



**МИНИСТЕРСТВО НА ЗДРАВЕОПАЗВАНЕТО**  
**НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ**

Милена Алексова

**ПОСТЕКСПОЗИЦИОНЕН И ПОСТВАКСИНАЛЕН  
Т-КЛЕТЪЧЕН ИМУНЕН ОТГОВОР СРЕЩУ SARS-COV-2**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Област на висше образование: **7. Здравеопазване и спорт**

Професионално направление: **7.1 Медицина**

Научна специалност: **Имунопатология и алергология**

Научен ръководител:

проф. д-р Мария Николова, дмн

СОФИЯ – 2024 г.

Дисертационният труд е изработен в отдел „Имунология“ към НЦЗПБ, гр. София, с финансовата подкрепа на два проекта : “ ИМУНОЛОГИЧНА ПАМЕТ ПРИ SARS-CoV-2 / COVID-19: МЕХАНИЗМИ, ПРОДЪЛЖИТЕЛНОСТ И КРЪСТОСАНА РЕАКТИВНОСТ”, финансиран от Фонд „Научни изследвания” (ФНИ) с номер на договор: КП-06-ДК1/9 от 29.03.2021 и „ФУНДАМЕНТАЛНИ, ТРАНСЛИРАЩИ И КЛИНИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ В ОБЛАСТТА НА ИНФЕКЦИИТЕ И ИНФЕКЦИОЗНАТА ИМУНОЛОГИЯ“, Наука и образование за интелигентен растеж, договор BG05M2OP001-1.002-0001-C04

Представен е на разширен колегиум на отдел „Имунология“ на 10.06.2024 година в 13:00

Дисертационният труд съдържа 187 страници, 58 фигури и 7 таблици. Библиографията включва 469 литературни източника.

## СЪДЪРЖАНИЕ

I УВОД .....	7
II ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	8
III МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ .....	9
I. ИЗСЛЕДВАНИ ЛИЦА И БИОЛОГИЧНИ ПРОБИ .....	9
II. БИОПРОДУКТИ, СТАНДАРТИ И СПОМАГАТЕЛНИ МАТЕРИАЛИ .....	11
1. Панел за имунофенотипиране; моноклонални антитела за директна имунофлуоресценция срещу човешки левкоцитни антигени .....	11
2. Стандарти за флоуцитометрия - .....	11
3. Активатори .....	11
III. РАЗТВОРИ, БУФЕРИ И ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ .....	16
1. Разтвор за лизиране .....	16
2. Фосфатно-буфериран физиологичен разтвор (PBS) .....	16
3. Сепарираща градиентна среда за изолиране на моноклеарни клетки от цяла периферна кръв.....	16
4. Фиксиращ разтвор PBS/FA .....	16
5. Хранителна среда - RPMI.....	16
7. Разтвор за промиване след размразяване на ПМНК .....	16
8. Разтвор за броене на живи/мъртви лимфоцити .....	16
9. Среда за култивиране на изолирани ПМНК .....	16
10. Брефелдин А (BFA) .....	16
11. Пермеабелизиращ разтвор (BD Perm/Wash Buffer) .....	16
12. Етилендиамин тетраоцетна киселина (EDTA) .....	16
IV. КИТОВЕ И КОНСУМАТИВИ.....	16
1. Полистиренови епруветки за флоуцитометрия .....	16
2. Стерилни криоепруветки.....	16
3. Епруветки от тип Falcon .....	16
4. Стерилни плаки .....	16
5. Камера на Бюркер .....	16
6. Кит за определяне на Т-клетъчния отговор срещу SARS-CoV-2 ( <i>T-SPOT.COVID</i> (Oxford, Immunotec) .....	17
7. Кит за определяне на IgG срещу сезонните (човешките) коронавируси NL63, 229E, OC43 и HKU1 (CD, Creative Diagnostics, USA).....	17
8. Кит за определяне на RBD-свързващи SARS-CoV-2-специфични IgG и IgA (Anti-SARS-CoV-2 ELISA, Euroimmun, Lübeck, Germany) .....	17
9. Кит за определяне на цитокинов профил (ThermoFisher Scientific ProcartaPlex Hu Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tregs 25plex) .....	17
10. Кит за определяне на хемокинов профил (Chemokine 9-Plex Human ProcartaPlex™	

Panel 1). .....	17
V. ОБОРУДВАНЕ .....	17
1. Флоуцитометър.....	17
2. ELISpot reader (AID CLASSIC ELISpot reader, Autoimmun Diagnostika GmbH) .....	17
3. Luminex® 200 (Thermo Fisher Scientific) .....	18
4. Спектрофотометър (BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer).....	18
5. Veho USB микроскоп (Veho, UK).....	18
VI. МЕТОДИ И АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИТЕ .....	18
1. Изолране на мононуклеарни клетки от периферна кръв (ПМНК) .....	18
2. Замразяване на лимфоцити – използване на пробата за анализи в бъдеще .....	18
3. Размразяване на лимфоцити .....	18
4. Детекция на SARS-CoV-2-специфични RBD-IgG и -IgA с ELISA метод .....	18
5. Детекция на IgG срещу HCoV-229E, NL63, OC43 и HKU1 с ELISA метод .....	18
6. Определяне на цитокинов и хемокинов профил с Luminex .....	18
7. Флоуцитометрия.....	18
8. Подходи за оценка на SARS-CoV-2-специфични лимфоцити .....	20
8.1. Флоуцитометрични методи.....	21
8.1.1. Специфично-стимулирана вътреклетъчна експресия на интерферон гама .....	21
8.1.2. Специфично стимулирана експресия на активационни молекули (AIM) .....	21
8.1.3. Вирус специфични стволови паметови Т клетки (AIM+TSCM) .....	22
8.2. ELISpot.....	22
8.2.1. IFN- $\gamma$ експресия след 16-18 ч. стимулация .....	22
8.2.2. IFN- $\gamma$ експресия след 5 дневна стимулация .....	22
8.2.3. IFN- $\gamma$ експресия на размразени ПМНК .....	22
9. Анализ на флоуцитометрични данни.....	23
10. Статистическа обработка на резултатите и обработка на библиографията.....	23
IV РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	25
1. Идентифициране на фенотипни профили, свързани с клиничната тежест .....	25
2. Цитокинов и хемокинов профил при пациенти в остра фаза на инфекция.....	28
3. Динамика на SARS-CoV-2 – специфичния ефекторен Т-клетъчен отговор.....	30
3.2. Съответствие Т-клетъчен и хуморален SARS-CoV-2 специфичен отговор.....	32
3.3 Изследване на кръстосана реактивност чрез определяне на имунитета към сезонните коронавируси и податливост към SARS-CoV-2 инфекция.....	34
3.4. Сравнение между естествено индуцирания и пост-ваксинален Т-клетъчен имунен отговор срещу SARS-CoV-2.....	36
4. SARS-CoV-2-специфични паметови CD4 и CD8 Т клетки.....	39
4.1. Изследване на SARS-CoV-2-специфични CD4 и CD8 Т клетки посредством	

<b>многопараметърна флоуцитометрия .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2. Динамика, диференциация и реактивност на SARS-CoV-2-специфичния CD4 и CD8 Тклетъчен пул .....</b>	<b>39</b>
<b>4.3 Еволюция на вируса и реактивност на вирус- специфичния Т клетъчен пул .....</b>	<b>44</b>
<b>4.3.1. Разпознаване на пептидни пулове от бета, гама, делта и ламбда вариант .....</b>	<b>44</b>
<b>4.3.2. Разпознаване на алфа, бета, гама, делта и ламбда от омикрон-индуцирани паметови Т клетки .....</b>	<b>48</b>
<b>4.3.3. Разпознаване на омикрон-варианти (XXB.1 и BA.2.86) от пре-омикрон-индуцирани паметови Т клетки .....</b>	<b>50</b>
<b>5. Сравнение между естествено индуцирания и пост-ваксинален Т-клетъчен имунен отговор срещу SARS-CoV-2.....</b>	<b>55</b>
<b>V ИЗВОДИ.....</b>	<b>59</b>
<b>VI ПРИНОСИ .....</b>	<b>60</b>
<b>ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ С ТЕОРЕТИЧЕН ХАРАКТЕР .....</b>	<b>60</b>
<b>ПРИНОСИ С НАУЧНО-ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР .....</b>	<b>60</b>
<b>VII ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>61</b>
<b>ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>67</b>
<b>УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ.....</b>	<b>68</b>
<b>Участия в международни научни форуми, по темата на дисертацията.....</b>	<b>68</b>
<b>Участие в национални научни форуми, по темата на дисертацията.....</b>	<b>68</b>
<b>УЧАСТИЯ В ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ КАТО ИЗПЪЛНИТЕЛ .....</b>	<b>70</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>71</b>

## **I УВОД**

### **Обобщено за проблема и мястото на имунологията в решаването му**

Коронавирусите представляват постоянна заплаха за човешкото здраве и икономиката. От 2000 година насам светът е преживял две епидемични избухвания с потенциал за пандемия, и двете свързани със зоонотични бетакоронавируси: SARS-CoV (2002-2003 г.) и MERS-CoV (2011 г.). Бързото разпространение на SARS-CoV-2 доведе до обявяването от Световната здравна организация (СЗО) на 30 януари 2020 г. на извънредна ситуация от международно значение за общественото здравеопазване, която ескалира до пандемия на 11 март 2020, а до края на март 2024 година е засегнала над 774 милиона души и е причинила смъртта на повече от 7 милиона души.

