) ведет к фосфорилированию и перемещению регуляторных факторов IRF3 (Interferon responsive factor 3) и IRF7 в ядро клетки. Активация RLR в цитоплазме идет через молекулу MAVS (Mitochondrial antiviral signaling protein), далее TRAF3 и ряда других молекул, что также приводит к перемещению регуляторных факторов IRF3 и IRF7 в ядро инфицированной клетки, в результате чего запускается транскрипция генов интерферонов IFN α и IFN β . Другой сигнальный путь через молекулу MAVS приводит к перемещению ядерного фактора κ B (nuclear factor NF- κ B) в ядро. Транслокация NF- κ B в ядро приводит к активации транскрипции нескольких провоспалительных цитокинов, включая TNF, IL-6 и IL-1.

Биологическая активность интерферонов I типа реализуется через рецепторы, экспрессируемые на большинстве клеток организма, в том числе на гепатоцитах, фибробластах, T-лимфоцитах, макрофагах, эпителиальных и дендритных клетках [18]. Точная настройка ответа IFN I типа имеет решающее значение, поскольку как чрезмерная, так и недостаточная активация передачи сигналов IFN может быть вредной для хозяина [134]. Успешная и своевременная

активация ответа IFN I типа ингибирует репликацию вируса и предотвращает распространение вирусной инфекции. Показано, что NLR реагируют на инфекцию SARS-CoV-2 и индуцируют выработку IFN I типа и провоспалительных цитокинов. NLRP3 (Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing), один из наиболее хорошо охарактеризованных инфламмосомных сенсоров, запускается в ответ на PAMPs и DAMPs, что приводит к активации каспазы-1, выработке и высвобождению биоактивных IL-1 β и IL-18 и расщеплению газдермина D, GSDMD, который образует поры в плазматической мембране, приводя к разрыву мембраны и пироптотической гибели инфицированных вирусом клеток [77].

Наконец, врожденная иммунная система участвует в процессе коагуляции, известном как "иммунотромбоз", который, как полагают, возникает при тяжелой форме COVID-19, что приводит к локализованной и/или системной коагулопатии [206]. Обнаружение PAMPs и DAMPs PRR-экспрессирующими макрофагами приводит к усилению экспрессии тканевого фактора (Tissue factor, TF), который, в свою очередь, активирует внешний путь коагуляции [99]. Кроме того, активированные нейтрофилы высвобождают нейтрофильные внеклеточные ловушки, состоящие из их ДНК и антимикробных пептидов, которые захватывают и уничтожают патогены, но также могут индуцировать сильный прокоагулянтный ответ [99].

SARS-CoV-2 уклоняется от врожденного распознавания, передачи сигналов, индукции IFN и IFN-стимулируемых генов (interferon stimulated genes, ISGs) посредством экспрессии ряда вирусных белков, которые блокируют эти пути [140, 285]. В легких или периферической крови лиц, инфицированных SARS-CoV-2, обнаруживаются более низкие уровни IFN-I или IFN-III по сравнению с другими респираторными вирусами [13, 120]. Пациенты с генетическими мутациями или аутоантителами к интерферонам, имеют тяжелое течение заболевания COVID-19. На поздней стадии заболевания длительная секреция IFN коррелирует с худшими исходами заболевания [182], возможно, за счет индукции хемокинов, которые рекрутируют провоспалительные клетки [133]. Установлено,

что отсроченный ответ IFN I типа и рекрутирование моноцитов/макрофагов в очаг воспаления являются основными причинами летальной пневмонии и острого респираторного дистресс-синдрома, наблюдаемых у пациентов с атипичной пневмонией [71].

Избыточная воспалительная реакция является основной особенностью тяжелого и критического COVID-19 [73], а дыхательная недостаточность при тяжелом заболевании, вызванном SARS-CoV-2 связана с гипервоспалением, которое может быть вызвано синдромом цитокинового шторма. Сывороточные уровни IL-2R, IL-4, IL-6, TNF- α , IL-1RA, IL-1 β , IFN- γ повышены [1, 192] в сочетании с повышенными уровнями хемокинов, таких как CCL2, CCL8, CXCL2, CXCL8, CXCL9 и CXCL16 [52]. IL-6 играет ключевую роль в стимулировании гипервоспалительного ответа [192] и является независимым предиктором выживаемости пациентов [91]. Было высказано предположение, что цитокиновый шторм характеризуется петлей положительной обратной связи. Действительно, начальная волна цитокинов может индуцировать гибель клеток как часть реакции воспаления, или паноптоз, состоящий из пироптоза, апоптоза и некроза [246], что дополнительно индуцирует высвобождение цитокинов, и, в конечном итоге, приводит к цитокиновому шторму [139]. Паноптоз, по-видимому, связан с сопутствующим увеличением IFN- γ и TNF- α . Недавнее исследование показало, что изменение уровня цитокинов и хемокинов происходит в течение первых нескольких дней с момента появления симптомов [150], что позволяет предположить, что нарушение регуляции может произойти на очень ранних стадиях течения заболевания. Неспособность врожденных иммунных реакций устранить вирус приводит к активации адаптивной иммунной системы. DC служат связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом, презентировав вирусные антигены Т-лимфоцитам. SARS-COV-2 может изменять экспрессию цитокинов, хемокинов и рецепторов хемокинов, инфицируя DCs, которые являются наиболее важными агентами иммунного мониторинга при доставке антигенов к Т-лимфоцитам [155]. DCs эффективно инициируют CD8⁺ и CD4⁺ клеточные ответы.

1.2.2 Клеточный иммунитет к антигенам вируса SARS-CoV-2

Главная роль в ответе адаптивного иммунитета против вируса, включая SARS-CoV-2, принадлежит Т-лимфоцитам, и, прежде всего, специфическим цитотоксическим CD8⁺Th-клеткам. Они препятствуют репликации вируса в дыхательных путях, убивая зараженные вирусом клетки и секретируя противовирусные цитокины IFN- γ и TNF- α . Зараженная вирусом клетка выставляет на своей поверхности антигенные пептиды в составе МНС I. Вирусспецифический CD8⁺Th-лимфоцит распознает их своим Т-клеточным рецептором (T-cell receptor, TCR) и либо за счёт взаимодействия Fas-Fas-лиганд, либо выброса перфоринов и гранзимов в синаптическую щель, запускает апоптоз этой клетки. IFN- γ воздействует на макрофаги, усиливает их фагоцитирующую активность. У макрофагов повышается экспрессия Fc-рецепторов, и они уничтожают вирусы, нейтрализованные антителами и апоптотические клетки. CD4⁺T-хелперные клетки выполняют множество функций, ключевых для координации и регуляции противовирусного иммунитета. Они разделены на субпопуляции, классически определяемые продукцией цитокинов. Фолликулярные CD4⁺T-лимфоциты (Tfh) способствуют выработке высокоаффинных нейтрализующих антител (Ат) и дифференцировке В-клеток зародышевого центра в клетки памяти и долгоживущие плазматические клетки (РС), секретирующие антитела. Помощь Tfh влияет на выживание В-клеток, пролиферацию, соматическую гипермутацию, рекомбинацию с переключением классов иммуноглобулинов и дифференцировку через IL-4, IL-21 и CD40L. Устойчивый контакт между клетками Tfh и В-клетками необходим для оказания помощи В-клеткам [126]. Специфические Th-2-лимфоциты тоже синтезируют IL-4, что может помогать дифференцировке В-клеток для синтеза нейтрализующих Ат. Th-17 привлекают в очаг воспаления нейтрофилы, у которых тоже есть рецепторы к Fc-фрагментам Ат, поэтому они могут участвовать в утилизации нейтрализованного вируса. Th-22 участвуют в восстановлении эпителия. Регуляторные Т-клетки (Treg) завершают цикл воспаления в нормальном протективном иммунном ответе. У выздоравливающих пациентов с COVID-19

было зарегистрировано адекватное количество Т-клеток и достаточная активация Т-клеток / клональная экспансия [60], что подразумевает важность Т-клеточного иммунитета для выздоровления и разрешения заболевания. Т-клеточный ответ также может быть неоптимальным, нарушенным и чрезмерным. Функциональная способность клеточного ответа является ключевым фактором, определяющим клинический исход.

Ранний цитотоксический ответ $CD8^+$ Т-клеток обычно наблюдается в течение 7 дней после появления симптомов и достигает максимума на 14-й день, коррелируя с эффективной очисткой организма от вируса [210], легкой формой заболевания [49] и соответствуя аналогичной кинетике гуморальных реакций [181]. Показано, что специфичные для SARS-CoV-2 $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки обнаруживаются в периферической крови больных COVID-19 в первые 2 недели после появления симптомов, при этом большинство специфичных для SARS-CoV-2 $CD4^+$ Т-клеток демонстрировали фенотип центральной памяти с доминирующей продукцией цитокинов Th1, в то время как $CD8^+$ Т-клетки имели более эффекторный фенотип с высокими уровнями экспрессии перфорина [303].

Уровень Т-клеток повышен у пациентов с легкой формой COVID-19, обеспечивая устойчивый противовирусный иммунный ответ [262]. $CD8^+$ Т-клетки экспрессируют более высокие уровни цитотоксических молекул, таких как гранзимы А, В и лиганд FAS, которые нужны для уничтожения инфицированных вирусом клеток. Однако в тяжелых случаях заболевания уровень цитотоксических молекул был снижен из-за уменьшения доли $CD8^+$ Т-клеток [166]. Количество Трег было умеренно увеличено у пациентов с легкой формой COVID-19. Уровни Трег у пациентов с тяжелой формой COVID-19 были ниже, чем у пациентов с легкой формой заболевания [277]. Их роль еще предстоит определить. Многие группы исследователей описали значительную дисфункцию Т-клеток при острой инфекции SARS-CoV-2 [170, 191, 268], эта дисфункция сохраняется во время выздоровления даже у негоспитализированных пациентов [104]. Возможно, что устойчивые ответы Tfh, обнаруженные у этой подгруппы лиц, свидетельствуют о нарушении регуляции иммунного ответа, и что эти Tfh не способствуют

образованию нейтрализующих Ат. Обнаружена повышенная доля SARS-CoV-2-реактивных Tfh с дисфункциональными свойствами и цитотоксичностью и отрицательной корреляцией с уровнями антител к S-белку SARS-CoV-2 у госпитализированных пациентов с тяжелым заболеванием COVID-19 [194].

Показано формирование ответов CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток практически на все белки SARS-CoV-2, включая неструктурные [281]. У CD4⁺ лимфоцитов преобладали ответы на S-белок, при этом уровень циркулирующих Tfh коррелировал с антительным ответом [136]. Также были выявлены Tfh, специфичные к белкам N и М. Важно, что антитела на N-белок не являются нейтрализующими, видимо, с этим связана низкая частота встречаемости Tfh к N-белку. Этот факт обосновывал стратегию создания вакцин, нацеленных только на S-белок в начале пандемии [55, 106, 135].

Как гиперактивация, так и истощение Т-клеток, были описаны при COVID-19, что отражает различные этапы в иммунном ответе на инфекцию [17, 191]. Важно отметить, что фенотип CD8⁺PD-1⁺CD38⁺Т-клеток у пациентов с тяжелой формой COVID-19 ассоциирован с высокими уровнями экспрессии перфорина и гранзима В по сравнению со здоровыми контрольными группами [60]. Это указывает на то, что белок программированной клеточной смерти (Programmed cell death protein 1, PD-1) и CD38 действуют как маркеры активации Т-клеток, а не маркеры истощения иммунного ответа в случаях COVID-19.

Одной из важных функций адаптивной иммунной системы является сохранение памяти о предыдущих антигенных контактах. Защита от инфекции обеспечивается Т-клетками, которые сохраняются в очагах предшествующего проникновения инфекционного агента в виде резидентных Т-клеток памяти (T-resident memory, TRM) [295]. TRM не рециркулируют и функционируют как первая линия защиты от патогенной инфекции, в частности, в коже и в слизистых оболочках [257]. К циркулирующим клеткам памяти относят эффекторы памяти (T-effector memory, TEM), Т-клетки центральной памяти (T-central memory, TCM) [226] и терминально дифференцированные эффекторы (T-effector memory cells re-expressing CD45RA, TEMRA) [198, 226]. Также выделяют долгоживущую Bcl6-

зависимую популяцию, которую назвали Т-резидентными хелперными клетками (T-resident helper, TRH). Клетки TRH находятся в легких независимо от Tfh лимфатического узла, но зависят от В-клеток, с которыми они находятся в тесном контакте в индуцируемой бронхоассоциированной лимфоидной ткани (inducible bronchus-associated lymphoid tissue, iBALT). Специфические для SARS-CoV-2 Tfh были в избытке обнаружены в ассоциированных с легкими лимфоузлах и легких [76, 227].

Интересно, что SARS-CoV-2-специфичные CD8⁺TRM были идентифицированы у переболевших ковидом людей. Показано, что специфичные для SARS-CoV-2 CD8⁺T-клетки выявляются в крови только у 50%, в легочной ткани – у 75%, в лимфоузлах легких – у 100% обследованных [76, 227]. Не вполне ясно, отражают ли циркулирующие вирусспецифические Т-клетки памяти ниши долгосрочной памяти в тканях, и способны ли они мигрировать в легкие во время вторичных инфекций [248]. Большинство современных данных свидетельствуют о том, что, хотя обе субпопуляции Т-клеток могут приобретать фенотипы центральной памяти, ТСМ, эффекторной памяти, ТЕМ, и памяти, подобной стволовым клеткам (T-stem cell-like memory, TSCM), среди CD4⁺T-клеток преобладают ТСМ, а среди CD8⁺ Т-клеток - ТЕМ [194, 261].

В ряде исследований было показано, что клеточный иммунитет сильно коррелирует с исходом заболевания, например, Le Bert N. et al. [156] в продольном исследовании изучили SARS-CoV-2-специфичные Т-клетки в когорте бессимптомных (n = 85) и пациентов с симптомами COVID-19 после сероконверсии (n = 75). Количество Т-клеток, отвечающих на структурные белки (М, N и S) SARS-CoV-2, было одинаковым у бессимптомных и индивидуумов с симптомами. При этом у бессимптомных наблюдалась повышенная продукция IFN- γ и IL-2 и пропорциональная секреция IL-10 и провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF- α и IL-1 β), в то время как непропорциональная секреция воспалительных цитокинов была вызвана специфической для SARS-CoV-2 активацией Т-клеток у лиц с симптомами. Следовательно, даже бессимптомные

лица, инфицированные SARS-CoV-2, имеют высокофункциональный специфичный к антигенам вируса клеточный иммунный ответ.

T-клеточные ответы против сезонных коронавирусов формируются, но имеют относительно низкий уровень, и их продолжительность не определена [255]. Группа O.W. Ng [207] показала, что T-клетки, отвечающие на антигены вируса SARS-CoV-1, обнаруживаются у людей через 11 лет после заражения, что свидетельствует о наличии долговременной T-клеточной памяти на этот вирус. Продемонстрировано отсутствие перекрестной реактивности этих CD8+T-клеточных ответов против MERS-CoV. Le Bert et al. обнаружили ответы T-клеток к вирусу SARS-CoV-1 через 17 лет, более того, эти T-клетки демонстрировали устойчивую перекрестную реактивность к N-белку SARS-CoV-2 [157]. T-клеточные ответы на антигены вируса MERS-CoV, по-видимому, являются более устойчивыми, чем гуморальный иммунитет [329]. Так было выявлено наличие MERS-CoV-специфичных T-клеточных ответов без сероконверсии у работников скотобойни в Нигерии [201]. Проведенный анализ подтвердил сохранение специфичного для SARS-CoV-2 клеточного иммунитета у 93% и 92% лиц через 6 и 12 месяцев после начала заболевания соответственно. Кроме того, уровни как антител, так и T-клеточной памяти, были положительно связаны с тяжестью заболевания [326]. Наличие T-клеточного иммунитета к предшествующим штаммам SARS-CoV-2 снижало уровень вирусной нагрузки при повторном заражении мутантными штаммами вируса [295]

1.2.3 Гуморальный иммунитет к антигенам вируса SARS-CoV-2

Вирус SARS-CoV-2 проникает в клетки хозяина как путем эндоцитоза, так и в результате слияния мембран. Затем DC процессируют вирус SARS-CoV-2 и презентруют вирусные антигены Th-клеткам. Это приводит к активации последних, секреции цитокинов и взаимодействию с B-клетками. B-клетки способны непосредственно распознавать вирусные антигены. При стимуляции вирусными антигенами большинство B-клеток пролиферируют и дифференцируются в плазматические клетки для выработки специфических Ат против SARS-CoV-2. Одновременно небольшая часть B-клеток развивается в B-

клетки памяти (Bm), специфичные к антигенам SARS-CoV-2. При повторном заражении SARS-CoV-2 Bm, специфичные к вирусу, могут быстро трансформироваться в плазматические клетки (Plasma Cells, PC) для выработки Ат.

На основе преобладающих изотипов и профилей соматических гипермутаций образующихся Ат можно выделить два варианта гуморального иммунного ответа на вирусную инфекцию или вакцины. Первый вариант носит название экстрафолликулярного пути развития. При этом В-клетки активируются и быстро дифференцируются в PC за пределами зародышевых центров в течение 4-6 дней после заражения [98]. PC пролиферируют и продуцируют антитела, которые содержат мало соматических гипермутаций, но, тем не менее, могут иметь достаточно высокое сродство и способны нейтрализовать вирус [154, 189]. Эти PC преимущественно имеют изотип IgM после иммунизации белком-антигеном, но они могут переключаться на IgG3 или IgA, особенно в ответ на вирусные инфекции [236]. Другой путь развития гуморального иммунного ответа подразумевает формирование зародышевых центров (Germinal Center, GC) в ближайших группах дренирующих лимфоузлов. GC представляют собой временные микроструктуры, которые формируются после того, как В-клетки, распознавшие вирусные антигены, получают помощь от Tfh, специализированной субпопуляции CD4+Т-лимфоцитов. Внутри GC В-клетки подвергаются клональной пролиферации и созреванию аффинитета и дифференцируются в долгоживущие PC или Bm с помощью Tfh [65, 241]. Процесс формирования GC длится от нескольких дней до недели, но поддержание GC может длиться месяцами. В GC антигенспецифические В-клетки подвергаются соматической гипермутации и селекции на основе аффинности, что приводит к образованию преимущественно изотипически измененных и высокоаффинных долгоживущих PC, которые создают компартмент, локализованный в костном мозге. Так при исследовании аспиратов костного мозга, полученных через 7 и 11 месяцев после заражения, на наличие анти-SARS-CoV-2 S-специфичных долгоживущих PC было показано, что у людей, выздоровевших от COVID-19, формируется достаточное

количество вирусспецифических резидентных клеток костного мозга: долгоживущих PC и Vm [291].

В результате иммунного ответа в GC формируются антигенспецифичные Vm, которые могут сохраняться еще долго после устранения первичной инфекции [214]. Например, Vm, сформированные на вакцину против оспы, сохраняются более 50 лет [85], а Vm, сформировавшиеся во время пандемии гриппа 1918 года, определялись не менее 90 лет [323]. Vm служат двум целям. Во-первых, Vm повторно активируются при инфекции в случае утраты защитного уровня Ат. Vm способны генерировать Ат в течение 3-5 дней от момента повторного контакта с инфекцией [163, 241]. Во-вторых, важная ценность Vm заключается в том, что они служат библиотекой прогнозов иммунной системы о возможных будущих вариантах вируса [84, 230]. Пандемия COVID-19 наглядно продемонстрировала важность разнообразия Vm в распознавании SARS-CoV-2 и его вариантов, и подтвердила блестящую способность иммунной системы предсказывать вирусные мутации, встраивая эти предсказания в репертуар клеток Vm [84].

Чтобы повысить вероятность повторной встречи с антигеном, Vm размещаются во вторичных лимфоидных органах, в барьерных тканях или патрулируют организм как рециркулирующие клетки [214]. Небольшое количество соматических гипермутаций и частичное созревание аффинитета могут происходить также и при экстрафолликулярном пути развития, при этом также происходит формирование Vm. Показано, что при тяжелом течении COVID-19 преобладает экстрафолликулярный путь формирования В-клеточного ответа, с формированием низкоаффинных, преимущественно IgM-антител, что обуславливает пониженную эффективность гуморальной защиты, несмотря на наличие высоких титров антител к антигенам SARS-CoV-2. Это подтверждается работами, выявившими отсутствие образования зародышевого центра в селезенке и лимфатических узлах пациентов с тяжелыми исходами заболевания [101].

Вирусспецифические к SARS-CoV-2 Vm можно обнаружить в крови уже через две недели после появления симптомов [86]. Показано, что уровень антиген-специфичных клеток Vm непрерывно увеличивается в течение 3-6

месяцев после заражения [78]. Это увеличение отмечено для анти-S, анти-RBD и анти-N Bm [86]. Количество Bm, специфичных к SARS-CoV-2, стабилизируется примерно через 4 месяца после заражения [86] и сохраняется в течение по меньшей мере 15 месяцев [190]. Это увеличение частоты S- и RBD-связывающих клеток Bm сопровождается значительным уровнем соматических гипермутаций на протяжении не менее 12 месяцев [300]. Анализ моноклональных антител, выделенных из S-специфичных Bm, накопленных за 6-12 месяцев, продемонстрировал повышенное созревание аффинности и повышенную эффективность нейтрализации SARS-CoV-2 [253]. Все эти факты указывают на длительное существование GC после заражения SARS-CoV-2; исключением, является летальный COVID-19, при котором на вскрытии можно наблюдать глубокое разрушение GC [137].

Средние сроки обнаружения специфических к SARS-CoV-2 антител IgM и IgA составили 5 дней, в то время как IgG появляется через 14 дней после появления симптомов, с положительной частотой 85,4%, 92,7% и 77,9% соответственно. В подтвержденных и вероятных случаях COVID-19 положительные показатели IgM-антител составили 75,6% и 93,1% соответственно [116]. В другом исследовании 285 пациентов с COVID-19 [175] показано, что все эти пациенты достигли сероконверсии IgM или IgG в течение 20 дней после появления симптомов. При этом IgG- сероконверсия была выявлена у 100% в течение 17-19 дней после появления симптомов, в то время как показатель IgM достиг максимума в 94,1% случаев примерно через 20-22 дня. Анализ сывороточных протеомов на микрочипах показал, что у бессимптомных пациентов в основном вырабатывались антитела IgM и IgG против белков S1 и N. В отличие от сильных и стойких N-специфических антител, S1-специфичные IgM-ответы развиваются у бессимптомных людей уже на 7 день после воздействия, достигают максимума в сроки от 17 до 25 дней, а затем исчезают через два месяца. У 11,8% (6/51) пациентов с легкой степенью тяжести и у 38,1% (24/63) пациентов с бессимптомным течением заболевания нейтрализующие антитела не

вырабатывались. Более того, нейтрализующие антитела у бессимптомных пациентов постепенно исчезали в течение двух месяцев [159].

Уровень ответов антител против SARS-CoV-2 коррелирует с тяжестью заболевания COVID-19. Показано, что самые высокие титры антител развиваются у наиболее тяжело больных пациентов, которые часто также имеют более высокую вирусную нагрузку в мазках из носоглотки по сравнению с пациентами с более легкой формой заболевания [5, 6, 176]. Более высокие соотношения IgG-антител, нацеленных на S1 или RBD-домены, по сравнению с N-белком, наблюдались у амбулаторных пациентов с легкой формой заболевания по сравнению с тяжелобольными пациентами [243].

Существует ограниченное количество исследований, анализирующих уровни IgA у пациентов с COVID-19. Среди изотипов антител секреторный IgA, который обнаруживается на поверхностях слизистых оболочек, играет решающую роль в защите от патогенов, которые нацелены на эти поверхности [11, 74]. Действительно, специфичный к вирусу SARS-CoV-2 IgA обнаруживается в слюне инфицированных индивидуумов [97, 131]. Более того, IgA является единственным иммуноглобулином, способным проникать в эпителиальные клетки для нейтрализации внутриклеточных вирусов [212]. В соответствии с тем фактом, что SARS-CoV-2 первоначально поражает носоглотку, антитела IgA, специфичные к SARS-CoV-2, быстро вырабатываются после заражения и остаются повышенными в плазме в течение 40 дней после появления симптомов. Мономеры сывороточного IgA продуцируются теми же клетками, которые продуцируют секреторные димеры. Показано, что ответы сывороточного IgA на SARS-CoV-2 коррелируют с ответами IgG, однако мономерная форма IgA, обнаруженная в сыворотке, в среднем, в два раза менее эффективна, чем IgG. Димерные секреторные формы IgA, обнаруженные в слизистой оболочке носоглотки, были, в среднем в 15 раз более эффективными, чем их соответствующие мономерные формы против SARS-CoV-2 [299]. Разница в нейтрализующей активности между изотипами в сыворотке крови может быть

обусловлена различиями в кинетике развития двух изотипов во время иммунного ответа на этот патоген.

При оценке субклассов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 против различных антигенов SARS-CoV-2 (N-белок, S-белок, RBD) показано, что IgG3 связан с ранним противовирусным ответом, предполагается, что IgG3 является первым высокоаффинным IgG-антителом, которое вырабатывается во время заражения COVID-19 [151]. Среди всех существующих субклассов IgG3 (наряду с IgG1) наиболее вовлечен в противовирусный ответ [103]. Этот субкласс антител частично отвечает за эффекторные функции при воспалении [293]. Хотя все четыре субкласса IgG имеют почти 90% структурного сходства, IgG3 имеет самую длинную область шарнира. Эта особенность структуры влияет на его способность связывать антиген. IgG3 часто описывают как субкласс с самой высокой связывающей способностью [245]. Из четырех субклассов IgG3 был в большей степени связан с начальной стадией заболевания (1-25 дней), тогда как концентрации IgG1 и IgG2 имели тенденцию к росту на более поздних стадиях и в период после выздоровления (180+ дней) [151]. Показано, что IgG1 и IgG3 были основными субклассами, обнаруженными при инфекции SARS-CoV-2 [278]. Кроме того, IgG1 и IgG3 демонстрировали самую высокую способность к нейтрализации вирусов [114].

В течение первых месяцев после заражения может наблюдаться довольно быстрое снижение концентрации вирусспецифичных IgG, продуцируемых транзиторными плазмобластами, за которым следует более медленная долгосрочная фаза снижения, зависящая от полностью дифференцированных долгоживущих PC. Поддержание уровня антител против SARS-CoV-2 в плазме крови и нейтрализующая активность на высоких уровнях продолжается до 3 месяцев, затем уровни Ат снижаются примерно до 6 месяцев, но нейтрализующая активность сохраняется у большинства пациентов до 15 месяцев [322]. Кроме того, нейтрализующая активность плазмы переболевших уханьским вариантом вируса SARS-CoV-2 была ниже в отношении вариантов Бета, Гамма и Дельта, особенно через 9-15 месяцев после заражения [67, 190]. Знание факторов,

влияющих на кинетику и продолжительность реакции нейтрализующих антител к SARS-CoV-2, необходимо для правильного определения приоритетов вакцинации. В исследовании, проведенном группой Y. Kim [147], было установлено постепенное снижение титров нейтрализующих Ат с течением времени со значительным снижением от 6 до 9 месяцев после заражения SARS-CoV-2. Это снижение с течением времени не зависело от пола, возраста и тяжести заболевания. Кроме того, титр нейтрализующих Ат был в 1,46 раза достоверно выше у лиц в возрасте старше 50 лет, чем у лиц моложе 50 лет, независимо от времени. Уровень этих Ат был в 2,41 раза выше в группе переболевших средней тяжести и тяжелой формой, чем в группе с легкой тяжестью заболевания, существенных различий по признаку пола не наблюдалось.

Поскольку COVID-19 – это новое заболевание, трудно предсказать, насколько долго будет сохраняться гуморальный иммунитет. Однако поскольку SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 и MERS-CoV принадлежат к одному и тому же классу новых коронавирусов, которые включают одноцепочечные РНК-вирусы с положительным смыслом и имеют определенный процент генетического сходства [116], можно сделать экстраполяции на основе изучения сохранения гуморального ответа после инфекций SARS-CoV-1 и MERS-CoV. Специфические к SARS-CoV-1 IgM в сыворотке крови большинства пациентов из Тайваня не обнаруживались уже после 6 месяцев от начала атипичной пневмонии. Специфические IgG к вирусу у этих пациентов обнаруживались не менее 1 года после начала заболевания [70]. Кроме того, было выявлено длительное сохранение Ат после вспышки инфекции MERS-CoV 2012 года в Иордании [217]. Нейтрализующие Ат были обнаружены у 6 (86%) из 7 человек в течение 34 месяцев после вспышки. Исходя из этих и других данных о длительности поддержания специфического гуморального иммунитета к SARS-CoV-1 и MERS-CoV, можно было ожидать, что специфический гуморальный ответ к SARS-CoV-2 будет достаточно продолжительным и способным эффективно защитить от повторных инфекций.

Однако, если в начале пандемии повторные заражения встречались редко, то с появлением штамма Омикрон, инфекции, им вызванные, прорвали

существующую на тот момент иммунную защиту. При этом участники трехлетнего продольного исследования PARIS показали преимущество гибридного иммунитета перед поствакцинальным (привиты преимущественно мРНК-вакцинами) и постинфекционным в защите от прорывных инфекций, вызванных вариантами Омикрона [269]. В течение 4 лет в результате массовой вакцинации и повторных инфекций, вызванных мутантными вариантами вируса SARS-CoV-2, выработался популяционный иммунитет. Предполагалось, что уровни сформировавшейся антительной защиты обеспечат снижение заболеваемости COVID-19 до уровня эндемии. На данный момент концентрации анти-S-IgG, способных защитить человека от заражения инфекцией, вызванной новыми мутантными штаммами вируса SARS-CoV-2, пересмотрены и составляют по разным данным от 603 и 1148 BAU/мл [208].

1.3 Вакцинация против вируса SARS-CoV-2

Высокая заболеваемость и смертность, связанные с пандемией COVID-19, сделали разработку вакцин против SARS-CoV-2 приоритетом глобального здравоохранения. Менее чем за 1 год несколько эффективных вакцин, нацеленных на S-белок SARS-CoV-2, на нескольких платформах, мРНК, инкапсулированная липидными наночастицами, инактивированный вирион или вакцинные платформы с вирусным вектором [115], получили разрешение на экстренное применение и были применены миллиардам людей по всему миру. В странах с высокими показателями вакцинации наблюдается заметное снижение числа инфекций, госпитализаций и смертей, хотя успех вакцинации был поставлен под угрозу появлением новых вариантов вируса, включая Бета, Гамма, Дельта и Омикрон, и недостаточно согласованными действиями в отношении процесса разработки и распространения вакцин [107].

Для любой вакцины, предназначенной для создания иммунитета, опосредованного Ат, доставка правильного по конформации белка имеет решающее значение. S-белок SARS-Cov-2 на поверхности вируса осуществляет его проникновение в клетку хозяина. Он достигает этого, подвергаясь масштабной перестройке, которая сближает вирусные и клеточные мембраны и

соединяет их. Таким образом, S-белок является динамичным и метастабильным белком, который имеет два основных конформационных состояния: префузионное и постфузионное. Отображение этого антигена таким образом, чтобы он сохранял химический состав исходного нативного S-белка и эпитопы, необходимо для получения высококачественных ответов нейтрализующих Ат. Состав и способ доставки вакцины также могут быть разработаны таким образом, чтобы влиять на функции Т-клеток и характер реакции. Необходимо индуцировать CD8+Т-клетки и стимулировать иммунный ответ типа CD4+Т-хелперов 1 (Th1), который обладает необходимыми противовирусными свойствами. Адьюванты могут быть использованы не только для улучшения интенсивности и продолжительности синтеза антител, индуцируемого вакцинами на основе белка, но также могут влиять на цитокиновые паттерны, производимые Т-клетками, и, таким образом, модулировать иммунные реакции [115].

1.3.1 – Вакцины, содержащие нереплицирующийся вирусный вектор

Векторные вакцины (Viral vector non-replicating (VVNR)) содержат генетический материал SARS-CoV-2, инкапсулированный в вирусную (векторную) оболочку; вектор проникает в клетки человека, но не реплицируется. Первоначально векторы были более популярны в генной терапии, и уже более 25 лет они используются для разработки вакцин [62, 310]. Наиболее распространенными векторами являются аденовирусы, вирусы герпеса, альфавирусы, а также вирусы кори, натуральной оспы и везикулярного стоматита. Все зарегистрированные вакцины типа VVNR против COVID-19 основаны на одном или нескольких из следующих аденовирусных векторов. Vaxzevria/Covishield состоит из вектора аденовируса шимпанзе ChAdOx1 [106]. Вакцина Ad26.COV2.S содержит рекомбинантный вектор аденовируса человека 26-го типа (Ad26) [251]. Вакцина «Гам-Ковид-Вак» («Спутник V») основана на рекомбинантных векторах аденовирусов типа 26 и типа 5 (Ad26 и Ad5) [174]. Вакцина Ad5-nCoV содержит аденовирусный вектор Ad5 [317]. Все вакцинные векторы несут фрагмент вирусной РНК, который кодирует S-белок вируса. Таким образом, синтез антигена SARS-CoV-2 происходит в клетках человека после

введения вакцины [317]. Даже однократная инъекция вакцины VVNR ассоциируется с достаточной иммуногенностью для достижения защитных титров антител [158, 290]. Это позволило разработать и одобрить однофазные вакцины «Спутник Лайт» и Ad26.COV2.S. Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, «Гам-КОВИД-Вак» или «Спутник V», была зарегистрирована 20.08.2020, дата переоформления 14.07.2021 ЛП-006395-231020. Разработчик вакцины, владелец регистрационного удостоверения и выпускающий контроль качества – ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Вакцина «Спутник V» состоит из 2-х доз, которые включают два компонента (два разных нереплицирующихся вирусных вектора): компонент I включает рекомбинантный аденовирус тип 26 (rAd26), а компонент II – рекомбинантный аденовирус тип 5 (rAd5). Оба вектора несут полноразмерный ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2. График вакцинации включает две дозы вакцины, основан на гетерогенном бустировании разными векторами, rAd26 и rAd5, последовательно с интервалом 21 день. Вакцина для профилактики COVID-19 «Спутник Лайт», дата регистрации 06.05.2021, представляет собой первый компонент (рекомбинантный аденовирус человека 26 серотипа (rAd26)) вакцины «Спутник V». Вакцинация «Спутник Лайт» проводилась однократно.

Вакцины соответствуют требованию ВОЗ WHO Target Product Profiles for COVID-19 Vaccines, April 2022 [313], прошли 3 фазы клинических испытаний [173, 174]. Вакцина «Спутник V» одобрена к применению в 71 стране, а «Спутник Лайт» – более чем в 30 странах.

Гипотетическое снижение иммунного ответа при наличии естественного иммунитета к переносчику или векторным вирусам не было подтверждено в исследованиях [270]. В то же время проблема сохранения иммуногенности VVNR при повторном введении вакцин остается актуальной [282]. Первым способом решения проблемы является чередование или использование различных векторов, что было реализовано в вакцине «Спутник V» [174]. Бустер с rAd5-S приводил к увеличению SARS-Cov-2-RBD-специфических IgG [173]. Второй способ избежать

нейтрализации вектора - использовать хорошо известные технологии, например, пегилированные формы [152], которые в настоящее время находятся в доклинической разработке и в основном используются в генной терапии [304].

1.3.2. Вакцины на основе нуклеиновых кислот

После доставки рибонуклеиновой (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в клетки хозяина синтезируются вирусные белки, инициирующие иммунный ответ и синтез антител к вирусу [216]. ДНК-вакцины считаются менее перспективной платформой из-за наличия дополнительных стадий формирования иммунного ответа, которые могут быть исключены с помощью РНК-вакцин. Тем не менее, первая ДНК-вакцина против COVID-19 (ZyCoV-D) была одобрена в Индии [188]. Вакцины Pfizer и Moderna содержат фрагмент мРНК, который кодирует целый S-белок, содержащий наибольшее количество иммуногенных эпитопов вируса [81, 252]. РНК-вакцины требуют использования систем доставки, которые могут защитить генетический материал от организма-хозяина до тех пор, пока он не попадет в антиген-представляющие клетки-мишени. В двух одобренных РНК-вакцинах (BNT162b2 и mRNA-1273) генетический материал защищен липидными наночастицами для доставки РНК [81, 252].

Иммунологическая память является основой защитного иммунитета, обеспечиваемого вакцинами и предыдущими инфекциями. Иммунологическая память может включать CD4⁺T-клетки и CD8⁺T-клетки памяти, Vm и долгоживущие PC. Аденовирусные векторные вакцины ChAdOx1 и Ad26.COV2.S вызывают специфический ответ CD8⁺T-клеток к S-белку у 51-64% людей в клинических испытаниях [251], хотя частота ответов снижается до 24-36% у лиц старше 65 лет. [251]. Стабильная память CD8⁺T-клеток на Ad26.COV2.S наблюдается по крайней мере 8 месяцев [42]. Сейчас уже доступны данные для сравнения между мРНК-вакцинами и аденовирусными векторными вакцинами по CD8⁺T-клеточной памяти. Аналогичные (примерно двукратные) специфические ответы к S-белку CD8⁺ T-клеток на вакцины мРНК и аденовирусные векторные вакцины наблюдаются примерно через 1 месяц после иммунизации 1 дозой Ad26.COV2.S [142, 280, 328], 2 дозами Ad26.COV2.S [142], или при

использовании в качестве 2-й дозы ChAdOx1 [228, 258]. Вакцины с мРНК и Ad26.COV2.S индуцировали сопоставимые частоты CD8⁺ Т-клеток, хотя их можно было обнаружить только у 60-67% испытуемых через 6 месяцев. Отличительной особенностью иммунизации Ad26.COV2.S была высокая частота CXCR3⁺ Vm. У вакцинированных мРНК наблюдалось значительное снижение уровня антител, в то время как Т- и В-клетки памяти были сравнительно стабильны [328]. В двух других исследованиях сообщалось об обратном [37, 80]: у 45 из 57 субъектов, вакцинированных Ad26.COV2.S и только у 20 из 116 вакцинированных BNT162b2 или мРНК-1273 субъектов определялись вирусспецифические CD8⁺ Т-клетки памяти [37]. В целом, память CD8⁺ Т-клеток на мРНК и векторные вакцины против COVID-19, по-видимому, одинакова по уровню и проценту респондентов, но выводы варьируются в зависимости от исследования. Необходимы дополнительные индивидуальные исследования или анализ Т-клеток памяти, включая исследование функциональности CD8⁺Т-клеток.

1.3.3 Белковые вирусные вакцины

Для разработки вакцин против COVID-19 необходим цельный S-белок, (вакцина Nuvaxovid (NVX-CoV2373), MVC-COV1901)) или его RBD, (вакцина Abdala (CIGB-66)), который отвечает за связывание вируса с ACE-2-рецептором [148]. ВОЗ считает вакцину ЭпиВакКорона белковой вакциной, но она содержит пептидные фрагменты S-белка SARS-CoV-2. Опубликованы результаты исследования эффективности и безопасности вакцины ЭпиВакКорона (3 фаза), однако на данный момент вакцина не используется для вакцинации населения [249]. В большинстве случаев белковые вакцины требуют адьюванта для усиления иммунного ответа [165]. Несмотря на большое количество вакцин-кандидатов, разработанных с использованием этой платформы, на сегодняшний день зарегистрировано только несколько вакцин, в основном в странах происхождения; остальные вакцины должны быть зарегистрированы в случае успешного завершения фазы 2/3 клинических испытаний.

1.3.4. Вакцины, содержащие инактивированный вирус

На сегодняшний день, по данным ВОЗ, для профилактики COVID-19 зарегистрировано 10 инактивированных вакцин, при этом две вакцины (BBIBP-CorV и CoronaVac) зарегистрированы в 88 и 53 странах соответственно, что делает их одними из наиболее широко используемых вакцин. Существенным недостатком инактивированных вакцин может быть относительно низкая иммуногенность по сравнению с мРНК или векторными вакцинами. Было показано, что титры нейтрализующих антител после вакцинации BNT162b2 (Comirnaty; Fosun–BioNTech) были значительно выше, чем у пациентов, получавших вакцину CoronaVac (Sinovac) [167]. Инактивированные вакцины являются хорошо зарекомендовавшей себя платформой; однако процесс производства требует тщательного контроля инактивации вируса, и могут потребоваться дальнейшие модификации одобренных или разработанных вакцин для улучшения их иммуногенности и эффективности.

1.3.5. Вакцинация и мутация SARS-CoV-2

На сегодняшний день циркулируют субварианты штамма Омикрон, которые отличаются от оригинального вируса, обнаруженного в Китае. Мутации в S-белке и, в частности, в домене RBD связаны со значительным снижением нейтрализующей активности антител у выздоравливающих или вакцинированных людей [312]. Клинические данные указывают на различное влияние мутаций SARS-CoV-2 на эффективность мРНК-вакцин. Было показано, что эффективность вакцин Pfizer и AstraZeneca против штамма Дельта вируса SARS-CoV-2 была снижена, различия были клинически незначительными. После введения однократной дозы вакцины эффективность против вариантов Альфа и Дельта составила 48,7% и 30,7% соответственно. Введение двух доз вакцины Pfizer привело к 93,7%-ной защите от инфекции, вызванной штаммом Альфа, и 88%-ной защите в случае инфицирования штаммом Дельта. Для вакцины AstraZeneca соответствующие значения составили 74,5 и 67% [302]. CoronaVac также была менее эффективна против штамма Дельта; в случае симптоматической инфекции, вызванной штаммом Альфа, она была эффективна на 67%, в то время как против

штамма Дельта она была эффективна на 59% [177]. Данные по способности вакцины «Спутник V» эффективно нейтрализовать мутантные варианты SARS-CoV-2 ограничены. Так, показано, что для штаммов, вызывающих озабоченность – Бета, Гамма и Дельта, наблюдалось статистически значимое снижение вируснейтрализующей активности сыворотки крови привитых вакциной «Спутник V» в 3,1, 2,8 и 2,5 раза соответственно [119]. Результаты исследования вируснейтрализующей активности сыворотки привитых вакциной «Спутник V» в Аргентине показывают, что эти сыворотки эффективно нейтрализовали штаммы уханьский и Альфа, хотя и с сильно различающимися титрами [130]. Те же сыворотки демонстрировали умеренные и заметно сниженные титры нейтрализации, соответственно, против штаммов E484K и Бета. Эти данные свидетельствуют о том, что наблюдение за нейтрализующей активностью, проявляемой сыворотками вакцинированных лиц, будет необходимо на постоянной основе. Исследования нейтрализации вируса могут указать, какие варианты SARS-CoV-2 способны прорвать иммунитет, индуцированный вакциной, и потребуются ли обновленные вакцины для контроля распространения новых мутантных штаммов [10, 237, 297, 331].

1.3.6 Сопоставление гуморального ответа при инфекции и вакцинации

Коррелятами вызванной вакциной защиты от COVID-19 являются титры нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 и концентрация антител, связывающихся с S-белком или рецепторсвязывающим доменом (RBD) [96, 111, 146]. Все современные вакцины против SARS-CoV-2 содержат или индуцируют экспрессию антигенов, сходных с антигенами раннего уханьского штамма, но отличаются по вызываемым связывающим и нейтрализующим ответам Ат. Более высокие ответы получены от вакцин с мРНК по сравнению с вакцинами с аденовирусным вектором или инактивированными вирусными вакцинами [87, 88].

Вакцины BNT162b2 и mRNA-1273 вызывают сильные кратковременные реакции нейтрализующих Ат и защитную эффективность [41, 225]. Однако высокие начальные титры нейтрализующих Ат в сыворотке крови, индуцируемые вакцинами с мРНК, уменьшаются к 3-6 месяцам и далее снижаются к 8 месяцам с

периодом полураспада примерно 60 дней [100, 306]. Серологические реакции на вакцину с мРНК Pfizer-BioNTech по сравнению с тяжелой инфекцией SARS-CoV-2 демонстрируют большее доминирование IgG над изотипами IgM и IgA, что указывает на эффективное переключение классов IgG. Различия в характере воспаления во время инфекции по сравнению с вакцинацией, а также различные анатомические компартменты, в которых инициируются иммунные реакции, могут привести к более узкому ответу Ат, наблюдаемому после вакцинации [242]. У вакцинированных мРНК BNT162b2 были выявлены концентрации Ат IgG к белкам N, RBD и S SARS-CoV-2, которые были сопоставимы с реакциями у тяжелобольных пациентов и выше, чем у пациентов с легкой или средней степенью заболевания; это достигло статистической значимости для Ат против N на 28 и 42 дни и для Ат против RBD на 42-й день [242]. По сравнению с инфекцией вакцина BNT162b2 индуцировала серологический ответ с преобладанием IgG при минимальных ответах IgM и IgA на S и S-домен RBD и N. Эти ответы были одинаковыми во всем возрастном диапазоне взрослых в исследовании, но показали более низкие уровни у лиц старше 60 лет.

В отличие от BNT162b2 и мРНК-1273, векторная вакцина Ad26.COV2.S индуцирует более низкие начальные титры нейтрализующих Ат [272], но эти реакции нейтрализующих Ат и клиническая эффективность довольно длительны в течение по крайней мере 8 месяцев [80, 328]. Данные реальных исследований эффективности показали изначально более высокую защиту с помощью BNT162b2 и мРНК-1273, чем с Ad26.COV2.S, но эти различия уменьшились через несколько месяцев [168]. Таким образом, BNT162b2 и мРНК-1273 индуцируют высокие начальные титры Ат, которые уменьшаются через несколько месяцев, тогда как векторная вакцина Ad26.COV2.S индуцирует более низкие начальные ответы Ат с большей стойкостью. В исследовании долгосрочного иммунного ответа у привитых вакциной «Спутник V» оценивалась персистенция и концентрация антител через 180 дней после вакцинации. Было установлено, что только 83% из тех, кто не сообщал об инфекции, имели Ат к SARS-CoV-2 [110]. Было показано, что у привитых вакциной «Спутник V» формируется стойкий В-

клеточный иммунитет [63], реакция Вm и Ат на «Спутник V» значительно зависела от того, была ли у вакцинируемого в анамнезе инфекция SARS-CoV-2 или нет [16]. В среднем, сыворотки от наивных реципиентов вакцины «Спутник V» были менее сильными с точки зрения их нейтрализующей способности по сравнению с сыворотками от вакцин с мРНК [169, 316], но они были на одном уровне с показателями, указанными для других вакцин на основе аденовируса [105, 332].

1.3.7 Снижение эффективности существующих вакцин против вариантов вируса SARS-CoV-2

В продольных исследованиях были проанализированы и сравнены образцы плазмы привитых вакциной BNT162b2 и пациентов, перенесших COVID-19 по S-связывающей и S-ACE2 блокирующей активности Ат против вариантов вируса Альфа, Бета и Гамма [242]. Связывание Ат с S-белком вариантов вируса SARS-CoV-2 и его антигеном RBD было снижено в одинаковой степени у вакцинированных и пациентов с COVID-19 с более заметным снижением для вариантов Бета и Гамма. Эти данные указывают на то, что мутантные варианты SARS-CoV-2 «уходят» от реакций антител, вызванных либо инфекцией, либо вакцинацией BNT162b2.

Было показано, что у вакцинированных лиц с прорывными инфекциями развиваются особенно устойчивые иммунные реакции. Эти данные свидетельствуют о том, что популяционный иммунитет к SARS-CoV-2 будет продолжать повышаться благодаря сочетанию широко распространенной вакцинации и инфекции [79, 110]. Появление новых вариантов вируса, снижение уровня антител после заражения или вакцинации [100, 161] и прорывные инфекции у ранее иммунизированных лиц [141] указывают на то, что периодическое повышение иммунитета к SARS-CoV-2 с помощью вакцин оправдано.

ГЛАВА 2 ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ ЛИЦ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 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. Диагноз COVID-19 устанавливался на основании клинической картины, данных КТ органов грудной клетки и наличия хотя бы одного положительного теста ПЦР на вирус SARS-CoV-2. 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. Проведенная вакцинация подтверждалась по наличию сертификата о прививках. 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 зависимости от срока, прошедшего после заболевания/вакцинации, обследуемые люди были разделены на подгруппы: 3мес., 6 мес., 9 мес., 12 мес., 15 мес., 18 мес., 24 мес., 30 мес., 36 мес. и 48 мес. 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, согласно этическим принципам, предъявляемым Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации [315], Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан, Правилами проведения клинической практики в РФ в соответствии с приказом МЗ РФ от 19.07.2003 No 266 [15].

Критерии включения пациентов в исследование

В состав обследуемых включены пациенты мужского и женского пола, соответствующие следующим критериям:

- 1) Возраст от 18 до 75 лет;
- 2) Наличие информированного письменного согласия пациента на участие в исследовании;
- 3) Способность к адекватному сотрудничеству в процессе исследования.

Критерии исключения пациента из исследования

К исследованиям не допускаются пациенты по следующим критериям:

- 1) Беременность, лактация;
- 2) Наличие декомпенсированных заболеваний, тяжелого течения гриппа или острых состояний, способных существенно повлиять на результат исследования;
- 3) Участие в любом другом клиническом испытании в последние 3 месяца.

Условия выбывания из исследования

- 1) значительное ухудшение состояния в период исследования;
- 2) отказ пациента от участия в исследовании.

На лиц, исключенных из исследования по каким-либо причинам, заполняется вся необходимая документация с указанием причины исключения из исследования.

Дизайн исследования представлен в таблице 2.1

Таблица 2.1 – Дизайн исследования

Параметры	Скрининг	Контрольные обследования	
		1 визит	2 визит
Процедура			
Получение информированного согласия	X		
Анализ критериев включения/исключения	X		
Общие данные (анамнез)	X		
Выявление субъективных жалоб пациента	X	X	X
Врачебное обследование	X	X	X
Серологическое исследование	X	X	X
Специфический клеточный иммунитет	X	X	X
Данные о побочных эффектах и нежелательных проявлениях	X	X	X
Заключительная оценка		X	X

В таблице 2.2. представлены данные о суммарном количестве выполненных тестов.

Таблица 2.2 – Количество выполненных лабораторных исследований.

Наименование теста	Количество выполненных анализов	Количество исследованных параметров в рамках данного теста
Определение антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 классов M, A и G	645	1378
Определение субклассов IgG-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2	645	2580
Определение avidности антител к S-белку вируса SARS-CoV-2	645	1290
Определение IgG-антител к N-белку вируса SARS-CoV-2	346	346
Определение субклассов IgG-антител к N-белку вируса SARS-CoV-2	346	1384
Определение avidности антител к N-белку вируса SARS-CoV-2	346	692
Индукцированная S-белком дегрануляция CD8 ^{high} лимфоцитов	645	1290
Индукцированная N-белком дегрануляция CD8 ^{high} лимфоцитов	346	692
Индукцированная S-белком продукция IFN- γ (ELISpot)	80	160
Индукцированная антигенными пептидами вируса SARS-CoV-2 продукция IFN- γ (ELISpot)	48	96
Итого:	4092	9908

2.2 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. Для выделения сыворотки пробы крови центрифугировали 6 мин при 3500 об/мин. Полученную сыворотку разливали в микропробирки типа эппендорф по 500 мкл, замораживали при температуре -70°C и хранили до использования.

Для выделения мононуклеаров периферической крови пробы гепаринизированной крови разводили в 2 раза забуференным фосфатами физиологическим раствором (ЗФР) и наслаивали на раствор фиколл-верографин,

$\rho = 1,077$ (ООО “ПанЭко”, Москва, РФ). Пробирки центрифугировали 20 минут при 1750 об/мин. Затем собирали мононуклеары, расположенные в виде кольца на границе сыворотки крови и градиента плотности, добавляли ЗФР до 10 мл и центрифугировали повторно 10 мин. при 1750 об/мин для удаления тромбоцитов [58]. Надосадок удаляли и добавляли 1 мл среды RPMI-1640 с добавлением 2мМ L-глутамина, гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Количество выделенных мононуклеаров подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток (по данным окрашивания трипановым синим) была не ниже 95%.

2.3 Определение количества иммуноглобулинов классов А, М и G к S-белку коронавируса

Оценку уровня IgA к антигенам SARS-CoV-2 проводили по разработанной ранее модификации ИФА [22, 233]. Исследуемые образцы предварительно разводили в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (РППС), внося в лунки планшета для предварительного разведения по 90 мкл РППС и 10 мкл сыворотки, тщательно перемешивая. Затем в лунки стрипов планшета с иммобилизованным рекомбинантным антигеном SARS-CoV-2 набора «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО Вектор-Бест, Новосибирск РФ) вносили по 90 мкл раствора для разведения сывороток (PPC) и по 10 мкл образцов, предварительно разведенных в 10 раз. Конечное разведение 1:100. В качестве отрицательного контроля использовали пул сывороток крови здоровых доноров, полученных в 2018 г. и так же разведенный 1:100. В качестве положительного контроля использовали пул сывороток от переболевших COVID-19, заранее оттитрованных и разведенных 1:100. Стрипы заклеивали пленкой и инкубировали 30 минут в термошейкере при температуре 37°C с интенсивностью перемешивания 700 об/мин. После 5-кратной промывки фосфатно-солевым буфером, в лунки стрипов вместо конъюгата из набора вносили по 100 мкл конъюгата моноклональных антител к IgA человека, меченных пероксидазой хрена (клон 14А/1Н9) в концентрации 1мкг/мл (Полигност, Санкт Петербург, РФ) и инкубировали их при условиях, указанных выше. Затем во все лунки, промытые

5-кратно фосфатно-солевым буфером, вносили субстрат: 0,025% раствор тетраметилбензидина из набора и инкубировали в защищенном от прямого солнечного света месте 25 минут при температуре от +18°C до +25°C, после чего вносили во все лунки по 100 мкл 4,9% раствора серной кислоты из набора в качестве стоп-реагента. Измерение оптической плотности растворов в лунках проводили на иммунологическом анализаторе Multiskan FC (Thermo Scientific, Финляндия) в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 620 нм в течение 5 минут после остановки реакции. Результаты оценивали в коэффициентах позитивности (КП) в отношении к отрицательному контролю. При этом учет результатов проводили при условии среднего значения ОП в лунках с отрицательным контролем не более 0,2, значения ОП в лунке с положительным контролем не менее 0,5. Критическое значение ОП считали по формуле $ОП_{крит} = ОП_{К^-} + 0,2$. КП вычисляли по формуле $КП = ОП_{обр}/ОП_{крит}$. Результат анализа считался положительным при $КП_{обр} > 1,1$, отрицательным - при $КП_{обр} < 0,8$, серая зона при $0,8 < КП_{обр} < 1,1$.

IgM-антитела к антигенам вируса SARS-CoV-2 определяли в сыворотке крови с помощью тест-системы «SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ» (АО Вектор-Бест, Новосибирск, РФ). Исследуемые образцы предварительно разводили в 100 раз, методика разведения указана выше, и вносили в лунки стрипов планшета с иммобилизованными моноклональными антителами к IgM человека. В две отдельные лунки вносили по 100 мкл контрольных образцов, положительный, содержащий IgM к SARS-CoV-2 и отрицательный, без IgM к SARS-CoV-2. Стрипы, заклеенные пленкой, инкубировали 30 мин в термошейкере при 37°C с интенсивностью перемешивания 700 об/мин. После 5-кратной промывки фосфатно-солевым буфером, в лунки стрипов вносили по 100 мкл конъюгата рекомбинантного антигена SARS-CoV-2 с пероксидазой хрена и инкубировали их в условиях, описанных выше. Затем во все лунки, промытые 5-кратно фосфатно-солевым буфером, добавляли 0,025% раствор тетраметилбензидина и инкубировали в защищенном от прямого солнечного света месте 25 минут при температуре от +18°C до +25°C. Реакцию останавливали, внося во все лунки по

100 мкл 4,9% раствора серной кислоты в качестве стоп-реагента. Оптическая плотность растворов в лунках измерялась на иммунологическом анализаторе Multiskan FC (Thermo Scientific, Финляндия) при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 620 нм в течение 5 минут после остановки реакции. Результаты оценивали в коэффициентах позитивности (КП). Результат анализа считался положительным при $KП > 1,1$, отрицательным – при $KП < 0,8$, пограничным при $0,8 < KП < 1,1$.

В начале исследований IgG-антитела к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови определяли полуколичественным методом, т.к. еще не были разработаны международные стандарты для проведения калибровки тест-систем, с помощью тест-системы «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО Вектор-Бест, Новосибирск, РФ). Исследуемые образцы предварительно разводили в 100 раз, методика разведения указана выше, и вносили в лунки стрипов планшета с иммобилизованным рекомбинантным полноразмерным тримером S-белка SARS-CoV-2. В две отдельные лунки вносили по 100 мкл контрольных образцов, положительный, содержащий IgG к SARS-CoV-2 и отрицательный, без IgG к SARS-CoV-2. Стрипы заклеивали пленкой и инкубировали 30 минут в термошейкере при температуре 37°C при перемешивании 700 об/мин. После 5-кратной промывки фосфатно-солевым буфером, в лунки стрипов вносили по 100 мкл конъюгата моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, подвергая их инкубации на термошейкере в условиях, обозначенных выше. Затем во все лунки, 5-кратно промытые фосфатно-солевым буфером, вносили субстрат (0,025% раствор тетраметилбензидина) и инкубировали в защищенном от прямого солнечного света месте 25 минут при температуре от +18°C до +25°C. Стоп-реагент, 4,9% раствора серной кислоты, вносили во все лунки по 100 мкл для остановки реакции. Измерение оптической плотности (ОП) растворов в лунках проводили на иммунологическом анализаторе Multiskan FC, (Thermo Scientific, Финляндия) при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 620 нм в течение 5 минут после остановки реакции. Результаты оценивали в КП. На рисунке 2.1 представлено распределение результатов определения уровней анти-S

IgG-антител, где по оси абсцисс представлен уровень анти-S-IgG, выраженный в КП, а по оси ординат – количество людей, отнесенных в соответствующую группу. Из рисунка видно, что распределение носит двугорбый характер, что свидетельствует о неоднородности популяции.

