

СОПОСТАВЛЕНИЕ РАЗНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ SARS-CoV-2

Афридонова З.Э.¹, Топтыгина А.П.^{1,2}, Боголюбова А.В.³,
Семикина Е.Л.^{4,5}

¹ ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁴ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁵ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Большинство методов оценки Т-клеточного иммунитета трудоемки и непригодны для рутинной лабораторной диагностики. Это стимулирует исследователей к созданию доступных и воспроизводимых тестов. Цель исследования — сопоставление трех методов оценки уровня клеточного иммунного ответа на антигены вируса SARS-CoV-2 у переболевших и привитых от новой корона-вирусной инфекции. Обследованы: 26 человек, перенесших COVID-19 в легкой или среднетяжелой форме (группа 1), 19 человек, дважды привитых «Спутником V», не болевших COVID-19 (группа 2), 21 человек, перенесший COVID-19 и дважды вакцинированных «Спутником V» (группа 3) и 14 человек, дважды перенесших COVID-19 (группа 4). Мононуклеары периферической крови выделяли градиентным центрифугированием. При оценке первым методом мононуклеары инкубированы с S-белком вируса SARS-CoV-2, окрашивали флуоресцентно мечеными антителами, затем на проточном цитометре BD FACS Canto II подсчитывали процент CD8^{high}CD107a⁺. При оценке методом ELISpot на наборе Human IFN-γ ELISpot продукцию IFNγ стимулировали S-белком SARS-CoV-2, или смесью пептидов белков SARS-CoV-2 на наборе Corona-T-test. По уровню экспрессии CD107a на CD8^{high} в группах 1, 2, 3 и 4 и количеству продуцентов IFNγ на S-белок вируса SARS-CoV-2 на наборе Human IFN-γ ELISpot значимых различий не обнаружено. Продукция IFNγ группы 3 (гибридный иммунитет) значимо ниже (317,29±19,04 пг/мл) групп 1 и 2 (постинфекционный и поствакцинальный иммунитет) 454,95±20,32 и 470,77±26,24 пг/мл. Относительный уровень IFNγ-продуцирующих клеток в группе 2 был выше (22,34±3,77) против 16,83±2,35 в группе 1 и 15,46±1,83 в группе 3, относительный уровень продукции IFNγ в этих группах не различался. Стимуляция полноразмерным S-белком об-наружила значимое снижение количества пятен в группе 4 (прорывной иммунитет) 30,59±2,29 про-

Адрес для переписки:

Топтыгина Анна Павловна
ФБУН «Московский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии
имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.
Тел.: 8 (495) 452-18-01.
Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Address for correspondence:

Anna P. Toptygina
G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology
and Microbiology
10 Adm. Makarov St
Moscow
125212 Russian Federation
Phone: +7 (495) 452-18-01.
Fax: +7 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Образец цитирования:

З.Э. Афридонова, А.П. Топтыгина, А.В. Боголюбова,
Е.Л. Семикина «Сопоставление разных методов
оценки клеточного иммунитета к вирусу
SARS-CoV-2» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25,
№ 6. С. 1431-1440. doi: 10.15789/1563-0625-COD-2640

© Афридонова З.Э. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

Z.E. Afridonova, A.P. Toptygina, A.V. Bogolyubova,
E.L. Semikina "Comparison of different techniques for
evaluation of cellular immunity to SARS-CoV-2 virus",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2023, Vol. 25, no. 6, pp. 1431-1440.

doi: 10.15789/1563-0625-COD-2640

© Afridonova Z.E. et al., 2023

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-COD-2640

тив $58,97 \pm 4,47$ в группе 3, а стимуляция смесью пептидов SARS-CoV-2 в группе 4 по сравнению с группой 3 выявила значимое повышение количества IFN γ -продуцирующих клеток $86,72 \pm 7,20$ против $69,38 \pm 5,53$ и продукции IFN γ $991,25 \pm 65,18$ пг/мл против $760,76 \pm 50,70$ пг/мл и в относительном выражении, $10,30 \pm 2,77$ против $8,61 \pm 2,66$ и $68,10 \pm 9,41$ против $48,35 \pm 8,15$ соответственно. Результаты трех методов оценки клеточного иммунного ответа положительно, но с разной силой коррелируют между собой.

Ключевые слова: клеточный иммунитет, SARS-CoV-2, гибридный иммунитет, прорывной иммунитет, ELISpot, цитотоксические лимфоциты, CD8⁺

COMPARISON OF DIFFERENT TECHNIQUES FOR EVALUATION OF CELLULAR IMMUNITY TO SARS-CoV-2 VIRUS

Afridonova Z.E.^a, Toptygina A.P.^{a, b}, Bogolyubova A.V.^c, Semikina E.L.^{d, e}

^a G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^c National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

^d National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

^e I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Most techniques for evaluation of T-cell immunity are laborious and unsuitable for routine laboratory diagnostics, thus encouraging researchers to look for accessible and reproducible tests. The purpose of our study is to compare three methods aimed for evaluation of cellular immune response levels to the SARS-CoV-2 viral antigens in patients who have been ill and vaccinated against a new coronavirus infection. We have examined 26 persons who experienced mild or moderate COVID-19 (group 1); 19 people vaccinated twice with Sputnik V, who did not have clinical COVID-19 (group 2); 21 subjects who had COVID-19 and were twice vaccinated with Sputnik V (group 3), and 14 persons who had COVID-19 twice (group 4). Peripheral blood mononuclear cells were isolated by gradient centrifugation. The first tested technique was performed as follows: the mononuclear cells were incubated with the S-protein of the SARS-CoV-2 virus, and stained with fluorescently labeled antibodies. The percentage of CD8^{high}CD107a was counted by means of BD FACS Canto II flow cytometer. When assessed by the ELISpot method with "Human IFN- γ ELISpot" kit, IFN γ production was stimulated by SARS-CoV-2 S-protein, or a mixture of SARS-CoV-2 protein peptides in the "Corona-T-test" kit. There were no significant differences in the levels of CD107a expression on CD8^{high} cells between the groups 1, 2, 3, and 4, as well as in amounts of IFN γ producers against SARS-CoV-2 S-protein when using "Human IFN- γ ELISpot" kit. Production of IFN was significantly lower in group 3 (hybrid immunity), i.e., 317.29 ± 19.04 pg/ml compared to groups 1 and 2 (post-infection and post-vaccination immunity), i.e., 454.95 ± 20.32 and 470.77 ± 26.24 pg/ml, respectively. The relative level of IFN γ -producing cells in group 2 was higher (22.34 ± 3.77) versus 16.83 ± 2.35 in group 1, and 15.46 ± 1.83 in group 3, whereas the relative levels of IFN γ did not differ in these groups. Stimulation with full-length S-protein showed a significant reduction in the number of spots in group 4 (breakthrough immunity), i.e., 30.59 ± 2.29 vs 58.97 ± 4.47 in group 3. Stimulation with a mixture of SARS-CoV-2 peptides in group 4 vs group 3 revealed a significantly increased number of IFN γ -producing cells (86.72 ± 7.20 versus 69.38 ± 5.53) and higher IFN γ production (991.25 ± 65.18 pg/ml versus 760.76 ± 50.70 pg/ml). Appropriate relative values were as follows: 10.30 ± 2.77 versus 8.61 ± 2.66 , and 68.10 ± 9.41 versus 48.35 ± 8.15 , respectively. The results of three methods for evaluation of cellular immune response correlate positively with each other, but at different significance levels.