Ранното изолиране на вируса и публикуването на данните за неговата генетична последователност, бяха от решаващо значение за информирането и дадоха възможност за своевременна реакция от страна на глобалната научна общност и органите за общественото здравеопазване, на възникващата пандемия от COVID-19. На национално ниво бяха въведени противоепидемични мерки като социално дистанциране, различни степени на изолация, задължителното носене на маска на обществени места и ограничения за международните пътувания като основен фактор за глобалното разпространение на вируса. Научните усилия и усилията на общественото здравеопазване бяха насочени към разбирането на вируса, разработването на ефективни лечения и, най-важното, създаването и разпространението на ваксини за ограничаване на инфекцията. Появата на COVID-19 подчерта значението на глобалното сътрудничество в отговор на здравни кризи и необходимостта от готовност срещу възникващи инфекциозни заболявания.

Разбирането на имунологичния отговор към инфекцията със SARS-CoV-2 зависи най-вече от изследванията, фокусирани върху динамиката на образуване и механизмите на активиране и функциониране на вирус-специфичните Т и В лимфоцити. Изследването на имунологичната памет е от съществено значение за овладяване на инфекциозните заболявания, тъй като създава дълготрайна защита, гарантира по-бърза имунна реакция при повторна експозиция и по-този начин предотвратява повторно заразяване и/или боледуване. Познаването на тези механизми беше условие за разработването и производството на нови и ефективни ваксини, които да обучат имунната система да

разпознава и реагира на SARS-CoV-2 и да създадат достатъчно трайна имунна памет. Разработването на терапии за COVID-19 също в значителна степен се фокусира върху имунния отговор: използване на вирус-специфичните антитела от реконвалесцентна плазма, модулирането с цел предотвратяване на екстремни възпалителни реакции и увреждане на тъканите и органите, разработването на нови терапевтични подходи като антивирусни лекарства и моноклонални антитела. Разбира се, изследванията на имунния отговор срещу вируса и факторите, които определят качествата на имунната памет са от съществено значение не само в индивидуален план. Те имат определящо значение при разработването на цялостна стратегия за борбата с еволюиращия вирус и овладяването на пандемията.

## **II ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

**Целта** на дисертационния труд е да се изследват **възникването, персистирането и функционалните характеристики на SARS-CoV-2- специфичните Т клетки,** индуцирани след инфекция, имунизация или хибридна експозиция

### **Основните задачи:**

1. Да се идентифицират фенотипни характеристики на перифирните Т-лимфоцити при пациенти със SARS-CoV-2 инфекция във връзка с клиничното ѝ протичане.
2. Да се направи оценка на цитокиновия фон при пациенти с различна тежест на Ковид-19.
3. Да се въведат подходящи методи за детекция и характеризиране на SARS-CoV-2-специфичния Т-клетъчен пул на различни срокове след индуцирането на имунния отговор, т.ч. вирус-специфичните стволови паметови клетки.
4. Да се проследи динамиката на SARS-CoV-2 – специфичния ефекторен Т-клетъчен отговор, в корелация с RBD-специфичните антитела и в зависимост от начина на индуциране (инфекция/ваксинация) .
5. Да се оцени възможният ефект на антитяловия отговор към най-често циркулиращите сезонни коронавируси (NL63, 229E, OC43, HKU1) върху развитието на SARS-CoV-2 специфичния имуен отговор.
6. Да се характеризират наличието и диференциацията на SARS-CoV-2 специфични Т-

клетки, в т. ч. стволови паметови клетки до 24 месеца след индуцирането им, в зависимост от вида на индуциращия стимул: имунизация/ инфекция/комбинация от двата..

7. Да изследва се реактивността на SARS-CoV-2-специфичния Т-клетъчен пул във връзка с еволюцията на вируса.

### **III МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

#### **I. ИЗСЛЕДВАНИ ЛИЦА И БИОЛОГИЧНИ ПРОБИ**

А. Пациенти с доказана SARS-CoV-2 инфекция (Табл.1).

- в остра фаза на COVID-19 (по време на хоспитализация и/или < 20 дни след PCR (+) резултат) – 243
- до 3 месеца след PCR (+) резултат - 105
- от 3 до 9 месеца след PCR (+) резултат – 119
- от 9 до 12 месеца след PCR (+) резултат - 26
- над 12 месеца след PCR (+) резултат – 69

Проследени във времето са, както следва: 124 пациента – двукратно, 41 - трикратно и 12 - четирикратно (средно, съответно, 93, 254 и 378 дни след PCR+ резултат)

Б. Контролни групи:

- лица без данни за прекарана инфекция, ваксинирани срещу SARS-CoV-2 - 120
- клинично здрави лица, без данни за прекарана инфекция, не ваксинирани - 38

Съхранени са изолирани лимфоцити от 279 донора и серум/плазма от 449 донора. Създадена е база от клинично-епидемиологични данни за изследваните пациенти, съдържаща следната информация: дата и резултат от SARS-CoV-2 PCR и /или бърз тест; симптоми и усложнения, тежест на COVID-19, съгласно критериите на СЗО, съпътстващи заболявания и синдроми, ваксинационен статус (приложени дози и тип ваксина).



**Таблица 1. Характеристики на всички изследвани донори и използвани методи**

\*контролни проби от донори без лабораторни и анамнестични данни за прекарана COVID-19 инфекция към момента на изследване.

+Проби от имунизирани донори (здравни работници имунизирани с BNT162b2 или ChAdOx1 nCoV-19)

Тежестта на COVID-19 беше определена съгласно критериите на СЗО<sup>1</sup>

Групи	Дни от PCR (+) / имунизация средно (мин-макс)	Брой	Период на пробоземане	Пол	Възраст (год.) средно мин-макс	Тежест на заболяването			коморбидитети	Имунизация срещу SRAS-CoV-2		Фенотипизация	Вирус-специфични антитела		HCoV's	T-spot	T <sub>SCM</sub>
				М/Ж		леко	средно	тежко		mRNA-1273/BNT162b2	AZD1222 / JNJ-78436735		RBD-IgA	RBD-IgG			
1	7 (0-20)	243	11/2020 - 10/2023	134/109	55 (19-83)	33	106	74	96	3	3	52	227	233	21	2	12
2	55 (30-87)	105	12/2020 - 7/2022	49/ 56	51 (23-73)	24	16	3	31	8	2	13	82	84	3	23	3
3	170 (90-270)	119	11/2020 - 10/2022	41/ 78	52 (24-81)	21	25	7	16	17	4	16	91	95	-	63	13
4	345 (300-360)	26	9/2020 - 11/2022	12/ 14	51 (27-69)	3	8	15	5	1	1	7	20	20	-	13	8
5	434 (365-810)	69	4/2021 - 6/2023	29/ 38	45 (23-66)	15	27	25	4	23	7	11	51	67	-	59	28
K*	-	38	12/2020 - 2/2022	10/28	51 (27-75)	-	-	-	1	-	-	6	22	27	24	12	2
V+	21 и 51/60 и 111	120	01/2021 - 02/2021	39/81	51 (23-76)	-	-	-	43	71	49	-	119	-	-	66	3

## **II. БИОПРОДУКТИ, СТАНДАРТИ И СПОМАГАТЕЛНИ МАТЕРИАЛИ**

- 1. Панел за имунофенотипиране; моноклонални антитела за директна имунофлуоресценция срещу човешки левкоцитни антигени** - за всяко от mAb експериментално е определена оптималната работна концентрация (Табл.2). Панелът за разширена имунофенотипизация е посочен в Табл.3 и 4.
- 2. Стандарти за флоуцитометрия** - гарантират точността на измерванията и правилното функциониране на уреда
  - а) Микросфери за ежедневно калибриране** - Cytometer Setup & Tracking Beads (BD CST за употреба с BD FACSDiva v 6.0)
  - б) Quantibrite (BD PE Fluorescence Quantitation Kit)** – за калибриране при количествено измерване на степента на експресия на CD38PE
- 3. Активатори**
  - 3.1. Пептидни пулове от SARS-CoV-2** - мегапулове от пептиди, обхващащи целия спайк протеин, съответстващ на **Алфа (B.1.1.7), Бета (B.1.351), Гама (P.1), Делта (B.1.617.1), Ламбда (C.37)** и подварианти на **Омикрон (XBV.1 и BA.2.86)**, за оценка на SARS-CoV-2-специфични Т-клетъчни отговори, синтезирани като суров материал (TC Peptide Lab, San Diego, CA, USA).
  - 3.2 Пептидни пулове** припокриващи се пептиди, обхващащи последователности на **спайк (S1) и нуклеокапсидния (N) протеин** (T-SPOT.COVID/ Discovery, Oxford).
  - 3.3. Костимулатор – CD28/CD49d** - Адхезионната молекула, функционира като лиганд за антигените CD80 и CD86.
  - 3.4. Фитохемаглутинин** - поликлонален неспецифичен стимулатор на ПМНК
- 4. Работни разтвори за флоуцитометър FACSCanto™ II (BD Biosciences) и FACSriaFusion (BD FACSTFlow sheath fluid; BD FACS Clean solution; BD FACS Rinse solution)** - основни работни разтвори за флуидните системи на двата флоуцитометъра.

**Таблица 2:** Списък на използваните моноклонални антитела (mAbs) срещу повърхностни и вътреклетъчни антигени за директна имунофенотипизация на левкоцитни популации.