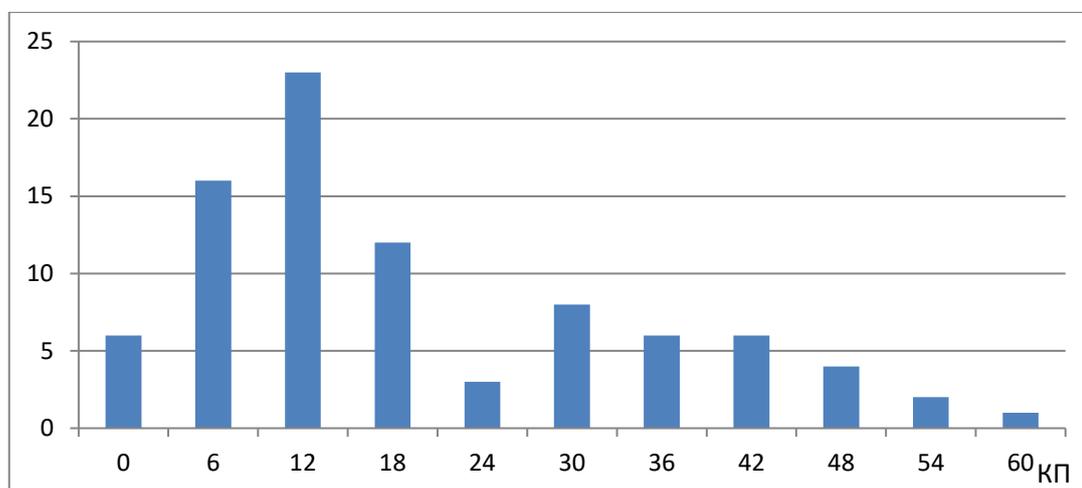


Рисунок 2.1 – Распределение переболевших COVID-19 по уровню анти-S антител, выраженному в КП

Для разделения когорты обследованных лиц на отвечающих на инфицирование SARS-CoV-2 синтезом IgG-антител к S-белку высокого или низкого уровня был проведен ROC-анализ. На рисунке 2.2 представлена ROC-кривая. Площадь под кривой AUC=1,0.

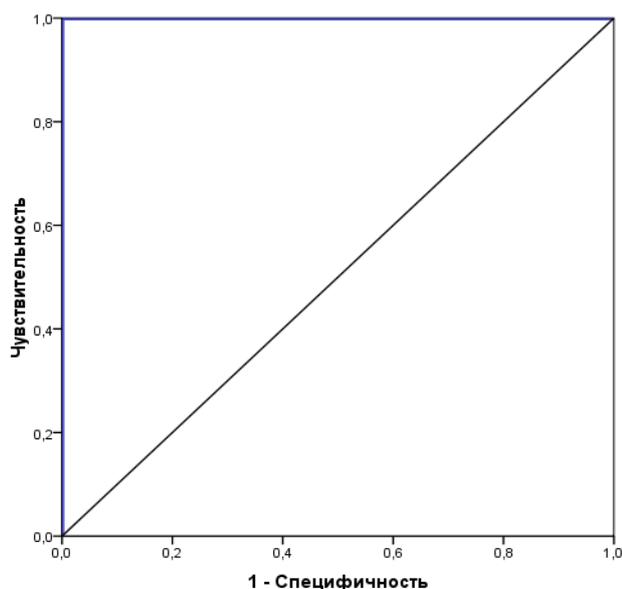


Рисунок 2.2 – ROC- кривая разделения на высокий и низкий уровень IgG антител к S-белку вируса SARS-CoV-2, выраженный в КП

Полученные результаты говорят о высоком качестве разделительной модели. Был рассчитан пороговый критерий cut-off, позволяющий разделить высокий и низкий уровень антител к S-белку. Cut-off = 10,13 КП, мы округлили и приняли пороговый критерий равным 10 КП.

Последующее ретестирование для количественного определения антител в международных единицах (BAU/ml, Binding Antibody Units/ml, First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin, [309]) на IgG-антитела к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови проводили с помощью тест-системы «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск, РФ). В лунки планшета с иммобилизованным рекомбинантным антигеном SARS-CoV-2 вносили по 100 мкл калибровочных образцов, содержащих известные количества IgG к SARS-CoV-2 – 0, 10, 200, 500, 1250, 2500, 5000 BAU/ml, и контрольного образца, содержащего IgG к SARS-CoV-2 в пределах, указанных в паспорте и на этикетке флакона, в BAU/ml. В остальные лунки планшета вносили по 100 мкл предварительно разведенных в 100 раз исследуемых образцов. Стрипы заклеивали пленкой и инкубировали 30 минут в термошейкере при температуре 37°C с интенсивностью перемешивания 700 об/мин. После 5-кратной промывки фосфатно-солевым буфером, в лунки стрипов вносили по 100 мкл конъюгата моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена и инкубировали при условиях, указанных выше. Затем во все лунки, промытые 5-кратно фосфатно-солевым буфером, вносили 0,025% раствор тетраметилбензидина и инкубировали в защищенном от прямого солнечного света месте 25 минут при температуре от +18°C до +25°C, после чего вносили во все лунки по 100 мкл 4,9% раствора серной кислоты в качестве стоп-реагента. Измерение оптической плотности растворов в лунках проводили на иммунологическом анализаторе Multiskan FC (Thermo Scientific, Финляндия) в двухволновом режиме: при основной длине волны 405 нм и длине волны сравнения 620 нм в течение 5 минут после остановки реакции, согласно инструкции к набору. Оценку результатов производили путем построения калибровочного графика зависимости значения оптической плотности от

концентрации IgG к S-белку SARS-CoV-2 и определения концентрации IgG к S-белку SARS-CoV-2 в анализируемых образцах по калибровочному графику. На рисунке 2.3 представлено распределение уровня IgG антител к S-белку коронавируса, где на оси ординат представлено количество лиц, у которых определялись соответствующие уровни анти-S-IgG в ВАУ/мл, отложенные на оси абсцисс.

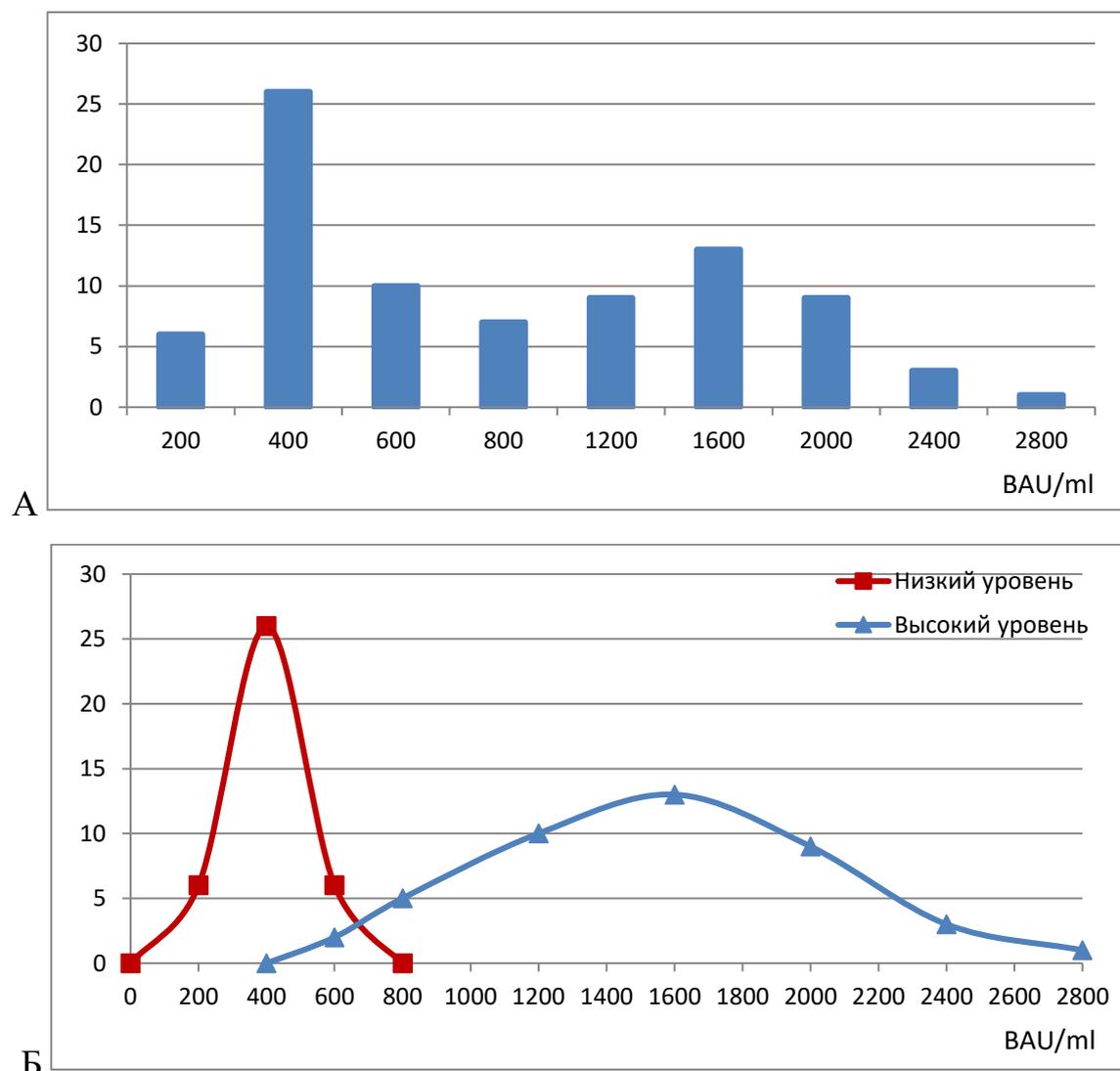


Рисунок 2.3 – Распределение уровня антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 (BAU/ml)

Примечание:

А Количество людей, имеющих соответствующий уровень антител к S-белку вируса SARS-CoV-2

Б Предполагаемое разделение на высокий и низкий уровень антител к S-белку вируса SARS-CoV-2

На рисунке явно видно, что характер распределения имеет вид двугорбой кривой, что свидетельствует о сочетании двух распределений с высоким и низким уровнем антител. Для анализа этого явления результаты определения уровня IgG к S-белку SARS-CoV-2 в ВАУ/мл были подвергнуты ROC-анализу. На рисунке 2.4 представлена полученная ROC-кривая. Площадь под кривой $AUC=1,0$. Полученные данные свидетельствуют о высокой степени соответствия разделительной модели. Рассчитанное пороговое разделяющее значение (cut-off) составило 602,7 ВАУ/мл. Мы округлили пороговый критерий до 600 ВАУ/мл. Уровень IgG к S-белку SARS-CoV-2 ниже 600 ВАУ/мл расценивался как низкий, уровень выше 600 ВАУ/мл – как высокий.

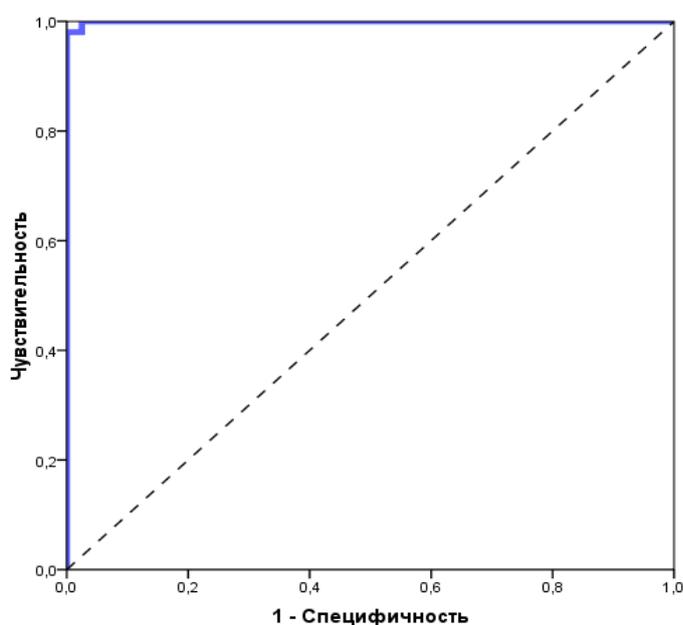


Рисунок 2.4 – ROC- кривая разделения на высокий и низкий уровень IgG антител к S-белку вируса SARS-CoV-2

2.4 Определение количества иммуноглобулинов класса G к N-белку коронавируса

IgG-антитела к N-белку вируса SARS-CoV-2 определяли в сыворотке крови с помощью «Набора реагентов для иммуноферментного количественного определения антител человека класса IgG к N-белку SARS-CoV-2 (N-CoV-2-IgG PS)» (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, РФ). Исследуемые образцы сыворотки предварительно разводили в 20

раз: в лунки планшета для разведения вносили по 190 мкл раствора для разведения исследуемых проб (РИП) и добавляли по 10 мкл сыворотки. В лунки А-Г стрипа 1 планшета с иммобилизованным N-белком SARS-CoV-2 вносили по 100 мкл предварительно разведенных калибраторов 60 у.е./мл, 30 у.е./мл, 15 у.е./мл, 7,5 у.е./мл, 3,75 у.е./мл, 1,86 у.е./мл, 0,93 у.е./мл, соответственно. В лунку Н стрипа 1 вносили 100 мкл отрицательного контроля, не содержащего IgG-антитела к N-белку вируса SARS-CoV-2. В лунку А стрипа 2 вносили 100 мкл положительного контроля с IgG-антителами к N-белку вируса SARS-CoV-2. В остальные лунки планшета вносили по 20 мкл предварительно разведенных в 20 раз образцов сыворотки крови и 80 мкл раствора для разведения исследуемых проб, конечное разведение образцов составляло 1:100. Стрипы заклеивали пленкой и инкубировали в течение 1 часа при температуре 37°C. После 3-кратной промывки фосфатно-солевым буфером во все лунки планшета вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата моноклональных антител к тяжелой цепи IgG человека, меченных пероксидазой хрена, и повторно инкубировали течение 1 часа при температуре 37°C, повторяя процедуру промывки после инкубации. Далее в каждую лунку планшета вносили по 100 мкл тетраметилбензидина и инкубировали в защищенном от света месте при температуре от +18°C до +22°C в течение 10 минут, ферментативную реакцию останавливали внесением стоп-реагента, 1 N раствора серной кислоты, по 50 мкл во все лунки. Измерение оптической плотности растворов в лунках проводили на иммунологическом анализаторе Multiskan FC (Thermo Scientific, Финляндия) в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 620 нм в течение 15 минут после остановки реакции. Оценку результатов производили путем построения калибровочного графика зависимости значения оптической плотности от концентрации IgG к N-белку SARS-CoV-2 в калибровочных образцах и определения концентрации IgG к N-белку SARS-CoV-2 в анализируемых образцах по калибровочному графику, находя по графику значения концентраций, соответствующих значениям оптической плотности исследуемых сывороток. Эти значения умножали на 100 в соответствии с разведением образцов сыворотки

крови 1:100 и выражали в у.е./мл. Исследуемые образцы, у которых рассчитанная концентрация была ниже 100 у.е./мл, считались отрицательными. При этом, концентрация > 3000 у.е./мл оценивалась как очень высокий, концентрация 3000-1501 у.е./мл - как высокий, 1500-751 у.е./мл - как средний, 750-187 у.е./мл - как низкий, 186-100 у.е./мл - как очень низкий уровень IgG к N-белку SARS-CoV-2, соответственно. Позднее, в связи с созданием первого международного стандарта [153] были произведены сопоставление калибровочных проб набора с калибровочной кривой международного стандарта и пересчет у.е./мл в ВАУ/мл [8], коэффициент пересчета определен как $1 \text{ ВАУ/мл} = 5,97 \text{ УЕ/мл}$, $r = 0,999$.

Как и в случае с IgG-антителами к S-белку, результаты определения уровня IgG к N-белку SARS-CoV-2 в ВАУ/мл были подвергнуты ROC-анализу. На рисунке 2.5 представлена полученная ROC-кривая. Площадь под кривой $AUC=1,0$. Полученные данные свидетельствуют о высокой степени соответствия разделительной модели. Рассчитанное пороговое разделяющее значение (cut-off) составило 603,9 ВАУ/ml. Мы также округлили пороговый критерий до 600 ВАУ/ml. Уровень IgG к N-белку SARS-CoV-2 ниже 600 ВАУ/ml расценивался как низкий, уровень выше 600 ВАУ/ml – как высокий.

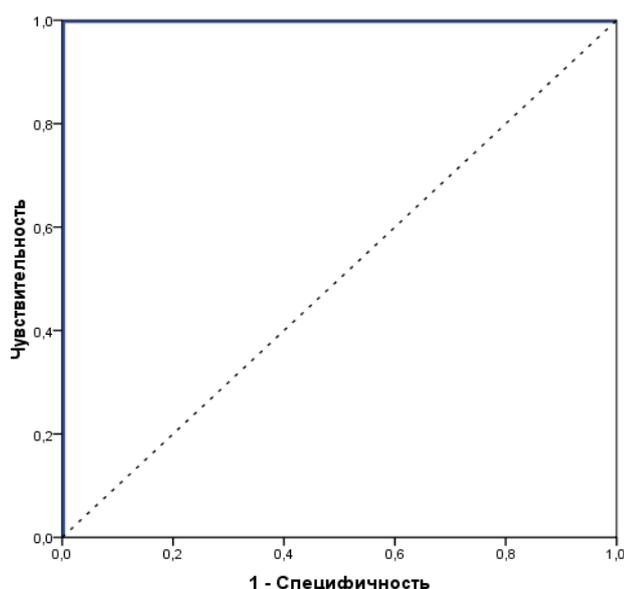


Рисунок 2.5 – ROC- кривая разделения на высокий и низкий уровень IgG антител к N-белку вируса SARS-CoV-2

2.5 Определение субклассов IgG-антител к антигенам вируса SARS-CoV-2

Оценку уровня субклассов IgG-антител к антигенам SARS-CoV-2 проводили по разработанной ранее модификации ИФА [24]. В качестве отрицательного контроля был взят пул сывороток крови здоровых доноров, полученных в 2018 г., в разведении 1:100. Исследуемые образцы предварительно разводили в 100 раз по методике, указанной в разделе 2.5, и вносили в лунки стрипов планшета с иммобилизованным рекомбинантным S-антигеном SARS-CoV-2 набора «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО Вектор-Бест, Новосибирск, РФ) или в лунки стрипов планшета с иммобилизованным N-белком SARS-CoV-2 «Набора реагентов для иммуоферментного количественного определения антител человека класса IgG к N-белку SARS-CoV-2 (N-CoV-2-IgG PS)» (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, РФ). Стрипы, заклеенные пленкой, инкубировали 30 минут в термошейкере при температуре 37°C с интенсивностью перемешивания 700 об/мин. После 5-кратной промывки фосфатно-солевым буфером, в лунки стрипов вместо конъюгата из набора вносили по 100 мкл конъюгатов меченных пероксидазой анти-IgG1 (клон 10G/2C11) - стрип 1, анти-IgG2 (клон 23G/3C7) - стрип 2, анти-IgG3 (клон 22G/5G12) - стрип 3 и анти-IgG4 (клон 20G/5C7) - стрип 4 моноклональных антител (ООО Полигност, Санкт-Петербург, РФ) в концентрации 1 мкг/мл, подвергая их далее инкубации в условиях, описанных выше. Затем во все лунки, после 5-кратной промывки фосфатно-солевым буфером, вносили субстрат: 0,025% раствор тетраметилбензидина и инкубировали в защищенном от прямого солнечного света месте 25 минут при температуре от +18°C до +25°C, после чего вносили во все лунки по 100 мкл 4,9% раствора серной кислоты в качестве стоп-реагента. Оптическую плотность растворов в лунках измеряли на иммунологическом анализаторе Multiskan FC (Thermo Scientific, Финляндия) в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 620 нм в течение 5 минут после остановки реакции. Результаты

оценивали в коэффициентах позитивности (КП) в отношении к отрицательному контролю.

2.6 Определение индекса avidности антител к антигенам вируса SARS-CoV-2

На момент проведения исследований не было стандартных тест-систем для определения индекса avidности Ат к S-белку вируса SARS-CoV-2. В то же время, этот параметр отражает важные характеристики гуморального иммунного ответа. Во время иммунного ответа идёт клональный отбор В-клеток, они генерируют IgG со все более высоким сродством к антигену на своей поверхности [123]. Силу связывания Ат с эпитопом-мишенью назвали avidностью или функциональной аффинностью. Ат с низкой avidностью обычно вырабатываются на ранних стадиях гуморального иммунного ответа [69], с дальнейшим созреванием avidности и формированием В-клеток памяти [195], которые могут генерировать высокоавидные IgG при повторной встрече с антигеном [54, 231] Avidность Ат может быть измерена различными методами, такими как осаждение сульфатом аммония, твердофазный радиоиммунологический анализ, поверхностный плазмонный резонанс и модифицированный ИФА [82, 124, 184]. Суть метода определения индекса avidности с помощью ИФА состоит в том, что исследуемая сыворотка добавляется в 2 лунки с сорбированным антигеном. После инкубации, необходимой для связывания Ат с антигеном, и отмывки, в одну лунку добавляют физиологический раствор, а в другую – денатурирующий раствор, чаще всего – раствор мочевины. После инкубации и отмывки добавляют конъюгат и проводят все последующие этапы для определения антител. Затем рассчитывают процент антител, оставшихся в лунке после обработки денатурирующим раствором, приняв за 100% уровень антител в необработанной лунке.

В связи с отсутствием сертифицированных наборов для определения индекса avidности Ат к антигенам вируса SARS-CoV-2, в имеющихся статьях в мировой литературе на эту тему каждый исследователь самостоятельно отработывал условия добавления денатурирующего раствора [46, 47, 172]. Анализ с разными концентрациями мочевины позволяет определить отчетливые различия

в созревании авидности, для IgG к N-белку, обработанных 5,3 М мочевиной был установлен cut-off индекса авидности 0,5, а для 7 М мочевины cut-off индекса авидности 0,3 определен как лучший для практического использования [46]. Ввиду более высокой изменчивости индексов авидности для IgG к RBD и S1, по сравнению со значениями, полученными для N-белка, можно использовать растворы мочевины в диапазоне 5,3 - 7 М [46].

Нами также была предпринята отработка методики определения индекса авидности Ат к антигенам вируса SARS-CoV-2. Для этой цели были отобраны пробы сыворотки крови пациентов, перенесших ПЦР-подтвержденный COVID-19 и имевших IgG-антитела к антигенам вируса SARS-CoV-2. При этом 37 человек имели давность заболевания 1-3 месяца – первичный иммунный ответ и 37 человек, перенесшие повторный COVID-19 (инфекция, вызванная штаммом Омикрон) через 9-12 месяцев после первого заболевания – вторичный иммунный ответ. Проанализировав вышеприведенные литературные данные, мы выбрали следующие параметры: концентрация раствора мочевины - 6М, время инкубации – 10 мин при комнатной температуре (от +18°C до +25°C).

Процедура определения индекса авидности Ат проводилась с использованием тест-системы «SARS-CoV-2-IgG-количественный-ИФА-Бест», (АО «Вектор-Бест», Новосибирск, РФ). Исследуемые образцы были разведены в 100 раз по методике, указанной в разделе 2.5, и каждый добавлен в 2 лунки планшета с иммобилизованным рекомбинантным S-белком SARS-CoV-2 в два соседних стрипа по 100 мкл. Планшет инкубировали в термошейкере в течение 30 минут при температуре +37°C. Затем планшет промывали 5 раз промывочным раствором согласно инструкции к набору. После промывания в лунки первого стрипа с исследуемыми образцами вносили по 200 мкл фосфатного буфера, а в лунки второго стрипа - по 200 мкл 6М раствора мочевины, с последующей инкубацией в течение 10 минут при комнатной температуре (от +18°C до +25°C). По окончании инкубации планшет со стрипами был промыт 5 раз. Затем во все лунки вносили конъюгат из набора по 100 мкл и 30 минут инкубировали в термошейкере при температуре +37°C. После инкубации промывали все лунки 5

раз промывочным раствором. Во все лунки вносили по 100 мкл ТМБ (тетраметилбензидин 0,025%) и инкубировали в защищённом от прямого солнечного света месте до 25 минут при комнатной температуре (от +18°C до +25°C). По завершении в каждую лунку было добавлено по 100 мкл стоп-реагента (серная кислота 4,9%). Измерение оптической плотности растворов в лунках проводили на иммунологическом анализаторе Multiskan FC (Thermo Scientific, Финляндия) в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 620 нм в течение 5 минут после остановки реакции. Индекс avidности выражали в процентах оптической плотности образца, обработанного 6 М мочевиной, за 100% принимали оптическую плотность образца, не обработанного мочевиной.

При выбранных условиях проведения теста минимальное значение индекса avidности 13,7% было получено в пробе сыворотки крови от пациента через 1 месяц после начала заболевания, максимальные значения – 100% – были получены у трех пациентов после повторного заболевания COVID-19, вызванного штаммом Омикрон. Полученные результаты представлены на рисунке 2.6, где по оси абсцисс – индекс avidности в процентах, а по оси ординат – количество переболевших, у которых определялся соответствующий индекс avidности. Следовательно, при выбранных нами условиях проведения теста был получен максимальный размах параметра индекса avidности.

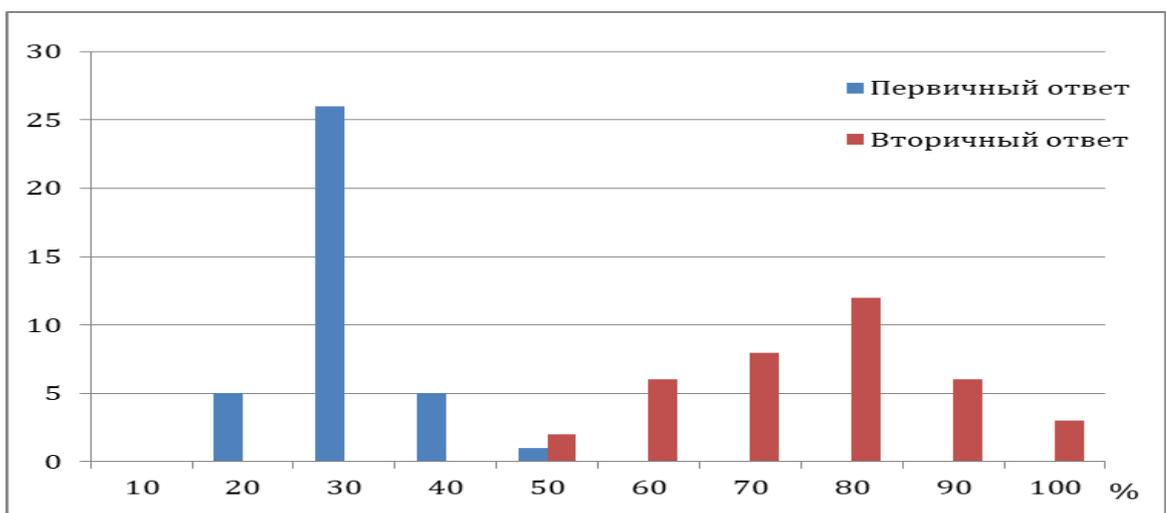


Рисунок 2.6 – Распределение индекса avidности антител к S-белку вируса SARS-CoV-2

Это позволяет оценить весь спектр индекса avidности A_t . Из рисунка видно, что при первичном иммунном ответе на S-белок SARS-CoV-2 индекс avidности не превышал 50%, максимум в интервале 20-30%, среднее значение индекса avidности IgG составило 26,29%. При вторичном иммунном ответе индекс avidности достиг 100% у части исследуемых, с максимумом на интервале 70-80%, и средним значением 79,26%. Результаты определения индекса avidности были подвергнуты ROC-анализу. На рисунке 2.7 представлена ROC-кривая. Площадь под кривой $AUC=1,0$.

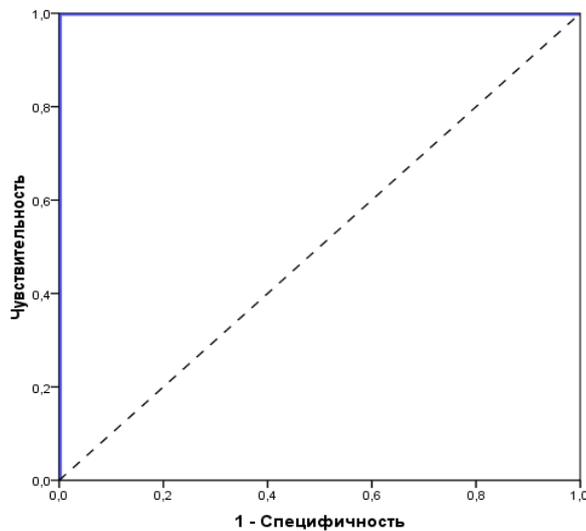


Рисунок 2.7 – ROC- кривая разделения первичного и вторичного иммунного ответа по индексу avidности антител к S-белку вируса SARS-CoV-2

Полученные данные свидетельствуют о высокой степени соответствия разделительной модели. Рассчитанное пороговое разделяющее значение (cut-off) составило 48,5%. Таким образом, предложенная нами модификация позволяет оценивать индекса avidности A_t к S-белку вируса SARS-CoV-2. Значения индекса avidности менее 48,5% соответствует первичному ответу, а более 48,5% – вторичному.

2.7 Определение клеточного иммунитета с помощью антиген-индуцированной дегрануляции цитотоксических Т-клеток

Известно, что уничтожение инфицированных вирусом клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами идет контактным способом через Fas-Fas-

лиганд, с индукцией апоптоза таких клеток вместе с содержащимся в них вирусом, а также с помощью перфоринов и гранзимов, которые Т-лимфоцит, распознавший зараженную вирусом клетку, вбрасывает в клетку из своих гранул. Стабильность мембраны таких гранул внутри Т-лимфоцита обеспечивает CD107a или LAMP-1, это белок, относящийся к семейству LAMP (lysosomal-associated membrane protein) [32]. Экспрессию CD107a на поверхности стимулированных антигеном CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов, используют как функциональный маркер, позволяющий подсчитать процент цитотоксических Т-лимфоцитов, отвечающих на данный антиген [14].

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, конечный объем в лунке составлял 200 мкл (отрицательный контроль). Стимуляцию мононуклеаров производили сорбированным на дне лунок набора «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО Вектор-Бест, Новосибирск, РФ) полноразмерным S-антигеном вируса SARS-CoV-2 или N-белком, иммобилизованным на дне лунок «Набора реагентов для иммуноферментного количественного определения антител человека класса IgG к N-белку SARS-CoV-2 (N-CoV-2-IgG PS)» (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, РФ). Предварительная стерилизация лунок была проведена 30-минутным ультрафиолетовым облучением. Контрольные и опытные пробы инкубировали 20 часов при 37°C во влажной атмосфере и 5% CO₂. Затем мононуклеары ресуспендировали, помещали в пробирки для проточной цитометрии и отмывали центрифугированием (300g 5 мин) в растворе CellWash. Окрашивание мононуклеаров проводили антителами к антигену CD8-FITC в течение 20 минут в защищенном от света месте при 4°C, отмывали и фенотипировали на проточном цитометре BD FACSCantoII (технологии и программное обеспечение Becton Dickinson, США). На рисунке 2.8 представлены последовательные этапы гейтирования. Для анализа выделяли лимфоидный гейт (R1), в нем в режиме FITC-SSS выделяли гейт (R2) лимфоцитов, высоко

экспрессирующих антиген CD8 ($CD8^{high}$) – это субпопуляция цитотоксических Т-лимфоцитов. Далее на графике CD107a-PE-Cy5 против CD8-FITC подсчитывали процент дважды положительных клеток.

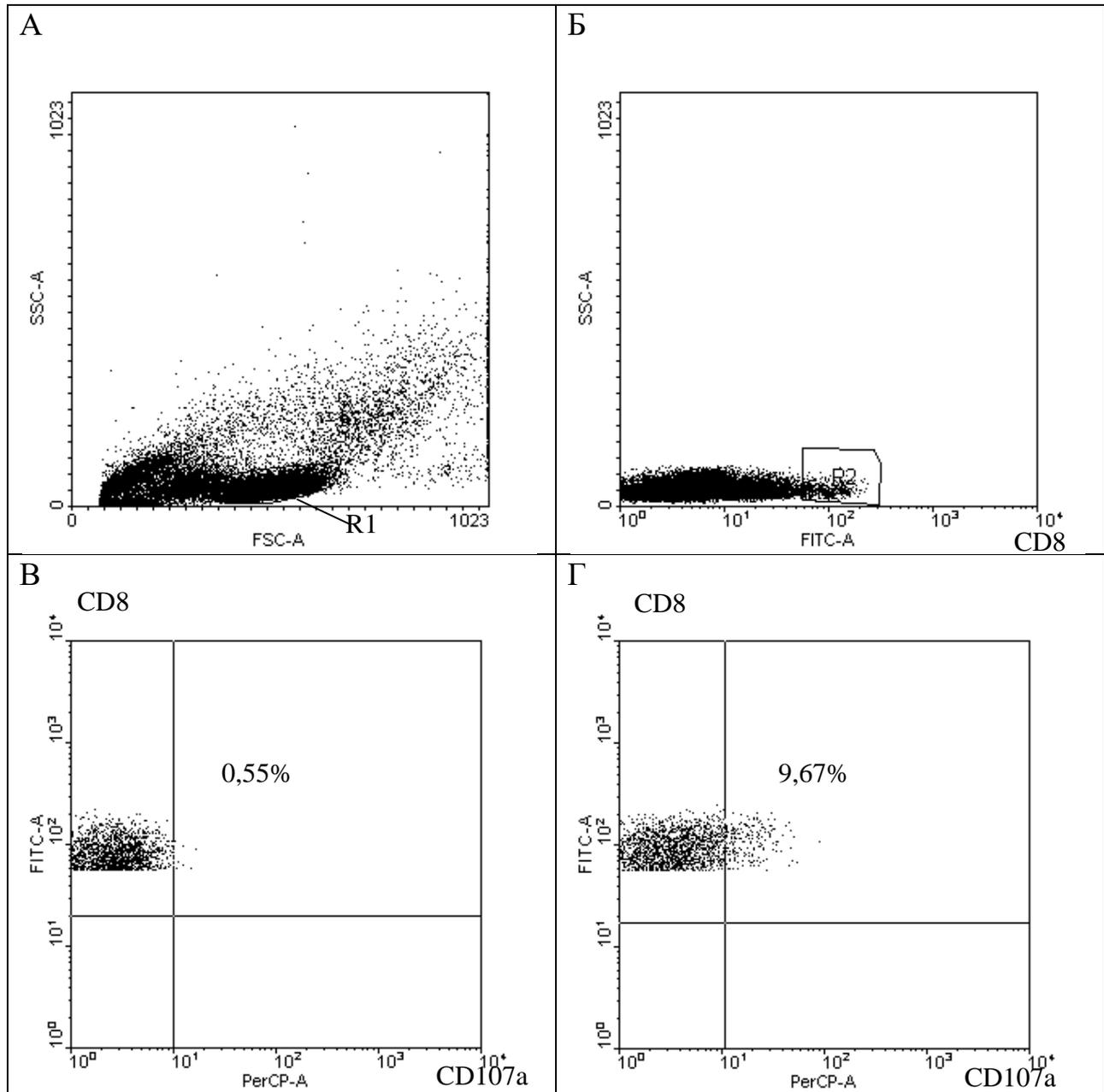


Рисунок 2. 8 – Пример оценки клеточного иммунитета по экспрессии CD107a на CD8^{hi} лимфоцитах

Примечание:

A – выделение лимфоидного гейта R1

B – выделение гейта CD8^{high} R2

B – спонтанная экспрессия CD107a на CD8^{high} лимфоцитах

G – индуцированная S-белком экспрессия CD107a на CD8^{high} лимфоцитах

Полученное число отражает процент цитотоксических лимфоцитов, распознавших антигены S-белка коронавируса и ответивших цитотоксической реакцией, заключающейся в выделении содержимого цитотоксических гранул относительно общего количества $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов. На рисунке 2.9 представлено распределение, выраженное в процентах, $CD8^{\text{high}}$ лимфоцитов, распознавших S-белок вируса SARS-CoV-2, и ответивших экспрессией CD107a.

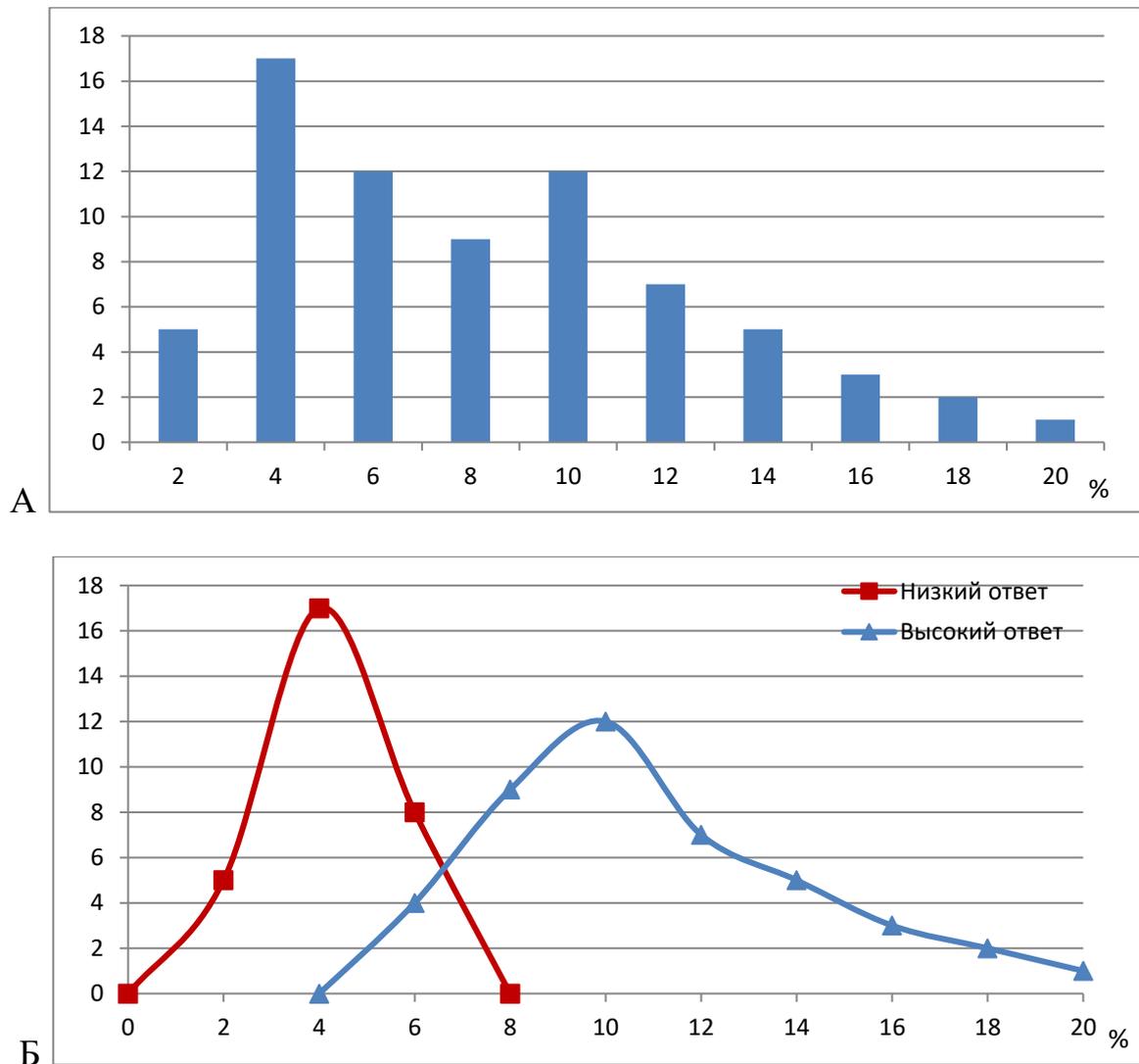


Рисунок 2.9 – Распределение уровня экспрессии CD107a на $CD8^{\text{high}}$ лимфоцитах, распознавших S-белок вируса SARS-CoV-2

Примечание:

А Количество людей, имеющих соответствующий уровень клеточного ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2

Б Предполагаемое разделение на высокий и низкий уровень клеточного ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2

Уровень спонтанной экспрессии CD107a на CD8^{high} лимфоцитах составляет менее 1%. Уровень в 1% принят в качестве значения cut-off, отделяющего отрицательный и положительный клеточный ответ на антиген. На рисунке явно видно, что характер распределения имеет вид двугорбой кривой, что свидетельствует о сочетании двух распределений с высоким и низким уровнем клеточного ответа.

Для анализа этого явления результаты клеточного ответа на S-белок SARS-CoV-2 были подвергнуты ROC-анализу. На рисунке 2.10 представлена полученная ROC-кривая. Площадь под кривой AUC=1,00.

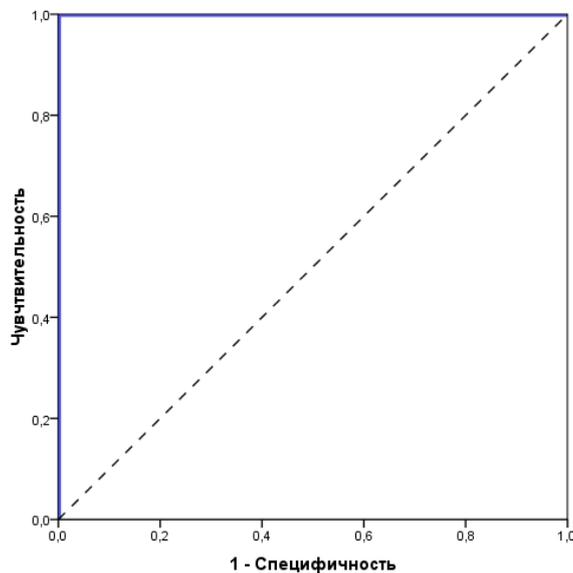


Рисунок 2.10 – ROC- кривая разделения на высокий и низкий уровень клеточного ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2

Полученные данные свидетельствуют о высокой степени соответствия разделительной модели. Рассчитанный cut-off составил 5,935%. Мы округлили значение порогового уровня до 6%. Уровень T-клеточного ответа на S-белок SARS-CoV-2 ниже 6% расценивался как низкий, уровень выше 6% – как высокий.

Аналогичные расчеты были проведены для T-клеточного ответа на N-белок SARS-CoV-2. ROC-анализ выявил высокую степень соответствия разделительной модели. На рисунке 2.11 представлена полученная ROC-кривая, площадь под

кривой $AUC=1,00$. Рассчитанное пороговое разделяющее значение (cut-off) составило 6%, что позволило с чувствительностью и специфичностью 100% разделить высокий уровень Т-клеточного ответа на N-белок SARS-CoV-2 – выше 6% и низкий уровень – ниже 6%.

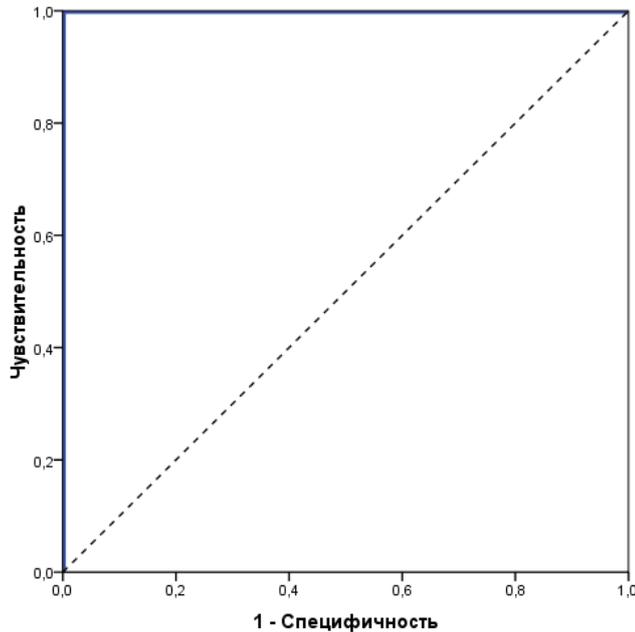


Рисунок 2.11 – ROC- кривая разделения на высокий и низкий уровень клеточного ответа на N-белок вируса SARS-CoV-2

2.8 Определение клеточного иммунитета методом ELISpot

Для оценки клеточного иммунитета методом ELISpot использовали две модификации метода. В первой модификации в лунки стрипа 96-луночной панели от набора для определения продукции IFN- γ методом ELISpot («Human IFN- γ ELISpot», Mabtech, Швеция) добавляли мононуклеары в количестве $2,5 \times 10^5$ и инкубировали 20 часов при 37°C во влажной атмосфере и 5% CO_2 – контрольная проба. Мононуклеары опытной пробы в таком же количестве стимулировали S-антигеном, как описано выше (для метода дегрануляции CD8+ Т-лимфоцитов, см. раздел 2.7). Далее пробы инкубировали 4 часа при 37°C во влажной атмосфере и 5% CO_2 . Предварительные опыты показали, что 4 часов достаточно для того, чтобы моноциты собрали антиген. Затем тщательно ресуспендированные клетки переносили в лунки стрипа набора для ELISpot, их инкубация проводилась при

описанных выше условиях еще 16 часов. Далее лунки промывали 5-кратно ЗФР по 200 мкл на лунку. Конъюгат, разведенный 1:200 бессывороточной средой RPMI-1640, вносили по 100 мкл на лунку с последующей инкубацией 2 часа при комнатной температуре, после чего лунки повторно промывали 5-кратно ЗФР. Готовый ТМБ-субстрат вносили по 100 мкл на лунку, затем инкубация шла при комнатной температуре до появления видимых пятен, по инструкции производителя. Жидкость из лунок удаляли, промывали их 2 раза вначале деионизированной, затем проточной водой. Поддон снимали, промывали мембрану с обратной стороны. Стрипы сушили на фильтровальной бумаге в защищенном от света месте при комнатной температуре.

Во второй модификации для оценки клеточного иммунитета использовали набор реагентов для определения Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2 «Corona-T-test» методом ELISpot (ФГБУ «НМИЦ гематологии», Россия) [286], где в качестве антигена выступали специально подобранные пептиды S- и N-белка вируса SARS-CoV-2. Тест проводили в нашей модификации. Мононуклеары добавляли в лунки стрипа 96-луночной панели в количестве $2,5 \times 10^5$. Клетки контрольной пробы инкубировали в культуральной среде, к клеткам опытной пробы добавляли смесь пептидов белков вируса SARS-CoV-2 в конечной концентрации 1 $\mu\text{M}/\text{мл}$. Инкубация проходила при 37°C во влажной атмосфере и 5% CO₂ 20 часов, затем содержимое лунок удаляли и промывали 5-кратно 200 мкл ЗФР. Далее вносили раствор А (конъюгат антител к IFN- γ с биотином) по 50 мкл на лунку, повторная инкубация шла 2 часа при комнатной температуре в защищенном от света месте. Лунки повторно промывали 5-кратно ЗФР. Раствор В (концентрированный раствор конъюгата стрептавидина, с щелочной фосфатазой) разводили 1:100 буфером В, вносили по 50 мкл в каждую лунку с последующей инкубацией 30 мин при комнатной температуре в темноте. Далее, в промытые 5-кратно ЗФР и 2-кратно дистиллированной водой лунки вносили по 50 мкл раствора С (субстрат для щелочной фосфатазы BCIP/NBT+). Инкубация лунок шла 15 мин в темноте с последующей промывкой дистиллированной, а затем проточной водой. Поддон

снимали, промывали мембрану с обратной стороны. Сушка стрипов производилась на фильтровальной бумаге в темноте при комнатной температуре.

Сформировавшиеся пятна для обоих методов ELISpot подсчитывали с помощью автоматизированного ELISpot-ридера AID (AID GmbH, Германия), рисунок 2.10.

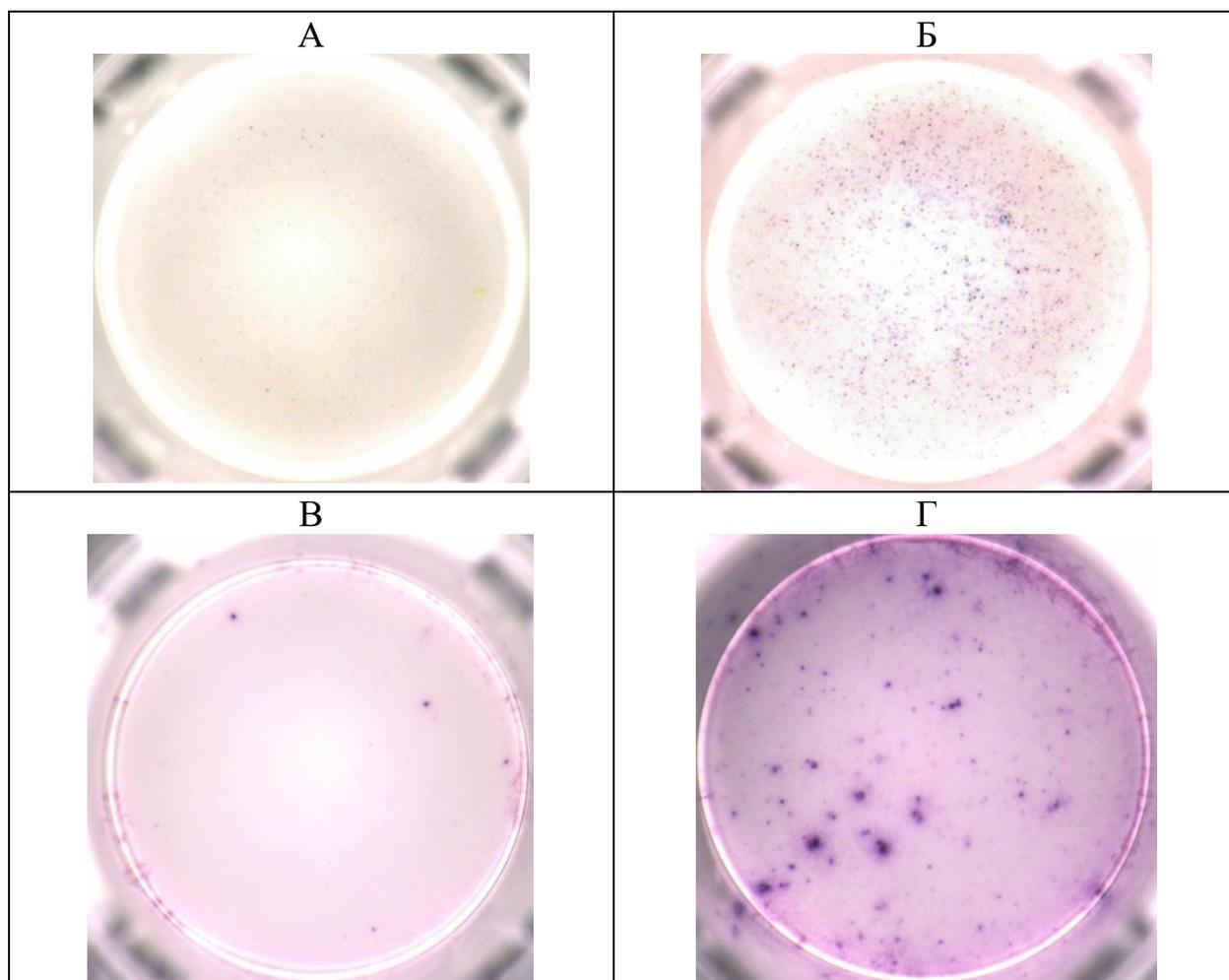


Рисунок 2.12 – Пример исследования клеточного иммунитета методом ELISpot

Примечание:

А – спонтанный уровень (тест-система «Human IFN- γ ELISpot»);

Б – антиген-индуцированный уровень (тест-системе «Human IFN- γ ELISpot»);

В – спонтанный уровень (тест-системе «Corona-T-test»);

Г – антиген-индуцированный уровень (тест-системе «Corona-T-test»)

Программное обеспечение позволяет посчитать количество пятен на дне лунки, их суммарную площадь и интенсивность окраски. Встроенные алгоритмы прибора позволяют рассчитать концентрацию IFN- γ для каждой лунки.

Спонтанный и индуцированный уровень IFN- γ и количество пятен отличались у разных пациентов. По этой причине результаты, полученные методом ELISpot, были представлены двумя способами: как разница между опытной и контрольной лункой для каждого обследованного (абсолютный показатель) и как отношение опытного к контрольному уровню для каждого испытуемого (относительный показатель).

2.9 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 характеристических кривых (receiver operator characteristic, ROC-кривых). Для количественного сопоставления рассчитывали площади под ROC-кривыми (AUC), значимость, чувствительность, специфичность и значение cut-off. Расчеты проводились с использованием компьютерных программ «Statgraf», «Microsoft Office Excel 16», «SPSS 16.0» и «Statistica 6.0».

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. Были использованы широко известные в статистическом анализе, теории вероятностей и в биологии функциональные зависимости, относящиеся к группе распределений Пирсона. В нашем исследовании рассматриваются две из них: распределение Эрланга (1)

$$f(x; k, \lambda, c) = c \cdot \frac{\lambda^k \cdot x^{k-1} \cdot e^{-\lambda x}}{(k-1)!} \quad (1)$$

где параметр k называется параметром формы, а параметр λ называется параметром скорости. Также был введён нормировочный коэффициент c для масштабирования значений функции. Комбинация значений параметров k и λ отвечает за положение экстремума графика, значение функции в точке экстремума и плавность перегиба функции.

И распределение Фишера (2)

$$f(x; n, m, c) = \begin{cases} c \cdot \frac{x^{\frac{n}{2}-1}}{\left(1 + \frac{n \cdot x}{m}\right)^{\frac{n+m}{2}}} & x \geq 0 \\ & x < 0 \end{cases} \quad (2)$$

где коэффициенты n и m влияют на форму графика, положение максимума функции и его значение, коэффициент c также является нормировочным. При этом распределение Эрланга характеризуется более плавным ростом и падением значений функции, в то время как распределение Фишера позволяет описывать функции, значение которых достаточно резко снижается после достижения максимума и затем плавно асимптотически стремится к нулю. В данном исследовании выбор общего вида аппроксимирующей функции осуществлялся в зависимости от характера наблюдаемых зависимостей. В каждом случае значения коэффициентов подбирались эмпирически, для обеспечения качественной аппроксимации исходных данных.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Параметры гуморального иммунитета, специфичного к S-белку вируса SARS-CoV-2 у реконвалесцентов COVID-19

3.1.1 IgM антитела к S-белку вируса SARS-CoV-2

В поперечном исследовании уровня IgM к антигенам вируса SARS-CoV-2 приняло участие 88 человек, переболевших COVID-19, имевших хотя бы один положительный ПЦР-тест. Результат анализа на IgM выражали в коэффициентах позитивности (КП), при КП >1,1 тест расценивали как серопозитивный. Не у всех обследованных были выявлены IgM-антитела через 2 мес. от начала заболевания (Таблица 3.1). Из 84 человек только у 59 были обнаружены IgM-антитела к антигенам SARS-CoV-2. В более поздние сроки выявлено уменьшение процента серопозитивных с 70,2% до 0% на сроках от 2 до 12 месяцев, с одновременным снижением уровня IgM с $3,7 \pm 0,35$ до неопределяемого.

Таблица 3.1 – IgM-антитела к S-белку вируса SARS-CoV-2 после заболевания COVID-19

	2 мес.	4 мес.	6 мес.	8 мес.	10 мес.	12 мес.
Абсолютное количество и % серопозитивных	59 70,2%	45 53,6%	42 50%	11 13,1%	6 7,1%	0 0%
Уровень IgM у серопозитивных (КП)	$3,7 \pm 0,35$	$2,44 \pm 0,23$	$2,37 \pm 0,21$	$1,89 \pm 0,19$	$1,43 \pm 0,15$	0

У 4 (4,5%) исследуемых установлен высокий уровень IgM к антигенам вируса SARS-CoV-2. Эти люди были дополнительно обследованы через 4, 6, 10 и 12 мес. после заболевания. Выявлено постепенное снижение уровня IgM к антигенам вируса SARS-CoV-2 в период с 2 до 12 месяцев от момента перенесенного

заболевания, с сохранением серопозитивности в течение 12 месяцев наблюдения (Рисунок 3.1).