Keywords: cellular immunity, SARS-CoV-2, hybrid immunity, breakthrough immunity, ELISpot, cytotoxic lymphocytes, CD8⁺ cells

Введение

Характерными признаками адаптивного иммунитета являются антигенная специфичность и иммунологическая память. Способность создавать долговременную иммунологическую память обеспечивает уникальный механизм защиты хозяина при последующих контактах с вирусом [28]. В зависимости от особенностей функционирования гуморального и клеточного адаптивного им-

мунитета у конкретного больного формируются клинические варианты и исходы заболевания, включая и COVID-19 [10].

Ключевая роль в элиминации вируса принадлежит цитотоксическим CD8⁺ лимфоцитам. При COVID-19 CD8⁺ клетки препятствуют репликации вируса в дыхательных путях. Именно CD8⁺ лимфоцит распознает зараженные вирусом клетки и либо контактным путем через взаимодействие FAS-FASL, либо за счет выброса со-

держимого цитотоксических гранул индуцирует апоптоз таких клеток, уничтожая также реплицирующийся вирус. CD4⁺T-хелперы координируют противовирусный иммунный ответ. Медиатором противовирусного ответа считают IFN γ , который усиливает фагоцитоз макрофагами апоптотических клеток и вирусов, нейтрализованных антителами. Ответ CD4⁺T-хелперов отличается в зависимости от вида вируса, в некоторых случаях реакция является защитной, в других случаях она может быть даже опасной для макроорганизма [6]. Функциональная активность иммунных клеток определяется скоординированной активностью сигнальных путей [8]. Измерение функционального состояния клеточного иммунного ответа в образце крови пациента способно улучшить прогнозирование клинического исхода заболевания или сохранения симптомов (длительный COVID), поддержать разработку вакцин и безопасных иммуномодулирующих методов лечения [13]. Пр продемонстрированы формирование иммунологической памяти Т-клеток и эффекторных реакции против широкого спектра эпитопов вируса SARS-CoV-2 [9, 14, 22, 24, 29].

Оценка противовирусного Т-клеточного ответа является крайне важным аспектом изучения адаптивного иммунитета в дополнение к серологическим тестам. Большинство анализов на Т-клетки трудоемки и непригодны для рутинной лабораторной диагностики. Ввиду отсутствия единой системы тестирования характеристик клеточного иммунного ответа против SARS-CoV-2 многими исследовательскими группами предприняты усилия по созданию доступных и воспроизводимых тестов [15, 17]. Количество и функции лимфоцитов исследуют в анализе с предельным разведением (Limiting dilution assay), внутриклеточным окрашиванием цитокинов (Intracellular Cytokine Staining), методом тетрамеров [11] и ELISpot [27]. По чувствительности анализ ELISpot превосходит другие методы определения антигенспецифических лимфоцитов [19]. Чувствительность ELISpot позволяет обнаружить антигенспецифичные Т-клетки, которые секретируют цитокины и эффекторные молекулы, такие как гранзим В и перфорин [19]. Мониторинг цитотоксических клеток с помощью ELISpot — золотой стандарт для оценки антигенспецифического Т-клеточного иммунитета в клинических испытаниях вакцинных препаратов. Наиболее часто используемым анализом ELISpot является тест на IFN γ [19, 20, 25]. ELISpot может быть применен для определения разных субпопуляций активированных Т-клеток с использованием цитокинов, таких как Th1 (цитокины IFN γ , IL-2, IL-12, и TNF α), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13) и Th17 (IL-17). Однако IFN γ синтезируют Th1, CD8⁺ цитотоксические лимфоциты, NK- и NKT-клетки [21], а выделение CD8⁺ субпопуляции приводит к большим потерям клеток, как и

пермеабилзация для внутриклеточного окрашивания, а использование тетрамеров рестрицировано по HLA, что делает этот тест непригодным для популяционных исследований.

Мы также попытались внести свой вклад, используя хорошо известную способность CD8⁺ клеток при распознавании вирусных пептидов в составе МНС-I на поверхности зараженной клетки формировать синапс и выбрасывать перфорин и гранзимы в синаптическую щель. В этот момент на поверхности такой CD8⁺ клетки оказывается молекула CD107a [5]. Экспрессия молекулы CD107a может выступать в качестве маркера дегрануляции CD8⁺ клеток после антигенспецифической стимуляции [12]. Мы апробировали такой подход к исследованию Т-клеточного иммунитета при исследовании ответа на антигены вирусов кори, краснухи и эпидемического паротита [2, 3].

Целью нашего исследования было сопоставление трех методов оценки уровня клеточного иммунного ответа на антигены вируса SARS-CoV-2 у переболевших и привитых от новой коронавирусной инфекции.