<b>mAbs</b> Специфичност	Флуорохром	Производител	Клон	Работно разреждане	Каталожен номер
<b>CD3</b>	BUV395	BD, Biosciences	SK7	1:40	564001
	FITC	BD, Biosciences	SK7	1:8	345764
	AmCyan	BD, Biosciences	SK7	1:10	339186
<b>CD4</b>	BV786	BD, Biosciences	SK3	1:80	563877
	PE-Cy7	BD, Biosciences	SK3	-	337166
	PE	BD, Biosciences	RPA-T4	1:8	555347
	PerCp	BD, Biosciences	L200	1:32	550631
<b>CD8</b>	V-500C	4070579	SK1	1:80	647457
	APC-Cy7	BD, Biosciences	SK1	-	348813
	PE	BD, Biosciences	HIT8a	1:16	555635
	APC	BD, Pharmingen	HIT8a	1:32	566852
	FITC	Immunotech	B9.11	1:16	PN IM0451
<b>CD14</b>	PE-Cy7	BeckmanCoulter	RMO52	1:10	A22331
<b>CD16</b>	PE	BD Pharm	B73.1	1:8	561313
<b>CD19</b>	APC	BD, Pharmingen	SJ25C1	1:10	345791
<b>CD25</b>	APC-Cy7	BD, Pharmingen	M-A251	1:5	557753
<b>CD27</b>	APC-R700	BD, Biosciences	M-T271	1:40	565116
	APC-H7	BD, Biosciences	M-T271	1:8	560222
<b>CD28/CD49d</b>	-	BD, Biosciences	L293/L25	-	347690
<b>CD28</b>	APC	BD, Pharmingen	CD28.2	1:10	558770
<b>CD38</b>	PE	BD, Pharmingen	HB7	1:4	567146
<b>CD39</b>	FITC	BD, Pharmingen	TU66	1:4	561444
<b>CD45</b>	PerCP	BD, Pharmingen	2D1	1:8	347464
<b>CD45RA</b>	BUV496	BD, Biosciences	HI100	1:160	750258
<b>CD45RO</b>	APC	BD, Biosciences	UCHL1	1:8	340438
<b>CD56</b>	PE	BD, Pharmingen	NCAM16.2	1:2	345812
<b>CD57</b>	FITC	Наше		1:10	Серия 226
		производство		1:8	
<b>CD69</b>	PE	BD, Biosciences	L78	1:20	341652
<b>CD95</b>	BB515	BD, Biosciences	DX2	1:40	564596
<b>CD127</b>	PerCPCy5.5	BD, Biosciences	HIL-7R-M21	1:10	560551
<b>CD137</b>	PE-CF594	BD, Biosciences	4B4-1	1:20	555956
<b>CD154</b>	BV421	BD, Biosciences	TRAP1	1:40	563886
<b>CD183</b>	APC	BD, Biosciences	1C6/CXCR3	1:7	561732
<b>CD196</b>	PECy7	BD, Pharmingen	11A9	1:10	560620
<b>CD197</b>	BB700	BD, Biosciences	3D12	1:200	566437
<b>HLA-DR</b>	FITC	BD, Pharmingen	G46-6	1:4	555811
	PerCP	BD, Pharmingen	L243	1:8	347402
<b>aIFN<math>\gamma</math></b>		Наше производство		1:4	

**Таблица 3:** Панел от комбинации от моноклонални антитела (mAbs), конюгирани с флуорохроми, срещу повърхностни за имунофенотипизация на левкоцитни популации и изследвани субпопулации

Субпопулация	Фенотип	№	Комбинация от mAbs	Параметър
Лимфоцити	CD45+	1	CD3 FITC/CD16+56 PE/CD45 PerCP/ CD4 PE-Cy7/CD8 APC-Cy7/ CD19 APC	Абсолютен брой, %
Т-лимфоцити	CD45+CD3+CD19-			
В-лимфоцити	CD45+CD3-CD19+			
НК-клетки	CD45+CD3-CD16+CD56+			
Хелперни CD4 Т-лимфоцити	CD45+CD3+CD4+			
Цитотоксични CD8 Т-лимфоцити	CD45+CD3+CD8+			
Антитяло-секретиращи В лимфоцити	CD19+CD27+CD38+	2	CD3 FITC/ CD38 PE/ CD19 APC/ CD27 APC-H7	%
Th1	CD183+CD196-CD4+	3	CD 39 FITC/ CD4 PE/ CD127 PerCP/ 196 PECy7/ CD183 APC/ CD25 APC-Cy7/CD3 AmCyan	%
Th2	CD183-CD196-CD4+			
Th17	CD183-CD196+CD4+			
Tregs	CD25 <sup>hi</sup> CD127-CD4			
Наивни CD4	CD45RO+CD27+CD4+	4	CD8 FITC/ CD4 PE/ CD45RO APC/ CD27 APC-H7	%
Паметови CD4	CD45RO-CD27+CD4+			
Ефекторни CD4	CD45RO-CD27-CD4+			
Наивни CD8	CD45RO+CD27+CD8+			
Паметови CD8	CD45RO-CD27+CD8+			
Ефекторни CD8	CD45RO-CD27-CD8+			
Апоптотични CD8	CD28-CD57+CD8+	5	CD57 FITC/ CD8 PE/ CD 28 APC	%
Активирани CD4	CD38+HLA-DR+CD4+	6	HLA-DR FITC/CD38 PE/ CD8 APC/ CD3 AmCyan	%
Активирани CD4	CD38+CD4+			ABS
Активирани CD8	CD38+HLA-DR+CD8+			%
Активирани CD8	CD38+CD8+			ABS

**Таблица 4:** Панел от комбинацията от моноклонални антитела (mAbs), конюгирани с флуорохроми, срещу повърхностни антигени за имунофенотипизация на левкоцитни популации и изследвани субпопулации след специфична стимулация с пептидни от SARS-CoV-2

Субпопулация	Фенотип	Комбинация от mAbs	Параметър
Хелперни CD4 Т-лимфоцити	CD3+CD4+	CD3 BUV395/ CD4 BV786/ CD8 V-500C/ CD197 BB700/ CD45RA BUV496/ CD27 APC-R700 / CD95 BB515 / CD69 PE / CD137 PE / CD154 BV421	%
Цитотоксични CD8 Т-лимфоцити	CD3+CD8+		
Вирус-специфични CD4 Т-лимфоцити (AIM+CD4+)	CD3+CD4+CD69+CD137+CD154+		
Вирус-специфични CD8 Т-лимфоцити (AIM+CD8+)	CD3+CD8+CD69+CD137+CD154+		
Централно-паметови CD4	CD3+CD4+CD197+CD45RA-		
Наивни CD4	CD3+CD4+CD197+CD45RA+		
Ефектор-памететови CD4	CD3+CD4+CD197-CD45RA-		
Терминално-ефекторни CD4	CD3+CD4+CD197-CD45RA+		
Централно-паметови CD8	CD3+CD8+CD197+CD45RA-		
Наивни CD8	CD3+CD8+CD197+CD45RA+		
Ефектор-памететови CD8	CD3+CD8+CD197-CD45RA-		
Терминално-ефекторни CD8	CD3+CD8+CD197-CD45RA+		
Стволови паметови CD4 (CD4 T <sub>SCM</sub> )	CD3+CD4+CD197+CD45RA+CD27+CD95+		
Стволови паметови CD8 (CD8 T <sub>SCM</sub> )	CD3+CD8+CD197+CD45RA+CD27+CD95+		
Вирус-специфични CD4 T <sub>SCM</sub> (AIM+CD4T <sub>SCM</sub> )	CD3+/CD4+/CD197+/CD45RA+/CD27+ CD95+/CD69+/CD137+/CD154+		

<b>Вирус-специфични CD8 T<sub>scm</sub></b> (AIM+CD8T <sub>scm</sub> )	CD3+/CD8+/CD197+/CD45RA+/CD27+ CD95+/CD69+/CD137+ CD154+		
<b>AIM+</b> <b>Централно-паметови CD4+</b> (AIM+CM)	CD3+ CD4+ CD137+ CD69+ CD154+ CD197+ CD45RA-		
<b>AIM+</b> <b>Наивни CD4</b>	CD3+ CD4+ CD137+ CD69+ CD154+ CD197+ CD45RA+		
<b>AIM+</b> <b>Ефектор-паметови CD4</b> (AIM+EM)	CD3+ CD4+ CD137+ CD69+ CD154+ CD197- CD45RA-		
<b>AIM+</b> <b>Терминално-ефекторни CD4 (AIM+TE)</b>	CD3+ CD4+ CD137+ CD69+ CD154+ CD197- CD45RA+		
<b>AIM+</b> <b>Централно-паметови CD8+</b> (AIM+CM)	CD3+ CD8+ CD137+ CD69+ CD154+ CD197+ CD45RA-		
<b>AIM+</b> <b>Наивни CD8</b>	CD3+ CD8+ CD137+ CD69+ CD154+ CD197+ CD45RA+		
<b>AIM+</b> <b>Ефектор-паметови CD8</b> (AIM+EM)	CD3+ CD8+ CD137+ CD69+ CD154+ CD197- CD45RA-		
<b>AIM+</b> <b>Терминално-ефекторни CD8 (AIM+TE)</b>	CD3+ CD8+ CD137+ CD69+ CD154+ CD197- CD45RA+		

### **III. РАЗТВОРИ, БУФЕРИ И ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ**

1. **Разтвор за лизиране (BDFACS LysingSolution)** – отстраняване на еритроцитите, за флоуцитометрично определяне на лимфоцити в цяла кръв
2. **Фосфатно-буфериран физиологичен разтвор (PBS)** - промиване на лимфоцити при тяхно изолиране от цяла кръв, промиване на култивираните клетки и за промиване на лимфоцити след оцветяване с моноклонални антитела
3. **Сепарираща градиентна среда за изолиране на моноклеарни клетки от цяла периферна кръв (LSM-A, Capricorn Scientific)** - стерилна, готова за употреба и съдържа Ficoll.
4. **Фиксиращ разтвор PBS/FA** - фиксиране на маркираните с моноклонални антитела лимфоцити, за по-късна евалуация.
5. **Хранителна среда - RPMI**
6. **Среда за замразяване на лимфоцити** - RPMI + 20% FCS+ 10% DMSO
7. **Разтвор за промиване след размразяване на ПМНК** - Dulbecco's PBS (1x) + 5% FCS
8. **Разтвор за броене на живи/мъртви лимфоцити** - Trypan blue 0.2% разтвор
9. **Среда за култивиране на изолирани ПМНК** - RPMI среда + 10% FCS
10. **Брефелдин А (BFA)** - Инхибитор на мембрания транспорт
11. **Пермеабилзиращ разтвор (BD Perm/Wash Buffer)** - пермеабилзиране на клетъчната мембрана
12. **Етилендиамин тетраоцетна киселина (EDTA)** - инхибитор на активация

### **IV. КИТОВЕ И КОНСУМАТИВИ**

1. **Полистиренови епруветки за флоуцитометрия**
2. **Стерилни криоепруветки**
3. **Епруветки от тип Falcon** - 15ml и 50ml, с конично дъно
4. **Стерилни плаки** - 24 ямкови и 96 ямкови плаки, със заоблено дъно за клетъчно култивиране.
5. **Камера на Бюркер** - преброяване на витални ПМНК след изолирането им или размразяване.