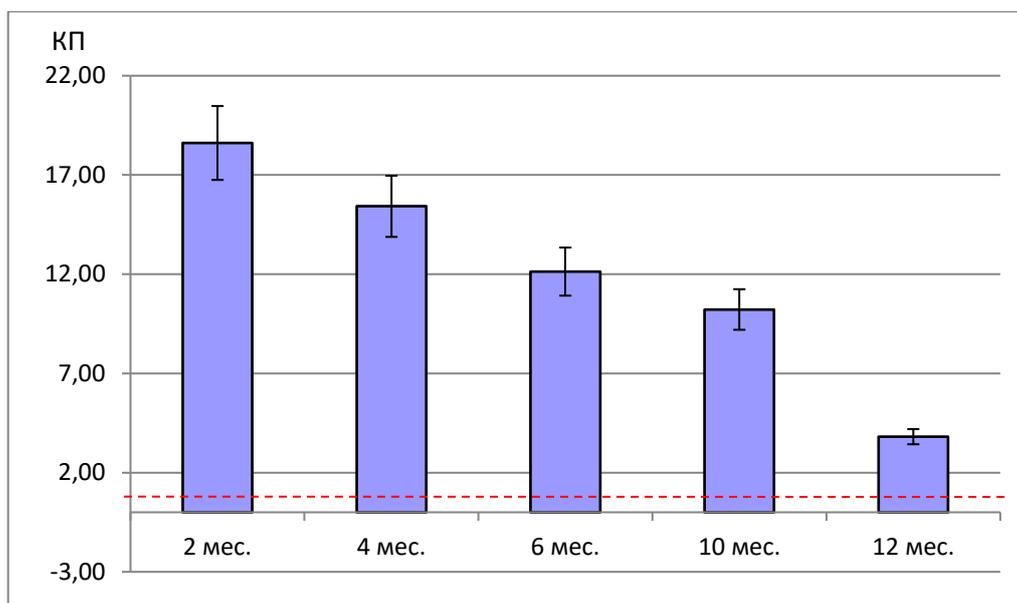


Рисунок 3.1 – Уровень IgM у 4 человек с высоким ответом

3.1.2 IgA и IgG антитела к S-белку вируса SARS-CoV-2 у ранних реконвалесцентов COVID-19

Ввиду отсутствия международных стандартов калибровки тест-систем на момент начала исследования, уровень IgG и IgA к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке 88-ми реконвалесцентов COVID-19 (1-3 месяца после заболевания) был измерен полуколичественным методом в коэффициентах позитивности. В контрольной группе не болевших COVID-19 здоровых исследуемых специфичные к S-белку вируса SARS-CoV-2 IgG и IgA не выявлены. В таблице 3.2 представлены результаты исследования гуморального иммунитета у переболевших COVID-19. Были определены специфичные к S-белку вируса SARS-CoV-2 IgG-антитела $17,08 \pm 1,94$ и $11,43 \pm 1,32$ для IgA в КП. Серопозитивность сывороток в примененных тест-системах установлена при значении КП более 1,1. По уровню специфического гуморального ответа исследуемые поделены на 2 группы: группа с высоким уровнем антител – 50 человек (57%), группа с низким уровнем антител – 38 человек (43%), разделение проведено по уровням анти-S-IgG. Границей для такого разделения считали 10

единиц КП (см. раздел 2.4). Средний уровень IgG-антител в группе с высоким уровнем гуморального ответа составил $27,39 \pm 2,25$ и в группе с низким уровнем ответа $4,46 \pm 0,53$.

Таблица 3.2 – Уровень IgG- и IgA-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 после заболевания COVID-19

	Полуколичественный метод (КП) M±SE			Количественный метод (BAU/мл) Me (LQ-HQ)		
	Группа переболевших	Высокий ответ n=50	Низкий ответ n=38	Группа переболевших	Высокий ответ (57%)	Низкий ответ (43%)
IgG	17,08±1,94	27,39± 2,25	4,46± 0,53*	1080 (366-1692)	1724 (1094-1988)	355 (188-481)*
IgA	11,43±1,32	15,09± 1,95	6,94± 0,67*	-	-	-

Примечание:

* $p < 0,05$ по сравнению с группой с высоким уровнем ответа

Для IgA средний уровень в группе высокого гуморального ответа против инфекции составил $15,09 \pm 1,95$ и $6,94 \pm 0,67$ в группе низкого ответа. Различия между этими группами и для IgG, и для IgA были значимыми ($p < 0,05$). Корреляция между уровнями специфических IgG и IgA была средняя положительная ($r = 0,43$). Было проведено ретестирование сывороток реконвалесцентов COVID-19 для определения количества анти-S-IgG, согласно международным стандартам в BAU/мл. При сопоставлении результатов с уровнем IgG, выраженным в КП, выявили очень сильную положительную корреляцию ($r = 0,98$). Медиана уровня анти-S-IgG количественным методом оказалась равна 1080 (366-1692) BAU/мл. Максимальный уровень составил 2172 BAU/мл, а у 6-и человек уровень антител был менее 10 BAU/мл, то есть отрицательный, из них у 2 были выявлены высокие уровни анти-S-IgA, у 4 не было обнаружено анти-S-IgA. У трех исследуемых с высоким уровнем анти-S-IgG не было обнаружено анти-S-IgA. Для группы с высоким ответом уровень анти-S-IgG составил 1724 (1094-1988) BAU/мл, с низким ответом – 355 (188-481) BAU/мл. Защитным уровнем

IgG-антител до появления штамма Омикрон считали 150 ВАУ/мл. Не было обнаружено корреляции между временем, прошедшим после заболевания, и уровнем гуморального иммунитета. У каждого конкретного человека уровень антител мог подвергаться подъемам и спадам, в зависимости от истории индивидуальных контактов с новыми штаммами вируса, однако в течение всего периода наблюдения сохранялся тип ответа: лица, идентифицированные при первом обследовании как высоко отвечающие, имели высокий уровень анти-S-IgG, а низко отвечающие сохраняли низкий уровень таких антител.

При исследовании спектра субклассов IgG-антител к S-белку не обнаружено антител субклассов IgG2 и IgG4, специфичных к S-белку вируса SARS-CoV-2 в группе перенесших COVID-19 однократно. Одним из критериев зрелости специфического гуморального ответа является уровень субкласса IgG1 антител в общем ответе IgG против S-белка вируса. На рисунке 3.2 продемонстрировано значимое нарастание процента анти-S-IgG1 в зависимости от сроков после перенесенной инфекции.

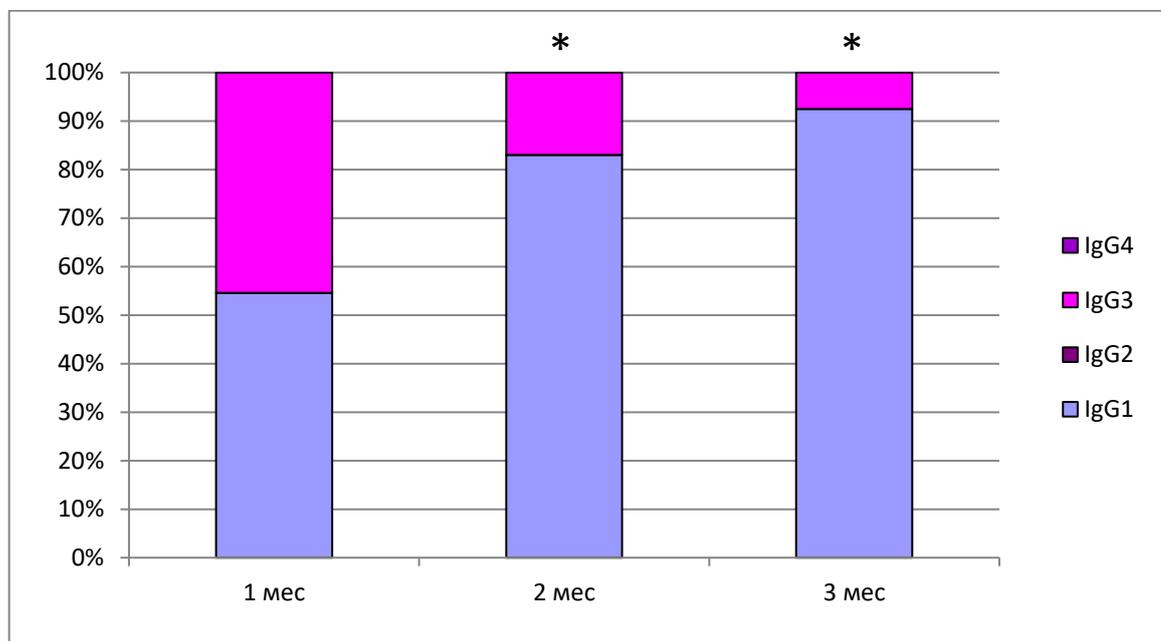


Рисунок 3.2 – Изменение спектра субклассов IgG-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 в зависимости от времени, прошедшего после заболевания

Примечание:

* $p < 0,05$ по сравнению с уровнем в 1 месяц

Другим показателем созревания специфического гуморального ответа является индекс авидности анти-S-IgG. У реконвалесцентов COVID-19 на сроке 3 месяца индекс авидности специфичных к S-белку IgG составил 29,7%, что следует расценить как низкоавидные антитела.

3.2. Показатели клеточного иммунитета, специфичного к S-белку вируса SARS-CoV-2, у переболевших COVID-19

Как спонтанный уровень экспрессии CD107a на CD8^{high}-лимфоцитах, так и индуцированной S-белком экспрессии CD107a в группе здоровых обследуемых, не болевших COVID-19 оказались ниже cut-off, не более 1%. В группе ранних реконвалесцентов COVID-19 (1-3 мес. после заболевания) уровень индуцированной S-белком экспрессии CD107a на CD8^{high}-лимфоцитах значимо ($p < 0,05$) превысил уровень спонтанной экспрессии CD107a, среднее арифметическое составило $6,48 \pm 0,61\%$ (Таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Параметры клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 после заболевания COVID-19 (%)

	Группа переболевших	Группа с высоким ответом n=44	Группа с низким ответом n=44
Спонтанный уровень <1%	$0,57 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,04$	$0,59 \pm 0,05$
S-индуцированный >1%	$6,48 \pm 0,61$	$11,23 \pm 0,72$	$3,85 \pm 0,36^*$

Примечание:

* $p < 0,05$ по сравнению с высоким уровнем

По уровню специфического клеточного ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2 переболевшие поделены на 2 равные группы, по 44 человека в каждой, группу с высоким и низким уровнем клеточного ответа соответственно. Уровень экспрессии CD107a в 6%, рассчитанный с помощью ROC-анализа (см. раздел 2.7), был принят за пороговый. Различия в ответах этих групп оказались значимыми ($p < 0,05$). В группе с высоким ответом средний уровень индуцированной экспрессии составил $11,23 \pm 0,72\%$, в группе с низким ответом – $3,85 \pm 0,36\%$.

Сопоставление уровней специфического гуморального, анти-S-IgG, анти-S-IgA, и клеточного $CD8^{high} CD107a^{+}$ иммунных ответов представлено на рисунке 3.3. Было выявлено 4 варианта соотношения гуморального и клеточного иммунитета.

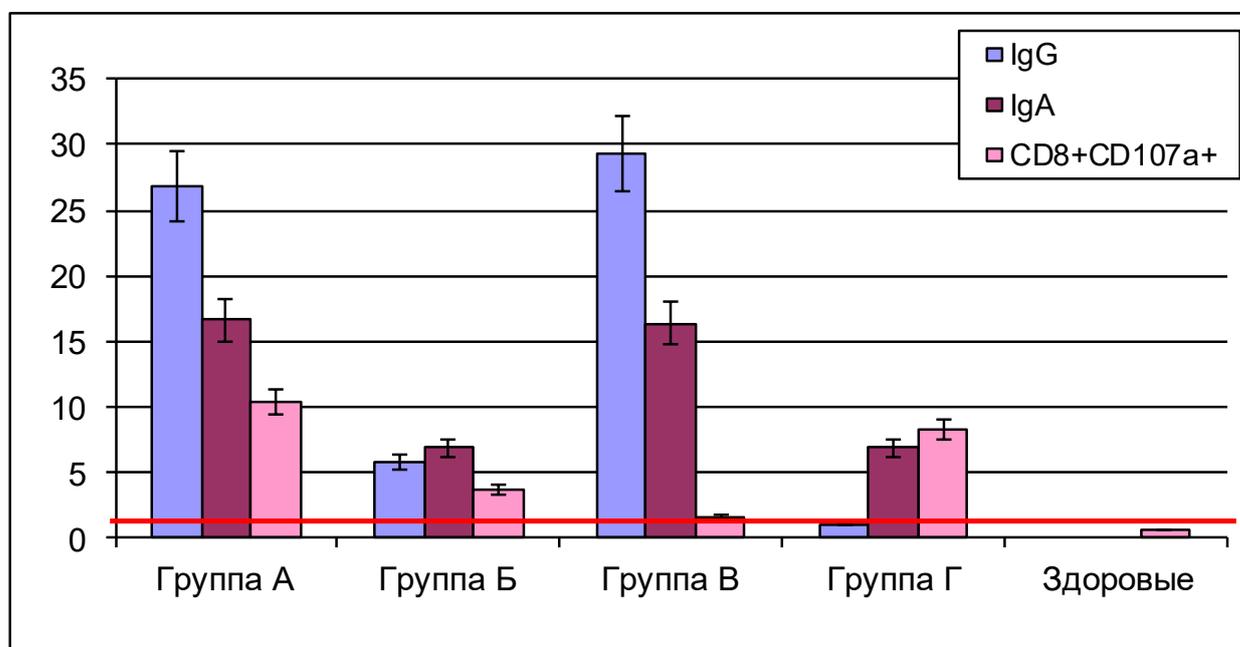


Рисунок 3.3 – Сопоставление гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 после заболевания COVID-19

Примечание: По оси ординат для IgG- и IgA-КП, для клеточного иммунитета процент $CD8^{hi}CD107a^{+}$ от всех $CD3^{+}CD8^{+}$ лимфоцитов.

Распределение людей по группам представлено на рисунке 3.4. Группа А, 28 человек, имела высокий уровень гуморального: IgG - $26,84 \pm 3,08$ (1693; 1165-1966 ВАУ/мл), IgA - $16,65 \pm 2,02$ и клеточного ответа ($CD8^{high}CD107a^{+}$ - $10,39 \pm 0,87\%$). Группа Б, 22 человека, демонстрировала низкий уровень гуморального: IgG - $6,22 \pm 0,65$ (426; 215-541 ВАУ/мл), IgA - $6,88 \pm 1,17$ и клеточного ($CD8^{high}CD107a^{+}$ - $3,8 \pm 0,44\%$) ответа. Группа В, также 22 человека, показала высокий гуморальный: IgG - $29,3 \pm 3,71$ (1763; 1234-1983 ВАУ/мл), IgA - $16,37 \pm 2,05$ и низкий клеточный ($CD8^{high}CD107a^{+}$ - $1,64 \pm 0,31\%$) ответ. Группа Г, 16 человек, характеризовалась низким гуморальным IgG - $1,06 \pm 0,18$ (201; 84-276 ВАУ/мл), IgA - $6,09 \pm 2,34$ и высоким клеточным ($CD8^{high}CD107a^{+}$ - $8,3 \pm 0,92\%$) ответом. В группе здоровых не

болевших COVID-19 обследуемых не было выявлено специфического гуморального и клеточного ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2.

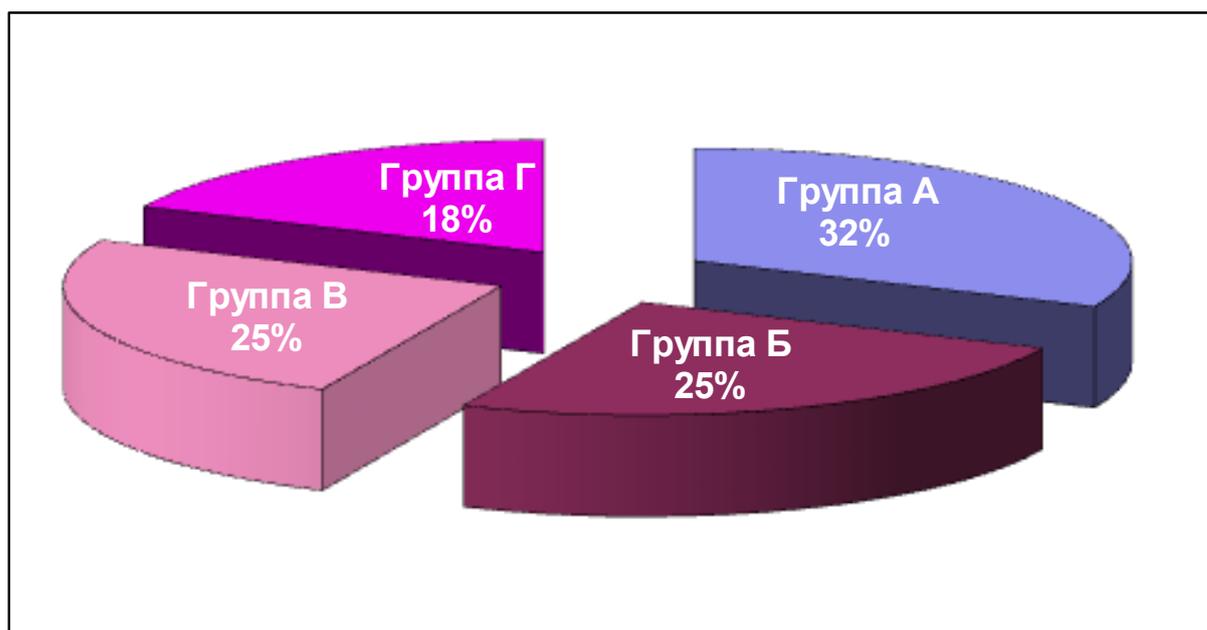


Рисунок 3.4 – Распределение переболевших COVID-19 на группы по соотношению уровней гуморального и клеточного иммунитета

Корреляции между уровнем гуморального и клеточного иммунитета к S-белку выявлено не было. Интересно, что у тех 6-и реконвалесцентов, у которых не обнаружено IgG-антител к S-белку, был выявлен клеточный иммунитет к этому антигену.

3.3. Параметры гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 у привитых от COVID-19

Проведенное исследование показало, что у привитых вакциной «Спутник V» через 3 месяца после второй вакцинации специфический клеточный и гуморальный ответ на S-белок сформировался у 100% его участников. Оценивая гуморальный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2 привитых вакциной «Спутник V», мы выделили группы с высоким и низким уровнем ответа антител (Таблица 3.4), различия между группами были статистически значимыми ($p < 0,05$). Из 30 дважды привитых вакциной «Спутник V», не болевших ранее COVID-19, у 5 человек (16,7%) были выявлены анти-S IgM-антитела с КП

2,16±0,22. У остальных 25 (83,3%) привитых участников обследования IgM-антитела, специфичные к S-белку вируса SARS-CoV-2, не были выявлены.

Таблица 3.4 – Распределение обследованных лиц по высоте гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 у привитых вакциной «Спутник V»

	Гуморальный иммунитет			Клеточный иммунитет	
	IgM (КП)	IgG (BAU/мл)	IgA (КП)	Спонт. <1%	S-индуц. >1%
Высокий уровень	2,16±0,22 n=5	1563 (1199-1819) n=16	4,04±0,63 n=16	0,61±0,06 n=17	11,77±1,01 n=17
Низкий уровень	0 n=25	432 (245-523)* n=14	1,2±0,52* n=14	0,62±0,04 n=13	3,31±0,37* n=13

*Примечание: * p < 0,05 по сравнению с высоким уровнем*

В группу с высоким уровнем поствакцинального ответа IgG и IgA, специфичных к S-белку вируса SARS-CoV-2, вошло 16 (53,3%) человек. Анти-S IgG в этой группе составили 1563 (1199-1819) BAU/мл, анти-S IgA 4,04±0,63 КП. Группа с низким уровнем поствакцинального ответа специфичных к S-белку вируса SARS-CoV-2 IgG и IgA-антител составила 14 (46,7%) человек, анти-S IgG – 432 (245-523) BAU/мл и анти-S IgA – 1,2±0,52 в единицах КП, соответственно.

По результатам исследования клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 привитых вакциной «Спутник V» также были выделены группы с высоким и низким уровнем ответа (см. таблицу 3.4). При разделении на группы уровень в 6% экспрессии CD107a на CD8^{high} Т-лимфоцитах, индуцированных S-белком коронавируса, принят за пороговый. Различия между группами были статистически значимыми (p < 0,05). Уровень спонтанной дегрануляции CD8^{high}CD107a⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов менее 1% установлен как критерий отсутствия специфического клеточного ответа. Группу с высоким уровнем клеточного ответа (11,77±1,01%) составили 17 человек (56,7%). В группе

с низким уровнем ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2 ($3,31 \pm 0,37\%$) оказались 13 человек (43,3%).

Сопоставляя уровни специфического гуморального и клеточного иммунного ответов к S-белку вируса SARS-CoV-2 дважды привитых вакциной «Спутник V», мы выделили 4 варианта соотношения этих параметров (Рисунок 3.5). В контрольной группе здоровых не болевших COVID-19 и не привитых «Спутник V» не выявлен ни гуморальный, ни клеточный иммунный ответ на S-белок вируса SARS-CoV-2.

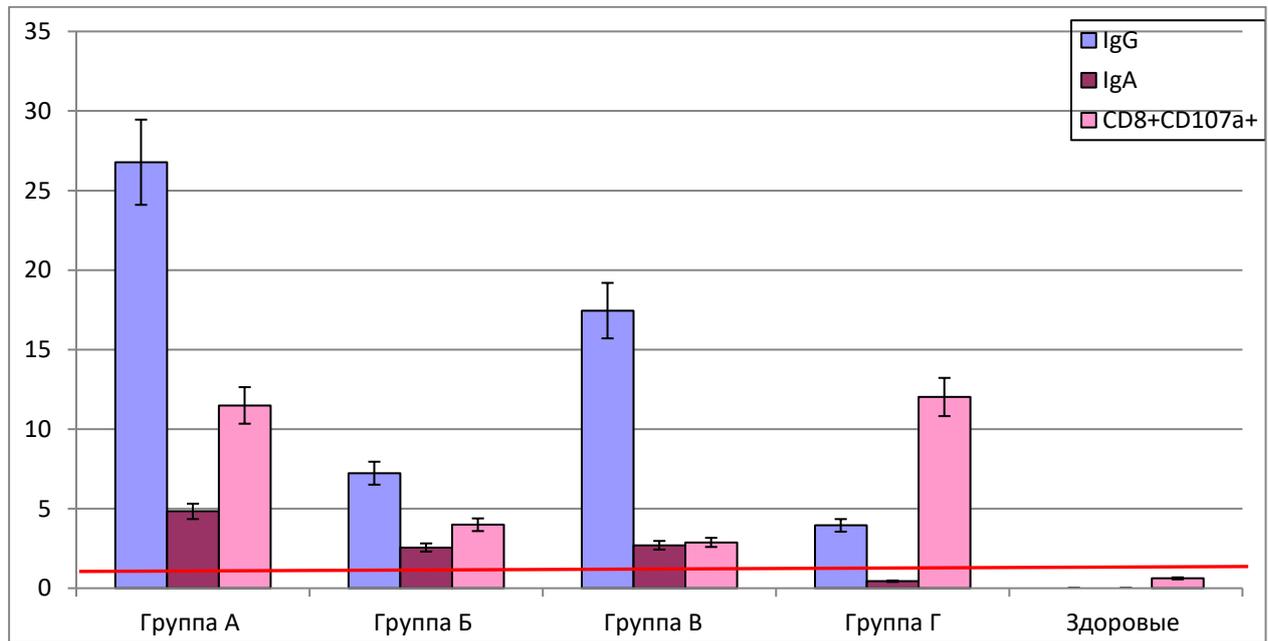


Рисунок 3.5 – Сопоставление гуморального и клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 у привитых вакциной «Спутник V»

Примечание: По оси ординат для IgG- и IgA-КП, для клеточного иммунитета процент $CD8^{hi}CD107a^{+}$ от всех $CD3^{+}CD8^{+}$ лимфоцитов.

Группа А с высоким гуморальным: IgG - 26,78 (1676; 1284-1900 ВАУ/мл), IgA- $4,83 \pm 0,72$ и клеточным ответом ($CD8^{high}CD107a^{+}$ - $11,49 \pm 1,37\%$) состояла из 8 человек (26,7%); низкий гуморальный: IgG- 7,23 (513; 214-599), IgA- $2,56 \pm 1,22$ и клеточный ответ ($CD8^{high}CD107a^{+}$ - $3,98 \pm 0,7\%$) был выявлен у 5 человек (16,6%), группа Б; группа В с высоким гуморальным: IgG - 17,45(1293; 868-1420), IgA- $3,27 \pm 0,91$ и низким клеточным ответом ($CD8^{high}CD107a^{+}$ - $2,85 \pm 0,42\%$) включала 8 человек (26,7%); а группа Г из 9 человек (30%) демонстрировала низкий

гуморальный: IgG – 3,95 (312; 185-488), IgA-0,44±0,22 и высокий клеточный ответ (CD8^{high}CD107a⁺ - 12,02±1,39%). (Рисунок 3.6).

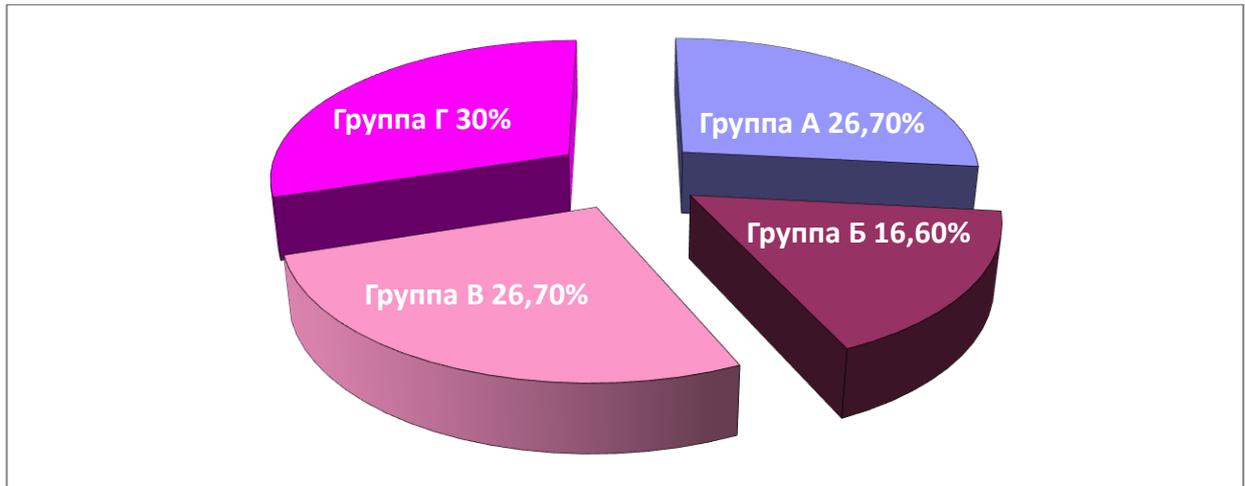


Рисунок 3.6 – Распределение привитых вакциной «Спутник V» на группы по соотношению уровней гуморального и клеточного иммунитета

Индекс avidности анти-S IgG-антител дважды привитых вакциной «Спутник V» на сроке 3 месяца после вакцинации составил 32,5±1,39%, что следует расценивать как низкий уровень. Как и у переболевших COVID-19, поствакцинальный иммунный ответ антител был представлен субклассами анти-S IgG1 и анти-S IgG3. Субкласс анти-S IgG1 на сроке 3 месяца после вакцинации составил 93,8±0,48% от всех IgG-антител к S-белку. Не установлено корреляции между индексом avidности и уровнем ответа анти-S IgG-антител. Кроме того, не выявлено взаимосвязи уровня поствакцинального ответа с возрастом и полом участников исследования.

3.4. Динамика изменений параметров иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 с течением времени (до появления штамма Омикрон)

При поперечном исследовании когорты из 107 переболевших COVID-19 через 3 мес. от начала заболевания уровень антител в сыворотке крови был 978 (336-1592) BAU/мл, через 6 мес. – 883 (335-1323) BAU/мл, через 9 мес. – 672 (276-1009) BAU/мл и через 12 мес. – 560 (189-867) BAU/мл. Очевидно, уровень антител со временем постепенно снижался. Следует отметить, что на момент проведения тестирования уровень 150 BAU/мл, а потом 300 BAU/мл (с появлением штамма

Омикрон), считали защитным, т.е. средний уровень антител можно было расценить как защитный даже через год после заболевания.

Было проведено продольное исследование когорты из 38 переболевших COVID-19, обследованных от 3 до 5 раз на сроках от 3 до 15 месяцев от момента начала заболевания (Рисунок 3.7). По концентрации анти-S IgG в сыворотке крови исследуемых 23 человека (60,5%) были отнесены в группу с высоким уровнем антител, средний уровень в группе - 1592 (1175–1862) ВАУ/мл. Уровень антител в этой группе достаточно быстро снижался на сроках от 3 до 9 месяцев от начала заболевания, затем темпы снижения замедлились, и концентрация антител вышла на плато на уровне около 900 ВАУ/мл. В то же время 15 человек (39,5%) вошли в группу с низким уровнем анти-S IgG, 366 (284–467) ВАУ/мл.

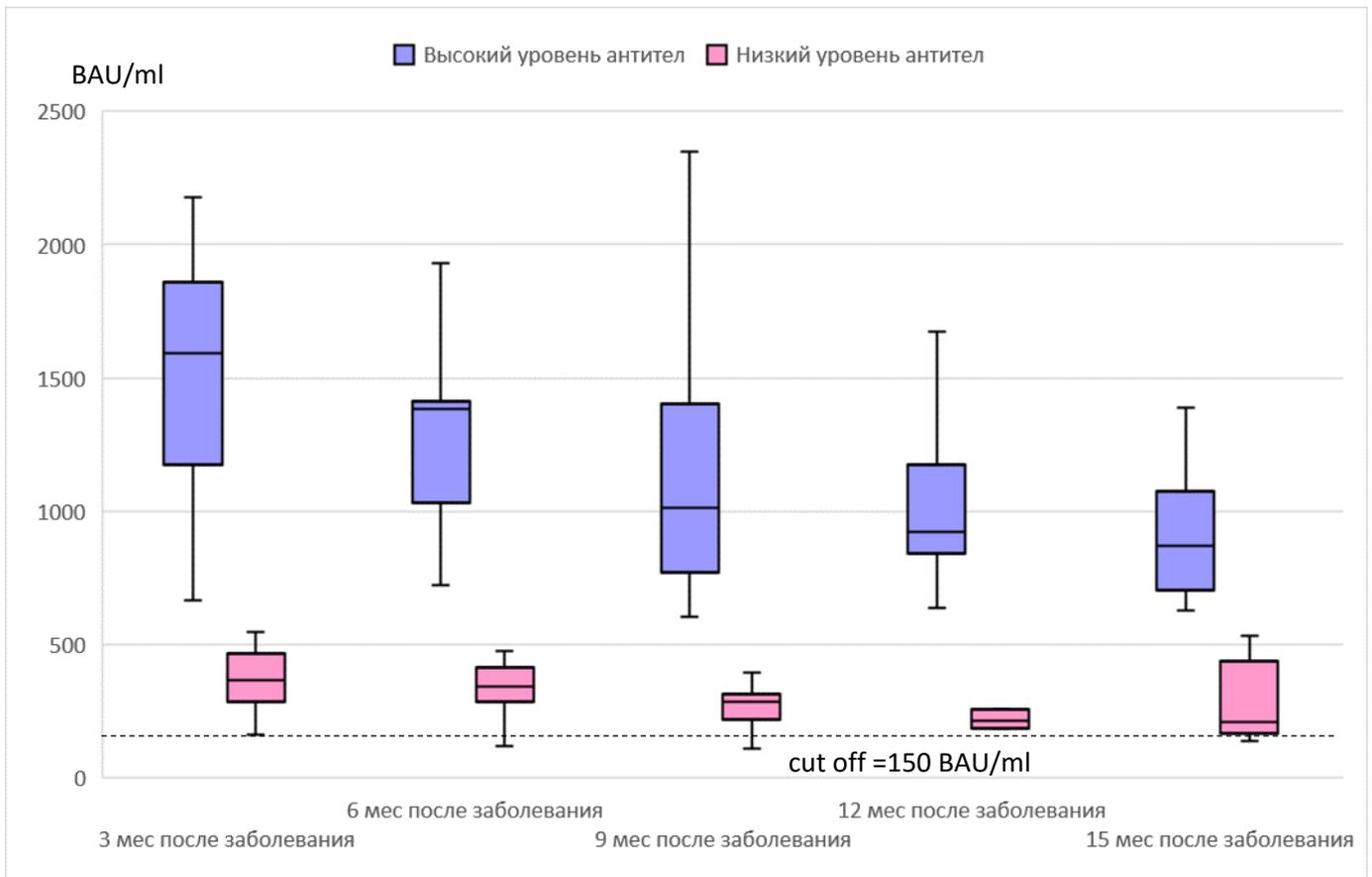


Рисунок 3.7 – Изменение уровня IgG-антител в зависимости от времени, прошедшего после заболевания

В этой группе отмечалась такая же тенденция снижения концентрации антител с выходом на плато на сроке после 12 месяцев от начала COVID-19 на уровне около

200 ВАУ/мл. Различия в уровнях антител между группами были значимыми ($p < 0,05$).

На рисунке 3.8 представлены результаты определения индекса avidности анти-S IgG у той же когорты из 38 перенесших COVID-19. В первой точке исследования в 3 месяца от момента заболевания анти-S IgG-антитела у переболевших были низкоавидными, индекс avidности составил $29,7 \pm 1,59\%$. Последующие исследования сывороток переболевших показали рост индекса avidности анти-S IgG до $50,88 \pm 1,52\%$ в течение года, что говорит о созревании ответа специфических антител. При этом не выявлено корреляции между индексом avidности и уровнем анти-S IgG.

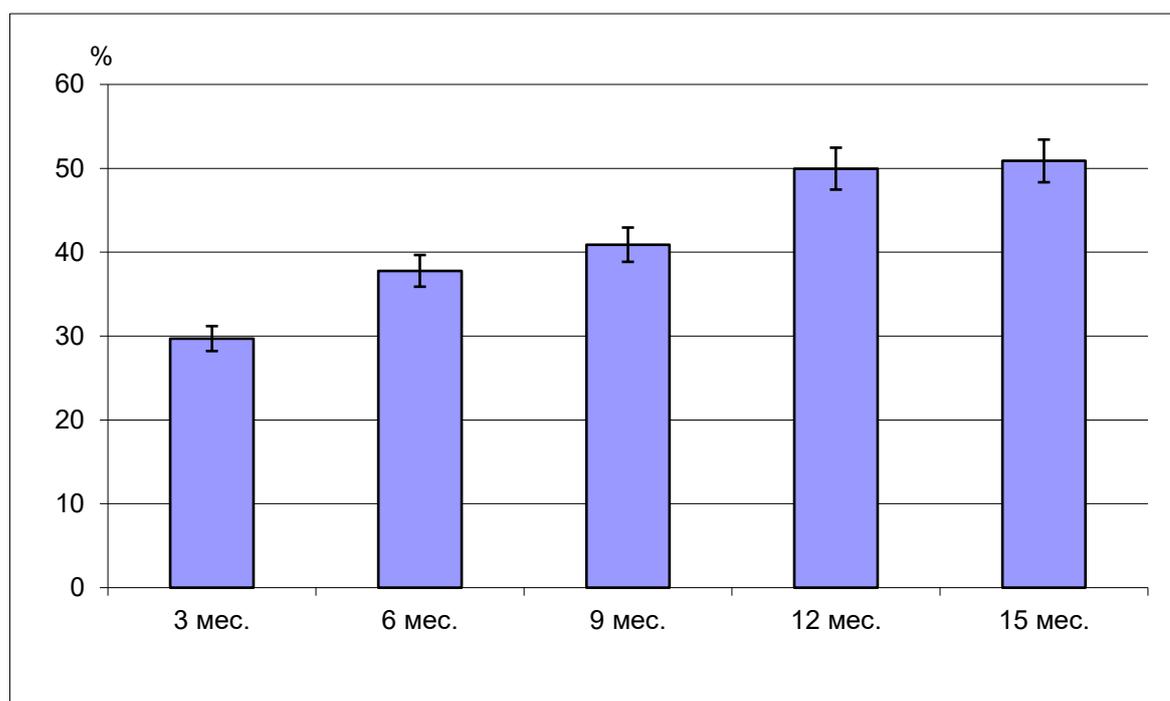


Рисунок 3.8 – Индекс avidности антител у переболевших COVID-19 в зависимости от времени после заболевания

Анти-S IgA антитела у перенесших COVID-19 определялись уже через 1 месяц от момента начала заболевания, с постепенным снижением их в течение полугода и сохранением на детектируемом уровне до 15 месяцев наблюдения.

Динамика ответа антител класса IgA, специфичных к S-белку вируса SARS-CoV-2, у переболевших представлена на рисунке 3.9.

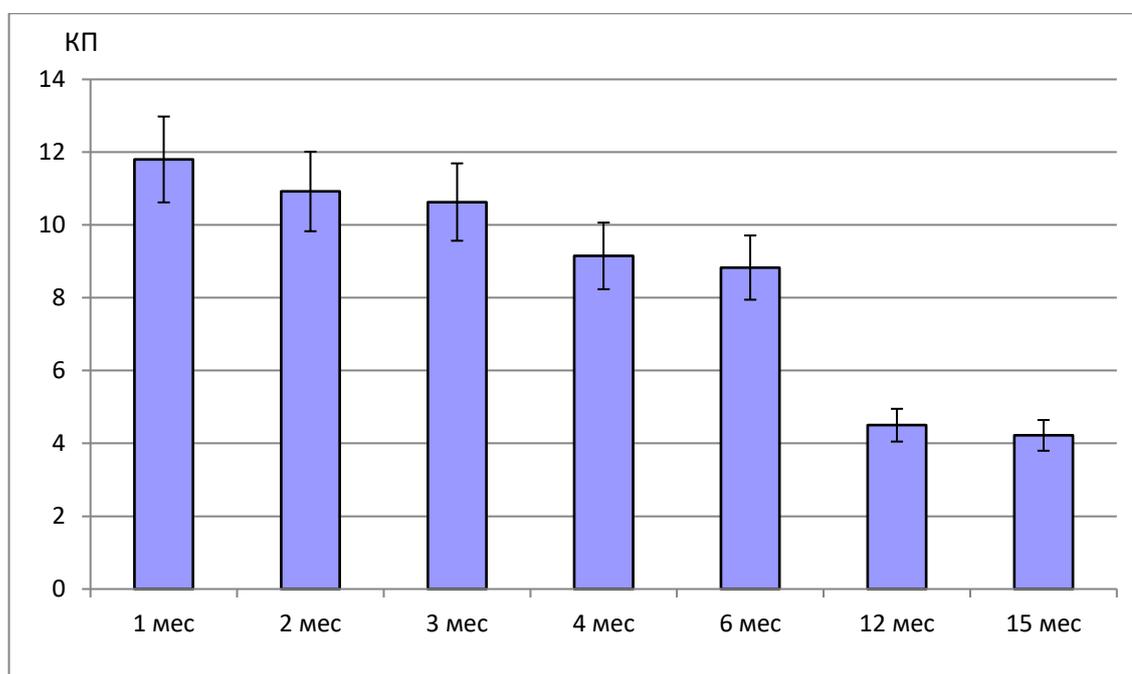


Рисунок 3.9 – Изменение уровня IgA-антител, специфичных к S-белку вируса, у переболевших COVID-19 в зависимости от времени после заболевания

Продольное исследование клеточного иммунитета той же когорты 38 перенесших COVID-19 выявило две группы: группа из 20 человек (52,6%) с высоким уровнем экспрессии CD107a на цитотоксических CD8^{high} Т-лимфоцитах 10,19±0,93% и группа из 18 человек (47,4%) с низким уровнем экспрессии CD8^{high}CD107a⁺ 3,9±0,37% (Таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Клеточный иммунитет (процент CD8^{hi}CD107a⁺ от CD8^{hi}) к S-белку вируса SARS-CoV-2 после заболевания COVID-19 при продольном исследовании когорты (M±SE)

	Через 3 мес.	Через 6 мес.	Через 9 мес.	Через 12 мес.	Через 15 мес.
Высокий уровень	10,19±0,93	10,63±0,97	10,15±0,88	10,05±0,85	10,82±1,01
Низкий уровень	3,9±0,37*	4,63±0,47*	4,4±0,43*	3,85±0,39*	4,1±0,39*

*Примечание: * p < 0,05 по сравнению с высоким уровнем*

Уровень экспрессии $CD8^{\text{high}}CD107a^+$ в 6% был принят за критерий разделения, различия в группах оказались статистически значимыми ($p < 0,05$). Результаты нашего наблюдения показывают, что на сроках от 3 до 15 месяцев от начала заболевания клеточный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2 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 значимо снизились.

Продольное исследование гуморального иммунного ответа 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 анти-S IgG в зависимости от времени, прошедшего после вакцинации, что и у перенесших COVID-19 (Рисунок 3.10).

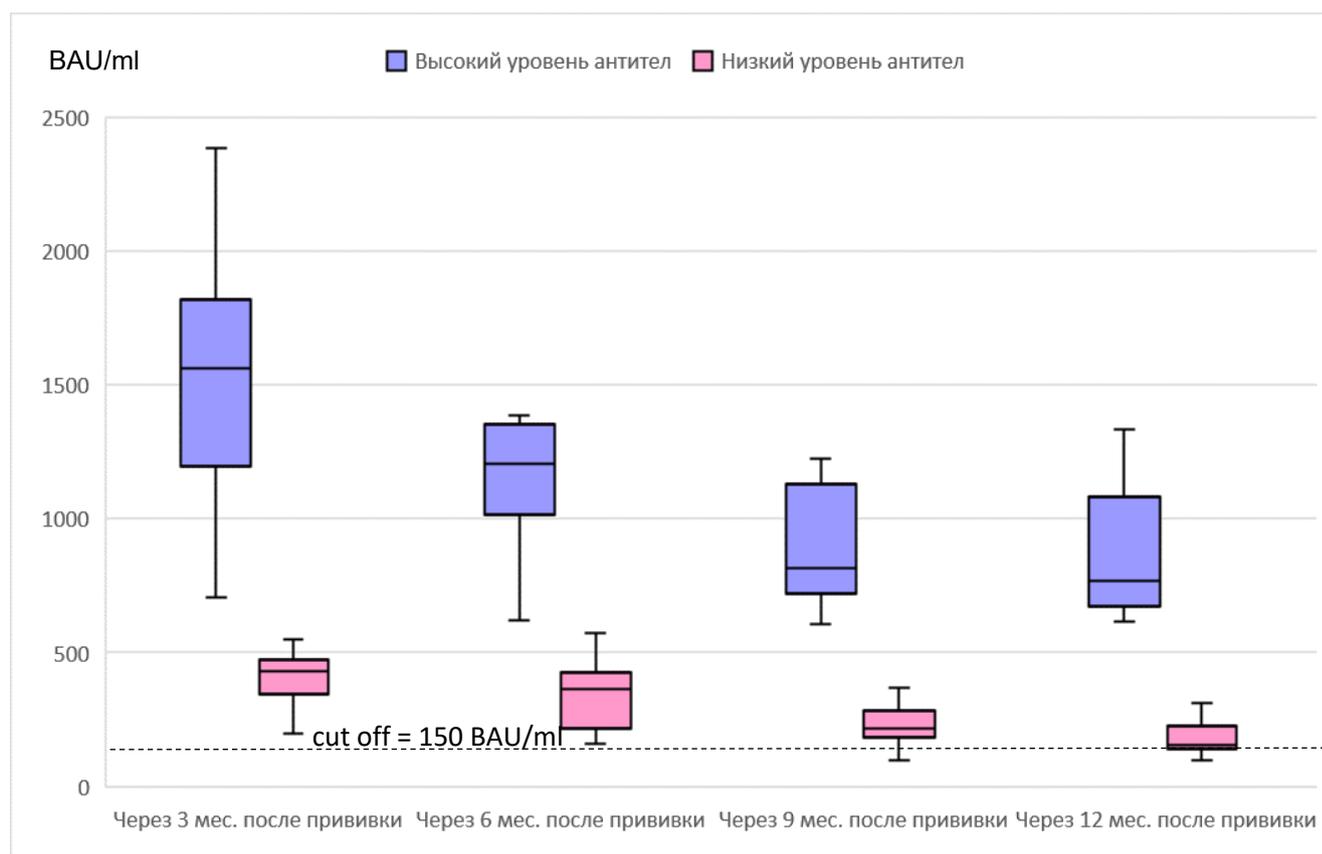


Рисунок 3.10 – Изменение уровня IgG-антител в зависимости от времени, прошедшего после вакцинации «Спутник V»

Видно отчетливое снижение уровня анти-S IgG, в группе с высоким уровнем специфических к S-белку вируса SARS-CoV-2 IgG с 1563 (1199-1819)

BAU/мл, с выходом на плато на уровне около 600 BAU/мл в 9 месяцев после второй прививки. Аналогично в группе с низким гуморальным ответом на S-белок специфичные к нему IgG-антитела снижались с 432 (345-473) BAU/мл с выходом на плато через 9 мес. после прививки на уровне около 150 BAU/мл. Тем не менее, следует подчеркнуть, что на протяжении года после прививки вакциной «Спутник V» уровень анти-S IgG оставался не ниже защитного, определенного на тот момент, в 150 BAU/мл.

Результаты изучения индекса avidности поствакцинальных анти-S IgG у 30 дважды привитых вакциной «Спутник V», не болевших COVID-19, представлены на рисунке 3.11. Из рисунка видно, что через 3 месяца после второй прививки индекс avidности антител, специфичных к S-белку вируса SARS-CoV-2 был низким, $32,5 \pm 1,39\%$, и постепенно нарастал до $47,3 \pm 1,42\%$ в течение года наблюдения. Корреляции между индексом avidности и уровнем анти-S IgG в группе привитых обнаружено не было.

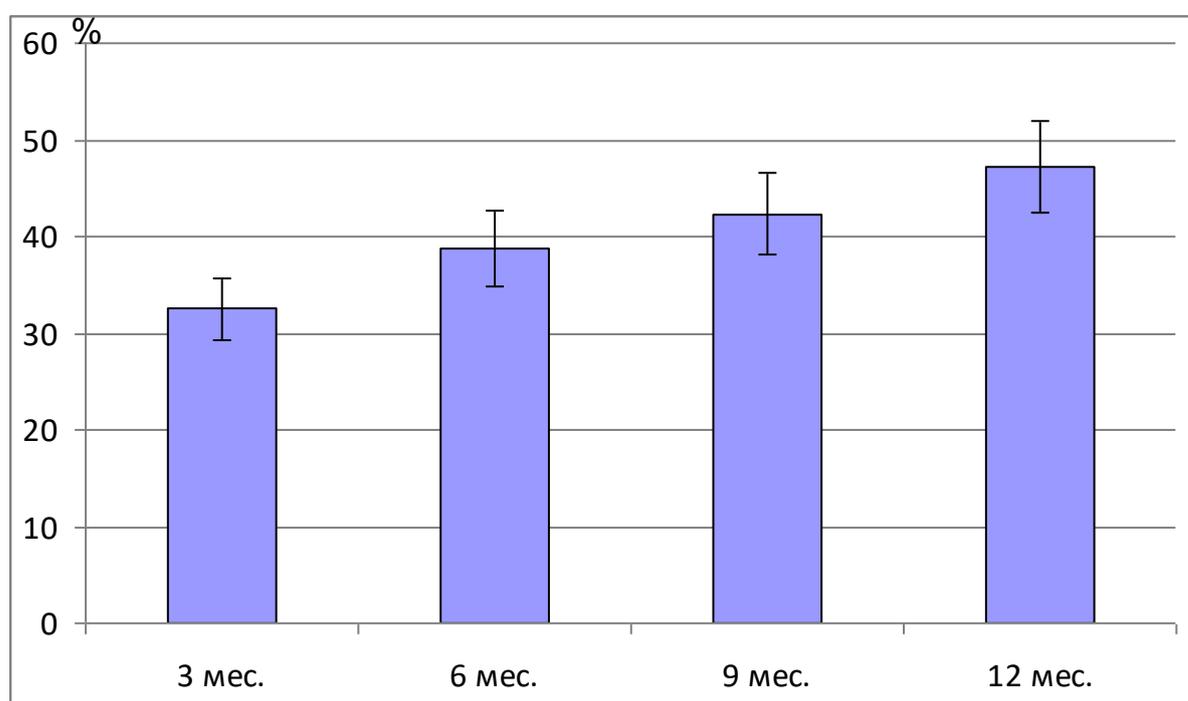


Рисунок 3.11 – Динамика индекса avidности антител у привитых вакциной «Спутник V»

Результаты продольного исследования клеточного иммунитета у 30 дважды привитых вакциной «Спутник V» в течение года после вакцинации представлены в таблице 3.6. Из таблицы видно, что процент $CD8^{high}CD107a^{+}$ цитотоксических Т-лимфоцитов от общего числа $CD3^{+}CD8^{+}$ в группе с высоким клеточным ответом снижался в течение года, и на сроках 9 и 12 месяцев от момента вакцинации, был значимо ниже ($p < 0,05$) в сравнении с уровнем ответа через 3 месяца после прививки, тогда как в группе с низким клеточным ответом практически не менялся. Тем не менее, поствакцинальный клеточный ответ сохранялся на всем периоде наблюдения выше уровня cut-off в 1% даже в группе с низким уровнем ответа.

Таблица 3.6 – Клеточный иммунитет (процент $CD8^{hi}CD107a^{+}$ от $CD8^{hi}$) к S-белку вируса SARS-CoV-2 после прививки вакциной «Спутник V» (% , $M \pm SE$)

	Через 3 мес.	Через 6 мес.	Через 9 мес.	Через 12 мес.
Высокий уровень	11,77±1,01	9,92±0,94	8,38±0,91*	7,67±0,80*
Низкий уровень	3,31±0,37	3,3±0,40	3,28±0,38	3,24±0,33

*Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с высоким уровнем*

3.5. Динамика изменений параметров адаптивного иммунитета к S-белку при бустировании за счет вакцинации или повторного инфицирования

23 человека дважды привитых вакциной «Спутник V» через год после завершения вакцинации были ревакцинированы вакциной «Спутник Лайт». В таблице 3.7 представлены результаты сопоставления уровней гуморального и клеточного иммунного ответа на S-белок вируса SARS-CoV-2 до ревакцинации и спустя 3 месяца после ревакцинации. Следует отметить, что IgM, специфичный к S-белку вируса SARS-CoV-2, не выявлен ни у одного из 23 ревакцинированных. Обнаружен значимый ($p < 0,05$) прирост уровня анти-S IgG как в группе с высоким уровнем гуморального ответа с 671(336-1134) ВАУ/мл до 1368,45 (930,51-1640,23) ВАУ/мл через 3 месяца после ревакцинации, так и в группе с низким уровнем ответа с 156 (112,3-328,5) ВАУ/мл до 476,35 (283,65-963,50) ВАУ/мл. Различия между группами в уровнях анти-S IgG также были значимыми

($p < 0,05$). Индекс avidности анти-S IgG у ревакцинированных значимо ($p < 0,05$) возрос с $47,3 \pm 1,42\%$ до $67,6 \pm 2,7\%$ независимо от уровня антител.

Таблица 3.7 – 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, BAU/мл (Me(LQ-HQ))		Клеточный иммунитет (процент CD8 ^{hi} CD107a ⁺ от CD8 ^{hi}) к S-белку вируса SARS-CoV-2, % (M±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±0,80	10,98±0,97 [#]
Низкий уровень	156 (112,3-328,5)*	476,35 (283,65-963,50) ^{#*}	3,24±0,33*	5,19±0,41 ^{#*}

Примечание:

[#] $p < 0,05$ по сравнению с уровнем перед ревакцинацией

* $p < 0,05$ по сравнению с высоким уровнем

Процент цитотоксических CD8^{high} Т-лимфоцитов, отреагировавших на распознавание S-белка вируса SARS-CoV-2 экспрессией молекулы CD107a, значимо ($p < 0,05$) вырос через 3 месяца после ревакцинации вакциной «Спутник Лайт», как в группе с исходно высоким клеточным ответом с $7,67 \pm 0,80\%$ до $10,98 \pm 0,97\%$, так и в группе с исходно низким клеточным ответом с $3,24 \pm 0,33\%$ до $5,19 \pm 0,41\%$. Различия между группами в уровнях ответов оказались значимыми ($p < 0,05$).

Спустя год после перенесенного COVID-19 27 наблюдавшихся нами человек были дважды привиты вакциной «Спутник V» и составили группу гибридного иммунитета. Это означает, что у этих лиц первичный иммунный ответ возник на уханьский штамм вируса SARS-CoV-2, а вторичный иммунный ответ - на вакцину «Спутник V». В таблице 3.8 сопоставлены концентрации анти-S IgG, их индекс avidности и клеточный иммунный ответ на S-белок до такой вакцинации (группа с постинфекционным иммунитетом), те же люди через 3 мес. после вакцинации составили группу с гибридным иммунитетом, и для сравнения представлены данные 30-и человек, не болевших COVID-19 через 3 мес. после

второй прививки вакциной «Спутник V» (группа с поствакцинальным иммунитетом).

Таблица 3.8 – 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 avidности антител к S-белку вируса SARS-CoV-2, % (M±SE)	Клеточный иммунитет (процент CD8 ^{hi} CD107a ⁺ от CD8 ^{hi}) к S-белку вируса SARS-CoV-2, % (M±SE)
Поствакцинальный иммунитет (n=30)	707,73 (585,10-932,33)	47,30±1,42	7,77±0,68
Постинфекционный иммунитет (n=27)	972,58 (612,51-1384,37)	50,20±2,12	8,19±0,73
Гибридный иммунитет (n=27)	1218,21 (724,50-2212,43)*	69,85±3,47*	9,94±0,75*

Примечание:

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

Было выявлено, что уровень анти-S IgG в группе гибридного иммунитета значимо выше ($p < 0,05$), он составил 1218,21 (724,50-2212,43) ВАУ/мл в сравнении с уровнем анти-S IgG в группе с постинфекционным иммунитетом – 972,58 (612,51-1384,37) ВАУ/мл и поствакцинальным иммунитетом – 707,73 (585,10-932,33) ВАУ/мл. Индекс avidности анти-S IgG оказался значимо выше ($p < 0,05$) в группе с гибридным иммунитетом, достигнув 69,85±3,47% в сравнении с индексом avidности анти-S-IgG 50,20±2,12% в группах с постинфекционным и 47,30±1,42% с поствакцинальным иммунитетом соответственно. Процент цитотоксических CD8^{high}CD107a⁺ Т-лимфоцитов, ответивших на S-белок вируса SARS-CoV-2, в группе с гибридным иммунитетом также был значимо ($p < 0,05$) выше 9,94±0,75% в сравнении с клеточными иммунными ответами в группах с поствакцинальным и постинфекционным иммунитетом, не показавшими значимых отличий, 7,77±0,68% и 8,19±0,73%, соответственно.

Из наблюдаемой нами группы реконвалесцентов 32 человека, перенесших COVID-19 в 2020-2021 годах, повторно переболели в январе-феврале 2022 года

COVID-19, вызванным штаммом Омикрон, и, таким образом, составили группу прорывного иммунитета. Это означает, что первичный иммунный ответ, сформированный при первом заболевании, оказался прорванным новым штаммом вируса SARS-CoV-2. Важно, что повторное заболевание у всех обследованных протекало в легкой форме. Примечательно, что анти-S IgM не были выявлены ни у одного из исследованных лиц, повторно перенесших COVID-19.

В таблице 3.9 представлены результаты сопоставления уровня анти-S IgG, их индекса авидности и клеточного иммунного ответа у этих людей до повторного заболевания COVID-19 (группа постинфекционного иммунитета) и через 3 мес. после повторного COVID-19 (группа прорывного иммунитета). Повторно перенесенное заболевание вызвало значимый ($p < 0,05$) прирост уровня анти-S IgG – 1601,22 (1011,93-2335,44) ВАУ/мл против 719,57 (407,51-961,73) ВАУ/мл группы постинфекционного иммунитета, индекса авидности – $81,58 \pm 3,41\%$ против $50,1 \pm 2,21\%$, и клеточного иммунного ответа – $13,71 \pm 1,07\%$ против $8,38 \pm 0,83\%$, соответственно.