Материалы и методы

С сентября 2021 г. по май 2022 г. было проведено простое открытое сравнительное обследование 80 взрослых добровольцев. Из них 26 человек перенесли COVID-19 в легкой или среднетяжелой форме, имели ПЦР-подтвержденный клинический диагноз заболевания давностью от 2 до 12 мес. (постинфекционный иммунитет, группа 1); 19 человек были дважды привиты «Спутником V» и не болели COVID-19, срок от первой прививки от 3 до 9 мес. (поствакцинальный иммунитет, группа 2); 21 человек перенесли COVID-19 и были дважды вакцинированы «Спутником V» (гибридный иммунитет, группа 3); 14 человек перенесли COVID-19 дважды: первый раз в 2020-2021 гг. и повторно — в январе-феврале 2022 г. (штамм «Омикрон»), они составили группу 4 (прорывной иммунитет). Кровь из локтевой вены брали утром натощак в вакуумную пробирку с гепарином 4 мл. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (протокол № 58), обследованные подписывали информированное согласие.

Мононуклеары периферической крови выделяли с помощью центрифугирования на градиенте плотности фиколл-верографин, $\rho = 1,077$ (ООО «ПанЭко», РФ), отмывали центрифугированием и добавляли 1 мл среды RPMI-1640 с добавлением 2 mM L-глутамин, гентамицин и 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Суспензию мононуклеаров делили на 3 порции. Клеточный иммунитет на антигены вируса SARS-CoV-2 определяли тремя разными способами.

Первый способ: мононуклеары вносили по $2,5 \times 10^5$ на лунку, в лунки 96-луночной стериль-

ной панели (отрицательный контроль), добавляли раствор моненсина в конечной концентрации 10 мкМ и моноклональные антитела к антигену CD107a-PE-Cy5 в конечном разведении 1:100, конечный объем в лунке составил 200 мкл. Для стимуляции мононуклеаров S-антигеном вируса SARS-CoV-2 использовали лунки панели от набора для определения антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 методом ИФА, в которых на дно лунок сорбирован полноразмерный S-белок, согласно инструкции производителя. Использован набор «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Перед началом эксперимента лунки были простерилизованы с помощью ультрафиолетового облучения в стерильных условиях в течение 30 минут. Пробы инкубировали при 37 °C во влажной атмосфере и 5% CO₂ 20 часов. По окончании инкубации клетки ресуспендировали, переносили в пробирки для проточной цитометрии и отмывали центрифугированием (300g 5 мин) в растворе CellWash.

Затем клетки окрашивали антителами к антигену CD8-FITC 20 минут в темноте при 4 °C, повторно отмывали при тех же условиях, и фенотипировали с помощью проточного цитометра BD FACS Canto II (технологии и программное обеспечение Becton Dickinson, США). Для анализа выделяли лимфоидный гейт, в нем в режиме FITC-SSS выделяли гейт 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 (рис. 1). 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 [4].

Второй способ: оценка клеточного иммунитета методом ELISpot. Мононуклеары для кон-

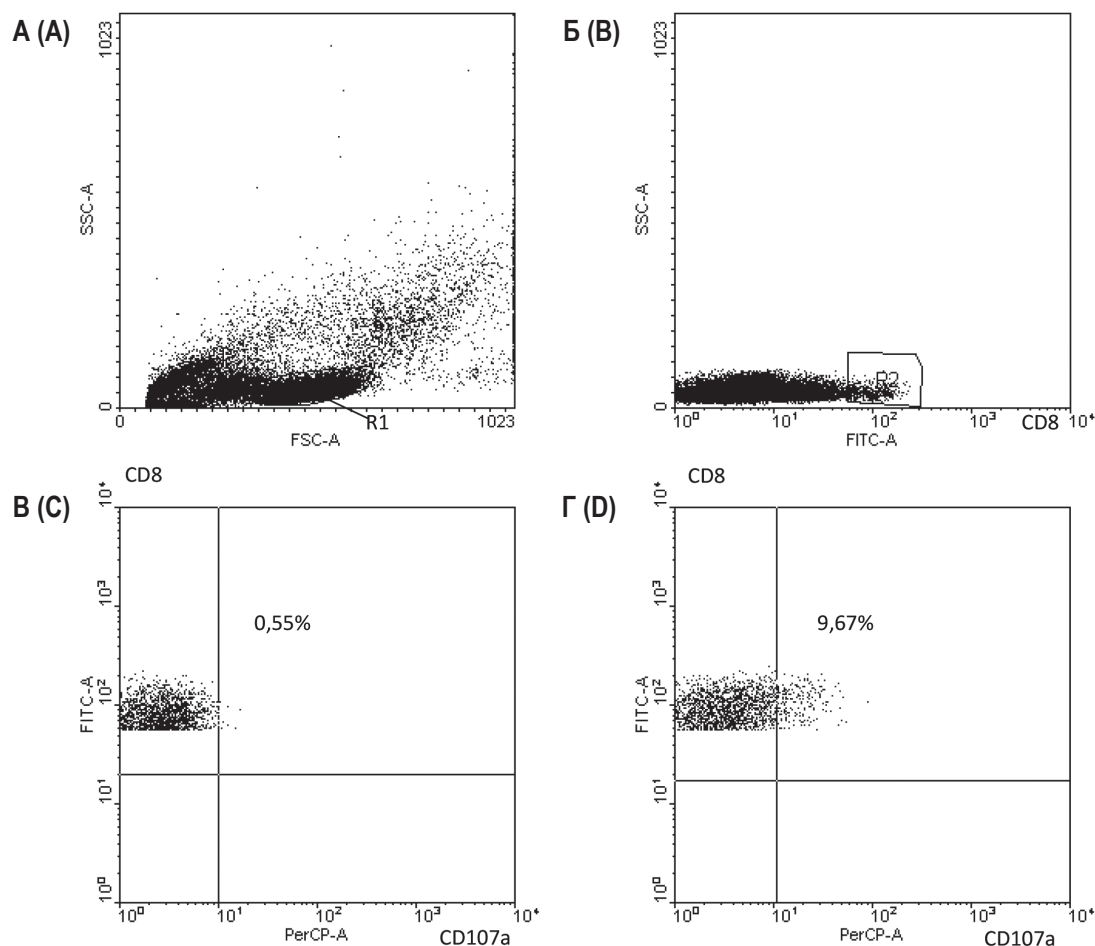


Рисунок 1. Пример оценки клеточного иммунитета по экспрессии CD107a на CD8^{hi} лимфоцитах

Примечание. А – выделение лимфоидного гейта R1. Б – выделение гейта CD8^{hi} R2. В – спонтанная экспрессия CD107a на CD8^{hi} лимфоцитах. Г – индуцированная S-белком экспрессия CD107a на CD8^{hi} лимфоцитах.