6. **Кит за определяне на Т-клетъчния отговор срещу SARS-CoV-2 (T-SPOT.COVID (Oxford, Immunotec)** - стандартизиран метод, базиран на ELISPOT. Се преброяват Т клетки, които отделят IFN- $\gamma$  в отговор на антигенна стимулация.
7. **Кит за определяне на IgG срещу сезонните (човешките) коронавируси NL63, 229E, OC43 и HKU1 (CD, Creative Diagnostics, USA)** - стандартизиран метод, базиран на ELISA
8. **Кит за определяне на RBD-свързващи SARS-CoV-2-специфични IgG и IgA (Anti-SARS-CoV-2 ELISA, Euroimmun, Lübeck, Germany)** - стандартизиран метод, базиран на ELISA
9. **Кит за определяне на цитокинов профил (ThermoFisher Scientific ProcartaPlex Hu Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tregs 25plex)** - за определяне на концентрацията pg/ml на GM-CSF, IFN-gamma, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL- 6, IL-12p70, IL-13, IL-18, TNF-alpha; IL-9, IL-10, IL-17A (CTLA-8), IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IFN- alpha, IL-1-alpha , IL-1RA, IL-7, IL -15, IL-31 и TNF-beta.
10. **Кит за определяне на хемокинов профил (Chemokine 9-Plex Human ProcartaPlex™ Panel 1)** - За определяне на концентрацията pg/ml на Eotaxin (CCL11), GRO-alpha (CXCL1), IL-8 (CXCL8), IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), MIP-1alpha (CCL3), MIP-1beta (CCL4), SDF-1alpha и RANTES (CCL5).

## V. ОБОРУДВАНЕ

### 1. Флоуцитометър

a) **FACSCanto II** – разполагащ с три лазера, дава възможност за отчитане на параметри по 6 цвята. Работи със софтуер FACSDiva v.6.2.

b) **Клетъчен сортер FACS Aria Fusion** - разполагащ с 4 лазера, дава възможност за едновременна детекция и характеризиране на 19 параметъра на таргетната клетъчна популация. Работи със софтуер FACSDiva v.6.2

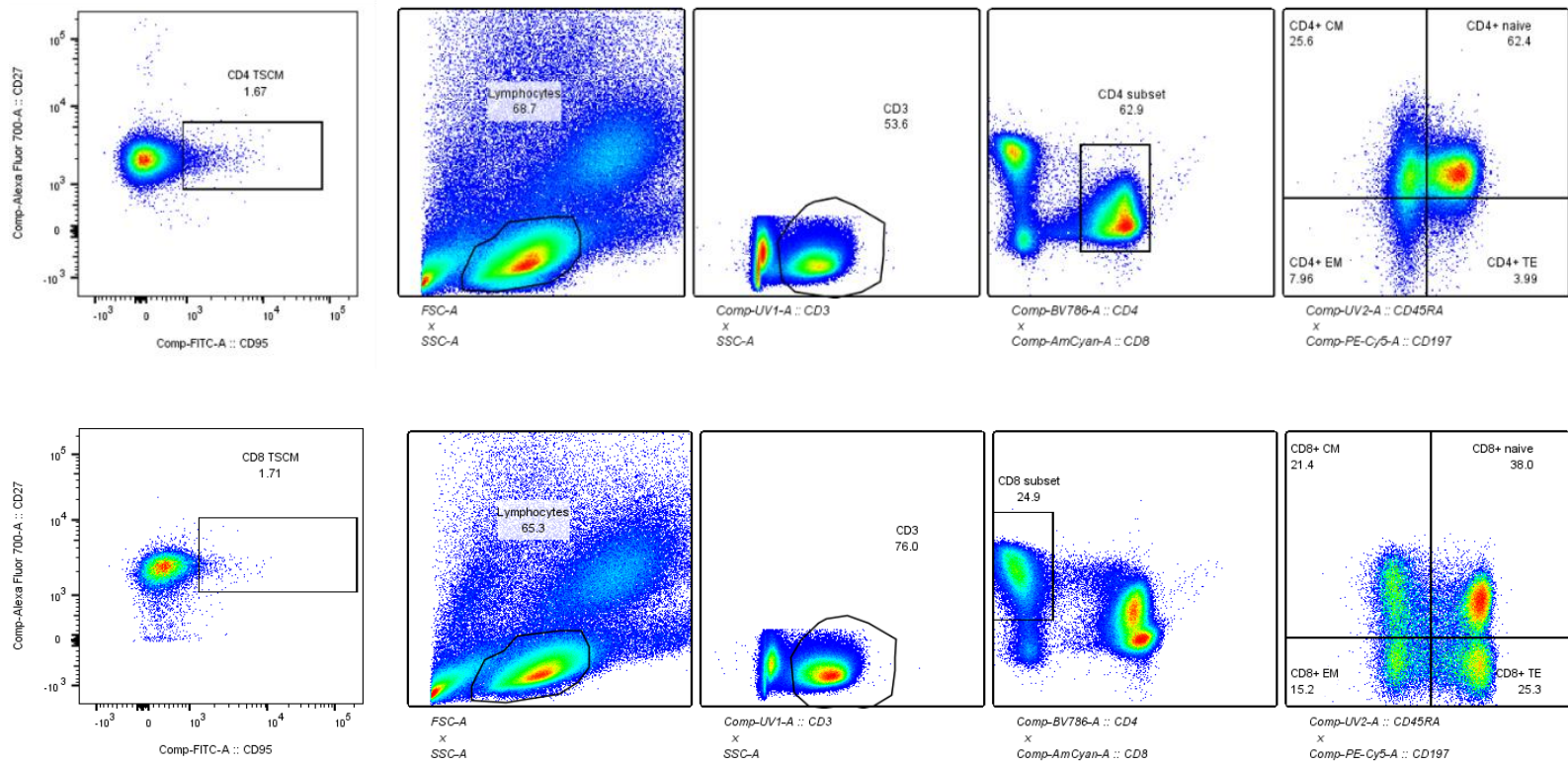
2. **ELISpot reader (AID CLASSIC ELISpot reader, Autoimmun Diagnostika GmbH)** - прави снимки с висока резолюция, автоматично центрира ямките и брой проявените спотове наведнъж



3. **Luminex® 200 (Thermo Fisher Scientific)** - система базирана на флоуцитометрия, Използва се софтуер ProcartaPlex™ Analyst 1.0 за отчитане и анализ на пробите
4. **Спектрофотометър (BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer)** - монохроматор за измерване на микроплаки
5. **Veho USB микроскоп (Veho, UK)** - за преброяване на спотове и заснемане на снимки от ELISpot теста.

## **VI. МЕТОДИ И АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

1. **Изолиране на мононуклеарни клетки от периферна кръв (ПМНК)**
2. **Замразяване на лимфоцити** – използване на пробата за анализи в бъдеще
3. **Размразяване на лимфоцити**
4. **Детекция на SARS-CoV-2-специфични RBD-IgG и -IgA с ELISA метод**
5. **Детекция на IgG срещу HCoV-229E, OC43 и HKU1 с ELISA метод**
6. **Определяне на цитокинов и хемокинов профил с Luminex**
7. **Флоуцитометрия**
  - 7.1. **Имунофенотипизация на левкоцитни популации в цяла кръв: директна флуоресценция, лизиране без промиване**
  - 7.2. **Имунофенотипизация на левкоцитни популации в цяла кръв: директна флуоресценция, лизиране с промиване**
  - 7.3. **Детекция и характеризиране на стволови паметови Т-лимфоцити - посредством клетъчен сортер FASCAriaFusion. Данните бяха анализирани в софтуер FACSDiva v.9.0.1 и FlowJo v.10.8.1 (FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA)**



**Фигура 1.** Детекция на стволови паметови CD4 (горе) и CD8 (долу) T-лимфоцити чрез многопараметърна флоуцитометрия на две отделни проби. Представена е последователността на флоуцитометричния анализ на стволови паметови T-клетки: дефиниране на гейта на лимфоцити (FCS vs SSC), определяне на T лимфоцити (CD3 vs SSC), след това дефиниране на CD4 и CD8 T лимфоцитите. CD4 и CD8 T бяха анализирани допълнително според експресията на CD45RA и CD197 като централно-паметови (CM, CD45RA-CD197+), наивни (naïve, CD45RA+ CD197+), ефектор-памететови (EM, CD45RA-CD197-) и терминално-ефекторни (TE, CD45RA+ CD197-). И на край последвано от детекция на стволови паметови CD4 и CD8 T (субпопулацията от T лимфоцити с наивен фенотип, ко-експресиращи CD95+ и CD27+)