Таблица 3.9 – Сопоставление постинфекционного и прорывного 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)
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*

Исследования гуморального и клеточного иммунного ответов против вируса SARS-CoV-2 проведены в условиях пандемии, когда продолжалась циркуляция вируса и он продолжал мутировать. Таким образом, каждая следующая встреча с новым штаммом SARS-CoV-2 приводила к бустированию,

независимо от того, появлялись ли клинические симптомы (обычно в форме легкого ОРЗ) или инфекция протекала бессимптомно. Трудно прогнозировать, сколько бы сохранялась иммунная защита против вируса SARS-CoV-2 при условии его элиминации из человеческой популяции. В подтверждение этой гипотезы рисунок 3.12 иллюстрирует результаты динамического наблюдения гуморального и клеточного ответов против вируса SARS-CoV-2 у 4 пациентов, первично перенесших COVID-19 в сентябре 2020 года за период наблюдения с декабря 2020 по сентябрь 2024 гг. Пациенты ТА (розовая линия) и ТС (синяя линия), перенесли COVID-19 средней степени тяжести. Пациенты АЮ (красная линия) и ТИ (зеленая линия) переболели COVID-19 легкой степени тяжести. У пациентов ТА, АЮ и ТС в первой точке исследования через 3 месяца от перенесенного COVID-19, в декабре 2020 года, был выявлен высокий уровень анти-S IgG, 1896 ВАУ/мл, 1464 ВАУ/мл и 1760 ВАУ/мл, соответственно. У пациента ТИ уровень анти-S-IgG оказался низким, 214 ВАУ/мл, тем не менее, он был выше установленного на тот момент защитного уровня антител в 150 ВАУ/мл. В течение последующих 6 месяцев после перенесенного COVID-19 уровень анти-S-IgG у всех 4 пациентов снизился. В мае 2021 года пациент ТА контактировал с другими лицами с подтвержденной инфекцией COVID-19, клинических проявлений заболевания у него не было. При исследовании уровня анти-S IgG у него установлен значительный прирост с 1460 ВАУ/мл в марте 2021 года до 1592 ВАУ/мл в июне 2021 года, который можно расценивать как бессимптомный бустер ответа антител. Пациент АЮ ухаживал за больной COVID-19 родственницей, симптомов заболевания у него не было, тем не менее у него выявлен бустер ответа анти-S IgG с 1140 ВАУ/мл в марте 2021 года до 2340 ВАУ/мл в июне 2021 года. Пациент ТС, не имевший контактов, демонстрировал продолжающееся снижение уровня анти-S IgG. Пациент ТИ, контактировавший с больными COVID-19, показал прирост антител со 120 ВАУ/мл до 164 ВАУ/мл в период с марта по июнь 2021 года.

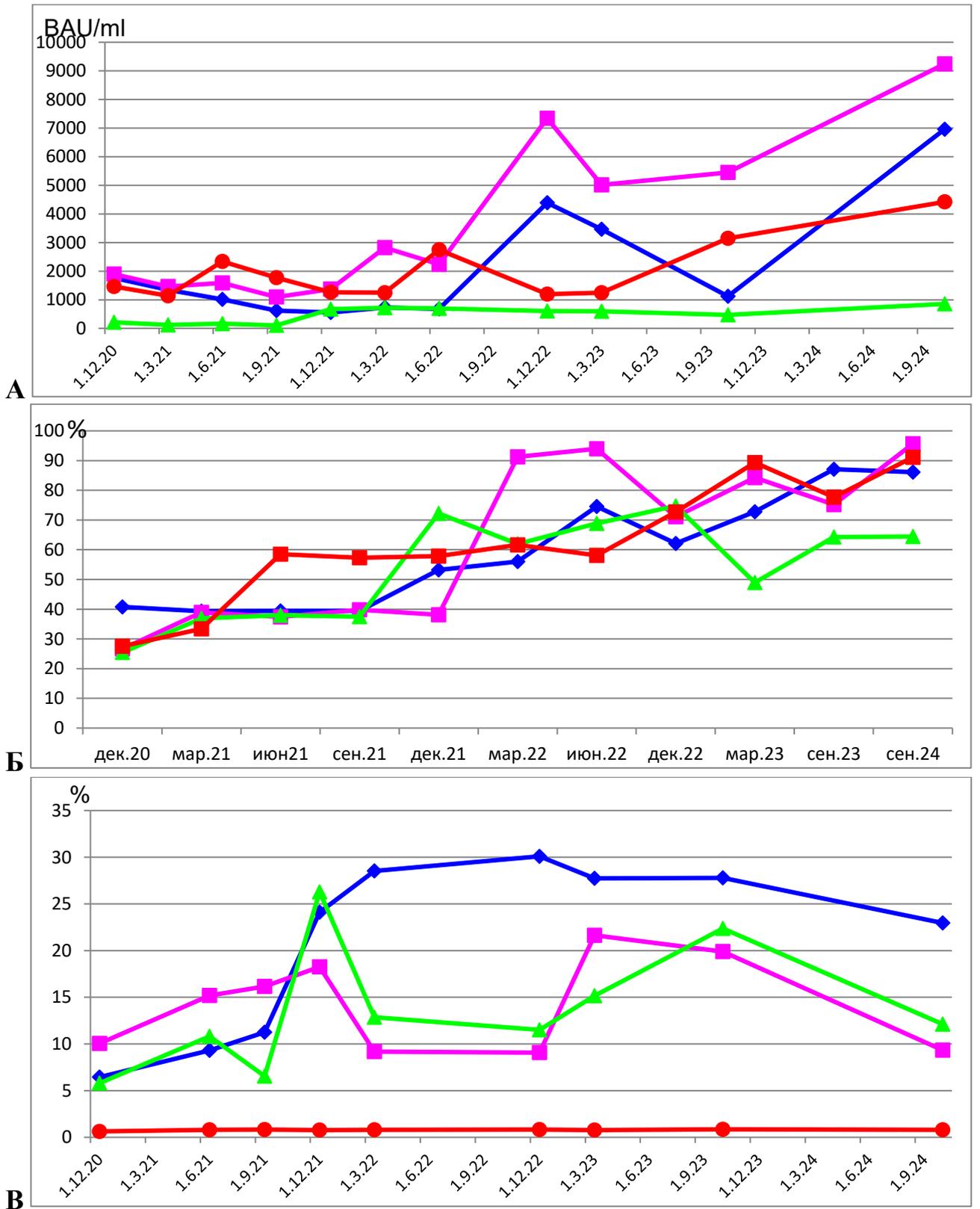


Рисунок 3.12 – Сопоставление динамики иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 у четырех человек, перенесших COVID-19 в сентябре 2020 г

Примечание:

А. Гуморальный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2

Б. Индекс avidности антител к S-белку вируса SARS-CoV-2

В. Клеточный иммунитет к S-белку вируса SARS-CoV-2

Далее ТИ перенес COVID-19, вызванный штаммом Дельта вируса SARS-CoV-2, со значимым приростом уровня анти-S IgG до 668 ВАУ/мл в декабре 2021 года. Пациент ТА в феврале 2022 года перенес COVID-19, вызванный штаммом Омикрон, что вызвало значимое повышение уровня анти-S IgG до 2826 ВАУ/мл. У пациентов ТИ и ТС, бывших с ним в контакте, выявлен подъем уровня анти-S IgG до 720 ВАУ/мл и 668 ВАУ/мл. Известно, что пациент ТС перенес ПЦР-подтвержденный COVID-19 в легкой форме осенью 2022 года, что дало прирост его уровня анти-S IgG до 4392,5 ВАУ/мл в декабре 2022 года, равно как и у пациента ТА, бывшего с ним в контакте и не имевшего клинических проявлений заболевания, до 7341,3 ВАУ/мл. Важно, что за период наблюдения у всех уровень анти-S IgG сохранялся выше защитного.

Созревание гуморального ответа характеризуется ростом avidности антител, специфичных к S-белку вируса SARS-CoV-2. Из рисунка видно, что индекс avidности нарастает в течение месяцев от момента перенесенного COVID-19, демонстрируя бустер после каждого перенесенного заболевания или бессимптомного контакта. У пациентов АЮ (красная линия), ТА (розовая линия) и ТИ (зеленая линия) уровень индекса avidности был низким и не превышал 30% в первой точке наблюдения в декабре 2020 года. У пациента ТС (синяя линия) индекс avidности анти-S IgG находилась на плато около 40% до сентября 2021 года, а затем прирастал вплоть до сентября 2023 года, составив 87,1%. Пациент АЮ показал рост индекса avidности до 58,5% наряду с бустером ответа анти-S IgG в июне 2021 года после длительного тесного контакта с больным COVID-19. У пациента ТА значимый прирост индекса avidности до 91,23% отмечен в марте 2022 года после перенесенного COVID-19, вызванного штаммом Омикрон, с дальнейшим созреванием гуморального ответа и ростом индекса avidности до 93,95% за последующие 3 месяца наблюдения. Далее индекс avidности анти-S IgG пациента ТА снижался, составив 75,2% в сентябре 2023 года. Все 4 пациента выработали высокоавидные анти-S IgG.

За весь период наблюдения у пациента АЮ (красная линия) процент цитотоксических $CD8^{high}CD107a^{+}$ Т-лимфоцитов, отреагировавших на S-белок

вируса SARS-CoV-2, был ниже cut-off 1%. Пациент ТА (розовая линия) демонстрировал подъем уровня клеточного иммунного ответа с 10,05% в декабре 2020 года до 18,26% в декабре 2021 года, постоянно контактируя с больными COVID-19. Затем его клеточные ответы постепенно снижались до 9,19% в марте 2022 года. Известно, что у штамма Омикрон произошло много мутаций в S-белке, а для индукции цитотоксических Т-лимфоцитов в лабораторных тестах использовали S-белок уханьского штамма SARS-CoV-2. Вероятно, часть цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к новым эпитопам вируса, не была учтена. Клеточный ответ пациента ТА в течение 9 месяцев, до декабря 2022 года, находился на одном уровне, при том, что одновременно значимо прирос уровень анти-S IgG. У пациентов ТИ (зеленая линия) и ТС (синяя линия) отмечен бессимптомный бустер клеточных ответов после контактов с больными COVID-19 до 26,29% и 24,1%, соответственно. И пациент ТИ, и пациент ТС, контактировали со штаммом Омикрон, показав разную динамику клеточных ответов. У пациента ТИ отмечалось снижение уровня клеточного ответа до 12,86% (март 2022 года). Пациент ТС, напротив, показал дальнейший бустер уровня клеточного ответа до 28,54%, при том, что уровень его анти-S IgG находился на плато в этот период наблюдения.

На 4-й год наблюдения выявленные тенденции сохранялись у всех 4 обследованных. Отмечался прирост уровня анти-S IgG, как у лиц с высоким, так и с низким типом гуморального ответа. Продолжал нарастать индекс авидности антител. Клеточный иммунитет продолжал сохраняться на высоком уровне у ТА, ТС и ТИ.

3.6 Моделирование гуморального иммунного ответа на S- и N- белок вируса SARS-CoV-2

Известно, что из всех белков коронавируса самыми иммуногенными, вызывающими выработку наибольшего количества антител, являются S- и N-белки. Анти-S IgG являются защитными в отличие от анти-N IgG. В связи с большим количеством мутаций в S-белке в ходе пандемии, вакцины, созданные в ее начале, частично утратили свою эффективность. Это вызвало интерес

исследователей к N-белку. N-белок вируса SARS-CoV-2 отличается своей консервативностью. Он размещен в центре вириона и участвует в упаковке вирусной РНК и сборке капсида, находясь вне досягаемости антител. Роль анти-N IgG в гуморальном иммунном ответе продолжают изучать.

У 27 человек, переболевших ПЦР-подтвержденным COVID-19 в легкой или среднетяжелой форме, 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. Следует отметить, что данная часть исследования была проведена до появления штамма Омикрон, когда многие ранее переболевшие стали повторно заболевать COVID-19. На рисунке 3.13 представлены результаты измерения уровней анти-N и анти-S IgG антител. Экспериментальные данные показывают различную динамику уровней анти-N IgG, сплошная линия красного цвета, и анти-S IgG, сплошная линия синего цвета. Уровни анти-N IgG в сыворотке крови переболевших COVID-19 появлялись раньше и резко нарастали с пиком на сроке 3 месяца от начала заболевания, 1033,2 (807,04-1215,6) ВАУ/мл и также быстро снижались в течение года, достигая минимума к 15 месяцам 75,5 (25,5-182,2) ВАУ/мл. Следует подчеркнуть, что cut-off используемой тест-системы составляла 17 ВАУ/мл.

Анти-S IgG, напротив, нарастали медленнее и, достигнув пика на сроке 4 месяца от момента перенесенного COVID-19 на уровне 819,5 (614,7-1538,3) ВАУ/мл, продолжали сохраняться на этом уровне в течение года наблюдения. Затем следовало плавное снижение уровня анти-S IgG в течение последующих 6 месяцев наблюдения до 551,6 (372,5-757,5) ВАУ/мл, с сохранением уровня, выше установленного защитного, на сроке 15 месяцев от начала заболевания.

Результаты исследований были аппроксимированы построением математических моделей динамического изменения уровней анти-S и анти-N IgG в зависимости от времени после заболевания COVID-19. Выбор функциональных зависимостей определял характер наблюдаемых изменений ответов анти-S и анти-N IgG. Динамику синтеза анти-N IgG удалось описать с помощью распределения Фишера, штрихпунктирная линия красного цвета на рис.3.13, где значения

функции достаточно быстро достигают максимума и постепенно снижаются до нулевого уровня, формула (3).

$$f_{N\text{-белок}}(x) = 8 \cdot 10^8 \cdot \frac{(0.2x)^{5.5}}{(1+0.52x)^9} \quad (3)$$

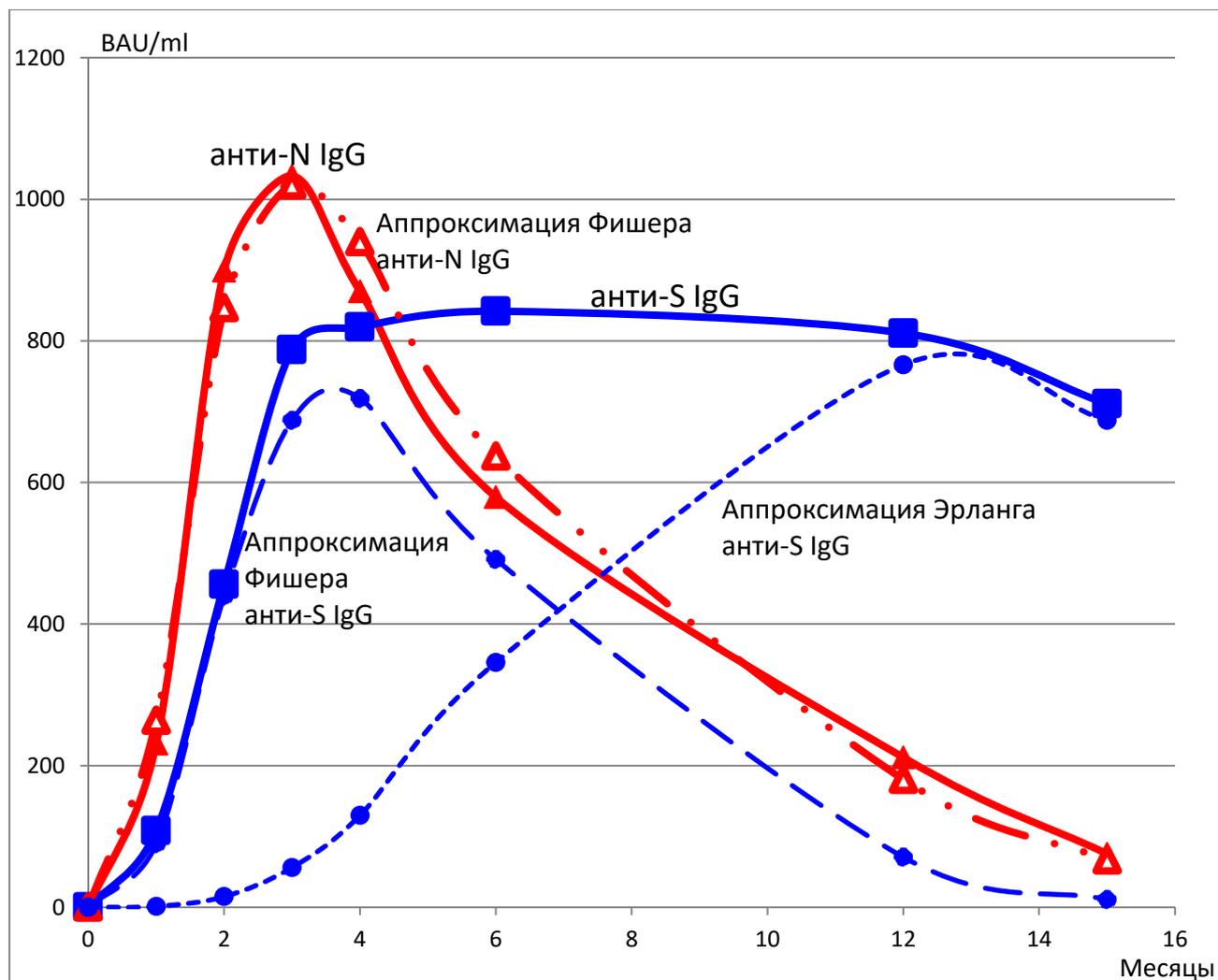


Рисунок 3.13 – Уровень IgG-антител к антигенам вируса SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19

Примечание:

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

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

Штрихпунктирная красная линия – аппроксимация Фишера уровня анти-N-IgG, короткоживущие плазмоциты

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

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

В таблице 3.10 представлены результаты сопоставления динамических изменений уровней анти-N IgG в зависимости от времени, прошедшего от начала заболевания COVID-19 и расчетных результатов, произведенных по формуле (3).

Таблица 3.10 – Сопоставление уровня IgG-антител к N-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших лиц (BAU/мл), полученных в эксперименте, и результатов расчетов по формуле (3)

Срок от начала заболевания	N-белок (Me (LQ-HQ))	Расчет (формула Фишера) (3)	Процент отклонения расчетного значения от экспериментального
1 мес.	230,9 (118,4-430,6)	264,34	-14,5%
2 мес.	899,2 (497,8-1225,9)	846,74	5,83%
3 мес.	1033,2 (807,04-1215,6)	1020,38	1,2%
4 мес.	870,1 (319,7-3790,36)	940,00	-8,0%
6 мес.	579,3 (374,3-2524,9)	637,55	-10,1%
12 мес.	211,5 (116,9-507,3)	180,55	14,6%
15 мес.	75,5 (25,5-182,2)	66,76	11,6%

Из таблицы видно, что данные эксперимента и расчетов по формуле (3) различаются не более чем на 15%, при том, что результаты расчетов строго уложились в интервал LQ-HQ в каждой точке исследования.

С целью оценки качества примененных моделей были рассчитаны метрики качества: квадратный корень из среднеквадратичной ошибки (RMSE) и средняя абсолютная процентная ошибка (MAPE). При моделировании процесса изменения уровня IgG-антител к N-белку вируса SARS-CoV-2 в зависимости от времени от начала заболевания при использовании коэффициентов, представленных в формуле (3), были получены минимальные значения метрик качества. RMSE составил 16,505, а MAPE – 9,408%, что свидетельствует о хорошем качестве предложенной модели.

Попытки аппроксимации кривой динамики ответа анти-S IgG, изображенной на рис. 3.13 сплошной линией синего цвета одним из известных

распределений не удались. Было предположено, что кривая, отражающая динамику уровня IgG-антител к S-белку коронавируса, является результатом двух процессов: синтеза ранних анти-S IgG короткоживущими плазматическими клетками, штриховая линия синего цвета, и поздних анти-S IgG долгоживущими плазматическими клетками, пунктирная линия синего цвета на рис. 3.13. Изменения уровня анти-S IgG во времени, продуцируемых короткоживущими плазматическими клетками, хорошо аппроксимируется распределением Фишера, формула (4).

$$f_{S\text{-белок Фишер}}(x) = 7 \cdot 10^5 \cdot \frac{(0.2x)^{4.5}}{(1+0.66x)^{13.75}} \quad (4)$$

Аппроксимацию изменений уровня анти-S-IgG во времени, продуцируемых долгоживущими плазматическими клетками, пунктирная линия синего цвета, хорошо отражает распределение Эрланга, формула (5), для которой характерно более плавное нарастание и медленное снижение значения функции.

$$f_{S\text{-белок Эрланг}}(x) = 1100 \cdot \frac{3.1^{5.1} \cdot (0.11x)^{4.1} \cdot e^{-3.1x}}{4!} \quad (5)$$

В таблице 3.11 представлены результаты сопоставления динамических изменений уровней анти-S IgG в зависимости от времени, прошедшего от начала заболевания COVID-19, и расчетных результатов, произведенных по формулам (4) и (5). Из таблицы видно, что данные эксперимента и расчетов по формулам (4) и (5) различаются не более чем на 13%, при том, что результаты расчетов строго уложились в интервал LQ-HQ в каждой точке исследования.

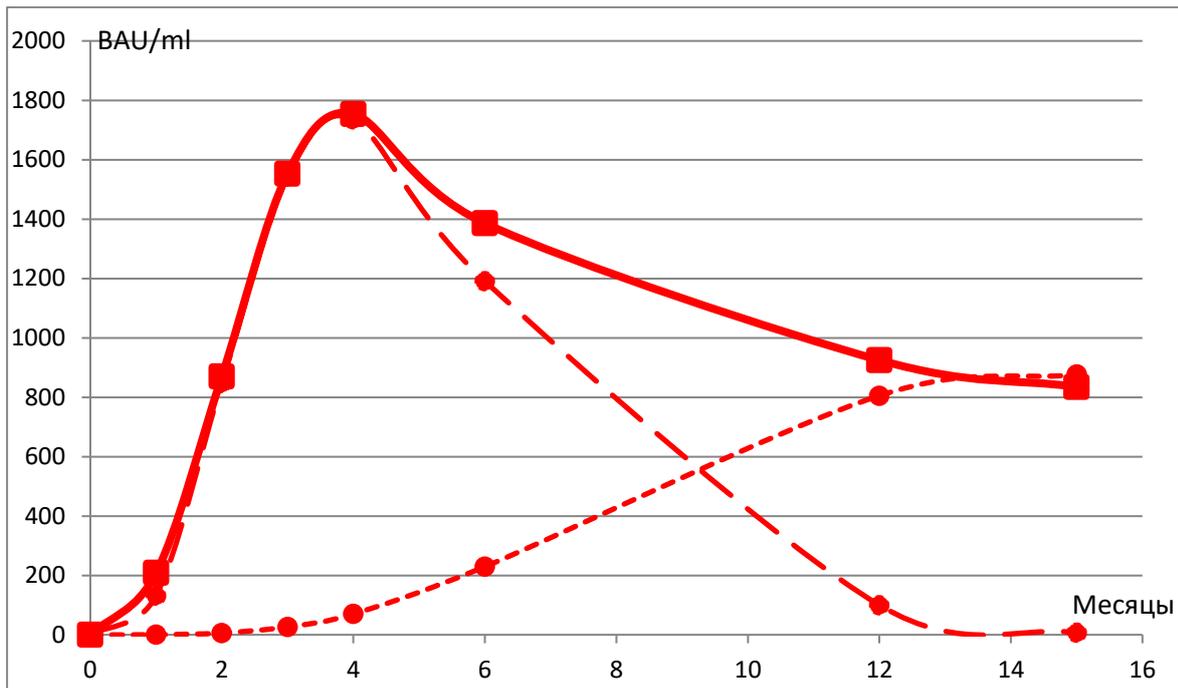
Для моделирования изменений уровня IgG-антител к S-белку в зависимости от времени, прошедшего от начала заболевания при использовании коэффициентов, представленных в формулах (4) и (5) были также получены минимальные значения метрик качества. RMSE составил 8,949, а MAPE – 4,096%, что свидетельствует о высоком качестве предложенной модели.

Таблица 3.11 – Сопоставление экспериментальных данных уровня IgG-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших лиц (BAU/мл) и результатов расчетов по формулам (4) и (5)

Срок от начала заболевания	S-белок (Me (LQ-HQ))	Расчет (формула Фишера) (4)	Расчет (формула Эрланга) (5)	Сумма расчетов по формулам (4) и (5)	Процент отклонения суммы расчетных значений от экспериментального
1 мес.	103,3 (73,37-189,1)	89,60	1,23	90,83	12,1%
2 мес.	456,2 (199,2-1027,1)	439,30	14,96	454,26	0,4%
3 мес.	787,4 (356,1-1190,2)	687,89	56,07	743,96	5,5%
4 мес.	819,5 (614,7-1538,3)	718,62	129,69	848,31	-3,5%
6 мес.	841,8 (614,9-1420,7)	491,38	345,69	837,07	0,6%
12 мес.	810,9 (504,5-1215,3)	70,82	766,21	837,03	-3,2%
15 мес.	551,6 (372,5-757,5)	10,98	522,10	533,08	3,4%

Динамика уровней анти-S IgG в зависимости от времени, прошедшего от начала заболевания COVID-19, была определена у 35 человек, что позволило разделить когорту на 2 подгруппы с высоким уровнем гуморального ответа (20 человек) и 15 человек с низким уровнем анти-S IgG (Рисунок 3.14). У исследуемых с высоким уровнем ответа анти-S IgG, сплошная линия красного цвета, отмечался значительный подъем концентрации с достижением пика 1800 BAU/мл через 4 месяца от момента начала COVID-19. Концентрация анти-S IgG далее быстро снижалась в течение года и выходила на плато в течение следующих 6 месяцев наблюдения, оставаясь на высоком уровне около 800 BAU/мл, в точке наблюдения 15 месяцев.

А



Б

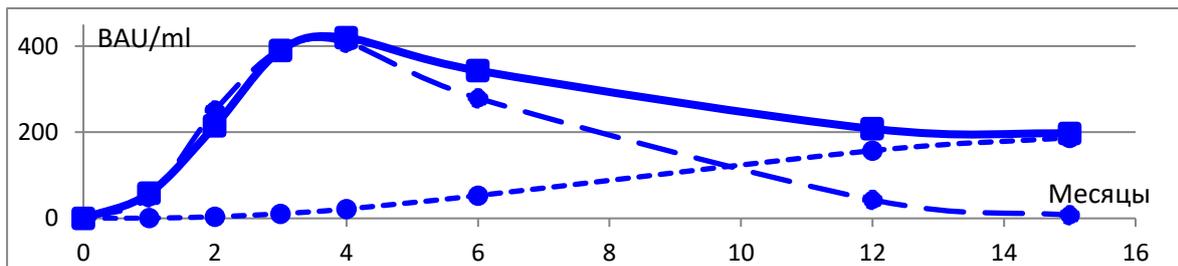


Рисунок 3.14 – Динамика концентрации анти-S IgG с высоким (А) и низким (Б) уровнем ответа

Примечание:

А. Сплошная красная линия – анти-S-IgG, экспериментальные данные

Штриховая красная линия – аппроксимация Фишера уровня анти-S-IgG-короткоживущие плазмоциты

Пунктирная красная линия – аппроксимация Эрланга уровня анти-S-IgG, долгоживущие плазмоциты.

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

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

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

Кривая, отражающая данные, рассчитанные с помощью распределения Фишера (6), штриховая линия красного цвета, описывает продукцию анти-S-IgG короткоживущими плазматическими клетками.

$$f_{S\text{-белок Фишер}}(x) = 10^6 \cdot \frac{(0.2x)^{4.65}}{(1 + 0.323x)^{23.15}} \quad (6)$$

Кривая, отражающая данные, рассчитанные с помощью распределения Эрланга (7), пунктирная линия красного цвета, описывает продукцию анти-S-IgG долгоживущими плазматическими клетками.

$$f_{S\text{-белок Эрланг}}(x) = 1100 \cdot \frac{3.1^{5.1} \cdot (0.11x)^{4.1} \cdot e^{-0.341x}}{4!} \quad (7)$$

В группе с исходно низким уровнем ответа анти-S IgG пик их концентрации, 400 ВАУ/мл, был достигнут через 4 месяца после перенесенного COVID-19, равно как и в группе исследуемых с исходно высоким уровнем анти-S IgG. Затем последовало более пологое снижение концентрации защитных антител с достижением уровня 200 ВАУ/мл через год наблюдения. Этот уровень поддерживался и в следующие 6 месяцев, то есть концентрация анти-S IgG оставалась защитной, как и в группе с исходно высоким уровнем таких антител. Кривая, отражающая данные, рассчитанные с помощью распределения Фишера (8), штриховая линия синего цвета, описывает продукцию анти-S-IgG короткоживущими плазматическими клетками в группе с исходно низким уровнем ответа анти-S-IgG.

$$f_{S\text{-белок Фишер}}(x) = 7 \cdot 10^5 \cdot \frac{(0.2x)^{4.75}}{(1 + 0.793x)^{13}} \quad (8)$$

Кривая, отражающая данные, рассчитанные с помощью распределения Эрланга (9), пунктирная линия синего цвета, описывает продукцию анти-S-IgG долгоживущими плазматическими клетками в группе с исходно низким уровнем ответа анти-S IgG.

$$f_{S\text{-белок Эрланг}}(x) = 800 \cdot \frac{1.2^{5.1} \cdot (0.15x)^3 \cdot e^{-1.2x}}{3!}$$

(9)

На рисунке 3.15 представлено изменение спектра субклассов IgG-антител к антигенам вируса SARS-CoV-2.

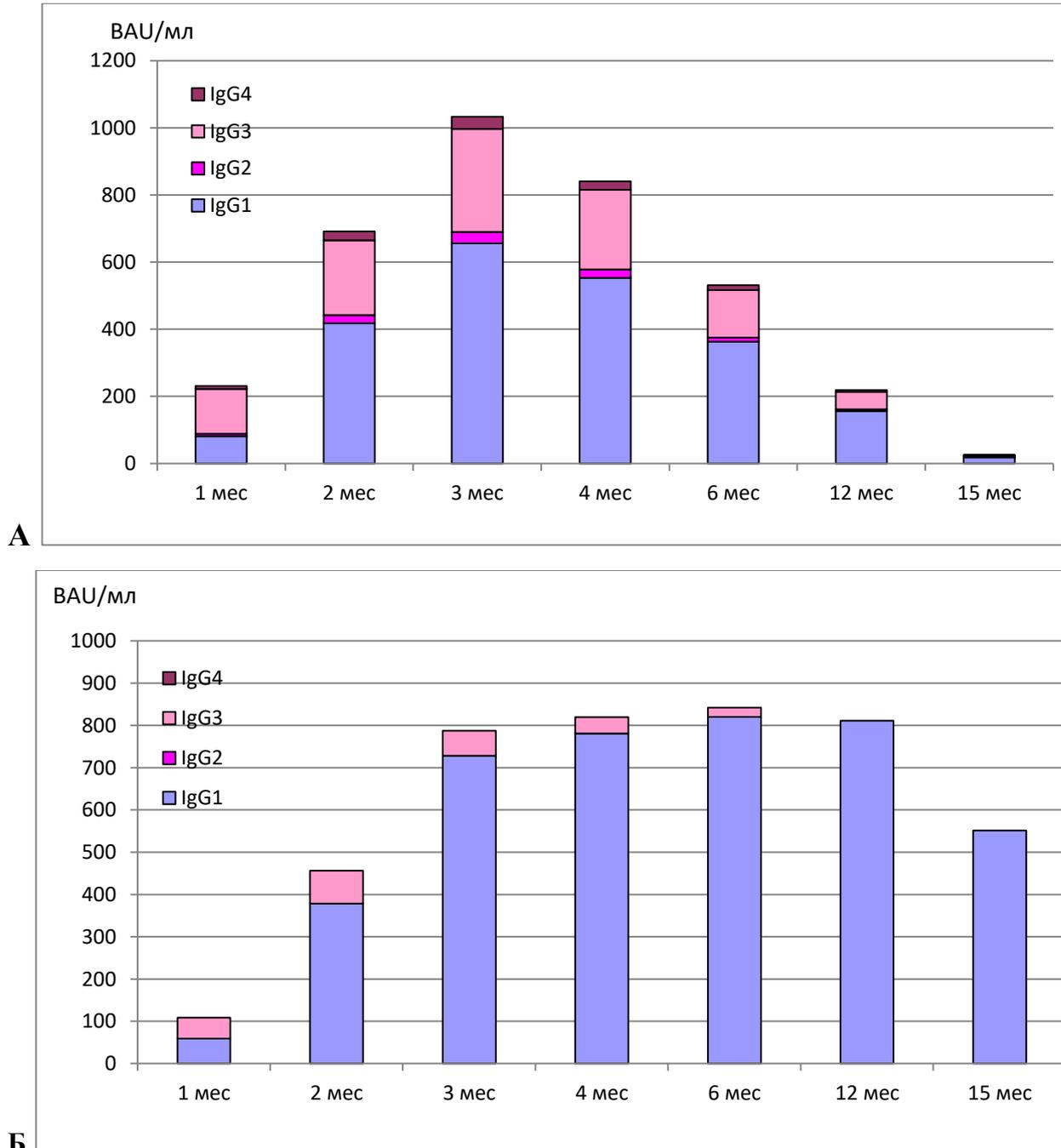


Рисунок 3.15 – Динамика спектра субклассов IgG-антител к антигенам вируса SARS-CoV-2 (абсолютные значения)

Примечание:

А. N-белок вируса SARS-CoV-2; Б. S-белок вируса SARS-CoV-2

Известно, что короткоживущие плазмоциты синтезируют преимущественно IgG3 антитела, а долгоживущие – антитела IgG1 субкласса. Видно, что созревание ответа антител на N- и S-белок вируса идет по-разному. В спектре субклассов анти-N IgG представлены все субклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, при этом субклассы IgG2 и IgG4 минорные. Спектр субклассов анти-S IgG представлен только субклассами IgG1 и IgG3. В ответе на N-белок изначально преобладают IgG3 антитела, прирост уровня IgG антител осуществляется за счет IgG1 и IgG3, быстро достигает максимума к 3 месяцам от начала COVID-19, а быстрое снижение уровня IgG идет в первую очередь за счет IgG3, а затем и за счет других субклассов. Ответ анти-S IgG формируют преимущественно антитела IgG1 субкласса, по мере нарастания уровня IgG до максимума в 6 месяцев от момента перенесенного COVID-19, антитела IgG3 субкласса полностью вытесняются IgG1 антителами. И в ответе анти-N IgG, и в ответе анти-S IgG идет постепенное замещение субкласса IgG3 на IgG1, но с разной скоростью, таблица 3.12. Через 1 месяц после COVID-19 54,6±2,7% анти-S IgG представлено субклассом IgG1 против 35,2±1,1% субкласса анти-N-IgG1.

Таблица 3.12 – 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

Вклад в гуморальный ответ анти-N IgG1 достигает максимума 71,38±3,2% к году наблюдения и сохраняется около этого уровня еще полгода. Анти-S IgG1 составляют 83,0±3,78% от общего ответа антител, специфичных к S-белку вируса

SARS-CoV-2 уже через 2 месяца от начала COVID-19, их удельный вес продолжает нарастать в течение года. Через год после перенесенного COVID-19 100% ответа антител на S-белок представлено субклассом IgG1, подобные результаты получены еще через 3 месяца наблюдения.

3.7 Сопоставление иммунного ответа на S- и N- белок вируса SARS-CoV-2

С целью сопоставления иммунных ответов на S- и N- белок вируса SARS-CoV-2 у лиц с разной историей контакта и путей введения, были проведены исследования на сроке 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.). Результаты представлены на рисунке 3.16. Из представленных на рисунке данных видно, что уровни анти-N IgG и анти-S IgG отличаются в группах обследуемых. В группе 1 постинфекционного иммунитета наблюдался довольно большой разброс концентраций анти-N IgG, но медиана по группе не превышала значимо уровень анти-S IgG. В группе 2 поствакцинального иммунитета ни у одного из исследуемых не было обнаружено анти-N IgG в связи с отсутствием N-белка в составе вакцины «Спутник V». В группе 3 гибридного иммунитета, COVID-19, а затем вакцинация, концентрация анти-N IgG оказалась значимо ниже ($p = 0,018$), чем анти-S IgG. Анти-S IgG в этой группе были значимо выше ($p=0,004$), чем в группе 2 поствакцинального иммунитета. В группе 4 прорывного иммунитета, у дважды перенесших COVID-19, ответы антител были значимо выше и по анти-N IgG ($p=0,042$) и по анти-S IgG ($p=0,0006$), в сравнении с группой 1 постинфекционного иммунитета, после однократного COVID-19.

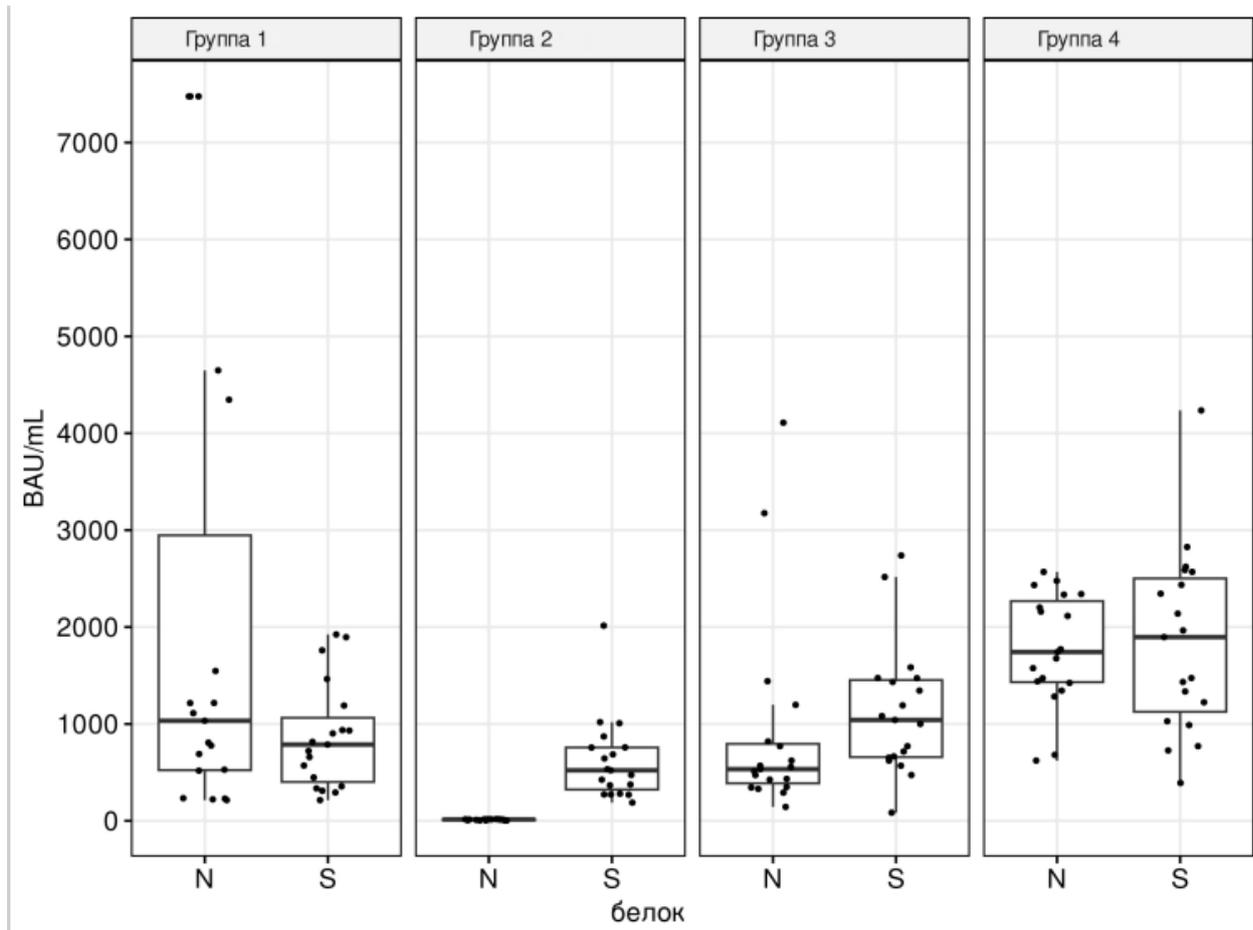


Рисунок 3.16 – Сопоставление уровней IgG антител к N- и S-белку у переболевших COVID-19 (группа 1), дважды привитых вакциной «Спутник V» (группа 2), переболевших, а после привитых вакциной «Спутник V» (группа 3) и дважды переболевших COVID-19 (группа 4)

На рисунке 3.17 представлены результаты сопоставления вклада субкласса IgG1 в анти-N-IgG и анти-S-IgG у тех же групп обследуемых. Во всех группах участников исследования ответ на S-белок вируса SARS-CoV-2 представлен исключительно субклассом IgG1. В группе 1 постинфекционного иммунитета анти-N IgG1 составили $72,8 \pm 3,5\%$, в группе 2 поствакцинального иммунитета не было ответов антител на N-белок по причине его отсутствия в вакцине, в группе 3 гибридного иммунитета вклад анти-N IgG1 $75,9 \pm 3,8\%$ был сопоставим с группой 1 постинфекционного иммунитета, эти обследуемые однократно перенесли COVID-19, затем получили вакцинацию «Спутник V» без N-белка в составе вакцины.

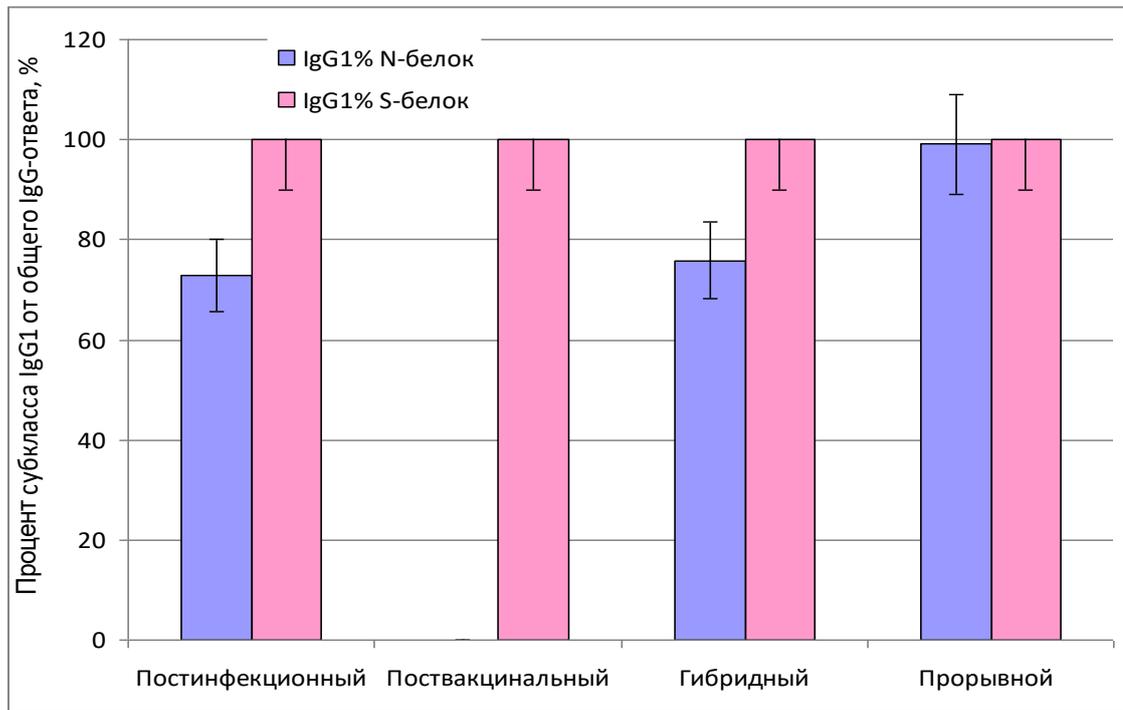


Рисунок 3.17 – Вклад субкласса IgG1 в общий IgG-ответ на N- и S-белок вируса SARS-CoV-2

Наибольший вклад анти-N IgG1 $99,1 \pm 0,3\%$ выявлен в группе 4 прорывного иммунитета, значительно превышая этот параметр в группах 1 постинфекционного и 3 гибридного иммунитета ($p < 0,01$). Это говорит о том, что при повторном заболевании COVID-19 в группе 4 продолжалось созревание ответа анти-N IgG.

Результаты исследований клеточных иммунных ответов на N- и S-белок вируса SARS-CoV-2 у тех же групп обследуемых представлены на рисунке 3.18. Процент цитотоксических $CD8^{high}CD107a^{+}$ Т-лимфоцитов, в ответ на распознавание S-белка вируса SARS-CoV-2, не имел значимых различий по группам, была выявлена тенденция к повышению уровня клеточного ответа в группе 4 прорывного иммунитета дважды перенесших COVID-19. В группе 3 гибридного иммунитета уровень клеточных ответов на N-белок вируса оказался значимо ниже ($p < 0,05$), чем в группах 1 постинфекционного и 4 гибридного иммунитета. В группе 2 поствакцинального иммунитета у 17 человек ожидаемо не было клеточных ответов на N-белок, а у 6 человек выявлены высокие клеточные ответы на него при отсутствии анти-N IgG, равно как и анти-S IgG до

вакцинации у всех членов этой группы. Присутствие клеточных ответов цитотоксических Т-лимфоцитов на N-белок со средним уровнем $5,94 \pm 2,3\%$ для всей группы 2 отражено на рисунке.

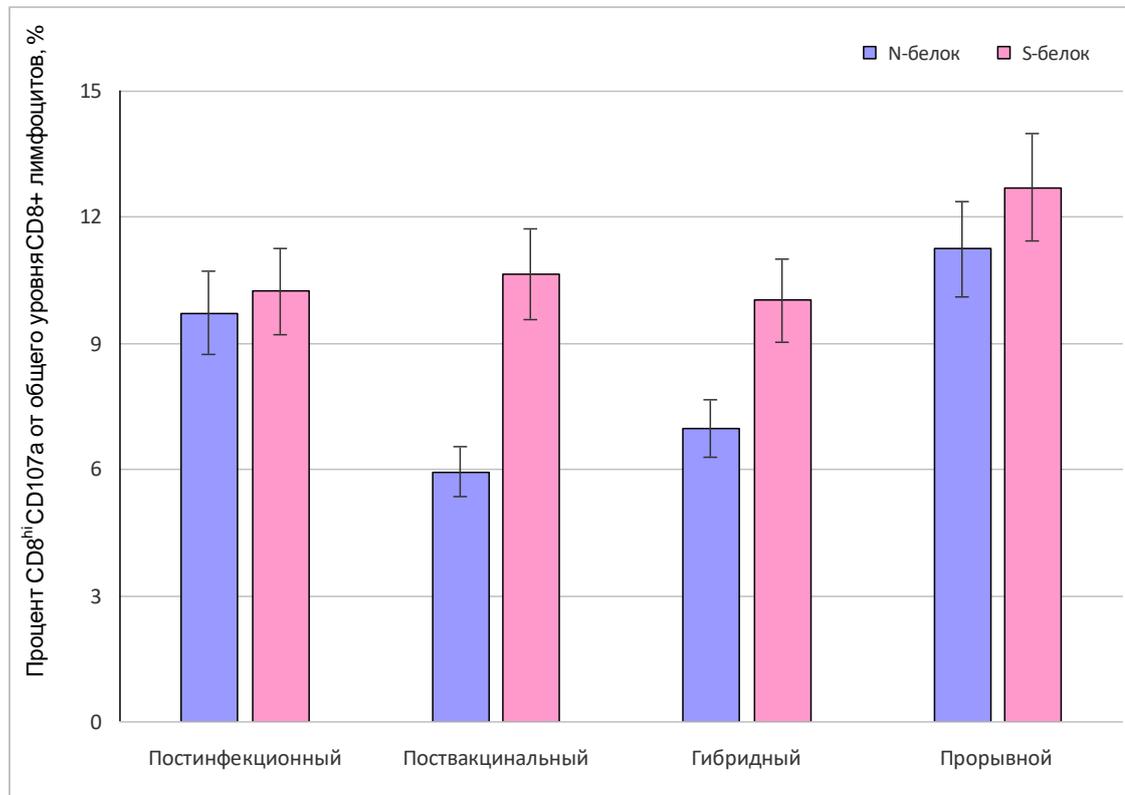


Рисунок 3.18 – Клеточный иммунный ответ на N- и S-белок вируса SARS-CoV-2

Уровни клеточных ответов на S- и N-белок показали сильную положительную корреляцию ($r = 0,937$) между собой. Гуморальные и клеточные ответы на S-белок вируса SARS-CoV-2 продемонстрировали слабую положительную корреляцию ($r = 0,358$). Корреляции гуморальных и клеточных ответов на N-белок вируса SARS-CoV-2 не выявлено.

3.8 Сопоставление разных методов оценки клеточного иммунного ответа на антигены вируса SARS-CoV-2

Решающая роль в клинических исходах заболеваний, вызванных вирусом, включая SARS-CoV-2, принадлежит клеточному иммунному ответу, основными характеристиками которого являются антигенспецифический ответ и формирование памяти, что позволяет организму эффективно защищаться при повторных встречах с вирусом. Количественные и функциональные

характеристики его отличаются от одного индивидуума к другому. Существует много различных способов оценки количества и функций клеточных эффекторов ответа, включая их анализ с предельным разведением, окрашиванием цитокинов предварительно пермеабиллизированных CD8⁺ Т-лимфоцитов, метод тетрамеров и, признанный “золотым стандартом” оценки Т-клеточного ответа в клинических испытаниях вакцин, ELISpot. В любом случае выделенные из крови мононуклеары стимулируют антигеном и оценивают реакцию на распознавание этого антигена. Наиболее часто в ELISpot оценивают продукцию цитокина IFN- γ , который могут синтезировать сразу несколько субпопуляций: NK-, NKT-, $\gamma\delta$ T-клетки, CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты, Th1. 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 индукции Т-клеточного ответа при использовании метода ELISpot. Была оценена продукция IFN- γ мононуклеарами, стимулированными в первом способе полноразмерным S-белком вируса SARS-CoV-2, во втором – смесью пептидов вируса, отличавшихся своей консервативностью и иммуногенностью. Результаты, полученные в ELISpot, сопоставляли с результатами оценки цитотоксических CD8^{high} Т-лимфоцитов, специфически распознающих антигены коронавируса, выставленные на поверхность зараженной вирусом клетки в составе MHC-I, отвечать атакой с выбросом перфорина и гранзимов в синаптическую щель. Известно, что в этот момент на поверхности такого CD8^{high} Т-лимфоцита появляется молекула CD107a. CD107a – белок мембраны цитотоксических гранул NK- и CD8⁺Т-клеток, его появление на поверхности таких клеток служит маркером их активации. Выделение гейта лимфоцитов, высоко экспрессирующих CD8^{high} дало возможность оценивать уровень специфичного к коронавирусу Т-клеточного ответа.

В исследовании, предпринятом с целью сопоставления трех методов оценки клеточного иммунного ответа к антигенам вируса SARS-CoV-2, приняли участие

26 человек, переболевших подтвержденным ПЦР COVID-19 в легкой или среднетяжелой форме, группа 1 постинфекционного иммунитета, на сроках от 2 до 12 месяцев от момента перенесенного заболевания; 19 человек, ранее не болевших COVID-19, 2-кратно привитых вакциной «Спутник V», на сроках от 3 до 9 месяцев после вакцинации, группа 2 поствакцинального иммунитета; 21 человек, перенесший COVID-19, затем дважды вакцинированный вакциной «Спутник V», группа 3 гибридного иммунитета; и 14 человек, имевших в анамнезе два подтвержденных случая COVID-19, 1-ый в 2020-2021 годах, второй – в январе-феврале 2022 года, штамм Омикрон, они сформировали группу 4 прорывного иммунитета.

В группах 1, 2 и в половине 3-ей группы (n=11) удалось провести оценку клеточного иммунного ответа 2-мя способами: по уровню экспрессии CD107a на CD8^{high} лимфоцитах (отношение количества CD8^{high} Т-лимфоцитов, распознавших S-белок и ответивших экспрессией молекулы CD107a на поверхности, к общему числу CD8^{high} Т-лимфоцитов, выраженное в процентах) и методом ELISpot с индукцией синтеза IFN-γ мононуклеарами крови полноразмерным S-белком SARS-CoV-2. Клеточный иммунный ответ второй половины группы 3 гибридного иммунитета (n=10) и всей группы 4 прорывного иммунитета удалось оценить 3-мя способами: по уровню экспрессии маркера активации цитотоксических Т-лимфоцитов CD8^{high} CD107a, методом ELISpot с оценкой уровня продукции IFN-γ мононуклеаров, стимулированных полноразмерным S-белком вируса SARS-CoV-2 и пептидной смесью из белков вируса SARS-CoV-2. Методика проявления пятен в двух последних способах имела отличия. Уровень ответа в виде продукции IFN-γ, проанализированный с помощью тест-систем Human IFN-γ ELISpot и Corona-T-test, различался, это дало основание анализировать результаты эксперимента отдельно для каждой тест-системы.

Из предыдущих экспериментов было установлено, что уровень спонтанной экспрессии CD107a на CD8^{high} Т-лимфоцитах не выходит за пределы cut-off = 1%, равно как и в группе лиц, не болевших и не прививавшихся против COVID-19. Для ELISpot уровень спонтанной активности клеток-продуцентов IFN-γ был

установлен в количестве $7,65 \pm 0,87$ пятен (клеток-продуцентов) на лунку. Программное обеспечение прибора для оценки результатов ELISpot позволяет не только подсчитать количество пятен, но и оценить суммарную площадь и интенсивность окраски пятен и пересчитать это в концентрацию IFN- γ в каждой лунке. Результаты ELISpot оказались различными у лиц, принявших участие в исследовании. Поэтому результат ELISpot каждого участника был оценен за вычетом уровня спонтанной продукции клеток-продуцентов IFN- γ и как соотношение индуцированного уровня клеточного ответа обследуемого к его отрицательному контролю, то есть в относительном выражении. Сопоставление результатов исследования клеточного иммунитета в группах 1, 2 и первой половины группы 3 приведено в таблице 3.13. По уровню экспрессии CD107a на CD8^{high} Т-лимфоцитах, специфически распознавших полноразмерный S-белок SARS-CoV-2, группы 1, 2 и часть группы 3, принявшей участие в этом исследовании, значимо не отличались. По абсолютному количеству пятен, соответствующих клеткам-продуцентам, ответивших синтезом IFN- γ на распознавание полноразмерного S-белка SARS-CoV-2, значимых отличий в группах 1, 2, 3 тоже не установлено.

Таблица 3.13 – Определение клеточного иммунитета по экспрессии CD107a на CD8^{high} лимфоцитах и методом ELISpot при индукции S-белком SARS-CoV-2

	CD8 ^{high} CD107a+ , %	ELISpot, абсолютное количество	IFN- γ , пг/мл	ELISpot, относительное количество	IFN- γ , относительное количество
Группа 1	10,09 \pm 1,35	83,23 \pm 6,63	454,95 \pm 20,32	16,83 \pm 2,35	42,79 \pm 8,09
Группа 2	9,45 \pm 1,48	86,25 \pm 7,12	470,77 \pm 26,24	22,34\pm 3,77*	42,98 \pm 10,43
Группа 3	9,31 \pm 1,32	80,04 \pm 5,87	317,29 \pm19,04*	15,46 \pm 1,83	45,64 \pm 8,84

Примечание:

* $p < 0,05$

Выявлено значимое превышение ($p = 0,048$) уровня продукции IFN- γ в группе 1 постинфекционного иммунитета, $454,95 \pm 20,32$ пг/мл, и группе 2

поствакцинального иммунитета, $470,77 \pm 26,24$ пг/мл, в сравнении с группой 3 гибридного иммунитета, $317,29 \pm 19,04$ пг/мл.

В относительном выражении результаты исследования методом ELISpot показали повышение уровня ответа клеток-продуцентов IFN- γ в группе 2 поствакцинального иммунитета $22,34 \pm 3,77$, по сравнению с $16,83 \pm 2,35$ в группе 1 постинфекционного иммунитета и $15,46 \pm 1,83$ в группе 3 гибридного иммунитета. Различия оказались значимыми, $p = 0,033$. В относительном выражении уровень продукции IFN- γ значимо не отличался в тех же группах.

В таблице 3.14 представлены результаты сопоставления уровней клеточных иммунных ответов, полученные всеми 3 способами во второй половине группы 3 гибридного и группы 4 прорывного иммунитета. Уровень экспрессии CD107a на CD8^{high} Т-лимфоцитах, специфически распознавших полноразмерный S-белок SARS-CoV-2 в группе 4 прорывного иммунитета показал тенденцию к его повышению в сравнении с группой 3 гибридного иммунитета, $12,27 \pm 2,51\%$ и $10,04 \pm 1,37\%$, соответственно, без значимых различий. Стимуляция мононуклеаров крови обследуемых полноразмерным S-белком SARS-CoV-2 выявила значимое ($p = 0,0034$), снижение количества пятен (клеток-продуцентов) в группе 4 прорывного иммунитета, $30,59 \pm 2,29$, в сравнении с группой 3 гибридного иммунитета, $58,97 \pm 4,47$. Продукция IFN- γ также была значимо ($p < 0,05$) ниже в группе 4 прорывного иммунитета, $267,52 \pm 17,38$ пг/мл, в сравнении с группой 3 гибридного иммунитета, $361,68 \pm 18,84$ пг/мл. Расчет тех же результатов в относительном выражении значимых различий не установил. Стимуляция мононуклеаров крови обследуемых смесью особо иммуногенных и консервативных пептидов вируса SARS-CoV-2 показала значимое ($p < 0,05$), повышение количества пятен (клеток-продуцентов IFN- γ), $86,72 \pm 7,20$, в группе 4 прорывного иммунитета в сравнении с $69,38 \pm 5,53$ в группе 3 гибридного. Уровень продукции IFN- γ также был значимо выше ($p = 0,043$) в группе 4 прорывного иммунитета, $991,25 \pm 65,18$ пг/мл, в сравнении с группой 3 гибридного – $760,76 \pm 50,70$ пг/мл. Расчеты результатов в относительном выражении выявили тенденцию к повышению числа пятен в группе 4 прорывного

иммунитета, $10,30 \pm 2,77$, против $8,61 \pm 2,66$ группы 3 гибридного иммунитета. Продукция IFN- γ в относительном выражении также была значимо выше ($p = 0,047$) в группе 4 прорывного иммунитета, $68,10 \pm 9,41$ против $48,35 \pm 8,15$ группы 3 гибридного.