Figure 1. Example of cellular immunity study by CD107a expression on CD8^{hi} lymphocytes

Note. A, Determination of the lymphoid gate R1. B, Selection of the gate CD8^{hi} R2. C, Spontaneous expression of CD107a on CD8^{hi} lymphocytes. D, S-protein-induced expression of CD107a on CD8^{hi} lymphocytes.

контрольной пробы ($2,5 \times 10^5$ на лунку) вносили в лунку стрипа от 96-луночной панели стандартного набора для определения продукции IFN γ методом ELISpot (Human IFN- γ ELISpot, Mabtech, Швеция). Мононуклеары опытной пробы стимулировали S-антигеном, как описано выше (для первого способа определения клеточного иммунитета). Клетки инкубировали 4 часа при 37 °C во влажной атмосфере и 5% CO $_2$. В предварительных опытах было показано, что этого времени достаточно для того, чтобы моноциты собрали антиген. Далее мононуклеары тщательно ресуспендировали и переносили в лунки стрипа от набора для ELISpot и продолжали инкубировать при тех же условиях еще 16 часов. По окончании инкубации содержимое лунок удаляли и промывали 5 раз забуференным фосфатами физиологическим раствором (ЗФР) по 20 мкл на лунку. Конъюгат разводили 1:200 в бессывороточной среде RPMI-1640, добавляли по 100 мкл на лунку и инкубировали 2 часа при комнатной температуре, снова промывали 5 раз ЗФР. Готовый ТМБ-субстрат добавляли по 100 мкл на лунку и инкубировали при комнатной температуре до появления видимых пятен, согласно инструкции производителя. После этого жидкость из лунок удаляли, промывали 2 раза деионизированной водой, затем проточной водой. После этого снимали поддон и промывали мембрану с обратной стороны. Сушили стрипы на фильтровальной бумаге в темноте при комнатной температуре.

Третий способ: оценка клеточного иммунитета также методом ELISpot, с использованием набора реагентов для определения Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2 Corona-T-test (ФГБУ «НМИЦ гематологии», Россия) [25], специально разработанном для оценки клеточного иммунитета к пептидам белка вируса SARS-CoV-2. Для стимуляции Т-лимфоцитов в этом наборе используют смесь пептидов из белков коронавируса. Постановка теста осуществлялась в нашей модификации. Для проведения теста мононуклеары вносили в лунки стрипа 96-луночной панели, входящей в набор ($2,5 \times 10^5$ на лунку) в контрольной лунке клетки инкубировали в культуральной среде, а в опытную лунку добавляли смесь пептидов белков вируса SARS-CoV-2 в конечной концентрации 1 μ M/мл и инкубировали при 37 °C во влажной атмосфере и 5% CO $_2$ 20 часов. По окончании инкубации содержимое лунок удаляли и промывали 5 раз 200 мкл ЗФР, добавляли по 50 мкл на лунку раствор А, содержащий антитела к IFN γ , конъюгированные с биотином, и инкубировали 2 часа при комнатной температуре в темноте, снова промывали 5 раз ЗФР. Затем раствор В, содержащий концентрированный раствор стрептавидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой, разводили 1:100 буфером В, добавляли по 50 мкл в каждую лунку, инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте и

промывали 5 раз ЗФР, а затем 2 раз дистиллированной водой. Добавляли раствор С, содержащий субстрат для щелочной фосфатазы BCIP/NBT+, по 50 мкл, инкубировали 15 мин в темноте и промывали дистиллированной, а затем проточной водой. После этого снимали поддон и промывали мембрану с обратной стороны. Сушили стрипы на фильтровальной бумаге в темноте при комнатной температуре.

Подсчет сформировавшихся пятен для метода 2 и 3 осуществляли с помощью автоматизированного ELISpot-ридера AID (AID GmbH, Германия) (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки). Программное обеспечение позволяет посчитать не только количество пятен на дне лунки, но также подсчитать их суммарную площадь и интенсивность окраски и рассчитать с помощью встроенных алгоритмов концентрацию IFN γ в каждой лунке.

Результаты исследования были подвергнуты статистической обработке. Для всех параметров было проведено исследование на нормальность распределения методом Колмогорова–Смирнова. Данные представлены в виде средней арифметической и ее ошибки ($M \pm SE$). Для сравнения групп использовали t-критерий. Уровень $p < 0,05$ считали значимым. Корреляции рассчитывали по методу Пирсона.

Результаты

Ранее было показано, что спонтанный уровень экспрессии молекулы CD107a на CD8^{high} лимфоцитах при определении клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 не превышает уровень cut off = 1% [4]. Аналогичные результаты были получены для контрольной пробы, и в настоящем исследовании уровень клеточного иммунитета, оцененного с помощью способа 1, представлен в процентах. Для методов 2 и 3, основанных на ELISpot, спонтанный уровень составил $7,65 \pm 0,87$ пятен на лунку. Результаты, полученные для разных обследованных лиц, различались. В связи с этим результаты, полученные методом ELISpot, были представлены двумя способами: за вычетом спонтанного уровня для каждого обследованного и как отношение опытного к контрольному уровню для каждого испытуемого (относительный показатель). Следует также отметить, что результаты, полученные методом ELISpot на двух разных тест-системах, несколько различались по методике проявления пятен. Объективно сложилось так, что оценка клеточного иммунитета в группах 1, 2 и половины группы 3 была осуществлена на тест-наборе Human IFN- γ ELISpot только вторым способом, а вторая половина группы 3 и группа 4 — на тест-наборе Corona-T-test вторым и третьим способом. Уровень ответа на этих наборах различался, поэтому мы провели анализ результатов, полученных на разных тест-наборах отдельно.