## 8. Подходи за оценка на SARS-CoV-2-специфични лимфоцити

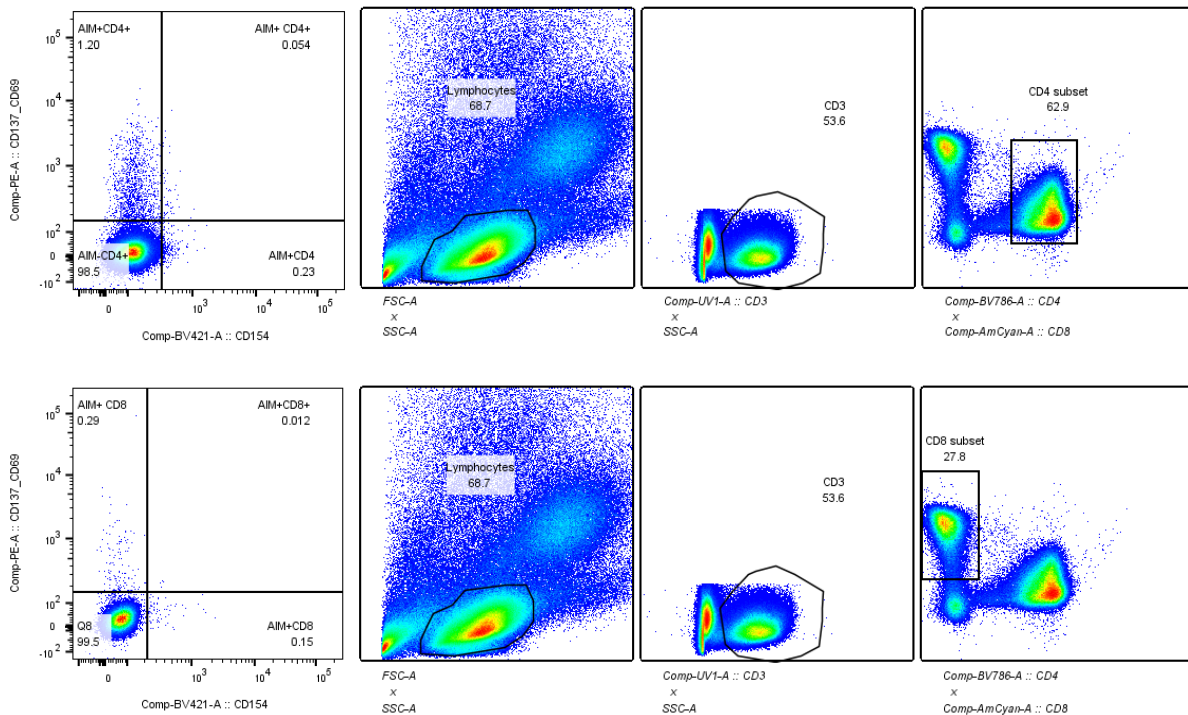


**Фигура 2. Подходи за оценка на SARS-CoV-2-специфични лимфоцити.** Активацията на вирус-специфичните Т клетки води до експресия на повърхностни активационни рецептори и, при част от тях, синтез на IFN- $\gamma$ . ELISPOT платформите „улавят“ и откриват отделения в средата цитокин. Предимство на ELISPOT е възможността за стандартизиране на резултатите, тъй като за всеки тест се залагат точно определен брой периферни мононуклеарни клетки. Резултатът се представя като брой спот-образуващи клетки (*spot-forming-cells, SFCs*) на  $10^6$  периферни мононуклеарни клетки (ПМНК). Основен недостатък е липсата на допълнителна информация за цитокин – образуващите клетки. Флоуцитометрията е безспорно най-информативният метод който предлага едновременно определяне на активационни и други молекули на повърхността на клетката и нейните продукти (цитокини), разположени интрацелуларно. По този начин се получава най-пълна картина за антиген специфичния отговор като се откриват повече специфични Т клетки и се определя техният подтип (CD4/CD8) и стадия на активация и диференциация. Недостатъкът е по-малка чувствителност и сравнително сложно и трудоемко изпълнен

## 8.1. Флоуцитометрични методи

**8.1.1. Специфично-стимулирана вътреклетъчна експресия на интерферон гама -** отчитането и анализа на пробите се извърши с флоуцитометър FACSCanto™ II и софтуер FACS Diva 6.2.

**8.1.2. Специфично стимулирана експресия на активационни молекули (AIM) - SARS-CoV-2-специфичните Т лимфоцити** бяха определени по експресията на активационно-индуцираните маркери (CD69/CD137/CD154) върху CD4 и CD8, след стимулация с пептидни пулове от SARS-CoV-2 и неговите варианти (B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.1, C.37, ХВВ.1, ВА.2.86). За положителна се счита стимулираната проба, съдържаща повече от 0.05% AIM+ Т лимфоцити. За да се изключат фалшиво положителни резултати, процента на AIM+ популациите беше изваден от резултата на негативната контрола (същите клетки инкубирани в отсъствие на вирусни пептиди).



**Фигура 3. Детекция на вирус-специфични CD4 (А) и CD8 (Б) Т-лимфоцити чрез многопараметърна флоуцитометрия на една проба. Представена е последователността на флоуцитометричния анализ на вирус-специфичните Т лимфоцити (AIM+Т): дефиниране на гейта на лимфоцити (FCS vs SSC), определяне на Т лимфоцити (CD3 vs SSC), след това дефиниране на CD4 и CD8 Т лимфоцитите. Последвано от детекция на вирус-специфичните CD4 и CD8 Т, според експресията на активационни-молекули (CD69/CD137/CD154).**

**8.1.3. Вирус специфични стволони паметови Т клетки (AIM+TSCM) –** гeyтинг стратегията е отразена на фигура 4.

## **8.2. ELISpot**

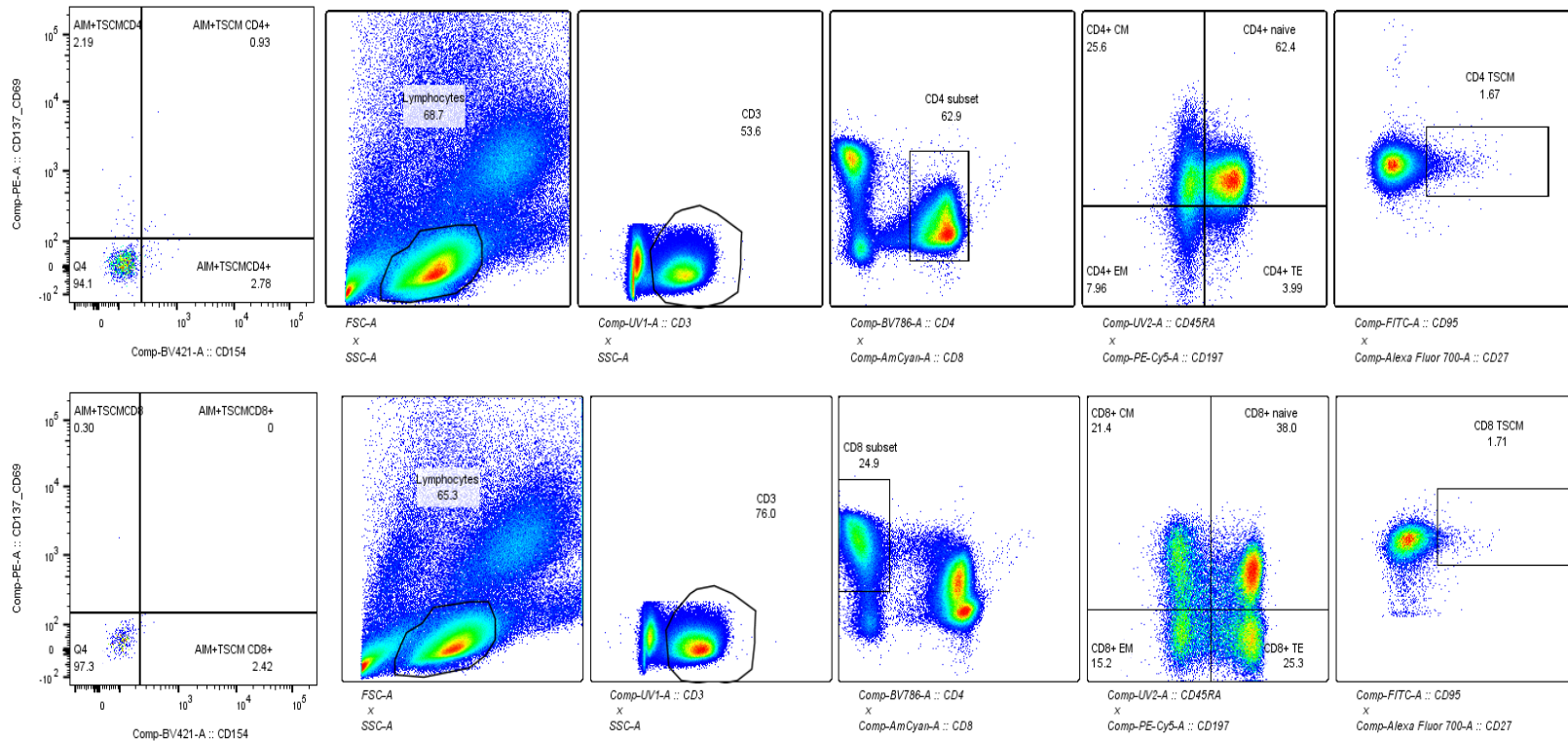
**8.2.1. IFN- $\gamma$  експресия след 16-18 ч. стимулация** - с помощта на кит за определяне на Т-клетъчния отговор срещу SARS-CoV-2 (T-SPOT.COVID Oxford, Immunotec). Като стандартизиран метод, базиран на ELISPOT (EnzymeLinkImmunoSpot), T-SPOT.COVID открива клетъчно-медиирани имунни отговори срещу SARS-CoV-2 в цяла кръв (натриев или литиев хепарин) след изолиране на ПМНК. Антигените на SARS-CoV-2 сенсibiliзират Т клетките като част от Т клетъчния отговор, активирайки както CD4, така и CD8 ефeкторните Т клетки, които от своя страна ще секретират цитокина интерферон-гама. За всяка проба определяхме броя на IFN $\gamma$ + спот-образуващи клетки (SFCs) в ямките, съдържащи специфичните пептиди, преизчислени като SFCs/10<sup>6</sup> ПМНК. Съгласно инструкциите на производителя за положителна се считаше стимулирана проба, съдържаща повече от 32 SFCs след изваждане на резултата от отрицателната контролна ямка (T-SPOT.COVID/ Discovery, Oxford).