Клеточный иммунитет переболевших ПЦР-подтвержденным COVID-19 однократно, группа 1 постинфекционного иммунитета, и перенесших COVID-19 дважды, группа 4 прорывного иммунитета, был исследован разными способами, сопоставление результатов было бы интересным, но не совсем корректным. Клеточные иммунные ответы группы 3 гибридного иммунитета, переболевших однократно COVID-19, затем дважды вакцинированных «Спутник V», удалось исследовать всеми тремя способами, хотя в них принимали участие разные люди из этой группы. С большим допущением можно считать, что мононуклеары крови обследуемых из группы 3 при стимуляции полноразмерным S-белком в тест-наборе Corona-T-test показали образование меньшего количества пятен (клеток-продуцентов IFN- γ) $58,97 \pm 4,47$ против $80,04 \pm 5,87$ в тест-системе Human IFN- γ ELISpot. Если принять, что такая тенденция имеет право на существование, то число пятен (клеток-продуцентов IFN- γ) в группе 4 прорывного иммунитета будет значимо ($p = 0,012$) ниже, чем в группе 1 постинфекционного иммунитета. Уровень продукции IFN- γ в группе 3 гибридного иммунитета в этих двух тест-системах не показал значимых различий. В этом случае уровень продукции IFN- γ мононуклеарами обследуемых группы 4 прорывного иммунитета, стимулированных полноразмерным S-белком, будет значимо ниже ($p = 0,047$) в сравнении с группой 1 постинфекционного иммунитета.

Таблица 3.14 – Сопоставление трех способов определения клеточного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2

	Способ 1 (S-белок)	Способ 2 (S-белок)				Способ 3 (пептиды)			
	CD8 ^{high} CD107a+, %	ELISpot, абсолютное количество	IFN- γ , пг/мл	ELISpot, относитель ное количество	IFN- γ , относительно е количество	ELISpot, абсолютное количество	IFN- γ , пг/мл	ELISpot, относительное количество	IFN- γ , относительное количество
Группа 3	10,04± 1,37	58,97± 4,47	361,68 ±18,84	7,48± 1,13	46,63± 9,37	69,38± 5,53	760,76 ±50,70	8,61± 2,66	48,35± 8,15
Группа 4	12,27± 2,51	30,59 ±2,29*	267,52 ±17,38*	5,79± 0,81	34,06± 8,69	86,72 ±7,20*	991,25 ±65,18*	10,89± 2,77	68,10± 9,41*

Примечание:

* p < 0,05

При расчетах в относительном выражении количество пятен клеток-продуцентов IFN- γ в группе 3 гибридного иммунитета, определенное на наборе Corona-T-test, оказалось $7,48 \pm 1,13$ против $15,46 \pm 1,83$ при использовании набора Human IFN- γ ELISpot, то есть в 2 раза ниже. Допуская корректность этих сравнений, количество пятен в группе 4 прорывного иммунитета также было бы значимо ниже ($p = 0,048$), чем в группе 1 постинфекционного иммунитета, а уровни продукции IFN- γ значимо не отличались бы. Важно отметить, что сопоставленные результаты групп 1 и 4 являются расчетными по причине использования разных тест-наборов.

Три способа оценки клеточного иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2, примененных в исследовании, значимо между собой не коррелировали. Установлена умеренная положительная корреляция ($r = 0,341$) между относительным количеством пятен (клеток-продуцентов IFN- γ) при стимуляции мононуклеаров исследуемых смесью пептидов и полноразмерным S-белком вируса SARS-CoV-2. Установлена сильная положительная корреляция ($r = 0,79$) количества пятен (клеток-продуцентов IFN- γ) и уровня синтеза IFN- γ мононуклеарами крови исследуемых, индуцированных полноразмерным S-белком, и очень сильная положительная корреляция ($r = 0,95$) этих двух показателей при индукции синтеза IFN- γ мононуклеарами смесью пептидов вируса SARS-CoV-2.

3.9 Динамика иммунных ответов на N- и S-белок вируса SARS-CoV-2

В продольном исследовании, представленном в данном разделе, приняло участие 32 человека, возрастной диапазон 23-72 года, первоначально перенесших COVID-19 легкой или средней степени тяжести в 2020 году. Заболевание было подтверждено положительным результатом ПЦР. Исследование сыворотки крови на наличие специфических антител и T-клеточного иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2 проводилось у этих лиц на протяжении 4 лет.

В разделе 3.6 было проведено математическое моделирование изменения концентраций IgG, специфичных к антигенам S- и N-белка вируса SARS-CoV-2 в зависимости от времени, прошедшего от первичного COVID-19. Если наши

аппроксимации изменения уровня антител верны, то, согласно функции Эрланга, через 2 года после заболевания концентрация анти-S антител должна была бы снизиться до 300 ВАУ/мл, через 3 года она была бы около 40 ВАУ/мл, а через 4 года - ниже 10 ВАУ/мл. Следует отметить, что 10 ВАУ/мл считается cut-off между отрицательным и положительным уровнем этих антител. В условиях продолжающейся пандемии, постоянных контактов людей с мутантными штаммами вируса SARS-CoV-2, массовой вакцинации населения, а, следовательно, все новыми бустерами для В-клеток памяти, мы выявили совершенно иную динамику развития специфического гуморального ответа. Результаты оценки уровней анти-N IgG и анти-S IgG представлены на рисунке 3.19. Из рисунка видно, что динамика анти-N IgG и анти-S IgG ответов у лиц, принявших участие в 4-летнем исследовании, различается.

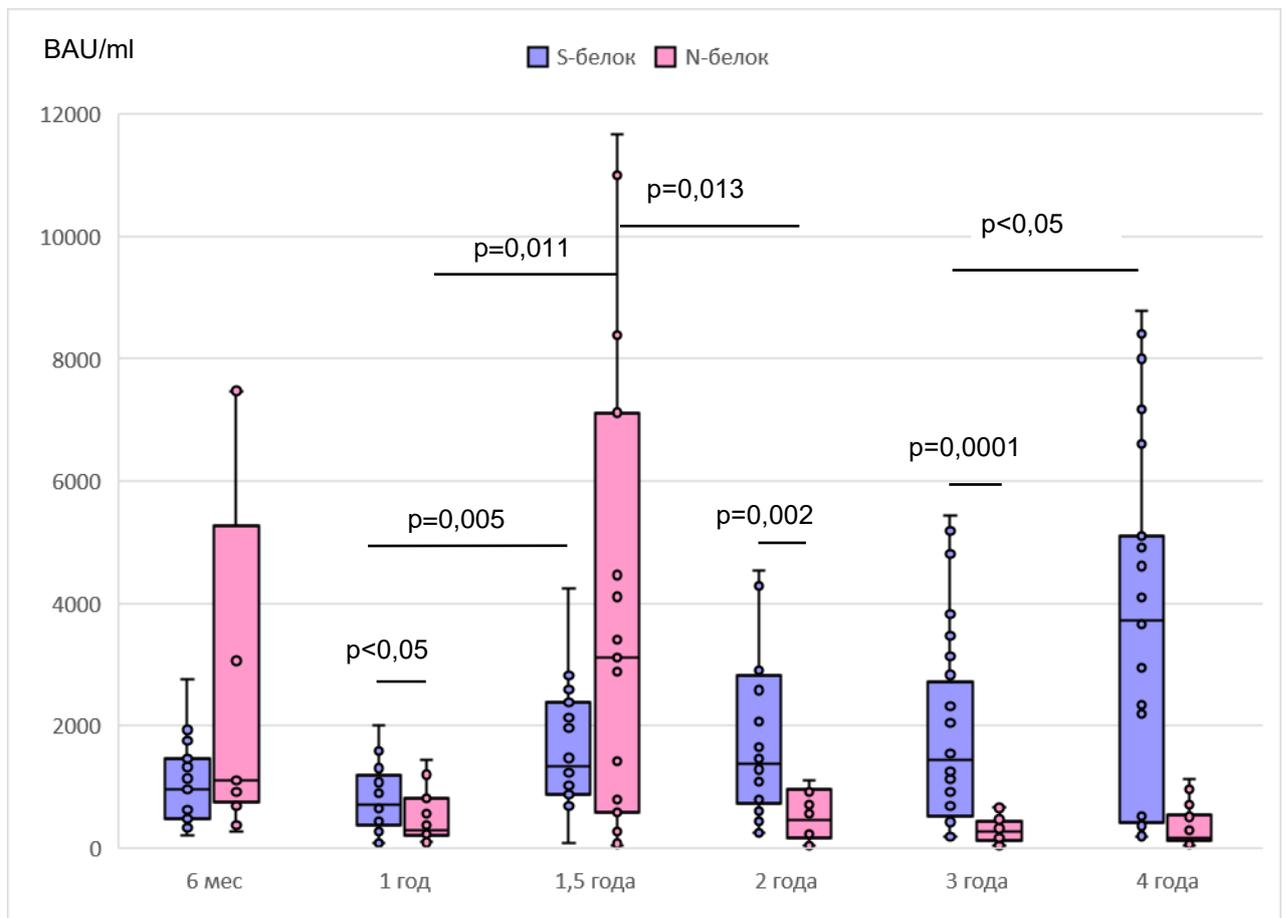


Рисунок 3.19 – Изменение уровней IgG-антител в зависимости от времени после заболевания

Если уровень анти-S IgG в период от 6 до 12 месяцев от момента перенесенного заболевания COVID-19, вызванного уханьским штаммом вируса SARS-CoV-2, сохранялся в пределах 700-900 ВАУ/мл, то уровень специфических анти-N IgG постепенно снижался с 1112 (748-5268) до 291 (199-819) ВАУ/мл за тот же период наблюдения, и на сроке 1 год различия в концентрациях анти-N IgG и анти-S IgG стали значимыми ($p < 0,05$). В феврале-марте 2022 года участники исследования перенесли повторно COVID-19, вызванный мутантным штаммом Омикрон, и в точке исследования, соответствовавшей 1,5 годам от момента первичного COVID-19, этиологическим фактором которого был уханьский штамм вируса SARS-CoV-2, было выявлено повышение концентрации как анти-S IgG до 1524 (725-2213) ВАУ/мл, так и анти-N IgG до 3117 (575-7119) ВАУ/мл. Уровни анти-S и анти-N IgG на сроках 1 и 1,5 года наблюдения значимо отличались. За последующие 6 месяцев наблюдения уровень анти-N IgG показал довольно быстрое снижение до 454 (162-950) ВАУ/мл и еще через год составил 267 (126-441) ВАУ/мл. Через 4 года после первичного заболевания уровень анти-N IgG составил 163 (102-406) ВАУ/мл. Напротив, концентрация анти-S IgG держалась на высоком уровне, составив 1572 (784-2819) ВАУ/мл на сроке 2 года и 1569 (751-2719) ВАУ/мл на сроке 3 года от момента перенесенного первичного COVID-19. Однако через 4 года после первичного заболевания отмечен значимый прирост уровня анти-S IgG до 3721 (416-5095). Различия концентраций анти-N и анти-S IgG на сроках 2 и более года оказались значимыми. Установлена умеренная отрицательная корреляция динамики концентраций анти-S и анти-N IgG ($r = -0,37$).

На рисунке 3.20 представлены результаты изменения индекса avidности анти-S IgG-антител в течение 4 лет наблюдения. В предшествующих исследованиях был рассчитан cut-off (48,5%) для разделения высокого и низкого уровня индекса avidности специфических к S-антигену IgG (раздел 2.7). Из рисунка видно, что на протяжении первых 6 месяцев исследования анти-S IgG у переболевших COVID-19 оставались низкоavidными, 34,65 (26,12-40,11)%. За последующие 6 месяцев наблюдения индекс avidности этих антител вырос до 53,84 (45,06-69,66)%, что говорит об их высокой avidности.

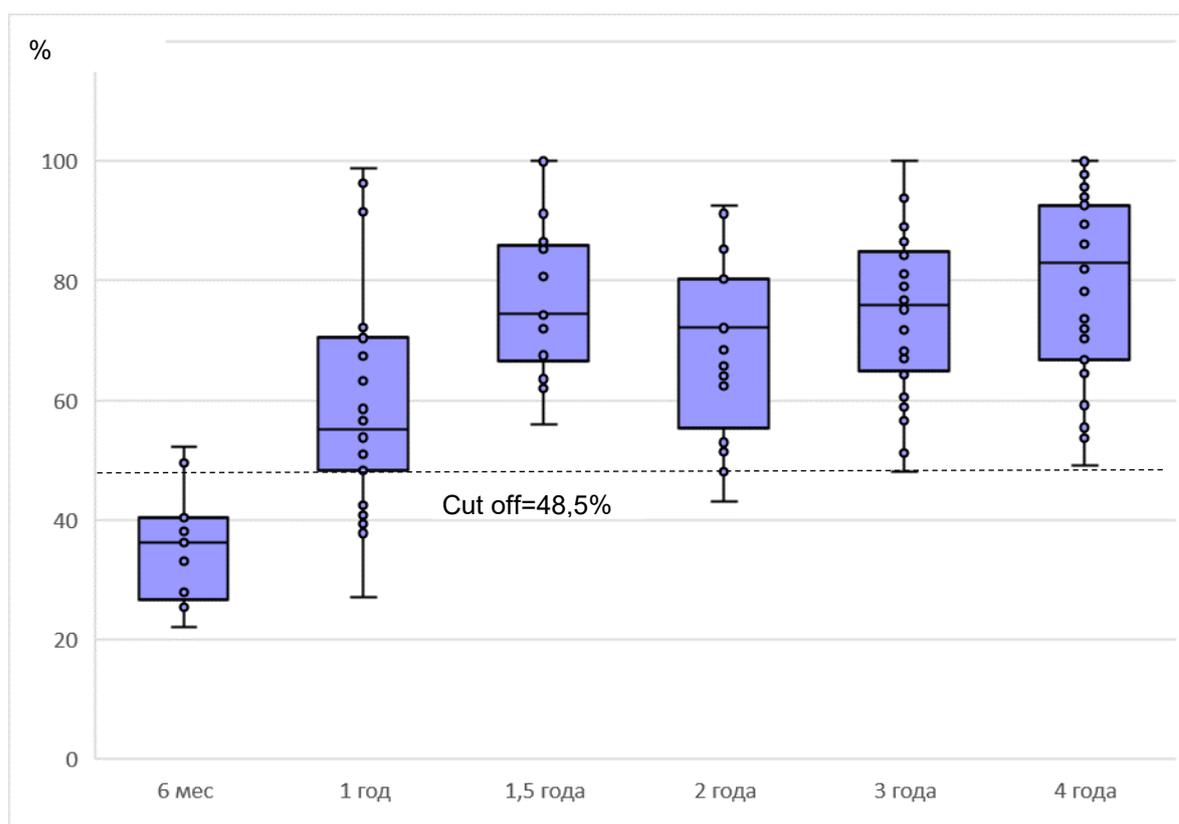


Рисунок 3.20 – Динамика индекса avidности анти-S IgG-антител у переболевших COVID-19

На сроке от 1 до 1,5 лет наблюдения индекс avidности анти-S IgG плавно нарастал, достигнув 74,41 (66,51-85,88) % после повторного заболевания COVID-19, вызванного штаммом Омикрон. В течение последующих 1,5 лет наблюдения индекс avidности анти-S IgG участников исследования продолжал сохраняться на уровне 72,2-76,1%. Через 4 года после первичного заболевания индекс avidности достиг 83,11 (66,81-92,68)%. Установлена сильная положительная корреляция между динамикой концентраций анти-S IgG-антител и их индексом avidности ($r = 0,89$).

Известно, что в начале иммунного ответа на антиген формируются короткоживущие плазмоциты, синтезирующие IgM и низкоavidные антитела IgG3 субкласса, а в процессе созревания иммунного ответа формируются долгоживущие плазмоциты, синтезирующие высокоavidные антитела преимущественно IgG1 субкласса и IgA. На рисунке 3.21 и в таблице 3.15 (абсолютные и относительные значения уровней IgG-антител, специфичных к N-

и S-белку вируса SARS-CoV-2, соответственно) представлены результаты изменения спектра субклассов анти-S и анти-N IgG-антител в зависимости от времени после перенесенного COVID-19.

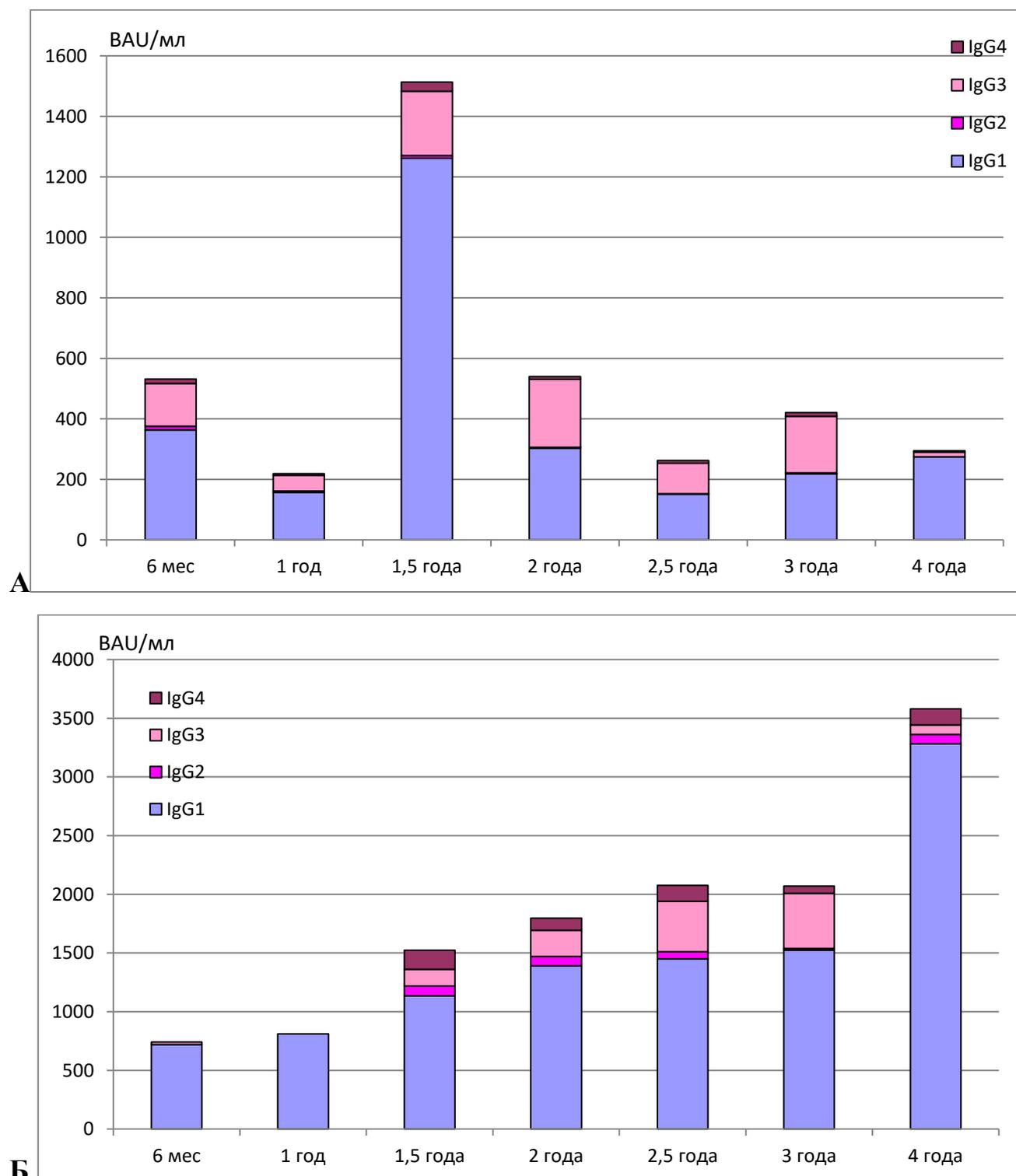


Рисунок 3.21 – Изменение спектра субклассов IgG-антител к антигенам вируса SARS-CoV-2 в зависимости от времени после заболевания

Примечание: А. N-белок вируса SARS-CoV-2; Б. S-белок вируса SARS-CoV-2

Из полученных в 4-х-летнем исследовании данных видно, что на антигены N-белка SARS-CoV-2 формировались все 4 субкласса антител: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, при том, что IgG2 и IgG4 оказались минорными. Анти-S IgG были представлены субклассами IgG1 и IgG3, с явным преобладанием субкласса IgG1. После перенесенного повторно COVID-19, вызванного штаммом Омикрон, на сроках 1,5 года от первичного заболевания, среди анти-N антител субкласс IgG1 стал преобладающим, составив $83,37 \pm 3,94\%$ от общего уровня IgG-антител к N-белку. Это говорит о формировании вторичного иммунного ответа на антигены N-белка. Через 2 года наблюдения оказалось, что среди антител на N-белок SARS-CoV-2 снова начал прирастать процент анти-N IgG3, составив $42,43 \pm 1,17\%$, а к 2,5 годам – $55,23 \pm 2,84\%$, соответственно. При этом анти-N IgG2 и анти-N IgG4 оставались в минорных количествах, менее 3%. Через 4 года превалировал IgG1 субкласс, а IgG2, IgG3 и IgG4 в сумме составили 13,65%.

Таблица 3.15 – 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 изменения спектра субклассов анти-S IgG была иной. Через 6 мес. после перенесенного первичного COVID-19, вызванного уханьским штаммом вируса SARS-CoV-2 анти-S IgG были представлены субклассами IgG1 и IgG3, с

явным преобладанием субкласса IgG1. Через 1 год после заболевания 100% антител к S-белку было представлено субклассом IgG1, что характерно для их синтеза долгоживущими плазмочитами. После прорывной инфекции, вызванной штаммом Омикрон, в спектре ответов антител на S-белок вируса вновь стали определяться анти-S IgG3 ($9,36 \pm 1,26\%$ от общего ответа анти-S IgG). Каждый последующий бустер, вызванный все новыми мутантными штаммами коронавируса, приводил к увеличению доли IgG3 субкласса среди анти-S антител, вплоть до $22,73 \pm 1,87\%$ на сроке 3 года наблюдения. Это говорит о формировании первичных иммунных ответов на новые штаммы вируса. Кроме того, повторный COVID-19, вызванный штаммом Омикрон, привел к появлению в спектре субклассов антител на S-белок SARS-CoV-2 субкласса IgG2, до $5,52 \pm 0,87\%$, и субкласса IgG4 до $10,68 \pm 0,93\%$ от общего количества анти-S IgG, при этом уровень анти-S IgG4 в абсолютных значениях составлял 142,61 (68,73-338,4) ВАУ/мл. У половины участников исследования концентрация анти-S IgG4 оказалась выше 100 ВАУ/мл, с медианой по этой подгруппе 285,7 (126,8-615,4) ВАУ/мл или $15 \pm 1,57\%$ от общего ответа анти-S IgG-антител. В результате последующих бустирований, вызванных новыми мутантными штаммами коронавируса, отмечалось снижение доли ответов анти-S IgG2 до $0,65 \pm 0,11\%$ и анти-S IgG4 до $2,92 \pm 0,27\%$ в точке наблюдения 3 года после первичного COVID-19. Анти-S IgG1 субкласса оставались преобладающими в общем ответе антител против S-белка SARS-CoV-2, поддерживаясь на уровне 70-75% в течение 1,5 лет после прорывной инфекции, вызванной штаммом Омикрон, а через 4 года составили почти 92% от общего уровня IgG к S-белку.

Динамика ответов IgA против S-белка SARS-CoV-2 имеет сходство с ответами антител против N-белка вируса. Результаты наблюдений представлены на рисунке 3.22. Из рисунка видно, что на сроке 6 месяцев после перенесенного первичного COVID-19 определялись высокие концентрации анти-S IgA до 8,64 (4,31-15,53) КП. Далее у переболевших установлено достаточно быстрое и значимое снижение их до уровня 0,92 (0-3,58) КП на сроках 1 год после COVID-19. После прорывной инфекции, вызванной штаммом Омикрон, выявлено

значимое повышение уровня анти-S IgA до 4,73 (2,40-10,67) КП в точке наблюдения 1,5 года.

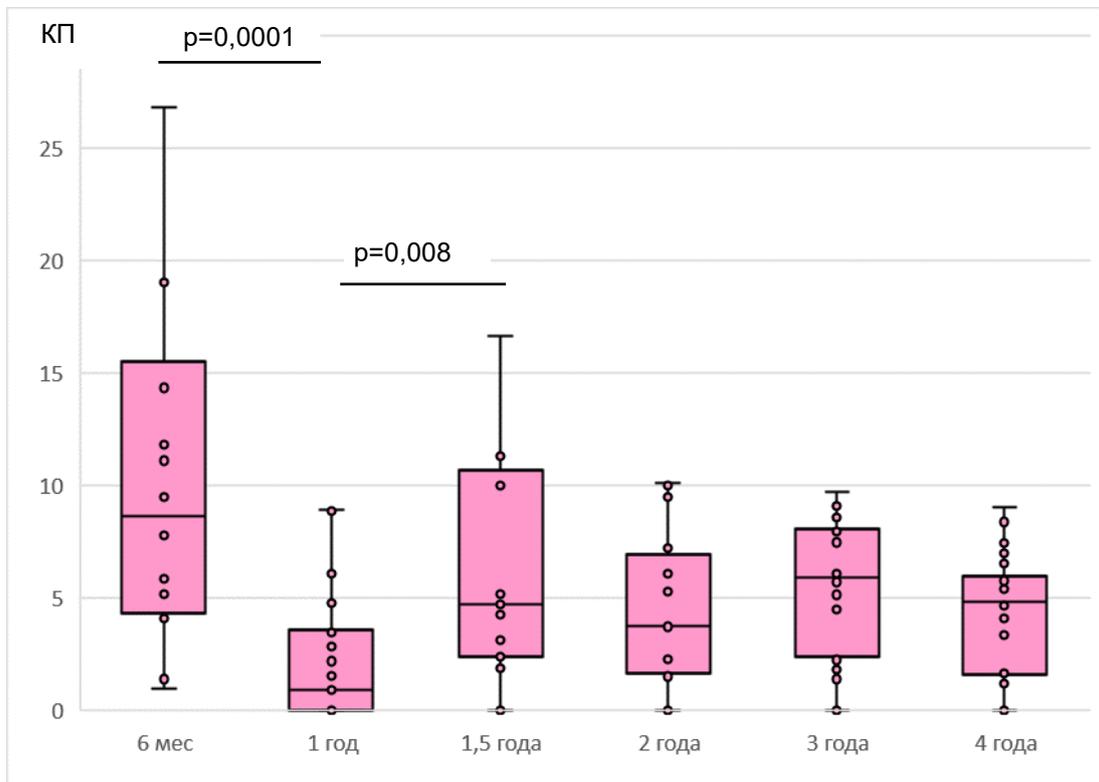


Рисунок 3.22 – Изменение уровня анти-S IgA-антител в зависимости от времени после заболевания

В течение следующих 6 месяцев уровень анти-S IgA снизился в точке наблюдения 2 года после первичного COVID-19, составив 3,76 (1,67-6,93) КП. Установлено повышение уровня анти-S IgA до 5,91 (2,37-8,06) КП в точке наблюдения 3 года, а в точке 4 года он составил 4,82 (1,62-5,98) КП. Уровни IgA на сроках 2, 3 и 4 года значительно отличались от уровня на сроке 1 год исследования ($p < 0,05$).

Результаты исследования ответов $CD8^+$ Т-лимфоцитов, специфичных к антигенам S- и N-белка коронавируса, представлены на рисунке 3.23. Динамика клеточного иммунного ответа на антигены S- и N-белка SARS-CoV-2 имела отличия. Спустя 6 месяцев после первичного COVID-19, вызванного уханьским штаммом, уровень цитотоксических $CD8^+$ лимфоцитов, распознавших антигены N-белка и ответивших экспрессией молекулы CD107a на своей поверхности, составил 15,49(7,39-18,76)%. На протяжении последующих 2,5 лет уровень Т-клеточных ответов на антигены N-белка постепенно снижался, составил 5,55(3,60-

12,75)% на сроке наблюдения 3 года, что значительно отличалось от его уровня на сроке 1,5 года.

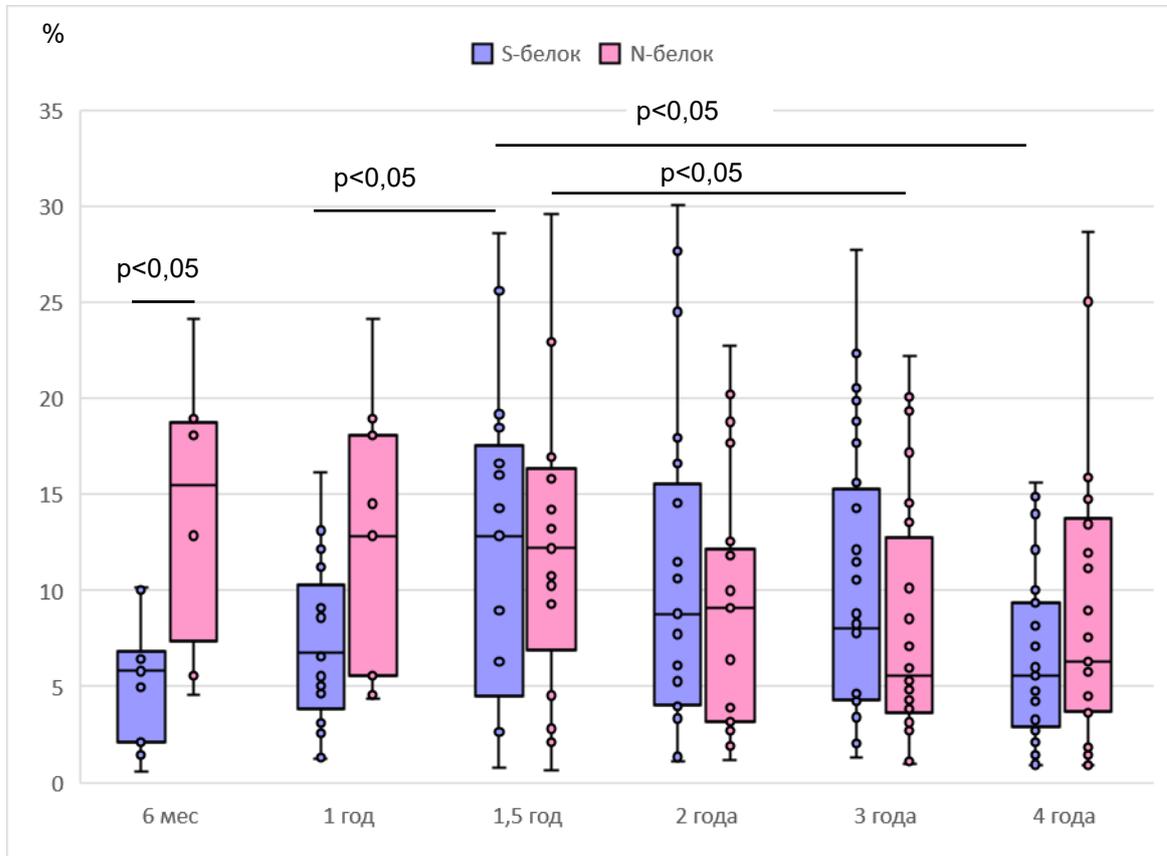


Рисунок 3.23 – Изменение уровней клеточного иммунного ответа на N- и S-белок вируса SARS-CoV-2 в зависимости от времени после заболевания

В точке исследования 4 года Т-клеточный ответ на N-белок коронавируса был 6,32(3,71-13,79)%. Установлена умеренная положительная корреляция ($r = 0,49$) ответов IgG и цитотоксических CD8⁺лимфоцитов на антигены N-белка коронавируса.

Ответ цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов на антигены S-белка на сроке 6 месяцев после первичного COVID-19 составил 5,81(2,11-6,86)%, будучи значительно ниже уровня клеточного иммунного ответа на антигены N-белка. В точке наблюдения 1,5 года после повторного COVID-19, вызванного штаммом Омикрон, Т-клеточный иммунный ответ на S-белок обследуемых существенно

вырос до 13,59(4,52-17,54)%, значимо отличаясь от ответа в 1 год. В точке наблюдения 2 года уровень ответа CD8⁺лимфоцитов на антигены S-белка снизился до 8,79(4,02-15,59)%. В последующие 2 года наблюдения выявлено постепенное снижение уровня ответа цитотоксических лимфоцитов на антигены S-белка SARS-CoV-2 до 5,56(2,93-9,34) на сроке 4 года, что значимо отличалось от уровня клеточного ответа на сроке 1,5 года ($p < 0,05$) и практически совпадало с уровнем клеточного иммунного ответа на сроке 6 мес. после первичного заболевания. Установлена умеренная положительная корреляция ($r = 0,41$) ответов IgG и цитотоксических CD8⁺T-лимфоцитов на антигены S-белка коронавируса. Динамика ответов CD8⁺T-лимфоцитов на антигены S- и N-белка SARS-CoV-2 показала слабую отрицательную корреляцию ($r = -0,27$).

РЕЗЮМЕ

Одной из важных характеристик адаптивного иммунитета является формирование иммунологической памяти и ее поддержание с течением времени. Обследованные нами люди формировали иммунный ответ к антигенам вируса SARS-CoV-2 в условиях его продолжающейся циркуляции и появления новых мутантных штаммов. Каждый новый контакт с мутировавшим вирусом продолжает приводить к бустеру иммунного ответа, как гуморального, так и клеточного. Наблюдение за поддержанием иммунологической памяти на антигены вируса SARS-CoV-2 у перенесших COVID-19 на фоне циркуляции все новых мутантных его штаммов показало ее сохранение на протяжении всего периода исследования. Изменение уровней антител во времени зависит от характера антигена (S- или N-белок), класса (IgG или IgA), количества бустеров у отдельных лиц. Т-клеточные ответы оказались более стабильными, чем гуморальный компонент иммунитета. Изменение во времени уровней анти-S-IgG в умеренной степени коррелирует с ответами Т-лимфоцитов на S-белок, это положение в равной степени справедливо и для гуморального и клеточного

ответов на N-белок вируса. Давление уже сформированного популяционного иммунитета вследствие повторных инфекций и массовой вакцинации способствует отбору все новых мутантных штаммов вируса SARS-CoV-2, способных избежать контроля иммунитета, что ускоряет появление новых VOC. Контакты иммунной системы людей с этими вариантами вируса активируют уже имеющуюся гуморальную и клеточную память, одновременно формируя первичные ответы на измененные эпитопы. Трудно прогнозировать, как скоро снизится наша иммунная защита в случае элиминации вируса SARS-CoV-2 из человеческой популяции. Очевидна необходимость дальнейшего изучения поддержания иммунологической памяти, как клеточной, так и гуморальной, к антигенам SARS-CoV-2. Наличие адаптивного иммунитета к SARS-CoV-2 практически у всего населения Земли привело к тому, что тяжесть течения COVID-19 изменилась в сторону легких и бессимптомных вариантов течения заболевания. Однако существует вероятность того, что большое количество мутаций в S-белке вируса может привести к формированию более патогенных его вариантов. Сохраняется необходимость создания новых типов вакцин ввиду снижения эффективности тех, что были созданы в период пандемии в экстренном порядке и базировались на выработке иммунного ответа в основном против S-белка и защитных анти-S-IgG, в частности [237, 296].

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ

В 3 ГЛАВЕ

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. Topotygina, 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 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента первого заболевания COVID-19 в декабре 2019 г. по настоящее время можно выделить два периода, принципиально отличающиеся друг от друга. Первый период от появления вируса SARS-CoV-2 до подъема заболеваемости, вызванного вариантом Омикрон зимой 2022 г., второй – от подъема заболеваемости, вызванного вариантом Омикрон, по настоящий момент. Начало первого периода характеризовалось отсутствием адаптивного иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2 у населения планеты. Практически каждый человек, контактировавший с вирусом, заболел, правда, с разной степенью тяжести. Все заболевшие отвечали на инфекцию первичным типом иммунного ответа. Вирус уханьского штамма имел репродуктивное число (среднее количество лиц, которые могут быть инфицированы одним больным) – 2.87, мутации были нечастые, и за 2 года первого периода появились всего 6 VOC [51]. Каждая такая мутация вызывала очередной подъем заболеваемости COVID-19, в который вовлекались преимущественно не болевшие и не вакцинированные люди, то есть иммунитет, приобретенный при контакте с предыдущими вариантами SARS-CoV-2, защищал от повторного заражения. Вариант Омикрон кардинально изменил ситуацию. Репродуктивное число оценивали уже как 5-7, заболели как неиммунные, так и привитые, и ранее переболевшие, то есть штамм Омикрон имел настолько много мутаций, отличавших его от предыдущих VOC, что прорывал ранее сформированный иммунитет [171]. За счет высокой контагиозности этого VOC после весны 2022 г. практически все население уже, так или иначе, контактировало с SARS-CoV-2 и имело к нему иммунитет. С этих пор начался второй этап. Вирус уже не мог найти неиммунный организм и вынужден был искать возможности обойти сформированный иммунитет. Репродуктивное число последних VOC оценивают как 15-17 [263]. Это очень высокий показатель. Если за первые 2 года возникло всего 6 VOC, то за вторые 2

года – полтора десятка VOC, не считая несущественных мутаций, а подъемов заболеваемости было всего 3. Заболевание стало протекать преимущественно легко и бессимптомно, что свидетельствует о работе иммунологической памяти, которая отвечает на не мутировавшие эпитопы SARS-CoV-2. Процесс активных мутаций вируса и повторные бустеры циркулирующими VOC актуализируют и поддерживают клоны клеток памяти, отвечающие на антигены SARS-CoV-2. Наши исследования были проведены как в первом, так и во втором периоде циркуляции вируса SARS-CoV-2 и выявили важные особенности иммунных ответов в эти два периода.

Синтез IgM при первичном иммунном ответе предшествует образованию IgG, так как наивные В-лимфоциты экспрессируют этот вариант В-клеточного рецептора и синтез IgM не требует его перестройки. [334]. Антитела, специфичные к антигенам вируса SARS-CoV-2, у лиц с ПЦП-подтвержденным COVID-19 были обнаружены на сроках 7-14 дней от момента начала заболевания, концентрация их со временем продолжала нарастать [211, 330]. В нашем исследовании у 70,2% участников исследования, перенесших COVID-19 в легкой и среднетяжелой форме, выявлены анти-S-IgM антитела через 2 месяца от начала заболевания. Guo L. с соавторами получили похожие результаты, 75,6% обследованных имели IgM-антитела к S-белку SARS-CoV-2 [116]. В то же время было показано, что у бессимптомных пациентов IgM, специфичные к S-белку, появляются на 7 день после заражения и перестают определяться уже через 2 месяца [159]. Уровень анти-S-IgM переболевших COVID-19 в нашем исследовании постепенно снижался до неопределяемого к году наблюдения за переболевшими COVID-19. В аналогичных исследованиях также показано снижение уровня IgM антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 в течение 12 месяцев после заболевания [122, 232]. Четыре участника нашего исследования оставались серопозитивными по IgM на сроках от 2 до 12 месяцев после COVID-19, сохраняя высокие уровни этих антител. У них длительное время не происходило переключения синтеза специфических антител на изотипы IgA, IgG3

и IgG1, возможно, это связано с индивидуальными особенностями реакции иммунной системы этих людей.

В самом начале пандемии использовались тест-системы, созданные в экстренном порядке, что привело к сообщениям исследователей о необычной последовательности синтеза специфических антител, в первую очередь IgG, и только затем IgM, говорилось об исчезновении специфических антител через 1-2 месяца после начала COVID-19 [233]. В таких системах применялись разные антигены, результаты измерялись в разных единицах, что затрудняло интерпретацию и сопоставление результатов, полученных разными авторами. Для решения этой проблемы был введен единый стандарт BAU/мл (Binding Antibody Units; First WHO International Standard for anti-SARS-CoV immunoglobulin (human), NIBSC code: 20/136). Наши исследования были начаты еще до появления единого стандарта, поэтому анти-S-IgA и анти-S-IgG ранних реконвалесцентов COVID-19 были измерены полуколичественным методом, в коэффициентах позитивности, с последующим ретестированием тех же сывороток и выражением в BAU/мл.

По уровню анти-S-IgG ответов обследуемые были поделены на 2 группы, с высоким и низким уровнем ответа, 57% и 43% обследованных, соответственно. Тип ответа (высокий или низкий уровень антител) не зависел от времени, прошедшего от начала заболевания. Исследования Robbiani et al. также выявили у 67% перенесших COVID-19 высокий уровень вируснейтрализующих анти-S-IgG, а у 33% - низкий уровень [240]. По всей видимости, сила гуморального ответа на вирус определяется особенностями иммунной системы индивидуума. Вероятно, есть связь с особенностями системы HLA. У высоко продуцирующих антитела индивидуумов молекулы HLA на антигенпрезентирующих клетках могут иметь большее сродство к пептидам SARS-CoV-2, тем самым сильнее активируя Т-клетки и затем В-клетки. По крайней мере, установлены ассоциированные с высоким гуморальным ответом аллели HLA A*26:01, C*02:02 и DPB1*04:01. Напротив, аллели HLA DRB3*01:01, DPB1*03:01 и DPB1*10:01 обнаружены у пациентов с низким уровнем антительного ответа [244]. Вероятно, немалую роль в силе и спектре гуморального ответа играет уровень продукции цитокинов и

степень экспрессии рецепторов к ним. Показана связь инфекции SARS-CoV-2, запускающей синтез провоспалительных цитокинов в кишечнике, с индукцией сильного системного антительного ответа [83]. Значительная летальность при COVID-19 сразу поставила перед исследователями вопрос о том, являются ли обнаруживаемые антитела протективными, какова длительность поддержания ответа специфических к вирусу антител, какой уровень антител следует считать защитным. За защитный уровень IgG-антител до появления штамма Омикрон была принята концентрация 150 BAU/мл.

Изучение ответа анти-S-IgA представляло и продолжает представлять особый интерес, так как его димеры на слизистых оболочках первыми встречают вирус при повторном заражении. Показано, что IgA-антитела появляются на 5-7 день от начала заболевания [185, 271], интенсивность их снижения сильно различается у разных пациентов, что вполне согласуется с нашими данными. В работе Feng C. с соавторами показано, что уровень IgA и IgG не зависел от тяжести заболевания COVID-19 [102], что коррелирует с нашими данными.

Созревание гуморального ответа подразумевает как повышение avidности антител за счет мутаций Fab-фрагментов, так и переключение с раннего IgG3 субкласса на более зрелый IgG1 субкласс, характерный для профиля синтеза антител клетками памяти. Так, было показано, что у взрослых ранних реконвалесцентов от кори формируются специфические IgG-антитела всех четырех субклассов, при этом преобладают IgG3 и IgG2, но постепенно на первое место выдвигаются IgG1-антитела [20]. В наших исследованиях у ранних реконвалесцентов COVID-19 формировались специфические IgG, представленные субклассами IgG1 и IgG3, с последующим увеличением доли анти-S-IgG1 в течение 3 месяцев от момента начала заболевания, аналогичные данные получены другими исследовательскими группами [53, 183]. Субклассы IgG1 и IgG3 участвуют в активации комплемента, антитело-зависимой цитотоксичности натуральных киллеров через распознавание зараженных вирусом клеток, опсонизированных этими антителами [90], в антитело-зависимом фагоцитозе макрофагов, связывая таким образом адаптивную и врожденную части иммунной

системы [283]. Эти механизмы определяют исход заболевания, являясь частью патогенеза COVID-19 [38]. Индекс авидности антител у ранних реконвалесцентов COVID-19 в нашей работе был низким, что совпадает с данными других исследователей [223].

Клеточный иммунный ответ, оцениваемый по проценту цитотоксических CD8^{high} Т-лимфоцитов, способных распознать S-белок вируса SARS-CoV-2 и ответить экспрессией молекулы CD107a на поверхности, от общего числа CD8⁺Т-лимфоцитов, так же, как и гуморальный, имеет индивидуальные различия у обследованных лиц. CD8⁺ Т-лимфоциты – ключевые эффекторы клеточного иммунного ответа против вирусов, они уничтожают пораженные вирусом клетки. По уровню клеточного ответа на S-белок обследованные ранние реконвалесценты COVID-19 были разделены на две равные группы. Подобные результаты получили Stephens et al., заключившие, что вирусспецифические Т-клетки представляют собой еще один уровень популяционного иммунитета против COVID-19, а их наличие ограничивает репликацию вируса, влияя на тяжесть и исход заболевания [271]. В результате проведенного нами исследования иммунного ответа ранних реконвалесцентов удалось показать, что формируется четыре варианта сочетания высокого и низкого уровня гуморального и клеточного ответов, примерно в равных пропорциях. Это дает основания считать, что формирование гуморального и клеточного иммунных ответов идет независимо друг от друга.

Участники нашего исследования, привитые вакциной «Спутник V», сформировали в 100% случаев гуморальный и клеточный ответ на антигены S-белка SARS-CoV-2, динамика формирования этих иммунных ответов была сопоставима со специфическим постинфекционным ответом на вирус SARS-CoV-2. У 16,7% привитых обнаружены анти-S-IgM антитела против 83,3% серонегативных по IgM. Похожие результаты были получены в исследовании Чистяковой Г.Н. и соавторов: у 84% обследованных IgM к SARS-CoV-2 не определялись, и в 16% случаев регистрировался положительный или пограничный результат [27]. Привитые в нашем исследовании так же, как и

переболевшие COVID-19, были разделены на две группы: с высоким и низким гуморальным ответом на S-белок SARS-CoV-2. Уровень гуморального ответа был сопоставим с таковым у переболевших COVID-19, однако привитые имели более низкий уровень анти-S IgA-антител, что, по всей видимости, связано с различиями в дозе и путях поступления антигена в организм человека. Аналогичные данные получены другими исследователями в отношении гуморального иммунитета у привитых вакциной «Спутник V» и переболевших COVID-19 [36]. Поствакцинальный иммунный ответ, как и постинфекционный, был представлен только субклассами анти-S IgG1 и анти-S IgG3.

Проценты CD8^{hi}CD107a⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов в ответ на S-белок у дважды вакцинированных вакциной «Спутник V» были сопоставимы с таковым у переболевших COVID-19, они также были поделены на высоко- и низкореагирующих на S-белок. По результатам сопоставления гуморального и клеточного иммунного ответов дважды привитых вакциной «Спутник V» так же, как и переболевших COVID-19, удалось разделить на 4 группы с высоким гуморальным и клеточным ответом, с низким гуморальным и клеточным ответом, с высоким гуморальным и низким клеточным, с низким гуморальным и высоким клеточным ответом. Это подтверждает гипотезу о независимости формирования гуморального и клеточного иммунитета друг от друга. Сопоставив характер гуморального и клеточного иммунного ответов у ранних реконвалесцентов COVID-19 и дважды привитых вакциной «Спутник V», и выявив их сходство, можно сделать вывод, что векторный тип вакцины максимально имитирует взаимодействие вируса и иммунной системы хозяина.

При исследовании динамики уровней анти-S-IgG у переболевших COVID-19 в течение следующих 15 месяцев (до появления штамма Омикрон) обнаружены интересные закономерности. Следует отметить, что гуморальный ответ формируется двумя путями: экстрафолликулярный путь, для которого характерно формирование короткоживущих плазмоцитов, синтезирующих ранние, низкоаффинные IgM, с возможным переключением на IgA и IgG3 [236], и путь синтеза антител в зародышевых центрах, где производятся антитела классов IgA,

IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, аффинность которых с течением времени нарастает благодаря соматическим гипермутациям и отбору по аффинности вирусспецифических В-клеток, с преобразованием их в высокоаффинные долгоживущие плазматические клетки [19, 291]. В продольном исследовании когорты переболевших COVID-19 было выявлено постепенное снижение концентрации антител с выходом на плато к сроку 9 месяцев от начала заболевания. В группе с высоким уровнем анти-S-IgG снижение уровня антител шло более быстрыми темпами, тем не менее, в обеих группах, и с высоким, и с низким уровнем гуморального ответа, уровень анти-S-IgG оставался выше защитного (150 ВАУ/мл до появления штамма Омикрон). При этом отмечалось постепенное нарастание индекса avidности анти-S-IgG антител с 29,7% до 50,88%. Данные других исследователей подтверждают сходную динамику гуморального ответа против S-белка вируса SARS-CoV-2 [2, 209]. Такая динамика, по-видимому, связана с постепенной элиминацией короткоживущих плазмоцитов и синтезируемых ими низкоавидных антител. Тем не менее, Г.Н. Чистякова с соавторами показала, что уровень анти-S-IgG поддерживался примерно на одном уровне, а у части обследуемых даже возрос на сроке 9 месяцев после перенесенного среднетяжелого COVID-19. Исследователи связывают свои результаты с тяжестью заболевания [27]. Однако, все обследуемые в работе Г.Н. Чистяковой являлись медицинскими сотрудниками, и, по всей видимости, ввиду частых контактов с пациентами, получали бессимптомные бустеры, поддерживавшие уровень антител. Важно, что при других вирусных инфекциях, например при кори, индекс avidности антител через год после заболевания достигает 90% [23], тогда как в нашем исследовании едва превысил 50%. Вероятно, SARS-CoV-2 обладает некими механизмами эвазии, замедляющими созревание аффинитета антител. В работе Luo et al. показано, что неполное созревание avidности IgG является характерным и для сезонных коронавирусных инфекций [183].

Специфические секреторные IgA на слизистых являются одним из ключевых моментов в защите против повторных инфекций, вызванных штаммами

SARS-CoV-2 [74]. Коррелятом защиты слизистых дыхательных путей может служить определение уровня анти-S IgA в сыворотке крови перенесших COVID-19. Wang Z et al. показали, что анти-S IgA быстро появляются в крови переболевших COVID-19 и остаются на высоких уровнях в течение не менее чем 40 дней от момента появления симптомов [299]. В нашем исследовании IgA, специфичные к S-белку вируса, определялись на высоких уровнях спустя месяц после перенесенного COVID-19, далее постепенно снижались. Обследуемые оставались серопозитивными в течение 15 месяцев наблюдения. Аналогичные данные были получены в течение, по крайней мере, 9 месяцев наблюдения за переболевшими. Они показали важную роль специфических IgA в раннем системном вируснейтрализующем ответе [267]. Быстрый подъем и довольно быстрое снижение уровня анти-S IgA может говорить о преимущественно экстрафолликулярном пути синтеза таких антител, с формированием короткоживущих плазматических клеток, когда иммунная система хозяина выбирает мощный быстрый ответ на неизвестную ранее инфекцию, предпочитая краткосрочную стратегию выжить, нежели сформировать долгосрочную иммунологическую память против вируса.

Продольное исследование иммунитета у тех же 38 человек, перенесших COVID-19, в течение 15 месяцев наблюдения показало сохранение и поддержание клеточного иммунного ответа CD8^{hi}CD107a⁺T-лимфоцитов на S-белок вируса, несмотря на снижение уровней гуморального ответа в те же сроки. Это говорит о том, что иммунологическая память клеточного и гуморального звена не только формируется, но и сохраняется независимым образом. В исследовании Guo L. et al величина ответов вирусспецифических T-клеток в виде синтеза IFN- γ на представление им антигенов вируса SARS-CoV-2 значимо не отличалась и через 1-2 года после заражения, а концентрация специфических антител снижалась в течение этих 2 лет наблюдения, что хорошо коррелирует с нашими результатами. Более того, исследовав когорту людей, перенесших единожды COVID-19, не вакцинированных против вируса, авторы показали, что вирусспецифическая активация T-клеток не зависит от мутаций в вариантах

SARS-CoV-2 даже через 2 года после инфекции, вызванной первоначальным уханьским штаммом [117]. Т-клетки активируются короткими антигенными пептидами, поэтому клеточный иммунитет меньше зависит от мутаций вируса, чем гуморальный.

Продольное обследование 30 привитых вакциной «Спутник V» в течение того же периода 15 месяцев после завершения вакцинации, показало те же тенденции сохранения гуморального и клеточного иммунных ответов, что и у переболевших COVID-19. Стоит отметить, что как уровень поствакцинальных анти-S IgG оставался выше защитного, 150 ВАУ/мл, так и поствакцинальный клеточный ответ сохранялся выше отметки cut-off в 1% у 100% обследуемых. Аналогичные результаты были получены и другими авторами [36]. В исследовании Андреева И.В. с соавт. установлено поддержание высокого уровня анти-S-IgG у привитых вакциной «Спутник V» по крайней мере в течение 6 месяцев после завершения вакцинации [2]. По данным Астраханцевой И.В. и соавт., привитые вакциной «Спутник V» показали незначительное снижение уровня специфических антител к S-белку SARS-CoV-2 в течение 6 месяцев после вакцинации, тогда как привитые мРНК вакцинами формировали высокие уровни антител, с резким их снижением в течение полугода наблюдения, до 38% каждый последующий месяц после завершения вакцинации [3, 132]. Аналогичные данные получены в когортном исследовании в отношении привитых векторной вакциной Vaxzevria, ChAdOx1-S и мРНК вакциной Comirnaty, BNT162b2, что свидетельствует о формировании гуморального ответа на мРНК вакцины короткоживущими плазматическими клетками [39].

Клеточный иммунитет был сопоставим в обеих группах, дважды привитых вакциной «Спутник V» и переболевших COVID-19. Тем не менее, в работе Babrukevich, D. et al. клеточный иммунитет у дважды вакцинированных вакциной «Спутник V» был выявлен только у 26,6% участников исследования против 100% в обсуждаемой работе. Очевидно, результаты исследований зависят от методов оценки поствакцинального клеточного иммунитета. Важно отметить, что процент сформировавших клеточный иммунный ответ на векторную вакцину «Спутник

V» и инактивированную ВВІВР-CoгV в этом же исследовании был сопоставим: 26,6% и 31,6% соответственно, обе вакцины имитируют естественное взаимодействие вируса и иммунной системы хозяина [40]. Ревакцинация спустя год после первичной вакцинации послужила бустером гуморального и клеточного ответа с ростом концентрации специфических антител и их авидности до 67,6%, подобные данные были получены и другими исследователями [2]. Процент цитотоксических $CD8^{hi}CD107a^{+}$ Т-лимфоцитов значимо возрос после ревакцинации. Аналогичные результаты были получены у ревакцинированных вакциной «Спутник V», продемонстрировавших сильный клеточный иммунный ответ, поддерживающийся в течение, как минимум, полугода на том же уровне [3].

Сопоставление результатов исследования поствакцинального, постинфекционного и гибридного иммунитета (перенесшие COVID-19 и затем дважды привитые вакциной «Спутник V») к S-белку вируса SARS-CoV-2 показало значимо более высокий уровень анти-S-IgG, индекса их авидности и клеточного иммунного ответа, выраженного процентом $CD8^{hi}CD107a^{+}$ у группы гибридного иммунитета. Подобные результаты получены другими исследователями в отношении как векторных, так и мРНК-вакцин, то есть лица с гибридным иммунитетом лучше защищены от последующих инфекций, вызванных мутантными штаммами [142]. Для мРНК-вакцин, введенных после первичной инфекции COVID-19, установлено, что титры антител сохранялись дольше, в течение примерно 7 месяцев после появления симптомов, то есть бустер гуморального ответа сформировался в том числе за счет долгоживущих плазматических клеток [44]. Качество и сила гибридного иммунитета могут зависеть от того, насколько близко первый геновариант вируса соответствует последующему, от типа вакцины и количества введенных доз [84, 112].

Большое количество мутаций в S-белке штамма Омикрон в 2022 году привело к прорыву сформированного ранее иммунитета, как поствакцинального, так и постинфекционного. Повторные массовые заболевания показали, что Омикрон избегает действия защитных анти-S-IgG [31, 64]. У обследованных

группы прорывного иммунитета выявлен значимый прирост уровня анти-S IgG, индекса авидности до 81,58% и клеточного иммунного ответа. Рост индекса авидности анти-S IgG у дважды переболевших COVID-19 подтверждает продолжающиеся гипермутации Fab-фрагментов антител в зародышевых центрах и формирование новых долгоживущих плазмоцитов. Рост процента CD8^{hi}CD107a⁺, ответивших на распознавание S-белка вируса, можно объяснить формированием дополнительных CD8^{high} цитотоксических Т-лимфоцитов к новым, измененным, эпитопам S-белка. С учетом использования в данном исследовании S-белка уханьского штамма в качестве антигена, стоит думать, что фактический уровень клеточного иммунитета еще выше у лиц, перенесших инфекцию, вызванную штаммом Омикрон.