В таблице 1 представлены результаты для тех обследованных, которые были получены на наборе Human IFN- γ ELISpot. Из таблицы видно, что результаты, полученные при оценке экспрессии CD107a на CD8^{high} лимфоцитах (первый способ оценки), который характеризует субпопуляцию цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов, способных распознать антигенные детерминанты S-белка вируса SARS-CoV-2 и ответить атакой с выбросом содержимого цитотоксических гранул, в группах 1, 2 и 3 значимо не различаются. По количеству пятен, т. е. клеток, ответивших синтезом IFN γ на S-белок вируса SARS-CoV-2, различий также нет. Однако по продукции IFN γ группа 3 (гибридный иммунитет) значимо отличается ($317,29 \pm 19,04$ пг/мл) от групп 1 и 2 (постинфекционный и поствакцинальный иммунитет) $454,95 \pm 20,32$ и $470,77 \pm 26,24$ пг/мл соответственно ($p = 0,048$). При анализе результатов ELISpot в относительном выражении выявлено значимое превышение уровня IFN γ -продуцирующих клеток в группе 2 (поствакцинальный иммунитет) $22,34 \pm 3,77$ против $16,83 \pm 2,35$ в группе 1 и $15,46 \pm 1,83$ в группе 3 ($p = 0,033$). В то же время по уровню продукции IFN γ различия не были выявлены.

В таблице 2 представлены результаты, полученные на наборе Corona-T-test и всеми тремя способами. Из таблицы видно, что при оценке клеточного иммунитета по экспрессии CD107a на CD8^{high} лимфоцитах имеется тенденция на повышение уровня ответа в группе 4 (прорывной иммунитет), однако эти различия не значимы. При оценке клеточного иммунитета вторым способом (стимуляция полноразмерным S-белком) обнаружено значимое снижение количества пятен в

группе 4 $30,59 \pm 2,29$ против $58,97 \pm 4,47$ в группе 3 ($p = 0,0034$), по концентрации IFN γ это снижение также проявляется ($p < 0,05$). Интересно, что при относительном расчете различий между группами не выявлено. При использовании для стимуляции клеточного ответа смеси пептидов (третий способ) выявлено значимое повышение количества пятен в группе 4 по сравнению с группой 3 ($p < 0,05$), и также по продукции IFN γ ($p = 0,043$). При относительном выражении результатов обнаружена тенденция на увеличение количества пятен в группе 4 по сравнению с группой 3: $10,30 \pm 2,77$ и $8,61 \pm 2,66$ и значимое повышение продукции IFN γ $68,10 \pm 9,41$ и $48,35 \pm 8,15$ ($p = 0,047$).

Из-за различий в использованных тест-системах для ELISpot, невозможно корректно сравнить группу 4 (прорывной иммунитет) с группой 1 (постинфекционный иммунитет), хотя это было бы очень интересно. Однако поскольку группа 3 была представлена для анализа на обеих тест-системах, хотя это разные люди, с большой степенью натяжки можно отметить, что группа 3 на тест-системе Corona-T-test имеет при стимуляции полноразмерным S-белком несколько меньшее количество пятен ($58,97 \pm 4,47$), чем на тест-системе Human IFN- γ ELISpot ($80,04 \pm 5,87$). Если принять такую тенденцию, то в группе 4 мы выявили бы значимо меньшее количество пятен, чем в группе 1 ($p = 0,012$). При этом по продукции IFN γ в группе 3, определенной двумя разными методами, различий нет. При таком допущении продукция IFN γ в ответ на стимуляцию S-белком в группе с прорывным иммунитетом была бы значимо ниже, чем в группе с постинфекционным ($p = 0,047$). При относительной оценке количе-

ТАБЛИЦА 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПО ЭКСПРЕССИИ CD107a НА CD8^{high} ЛИМФОЦИТАХ И МЕТОДОМ ELISPOT ПРИ ИНДУКЦИИ S-БЕЛКОМ SARS-CoV-2

TABLE 1. DETERMINATION OF CELLULAR IMMUNITY BY EXPRESSION OF CD107a ON CD8^{high} LYMPHOCYTES AND BY THE ELISPOT METHOD UPON INDUCTION BY SARS-CoV-2 S-PROTEIN

Группа Group	CD8 ⁺ CD107a ⁺ , %	ELISpot, абсолютное количество ELISpot, absolute value	IFN γ , пг/мл IFN γ , pg/mL	ELISpot, относительное количество ELISpot, relative value	IFN γ , относительное количество IFN γ , relative value
Группа 1 Group 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 Group 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 Group 3	$9,31 \pm 1,32$	$80,04 \pm 5,87$	$317,29 \pm 19,04^*$	$15,46 \pm 1,83$	$45,64 \pm 8,84$

Примечание. * $p < 0,05$.

Note. * $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 2. СОПОСТАВЛЕНИЕ ТРЕХ СПОСОБОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ SARS-CoV-2

TABLE 2. COMPARISON OF THREE METHODS FOR DETERMINING CELLULAR IMMUNITY TO THE SARS-CoV-2 VIRUS

Группа Group	Способ 1 Method 1 S-белок S-protein	Способ 2 Method 2 S-белок S-protein				Способ 3 Method 3 Пептиды Peptides			
	CD8 ⁺ CD107a ⁺ , %	ELISpot, абсолютное количество ELISpot, absolute value	IFN γ , пг/мл IFN γ , pg/mL	ELISpot, относительное количество ELISpot, relative value	IFN γ , относительное количество IFN γ , relative value	ELISpot, абсолютное количество ELISpot, absolute value	IFN γ , пг/мл IFN γ , pg/mL	ELISpot, относительное количество ELISpot, relative value	IFN γ , относительное количество IFN γ , relative value
Группа 3 Group 3	10,04 \pm 1,37	58,97 \pm 4,47	361,68 \pm 18,84	7,48 \pm 1,13	46,63 \pm 9,37	69,38 \pm 5,53	760,76 \pm 50,70	8,61 \pm 2,66	48,35 \pm 8,15
Группа 4 Group 4	12,27 \pm 2,51	30,59 \pm 2,29*	267,52 \pm 17,38*	5,79 \pm 0,81	34,06 \pm 8,69	86,72 \pm 7,20*	991,25 \pm 65,18*	10,89 \pm 2,77	68,10 \pm 9,41*

Примечание. * $p < 0,05$.

Note. * $p < 0.05$.