**8.2.2. IFN- $\gamma$  експресия след 5 дневна стимулация** - при 16 часова стимулация вероятно се пропускат част от лицата с наличен SARS-CoV-2 специфичен Т-клетъчен отговор. За да проверим тази хипотеза, при ограничен брой проби вирус-специфичните Т клетки бяха определени след 4-дневна стимулация със SARS-CoV-2 пептиди, в присъствие на IL-2 (10<sup>2</sup> IU/ml), RPMI-1640 среда, съдържаща 10% FCS. След 4 дневната инкубация изолираните Т клетки бяха първо измити с PBS и преместени в IFN $\gamma$ - покрита ELISpot 96-ямкова плака, която след това беше обработена по метода описана по-горе

**8.2.3. IFN- $\gamma$  експресия на размразени ПМНК** - за да могат Т клетките да се развият и да се размножат до необходимата концентрация, размразените клетки бяха допълнително култивирани върху 96-ямкова стерилна плака заедно с пептидните пулове от ХХВ.1 и ВА.2.86, IL-2 (10<sup>2</sup> IU/ml), RPMI-1640 среда, съдържаща 10% FCS в продължение на 24 часа (във влажен инкубатор при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>). След тази стимулация изолираните Т клетки бяха първо измити с PBS и преместени в IFN $\gamma$ - покрита ELISpot 96-ямкова плака, която след това беше обработена по метода описана по-горе.

**9. Анализ на флоуцитометрични данни** - за детекция на редки лимфоцитни популации, като на пример AIM+TSCM CD4+ и CD8+ и създаване Т-клетъчни клъстери в специфично стимулирани Т-клетъчни популации беше използван FlowJo v.10.8.1, мощен софтуер в имунологията, който позволява на изследователите да анализират и интерпретират данни от флоуцитометрия, визуализиране на многоизмерни данни, навигиране в сложни набори от данни и извършване на сложни анализи. Импортират се необработени файлове с данни (fcs files от клетъчения сортер FACSAria Fusion, софтуер FACSDiva v.9.0.1). За създаването на Т-клетъчните клъстери бяха използвани „t-SNE” и „UMAP“, алгоритми, който трансформират многоизмерни набори от данни, като запазват оригиналната информация. С помощта на tSNEплотовете можем да видим в кой клъстер на паметови CD4 и/или CD8 Т клетки попадат AIM+ Т клетки, въз основа на тяхната антигенна специфичност и паметов фенотип. Това групиране отразява организацията на Т клетки с подобни паметови характеристики, подпомагайки идентифицирането и анализа на вирус-специфични имунни отговори в рамките на по-широкия Т-клетъчен репертоар.

**10. Статистическа обработка на резултатите и обработка на библиографията** - използван е специализиран софтуер GraphPad 9.0, а за подреждане на библиографията е използван специализиран софтуер: Zotero



**Фигура 4. Детекция на вирус-специфични стволови паметови (AIM+T<sub>SCM</sub>) CD4 (горе) и CD8 (долу) Т-лимфоцити чрез многопараметърна флоу цитометрия на две отделни проби. Представена е последователността на флоуцитометричния анализ на AIM+T<sub>SCM</sub>: дефиниране на гейта на лимфоцити (FCS vs SSC), определяне на Т лимфоцити (CD3 vs SSC), след това дефиниране на CD4 и CD8 Т лимфоцитите. CD4 и CD8 Т бяха анализирани допълнително според експресията на CD45RA и CD197 като централно-паметови (CM, CD45RA-CD197+), наивни (naïve, CD45RA+ CD197+), ефектор-памететови (EM, CD45RA-CD197-) и терминално-ефекторни (TE, CD45RA+ CD197-). Следва детекция на общия пул на стволови паметови CD4 и CD8 Т (субпопулацията от Т лимфоцити с наивен фенотип, ко-експресирации CD95 и CD27) и на край последвано от детекция на AIM+T<sub>SCM</sub>, които експресират CD69 CD137 и/или CD154**

## IV РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. Идентифициране на фенотипни профили, свързани с клиничната тежест

Първоначалните литературни данни за COVID-19 сочат LyAC като основен критерий за клиничната тежест на инфекцията<sup>2-6</sup>. Когато се използва за разделяне на групите (леко, умерено, тежко протичане на инфекцията), целта е да се разбере кой нарушения в имунните механизми определят по-тежко протичане.

Изследваната от нас група LyAC варираше в широки граници (min-max 195 – 2865 клетки/ $\mu$ l). В зависимост от нивата на лимфоцитите, пациентите бяха класифицирани в три подгрупи : Група А – с LyAC в рамките на референтните стойности за здрави контроли (>1100), Група В - с първа степен на лимфопения (LyAC от 1100 до 800 клетки/ $\mu$ l), и Група С - с 2-ра и по-голяма степен на лимфопения (< 800 клетки/ $\mu$ l)<sup>2,7,8</sup>.

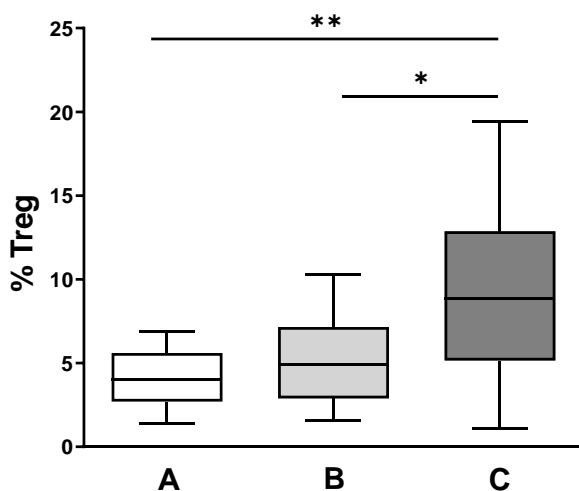
Установихме следните сигнификантни разлики между подгрупите (Табл.5): умерената и тежка лимфопения бяха свързани с намален дял Th1 (CD183+CD196-CD4+) лимфоцити, което съответства на намален антивирусен ефекторен потенциал. Установихме значимо по-висок дял на Th1 лимфоцити в група А в сравнение с В и С (33 с/у 21 и 21, ANNOVA  $p < 0.05$ ), нарастване на дела на активираните (CD38+DR+) CD8 Т (25% vs. 29% и 39%, съответно за група А vs. В и С), както и на броя CD38 молекули, експресирани от CD8 Т клетките (2345 vs. 4471 и 5290 ABS; ANNOVA  $p < 0.05$ ). Намалените нива на хелперни и супресорни Т-клетки при пациенти с COVID-19, особено при тежките случаи, указват на нарушен имуен отговор, като при тежките случаи се наблюдава и увеличение на наивните хелперни Т-клетки и намаляване на паметови хелперни Т-клетки, което подсказва за компрометирана имунна защита срещу SARS-CoV-2 (Qin et al., 2020; Sette & Crotty, 2022; С.-Н. Ye et al., 2021). Продължителната активация, особено на CD8 Т лимфоцитите, представлява риск от изтощаване на антивирусния отговор и неспецифично имунно възпаление<sup>3,9</sup>.



Таблица 5. Иммунофенотипни характеристики на лимфоцитния пул при пациенти с различна степен на лимфопения

ПОПУЛАЦИИ	ЗНАЧЕНИЕ/ мярка	A	B	C	ANOVA	A vs.B	B vs.C	A vs.C
		средна	средна	средна	T-test p	T-test p	T-test p	T-test p
CD3+CD19-	T лимфоцити, %	70	70	67	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD3+CD4+ T	Хелперни T, %	44	45	42	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD3+CD8+ T	Цитотоксични T, %	22	20	21	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD4/CD8	Индекс	2.3	2.7	2.7	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD3-CD56+	NK клетки, %	14	13	15	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD3-CD19+	B лимфоцити, %	13	12	13	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD19+CD27+	Паметови B, %	34	38	31	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD19+CD27+CD38+	Антитяло- секретиращи B, %	19	22	16	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD183+CD196-CD4	Th1 %	<b>33</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>&lt;0.05</b>	<b>&lt;0.05</b>	>0.05	<b>&lt;0.05</b>
CD183-CD196-CD4	Th2 %	37	42	41	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD183-CD196+CD4	Th17 %	22	28	30	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD45RA+CD27+CD4	наивни CD4	37	42	36	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD45RA-CD27+CD4	паметови CD4	37	34	41	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD45RA-CD27-CD4	ефекторни CD4	8	7	5	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD45RA+CD27+CD8	наивни CD8	34	32	32	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD45RA-CD27+CD8	паметови CD8	19	22	20	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD45RA-CD27-CD8	ефекторни CD8	34	35	30	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD28-CD57+CD8	Апоптотични CD8	29	26	55	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD38/CD4	Активирани CD4, ABC	2640	2795	3043	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD38+HLA-DR+CD4	Активирани CD4,%	7	9	12	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD38/CD8	Активирани CD8, ABC	<b>2345</b>	<b>4471</b>	<b>5290</b>	<b>&lt;0.05</b>	<b>&lt;0.05</b>	>0.05	<b>&lt;0.05</b>
CD38/HLA-DR+CD8	Активирани CD8,%	<b>25</b>	<b>29</b>	<b>39</b>	<b>&lt;0.05</b>	<b>&lt;0.05</b>	>0.05	<b>&lt;0.05</b>
CD25 <sup>hi</sup> +CD127-CD4	Treg %	<b>4.2</b>	<b>7.7</b>	<b>10.8</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.05</b>	<b>&lt;0.05</b>
CD25 <sup>hi</sup> +CD127-CD39+	Treg CD39+	20	20	21	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD183+CD196+CD4	Treg/Th17	7.5	8	9.5	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
CD183+CD196+CD39+ CD4	Treg/Th17 CD39+	31	32	40	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