Среди белков коронавируса самыми иммуногенными являются S- и N-белок. N-белок находится внутри вирусной частицы и принимает участие в сборке вириона, укладывая РНК в нуклеокапсид. Таким образом, в собранном вирусе он недоступен для действия антител. Роль формирующихся анти-N IgG не до конца изучена [45]. На N-белок формируется и Т-клеточный ответ. Более того, показано поддержание Т-клеточной памяти спустя 11 лет после перенесенной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-1 [207]. N-белок SARS-CoV-2, как и у других коронавирусов, является малоизменчивым по своей структуре [213, 333]. Постоянство его структуры позволило установить наличие Т-лимфоцитов, перекрестно реагирующих на эпитопы N-белка SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 и сезонных коронавирусов человека. Все это дает основания считать, что вакцины, индуцирующие Т-клеточные ответы на высоко консервативный N-белок, будут потенциально защищать от человеческих коронавирусов или облегчать течение заболевания [213].

Сопоставление динамики развития гуморального ответа на S- и N-белок SARS-CoV-2 обнаружило различия. Анти-N-IgG стремительно нарастали и доходили до пика своей концентрации к 3 месяцам наблюдения после COVID-19, затем также резко их уровень снижался в течение года, и к 18 месяцам наблюдения их уровень был низким, но определяемым. Анти-S-IgG нарастали

более плавно, достигая своего максимума к 4 месяцам и сохранялись на одном уровне до года наблюдения. За последующие полгода они постепенно снижались, оставаясь выше защитного уровня как минимум еще 6 месяцев. В исследовании Ren L. et al получены аналогичные данные [239]. Изменения уровней анти-N-IgG во времени определяются быстрым формированием короткоживущих плазматических клеток, формирующихся по экстрафолликулярному пути, когда наиболее важно дать быстрый антительный ответ против вируса, с быстрым увеличением их количества. Одновременно идет другой процесс, эти короткоживущие клетки гибнут со временем и концентрация анти-N-IgG снижается также довольно быстро, достигая минимума к концу года при отсутствии бустерных инфекций. Более медленное нарастание уровня анти-S-IgG с выходом на плато и такое же медленное снижение с сохранением уровней выше защитных можно объяснить наложением двух событий. На S-белок вируса так же быстро образуются короткоживущие плазматические клетки, синтезирующие анти-S-IgG, они так же в этот период выполняют задачу быстрой защиты организма от инфекции. Пики ответов ранних анти-N-IgG и анти-S-IgG, описываемых распределением Фишера, приходятся на 3-4 месяц от момента начала COVID-19, после чего полученные расчетные кривые идут параллельно, снижаясь. Одновременно идет формирование долгосрочной иммунологической памяти путем образования долгоживущих плазматических клеток в зародышевых центрах. Они синтезируют пул анти-S-IgG, выявляемых в крови длительное время, до 1,5 лет наблюдения. Со временем, в отсутствие бустерных инфекций SARS-CoV-2, долгоживущие плазматические клетки тоже постепенно гибнут. Эти два процесса, формирования и апоптоза долгоживущих плазматических клеток хорошо описывает распределение Эрланга. Распределения Фишера и Эрланга применимы для описания результирующих данных двух одновременно протекающих процессов, независимых друг от друга.

Короткоживущие плазматические клетки и на N-, и на S-белок, синтезируют антитела субкласса IgG3, долгоживущие плазматические клетки – преимущественно субкласса IgG1 [23]. С помощью примененных нами методов

математического моделирования установлено, что первичный гуморальный ответ на N- и S-белок вируса в виде анти-N-IgG и анти-S-IgG представлен независимыми друг от друга процессами. В проведенном исследовании замещение субкласса IgG3 на IgG1 в ответе антител на N-белок вируса SARS-CoV-2 шло медленнее, чем на S-белок. Уже через 3 месяца от перенесенного COVID-19 анти-S-IgG на 92,5% были представлены IgG1 против 63,5% анти-N-IgG. Анти-N-IgG производят в основном короткоживущие плазматические клетки, и даже спустя год после перенесенного COVID-19 анти-N-IgG1 составляют не более 70% от всего ответа антител на N-белок вируса. На S-белок вируса первоначально также отвечают синтезом субкласса IgG3 короткоживущие плазматические клетки, затем в дело вступают долгоживущие плазматические клетки, производящие анти-S-IgG1. N- и S-белок выполняют разные функции и их местонахождение в вирионе отличается. N-белок размещен внутри и участвует в процессе размножения вируса и его сборки. S-белок размещен на поверхности вирусной частицы и его основная работа – прикрепиться к поверхности клетки хозяина и провести слияние мембраны вируса и инфицируемой клетки. Поэтому антитела против S-белка являются защитными [298], у анти-N антител такой функции не установлено [45]. Можно предположить, что эти различия являются причиной разной кинетики ответа анти-S-IgG и анти-N-IgG.

При отсутствии бустеров ответа антител в виде повторных инфекций расчетный уровень анти-S-IgG спустя 2 года наблюдения оказался бы около 300 ВАУ/мл, а за 4 года наблюдения – на уровне 10 ВАУ/мл и менее, то есть ниже cut-off. Именно так снижался уровень специфических IgG у переболевших инфекциями, вызванными SARS-CoV-1 и MERS [30, 279]. Вирус SARS-CoV-2 продолжает циркулировать и под давлением сформированного популяционного иммунитета продолжает мутировать, основная часть мутаций происходит в S-белке с целью избежать уже имеющегося ответа защитных антител у переболевших и вакцинированных.

Сопоставление динамики ответов у 4 пациентов наглядно демонстрирует индивидуальные черты формирования и поддержания уровня гуморального и

клеточного ответов, их зависимость от истории контактов и возраста. Продемонстрирован высокий и низкий уровень гуморального ответа, как высокий клеточный ответ на S-белок вируса, так и его отсутствие, постепенное нарастание уровня и avidности антител после каждого нового контакта с вирусом и поддержание их концентрации на защитном уровне в течение всего срока наблюдения, выше 150 BAU/мл до появления штамма Омикрон и выше 300 BAU/мл после. Данные наблюдения за этими 4 пациентами подтверждают независимость формирования клеточного и гуморального иммунного ответов против S-белка вируса SARS-CoV-2. Кроме того, данное наблюдение показывает, что в условиях продолжающихся мутаций и бустирования новыми VOC не происходит снижения уровня антител и клеточного иммунитета к SARS-CoV-2, как это могло бы быть, исходя из наших расчетов в случае элиминации SARS-CoV-2, подобно SARS-CoV-1 и MERS.

Сопоставление иммунного ответа на S- и N-белок вируса SARS-CoV-2 у 4 групп лиц с бустером иммунного ответа в виде вакцинации (гибридный иммунитет) и повторной инфекции Омикрон (прорывной иммунитет) и без бустера у переболевших однократно COVID-19 (постинфекционный иммунитет) и привитых вакциной «Спутник V» (поствакцинальный иммунитет) показало, что уровни анти-S-IgG и спектр субклассов у лиц, имевших первый контакт с вирусом в виде естественной инфекции и вакцинации, не отличались. У тех лиц, кто повторно контактировал со штаммом Омикрон, значительно возросли как уровни анти-S-IgG, так и анти-N-IgG. При этом почти 100% анти-N-IgG были представлены субклассом IgG1. Это говорит о том, что к моменту повторной встречи с вирусом SARS-CoV-2, почти все короткоживущие плазмоциты успели уйти в апоптоз, уровень анти-N-IgG был низким, и отреагировали В-клетки памяти, повторно самостоятельно распознав N-белок вируса и ответив вторичным иммунным ответом. Новые соматические гипермутации Fab-фрагментов, так и переключение субклассов, привели к повышению индекса avidности анти-N-IgG и переключению синтеза на анти-N-IgG1. Анти-S-IgG также ответили бустером на инфекцию, вызванную штаммом Омикрон.

Клеточный ответ был выявлен во всех 4 группах обследуемых в виде процента CD8^{hi}CD107a⁺ Т-лимфоцитов, распознавших антигены SARS-CoV-2. Т-лимфоциты формируют иммунный ответ на N- и S-белок вируса [221]. У половины обследуемых был высокий уровень Т-клеточных ответов на S-белок, у второй половины – низкий. Подобные данные получены и другими исследователями [203, 271]. Уровень клеточного ответа может определяться характеристиками иммунной системы индивидуума, особенностями презентации антигена, уровня провоспалительных цитокинов, вирусной нагрузкой [9, 203, 229]. Клеточный ответ на S-белок слабо коррелировал с гуморальным, а на N-белок такой корреляции не было выявлено. По всей видимости, это связано с разными функциями этих белков в развитии инфекционного процесса и ответа иммунной системы хозяина на них. Т-лимфоциты в отличие от В-клеток распознают пептиды из 9-11 аминокислот, поэтому текущие мутации вируса меньше влияют на эффективность клеточного иммунитета. Этим можно объяснить незначимые различия ответа Т-клеток на S-белок во всех 4 группах с тенденцией его повышения в группе прорывного иммунитета, после повторной инфекции, вызванной штаммом Омикрон. В исследовании Т-клеточных ответов был использован в качестве антигена S-белок уханьского штамма вируса, что, возможно, наложило определенные ограничения на уровень ответа Т-клеток в группе повторно переболевших COVID-19. Показано, что CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, сформированные предыдущей инфекцией или вакцинацией против вируса SARS-CoV-2, продолжали перекрестно распознавать антигены штамма Омикрон и его субвариантов у 70-90% обследуемых [59, 108, 143]. По мере нарастания количества мутаций в S-белке вируса и все большего отклонения его структуры от родоначального уханьского штамма, идет смена иммунодоминантных эпитопов, когда минорные становятся мажорными [21]. Обнаруженные у 6 человек обследуемых высокие ответы Т-клеток на N-белок вируса при отсутствии анти-N IgG и анти-S IgG до вакцинации могут говорить о бессимптомно перенесенной инфекции COVID-19 или недавней инфекции, вызванной сезонными коронавирусами. Кроме того, мы не можем исключить по аналогии с

инфекцией MERS, формирование клеточных ответов без сероконверсии, как это было обнаружено у работников скотобойни в Нигерии [201].

Ключевым звеном в борьбе против вирусов является формирование эффективного долгосрочного клеточного иммунного ответа, специфичного к антигенам вируса. К сожалению, нет единого универсального метода оценки клеточного иммунитета, как иммуноферментный метод для гуморального. Используют разные способы оценки функциональной активности Т-лимфоцитов, такие как внутриклеточное окрашивание цитокинов Т-клеток, метод тетрамеров и другие [118]. Наиболее широко применяемым является ELISpot, которым измеряют уровень продукции цитокинов мононуклеарами крови [305]. Каждый из этих методов имеет свои ограничения. Метод тетрамеров ограничен гаплотипами HLA, а значит, не может быть применимым для популяционных исследований, внутриклеточное окрашивание влечет за собой потерю части Т-лимфоцитов в процессе пробоподготовки и так далее. Все эти методы основаны на том, что мононуклеары, выделенные из крови обследуемых, стимулируют антигеном и оценивают их активацию. В ELISpot чаще всего оценивают продукцию IFN- γ [26, 247] Стоит заметить, что в этом методе невозможно оценить продукцию IFN- γ исключительно специфическими к антигенам вируса CD4⁺Th1-хелперами или CD8⁺Т-клетками, распознавшими эти антигены и ответившими специфически индуцированным синтезом IFN- γ [203]. CD4⁺Th1-хелперы продуцируют намного больше IFN- γ , чем CD8⁺Т-цитотоксические лимфоциты. Да и не все CD8⁺Т-лимфоциты, активированные антигеном, синтезируют IFN- γ [260]. IFN- γ производят также NK-, NKT-клетки и $\gamma\delta$ -Т-лимфоциты, не способные специфически распознавать антигены SARS-CoV-2, но активирующиеся другими путями. Все это вместе взятое означает, что количество продуцентов IFN- γ , как и уровень продукции IFN- γ , оцениваемые в ELISpot, не отражают прямо уровень специфической клеточной защиты. Тем не менее, этот метод стандартизован и воспроизводим, и часто применяется для оценки специфического клеточного ответа на антигены вирусов [4, 222]. Цитотоксические CD8⁺ Т-лимфоциты непосредственно реализуют адаптивный ответ, индуцируя апоптоз зараженных

вирусом клеток. $CD4^+$ Т-лимфоциты – скорее дирижеры иммунного ответа, они участвуют, в том числе, и в активации В-клеток, определяя уровень ответа антител, что может объяснять корреляцию ответа $CD4^+$ Т-лимфоцитов с уровнем вирусспецифических IgG и IgA, для $CD8^+$ Т-лимфоцитов такой корреляции не установлено [109].

В нашем исследовании была предпринята попытка сопоставить два метода оценки клеточного иммунного ответа против антигенов S-белка вируса SARS-CoV-2. Первый метод основан на оценке уровня экспрессии молекулы CD107a $CD8^{high}$ Т-лимфоцитами, распознавшими тот или иной антиген вируса и ответившими атакой с выбросом содержимого цитотоксических гранул. CD107a стабилизирует мембраны лизосом $CD8^{high}$ Т-лимфоцитов и NK-клеток и не позволяет биологически активным веществам вызвать самоповреждение клетки. Наличие CD107a на поверхности $CD8^{high}$ Т-лимфоцитов и NK-клеток говорит об их активации [29]. Выделение лимфоидного гейта $CD8^{high}$ позволяет оценить клеточный иммунный ответ именно цитотоксических Т-лимфоцитов, но не NK-клеток, низко экспрессирующих CD8 [145]. Уровень $CD8^{hi}CD107a^+$ при распознавании S-белка вируса как у лиц, однократно перенесших COVID-19 в 2020-2021 гг., так и у дважды привитых вакциной «Спутник V» не отличался. Повторный бустер клеточного ответа последующей двухкратной вакцинацией «Спутник V» и повторной инфекцией, вызванной штаммом Омикрон, значимо его не усилил.

Во втором методе, основанном на ELISpot, мононуклеары периферической крови обследуемых активировали двумя способами – представлением им трехмерного S-белка вируса SARS-CoV-2 или специальной смесью пептидов из белков вируса – и оценивали количество клеток-продуцентов и уровень продукции IFN- γ . Было установлено, что продукция IFN- γ , стимулированная S-белком SARS-CoV-2, измеренная в абсолютных значениях, пг/мл, значимо ниже в группах гибридного иммунитета, переболевших и затем вакцинированных, и прорывного иммунитета, дважды перенесших COVID-19, в сравнении с группами постинфекционного и поствакцинального иммунитета. Можно предположить, что

большое количество мутаций в S-белке привело к сдвигу в спектре иммуногенных эпитопов вируса. Те из них, которые были иммунодоминантными в случае уханьского штамма, стали минорными для штамма Омикрон. Так как мононуклеары всех групп обследуемых стимулировали S-белком уханьского штамма, часть Т-лимфоцитов лиц с гибридным и прорывным иммунитетом не ответила. Напротив, мононуклеары лиц с прорывным иммунитетом, стимулированные высокоиммуногенной смесью пептидов вируса SARS-CoV-2, синтезировали значимо больше IFN- γ как в абсолютных, так и относительных значениях. Незначимые отличия уровней экспрессии CD107a CD8^{high} Т-лимфоцитами, стимулированными S-белком, в 4-х группах обследуемых могут свидетельствовать о сужении спектра клонов Т-лимфоцитов, специфически отвечающих на повторную антигенную стимуляцию новыми штаммами вируса. Так, обсуждается вероятность того, что репертуар клонов меняется на порядки в течение нескольких лет, даже при отсутствии сильной специфической стимуляции, а также зависимость смены этого репертуара от возраста. У более молодых лиц смена клонов идет быстрее, чем у пожилых [48]. Со временем Т-лимфоциты, специфически отвечающие на более стабильные пептиды N-белка, способны занять ведущее место в клеточном ответе на вирус, в сравнении с Т-лимфоцитами, реагирующими на пептиды S-белка, который часто мутирует. Поскольку в методах, примененных в нашем исследовании, участвовали разные типы клеток, результаты ELISpot не коррелировали с уровнем экспрессии CD107a на CD8^{high} Т-лимфоцитах. Умеренная корреляция между ответом клеток-продуцентов IFN- γ на S-белок и смесь пептидов вируса SARS-CoV-2 объяснима различиями в пептидах, которыми стимулируют мононуклеары. Количество клеток-продуцентов IFN- γ и его синтез высоко коррелировали между собой. Метод ELISpot наглядно продемонстрировал индивидуальные черты клеточного ответа у обследуемых. У одних пятна в лунке, соответствующие клеткам, ответившим синтезом IFN- γ на специфическую стимуляцию, были крупные, но их было мало. У других обследуемых клеточный ответ был представлен большим количеством мелких пятен. Пятна отличались интенсивностью окраски, а, значит,

и уровнем продукции цитокина от одного обследуемого к другому. Оценка специфического Т-клеточного звена иммунитета, как ключевого в ответе на антигены вируса SARS-CoV-2, важна. Тем не менее, задача создать единый воспроизводимый и экономически выгодный стандарт оценки клеточного иммунного ответа, специфичного по отношению к вирусным антигенам, на данный момент до конца не решена.

Четыре года наблюдения за группой перенесших COVID-19 в условиях продолжающейся циркуляции новых мутантных штаммов вируса SARS-CoV-2 показали сохранение и поддержание клеточной и гуморальной иммунологической памяти к его антигенам. За это время в России прошло 9 волн подъема заболеваемости и обследуемые неоднократно встречали разные штаммы вируса, включая Омикрон и его варианты. Часть из них болела повторно с явной симптоматикой ОРЗ, часть бессимптомно бустировала. Предыдущие наблюдения исследователей за сохранением Т- и В-клеточной памяти к антигенам SARS-CoV-1 и MERS проводились в условиях элиминации этих вирусов из человеческой популяции [207, 329]. В данном исследовании установлена разница в динамике ответов анти-S и анти-N IgG. IgG против S-белка вируса сохраняли стабильный уровень в течение первого года наблюдения. Инфекция, вызванная штаммом Омикрон и его вариантами, послужили бустерами ответа этих антител, синтезируемых уже имеющимися в результате предыдущих COVID-19 долгоживущими плазматическими клетками. Данные других исследователей продемонстрировали такие же результаты, максимально выраженные у лиц, переболевших COVID-19 многократно [199]. Спектр субклассов анти-S IgG таких реконвалесцентов представлен в основном анти-S IgG1. Тем не менее, у обследуемых при дальнейшем наблюдении стали вновь определяться анти-S IgG3. Этот факт может свидетельствовать о первичном гуморальном ответе на мутантные эпитопы S-белка. Также у этих переболевших часть ответов антител против S-белка состояла из анти-S-IgG2 и анти-S-IgG4. Таким образом, гуморальный ответ на повторные инфекции, вызванные вариантами Омикрона, был представлен вторичным иммунным ответом на прежние, неизмененные,

эпитопы S-белка и первичным иммунным ответом на новые мутантные. Созревание ответа антител против S-белка подтверждает рост индекса avidности до 75%. Затем у некоторых наблюдаемых индекс avidности анти-S IgG снижался после очередной инфекции, вызванной мутантными штаммами. Скорее всего, этот результат можно объяснить суммой высокоавидных анти-S IgG вторичного и низкоавидных анти-S IgG первичного ответа. Появление в спектре ответов анти-S-IgG4 после инфекции, вызванной штаммом Омикрон, описано у пациентов, перенесших тяжелые и летальные формы COVID-19 и повторно вакцинированных мРНК-вакцинами [292]. В данном исследовании не было лиц, переболевших тяжелой формой COVID-19 или привитых мРНК-вакцинами. Однако 50% наблюдаемых нами обследуемых демонстрировали концентрации анти-S IgG4 выше 100 ВАУ/мл или 15% от общего ответа анти-S IgG-антител после инфекции, вызванной штаммом Омикрон. Анти-S IgG4 у этих лиц постепенно снижались и достигли уровня 2,92% в точке наблюдения 3 года. Все они болели не тяжело. Субкласс IgG4 относят к категории блокирующих антител, обычно завершающих гуморальный иммунный ответ [292]. В то же время, об аутоиммунитете, индуцированном IgG4, свидетельствует тот факт, что большинство антигенспецифических аутоантител относятся к классу IgG4 и что их концентрации коррелируют с серьезностью аутоиммунных болезней [129].

Динамика ответа IgG против консервативного N-белка вируса отличалась от ответов на S-белок слияния и проникновения. После первичного COVID-19 концентрация анти-N IgG была значимо выше, чем анти-S IgG. Их уровень повторно повышался после инфекции, вызванной штаммом Омикрон, и также быстро падал, как и после инфекции, вызванной уханьским штаммом вируса. Данные других исследовательских групп аналогичны [193]. Характер изменений уровней анти-N IgG во времени и значимый вклад субкласса IgG3 говорит о продукции таких антител, в основном, короткоживущими плазматическими клетками вне зародышевых фолликулов. После инфекции, вызванной штаммом Омикрон, отмечался рост вклада анти-N IgG3 до 42,43% на сроке 2 года от стартовой точки исследования. Это свидетельствует о том, что в IgG ответ на N-

белок включились новые клетки, ввиду гибели короткоживущих плазмоцитов за это время. Уровни анти-S IgA во времени менялись аналогичным образом, что говорит нам об их экстрафолликулярной продукции. Подобные данные по динамике ответов IgA на антигены S-белка получены и в других исследованиях [33].

Формирование и поддержание ответов Т-лимфоцитов, специфичных к S- и N-белку вируса, оказались различными. Процент CD8^{hi}CD107a⁺ клеток на N-белок после первого COVID-19 был значимо выше, чем на S-белок, далее он постепенно снижался, несмотря на контакт со штаммом Омикрон. Аналогичные данные показали другие исследователи [94, 164]. На эпитопы S-белка вируса формировало свои ответы значимо меньшее количество CD8^{hi} Т-лимфоцитов. Рост клеточных ответов на S-белок был выявлен после инфекции, вызванной штаммом Омикрон. 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 исследования. Известно, что клеточный иммунитет, представленный ответом Т-лимфоцитов, оказывается более значимым в защите организма от атак мутантных штаммов, в сравнении с ответом противовирусных антител [50].

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 плазмоциты. Динамика изменения во времени концентрации IgG-антител к S-белку в сыворотке крови является суммой двух процессов: синтеза ранних антител короткоживущими плазмоцитами, этот процесс аппроксимируется с помощью распределения Фишера, и синтеза антител долгоживущими плазмоцитами, 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 ВАУ/мл, а за 4 года наблюдения – до уровня менее 10 ВАУ/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 T-клеточных ответов на высококонсервативный N-белок на протяжении 4 лет наблюдения выше уровня cut-off 1% позволяют предположить, что T-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 ВАУ/мл. Концентрацию IgG-антител ниже 600 ВАУ/мл оценивать как низкий уровень ответа, выше 600 ВАУ/мл – как высокий уровень ответа антител.
2. Использовать для описания динамики ответа анти-N-IgG и анти-S-IgG, синтезируемых короткоживущими плазмочитами, распределение Фишера, а динамики анти-S-IgG, синтезируемых долгоживущими плазмочитами, 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 исследование иммунитета в рамках постковидного синдрома.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВИЧ - вирус иммунодефицита человека

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

АСЕ2 - ангиотензинпревращающий фермент 2

АИМ2 - рецепторы лектина С-типа и отсутствующие при меланоме 2

Bcl6 - белок 6 В-клеточной лимфомы, фактор транскрипции

CCl – хемокин

CD4⁺ - кластер дифференцировки, маркер Т-хелперов

CD8⁺ - кластер дифференцировки, маркер Т-цитотоксических лимфоцитов

CD40L – лиганд к кластеру дифференцировки CD40

ChAdOx1 – аденовирус шимпанзе

COVID-19 - коронавирусная инфекция 2019 года

CXCL – хемокин

CXCR – рецептор к хемокину

DAMP – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением

ELISpot - (англ. Enzyme-linked immunosorbent spot) – иммуноферментный анализ, используемый для детекции клеток, секретирующих IFN- γ

FAS – член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли

GC – зародышевый центр лимфоузла

GSDMD – белок газдермин D

HKU-1 – коронавирус сезонного респираторного заболевания человека

iBALt – индуцируемая бронхо-ассоциированная лимфоидная ткань

IFN – интерферон

IgG - иммуноглобулины G

IgM - иммуноглобулины M

IL – интерлейкин

ILC – врожденные лимфоидные клетки

IL-1RA - антагонист рецептора интерлейкина 1
IRF - регуляторный фактор интерферона
ISG – интерферон-стимулируемые гены
MAVS –митохондриальный противовирусный сигнальный белок
MHC – комплекс тканевой совместимости
NF-κB - ядерный фактор κB
NK – натуральные киллеры
Nsp – неструктурные белки
NKT – клетки, экспрессирующие маркеры NK-клеток и Т-лимфоцитов
NL63 – альфакоронавирус человека
NLR - рецепторы, подобные нуклеотидсвязывающему домену олигомеризации
NLRP3 – нуклеотид-связывающий домен олигомеризации, богатый повторами лейцина и содержащий домен пирина
mDC - миелоидные дендритные клетки
MERS-CoV - коронавирус ближневосточного респираторного синдрома
MyD88 - ген первичного ответа миелоидной дифференцировки
OC43 – бетакоронавирус человека
PC – плазматические клетки
PD-1 - белок программированной клеточной смерти
PRR – паттерн-распознающие рецепторы
PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
pDC - плазмоцитоидные дендритные клетки
RBD - рецептор-связывающий домен
RLR - рецепторы, индуцируемые ретиноевой кислотой, подобные гену I
SARS-CoV-2 (2019-nCoV) - коронавирус, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом
γδ-T – Т-лимфоциты, несущие γδ-T-клеточный рецептор
TCM – Т-клетки центральной памяти
TCR – Т-клеточный рецептор
TEM – Т-эффекторы памяти

TEMRA – терминально дифференцированные Т-эффекторы памяти

TF – тканевой фактор

TLR - Toll-подобные рецепторы

TNF – фактор некроза опухоли

TRAF6 - фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей

TRH – Т-резидентные хелперы

TRM – резидентные Т-клетки памяти

TSCM – Т-клетки памяти, подобные стволовым клеткам

VOC – штаммы, вызывающие озабоченность

VVNR – вакцины, содержащие не реплицирующийся вирусный вектор

WT – уханьский штамм SARS-CoV-2

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова, Н.Д. Экспрессия и продукция цитокинов у пациентов с тяжелым течением SARS-CoV-2 /Н.Д. Абрамова, Е.А. Меремьянина, Н.О. Калужная, А.В. Поддубиков, М.П. Костинов, В.В. Греченко, О.А. Свитич // Российский иммунологический журнал. – 2023. – т. 26. – № 4. – С. 603-610.
2. Андреев, И.В. Поствакцинальный и постинфекционный гуморальный иммунный ответ на инфекцию SARS-CoV-2/ И.В. Андреев, К.О. Нечай, А.И. Андреев, А.П. Зубарёва, Д.Р. Есаулова, А.М. Аленова, И.А. Николаева, О.П. Чернявская, К.С. Ломоносов, А.Е. Шульженко, О.М. Курбачева, Е.А. Латышева, Е.В. Шартанова, Е.В. Назарова, Л.В. Романова, Н.Г. Черченко, В.В. Смирнов, О.В. Аверков, А.И. Мартынов, В.И. Вечорко, Г.О. Гудима, Д.А. Кудлай, М.Р. Хайтов, Р.М. Хайтов // Иммунология. – 2022. – т.43. – №3. – С. 18-32
3. Астраханцева, И.В. Сравнение иммунного ответа на различные вакцины против SARS-CoV-2 в течение 6 месяцев после начала вакцинации и после ревакцинации»/ И.В. Астраханцева // Российский иммунологический журнал. – 2023. – т. 26. – № 4. – С. 665-670.
4. Герасимова, В.В. 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. – 2022. – т. 7. – №5-2. – С. 96-102.
5. Евсеева, Г.П. Оценка уровня иммунной прослойки к SARS-COV-2 у детей в условиях новой коронавирусной инфекции COVID-19 / Г.П. Евсеева, М.А. Лазарева, М.А. Власова, Е.Б. Наговицына, С.В. Супрун, Р.С. Телепнёва, Е.В. Книжникова, О.И. Галянт, О.А. Лебедько // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2023. – № 88. – С. 59-68
6. Закурская, В.Я. Динамика специфического гуморального ответа у пациентов, перенесших COVID-19 / В.Я. Закурская, Л.П. Сизякина, М.В. Харитонова, С.В. Шлык // Иммунология. – 2022. – т. 43. – №1. – С. 71–77.
7. Земсков, Д.Н. Актуальные аспекты этиотропной терапии COVID-19 / Д.Н. Земсков, Л.А. Балыкова, О.А. Радаева, К.Я. Заславская, П.А. Белый, Е.В.

- Семенова, М.В. Ширманкина, К.Н. Корянова// Фармация и фармакология. – 2022. – т. 10. – №5. – С. 432-445.
8. Зуева, Е.В. Характеристика набора реагентов «N-CoV-2-IgG PS» для количественного определения IgG человека к нуклеокапсидному белку SARS-CoV-2 / Е.В. Зуева, Н.Н. Беляев, В.Н. Вербов, И.В. Лихачев, И.А. Бачинин, И.В. Хамитова, З.Р. Коробова, Н.А. Арсентьева, А.А. Тотолян // Инфекция и иммунитет. – 2022. – т.12. – №4. – С. 771-778.
9. Иванова, И.А. Оценка формирования и напряженности адаптивного иммунитета у переболевших COVID-19 / И.А. Иванова, А.В. Филиппенко, А.А. Труфанова, Н.Д. Омельченко, О.С. Чемисова, А.С. Водопьянов, Е.А. Березняк, Е.П. Соколова, А.К. Носков, А.А. Тотолян // Инфекция и иммунитет. – 2023. – т.13. – №2. – С. 319–328.
10. Корчевая, Е.Р. Живые аттенуированные вакцины против COVID-19: подходы к разработке и перспективы клинического применения / Е.Р. Корчевая, А.В. Грачева, И.Н. Дьяков, В.В. Зверев, Е.Б. Файзулов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2023. – т. 100. – №3. – С. 225–236. doi: 10.36233/0372-9311-404
11. Крюкова Н.О. Секреторный иммуноглобулин А респираторной системы и COVID-19 / Н.О. Крюкова, Е.Б. Ракунова, М.П. Костинов, И.А. Баранова, О.А. Свитич // Пульмонология. – 2021. – т. 31. – №6. – С. 792–798.
12. Львов, Д.К. Истоки пандемии COVID-19: экология и генетика коронавирусов (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (подрод Sarbecovirus), MERS-CoV (подрод Merbecovirus) / Д.К. Львов, С.В. Альховский // Вопросы вирусологии. – 2020. – т. 65. – № 2. – С. 62-70.
13. Оспельникова, Т.П. Биологическая активность интерферонов при новой коронавирусной инфекции COVID-19 / Т.П. Оспельникова, Д.С. Левицкая, Л.В. Колодяжная, А.Д. Шитова, В.Н. Осипцов, Л.Р. Арифиллина, Н.О. Крюкова, Д.В. Пахомов, Е.А. Хромова, И.А. Баранова, А.Г. Чучалин, М.П. Костинов, О.А. Свитич // Вопросы вирусологии. – 2022. – т. 67. – №2. – С. 142-152.

14. Патент RU 2762616 C1 Российской Федерации СПК G01N 33/533 (2021.08); G01N 33/577 (2021.08); A61B 5/145 (2021.08) Способ определения и количественной оценки специфического клеточного иммунитета к антигенам S-белка вируса SARS-CoV-2/ А.П.Топтыгина; заявитель и патентообладатель ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора (RU), заявл. 22.09.2021, опубл. 21.12.2021 Бюл. № 36. -, 12 с.: с ил.
15. Приказ МЗ РФ от 19.07.2003 №266. Об утверждении Правил клинической практики в Российской Федерации. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/901866939>
16. Радаева, О.А. Динамика уровня макрофагального колониестимулирующего фактора в сыворотке крови пациентов с эссенциальной гипертензией при формировании поствакцинального иммунитета к SARS-CoV-2 / О.А. Радаева, А.С. Симбирцев, Ю.А. Костина, М.С. Искандярова, С.В. Машнина, Е.В. Негоднова, Д.Д. Бесшейнов // Российский иммунологический журнал. – 2021. – т. 24. – № 4. – С. 531-538.
17. Сизякина, Л.П. Клинико-иммунологическая характеристика среднетяжелых форм COVID-19 при различных уровнях маркера тканевой деструкции – лактатдегидрогеназы / Л.П. Сизякина, В. Я. Закурская, Н.А. Скрипкина, Е.А. Антонова, Д.В. Сизякин // Медицинский вестник Юга России. – 2021. – т. 12. – №4. – С. 108-115.
18. Симбирцев, А.С. Иммунопатогенез и перспективы иммунотерапии коронавирусной инфекции/ А.С. Симбирцев // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2020. – т. 12. – №4. – С. 7-22.
19. Топтыгина, А.П. Лимфоидный фолликул – территория иммунного ответа/ А.П. Топтыгина // Иммунология. – 2012. – т. 33. – № 3. С. 162-169.
20. Топтыгина, А.П. Общие закономерности формирования и поддержания специфического гуморального ответа на примере ответа на вирусы кори и краснухи // А.П. Топтыгина // Инфекция и иммунитет. – 2014. – т. 4. – № 1. – С. 7–14

21. Топтыгина, А.П. Гетерологичные иммунные ответы в норме и при патологии / А.П. Топтыгина // Инфекция и иммунитет. – 2020. – Т. 10. – №2. – С.269-276
22. Топтыгина, А.П. Сопоставление первичного и вторичного гуморального иммунного ответа на вакцинацию «Приорикс» / А.П. Топтыгина, В.А. Алешкин // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. 3. – №4. – С. 359-364.
23. Топтыгина, А.П. Особенности специфического гуморального иммунного ответа против вируса кори / А.П. Топтыгина, Т.А. Мамаева, В.А. Алешкин // Инфекция и иммунитет. – 2013. – т. 3. – № 3. – С. 243-250
24. Топтыгина, А.П. Спектр субклассов противокоревых иммуноглобулинов G у лиц, перенесших корь / А.П. Топтыгина, А.Л. Пухальский, Т.А. Мамаева, В.А. Алешкин // Бюллетень экспериментальной биологии. – 2004. – т. 137. – №3. – С. 293–295.
25. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Актуальная эпидемическая ситуация в России и мире. Режим доступа: https://www.rospotrebnadzor.ru/region/korono_virus/epid.php
26. Черепович, Б.С. Определение Т-клеточного иммунного ответа к коронавирусу SARS-CoV-2, основанного на индукции выработки γ -интерферона специфическими Т-лимфоцитами периферической крови при их стимуляции вирусным антигеном / Б.С. Черепович, А.М. Кудряшова, Л.Л. Панкратьева, А.В. Боголюбова, В.А. Мануйлов, В.А. Гуцин, А.А. Почтовый, О.В. Борисова, О.А. Свитич // Медицинская иммунология. – 2025. – т. 27. – №1. – С. 45-56.
27. Чистякова, Г.Н. Формирование противоинфекционного и поствакцинального гуморального иммунитета к SARS-CoV-2 у медицинских работников перинатального центра / Г.Н. Чистякова, Г.Б. Мальгина, А.В. Устюжанин, И.И. Ремизова // Инфекция и иммунитет. – 2022. – т. 12. – № 4. – С. 688–700.
28. Щелканов М.Ю. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae) /М.Ю. Щелканов, А.Ю. Попова, В.Г. Дедков, В.Г. Акимкин, В.В. Малеев //Инфекция и иммунитет. – 2020. – т. 10, – №2. – С. 221–246.

29. Aktas, E. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity/ E. Aktas, U.C. Kucuksezer, S. Bilgic, G. Erten, G. Deniz // *Cell Immunology*. – 2009. – Vol. 254(2). – P. 149-154.
30. Alhabbab, R.Y. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Elicits Long-lasting Specific Antibody, T and B Cell Immune Responses in Recovered Individuals/ R.Y. Alhabbab, A. Algaissi, A.B. Mahmoud, A.A. Alkayyal, S. Al-Amri, M.A. Alfaleh, M. Basabrain, R.A. Alsubki, I.S. Almarshad, A.M. Alhudaithi, O.A.A. Gafari, Y.A. Alshamlan, H.M. Aldossari, M.M. Alsafi, A. Bukhari, W. Bajhmom, Z.A. Memish, W.S. Al Salem, A.M. Hashem // *Clinical Infectious Diseases*. – 2023. – Vol. 76(3). – e308-e318.
31. Altarawneh, H.N. Protection against the Omicron Variant from Previous SARS-CoV-2 Infection / H.N. Altarawneh, H. Chemaitelly, M.R. Hasan, H.H. Ayoub, S. Qassim, S. AlMukdad, P. Coyle, H.M. Yassine, H.A. Al-Khatib, F.M. Benslimane, Z. Al-Kanaani, E. Al-Kuwari, A. Jeremijenko, A.H. Kaleeckal, A.N. Latif, R.M. Shaik, H.F. Abdul-Rahim, G.K. Nasrallah, M.G. Al-Kuwari, A.A. Butt, H.E. Al-Romaihi, M.H. Al-Thani, A. Al-Khal, R. Bertollini, P. Tang, L.J. Abu-Raddad // *New England Journal of Medicine*. – 2022. – Vol.386 (13). –P.1288-1290.
32. Alter, G. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity / G. Alter, J.M. Malenfant, M. Altfeld // *Journal of Immunological Methods*. – 2004. – Vol. 294(1-2). – P. 15-22.
33. Amellal, H. Kinetics of specific anti-SARS-CoV-2 IgM, IgA, and IgG responses during the first 12 months after SARS-CoV-2 infection: A prospective longitudinal study. / H. Amellal, N. Assaid, H. Charoute, K. Akarid, A. Maaroufi, S. Ezzikouri, M. Sarih // *PLoS One*. 2023. Vol. 18(7). e0288557.
34. Arase, H. Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking/ H. Arase, N. Arase, T. Saito // *Journal of Experimental Medicine*. – 1996. – Vol.183(5). – P. 2391-2396.
35. Aschwanden, C. Five reasons why COVID herd immunity is probably impossible/ C. Aschwanden // *Nature*. – 2021. – Vol. 591(7851). – P. 520-522.

36. Astakhova, E.A. Functional Profiling of In Vitro Reactivated Memory B Cells Following Natural SARS-CoV-2 Infection and Gam-COVID-Vac Vaccination / E.A. Astakhova, M.G. Byazrova, G.M. Yusubalieva, S.V. Kulemzin, N.A. Kruglova, A.G. Prilipov, V.P. Baklaushev, A.A. Gorchakov, A.V. Taranin, A.V. Filatov // *Cells*. – 2022. – Vol. 11(13). – 1991.
37. Atmar, R.L. Homologous and Heterologous Covid-19 Booster Vaccinations / R.L. Atmar, K.E. Lyke, M.E. Deming, L.A. Jackson, A.R. Branche, H.M. El Sahly, C.A. Rostad, J.M. Martin, C. Johnston, R.E. Rupp, M.J. Mulligan, R.C. Brady, R.W. Jr Frenc, M. Bäcker, A.C. Kottkamp, T.M. Babu, K. Rajakumar, S. Edupuganti, D. Dobrzynski, R.N. Coler, C.M. Posavad, J.I. Archer, S. Crandon, S.U. Nayak, D. Szydlo, J.A. Zemanek, C.P. Dominguez Islas, E.R. Brown, M.S. Suthar, M.J. McElrath, A.B. McDermott, S.E. O'Connell, D.C. Montefiori, A. Eaton, K.M. Neuzil, D.S. Stephens, P.C. Roberts, J.H. Beigel; DMID 21-0012 Study Group // *New England Journal of Medicine*. – 2022. – Vol. 386(11). – P. 1046-1057.
38. Atyeo, C. Distinct early serological signatures track with SARS-CoV-2 survival/ C. Atyeo, S. Fischinger, T. Zohar, M.D. Slein, J. Burke, C. Loos, D.J. McCulloch, K.L. Newman, C. Wolf, J. Yu, K. Shuey, J. Feldman, B.M. Hauser, T. Caradonna, A.G. Schmidt, T.J. Suscovich, C. Linde, Y. Cai, D. Barouch, E.T. Ryan, R.C. Charles, D. Lauffenburger, H. Chu, G. Alter // *Immunity*. – 2020. – Vol.53(3). – P. 524–532.e4.
39. Augustyniak, A. A cohort study reveals different dynamics of SARS-CoV-2-specific antibody formation after Comirnaty and Vaxzevria vaccination / A. Augustyniak, T. Szymański, F. Porzucek, A.A. Mieloch, J.A. Semba, K.A. Hubert, D. Grajek, R. Krela, Z. Rogalska, E. Zalc-Budziszewska, S. Wysocki, K. Sobczak, L. Kuczyński, J.D. Rybka // *Vaccine*. – 2023. – Vol. 41(34). – P. 5037-5044.
40. Babrukevich, D. SARS-CoV-2-specific T Cell Immunity after Vaccination with Sputnik V and BBIBP-CorV / D. Babrukevich, N. Antonevich, A. Hancharou, A. Rynda, O. Timohina, Y. Minich, V. Mantivoda, L. DuBuske // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2022. – Vol.149(2). – AB99.
41. Baden, L.R. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine / L.R. Baden, H.M. El Sahly, B. Essink, K. Kotloff, S. Frey, R. Novak, D. Diemert, S.A.

- Spector, N. Rouphael, C.B. Creech, J. McGettigan, S. Khetan, N. Segall, J. Solis, A. Brosz, C. Fierro, H. Schwartz, K. Neuzil, L. Corey, P. Gilbert, H. Janes, D. Follmann, M. Marovich, J. Mascola, L. Polakowski, J. Ledgerwood, B.S. Graham, H. Bennett, R. Pajon, C. Knightly, B. Leav, W. Deng, H. Zhou, S. Han, M. Ivarsson, J. Miller, T. Zaks; COVE Study Group // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 384(5). – P. 403-416.
42. Barouch, D.H. Durable Humoral and Cellular Immune Responses 8 Months after Ad26.COV2.S Vaccination / D.H. Barouch, K.E. Stephenson, J. Sadoff, J. Yu, A. Chang, M. Gebre, K. McMahan, J. Liu, A. Chandrashekar, S. Patel, M. Le Gars, A.M. de Groot, D. Heerwegh, F. Struyf, M. Douoguih, J. van Hoof, H. Schuitemaker // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 385(10). – P. 951-953.
43. Barrett, C.T. Viral Membrane Fusion and the Transmembrane Domain / C.T. Barrett, R.E. Dutch. // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12(7) – P. 693.
44. Bates, T.A. Vaccination before or after SARS-CoV-2 infection leads to robust humoral response and antibodies that effectively neutralize variants / T.A. Bates, S.K. McBride, H.C. Leier, G. Guzman, Z.L. Lyski, D. Schoen, B. Winders, J.Y. Lee, D.X. Lee, W.B. Messer, M.E. Curlin, F.G. Tafesse // *Science Immunology*. – 2022. – Vol. 7(68). – eabn8014.
45. Batra, M. Role of IgG against N-protein of SARS-CoV2 in COVID19 clinical outcomes / M. Batra, R. Tian, C. Zhang, E. Clarence, C.S. Sacher, J.N. Miranda, J.R.O. De La Fuente, M. Mathew, D. Green, S. Patel, M.V.P. Bastidas, S. Haddadi, M. Murthi, M.S. Gonzalez, S. Kambali, K.H.M. Santos, H. Asif, F. Modarresi, M. Faghihi, M. Mirsaeidi // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11(1). – 3455.
46. Bauer, G. The potential significance of high avidity immunoglobulin G (IgG) for protective immunity towards SARS-CoV-2 / G. Bauer // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 106. – P. 61-64.
47. Benner, S. SARS-CoV-2 Antibody Avidity Responses in COVID-19 Patients and Convalescent Plasma Donors / S.E. Benner, E.U. Patel, O. Laeyendecker, A. Pekosz, K. Littlefield, Y. Eby, R.E. Fernandez, J. Miller, C.S. Kirby, M. Keruly, E.

- Klock, O.R. Baker, H.A. Schmidt, R. Shrestha, I. Burgess, T.S. Bonny, W. Clarke, P. Caturegli, D. Sullivan, S. Shoham, T.C. Quinn, E.M. Bloch, A. Casadevall, A.A.R. Tobian, A.D. Redd // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 222(12) – P. 1974-1984.
48. Bensouda Koraichi, M. Inferring the T cell repertoire dynamics of healthy individuals / M. Bensouda Koraichi, S. Ferri, A.M. Walczak, T. Mora // *PNAS*. – 2023. – Vol. 120(4). – e2207516120
49. Bergamaschi, L. Longitudinal analysis reveals that delayed bystander CD8+ T cell activation and early immune pathology distinguish severe COVID-19 from mild disease/ L. Bergamaschi, F. Mescia, L. Turner, A.L. Hanson, P. Kotagiri, B.J. Dunmore, H. Ruffieux, A. De Sa, O. Huhn, M.D. Morgan, P.P. Gerber, M.R. Wills, S. Baker, F.J. Calero-Nieto, R. Doffinger, G. Dougan, A. Elmer, I.G. Goodfellow, R.K. Gupta, M. Hosmillo, K. Hunter, N. Kingston, P.J. Lehner, N.J. Matheson, J.K. Nicholson, A.M. Petrunkina, S. Richardson, C. Saunders, J.E.D. Thaventhiran, E.J.M. Toonen, M.P. Weekes; Cambridge Institute of Therapeutic Immunology and Infectious Disease-National Institute of Health Research (CITIID-NIHR) COVID BioResource Collaboration, B. Göttgens, M. Toshner, C. Hess, J.R. Bradley, P.A. Lyons, K.G.C. Smith // *Immunity*. – 2021. – Vol. 54(6). – P. 1257-1275.e8.
50. Bertoletti, A. SARS-CoV-2-specific T cells in the changing landscape of the COVID-19 pandemic / A. Bertoletti, N. Le Bert, A.T. Tan // *Immunity*. – 2022. – Vol. 55(10). – P. 1764-1778.
51. Billah, M.A. Reproductive number of coronavirus: A systematic review and meta-analysis based on global level evidence / M.A. Billah, M.M. Miah, M.N. Khan // *PLoS One*. – 2020. – Vol.15(11). – e0242128.
52. Blanco-Melo, D. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19/ D. Blanco-Melo, B.E. Nilsson-Payant, W.C. Liu, S. Uhl, D. Hoagland, R. Möller, T.X. Jordan, K. Oishi, M. Panis, D. Sachs, T.T. Wang, R.E. Schwartz, J.K. Lim, R.A. Albrecht, B.R. tenOever // *Cell*. – 2020. – Vol. 181(5). – P. 1036–1045. e9.

53. Bobik, T. V. COVID-19 in Russia: Clinical and Immunological Features of the First-Wave Patients / T. V. Bobik, N. N. Kostin, G. A. Skryabin, P. N. Tsabai, M. A. Simonova, V. D. Knorre, O. N. Stratienco, N. L. Aleshenko, I. I. Vorobiev, E. N. Khurs, Yu. A. Mokrushina, I. V. Smirnov, A. I. Alekhin, A. E. Nikitin, A. G. Gabibov // *Acta Naturae*. – 2021. – Vol. 13(1). – P. 102-115.
54. Boppana, S.B. Antiviral antibody responses and intrauterine transmission after primary maternal cytomegalovirus infection / S.B. Boppana, W.J. Britt // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1995. – Vol. 171(5). – P. 1115-1121.
55. Boppana, S.B. SARS-CoV-2-specific circulating T follicular helper cells correlate with neutralizing antibodies and increase during early convalescence / S.B. Boppana, K. Qin, J.K. Files, R.M. Russell, R. Stoltz, F. Bibollet-Ruche, A. Bansal, N. Erdmann, B.H. Hahn, P.A. Goepfert // *PLoS Pathogens*. – 2021. – Vol. 17(7). – e1009761.
56. Bosch, B.J. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex / B.J. Bosch, R. van der Zee, C.A. de Haan, P.J. Rottier // *Journal of Virology*. – 2003. – Vol.77(16). – P. 8801–8811.
57. Bouhaddou, M. SARS-CoV-2 variants evolve convergent strategies to remodel the host response / M. Bouhaddou, A.K. Reuschl, B.J. Polacco, L.G. Thorne, M.R. Ummadi, C. Ye, R. Rosales, A. Pelin, J. Batra, G.M. Jang, J. Xu, J.M. Moen, A.L. Richards, Y. Zhou, B. Harjai, E. Stevenson, A. Rojic, R. Ragazzini, M.V.X. Whelan, W. Furnon, G. De Lorenzo, V. Cowton, A.M. Syed, A. Ciling, N. Deutsch, D. Pirak, G. Dowgier, D. Mesner, J.L. Turner, B.L. McGovern, M.L. Rodriguez, R. Leiva-Rebollo, A.S. Dunham, X. Zhong, M. Eckhardt, A. Fossati, N.F. Liotta, T. Kehrer, A. Cupic, M. Rutkowska, I. Mena, S. Aslam, A. Hoffert, H. Foussard, C.O. Olwal, W. Huang, T. Zwaka, J. Pham, M. Lyons, L. Donohue, A. Griffin, R. Nugent, K. Holden, R. Deans, P. Aviles, J.A. Lopez-Martin, J.M. Jimeno, K. Obernier, J.M. Fabius, M. Soucheray, R. Hüttenhain, I. Jungreis, M. Kellis, I. Echeverria, K. Verba, P. Bonfanti, P. Beltrao, R. Sharan, J.A. Doudna, L. Martinez-Sobrido, A.H. Patel, M. Palmarini, L. Miorin, K. White, D.L. Swaney, A. Garcia-Sastre, C. Jolly, L.

- Zuliani-Alvarez, G.J. Towers, N.J. Krogan // *Cell*. – 2023. – Vol. 186(21). – P. 4597-4614.e26.
58. Böyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g / A. Böyum // *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation supplementum* – 1968. – Vol. 97. – P. 77-89.
59. Brand, M. Evolution of SARS-CoV-2-specific CD4+ T cell epitopes / M. Brand, C. Keşmir // *Immunogenetics*. – 2023. – Vol. 75(3). – P. 283-293.
60. Braun, J. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19/ J. Braun, L. Loyal, M. Frentsch, D. Wendisch, P. Georg, F. Kurth, S. Hippenstiel, M. Dingeldey, B. Kruse, F. Fauchere, E. Baysal, M. Mangold, L. Henze, R. Lauster, M.A. Mall, K. Beyer, J. Röhmel, S. Voigt, J. Schmitz, S. Miltenyi, I. Demuth, M.A. Müller, A. Hocke, M. Witzenrath, N. Suttorp, F. Kern, U. Reimer, H. Wenschuh, C. Drosten, V.M. Corman, C. Giesecke-Thiel, L.E. Sander, A. Thiel // *Nature*. – 2020. – Vol. 587(7833). – P. 270-274.
61. Bulcha, J.T. Viral vector platforms within the gene therapy landscape / J.T. Bulcha, Y. Wang, H. Ma, P.W.L. Tai, G. Gao // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2021. – Vol. 6(1). – 53.
62. Bussani, R. Persistent SARS-CoV-2 infection in patients seemingly recovered from COVID-19 / R. Bussani, L. Zentilin, R. Correa, A. Colliva, F. Silvestri, S. Zacchigna, C. Collesi, M. Giacca // *The Journal of Pathology*. – 2023. – Vol.259(3). – P. 254-263.
63. Byazrova, M.G. Memory B Cells Induced by Sputnik V Vaccination Produce SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies Upon Ex Vivo Restimulation / M.G. Byazrova, S.V. Kulemzin, E.A. Astakhova, T.N. Belovezhets, G.A. Efimov, A.N. Chikaev, I.O. Kolotygin, A.A. Gorchakov, A.V. Taranin, A.V. Filatov // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – e840707.
64. Cameroni, E. Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 Omicron antigenic shift/ E. Cameroni, J.E. Bowen, L.E. Rosen, C. Saliba, S.K. Zepeda, K.

- Culap, D. Pinto, L.A. VanBlargan, A. De Marco, J. di Iulio, F. Zatta, H. Kaiser, J. Noack, N. Farhat, N. Czudnochowski, C. Havenar-Daughton, K.R. Sprouse, J.R. Dillen, A.E. Powell, A. Chen, C. Maher, L. Yin, D. Sun, L. Soriaga, J. Bassi, C. Silacci-Fregni, C. Gustafsson, N.M. Franko, J. Logue, N.T. Iqbal, I. Mazzitelli, J. Geffner, R. Grifantini, H. Chu, A. Gori, A. Riva, O. Giannini, A. Ceschi, P. Ferrari, P.E. Cippà, A. Franzetti-Pellanda, C. Garzoni, P.J. Halfmann, Y. Kawaoka, C. Hebner, L.A. Purcell, L. Piccoli, M.S. Pizzuto, A.C. Walls, M.S. Diamond, A. Telenti, H.W. Virgin, A. Lanzavecchia, G. Snell, D. Veessler, D. Corti // *Nature*. – 2022. – Vol.602. – P.664–670.
65. Cañete, P.F. COVID-19 makes B cells forget, but T cells remember / P.F. Cañete, C.G. Vinuesa // *Cell*. – 2020. – Vol. 183(1). – P. 13–15.
66. Carabelli, A.M. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness / A.M. Carabelli, T.P. Peacock, L.G. Thorne, W.T. Harvey, J. Hughes; COVID-19 Genomics UK Consortium; S.J. Peacock, W.S. Barclay, T.I. de Silva, G.J. Towers, D.L. Robertson // *Nature Reviews Microbiology*. – 2023. – Vol.21(3). – P. 162-177.
67. Carvajal, J.J. New insights into the pathogenesis of SARS-CoV-2 during and after the COVID-19 pandemic / J.J. Carvajal, V. García-Castillo, S.V. Cuellar, C.P. Campillay-Véliz, C. Salazar-Ardiles, A.M. Avellaneda, C.A. Muñoz, A. Retamal-Díaz, S.M. Bueno, P.A. González, A.M. Kalergis, M.K. Lay // *Frontiers in Immunology*. – 2024. – Vol. 15. – 1363572.
68. Caserta, L.C. White-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) may serve as a wildlife reservoir for nearly extinct SARS-CoV-2 variants of concern/ L.C. Caserta, M. Martins, S.L. Butt, N.A. Hollingshead, L.M. Covalada, S. Ahmed, M.R.R. Everts, K.L. Schuler, D.G. Diel // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2023. – Vol. 120(6). – e2215067120.
69. Chan, K.H. Use of Antibody Avidity Assays for Diagnosis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection /K.H. Chan, K. Sonnenberg, M. Niedrig, S.Y. Lam, C.M. Pang, K.M. Chan, S.K. Ma, W.H. Seto, J.S.M. Peiris // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2007. – Vol. 14(11) – P. 1433–1436.

70. Chang, S.C. Longitudinal analysis of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) coronavirus-specific antibody in SARS patients / S.C. Chang, J.T. Wang, L.M. Huang, Y.C. Chen, C.T. Fang, W.H. Sheng, J.L. Wang, C.J. Yu, P.C. Yang // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2005. – Vol. 12(12). – e1455-7. doi: 10.1128/CDLI.12.12.1455-1457.2005.
71. Channappanavar, R. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology/ R. Channappanavar, S. Perlman // *Seminars in Immunopathology*. – 2017. – Vol.39(5). – P. 529–539.
72. Chan-Yeung, M. SARS: epidemiology /M. Chan-Yeung, R.H. Xu // *Respirology*. – 2003. – Vol. 8. – P. 9-14.
73. Chen, G. Clinical and Immunological Features of Severe and Moderate Coronavirus Disease 2019/ G. Chen, D. Wu, W. Guo, Y. Cao, D. Huang, H. Wang, T. Wang, X. Zhang, H. Chen, H. Yu, X. Zhang, M. Zhang, S. Wu, J. Song, T. Chen, M. Han, S. Li, X. Luo, J. Zhao, Q. Ning // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2020. – Vol. 130(5). – P. 2620–2629.
74. Chen, K. Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA / K. Chen, G. Magri, E.K. Grasset, A. Cerutti // *Nature Reviews of Immunology*. – 2020. – Vol. 20(7). – P. 427-441.
75. Chen, L. RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak / L. Chen, W. Liu, Q. Zhang, K. Xu, G. Ye, W. Wu, Z. Sun, F. Liu, K. Wu, B. Zhong, Y. Mei, W. Zhang, Y. Chen, Y. Li, M. Shi, K. Lan, Y. Liu. // *Emerging Microbes & Infections*. – 2020. – Vol. 9(1). – P. 313-319.
76. Cheon, I.S. Immune signatures underlying post-acute COVID-19 lung sequelae/ I.S. Cheon, C. Li, Y.M. Son, N.P. Goplen, Y. Wu, T. Cassmann, Z. Wang, X. Wei, J. Tang, Y. Li, H. Marlow, S. Hughes, L. Hammel, T.M. Cox, E. Goddery, K. Ayasoufi, D. Weiskopf, J. Boonyaratanakornkit, H. Dong, H. Li, R. Chakraborty, A.J. Johnson, E. Edell, J.J. Taylor, M.H. Kaplan, A. Sette, B.J. Bartholmai, R. Kern, R. Vassallo, J. Sun // *Science Immunology*. – 2021. – Vol. 6(65). – eabk1741.