ство пятен в группе 3 на тест-системе Corona-T-test ниже в 2 раза, и при таком допущении в группе 4 было бы обнаружено значимое снижение по сравнению с группой 1 ($p = 0,048$), а по отношению уровней IFN γ различия были бы не значимы. Однако следует подчеркнуть, что сопоставление групп 1 и 4 чисто расчетные, поскольку результаты были получены на разных тест-системах.

Расчет корреляций Пирсона не выявил значимых корреляций между уровнями клеточного иммунного ответа, измеренного тремя исследованными нами способами, за исключением умеренной положительной корреляции ($r = 0,341$) между относительным количеством пятен, индуцированных пептидным комплексом и полноразмерным S-белком. В то же время выявлена сильная положительная корреляционная связь между количеством пятен и уровнем продукции IFN γ при стимуляции полноразмерным S-белком ($r = 0,79$) и очень сильная положительная корреляция при стимуляции пептидным комплексом ($r = 0,95$).

Обсуждение

В нашем исследовании мы сопоставили три разных способа оценки клеточного иммунитета на антигенные детерминанты вируса SARS-CoV-2 у 4 групп обследованных с разной историей контакта с новой коронавирусной инфекцией. Следует подчеркнуть, что первый из использованных нами способов позволяет подсчитать процент цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов, способных

распознать антигенные детерминанты S-белка коронавируса и ответить атакой с выбросом содержимого цитотоксических гранул [7]. Эта реакция является основной защитной реакцией клеточного иммунитета, позволяющей выявить и уничтожить зараженные коронавирусом клетки организма. В результате уничтожается размножающийся в клетках вирус и его компоненты, и организм очищается от вируса. При оценке результатов, полученных этим методом, можно видеть, что уровень поствакцинального клеточного иммунитета не отличается от постинфекционного, а повторная стимуляция (гибридный и прорывной иммунитет) не приводит к серьезному изменению уровня клеточной защиты.

При оценке клеточного иммунитета методом ELISpot по продукции IFN γ выявляется суммарный эффект, поскольку IFN γ могут синтезировать Th1-хелперы, цитотоксические CD8⁺ лимфоциты, NK-клетки, NKT-клетки и $\gamma\delta$ T-клетки. При этом NK, NKT-клетки и $\gamma\delta$ T-клетки, по видимому, проявляют себя в тесте как спонтанные продуценты IFN γ , тогда как Th1-хелперы и цитотоксические CD8⁺ лимфоциты способны распознать антигенные детерминанты S-белка коронавируса и являются индуцированными продуцентами IFN γ [16]. Следует отметить, что хелперов в крови в принципе больше, чем цитотоксических клеток, Th1 являются более мощными продуцентами IFN γ , чем CD8⁺ лимфоциты и далеко не все цитотоксические лимфоциты, распознавшие антиген, продуцируют IFN γ [21]. Более того, IFN γ не оказывает прямого противо-

вирусного действия. Он является своеобразным дирижером, организатором противовирусного ответа, активируя клетки адаптивного и врожденного иммунитета на борьбу с вирусом. Поэтому продукция $IFN\gamma$ является лишь косвенным свидетелем активации клеточного ответа и не коррелирует прямо с эффективностью клеточной защиты от вируса. Тем не менее метод ELISpot для оценки клеточного иммунитета весьма популярен в западных публикациях, предлагаются различные его модификации [8, 18, 26]. Мы сопоставили 2 варианта этого метода, где индукторами клеточного иммунного ответа были смесь пептидов белков вируса SARS-CoV-2 или полноразмерный S-белок коронавируса. Оказалось, что при индукции полноразмерным S-белком в группах с гибридным и прорывным иммунитетом продукция $IFN\gamma$ ниже, чем в группах с постинфекционным и поствакцинальным иммунитетом. Возможно, эти различия связаны с интенсивным процессом мутации коронавируса. Привитые и болевшие в начале пандемии отвечали на уханьский вариант S-белка, и именно этот вариант использовался для стимуляции клеточного иммунитета, тогда как у людей с гибридным и прорывным иммунитетом штаммы при первичной и повторной встрече с коронавирусом могли сильно различаться. При этом доминантные клоны, сформированные на первый контакт, могут оказаться минорными при повторной встрече с антигеном. Стимуляция S-белком уханьского штамма может оказаться не столь эффективной. В то же время при стимуляции комплексом пептидов, специально подобранными наиболее иммуногенными и консервативными последовательностями из разных белков вируса SARS-CoV-2, выявлено значимое превышение количества пятен и продукции $IFN\gamma$ в группе с прорывным иммунитетом. Такая дихотомия результатов может свидетельствовать о сужении спектра антигенспецифических клонов Т-лимфоцитов при повторных встречах с измененными мутациями штаммами вируса. С другой стороны, клеточные ответы на антигенные пептиды более консервативных белков коронавируса, например, N-белка, могут оказываться более значимыми при повторных контактах с вирусом, чем ответы на подверженный частым мутациям S-белок.

Не было выявлено корреляции уровня клеточного иммунитета, определенного по экспрессии CD107a на $CD8^{high}$ лимфоцитах с результатами, полученными методом ELISpot, что, по-видимому, связано с различиями в клеточных субпопуляциях, ответ которых определяется этими методами. Корреляция между индукцией иммунного ответа комплексом пептидов и полноразмерным S-белком была положительная, но умеренной силы, что объясняется разным составом пептидов, который презентируют моноциты при этих двух разных способах стимуляции. Сильная положительная корреляция между количеством пятен и уровнем $IFN\gamma$ вполне понятна. Однако она менее 1, поскольку есть образцы, в которых сформировано много очень мелких пятен, а есть другой вариант, когда пятен не так много, но они крупные и интенсивно окрашены (рис. 2Б, Г; см. 2-ю стр. обложки).

Заключение

Таким образом, можно заключить, что клеточный иммунный ответ имеет индивидуальные черты у разных людей. Отсутствие общепризнанного метода оценки Т-клеточного иммунитета, такого, как иммуноферментный анализ для оценки гуморального иммунитета, и трудоемкость известных методов стимулирует многих авторов к сопоставлению этих методов [18, 20, 24, 26]. Также предпринимаются попытки разработки тестов более подходящих для оценки клеточного иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2 [1, 23]. Результаты, полученные разными методами, коррелируют между собой в той или иной степени, однако все еще не удается прийти к консенсусу относительно метода оценки Т-клеточного иммунитета на антигены. Тем не менее исследование Т-клеточного иммунитета крайне важно для оценки противовирусного иммунного ответа.