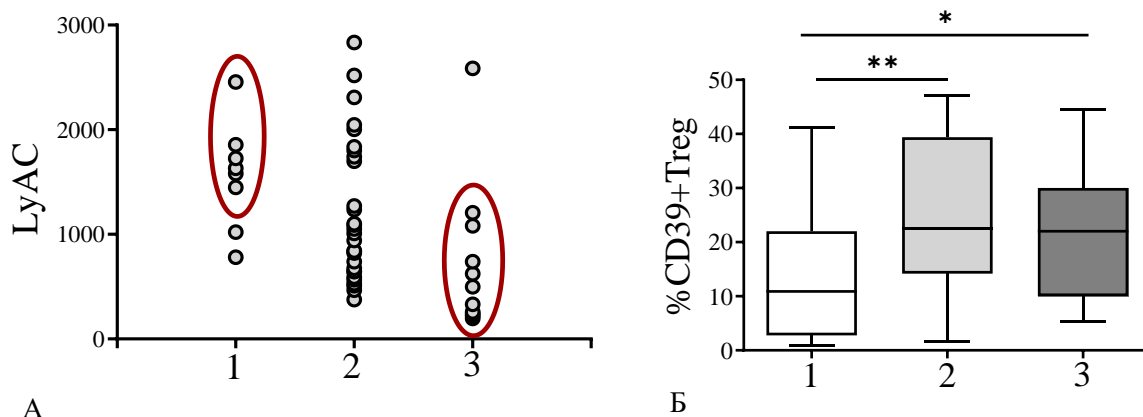
Същевременно установихме нарастване на Т регулаторната субпопулация с неспецифична инхибираща активност (CD25<sup>hi</sup>CD127-CD4<sup>+</sup>) при пациентите с лимфопения, съответно 4.2 vs. 5.2 и 9.3 за групи А, В и С, p<0.05 за всички сравнения). Treg нарастват сравнително рано в хода на инфекцията и разграничават добре пациентите със задълбочаваща се лимфопения (фиг.5). При това броят активационни молекули, експресирани от CD4 и CD8 Т клетките корелираше с процента регулаторни CD4+CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup> Т клетки при пациенти с COVID19, независимо от тежестта на инфекцията.



**Фигура 5.** Ниво на инхибиращи Т-регулаторни клетки (CD25<sup>hi</sup>CD127-CD4) в изследваните групи (А). Група А означена в бяло; група В – светло сиво; Група С – тъмно сиво

Допълнително анализирахме LyAC на изследваните пациенти, разпределени в зависимост от тежестта на протичане на инфекцията, съгласно дефиницията на СЗО (фиг.6А). При пациентите с умерено тежко протичане на инфекцията LyAC варира в широки граници. Именно в тази група делът на Treg би могъл да се използва като предиктивен маркер. Интересно е, че делът на CD39<sup>+</sup>Treg се различаваше значимо между групата с леко (1) и тези с умерено-тежко (2) и тежко (3) протичане, (средно 13,4 vs. 21,3 и 24, p <0.01 и p<0.05 за двете сравнения), тъй като е значимо по-висок при пациенти с умерено-тежко и тежко протичане, отколкото при клинично леките случаи (фиг.6Б). Високите нива на Treg /CD39<sup>+</sup> при хронични вирусни инфекции играят имунопатологична роля по няколко механизма:

потискат антивирусните ефекторни функции, не ограничават имунната активация поради „нечувствителност“ на изтощените вирус-специфични Т-лимфоцитни клонове и нарушават балансираната диференциация на вирус-специфични паметови Т клетки (Nikolova et al., 2011).



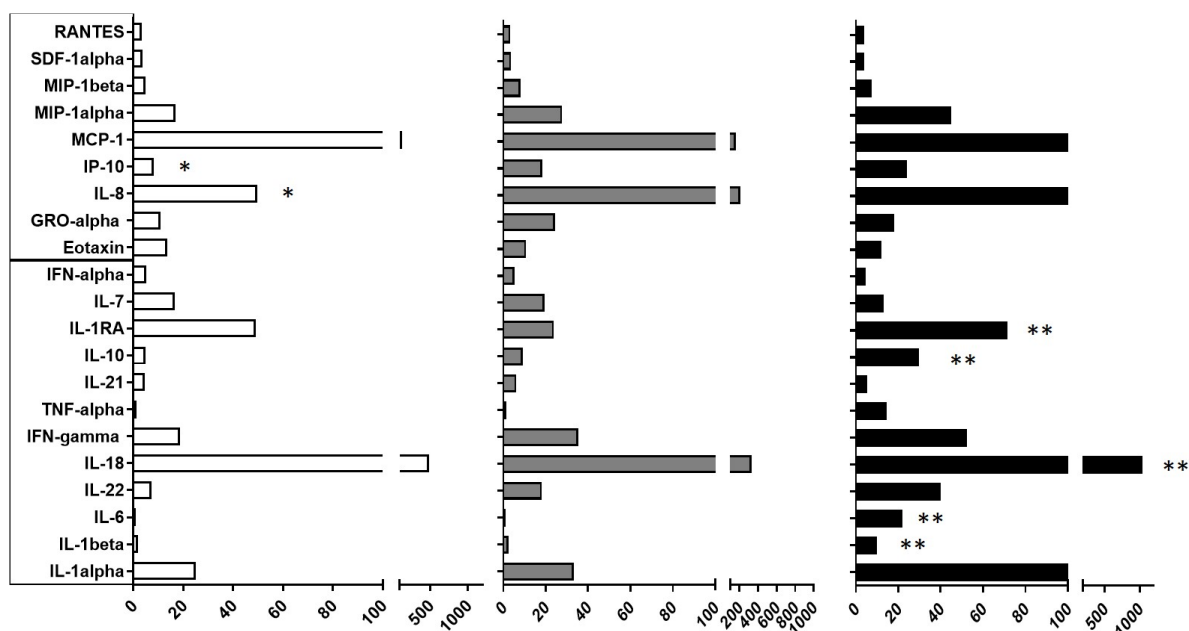
**Фигура 6.** Ly AC при пациенти с различна тежест на COVID19 съгласно дефиницията на СЗО: 1-лек, 2-умерен,3-тежък. Докато в групи 1 и 3 се наблюдава съответствие съответно с висок и нисък LyAC, последният варира в широки граници в група 2. (А) Дял на индуцираните Treg (CD39+) в групите с различна тежест на инфекцията (Б). Статистическите разлики са определени чрез непараметричен тест на Mann-Whitney (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ; медиана, P25 – P75).

## 2. Цитокинов и хемокинов профил при пациенти в остра фаза на инфекция

Осъществяването на протективен имуен отговор и , в частност, качествата на формираната имунна памет, се определят от концентрациите и съотношенията на различните ефекторни и регулаторни цитокини, секретирани от клетките, участващи в различните фази на имунния отговор, както и от вече съществуващият цитокинов фон. Повишената концентрация на IL-6 беше един от първите открити индикатори за тежък COVID-19, свързан със синдром на остър респираторен дистрес (ARDS) и повишена смъртност, в подкрепа на факта, че цитокините модулират имунния отговор при COVID-19 и допринасят за хипервъзпалителното състояние, което характеризира тежката инфекция <sup>2,10-19</sup>.

Значими отклонения бяха установени в концентрациите на ограничен брой цитокини, за

които заключихме че играят роля в острата фаза на инфекцията: IL-18, IFN-gamma, TNF-alpha; IL-21; IL-1alpha, IL-1beta, IL-6, IL-22; IL-10, IL-1RA; IL-7 и IFN-alpha (фиг.7). Секрецията на IL-1 $\beta$  и IL-6 беше значително увеличена при тежките случаи и ги разграничаваше от пациентите с умерено тежко ( $p < 0.01$ ) и леко ( $p < 0.05$ ) заболяване (Фиг.7). Серумните нива на IL-10 бяха значително по-високи при тежките случаи, в сравнение с тези с умерено тежка ( $p < 0.05$ ) и лека ( $p < 0.01$ ) инфекция и корелираха положително с по-високите серумни нива на провъзпалителни цитокини като IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-18 ( $R=0.54$ ;  $R=0.57$ ;  $R=0.40$ ;  $R=0.47$ , съответно).