77. Christgen, S. Inflammasomes and the fine line between defense and disease/ S. Christgen, T. D. Kanneganti // *Current Opinion in Immunology*. – 2020. – Vol. 62. – P. 39–44.
78. Cohen, K.W. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells / K.W. Cohen, S.L. Linderman, Z. Moodie, J. Czartoski, L. Lai, G. Mantus, C. Norwood, L.E. Nyhoff, V.V. Edara, K. Floyd, S.C. De Rosa, H. Ahmed, R. Whaley, S.N. Patel, B. Prigmore, M.P. Lemos, C.W. Davis, S. Furth, J.B. O'Keefe, M.P. Gharpure, S. Gunisetty, K. Stephens, R. Antia, V.I. Zarnitsyna, D.S. Stephens, S. Edupuganti, N. Rouphael, E.J. Anderson, A.K. Mehta, J. Wrammert, M.S. Suthar, R. Ahmed, M.J. McElrath // *Cell Reports Medicine*. – 2021. – Vol. 2(7). – e100354.
79. Collier, A.Y. Characterization of immune responses in fully vaccinated individuals after breakthrough infection with the SARS-CoV-2 delta variant/ A.Y. Collier, C.M. Brown, K. McMahan, J. Yu, J. Liu, C. Jacob-Dolan, A. Chandrashekar, D. Tierney, J.L. Ansel, M. Rowe, D. Sellers, K. Ahmad, R. Aguayo, T. Anioke, S. Gardner, M. Siamatu, L. Bermudez Rivera, M.R. Hacker, L.C. Madoff, D.H. Barouch // *Science Translational Medicine*. – 2022. – Vol. 14(641). – eabn6150.
80. Collier, A.Y. Differential Kinetics of Immune Responses Elicited by Covid-19 Vaccines / A.Y. Collier, J. Yu, K. McMahan, J. Liu, A. Chandrashekar, J.S. Maron, C. Atyeo, D.R. Martinez, J.L. Ansel, R. Aguayo, M. Rowe, C. Jacob-Dolan, D. Sellers, J. Barrett, K. Ahmad, T. Anioke, H. VanWyk, S. Gardner, O. Powers, E.A. Bondzie, H. Wan, R.S. Baric, G. Alter, M.R. Hacker, D.H. Barouch // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 385(21). – P. 2010-2012.
81. Corbett, K.S. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness/ K.S. Corbett, D.K. Edwards, S.R. Leist, O.M. Abiona, S. Boyoglu-Barnum, R.A. Gillespie, S. Himansu, A. Schäfer, C.T. Ziwawo, A.T. DiPiazza, K.H. Dinno, S.M. Elbashir, C.A. Shaw, A. Woods, E.J. Fritch, D.R. Martinez, K.W. Bock, M. Minai, B.M. Nagata, G.B. Hutchinson, K. Wu, C. Henry, K. Bahl, D. Garcia-Dominguez, L. Ma, I. Renzi, W.P. Kong, S.D. Schmidt, L. Wang, Y. Zhang, E. Phung, L.A. Chang, R.J. Loomis, N.E. Altaras, E. Narayanan, M. Metkar, V.

- Presnyak, C. Liu, M.K. Louder, W. Shi, K. Leung, E.S. Yang, A. West, K.L. Gully, L.J. Stevens, N. Wang, D. Wrapp, N.A. Doria-Rose, G. Stewart-Jones, H. Bennett, G.S. Alvarado, M.C. Nason, T.J. Ruckwardt, J.S. McLellan, M.R. Denison, J.D. Chappell, I.N. Moore, K.M. Morabito, J.R. Mascola, R.S. Baric, A. Carfi, B.S. Graham // *Nature*. – 2020. – Vol. 586(7830). – P. 567–571.
82. Correa, V.A. Modified ELISA for antibody avidity evaluation: The need for standardization / V.A. Correa, T.S. Rodrigues, A.I. Portilho, G. Trzewikoswki de Lima, E. De Gaspari // *Biomedical Journal*. – 2021. – Vol. 44(4). – P. 433-438.
83. Costigan, D. A pro-inflammatory gut mucosal cytokine response is associated with mild COVID-19 disease and superior induction of serum antibodies/ D. Costigan, J. Fenn, S. Yen, N. Ilott, S. Bullers, J. Hale, W. Greenhalf, E. Conibear, A. Koycheva, K. Madon, I. Jahan, M. Huang, A. Badhan, E. Parker, C. Rosadas, K. Jones, M. McClure, R. Tedder, G. Taylor, K.J. Baillie, M.G. Semple, P.J.M. Openshaw, C. Pearson, J. Johnson; INSTINCT Study Group; ISARIC4C investigators; A. Lalvani, E.E. Thornton // *Mucosal Immunology*. – 2024. – Vol. 17(1). – P. 111-123.
84. Crotty, S. Hybrid immunity / S. Crotty// *Science*. – 2021. – Vol. 372(6549). – P. 1392-1393.
85. Crotty, S. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination / S. Crotty, P. Felgner, H. Davies, J. Glidewell, L. Villarreal, R. Ahmed // *The Journal of Immunology*. – 2003. – Vol. 171(10). – P. 4969-4973.
86. Dan, J.M. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection / J.M. Dan, J. Mateus, Y. Kato, K.M. Hastie, E.D. Yu, C.E. Faliti, A. Grifoni, S.I. Ramirez, S. Haupt, A. Frazier, C. Nakao, V. Rayaprolu, S.A. Rawlings, B. Peters, F. Krammer, V. Simon, E.O. Saphire, D.M. Smith, D. Weiskopf, A. Sette, S. Crotty // *Science*. – 2021. – Vol. 371(6529). – eabf4063.
87. Dashdorj, N.J. Molecular and Serologic Investigation of the 2021 COVID-19 Case Surge Among Vaccine Recipients in Mongolia / N.J. Dashdorj, N.D. Dashdorj, M. Mishra, L. Danzig, T. Briese, W.I. Lipkin, N. Mishra // *JAMA Network Open*. – 2022. – Vol. 5(2). – e2148415.

88. Dashdorj, N.J. Direct comparison of antibody responses to four SARS-CoV-2 vaccines in Mongolia / N.J. Dashdorj, O.F. Wirz, K. Röltgen, E. Haraguchi, A.S. Buzzanco 3rd, M. Sibai, H. Wang, J.A. Miller, D. Solis, M.K. Sahoo, P.S. Arunachalam, A.S. Lee, M.M. Shah, J. Liu, S. Byambabaatar, P. Bat-Ulzii, A. Enkhbat, E. Batbold, D. Zulkhuu, B. Ochirsum, T. Khurelsukh, G. Dalantai, N. Burged, U. Baatarsuren, N. Ariungerel, O. Oidovsambuu, A.S. Bungert, Z. Genden, D. Yagaanbuyant, A. Mordorj, B. Pulendran, S. Chinthrajah, K.C. Nadeau, T. Jardetzky, J.L. Wilbur, J.N. Wohlstadter, G.B. Sigal, B.A. Pinsky, S.D. Boyd, N.D. Dashdorj // *Cell Host Microbe*. – 2021. – Vol. 29(12). – P. 1738-1743.e4.
89. de Groot, R.J. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group /R.J. de Groot, S.C. Baker, R.S. Baric, C.S. Brown, C. Drosten, L. Enjuanes, R.A. Fouchier, M. Galiano, A.E. Gorbalenya, Z.A. Memish, S. Perlman, L.L. Poon, E.J. Snijder, G.M. Stephens, P.C. Woo, A.M. Zaki, M. Zambon, J. Ziebuhr. // *Journal of Virology*. – 2013. – Vol. 87(14). – P. 7790–7792.
90. de Taeye, S.W. FcγR Binding and ADCC Activity of Human IgG Allotypes/ S.W. de Taeye, A.E.H. Benthage, M.M. Mebius, J.I. Meesters, S. Lissenberg-Thunnissen, D. Falck, T. Sénard, N. Salehi, M. Wuhrer, J. Schuurman, A.F. Labrijn, T. Rispens, G. Vidarsson // *Frontiers in Immunology*. – 2020. –Vol. 11. – 740.
91. Del Valle, D.M. An Inflammatory Cytokine Signature Predicts COVID-19 Severity and Survival/ DM Del Valle, S Kim-Schulze, HH Huang, ND Beckmann, S Nirenberg, B Wang, Y.Yonit Lavin, T.H. Swartz, D Madduri, A. Aryeh Stock, T. U. Marron, H. Xie, M. Patel, K. Tuballes, O. Van Eekelen, A. Rahman, P. Kovatch, J.A. Aberg, E. Schadt, S. Jagannath, M. Madhu Mazumdar, A.W. Charney, A. Firpo-Betancourt, D.R. Mendu, J. Jhang, D. Reich, K. Sigel, C. Cordon-Cardo, M. Feldmann, S. Parekh, M. Merad, S. Gnjatic // *Nature Medicine*. – 2020. – Vol. 26(10). – P. 1636–1643.
92. Denison, M.R. Coronaviruses. An RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity / M.R. Denison, R.L. Graham, E.F. Donaldson, L.D. Eckerle, R.S. Baric // *RNA Biology*. – 2011. – Vol. 8(2). – P. 270-279

93. Diamond, M. S. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2/ M.S. Diamond, T.-D. Kanneganti // *Nature Immunology*. – 2022. – Vol. 23. – P. 165-176.
94. Dolton, G. Emergence of immune escape at dominant SARS-CoV-2 killer T cell epitope / G. Dolton, C. Rius, M.S. Hasan, A. Wall, B. Szomolay, E. Behiry, T. Whalley, J. Southgate, A. Fuller; COVID-19 Genomics UK (COG-UK) consortium; T. Morin, K. Topley, L.R. Tan, P.J.R. Goulder, O.B. Spiller, P.J.. Rizkallah, L.C. Jones, T.R. Connor, A.K. Sewell// *Cell*. – 2022. – Vol. 185(16). – 2936-2951.e19.
95. Dropulic, L.K. Overview of Infections in the Immunocompromised Host / L.K. Dropulic, H.M. Lederman // *Microbiology Spectrum*. – 2016. – Vol. 4(4).
96. Earle, K.A. Evidence for antibody as a protective correlate for COVID-19 vaccines / K.A. Earle, D.M. Ambrosino, A. Fiore-Gartland, D. Goldblatt, P.B. Gilbert, G.R. Siber, P. Dull, S.A. Plotkin // *Vaccine*. – 2021. – Vol. 39(32). – P. 4423-4428.
97. Ellis, S. Salivary IgA and vimentin differentiate in vitro SARS-CoV-2 infection: A study of 290 convalescent COVID-19 patients / S. Ellis, R. Way, M. Nel, A. Burleigh, I. Doykov, J. Kembou-Ringert, M. Woodall, T. Masonou, K.M. Case, A.T. Ortez, T.D. McHugh, A. Casal, L.E. McCoy, S. Murdan, R.E. Hynds, K.C. Gilmour, L. Grandjean, M. Cortina-Borja, W.E. Heywood, K. Mills, C.M. Smith // *Mucosal Immunology*. – 2024. – Vol. 17(1). – P. 124-136.
98. Elsner, R.A. Germinal Center and Extrafollicular B Cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity / R.A. Elsner, M.J. Shlomchik // *Immunity*. – 2020. – Vol. 53(6). – P. 1136-1150.
99. Engelmann, B. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity/ B. Engelmann, S. Massberg // *Nature Reviews of Immunology*. – 2013. – Vol.13. – P. 34–45.
100. Falsey, A.R. SARS-CoV-2 Neutralization with BNT162b2 Vaccine Dose 3 / A.R. Falsey, R.W. Frenck Jr, E.E. Walsh, N. Kitchin, J. Absalon, A. Gurtman, S. Lockhart, R. Bailey, K.A. Swanson, X. Xu, K. Koury, W. Kalina, D. Cooper, J. Zou, X. Xie, H. Xia, Ö. Türeci, E. Lagkadinou, K.R. Tompkins, P.Y. Shi, K.U.

- Jansen, U. Şahin, P.R. Dormitzer, W.C. Gruber // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 385(17). – P. 1627-1629.
101. Farzi, R. The role of antigen-presenting cells in the pathogenesis of COVID-19 / R. Farzi, P.S. Aghbash, N. Eslami, A. Azadi, A. Shamekh, N. Hemmat, T. Entezari-Maleki, H.B. Baghi // *Pathology, research and practice*. – 2022. – Vol. 233. – e153848.
102. Feng, C. Protective humoral and cellular immune responses to SARS-CoV-2 persist up to 1 year after recovery / C. Feng, J. Shi, Q. Fan, Y. Wang, H. Huang, F. Chen, G. Tang, Y. Li, P. Li, J. Li, J. Cui, L. Guo, S. Chen, M. Jiang, L. Feng, L. Chen, C. Lei, C. Ke, X. Deng, F. Hu, X. Tang, F. Li // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12(1). – 4984.
103. Ferrante, A. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens / A. Ferrante, L.J. Beard, R.G. Feldman // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 1990. – Vol. 9(8 Suppl). – P. 16-24.
104. Files, J.K. Sustained cellular immune dysregulation in individuals recovering from SARS-CoV-2 infection / J.K. Files, S. Boppana, M.D. Perez, S. Sarkar, K.E. Lowman, K. Qin, S. Sterrett, E. Carlin, A. Bansal, S. Sabbaj, D.M. Long, O. Kutsch, J. Kobie, P.A. Goepfert, N. Erdmann // *Journal of Clinical Investigations*. – 2021. – Vol. 131(1). – e140491.
105. Flaxman, A. Reactogenicity and immunogenicity after a late second dose or a third dose of ChAdOx1 nCoV-19 in the UK: a substudy of two randomised controlled trials (COV001 and COV002) / A. Flaxman, N.G. Marchevsky, D. Jenkin, J. Aboagye, P.K. Aley, B. Angus, S. Belij-Rammerstorfer, S. Bibi, M. Bittaye, F. Cappuccini, P. Cicconi, E.A. Clutterbuck, S. Davies, W. Dejnirattisai, C. Dold, K.J. Ewer, P.M. Folegatti, J. Fowler, A.V.S. Hill, S. Kerridge, A.M. Minassian, J. Mongkolsapaya, Y.F. Mujadidi, E. Plested, M.N. Ramasamy, H. Robinson, H. Sanders, E. Sheehan, H. Smit, M.D. Snape, R. Song, D. Woods, G. Screaton, S.C. Gilbert, M. Voysey, A.J. Pollard, T. Lambe; Oxford COVID Vaccine Trial group // *Lancet*. – 2021. – Vol. 398(10304). – P. 981-990.

106. Folegatti, P.M. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: A preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial / P.M. Folegatti, K.J. Ewer, P.K. Aley, B. Angus, S. Becker, S. Belij-Rammerstorfer, D. Bellamy, S. Bibi, M. Bittaye, E.A. Clutterbuck, C. Dold, S.N. Faust, A. Finn, A.L. Flaxman, B. Hallis, P. Heath, D. Jenkin, R. Lazarus, R. Makinson, A.M. Minassian, K.M. Pollock, M. Ramasamy, H. Robinson, M. Snape, R. Tarrant, M. Voysey, C. Green, A.D. Douglas, A.V.S. Hill, T. Lambe, S.C. Gilbert, A.J. Pollard; Oxford COVID Vaccine Trial Group // *Lancet*. – 2020. – Vol. 396(10249). – P. 467–478.
107. Forman, R. COVID-19 vaccine challenges: what have we learned so far and what remains to be done? / R. Forman, S. Shah, P. Jeurissen, M. Jit, E. Mossialos // *Health Policy*. – 2021. – Vol. 125(5). – P. 553–567.
108. Gao, Y. Ancestral SARS-CoV-2-specific T cells cross-recognize the Omicron variant / Y. Gao, C. Cai, A. Grifoni, T.R. Müller, J. Niessl, A. Olofsson, M. Humbert, L. Hansson, A. Österborg, P. Bergman, P. Chen, A. Olsson, J.K. Sandberg, D. Weiskopf, D.A. Price, H.G. Ljunggren, A.C. Karlsson, A. Sette, S. Aleman, M. Buggert // *Nature Medicine*. – 2022. – Vol. 28(3). – P. 472-476.
109. Gazit, S. SARS-CoV-2 natural acquired immunity vs. vaccine-induced immunity, reinfections versus breakthrough infections: a retrospective cohort study / S. Gazit, R. Shlezinger, G. Perez, R. Lotan, A. Peretz, A. Ben-Tov, E. Herzel, H. Alapi, D. Cohen, K. Muhsen, G. Chodick, T. Patalon // *Clinical Infectious Diseases*. – 2022. – Vol. 75(1). – e545-e551.
110. Gentile, A. Long-term antibody response following SPUTNIK V primary vaccination in healthcare workers with and without history of SARS-CoV-2 infection: Prospective cohort study from a hospital in Argentina / A. Gentile, V.E. Castellano, A. Pacchiotti, N. Weinberger, S. Diana Menéndez, M. Del Pino, G. Carciofi, P. Lamy, A.S. Mistchenko // *Vaccine X*. – 2022. –11:100187.
111. Gilbert, P.B. Immune correlates analysis of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine efficacy clinical trial / P.B. Gilbert, D.C. Montefiori, A.B. McDermott, Y. Fong, D. Benkeser, W. Deng, H. Zhou, C.R. Houchens, K. Martins, L. Jayashankar, F.

- Castellino, B. Flach, B.C. Lin, S. O'Connell, C. McDanal, A. Eaton, M. Sarzotti-Kelsoe, Y. Lu, C. Yu, B. Borate, L.W.P. van der Laan, N.S. Hejazi, C. Huynh, J. Miller, H.M. El Sahly, L.R. Baden, M. Baron, L. De La Cruz, C. Gay, S. Kalams, C.F. Kelley, M.P. Andrasik, J.G. Kublin, L. Corey, K.M. Neuzil, L.N. Carpp, R. Pajon, D. Follmann, R.O. Donis, R.A. Koup; Immune Assays Team§; Moderna, Inc. Team§; Coronavirus Vaccine Prevention Network (CoVPN)/Coronavirus Efficacy (COVE) Team§; United States Government (USG)/CoVPN Biostatistics Team§ // *Science*. – 2022. – Vol. 375(6576). – P. 43-50.
112. Goldberg, Y. Waning immunity after the BNT162b2 vaccine in Israel / Y. Goldberg, M. Mandel, Y.M. Bar-On, O. Bodenheimer, L. Freedman, E.J. Haas, R. Milo, S. Alroy-Preis, N. Ash, A. Huppert // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol.385 (24). – e85.
113. Gorse, G.J. Prevalence of antibodies to four human coronaviruses is lower in nasal secretions than in serum /G.J. Gorse, G.B. Patel, J.N. Vitale, T.Z. O'Connor // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2010. – Vol. 17(12). – P. 1875-1880.
114. Goyins, K.A. Isotyping and quantitation of the humoral immune response to SARS-CoV-2 / K.A. Goyins, J.J. Yu, S.B. Papp, R. Beddard, A.K. Murthy, J.P. Chambers, B.P. Arulanandam // *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*. – 2022. – Vol. 247(12). – P. 1055-1060.
115. Graham, B.S. Rapid COVID-19 vaccine development. Finding the fastest pathway to vaccine availability includes the avoidance of safety pitfalls / B.S. Graham // *Science*. – 2020. – Vol. 368(6494). – P. 945-946,
116. Guo, L. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19) / L. Guo, L. Ren, S. Yang, M. Xiao, D. Chang, F. Yang, C.S. Dela Cruz, Y. Wang, C. Wu, Y. Xiao, L. Zhang, L. Han, S. Dang, Y. Xu, Q.W. Yang, S.Y. Xu, H.D. Zhu, Y.C. Xu, Q. Jin, L. Sharma, L. Wang, J. Wang // *Clinical Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 71(15). – P. 778-785.
117. Guo, L. Durability and cross-reactive immune memory to SARS-CoV-2 in individuals 2 years after recovery from COVID-19: a longitudinal cohort study/ L. Guo, Q. Zhang, X. Gu, L. Ren, T. Huang, Y. Li, H. Zhang, Y. Liu, J. Zhong, X.

- Wang, L. Chen, Y. Zhang, D. Li, M. Fang, L. Xu, H. Li, Z. Wang, H. Li, T. Bai, W. Liu, Y. Peng, T. Dong, B. Cao, J. Wang // *Lancet Microbe*. – 2024. – Vol. 5. – e24–33.
118. Gupta, S. SARS-CoV-2-Specific and Functional Cytotoxic CD8 Cells in Primary Antibody Deficiency: Natural Infection and Response to Vaccine / S. Gupta, S. Agrawal, A. Sandoval, H. Su, M. Tran, Y. Demirdag // *Journal of Clinical Immunology*. – 2022. – Vol. 42(5). – P. 914-922.
119. Gushchin, V.A. Neutralizing Activity of Sera From Sputnik V-Vaccinated People Against Variants of Concern (VOC: B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.617.3) and Moscow Endemic SARS-CoV-2 Variants / V.A. Gushchin, I.V. Dolzhikova, A.M. Shchetinin, A.S. Odintsova, A.E. Siniavin, M.A. Nikiforova, A.A. Pochtovyi, E.V. Shidlovskaya, N.A. Kuznetsova, O.A. Burgasova, L.V. Kolobukhina, A.A. Iliukhina, A.V. Kovyrshina, A.G. Botikov, A.V. Kuzina, D.M. Grousova, A.I. Tukhvatulin, D.V. Shcheblyakov, O.V. Zubkova, O.V. Karpova, O.L. Voronina, N.N. Ryzhova, E.I. Aksenova, M.S. Kunda, D.A. Lioznov, D.M. Danilenko, A.B. Komissarov, A.P. Tkachuck, D.Y. Logunov, A.L. Gintsburg // *Vaccines*. –2021. – Vol. 9(7). – P. 779.
120. Hadjadj, J. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients/ J. Hadjadj, N. Yatim, L. Barnabei, A. Corneau, J. Boussier, N. Smith, H. Péré, B. Charbit, V. Bondet, C. Chenevier-Gobeaux, P. Breillat, N. Carlier, R. Gauzit, C. Morbieu, F. Pène, N. Marin, N. Roche, T.A. Szwebel, S.H. Merklings, J.M. Treluyer, D. Veyer, L. Mouthon, C. Blanc, P.L. Tharaux, F. Rozenberg, A. Fischer, D. Duffy, F. Rieux-Laucat, S. Kernéis, B. Terrier // *Science*. – 2020. – Vol. 369(6504). – P. 718–724.
121. Hajjar, SA. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): A Perpetual Challenge /S.A. Hajjar, Z.A. Memish, K. McIntosh // *Annals of Saudi Medicine*. – 2013. – Vol.33(5). – P. 427–436.
122. Han, J. Distinct durability of IgM/IgG antibody responses in COVID-19 patients with differing severity / J. Han, N. Zhang, D. Chen, Y. Gong, G. Li, Y. Kong, L. Pu, C. Chen, J. Liu , Q. Wang, J. Zhang, X. Zhao, J. Du, K. Han, C. Song , L. Wang, M.

- Hua , Y. Hao, R. Song, Y. Song, F. Yu, S. Yang, H. Xiong, W. Zhang, G.F. Gao , F. Zhang, A. Li, H. Zeng, Y. Bi // *Science China Life Sciences*. – 2022. – Vol. 65(1). – P. 223-226.
123. Hazell, S.L. Clinical utility of avidity assays / S.L. Hazell // *Expert Opinion on Medical Diagnostics*. – 2007. – Vol. 1(4) – P. 511-519.
124. Hedman, K. Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases / K. Hedman, M. Lappalainen, M. Söderlund, L. Hedman // *Reviews in Medical Microbiology*. – 1993. – Vol. 4(3). – P. 123-129.
125. Hu, B. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19/ B. Hu, H. Guo, P. Zhou, Z.L. Shi // *Nature Reviews Microbiology*. – 2021. – Vol. 19. – P. 141-154.
126. Hu, J. Modulation of SAP dependent T: B cell interactions as a strategy to improve vaccination/ J. Hu, C. Havenar-Daughton, S. Crotty // *Current Opinion in Virology*. – 2013. – Vol. 3(3). – P. 363-70.
127. Huan, X. Research progress of spike protein mutation of SARS-CoV-2 mutant strain and antibody development/ X. Huan, J. Zhan, H. Gao // *Frontiers in Immunology*. – 2024. – Vol.15. – 1407149.
128. Huang, C. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China /C. Huang, Y. Wang, X. Li, L. Ren, J. Zhao, Y. Hu, L. Zhang, G. Fan, J. Xu, X. Gu, Z. Cheng, T. Yu, J. Xia, Y. Wei, W. Wu, X. Xie, W. Yin, H. Li, M. Liu, Y. Xiao, H. Gao, L. Guo, J. Xie, G. Wang, R. Jiang, Z. Gao, Q. Jin, J. Wang, B. Cao // *Lancet*. – 2020. – Vol. 3951(10223). – P. 497–506
129. Huijbers, M.G. IgG4-mediated autoimmune diseases: A niche of antibody-mediated disorders/ M.G. Huijbers, J.J. Plomp, S.M. van der Maarel, J.J. Verschuuren // *Annals of New York Academy of Sciences*. –2018. – Vol. 1413. – P. 92–103.
130. Ikegame, S. Neutralizing activity of Sputnik V vaccine sera against SARS-CoV-2 variants / S. Ikegame, M.N.A. Siddiquey, C.T. Hung, G. Haas, L. Brambilla, K.Y. Oguntuyo, S. Kowdle, H.P. Chiu, C.S. Stevens, A.E. Vilardo, A. Edelstein, C. Perandones, J.P. Kamil, B. Lee // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12(1). – e4598.

131. Isho, B. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients / B. Isho, K.T. Abe, M. Zuo, A.J. Jamal, B. Rathod, J.H. Wang, Z. Li, G. Chao, O.L. Rojas, Y.M. Bang, A. Pu, N. Christie-Holmes, C. Gervais, D. Ceccarelli, P. Samavarchi-Tehrani, F. Guvenc, P. Budykowski, A. Li, A. Paterson, F.Y. Yue, L.M. Marin, L. Caldwell, J.L. Wrana, K. Colwill, F. Sicheri, S. Mubareka, S.D. Gray-Owen, S.J. Drews, W.L. Siqueira, M. Barrios-Rodiles, M. Ostrowski, J.M. Rini, Y. Durocher, A.J. McGeer, J.L. Gommerman, A.C. Gingras // *Science Immunology*. – 2020. – Vol. 5(52). – eabe5511.
132. Israel, A. Large-Scale Study of Antibody Titer Decay following BNT162b2 mRNA Vaccine or SARS-CoV-2 Infection/ A. Israel, Y. Shenhar, I. Green, E. Merzon, A. Golan-Cohen, A.A. Schäffer, E. Ruppin, S. Vinker, E. Magen // *Vaccines (Basel)*. – 2021. – Vol. 10(1). – 64.
133. Israelow, B. Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling/ B. Israelow, E. Song, T. Mao, P. Lu, A. Meir, F. Liu, M.M. Alfajaro, J. Wei, H. Dong, R.J. Homer, A. Ring, C.B. Wilen, A. Iwasaki // *Journal of Experimental Medicine*. – 2020. – Vol. 217(12). – e20201241.
134. Ivashkiv, L.B. Regulation of type I interferon responses/ L.B. Ivashkiv, L.T. Donlin // *Nature Reviews of Immunology*. – 2014. – Vol. 14. – P. 36–49.
135. Jackson, L.A. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report / L.A. Jackson, E.J. Anderson, N.G. Rouphael, P.C. Roberts, M. Makhene, R.N. Coler, M.P. McCullough, J.D. Chappell, M.R. Denison, L.J. Stevens, A.J. Pruijssers, A. McDermott, B. Flach, N.A. Doria-Rose, K.S. Corbett, K.M. Morabito, S. O'Dell, S.D. Schmidt, P.A. 2nd Swanson, M. Padilla, J.R. Mascola, K.M. Neuzil, H. Bennett, W. Sun, E. Peters, M. Makowski, J. Albert, K. Cross, W. Buchanan, R. Pikaart-Tautges, J.E. Ledgerwood, B.S. Graham, J.H. Beigel; mRNA-1273 Study Group // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383(20). – P. 1920-1931.
136. Juno, J.A. Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19 / J.A. Juno, H.X. Tan, W.S. Lee, A. Reynaldi, H.G. Kelly,

- K. Wragg, R. Esterbauer, H.E. Kent, C.J. Batten, F.L. Mordant, N.A. Gherardin, P. Pymm, M.H. Dietrich, N.E. Scott, W.H. Tham, D.I. Godfrey, K. Subbarao, M.P. Davenport, S.J. Kent, A.K. Wheatley // *Nature Medicine*. – 2020. – Vol. 26(9). – P. 1428-1434.
137. Kaneko, N. Loss of Bcl-6-expressing T follicular helper cells and germinal centers in COVID-19 / N. Kaneko, H.H. Kuo, J. Boucau, J.R. Farmer, H. Allard-Chamard, V.S. Mahajan, A. Piechocka-Trocha, K. Lefteri, M. Osborn, J. Bals, Y.C. Bartsch, N. Bonheur, T.M. Caradonna, J. Chevalier, F. Chowdhury, T.J. Diefenbach, K. Einkauf, J. Fallon, J. Feldman, K.K. Finn, P. Garcia-Broncano, C.A. Hartana, B.M. Hauser, C. Jiang, P. Kaplonek, M. Karpell, E.C. Koscher, X. Lian, H. Liu, J. Liu, N.L. Ly, A.R. Michell, Y. Rassadkina, K. Seiger, L. Sessa, S. Shin, N. Singh, W. Sun, X. Sun, H.J. Ticheli, M.T. Waring, A.L. Zhu, G. Alter, J.Z. Li, D. Lingwood, A.G. Schmidt, M. Lichterfeld, B.D. Walker, X.G. Yu, R.F. Jr. Padera, S. Pillai; Massachusetts Consortium on Pathogen Readiness Specimen Working Group // *Cell*. – 2020. – Vol. 183(1). – P. 143-157.e13. doi:10.1016/j.cell.2020.08.025
138. Kanneganti, T. D. Intracellular innate immune receptors: life inside the cell/ T. D. Kanneganti // *Immunological Reviews*. – 2020. – Vol. 297(1). – P. 5–12.
139. Karki, R. Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes/ R. Karki, B.R. Sharma, S. Tuladhar, E.P. Williams, L. Zalduondo, P. Samir, M. Zheng, B. Sundaram, B. Banoth, R.K.S. Malireddi, P. Schreiner, G. Neale, P. Vogel, R. Webby, C.B. Jonsson, T.D. Kanneganti // *Cell*. – 2021. – Vol. 184(1). – P. 149–168. e17. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.025.
140. Kasuga, Y. Innate immune sensing of coronavirus and viral evasion strategies/ Y. Kasuga, B. Zhu, K.J. Jang, J.S. Yoo // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2021. – Vol. 53. – P. 723–736.
141. Keehner, J. SARS-CoV-2 Infection after Vaccination in Health Care Workers in California/ J. Keehner, L.E. Horton, M.A. Pfeffer, C.A. Longhurst, R.T. Schooley, J.S. Currier, S.R. Abeles, F.J. Torriani // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 384(18). – P.1774-1775.

142. Keeton, R. Prior infection with SARS-CoV-2 boosts and broadens Ad26.COVS immunogenicity in a variant-dependent manner / R. Keeton, S. I. Richardson, T. Moyo-Gwete, T. Hermanus, M. B. Tincho, N. Benede, N. P. Manamela, R. Baguma, Z. Makhado, A. Ngomti, T. Motlou, M. Mennen, L. Chinhoyi, S. Skelem, H. Maboreke, D. Doolabh, A. Iranzadeh, A. D. Otter, T. Brooks, M. Noursadeghi, J. C. Moon, A. Grifoni, D. Weiskopf, A. Sette, J. Blackburn, N.-Y. Hsiao, C. Williamson, C. Riou, A. Goga, N. Garrett, L.-G. Bekker, G. Gray, N. A. B. Ntusi, P. L. Moore, W. A. Burgers. *Cell Host Microbe*. – 2021. – Vol. 29. – P.1611–1619.e5
143. Keeton, R. T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron / R. Keeton, M.B. Tincho, A. Ngomti, R. Baguma, N. Benede, A. Suzuki, K. Khan, S. Cele, M. Bernstein, F. Karim, S.V. Madzorera, T. Moyo-Gwete, M. Mennen, S. Skelem, M. Adriaanse, D. Mutithu, O. Aremu, C. Stek, E. du Bruyn, M.A. Van Der Mescht, Z. de Beer, T.R. de Villiers, A. Bodenstein, G. van den Berg, A. Mendes, A. Strydom, M. Venter, J. Giandhari, Y. Naidoo, S. Pillay, H. Tegally, A. Grifoni, D. Weiskopf, A. Sette, R.J. Wilkinson, T. de Oliveira, L.G. Bekker, G. Gray, V. Ueckermann, T. Rossouw, M.T. Boswell, J.N. Bhiman, P.L. Moore, A. Sigal, N.A.B. Ntusi, W.A. Burgers, C. Riou // *Nature*. – 2022. – Vol. 603(7901). – P. 488–492.
144. Kemp, S.A. SARS-CoV-2 evolution during treatment of chronic infection/ S.A. Kemp, D.A. Collier, R.P. Datir, I.A.T.M. Ferreira, S. Gayed, A. Jahun, M. Hosmillo, C. Rees-Spear, P. Mlcochova, I.U. Lumb, D.J. Roberts, A. Chandra, N. Temperton; CITIID-NIHR BioResource COVID-19 Collaboration; COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium; K. Sharrocks, E. Blane, Y. Modis, K.E. Leigh, J.A.G. Briggs, M.J. van Gils, K.G.C. Smith, J.R. Bradley, C. Smith, R. Doffinger, L. Ceron-Gutierrez, G. Barcenas-Morales, D.D. Pollock, R.A. Goldstein, A. Smielewska, J.P. Skittrall, T. Gouliouris, I.G. Goodfellow, E. Gkrania-Klotsas, C.J.R. Illingworth, L.E. McCoy, R.K. Gupta // *Nature*. – 2021. – Vol. 592. – P. 277–282.
145. Keshavarz, M. Immune Response to the Mumps Virus in Iranian Unvaccinated Young Adults / M. Keshavarz, A. Shafiee, M.H. Nicknam, P. Khosravani, A.

- Yousefi, M. Izad // *Japan Journal of Infectious Diseases*. – 2017. – Vol. 70(2). – P. 127-131.
146. Khoury, D.S. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection / D.S. Khoury, D. Cromer, A. Reynaldi, T.E. Schlub, A.K. Wheatley, J.A. Juno, K. Subbarao, S.J. Kent, J.A. Triccas, M.P. Davenport // *Nature Medicine*. – 2021. – Vol. 27(7). – P. 1205-1211.
147. Kim, Y. Kinetics of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 infection according to sex, age, and disease severity / Y. Kim, J.Y. Bae, K. Kwon, H.H. Chang, W.K. Lee, H. Park, J. Kim, I. Choi, M.S. Park, S.W. Kim // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12(1). – e13491.
148. Kisby, T. Reasons for success and lessons learnt from nanoscale vaccines against COVID-19 / T. Kisby, A. Yilmazer, K. Kostarelos // *Nature Nanotechnology*. – 2021. – Vol. 16(8). – P. 843-850.
149. Kistler, K.E. An atlas of continuous adaptive evolution in endemic human viruses/ K.E. Kistler, T. Bedford // *Cell Host & Microbe*. – 2023. – Vol.3(11). – P.1898-1909.e3.
150. Kleymenov, D.A. A Deep Look Into COVID-19 Severity Through Dynamic Changes in Blood Cytokine Levels/ D.A. Kleymenov, E.N. Bykonina, L.I. Popova, E.P. Mazunina, V.A. Gushchin, L.V. Kolobukhina, O.A. Burgasova, I.S. Kruzhkova, N.A. Kuznetsova, E.V. Shidlovskaya, E.V. Divisenko, A.A. Pochtovyi, V.V. Bacalin, S.V. Smetanina, A.P. Tkachuk, D.Y. Logunov, A.L. Gintsburg // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – e771609.
151. Korobova, Z.R. Changes in Anti-SARS-CoV-2 IgG Subclasses over Time and in Association with Disease Severity / Z.R. Korobova, E.V. Zueva, N.A. Arsentieva, O.K. Batsunov, N.E. Liubimova, I.V. Khamitova, R.N. Kuznetsova, A.A. Rubinstein, T.V. Savin, O.V. Stanevich, A.N. Kulikov, D.E. Pevtsov, A.A. Totolian // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14(5). – e941.
152. Kreppel, F. Capsid and Genome Modification Strategies to Reduce the Immunogenicity of Adenoviral Vectors/ F. Kreppel, C. Hagedorn. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22(5). – e2417.

153. Kristiansen, P.A. WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin / P.A. Kristiansen, M. Page, V. Bernasconi, G. Mattiuzzo, P. Dull, K. Makar, S. Plotkin, I. Knezevic // *Lancet*. – 2021. – Vol. 397(10282). – P. 1347-1348.
154. Lam, J.H. B Cell Activation and Response Regulation During Viral Infections / J.H. Lam, F.L. Smith, N. Baumgarth // *Viral Immunology*. – 2020. – Vol. 33(4). – P. 294-306.
155. Lau, Y.L. Role of dendritic cells in SARS coronavirus infection/ Y.L. Lau, J.S. Peiris, H.K. Law // *Hong Kong Medical Journal*. – 2012. – Vol. 18(3). – P. 28–30.
156. Le Bert, N. Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection / N. Le Bert, H.E. Clapham, A.T. Tan, W.N. Chia, C.Y.L. Tham, J.M. Lim, K. Kunasegaran, L.W.L. Tan, C.A. Dutertre, N. Shankar, J.M.E. Lim, L.J. Sun, M. Zahari, Z.M. Tun, V. Kumar, B.L. Lim, S.H. Lim, A. Chia, Y.J. Tan, P.A. Tambyah, S. Kalimuddin, D. Lye, J.G.H. Low, L.F. Wang, W.Y. Wan, L.Y. Hsu, A. Bertoletti, C.C. Tam // *Journal of Experimental Medicine*. – 2021. – Vol. 218(5). – e20202617.
157. Le Bert, N. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls / N. Le Bert, A.T. Tan, K. Kunasegaran, C.Y.L. Tham, M. Hafezi, A. Chia, M.H.Y. Chng, M. Lin, N. Tan, M. Linster, W.N. Chia, M.I. Chen, L.F. Wang, E.E. Ooi, S. Kalimuddin, P.A. Tambyah, J.G. Low, Y.J. Tan, A. Bertoletti // *Nature*. – 2020. – Vol. 584(7821). – P. 457-462.
158. Le Gars, M. Immunogenicity and efficacy of Ad26.COV2.S: An adenoviral vector-based COVID-19 vaccine / M. Le Gars, J. Hendriks, J. Sadoff, M. Ryser, F. Struyf, M. Douoguih, H. Schuitemaker // *Immunological Reviews*. – 2022. – 11:10.1111/imr.13088.
159. Lei, Q. Antibody dynamics to SARS-CoV-2 in asymptomatic COVID-19 infections / Q. Lei, Y Li, H.Y. Hou, F. Wang, Z.Q. Ouyang, Y. Zhang, D.Y. Lai, J.L. Banga Ndzouboukou, Z.W. Xu, B. Zhang, H. Chen, J.B. Xue, X.S. Lin, Y.X. Zheng, Z.J. Yao, X.N. Wang, C.Z. Yu, H.W. Jiang, H.N. Zhang, H. Qi, S.J. Guo,

- S.H. Huang, Z.Y. Sun, S.C. Tao, X.L. Fan // *Allergy*. – 2021. – Vol. 76(2). – P. 551-561.
160. Letko, M. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses /M. Letko, A. Marzi, V. Munster // *Nature Microbiology*. – 2020. – Vol. 5. – P. 562–569.
161. Levin, E.G. Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months / E.G. Levin, Y. Lustig, C. Cohen, R. Fluss, V. Indenbaum, S. Amit, R. Doolman, K. Asraf, E. Mendelson, A. Ziv, C. Rubin, L. Freedman, Y. Kreiss, G. Regev-Yochay// *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 385(24). – e84.
162. Li, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins / F. Li // *Annual Review of Virology*. – 2016. – Vol. 3. – P. 237-261.
163. Li, G.M. Pandemic H1N1 influenza vaccine induces a recall response in humans that favors broadly cross-reactive memory B cells / G.M. Li, C. Chiu, J. Wrammert, M. McCausland, S.F. Andrews, N.Y. Zheng, J.H. Lee, M. Huang, X. Qu, S. Edupuganti, M. Mulligan, S.R. Das, J.W. Yewdell, A.K. Mehta, P.C. Wilson, R. Ahmed // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2012. – Vol. 109(23). – P. 9047-9052.
164. Li, Z. SARS-CoV-2-specific T cell responses wane profoundly in convalescent individuals 10 months after primary infection / Z. Li, T. Xiang, B. Liang, J. Liu, H. Deng, X. Yang, H. Wang, X. Feng, G. Zelinsky, M. Trilling, K. Sutter, M. Lu, U. Dittmer, B. Wang, D. Yang, X. Zheng, J. Liu // *Virologica Sinica*. – 2023. – Vol. 38(4). – P. 606-619.
165. Liang, Z. Adjuvants for Coronavirus Vaccines / Z. Liang, H. Zhu, X. Wang, B. Jing, Z. Li, X. Xia, H. Sun, Y. Yang, W. Zhang, L. Shi, H. Zeng, B. Sun. *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – e589833.
166. Liao, M. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19 /M. Liao, Y. Liu, J. Yuan, Y. Wen, G. Xu, J. Zhao, L. Cheng, J. Li, X. Wang, F. Wang, L. Liu, I. Amit, S. Zhang, Z. Zhang // *Nature Medicine*. – 2020. – Vol. 26(6). – P. 842-844.

167. Lim, W.W. Comparative immunogenicity of mRNA and inactivated vaccines against COVID-19 / W.W. Lim, L. Mak, G.M. Leung, B.J. Cowling, M. Peiris // *Lancet Microbe*. – 2021. – Vol. 2(9). – e423.
168. Lin, D.Y. Effectiveness of Covid-19 Vaccines over a 9-Month Period in North Carolina / D.Y. Lin, Y. Gu, B. Wheeler, H. Young, S. Holloway, S.K. Sunny, Z. Moore, D. Zeng // *New England Journal of Medicine*. – 2022. –Vol. 386(10). – P. 933-941.
169. Liu, Y. Neutralizing Activity of BNT162b2-Elicited Serum / Y. Liu, J. Liu, H. Xia, X. Zhang, C.R. Fontes-Garfias, K.A. Swanson, H. Cai, R. Sarkar, W. Chen, M. Cutler, D. Cooper, S.C. Weaver, A. Muik, U. Sahin, K.U. Jansen, X. Xie, P.R. Dormitzer, P.Y. Shi // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 384(15). – P. 1466-1468.
170. Liu, Y. Association between age and clinical characteristics and outcomes of COVID-19 / Y. Liu, B. Mao, S. Liang, J.W. Yang, H.W. Lu, Y.H. Chai, L. Wang, L. Zhang, Q.H. Li, L. Zhao, Y. He, X.L. Gu, X.B. Ji, L. Li, Z.J. Jie, Q. Li, X.Y. Li, H.Z. Lu, W.H. Zhang, Y.L. Song, J.M. Qu, J.F. Xu; Shanghai Clinical Treatment Experts Group for COVID-19// *European Respiratory Journal*. – 2020. – Vol. 55(5). – e2001112
171. Liu, Y. The effective reproductive number of the Omicron variant of SARS-CoV-2 is several times relative to Delta/ Y. Liu, J. Rocklöv // *Journal of Travel Medicine*. – 2022. – Vol. 29(3). – taac037.
172. Löfström, E. Dynamics of IgG-avidity and antibody levels after Covid-19 / E. Löfström, A. Eringfält, A. Kötz, F. Wickbom, J. Tham, M. Lingman, J.M. Nygren, J. Undén // *Journal of Clinical Virology*. – 2021. – Vol. 144. –104986.
173. Logunov, D.Y. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia/ D.Y. Logunov, I.V. Dolzhikova, O.V. Zubkova, A.I. Tukhvatullin, D.V. Shcheblyakov, A.S. Dzharullaeva, D.M. Grousova, A.S. Erokhova, A.V. Kovyrshina, A.G. Botikov, F.M. Izhaeva, O. Popova, T.A. Ozharovskaya, I.B. Esmagambetov, I.A. Favorskaya, D.I. Zrelkin,

- D.V. Voronina, D.N. Shcherbinin, A.S. Semikhin, Y.V. Simakova, E.A. Tokarskaya, N.L. Lubenets, D.A. Egorova, M.M. Shmarov, N.A. Nikitenko, L.F. Morozova, E.A. Smolyarchuk, E.V. Kryukov, V.F. Babira, S.V. Borisevich, B.S. Naroditsky, A.L. Gintsburg // *Lancet*. – 2020. – Vol. 396. – e10255, P. 887-897.
174. Logunov, D.Y. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: An interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia / D.Y. Logunov, I.V. Dolzhikova, D.V. Shcheblyakov, A.I. Tukhvatulin, O.V. Zubkova, A.S. Dzharullaeva, A.V. Kovyrshina, N.L. Lubenets, D.M. Grousova, A.S. Erokhova, A.G. Botikov, F.M. Izhaeva, O. Popova, T.A. Ozharovskaya, I.B. Esmagambetov, I.A. Favorskaya, D.I. Zrelkin, D.V. Voronina, D.N. Shcherbinin, A.S. Semikhin, Y.V. Simakova, E.A. Tokarskaya, D.A. Egorova, M.M. Shmarov, N.A. Nikitenko, V.A. Gushchin, E.A. Smolyarchuk, S.K. Zyryanov, S.V. Borisevich, B.S. Naroditsky, A.L. Gintsburg; Gam-COVID-Vac Vaccine Trial Group // *Lancet*. – 2021. – Vol. 397(10275) – P. 671–681.
175. Long, Q.X. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 / Q.X. Long, B.Z. Liu, H.J. Deng, G.C. Wu, K. Deng, Y.K. Chen, P. Liao, J.F. Qiu, Y. Lin, X.F. Cai, D.Q. Wang, Y. Hu, J.H. Ren, N. Tang, Y.Y. Xu, L.H. Yu, Z. Mo, F. Gong, X.L. Zhang, W.G. Tian, L. Hu, X.X. Zhang, J.L. Xiang, H.X. Du, H.W. Liu, C.H. Lang, X.H. Luo, S.B. Wu, X.P. Cui, Z. Zhou, M.M. Zhu, J. Wang, C.J. Xue, X.F. Li, L. Wang, Z.J. Li, K. Wang, C.C. Niu, Q.J. Yang, X.J. Tang, Y. Zhang, X.M. Liu, J.J. Li, D.C. Zhang, F. Zhang, P. Liu, J. Yuan, Q. Li, J.L. Hu, J. Chen, A.L. Huang // *Nature Medicine*. – 2020. – Vol. 26(6). – P. 845-848.
176. Long, Q.X. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections / Q.X. Long, X.J. Tang, Q.L. Shi, Q. Li, H.J. Deng, J. Yuan, J.L. Hu, W. Xu, Y. Zhang, F.J. Lv, K. Su, F. Zhang, J. Gong, B. Wu, X.M. Liu, J.J. Li, J.F. Qiu, J. Chen, A.L. Huang // *Nature Medicine*. – 2020. – Vol. 26(8). – P. 1200-1204.
177. Lopez Bernal, J. Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant / J. Lopez Bernal, N. Andrews, C. Gower, E. Gallagher, R.

- Simmons, S. Thelwall, J. Stowe, E. Tessier, N. Groves, G. Dabrera, R. Myers, C.N.J. Campbell, G. Amirthalingam, M. Edmunds, M. Zambon, K.E. Brown, S. Hopkins, M. Chand, M. Ramsay // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 385(7). – P. 585-594.
178. Low, Z.Y. SARS-CoV-2 Non-Structural Proteins and Their Roles in Host Immune Evasion / Z.Y. Low, N.Z. Zabidi, A.J.W. Yip, A. Puniyamurti, V.T. K. Chow, S.K. Lal // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14(9). – e1991.
179. Lu, G. Bat-to-human: spike features determining ‘host jump’ of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond / G. Lu, Q. Wang, G.F. Gao // *Trends in Microbiology*. – 2015. – Vol. 23(8). – P. 468-78.
180. Lu, R. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding / R. Lu, X. Zhao, J. Li, P. Niu, B. Yang, H. Wu, W. Wang, H. Song, B. Huang, N. Zhu, Y. Bi, X. Ma, F. Zhan, L. Wang, T. Hu, H. Zhou, Z. Hu, W. Zhou, L. Zhao, J. Chen, Y. Meng, J. Wang, Y. Lin, J. Yuan, Z. Xie, J. Ma, W.J. Liu, D. Wang, W. Xu, E.C. Holmes, G.F. Gao, G. Wu, W. Chen, W. Shi, W. Tan. // *Lancet*. – 2020. – Vol. 395(10224). – P. 565–574.
181. Lucas, C. Delayed production of neutralizing antibodies correlates with fatal COVID-19/ C. Lucas, J. Klein, M.E. Sundaram, F. Liu, P. Wong, J. Silva, T. Mao, J.E. Oh, S. Mohanty, J. Huang, M. Tokuyama, P. Lu, A. Venkataraman, A. Park, B. Israelow, C.B.F. Vogels, M.C. Muenker, C.H. Chang, A. Casanovas-Massana, A.J. Moore, J. Zell, J.B. Fournier; Yale IMPACT Research Team, A.L. Wyllie, M. Campbell, A.I. Lee, H.J. Chun, N.D. Grubaugh, W.L. Schulz, S. Farhadian, C. Dela Cruz, A.M. Ring, A.C. Shaw, A.V. Wisnewski, I. Yildirim, A.I. Ko, S.B. Omer, A. Iwasaki // *Nature Medicine*. – 2021. – Vol. 27(7). – P. 1178-1186.
182. Lucas, C. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19/ C. Lucas, P. Wong, J. Klein, T.B.R. Castro, J. Silva, M. Sundaram, M.K. Ellingson, T. Mao, J.E. Oh, B. Israelow, T. Takahashi, M. Tokuyama, P. Lu, A. Venkataraman, A. Park, S. Mohanty, H. Wang, A.L. Wyllie, C.B.F. Vogels, R. Earnest, S. Lapidus, I.M. Ott, A.J. Moore, M.C. Muenker, J.B. Fournier, M. Campbell, C.D. Odio, A. Casanovas-Massana; Yale IMPACT Team; R. Herbst,

- A.C. Shaw, R. Medzhitov, W.L. Schulz, N.D. Grubaugh, C. Dela Cruz, S. Farhadian, A.I. Ko, S.B. Omer, A. Iwasaki // *Nature*. – 2020. – Vol. 584. – P. 463–469.
183. Luo, H. The Characterization of Disease Severity Associated IgG Subclasses Response in COVID-19 Patients / H. Luo, T. Jia, J. Chen, S. Zeng, Z. Qiu, S. Wu, X. Li, Y. Lei, X. Wang, W. Wu, R. Zhang, X. Zou, T. Feng, R. Ding, Y. Zhang, Y.-Q. Chen, C. Sun, T. Wang, S. Fang, Y. Shu // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 632814.
184. Lynch, H.E. Surface plasmon resonance measurements of plasma antibody avidity during primary and secondary responses to anthrax protective antigen / H.E. Lynch, S.M. Stewart, T.B. Kepler, G.D. Sempowski, S.M. Alam // *Journal of Immunological Methods*. – 2014. – Vol. 404. – P. 1-12.
185. Lynch, K.L. Magnitude and kinetics of anti-SARS-CoV-2 antibody responses and their relationship to disease severity / K.L. Lynch, J.D. Whitman, N.P. Lacanienta, E.W. Beckerdite, S.A. Kastner, B.R. Shy, G.M. Goldgof, A.G. Levine, S.P. Bapat, S.L. Stramer, J.H. Esensten, A.W. Hightower, C. Bern, A.H.B. Wu // *Clinical Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 72. – P. 301–308. doi: 10.1093/cid/ciaa979.
186. Madden, E.A. Host cell-intrinsic innate immune recognition of SARS-CoV-2 / E.A. Madden, M.S. Diamond // *Current Opinion in Virology*. – 2021. – Vol. 52. – P. 30–38.
187. Malato, J. Stability of hybrid versus vaccine immunity against BA.5 infection over 8 months / J. Malato, R.M. Ribeiro, E. Fernandes, P.P. Leite, P. Casaca, C. Antunes, V.R. Fonseca, M.C. Gomes, L. Graca // *Lancet Infectious Diseases*. – 2023. – Vol. 23(2). – P. 148-150.
188. Mallapaty, S. India's DNA COVID vaccine is a world first—More are coming. *Nature*. – 2021. – Vol. 597(7875). – P. 161–162.
189. Mansourabadi, A.H. B lymphocytes in COVID-19: a tale of harmony and discordance / A.H. Mansourabadi, A. Aghamajidi, M. Dorfaki, F. Keshavarz, Z. Shafeghat, A. Moazzeni, F.L. Arab, A. Rajabian, M. Roozbehani, R. Falak, F. Faraji, R. Jafari // *Archives of Virology*. – 2023. – Vol. 168(5). – P. 148.

190. Marcotte, H. Immunity to SARS-CoV-2 up to 15 months after infection / H. Marcotte, A. Piralla, F. Zuo, L. Du, I. Cassaniti, H. Wan, M. Kumagai-Braesh, J. Andréll, E. Percivalle, J.C. Sammartino, Y. Wang, S. Vlachiotis, J. Attevall, F. Bergami, A. Ferrari, M. Colaneri, M. Vecchia, M. Sambo, V. Zuccaro, E. Asperges, R. Bruno, T. Oggionni, F. Meloni, H. Abolhassani, F. Bertoglio, M. Schubert, L. Calzolari, L. Varani, M. Hust, Y. Xue, L. Hammarström, F. Baldanti, Q. Pan-Hammarström // *iScience*. – 2022. – Vol. 25(2). – e103743.
191. Mathew, D. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications / D. Mathew, J.R. Giles, A.E. Baxter, D.A. Oldridge, A.R. Greenplate, J.E. Wu, C. Alanio, L. Kuri-Cervantes, M.B. Pampena, K. D'Andrea, S. Manne, Z. Chen, Y.J. Huang, J.P. Reilly, A.R. Weisman, C.A.G. Ittner, O. Kuthuru, J. Dougherty, K. Nzingha, N. Han, J. Kim, A. Pattekar, E.C. Goodwin, E.M. Anderson, M.E. Weirick, S. Gouma, C.P. Arevalo, M.J. Bolton, F. Chen, S.F. Lacey, H. Ramage, S. Cherry, S.E. Hensley, S.A. Apostolidis, A.C. Huang, L.A. Vella; UPenn COVID Processing Unit, M.R. Betts, N.J. Meyer, E.J. Wherry // *Science*. – 2020. – Vol. 369(6508). – eabc8511.
192. Mazzoni, A. Impaired Immune Cell Cytotoxicity in Severe COVID-19 is IL-6 Dependent / A. Mazzoni, L. Salvati, L. Maggi, M. Capone, A. Vanni, M. Spinicci, J. Mencarini, R. Caporale, B. Peruzzi, A. Antonelli, M. Trotta, L. Zammarchi, L. Ciani, L. Gori, C. Lazzeri, A. Matucci, A. Vultaggio, O. Rossi, F. Almerigogna, P. Parronchi, P. Fontanari, F. Lavorini, A. Peris, G.M. Rossolini, A. Bartoloni, S. Romagnani, F. Liotta, F. Annunziato, L. Cosmi // *Journal of Clinical Investigation*. – 2020. – Vol. 130(9). – P. 4694–4703.
193. McGee, C. Longitudinal Serological Surveillance for COVID-19 Antibodies after Infection and Vaccination / C. McGee, M. Shi, J. House, A. Drude, G. Gonzalez, N. Martin, S.H. Chen, H. Rogers, A. Njunge, X. Hodge, B. Mosley, M. George, R. Agrawal, C. Wild, C. Smith, A. Brown, L. Barber, S. Garantziotis // *Microbiol Spectrum*. – 2022. – Vol. 10(5). – e0202622.
194. Meckiff, B.J. Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4 + T Cells in COVID-19 / B.J. Meckiff, C. Ramírez-Suástegui, V. Fajardo, S.J.