Благодарности

Разработка используемого в исследовании набора реагентов для определения Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2 Corona-T-test была осуществлена при финансовой поддержке гранта Российского Научного Фонда № 20-15-00395.

Список литературы / References

1. Потеряев Д.А., Аббасова С.Г., Игнатьева П.Е., Стрижакова О.М., Колесник С.В., Хамитов Р.А. Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против COVID-19 лиц с помощью ELISPOT набора Tigratest[®] SARS-CoV-2 // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение, 2021. Т. 21, № 3. С. 178-192. [Poteryaev D.A., Abbasova S.G., Ignatieva P.E., Strizhakova O.M., Kolesnik S.V., Khamitov R.A. Evaluation of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in recovered patients and vaccinated against COVID-19 using the Tigratest[®] SARS-CoV-2 ELISPOT kit. *BIOpreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lecheniye = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2021, Vol. 21, no. 3, pp. 178-192. (In Russ.)]
2. Смердова М.А., Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Сенникова С.В., Зеткин А.Ю., Клыкова Т.Г., Беляков С.И. Гуморальный и клеточный иммунитет к антигенам вирусов кори и краснухи у здоровых людей // Инфекция и иммунитет, 2019. Т. 9, № 3-4. С. 607-611. [Smerdova M.A., Toptygina A.P., Andreev Yu.Yu.,

Sennikova S.V., Zetkin A.Yu., Klykova T.G., Belyakov S.I. Humoral and cellular immunity to measles and rubella virus antigens in healthy subjects. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, Vol. 9, no. 3-4, pp. 607-611. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-607-611.

3. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Алешкин В.А. Формирование и поддержание специфического клеточного ответа на вакцинацию «Приорикс» // Иммунология, 2013. Т. 34, № 5. С. 257-261. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Alioshkin V.A. The shaping and the maintenance of T-cell specific immune response to vaccination Priorix. *Immunologiya = Immunology*, 2013, Vol. 34, no. 5, pp. 257-261. (In Russ.)]

4. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Закиров Р.Ш., Афридонова З.Э. Сопоставление гуморального и клеточного иммунитета у переболевших COVID-19 // Инфекция и иммунитет, 2022. Т. 12, № 3. С. 495-504. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Zakirov R.Sh., Afridonova Z.E. Comparison of the humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescents. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, no. 3, pp. 495-504. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-COT-1809.

5. Aktas E., Kucuksezer U.C., Bilgic S., Erten G., Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol.*, 2009, Vol. 254, no. 2, pp. 149-154.

6. Beňová K., Hancková M., Koči K., Kúdelová M., Betáková T. T cells and their function in the immune response to viruses. *Acta Virol.*, 2020, Vol. 64, no. 2, pp. 131-143.

7. Betts M.R., Brenchley J.M., Price D.A., de Rosa S.C., Douek D.C., Roederer M., Koup R.A. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J. Immunol. Methods*, 2003, Vol. 281, no. 1-2, pp. 65-78.

8. Bouwman W., Verhaegh W., Holtzer L., van de Stolpe A. Measurement of cellular immune response to viral infection and vaccination. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 575074. doi: 10.3389/fimmu.2020.575074.

9. Braun J., Loyal L., Frentsch M., Wendisch D., Georg P., Kurth F., Hippenstiel S., Dingeldey M., Kruse B., Fauchere F., Baysal E., Mangold M., Henze L., Lauster R., Mall M.A., Beyer K., Röhm J., Voigt S., Schmitz J., Miltenyi S., Demuth I., Müller M.A., Hocke A., Witzernath M., Suttrop N., Kern F., Reimer U., Wenschuh H., Drosten C., Cormann V.M., Giesecke-Thiel C., Sander L.E., Thiel A. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*, 2020, Vol. 587, no. 7833, pp. 270-274.

10. García L.F. Immune Response, Inflammation, and the Clinical Spectrum of COVID-19. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1441. doi: 10.3389/fimmu.2020.01441.

11. Gupta S., Agrawal S., Sandoval A., Su H., Tran M., Demirdag Y. SARS-CoV-2-specific and functional cytotoxic CD8 cells in primary antibody deficiency: Natural infection and response to vaccine. *J. Clin. Immunol.*, 2022, Vol. 42, no. 5, pp. 914-922.

12. Keshavarz M., Shafiee A., Nicknam M.H., Khosravani P., Yousefi A., Izad M. Immune response to the mumps virus in iranian unvaccinated young adults. *Japan J. Infect. Dis.*, 2017, Vol. 70, no. 2, pp. 127-131.

13. Kundura L., Cezar R., André S., Campos-Mora M., Lozano C., Vincent T., Muller L., Lefrant J.Y., Roger C., Claret P.G., Duvnjak S., Loubet P., Sotto A., Tran T.A., Estaquier J., Corbeau P. Low perforin expression in CD8⁺ T lymphocytes during the acute phase of severe SARS-CoV-2 infection predicts long COVID. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 1029006. doi: 10.3389/fimmu.2022.1029006.

14. Le Bert N., Clapham H.E., Tan A.T., Chia W.N., Tham C.Y.L., Lim J.M., Kunasegaran K., Tan L.W.L., Dutertre C.A., Shankar N., Lim J.M.E., Sun L.J., Zahari M., Tun Z.M., Kumar V., Lim B.L., Lim S.H., Chia A., Tan Y.J., Tambyah P.A., Kalimuddin S., Lye D., Low J.G.H., Wang L.F., Wan W.Y., Hsu L.Y., Bertoletti A., Tam C.C. Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *J. Exp. Med.*, 2021, Vol. 218, no. 5, e20202617. doi: 10.1084/jem.20202617.

15. Lind Enoksson S., Bergman P., Klingström J., Boström F., da Silva Rodrigues R., Winerdal M.E., Marits P. A flow cytometry-based proliferation assay for clinical evaluation of T-cell memory against SARS-CoV-2. *J. Immunol. Methods*, 2021, Vol. 499, 113159. doi: 10.1016/j.jim.2021.113159.

16. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat. Immunol.*, 2022, Vol. 23, no. 2, pp. 186-193.

17. Paolini A., Borella R., Neroni A., Lo Tartaro D., Mattioli M., Fidanza L., di Nella A., Santacroce E., Gozzi L., Busani S., Trenti T., Meschiari M., Guaraldi G., Girardis M., Mussini C., Gibellini L., de Biasi S., Cossarizza A. Patients recovering from severe COVID-19 develop a polyfunctional antigen-specific CD4⁺ T cell response. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 14, 8004. doi: 10.3390/ijms23148004.

18. Phillips E., Adele S., Malone T., Deeks A., Stafford L., Dobson S.L., Amini A., Skelly D., Eyre D., Jeffery K., Conlon C.P., Dold C., Otter A., d'Arcangelo S., Turtle L.; PITCH Consortium, Klenerman P., Barnes E., Dunachie S.J. Comparison of two T-cell assays to evaluate T-cell responses to SARS-CoV-2 following vaccination in naïve and convalescent healthcare workers. *Clin. Exp. Immunol.*, 2022, Vol. 209, no. 1, pp. 90-98.

19. Ranieri E., Netti G.S., Gigante M. CTL ELISPOT Assay and T Cell Detection. *Methods Mol. Biol.*, 2021, Vol. 2325, pp. 65-67.

20. Ruan Y., Guo W., Liang S., Xu Z., Niu T. Diagnostic performance of cytomegalovirus (CMV) immune monitoring with ELISPOT and QuantiFERON-CMV assay in kidney transplantation: A PRISMA-compliant article. *Medicine (Baltimore)*, 2019, Vol. 98, no. 16, e15228. doi: 10.1097/MD.00000000000015228.

21. Schoenborn J.R., Wilson C.B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv. Immunol.*, 2007, Vol. 96, pp. 41-101.

22. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullimann D.J., Kammann T., Emgård J., Parrot T., Folkesson E.; Karolinska COVID-19 Study Group, Rooyackers O., Eriksson L.L., Henter J.L., Sönnernborg A., Allander T., Albert J., Nielsen M., Klingström J., Gredmark-Russ S., Björkström N.K., Sandberg J.K., Price D.A., Ljunggren H.G., Aleman S., Bugger M.

Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*, 2020, Vol. 183, no. 1, pp.158-168.

23. Shomuradova A.S., Vagida M.S., Sheetikov S.A., Zornikova K.V., Kiryukhin D., Titov A., Peshkova Iu.O., Khmelevskaya A., Dianov D.V., Malasheva M., Shmelev A., Serdyuk Ya., Bagaev D.V., Pivnyuk A., Shcherbinin D.S., Maleeva A.V., Shakirova N.T., Pilunov A., Malko D.B., Khamaganova E.G., Biderman B., Ivanov A., Shugay M., Efimov G.A. SARS-CoV-2 Epitopes Are Recognized by a Public and Diverse Repertoire of Human T Cell Receptors. *Immunity*, 2020, Vol. 53, pp. 1245-1257.

24. Tarke A., Sidney J., Kidd C.K., Dan J.M., Ramirez S.I., Yu E.D., Mateus J., da Silva Antunes R., Moore E., Rubiro P., Methot N., Phillips E., Mallal S., Frazier A., Rawlings S.A., Greenbaum J.A., Peters B., Smith D.M., Crotty S., Weiskopf D., Grifoni A., Sette A. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases. *Cell Rep. Med.*, 2021, Vol. 2, no. 2, 100204. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100204.

25. Titov A., Shaykhutdinova R., Shcherbakova O.V., Serdyuk Y.V., Sheetikov S.A., Zornikova K.V., Maleeva A.V., Khmelevskaya A., Dianov D.V., Shakirova N.T., Malko D.B., Shkurnikov M., Nersisyan S., Tonevitsky A., Khamaganova E., Ershov A.V., Osipova E.Y., Nikolaev R.V., Pershin D.E., Vedmedskia V.A., Maschan M., Ginanova V.R., Efimov G.A. Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2. *JCI Insight*, 2022, Vol. 7, no. 9, e157699. doi: 10.1172/jci.insight.157699.

26. Villemonteix J., Cohen L., Guihot A., Guérin V., Moulin C., Caseris M., Carol A., Bonacorsi S., Carcelain G. Comparison between enzyme-linked immunospot assay and intracellular cytokine flow cytometry assays for the evaluation of T cell response to SARS-CoV-2 after symptomatic COVID-19. *Immun. Inflamm. Dis.*, 2022, Vol. 10, no. 10, e617. doi: 10.1002/iid3.617.

27. Wherry E.J., Masopust D. Adaptive immunity: neutralizing, eliminating, and remembering for the next time. *Viral pathogenesis (Third Edition), From Basics to Systems Biology*, 2016, pp. 57-69.

28. Zajac A.J., Harrington L.E., Immune Response to Viruses: Cell-Mediated Immunity. *Encyclopedia of Virology*, Elsevier eBooks, 2008, pp. 70-77.

29. Zornikova K.V., Khmelevskaya A., Sheetikov S.A., Kiryukhin D.O., Shcherbakova O.V., Titov A., Zvyagin I.V., Efimov G.A. Clonal diversity predicts persistence of SARS-CoV-2 epitope-specific T-cell response. *Commun. Biol.*, 2022, Vol. 5, no. 1, 1351. doi: 10.1038/s42003-022-04250-7.

Авторы:

Афридонова З.Э. — аспирант лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Топтыгина А.П. — д.м.н., главный научный сотрудник, руководитель лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Боголюбова А.В. — к.б.н., заведующая лабораторией трансплантационной иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Семикина Е.Л. — д.м.н., главный научный сотрудник, заведующая лабораторным отделом ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Afridonova Z.E., Postgraduate Student, Laboratory of Cytokines, G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Toptygina A.P., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Head, Laboratory of Cytokines, G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Bogolyubova A.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Transplantation Immunology, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Semikina E.L., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Head of Laboratory Department, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 13.01.2023
Принята к печати 16.02.2023

Received 13.01.2023
Accepted 16.02.2023