- Chee, A. Kusnadi, H. Simon, S. Eschweiler, A. Grifoni, E. Pelosi, D. Weiskopf, A. Sette, F. Ay, G. Seumois, C.H. Ottensmeier, P. Vijayanand // *Cell*. – 2020. – Vol. 183(5). – P. 1340-1353.e16.
195. Mercader, S. Measles virus IgG avidity assay for use in classification of measles vaccine failure in measles elimination settings / S. Mercader, P. Garcia, W.J. Bellini. // *Clinical Vaccine Immunology*. – 2012. – Vol. 19(11). – P. 1810-1817.
196. Meselson, M. Droplets and Aerosols in the Transmission of SARS-CoV-2/ M. Meselson // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 382. – P. 2063.
197. Minkoff, J.M. Innate immune evasion strategies of SARS-CoV-2 / J.M. Minkoff, B. tenOever // *Nature Reviews Microbiology*. – 2023. – Vol. 21(3). – P. 178-194.
198. Miron, M. Maintenance of the human memory T cell repertoire by subset and tissue site / M. Miron, W. Meng, A.M. Rosenfeld, S. Dvorkin, M.M.L. Poon, N. Lam, B.V. Kumar, Y. Louzoun, E.T. Luning Prak, D.L. Farber // *Genome Medicine*. – 2021. – Vol. 13(1). – P. 100.
199. Miyamoto, S. Vaccination-infection interval determines cross-neutralization potency to SARS-CoV-2 Omicron after breakthrough infection by other variants / S. Miyamoto, T. Arashiro, Y. Adachi, S. Moriyama, H. Kinoshita, T. Kanno, S. Saito, H. Katano, S. Iida, A. Ainai, R. Kotaki, S. Yamada, Y. Kuroda, T. Yamamoto, K. Ishijima, E.S. Park, Y. Inoue, Y. Kaku, M. Tobiume, N. Iwata-Yoshikawa, N. Shiwa-Sudo, K. Tokunaga, S. Ozono, T. Hemmi, A. Ueno, N. Kishida, S. Watanabe, K. Nojima, Y. Seki, T. Mizukami, H. Hasegawa, H. Ebihara, K. Maeda, S. Fukushi, Y. Takahashi, T. Suzuki // *Med*. – 2022. – Vol.3(4). – P. 249-261.e4.
200. Moga, E. The Robustness of Cellular Immunity Determines the Fate of SARS-CoV-2 Infection/ E. Moga, E. Lynton-Pons, P. Domingo // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol.13. – 904686.
201. Mok, C.K.P. T-cell responses to MERS coronavirus infection in people with occupational exposure to dromedary camels in Nigeria: an observational cohort study / C.K.P. Mok, A. Zhu, J. Zhao, E.H.Y. Lau, J. Wang, Z. Chen, Z. Zhuang, Y. Wang, A.N. Alshukairi, S.A. Baharoon, W. Wang, W. Tan, W. Liang, J.O. Oladipo,

- R.A.P.M. Perera, S.A. Kuranga, M. Peiris, J. Zhao // *Lancet Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 21(3). – P. 385-395.
202. Moreno, M. IFN-gamma-producing human invariant NKT cells promote tumor-associated antigen-specific cytotoxic T cell responses/ M. Moreno, J.W. Molling, S. von Mensdorff-Pouilly, R.H. Verheijen, E. Hooijberg, D. Kramer, A.W. Reurs, A.J. van den Eertwegh, B.M. von Blomberg, R.J. Scheper, H.J. Bontkes // *The Journal of Immunology*. – 2008. – Vol.181(4). – P. 2446-2454.
203. Moss, P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nature Immunology*. – 2022. – Vol. 23. – P.186–193.
204. Mulabbi, E.N. The history of the emergence and transmission of human coronaviruses. /E.N. Mulabbi, R. Tweyongyere, D.K. Byarugaba // *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. – 2021. – Vol. 88(1). – e1-e8,
205. Murray, P.D. Cellular sources and targets of IFN-gamma-mediated protection against viral demyelination and neurological deficits/ P.D. Murray, D.B. McGavern, L.R. Pease, M. Rodriguez // *European Journal of Immunology*. – 2002. – Vol.32(3). – P. 606-615.
206. Nakazawa, D. Immunothrombosis in severe COVID-19/ D. Nakazawa, A. Ishizu // *eBioMedicine Part of the Lancet Discovery Science*. – 2020. – Vol. 59. – article 102942.
207. Ng, O.W. Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection / O.W. Ng, A. Chia, A.T. Tan, R.S. Jadi, H.N. Leong, A. Bertoletti, Y.J. Tan // *Vaccine*. – 2016. – Vol. 34(17). – P. 2008-2014.
208. Nilles, E.J. Monitoring Temporal Changes in SARS-CoV-2 Spike Antibody Levels and Variant-Specific Risk for Infection, Dominican Republic, March 2021-August 2022/ E.J. Nilles, M. de St Aubin, D. Dumas, W. Duke, M.C. Etienne, G. Abdalla, P. Jarolim, T. Oasan, S. Garnier, N. Iihoshi, B. Lopez, L. de la Cruz, Y.C. Puello, M. Baldwin, K.W. Roberts, F. Peña, K. Durski, I.M. Sanchez, S.M. Gunter, A.R. Kneubehl, K.O. Murray, A. Lino, S. Strobel, A.A. Baez, C.L. Lau, A. Kucharski, E.Z. Gutiérrez, R. Skewes-Ramm, M. Vasquez, C.T. Paulino // *Emerging Infectious Diseases*. – 2023. – Vol. 29(4). – P. 723-733.

209. Nordström, P. Risk of SARS-CoV-2 reinfection and COVID-19 hospitalisation in individuals with natural and hybrid immunity: a retrospective, total population cohort study in Sweden / P. Nordström, M. Ballin, A. Nordström // *Lancet Infectious Diseases*. – 2022. – Vol. 22(6). – P.781–790.
210. Notarbartolo, S. Integrated longitudinal immunophenotypic, transcriptional and repertoire analyses delineate immune responses in COVID-19 patients/ S. Notarbartolo, V. Ranzani, A. Bandera, P. Guarin, V. Bevilacqua, A.R. Putignano, A. Gobbini, E. Galeota, C. Manara, M. Bombaci, E. Pesce, E. Zagato, A. Favalli, M.L. Sarnicola, S. Curti, M. Crosti, M. Martinovic, T. Fabbris, F. Marini, L. Donnici, M. Lorenzo, M. Mancino, R. Ungaro, A. Lombardi, D. Mangioni, A. Muscatello, S. Aliberti, F. Blasi, T. De Feo, D Prati, L. Manganaro, F. Granucci, A. Lanzavecchia, R. De Francesco, A. Gori, R. Grifantini, S. Abrignani // *Science Immunology*. – 2021. – Vol. 6(62). – eabg5021.
211. Okba, N.M.A. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients / N.M.A. Okba, M.A. Müller, W. Li, C. Wang, C.H. GeurtsvanKessel, V.M. Corman, M.M. Lamers, R.S. Sikkema, E. de Bruin, F.D. Chandler, Y. Yazdanpanah, Q. Le Hingrat, D. Descamps, N. Houhou-Fidouh, C.B.E.M. Reusken, B.J. Bosch , C. Drosten, M.P.G. Koopmans, B.L. Haagmans // *Emerging Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 26(7). – P. 1478-1488.
212. Olas, K. Immunomodulatory properties of human serum immunoglobulin A: anti-inflammatory and pro-inflammatory activities in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells / K. Olas, H. Butterweck, W. Teschner, H.P. Schwarz, B. Reipert // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2005. – Vol. 140(3). – P. 478-90.
213. Oliveira, S.C. Immunoinformatic Analysis of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Identification of COVID-19 Vaccine Targets/ S.C. Oliveira, M.T.Q. de Magalhães, E.J. Homan // *Frontiers in Immunology*. –2020. – Vol. 11. – 587615.

214. Palm, A.E. Remembrance of Things Past: Long-Term B Cell Memory After Infection and Vaccination / A.E. Palm, C. Henry // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – e1787.
215. Parazzini, F. Delivery in pregnant women infected with SARS-CoV-2: A fast review/ F. Parazzini, R. Bortolus, P.A. Mauri, A. Favilli, S. Gerli, E. Ferrazzi // *International Journal of Gynaecology & Obstetrics*. – 2020. – Vol. 150(1). – P. 41–46.
216. Pardi, N. mRNA vaccines—A new era in vaccinology/ N. Pardi, M.J. Hogan, F.W. Porter, D. Weissman // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2018 – Vol. 17(4). –P. 261–279.
217. Payne, D.C. Persistence of Antibodies against Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus / D.C. Payne, I. Iblan, B. Rha, S. Alqasrawi, A. Haddadin, M. Al Nsour, T. Alsanouri, S.S. Ali, J. Harcourt, C. Miao, A. Tamin, S.I. Gerber, L.M. Haynes, M.M. Al Abdallat // *Emerging Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 22(10). – e1824-6.
218. Peacock, T.P. Mink farming poses risks for future viral pandemics/ T.P. Peacock, W.S. Barclay// *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2023. – Vol. 120(30). – e2303408120.
219. Peck, K.M. Coronavirus Host Range Expansion and Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Emergence: Biochemical Mechanisms and Evolutionary Perspectives / K.M. Peck, C.L. Burch, M.T. Heise, R.S. Baric // *Annual Review of Virology*. – 2015. – Vol. 2. – P. 95-117.
220. Peiris, J.S. Severe acute respiratory syndrome /J.S. Peiris, Y. Guan, K.Y. Yuen // *Nature Medicine*. – 2004. – Vol.10(12). – P. 88-97.
221. Peng, Y. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19 / Y. Peng, A.J. Mentzer, G. Liu, X. Yao, Z. Yin, D. Dong, W. Dejnirattisai, T. Rostron, P. Supasa, C. Liu, C. López-Camacho, J. Slon-Campos, Y. Zhao, D.I. Stuart, G.C. Paesen, J.M. Grimes, A.A. Antson, O.W. Bayfield, D.E.D.P. Hawkins, D.S. Ker, B. Wang, L. Turtle, K. Subramaniam, P. Thomson, P. Zhang, C. Dold, J. Ratcliff, P. Simmonds,

- T. de Silva, P. Sopp, D. Wellington, U. Rajapaksa, Y.L. Chen, M. Salio, G. Napolitani, W. Paes, P. Borrow, B.M. Kessler, J.W. Fry, N.F. Schwabe, M.G. Semple, J.K. Baillie, S.C. Moore, P.J.M. Openshaw, M.A. Ansari, S. Dunachie, E. Barnes, J. Frater, G. Kerr, P. Goulder, T. Lockett, R. Levin, Y. Zhang, R. Jing, L.P. Ho; Oxford Immunology Network Covid-19 Response T cell Consortium; ISARIC4C Investigators; R.J. Cornall, C.P. Conlon, P. Klenerman, G.R. Screaton, J. Mongkolsapaya, A. McMichael, J.C. Knight, G. Ogg, T. Dong // *Nature Immunology*. – 2020. – Vol. 21(11). – P. 1336-1345.
222. Phillips, E. Comparison of two T-cell assays to evaluate T-cell responses to SARS-CoV-2 following vaccination in naïve and convalescent healthcare workers / E. Phillips, S. Adele, T. Malone, A. Deeks, L. Stafford, S.L. Dobson, A. Amini, D. Skelly, D. Eyre, K. Jeffery, C.P. Conlon, C. Dold, A. Otter, S. D'Arcangelo, L. Turtle; PITCH Consortium, P. Klenerman, E. Barnes, S. J. Dunachie // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2022. – Vol. 209(1). – P. 90-98.
223. Pichler, D. Marked Increase in Avidity of SARS-CoV-2 Antibodies 7–8 Months After Infection Is Not Diminished in Old Age/ D. Pichler, M. Baumgartner, J. Kimpel, A. Rössler, L. Riepler, K. Bates, V. Fleischer, D. von Laer, W. Borena, R. Würzner // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2021. – Volume 224(5). – P. 764–770
224. Planas, D. Distinct evolution of SARS-CoV-2 Omicron XBB and BA.2.86 lineages combining increased fitness and antibody evasion / D. Planas, I. Staropoli, V. Michel, F. Lemoine, F. Donati, M. Prot, F. Porrot, F. Guivel-Benhassine, B. Jeyarajah, A. Brisebarre, O. Dehan, L. Avon, W.H. Boland, M. Hubert, J. Buchrieser, T. Vanhoucke, P. Rosenbaum, D. Veyer, H. Péré, B. Lina, S. Trouillet-Assant, L. Hocqueloux, T. Prazuck, E. Simon-Loriere, O. Schwartz // *bioRxiv*. – 2023. – e:2023.11.20.567873.
225. Polack, F.P. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine / F.P. Polack, S.J. Thomas, N. Kitchin, J. Absalon, A. Gurtman, S. Lockhart, J.L. Perez, G. Pérez Marc, E.D. Moreira, C. Zerbini, R. Bailey, K.A. Swanson, S. Roychoudhury, K. Koury, P. Li, W.V. Kalina, D. Cooper, R.W. Frenck Jr, L.L.

- Hammit, Ö. Türeci, H. Nell, A. Schaefer, S. Ünal, D.B. Tresnan, S. Mather, P.R. Dormitzer, U. Şahin, K.U. Jansen, W.C. Gruber; C4591001 Clinical Trial Group // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383(27). – P. 2603-2615.
226. Poon, M.M.L. The Whole Body as the System in Systems Immunology/ M.M.L. Poon, D.L. Farber // *iScience*. – 2020. – Vol. 23(9). – 101509.
227. Poon, M.M.L. SARS-CoV-2 infection generates tissue-localized immunological memory in humans / M.M.L. Poon, K. Rybkina, Y. Kato, M. Kubota, R. Matsumoto, N.I. Bloom, Z. Zhang, K.M. Hastie, A. Grifoni, D. Weiskopf, S.B. Wells, B.B. Ural, N. Lam, P.A. Szabo, P. Dogra, Y.S. Lee, J.I. Gray, M.C. Bradley, M.A. Brusko, T.M. Brusko, E.O. Saphire, T.J. Connors, A. Sette, S. Crotty, D.L. Farber // *Science Immunology*. – 2021. – Vol. 6(65). – eabl9105.
228. Pozzetto, B. Immunogenicity and efficacy of heterologous ChAdOx1–BNT162b2 vaccination / B. Pozzetto, V. Legros, S. Djebali, V. Barateau, N. Guibert, M. Villard, L. Peyrot, O. Allatif, J.B. Fassier, A. Massardier-Pilonchéry, K. Brengel-Pesce, M. Yaugel-Novoa, S. Denolly, B. Boson, T. Bourlet, A. Bal, M. Valette, T. Andrieu, B. Lina; Covid-Ser study group, F.L. Cosset, S. Paul, T. Defrance, J. Marvel, T. Walzer, S. Trouillet-Assant // *Nature*. – 2021. – Vol. 600(7890). – P. 701-706.
229. Pujadas, E. SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality/ E. Pujadas, F. Chaudhry, R. McBride, F. Richter, S. Zhao, A. Wajnberg, G. Nadkarni, B.S. Glicksberg, J. Houldsworth, C. Cordon-Cardo // *Lancet Respiratory Medicine*. – 2020. – Vol. 8(9). – e70.
230. Purtha, W.E. Memory B cells, but not long-lived plasma cells, possess antigen specificities for viral escape mutants / W.E. Purtha, T.F. Tedder, S. Johnson, D. Bhattacharya, M.S. Diamond // *Journal of Experimental Medicine*. – 2011. – Vol. 208(13). – P. 2599-2606.
231. Puschnik, A. Correlation between dengue-specific neutralizing antibodies and serum avidity in primary and secondary dengue virus 3 natural infections in humans / A. Puschnik, L. Lau, E.A. Cromwell, A. Balmaseda, S. Zompi, E. Harris // *PLoS Neglected Tropical Diseases*. – 2013. – Vol. 7(6). – e2274.

232. Pušnik, J. Persistent maintenance of intermediate memory B cells following SARS-CoV-2 infection and vaccination recall response / J. Pušnik, J. König, K. Mai, E. Richter, J. Zorn, H. Proksch, B. Schulte, G. Alter, H. Streeck // *Journal of Virology*. 2022. Vol. 96(15). e0076022.
233. Qu, J. Profile of Immunoglobulin G and IgM Antibodies Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) / J. Qu, C. Wu, X. Li, G. Zhang, Z. Jiang, X. Li, Q. Zhu, L. Liu // *Clinical Infectious Diseases*. – 2020. – Vol.71(16). – P. 2255-2258.
234. Ragonnet-Cronin, M. Generation of SARS-CoV-2 escape mutations by monoclonal antibody therapy/ M. Ragonnet-Cronin, R. Nutalai, J. Huo, A. Dijokaite-Guraliuc, R. Das, A. Tuekprakhon, P. Supasa, C. Liu, M. Selvaraj, N. Groves, H. Hartman, N. Ellaby, J. Mark Sutton, M.W. Bahar, D. Zhou, E. Fry, J. Ren, C. Brown, P. Klenerman, S.J. Dunachie, J. Mongkolsapaya, S. Hopkins, M. Chand, D.I. Stuart, G.R. Screaton, S. Rokadiya // *Nature Communications*. – 2023. – Vol. 14(1). – e3334.
235. Rahman, M.S. Evolutionary dynamics of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its consequences / M.S. Rahman, M.R. Islam, A.S.M.R.U. Alam, I. Islam, M.N. Hoque, S. Akter, M.M. Rahaman, M. Sultana, M.A. Hossain. // *Journal of Medical Virology*. – 2021. – Vol. 93(4). – P. 2177–2195.
236. Ravichandran, S. Differential human antibody repertoires following Zika infection and the implications for serodiagnostics and disease outcome / S. Ravichandran, M. Hahn, P.F. Belaunzarán-Zamudio, J. Ramos-Castañeda, G. Nájera-Cancino, S. Caballero-Sosa, K.R. Navarro-Fuentes, G. Ruiz-Palacios, H. Golding, J.H. Beigel, S. Khurana // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10(1). – P. 1943.
237. Rayati Damavandi, A. Molecular variants of SARS-CoV-2: antigenic properties and current vaccine efficacy/ A. Rayati Damavandi, R. Dowran, S. Al Sharif, F. Kashanchi, R. Jafari// *Medical Microbiology and Immunology*. – 2022. – Vol.211(2-3). – P.79-103.

238. Rehman, S.U. COVID-19 challenges and its therapeutics / S.U. Rehman, S.U. Rehman, H.H. Yoo // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2021. – Vol. 142. – 112015.
239. Ren, L. The kinetics of humoral response and its relationship with the disease severity in COVID-19/ L. Ren, L. Zhang, D. Chang, J. Wang, Y. Hu, H. Chen, L. Guo, C. Wu, C. Wang, Y. Wang, Y. Wang, G. Wang, S. Yang, C.S. Dela Cruz, L. Sharma, L. Wang, D. Zhang, J. Wang // *Communications Biology*. – 2020. – Vol. 3(1). – 780.
240. Robbiani, D.F. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals / D.F. Robbiani, C. Gaebler, F. Muecksch, J.C.C. Lorenzi, Z. Wang, A. Cho, M. Agudelo, C.O. Barnes, A. Gazumyan, S. Finkin, T. Hägglöf, T.Y. Oliveira, C. Viant, A. Hurley, H.H. Hoffmann, K.G. Millard, R.G. Kost, M. Cipolla, K. Gordon, F. Bianchini, S.T. Chen, V. Ramos, R. Patel, J. Dizon, I. Shimeliovich, P. Mendoza, H. Hartweger, L. Nogueira, M. Pack, J. Horowitz, F. Schmidt, Y. Weisblum, E. Michailidis, A.W. Ashbrook, E. Waltari, J.E. Pak, K.E. Huey-Tubman, N. Koranda, P.R. Hoffman, A.P. West Jr., C.M. Rice, T. Hatziioannou, P.J. Bjorkman, P.D. Bieniasz, M. Caskey, M.C. Nussenzweig // *Nature*. – 2020. – Vol. 584. – P. 437–442.
241. Röltgen, K. Antibody and B Cell Responses to SARS-CoV-2 Infection and Vaccination: The End of the Beginning / K. Röltgen, S.D. Boyd // *Annual Reviews of Pathology*. – 2024. – Vol. 19. – P. 69-97.
242. Röltgen, K. mRNA vaccination compared to infection elicits an IgG-predominant response with greater SARS-CoV-2 specificity and similar decrease in variant spike recognition / K. Röltgen, S.C.A. Nielsen, P.S. Arunachalam, F. Yang, R.A. Hoh, O.F. Wirz, A.S. Lee, F. Gao, V. Mallajosyula, C. Li, E. Haraguchi, M.J. Shoura, J.L. Wilbur, J.N. Wohlstadter, M.M. Davis, B.A. Pinsky, G.B. Sigal, B. Pulendran, K.C. Nadeau, S.D. Boyd // *medRxiv [Preprint]*. – 2021. – 2021.04.05.21254952.
243. Röltgen, K. Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome / K. Röltgen, A.E. Powell, O.F. Wirz, B.A. Stevens, C.A. Hogan, J. Najeeb, M. Hunter, H. Wang,

- M.K. Sahoo, C. Huang, F. Yamamoto, M. Manohar, J. Manalac, A.R. Otrelo-Cardoso, T.D. Pham, A. Rustagi, A.J. Rogers, N.H. Shah, C.A. Blish, J.R. Cochran, T.S. Jardetzky, J.L. Zehnder, T.T. Wang, B. Narasimhan, S. Gombar, R. Tibshirani, K.C. Nadeau, P.S. Kim, B.A. Pinsky, S.D. Boyd // *Science Immunology*. – 2020. – Vol. 5(54). – eabe0240.
244. Rottmayer, K. Individual Immune Response to SARS-CoV-2 Infection-The Role of Seasonal Coronaviruses and Human Leukocyte Antigen/ K. Rottmayer, H. Loeffler-Wirth, T. Gruenewald, I. Doxiadis, C. Lehmann // *Biology (Basel)*. – 2023. – Vol. 12(10). – 1293.
245. Roux, K.H. Flexibility of human IgG subclasses / K.H. Roux, L. Strelets, T.E. Michaelsen // *The Journal of Immunology*. – 1997. – Vol. 159(7). – P. 3372-3382.
246. Rovito, R. Hallmarks of Severe COVID-19 Pathogenesis: A Pas de Deux Between Viral and Host Factors / R. Rovito, M. Augello, A. Ben-Haim, V. Bono, A.A. Monforte, G. Marchetti // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol.13. – article 912336.
247. Ruan, Y. Diagnostic performance of cytomegalovirus (CMV) immune monitoring with ELISPOT and QuantiFERON-CMV assay in kidney transplantation: A PRISMA-compliant article / Y. Ruan, W. Guo, S. Liang, Z. Xu, T. Niu // *Medicine (Baltimore)*. – 2019. – Vol. 98(16). – e15228.
248. Rybkina, K. Tissue immunity to SARS-CoV-2: Role in protection and immunopathology/ K. Rybkina, J. Davis-Porada, D.L. Farber // *Immunological Reviews*. – 2022. – Vol. 309(1). – P. 25-39.
249. Ryzhikov, A. B. Assessment of Safety and Prophylactic Efficacy of the EpiVacCorona Peptide Vaccine for COVID-19 Prevention (Phase III) / AB Ryzhikov, EA Ryzhikov, MP Bogryantseva, SV Usova, EA Nechaeva, ED Danilenko, SA Pyankov, AS Gudymo, AA Moiseeva, GS Onkhonova, OV Pyankov, ES Sleptsova, NV Lomakin, VS Vasilyeva, MV Tulikov, VG Gusarov, AA Pulin, MA Balalaeva, SB Erofeeva, SA Terpigorev, OA Rychkova, IM Petrov, VY Delian, VV Rafalskiy, SV Tyranovets, EV Gavrilova, RA Maksyutov// *Vaccines (Basel)*. – 2023. – Vol. 11(5). – 998.

250. Saad Albichr, I. Evaluation of a commercial interferon- γ release assay for the detection of SARS-CoV-2 T-cell response after vaccination/ I. Saad Albichr, S. Mzougui, A. Devresse, H. Georgery, E. Goffin, N. Kanaan, J.C. Yombi, L. Belkhir, J. De Greef, A. Scohy, H. Rodriguez-Villalobos, B. Kabamba-Mukadi// *Heliyon*. – 2023. – Vol. 9(6). – e17186.
251. Sadoff, J. Interim results of a phase 1–2a trial of Ad26.COV2.S Covid-19 vaccine / J. Sadoff, M. Le Gars, G. Shukarev, D. Heerwegh, C. Truyers, A.M. de Groot, J. Stoop, S. Tete, W. Van Damme, I. Leroux-Roels, P.J. Berghmans, M. Kimmel, P. Van Damme, J. de Hoon, W. Smith, K.E. Stephenson, S.C. De Rosa, K.W. Cohen, M.J. McElrath, E. Cormier, G. Scheper, D.H. Barouch, J. Hendriks, F. Struyf, M. Douoguih, J. Van Hoof, H. Schuitemaker // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 384(19). – P. 1824-1835.
252. Sahin, U. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses/ U. Sahin, A. Muik, E. Derhovanessian, I. Vogler, L.M. Kranz, M. Vormehr, A. Baum, K. Pascal, J. Quandt, D. Maurus, S. Brachtendorf, V. Lörks, J. Sikorski, R. Hilker, D. Becker, A.K. Eller, J. Grützner, C. Boesler, C. Rosenbaum, M.C. Kühnle, U. Luxemburger, A. Kemmer-Brück, D. Langer, M. Bexon, S. Bolte, K. Karikó, T. Palanche, B. Fischer, A. Schultz, P.Y. Shi, C. Fontes-Garfias, J.L. Perez, K.A. Swanson, J. Loschko, I.L. Scully, M. Cutler, W. Kalina, C.A. Kyratsous, D. Cooper, P.R. Dormitzer, K.U. Jansen, Ö. Türeci // *Nature*. – 2020. – Vol. 586(7830). – P. 594-599.
253. Sakharkar, M. Prolonged evolution of the human B cell response to SARS-CoV-2 infection / M. Sakharkar, C.G. Rappazzo, W.F. Wieland-Alter, C.L. Hsieh, D. Wrapp, E.S. Esterman, C.I. Kaku, A.Z. Wec, J.C. Geoghegan, J.S. McLellan, R.I. Connor, P.F. Wright, L.M. Walker // *Science Immunology*. – 2021. – Vol. 6(56). – eabg6916.
254. Salamanna, F. Body localization of ACE-2: on the trail of the keyhole of SARS-CoV-2/ F. Salamanna, M. Maglio, M.P. Landini, M. Fini // *Frontiers in Medicine*. – 2021. – Vol.7. – 594495.

255. Saletti, G. Older adults lack SARS CoV-2 cross-reactive T lymphocytes directed to human coronaviruses OC43 and NL63 / G. Saletti, T. Gerlach, J.M. Jansen, A. Molle, H. Elbahesh, M. Ludlow, W. Li, B.J. Bosch, A.D.M.E. Osterhaus, G.F. Rimmelzwaan // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10(1). – 21447.
256. Schalk, A.F. An apparently new respiratory disease of baby chicks / A.F. Schalk, M.C. Hawn // *Journal of American Veterinary Medical Association*. – 1931. Vol. 78. – P. 413-422.
257. Schenkel, J.M. Tissue-resident memory T cells / J.M. Schenkel, D. Masopust // *Immunity*. – 2014. – Vol. 41(6). – P. 886-897.
258. Schmidt, T. Immunogenicity and reactogenicity of heterologous ChAdOx1 nCoV-19/mRNA vaccination / T. Schmidt, V. Klemis, D. Schub, J. Mihm, F. Hielscher, S. Marx, A. Abu-Omar, L. Ziegler, C. Guckelmuß, R. Urschel, S. Schneitler, S.L. Becker, B.C. Gärtner, U. Sester, M. Sester // *Nature Medicine*. – 2021. – Vol. 27(9) – P. 1530-1535.
259. Scherer, E.M. SARS-CoV-2 Evolution and Immune Escape in Immunocompromised Patients / E.M. Scherer, A. Babiker, M.W. Adelman, B. Allman, A. Key, J.M. Kleinhenz, R.M. Langsjoen, P.V. Nguyen, I. Onyechi, J.D. Sherman, T.W. Simon, H. Soloff, J. Tarabay, J. Varkey, A.S. Webster, D. Weiskopf, D.B. Weissman, Y. Xu, J.J. Waggoner, K. Koelle, N. Rouphael, S.M. Pouch, A. Piantadosi // *New England Journal of Medicine*. – 2022. – Vol. 386(25). – P. 2436-2438.
260. Schoenborn, J.R. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses/ J.R. Schoenborn, C.B. Wilson // *Advances in Immunology*. – 2007. – Vol. 96. – P. 41-101.
261. Sekine, T. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19 / T. Sekine, A. Perez-Potti, O. Rivera-Ballesteros, K. Strålin, J.B. Gorin, A. Olsson, S. Llewellyn-Lacey, H. Kamal, G. Bogdanovic, S. Muschiol, D.J. Wullimann, T. Kammann, J. Emgård, T. Parrot, E. Folkesson; Karolinska COVID-19 Study Group, O. Rooyackers, L.I. Eriksson, J.I. Henter, A. Sönnernborg, T. Allander, J. Albert, M. Nielsen, J. Klingström, S.

- Gredmark-Russ, N.K. Björkström, J.K. Sandberg, D.A. Price, H.G. Ljunggren, S. Aleman, M. Buggert // *Cell*. – 2020. – Vol. 183(1). – P. 158-168.e14.
262. Sette, A. T Cell Responses to SARS-CoV-2 / A. Sette, J. Sidney, S. Crotty. // *Annual Review of Immunology*. – 2023. – Vol. 41. – P. 343-373.
263. Shen, H. A mini review of reinfection with the SARS-CoV-2 Omicron variant / H. Shen, D. Chen, C. Li, T. Huang, W. Ma // *Health Science Reports*. – 2024. – Vol. 7(4). – e2016.
264. Shi, J. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2 / J. Shi, Z. Wen, G. Zhong, H. Yang, C. Wang, B. Huang, R. Liu, X. He, L. Shuai, Z. Sun, Y. Zhao, P. Liu, L. Liang, P. Cui, J. Wang, X. Zhang, Y. Guan, W. Tan, G. Wu, H. Chen, Z. Bu // *Science*. – 2020. – Vol. 368(6494). – P. 1016–1020.
265. Singh, B. Chloroquine or hydroxychloroquine for prevention and treatment of COVID-19 / B. Singh, H. Ryan, T. Kredo, M. Chaplin, T. Fletcher // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2021. – Vol.2(2). – CD013587.
266. Singla, R. Human animal interface of SARS-CoV-2 (COVID-19) transmission: a critical appraisal of scientific evidence / R. Singla, A. Mishra, R. Joshi, S. Jha, A.R. Sharma, S. Upadhyay, P. Sarma, A. Prakash, B. Medhi // *Veterinary Research Communications*. – 2020. – Vol. 44. – P. 119–130.
267. Siracusano, G. Profiling Antibody Response Patterns in COVID-19: Spike S1-Reactive IgA Signature in the Evolution of SARS-CoV-2 Infection / G. Siracusano, C. Brombi, C. Pastori, F. Cugnata, M. Noviello, E. Tassi, D. Princi, D. Cantoni, M.S. Malnati, N. Maugeri, C. Bozzi, G. Saretto, N. Clementi, N. Mancini, C. Uberti-Foppa, N. Temperton, C. Bonini, C. Di Serio, L. Lopalco // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – 772239.
268. Song, J.W. Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19/ J.W. Song, C. Zhang, X. Fan, F.P. Meng, Z. Xu, P. Xia, W.J. Cao, T. Yang, X.P. Dai, S.Y. Wang, R.N. Xu, T.J. Jiang, W.G. Li, D.W. Zhang, P. Zhao, M. Shi, C. Agrati, G. Ippolito, M. Maeurer, A. Zumla, F.S. Wang, J.Y. Zhang // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11(1). – 3410.

269. Srivastava, K. SARS-CoV-2-infection- and vaccine-induced antibody responses are long lasting with an initial waning phase followed by a stabilization phase / K. Srivastava, J.M. Carreño, C. Gleason, B. Monahan, G. Singh, A. Abbad, J. Tcheou, A. Raskin, G. Kleiner, H. van Bakel, E.M. Sordillo; PARIS Study Group; F. Krammer, V. Simon // *Immunity*. – 2024. – Vol. 57(3). – P. 587-599.e4.
270. Steffensen, M.A. Pre-existing vector immunity does not prevent replication deficient adenovirus from inducing efficient CD8 T-cell memory and recall responses/ M.A. Steffensen, B.A. Jensen, P.J. Holst, M.R. Bassi, J.P. Christensen, A.R. Thomsen // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(4). – e34884.
271. Stephens, D.S. COVID-19 and the path to immunity/ D.S. Stephens, M.J. McElrath // *JAMA*. – 2020. – Vol. 324. – P. 1279–1281.
272. Stephenson, K.E. Immunogenicity of the Ad26.COV2.S Vaccine for COVID-19 / K.E. Stephenson, M. Le Gars, J. Sadoff, A.M. de Groot, D Heerwegh, C. Truyers, C. Atyeo, C. Loos, A. Chandrashekar, K. McMahan, L.H. Tostanoski, J. Yu, M.S. Gebre, C. Jacob-Dolan, Z. Li, S. Patel, L. Peter, J. Liu, E.N. Borducchi, J.P. Nkolola, M. Souza, C.S. Tan, R. Zash, B. Julg, R.R. Nathavitharana, R.L. Shapiro, A.A. Azim, C.D. Alonso, K. Jaegle, J.L. Ansel, D.G.. Kanjilal, CJ. Guiney, C. Bradshaw, A. Tyler, T. Makoni, K.E. Yanosick, M.S. Seaman, D.A. Lauffenburger, G. Alter, F. Struyf, M Douoguih, J. Van Hoof, H. Schuitemaker, D.H. Barouch // *JAMA*. – 2021. – Vol. 325(15). – P. 1535-1544.
273. Sun, J. Isolation of infectious SARS-CoV-2 from urine of a COVID-19 patient/ J. Sun, A. Zhu, H. Li, K. Zheng, Z. Zhuang, Z. Chen, Y. Shi, Z. Zhang, S.B. Chen, X. Liu, J. Dai, X. Li, S. Huang, X. Huang, L. Luo, L. Wen, J. Zhuo, Y. Li, Y. Wang, L. Zhang, Y. Zhang, F. Li, L. Feng, X. Chen, N. Zhong, Z. Yang, J. Huang, J. Zhao, Y.M. Li // *Emerging Microbes & Infections*. – 2020. – Vol. 9(1). – P. 991–993.
274. Suryawanshi, Y.N. Herd Immunity to Fight Against COVID-19: A Narrative Review / Y.N. Suryawanshi, D.A. Biswas // *Cureus*. – 2023. – Vol.15(1). – e33575.

275. Sweet DR. Immunohematologic Biomarkers in COVID-19: Insights into Pathogenesis, Prognosis, and Prevention / D.R. Sweet, M.L. Freeman, D.A. Zidar // *Pathogenes and Immunity*. – 2023. – Vol.8(1). – P. 17-50.
276. Tamura, T. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 XBB variant derived from recombination of two Omicron subvariants / T. Tamura, J. Ito, K. Uriu, J. Zahradnik, I. Kida, Y. Anraku, H. Nasser, M. Shofa, Y. Oda, S. Lytras, N. Nao, Y. Itakura, S. Deguchi, R. Suzuki, L. Wang, M.M. Begum, S. Kita, H. Yajima, J. Sasaki, K. Sasaki-Tabata, R. Shimizu, M. Tsuda, Y. Kosugi, S. Fujita, L. Pan, D. Sauter, K. Yoshimatsu, S. Suzuki, H. Asakura, M. Nagashima, K. Sadamasu, K. Yoshimura, Y. Yamamoto, T. Nagamoto, G. Schreiber, K. Maenaka; Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium; T. Hashiguchi, T. Ikeda, T. Fukuhara, A. Saito, S. Tanaka, K. Matsuno, K. Takayama, K. Sato // *Nature Communications*. – 2023. – Vol.14(1). – e2800.
277. Tan, M. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China / M. Tan, Y. Liu, R. Zhou, X. Deng, F. Li, K. Liang, Y. Shi // *Immunology*. – 2020. – Vol. 160(3). – P. 261-268.
278. Tandhavanant, S. Longitudinal analysis to characterize classes and subclasses of antibody responses to recombinant receptor-binding protein (RBD) of SARS-CoV-2 in COVID-19 patients in Thailand / S. Tandhavanant, S. Koosakunirand, T. Kaewarpai, W. Piyaphanee, P. Leungwutiwong, V. Luvira, N. Chantratita // *PLoS One*. – 2021. – Vol. 16(80). – e0255796.
279. Tang, F. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study/ F. Tang, Y. Quan, Z.T. Xin, J. Wrammert, M.J. Ma, H. Lv, T.B. Wang, H. Yang, J.H. Richardus, W. Liu, W.C. Cao // *Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 186. – P. 7264–7268.
280. Tarke, A. SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron / A. Tarke, C.H. Coelho, Z. Zhang, J.M. Dan, E.D. Yu, N. Methot, N.I. Bloom, B. Goodwin, E. Phillips, S. Mallal, J. Sidney, G. Filaci, D. Weiskopf, R. da Silva Antunes, S. Crotty, A. Grifoni, A. Sette // *Cell*. – 2022. – Vol. 185(5). – P. 847-859.e11.

281. Tarke, A. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases/ A. Tarke, J. Sidney, C.K. Kidd, J.M. Dan, S.I. Ramirez, E.D. Yu, J. Mateus, R. da Silva Antunes, E. Moore, P. Rubiro, N. Methot, E. Phillips, S. Mallal, A. Frazier, S.A. Rawlings, J.A. Greenbaum, B. Peters, D.M. Smith, S. Crotty, D. Weiskopf, A. Grifoni, A. Sette // *Cell Reports Medicine*. – 2021. – Vol. 2(2). – e100204.
282. Tatsis, N. Adenoviruses as vaccine vectors / N. Tatsis, H.C Ertl // *Molecular Therapy*. – 2004. – Vol. 10(4). – P. 616-29. doi: 10.1016/j.ymthe.2004.07.013.
283. Tay, M.Z. Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis in Antiviral Immune Responses / M.Z. Tay, K. Wiehe, J. Pollara // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – 332.
284. Thakur, V. Waves and variants of SARS-CoV-2: understanding the causes and effect of the COVID-19 catastrophe/ V. Thakur, S. Bhola, P. Thakur, S.K.S. Patel, S. Kulshrestha, R.K. Ratho, P. Kumar // *Infection*. – 2022. – Vol. 50. – P. 309–325.
285. Thorne, L.G. Evolution of enhanced innate immune evasion by SARS-CoV-2 / L.G. Thorne, M. Bouhaddou, A.K. Reuschl, L. Zuliani-Alvarez, B. Polacco, A. Pelin, J. Batra, M.V.X. Whelan, M. Hosmillo, A. Fossati, R. Ragazzini, I. Jungreis, M. Ummadi, A. Rojc, J. Turner, M.L. Bischof ML, K. Obernier, H. Braberg, M. Soucheray, A. Richards, K.H. Chen, B. Harjai, D. Memon, J. Hiatt, R. Rosales, B.L. McGovern, A. Jahun, J.M. Fabius, K. White, I.G. Goodfellow, Y. Takeuchi, P. Bonfanti, K. Shokat, N. Jura, K. Verba, M. Noursadeghi, P. Beltrao, M. Kellis, D.L. Swaney, A.. García-Sastre, C. Jolly, G.J. Towers, N.J. Krogan. // *Nature*. – 2022. – Vol. 602(7897). – P. 487-495.
286. Titov, A. Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2 / A. Titov, R. Shaykhutdinova, O.V. Shcherbakova, Y.V. Serdyuk, S.A. Sheetikov, K.V. Zornikova, A.V. Maleeva, A. Khmelevskaya, D.V. Dianov, N.T. Shakirova, D.B. Malko, M. Shkurnikov, S. Nersisyan, A. Tonevitsky, E. Khamaganova, A.V. Ershov, E.Y. Osipova, R.V. Nikolaev, D.E. Pershin, V.A. Vedmedskia, M. Maschan, V.R. Ginanova, G.A. Efimov // *JCI Insight*. – 2022. – Vol. 7(9). – e157699.

287. Topol, E. The Virus Takes a Detour in its Evolutionary Arc. How Well will Our Immune System Respond? / E. Topol. – 2023. – Available at: <https://erictopol.substack.com/p/the-virus-takes-a-detour-in-its-evolutionary>
288. Troisi, J. COVID-19 and the gastrointestinal tract: Source of infection or merely a target of the inflammatory process following SARS-CoV-2 infection? / J. Troisi, G. Venutolo, M. Pujolassos Tanyà, M. Delli Carri, A. Landolfi, A. Fasano // World Journal of Gastroenterology. – 2021. – Vol.27(14) – P. 1406-1418
289. Tseng, C.T. Immunization with SARS Coronavirus Vaccines Leads to Pulmonary Immunopathology on Challenge with the SARS Virus / C.T. Tseng, E. Sbrana, N. Iwata-Yoshikawa, P.C. Newman, T. Garron, R.L. Atmar, C.J. Peters, R.B. Couch // PLoS One. – 2012. – Vol. 7(4). – e35421
290. Tikhvatulin, A.I. An open, non-randomised, phase 1/2 trial on the safety, tolerability, and immunogenicity of single-dose vaccine "Sputnik Light" for prevention of coronavirus infection in healthy adults/ A.I. Tikhvatulin, I.V. Dolzhikova, D.V. Shcheblyakov, O.V. Zubkova, A.S. Dzharullaeva, A.V. Kovyrshina, N.L. Lubenets, D.M. Grousova, A.S. Erokhova, A.G. Botikov, F.M. Izhaeva, O. Popova, T.A. Ozharovskaia, I.B. Esmagambetov, I.A. Favorskaya, D.I. Zrelkin, D.V. Voronina, D.N. Shcherbinin, A.S. Semikhin, Y.V. Simakova, E.A. Tokarskaya, M.M. Shmarov, N.A. Nikitenko, V.A. Gushchin, E.A. Smolyarchuk, T.G. Zubkova, K.A. Zakharov, V.B. Vasilyuk, S.V. Borisevich, B.S. Naroditsky, D.Y. Logunov, A.L. Gintsburg // Lancet Regional Health – Europe. – 2021. – Vol. 11. – e100241.
291. Turner, J.S. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans / J.S. Turner, W. Kim, E. Kalaidina, C.W. Goss, A.M. Rauseo, A.J. Schmitz, L. Hansen, A. Haile, M.K. Klebert, I. Pusic, J.A. O'Halloran, R.M. Presti, A.H. Ellebedy. Nature. – 2021. – Vol. 595(7867). –P. 421-425.
292. Uversky, V.N. IgG4 Antibodies Induced by Repeated Vaccination May Generate Immune Tolerance to the SARS-CoV-2 Spike Protein/ V.N. Uversky, E.M. Redwan, W. Makis, A. Rubio-Casillas // Vaccines (Basel). –2023. – Vol. 11(5). – 991.

293. Vidarsson, G. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions / G. Vidarsson, G. Dekkers, T. Rispen // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – Vol. 5. – e520.
294. Walls, A.C. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. / A.C. Walls, Y.J. Park, M.A. Tortorici, A. Wall, A.T. McGuire, D. Veelsler // *Cell*. – 2020. – Vol. 181(1). – P. 281–292. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
295. Wang, L. T cell immune memory after covid-19 and vaccination / L. Wang, A. Nicols, L. Turtle, A. Richter, C.J. Duncan, S.J. Dunachie, P. Klenerman, R.P. Payne // *BMJ Medicine*. – 2023. – Vol. 2(1). – e000468.
296. Wang, Q. Antigenicity and receptor affinity of SARS-CoV-2 BA.2.86 spike/ Q. Wang, Y. Guo, L. Liu, L.T. Schwanz, Z. Li, M.S. Nair, J. Ho, R.M. Zhang, S. Iketani, J. Yu, Y. Huang, Y. Qu, R. Valdez, A.S. Luring, Y. Huang, A. Gordon, H.H. Wang, L. Liu, D.D. Ho // *Nature*. – 2023. – Vol. 624 (7992). – P. 639–644.
297. Wang, Q. Key mutations in the spike protein of SARS-CoV-2 affecting neutralization resistance and viral internalization/ Q. Wang, S.B. Ye, Z.J. Zhou, A.L. Song, X. Zhu, J.M. Peng, R.M. Liang, C.H. Yang, X.W. Yu, X. Huang, J. Yu, Y. Qiu, X.Y. Ge // *Journal of Medical Virology*. – 2023. – Vol. 95(1). – e28407.
298. Wang, X. Neutralizing Antibody Responses to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Coronavirus Disease 2019 Inpatients and Convalescent Patients/ X. Wang, X. Guo, Q. Xin, Y. Pan, Y. Hu, J. Li, Y. Chu, Y. Feng, Q. Wang // *Clinical Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 71(10). – P. 2688-2694.
299. Wang, Z. Enhanced SARS-CoV-2 neutralization by dimeric IgA / Z. Wang, J.C.C. Lorenzi, F. Muecksch, S. Finkin, C. Viant, C. Gaebler, M. Cipolla, H.H. Hoffmann, T.Y. Oliveira, D.A. Oren, V. Ramos, L. Nogueira, E. Michailidis, D.F. Robbiani, A. Gazumyan, C.M. Rice, T. Hatziioannou, P.D. Bieniasz, M. Caskey, M.C. Nussenzweig // *Science Translational Medicine*. – 2021. – Vol. 13(577). – eabf1555.
300. Wang, Z. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection / Z. Wang, F. Muecksch, D. Schaefer-Babajew, S. Finkin, C. Viant, C. Gaebler, H.H. Hoffmann, C.O. Barnes, M. Cipolla, V. Ramos, T.Y. Oliveira, A.

- Cho, F. Schmidt, J. Da Silva, E. Bednarski, L. Aguado, J. Yee, M. Daga, M. Turroja, K.G. Millard, M. Jankovic, A. Gazumyan, Z. Zhao, C.M. Rice, P.D. Bieniasz, M. Caskey, T. Hatziioannou, M.C. Nussenzweig // *Nature*. – 2021. – Vol. 595(7867). – P. 426-431.
301. Watanabe, Y. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike / Y. Watanabe, J.D. Allen, D. Wrapp, J.S. McLellan, M. Crispin. // *Science*. – 2020. – Vol. 369(6501). – P. 330–333.
302. Weisblum, Y. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants / Y. Weisblum, F. Schmidt, F. Zhang, J. DaSilva, D. Poston, J.C. Lorenzi, F. Muecksch, M. Rutkowska, H.H. Hoffmann, E. Michailidis, C. Gaebler, M. Agudelo, A. Cho, Z. Wang, A. Gazumyan, M. Cipolla, L. Luchsinger, C.D. Hillyer, M. Caskey, D.F. Robbiani, C.M. Rice, M.C. Nussenzweig, T. Hatziioannou, P.D. Bieniasz // *Elife*. – 2020. – Vol. (9). – e61312.
303. Weiskopf, D. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome / D. Weiskopf, K.S. Schmitz, M.P. Raadsen, A. Grifoni, N.M.A. Okba, H. Endeman, J.P.C. van den Akker, R. Molenkamp, M.P.G. Koopmans, E.C.M. van Gorp, B.L. Haagmans, R.L. de Swart, A. Sette, R.D. de Vries // *Science Immunology*. – 2020. – Vol. 5(48). – eabd2071.
304. Weklak, D. Genetic and Chemical Capsid Modifications of Adenovirus Vectors to Modulate Vector-Host Interactions/ D. Weklak, D. Pembaur, G. Koukou, F. Jönsson, C. Hagedorn, F. Kreppel // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13(7). – e1300.
305. Wherry, E.J. Adaptive Immunity: Neutralizing, Eliminating, and Remembering for the Next Time / E.J. Wherry, D. Masopust // *Viral Pathogenesis (Third Edition), From Basics to Systems Biology*. – 2016. – P. 57-69.
306. Widge, A.T. Durability of Responses after SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccination / A.T. Widge, N.G. Rouphael, L.A. Jackson, E.J. Anderson, P.C. Roberts, M. Makhene, J.D. Chappell, M.R. Denison, L.J. Stevens, A.J. Pruijssers, A.B. McDermott, B. Flach, B.C. Lin, N.A. Doria-Rose, S. O'Dell, S.D. Schmidt, K.M. Neuzil, H. Bennett, B. Leav, M. Makowski, J. Albert, K. Cross, V.V. Edara,

- K. Floyd, M.S. Suthar, W. Buchanan, C.J. Luke, J.E. Ledgerwood, J.R. Mascola, B.S. Graham, J.H. Beigel; mRNA-1273 Study Group //New England Journal of Medicine. – 2021. – Vol. 384(1). – P. 80-82.
307. World Health Organization (WHO). Statement regarding cluster of pneumonia cases in Wuhan, China/ World Health Organization 2020. – Available at: <https://www.who.int/hongkongchina/news/detail/09-01-2020-who-statement-regarding-cluster-of-pneumonia-cases-in-wuhan-china>
308. World Health Organization (WHO). WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020/ 2 /World Health Organization 2020. – Available at: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
309. World Health Organization (WHO). First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin / World Health Organization 2021. – Available at: <https://www.who.int/groups/expert-committee-on-biological-standardization>
310. World Health Organization (WHO). The different types of COVID-19 vaccines / World Health Organization 2021. – Available at: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-race-for-a-covid-19-vaccine-explained>
311. World Health Organization (WHO). Tracking SARS-CoV-2 variants / World Health Organization 2021. – Available at: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
312. World Health Organization (WHO). Update on Omicron/ World Health Organization 2021. – Available at: <https://www.who.int/news/item/28-11-2021-update-on-omicron>
313. World Health Organization (WHO). WHO Target Product Profiles for COVID-19 Vaccines. Revised version April 2022/ World Health Organization 2022. – Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/who-target-product-profiles-for-covid-19-vaccines>
314. World Health Organization (WHO). WHO Director-General's opening remarks at the media briefing/ World Health Organization 2023. – Available at:

- <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing---5-may-2023>
315. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects // *JAMA*. – 2013. – Vol. 310(20). – P. 2191-2194.
 316. Wu, K. Serum Neutralizing Activity Elicited by mRNA-1273 Vaccine / K. Wu, A.P. Werner, M. Koch, A. Choi, E. Narayanan, G.B.E. Stewart-Jones, T. Colpitts, H. Bennett, S. Boyoglu-Barnum, W. Shi, J.I. Moliva, N.J. Sullivan, B.S. Graham, A. Carfi, K.S. Corbett, R.A. Seder, D.K. Edwards // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. – 384(15). – P. 1468-1470.
 317. Wu, S. Safety, tolerability, and immunogenicity of an aerosolised adenovirus type-5 vector-based COVID-19 vaccine (Ad5-nCoV) in adults: preliminary report of an open-label and randomised phase 1 clinical trial / S. Wu, J. Huang, Z. Zhang, J. Wu, J. Zhang, H. Hu, T. Zhu, J. Zhang, L. Luo, P. Fan, B. Wang, C. Chen, Y. Chen, X. Song, Y. Wang, W. Si, T. Sun, X. Wang, L. Hou, W. Chen // *Lancet Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 21(12). – P. 1654-1664.
 318. Xiao, K. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins / K. Xiao, J. Zhai, Y. Feng, N. Zhou, X. Zhang, J.J. Zou, N. Li, Y. Guo, X. Li, X. Shen, Z. Zhang, F. Shu, W. Huang, Y. Li, Z. Zhang, R.A. Chen, Y.J. Wu, S.M. Peng, M. Huang, W.J. Xie, Q.H. Cai, F.H. Hou, W. Chen, L. Xiao, Y. Shen // *Nature*. – 2020. – Vol. 583. – P. 286–289.
 319. Xiao, T. A trimeric human angiotensin-converting enzyme 2 as an anti-SARS-CoV-2 agent / T. Xiao, J. Lu, J. Zhang, R.I. Johnson, L.G.A. McKay, N. Storm, C.L. Lavine, H. Peng, Y. Cai, S. Rits-Volloch, S. Lu, B.D. Quinlan, M. Farzan, M.S. Seaman, A. Griffiths, B. Chen // *Nature Structural and Molecular Biology*. – 2021. – Vol. 28. – P. 202-209.
 320. Xu, Y. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding/ Y. Xu, X. Li, B. Zhu, H. Liang, C. Fang, Y. Gong, Q. Guo, X. Sun, D. Zhao, J. Shen, H. Zhang, H. Liu, H. Xia, J. Tang, K. Zhang, S. Gong // *Nature Medicine*. – 2020. – Vol. 26. – P. 502–505.

321. Younes, N. Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2 / N. Younes, D.W. Al-Sadeq, H. Al-Jighefee, S. Younes, O. Al-Jamal, H.I. Daas, H.M. Yassine, G.K. Nasrallah. *Viruses*. – 2020. – Vol. 12(6). – 582.
322. Yousefi, Z. Long-Term Persistence of Anti-SARS-COV-2 IgG Antibodies / Z. Yousefi, N. Taheri, M. Dargahi, R. Chaman, E. Binesh, M.H. Emamian, R. Jafari // *Current Microbiology*. – 2022. – Vol. 79(4). – P. 96.
323. Yu, X. Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors / X. Yu, T. Tsibane, P.A. McGraw, F.S. House, C.J. Keefer, M.D. Hicar, T.M. Tumpey, C. Pappas, L.A. Perrone, O. Martinez, J. Stevens, I.A. Wilson, P.V. Aguilar, E.L. Altschuler, C.F. Basler, J.E. Jr. Crowe // *Nature*. – 2008. – Vol. 455(7212). – P. 532-536.
324. Yuan, M. Structural Immunology of SARS-CoV-2/ M. Yuan, I.A. Wilson // *Immunological Reviews*. – 2025. – Vol. 329(1). – e13431.
325. Zhang, C. Protein Structure and Sequence Reanalysis of 2019-nCoV Genome Refutes Snakes as Its Intermediate Host and the Unique Similarity between Its Spike Protein Insertions and HIV-1 / C. Zhang, W. Zheng, X. Huang, E.W. Bell, X. Zhou, Y. Zhang. // *Journal of Proteome Research*. – 2020. – Vol. 19. – P. 1351–1360.
326. Zhang, J. One-Year Sustained Cellular and Humoral Immunities in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Convalescents / J. Zhang, H. Lin, B. Ye, M. Zhao, J. Zhan, S. Dong, Y. Guo, Y. Zhao, M. Li, S. Liu, H. Zhang, W. Xiao, Y. Guo, C. Yue, D. Zhang, M. Yang, J. Zhang, C. Quan, W. Shi, X. Liu, P. Liu, Y. Jiang, G. Wu, G.F. Gao, W.J. Liu // *Clinical Infectious Diseases*. – 2022. – Vol. 75(1). – e1072-e1081.
327. Zhang, J. Structure of SARS-CoV-2 spike protein / J. Zhang, T. Xiao, Y. Cai, B. Chen // *Current Opinion in Virology*. – 2021. – Vol. 50. – P. 173-182.
328. Zhang, Z. Humoral and cellular immune memory to four COVID-19 vaccines / Z. Zhang, J. Mateus, C.H. Coelho, J.M. Dan, C.R. Moderbacher, R.I. Gálvez, F.H. Cortes, A. Grifoni, A. Tarke, J. Chang, E.A. Escarrega, C. Kim, B. Goodwin, N.I. Bloom, A. Frazier, D. Weiskopf, A. Sette, S. Crotty // *Cell*. – 2022. – Vol. 185(14). – P. 2434-2451.e17.

329. Zhao, J. Recovery from the Middle East respiratory syndrome is associated with antibody and T-cell responses / J. Zhao, A.N. Alshukairi, S.A. Baharoon, W.A. Ahmed, A.A. Bokhari, A.M. Nehdi, L.A. Layqah, M.G. Alghamdi, M.M. Al Gethamy, A.M. Dada, I. Khalid, M. Boujelal, S.M. Al Johani, L. Vogel, K. Subbarao, A. Mangalam, C. Wu, P. Ten Eyck, S. Perlman, J. Zhao // *Science Immunology*. – 2017. – Vol. 2(14). – eaan5393.
330. Zhao, J. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients with Novel Coronavirus Disease 2019/ J. Zhao, Q. Yuan, H. Wang, W. Liu, X. Liao, Y. Su, X. Wang, J. Yuan, T. Li, J. Li, S. Qian, C. Hong, F. Wang, Y. Liu, Z. Wang, Q. He, Z. Li, B. He, T. Zhang, Y. Fu, S. Ge, L. Liu, J. Zhang, N. Xia, Z. Zhang // *Clinical Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 71(16). – P. 2027-2034.
331. Zhao, Z. COVID-19 Variants and Vaccine Development / Z. Zhao, S. Bashiri, Z.M. Ziora, I. Toth, M. Skwarczynski // *Viruses*. – 2024. –Vol. 16(5). – 757.
332. Zhu, F.C. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial / F.C. Zhu, X.H. Guan, Y.H. Li, J.Y. Huang, T. Jiang, L.H. Hou, J.X. Li, B.F. Yang, L. Wang, W.J. Wang, S.P. Wu, Z. Wang, X.H. Wu, J.J. Xu, Z. Zhang, S.Y. Jia, B.S. Wang, Y. Hu, J.J. Liu, J. Zhang, X.A. Qian, Q. Li, H.X. Pan, H.D. Jiang, P. Deng, J.B. Gou, X.W. Wang, X.H. Wang, W. Chen // *Lancet*. – 2020. – Vol. 396(10249). – P. 479-488.
333. Zhu, Y. Isolation of virus from a SARS patient and genome-wide analysis of genetic mutations related to pathogenesis and epidemiology from 47 SARS-CoV isolates / Y. Zhu, M. Liu, W. Zhao, J. Zhang, X. Zhang, K. Wang, C. Gu, K. Wu, Y. Li, C. Zheng, G. Xiao, H. Yan, J. Zhang, D. Guo, P. Tien, J. Wu // *Virus Genes*. – 2005. – Vol. 30(1). – P. 93–102.
334. Zuiani, A. Antibody Dynamics and Durability in Coronavirus Disease-19 / A. Zuiani, D.R. Wesemann// *Clinics in Laboratory Medicine*. – 2022. –Vol. 42(1). – P. 85–96.