**Фигура 7.** Сравнение на серумните концентрации на изследваните цитокини и хемокини при пациенти с различна тежест на SARS-CoV-2 инфекция. Показана е кратност на нарастване на концентрациите (над границата на детекция на метода) при пациенти с леко (бяло), умерено (сиво) и тежко (черно) заболяване. Звездичките показват наличието на статистически значими разлики между групите по тежест. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Докато нивата на основния Th1 ефекторен цитокин IFN- $\gamma$  не се различаваха значително между групите (фиг.7), съотношението IFN- $\gamma$ /IL-10 беше значително намалено при пациентите с тежък, в сравнение с умерено и леко протичащ COVID-19 (1.8 с/у 3.9 и 3.8). От друга страна, съотношението IL-6/IL-10 беше сравнимо при леките и умерените случаи,

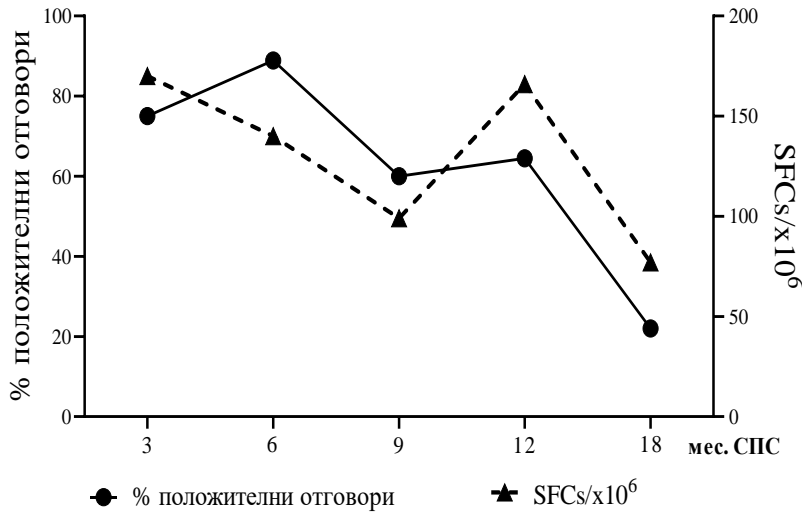
но нарастваше при тежката форма (0.2 и 0.1 с/у 0.7). Намалването на съотношението IFN- $\gamma$ /IL-10 може да означава, че IL-10 или не успява да потисне възпалението, или действа по провъзпалителен начин при определени условия<sup>20-23</sup>. Сравнението между средните нива на изследваните хемокини в трите групи показва значими разлики само по отношение на IL-8 – основният хемоатрактант за неутрофили и IFN $\gamma$  -индуцируемият медиатор на възпаление IP-10. И двата медиатора бяха значимо повишени при умерено и тежко протичащо заболяване, в сравнение с леките случаи (фиг.7).

### 3. Динамика на SARS-CoV-2 – специфичния ефекторен Т-клетъчен отговор

#### 3.1. Изследване на SARS-CoV-2-специфични IFN- $\gamma$ секретирани Т клетки посредством ELISpot метод (T-SPOT.COVID, Oxford, Immunotec)

<i>Таблица 6. Характеристики на изследваните с ELISpot пациенти</i>					
ДСПС (med; min-max)	<b>90</b> <b>30-135</b>	<b>180</b> <b>173-224</b>	<b>270</b> <b>238-330</b>	<b>362</b> <b>331-375</b>	<b>542</b> <b>400-750</b>
<b>Проби (n)</b>	<b>27</b>	<b>26</b>	<b>12</b>	<b>31</b>	<b>11</b>
<b>Възраст</b> (год, med; min-max)	59 19-68	53 24-71	47 29-63	56 32-69	51 35-63
<b>Пол (М/Ж)</b>	<b>12/15</b>	<b>10/16</b>	<b>2/10</b>	<b>15/16</b>	<b>6/5</b>
<b>Ваксинирани след инфекцията (n)</b>	0	7	1	6	2
<b>Период на инфектиране Мес./год.</b>	03.2020- 01.2022	07.2020- 02.2022	06.2020- 10.2021	06.2020- 03.2021	09.2020- 03.2021
<b>% положителни резултати</b>	<b>75</b>	<b>89</b>	<b>60</b>	<b>65</b>	<b>22</b>

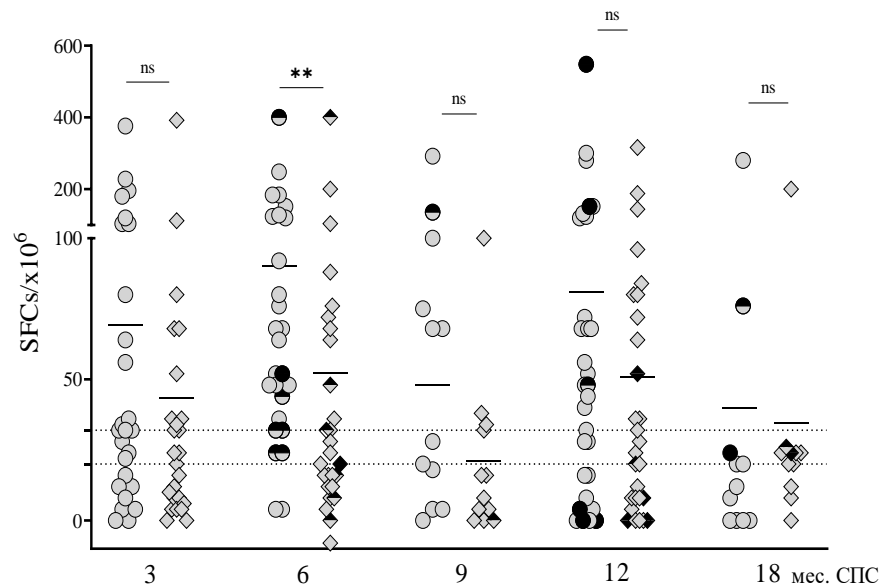
Проучвания върху SARS-CoV-1 инфекцията разкриха устойчиви паметови Т клетки, откриваеми и до 17 години след инфекцията, предоставяйки ценна информация за дългосрочния имунитет срещу човешките коронавируси<sup>24-26</sup>. Редица проучвания демонстрират стабилни Т-клетъчни отговори, които корелират с успешното възстановяване на реконвалесцентните донори и могат да бъдат открити след COVID-19 инфекцията, включително и при пациенти със съпътстващи заболявания<sup>27-34</sup>



**Фигура 8.** Динамика на SARS-CoV-2-специфичния Т-клетъчен отговори до 18 месеца след появата на симптомите на инфекция (СПС). Дял на положителни отговори от изследваните проби (непрекъсната линия) и среден брой SFCs/ $10^6$  ПМНК (пунктирна линия).

Установихме, че кумулативният дял на положителните отговори (към S1 и/или N) достига максимум (89%) шест месеца след инфекцията, последван от постепенно намаляване, така че на 18-ия месец само 22% от тестваните проби отговоряха с вирус-специфична продукция на IFN $\gamma$  (фиг.8). Същата тенденция наблюдавахме и по отношение на средния брой SFCs, който намаля близо двукратно, от  $170/10^6$  ПМНК на 3-ия месец до  $77/10^6$  ПМНК на 18-ия месец след инфекцията (фиг.8).

Епитоп-специфичният анализ показва, че намаляването на SARS-CoV-2-специфичните Т-клетъчни отговори към 9-ия месец се дължи изцяло на бързо намаляващата реактивност към N-пептидни пул (фиг.9). В същото време S1-специфичните Т-клетъчни отговори оставаха почти непроменени до 12 месеца след инфекцията (средни стойности SFCs/ $10^6$  ПМНК на 3ти, 6ти, 9ти, 12ти и 18ти месец, съответно: 70; 90; 68; 80; и 40). Всъщност, през всички изследвани периоди, средният брой на N-специфични Т-клетки бе по-нисък в сравнение със S1-специфичните, като тази разлика достигна статистическа значимост на 6-ия месец СПС (52 срещу 90, MW  $p < 0.01$ ), (фиг. 9).

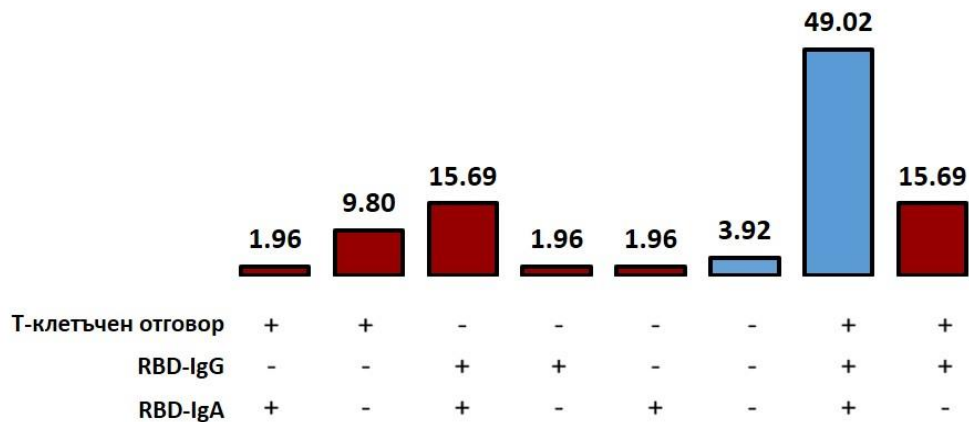


**Фигура 9.** Индивидуални стойности за SI- (кръг) и N- (диамант) специфичните IFN- $\gamma$ + T. Пунктираната линия съответства на границата за отчитане на положителен отговор (32 SFCs/10<sup>6</sup> ПМНК). Донорите, ваксинирани в рамките на 6 месеца преди пробовземането, са обозначени с пълни черни символи, а тези, ваксинирани повече от 6 месеца преди пробовземането, с получерни символи. (\*\* $p < 0,01$ , ns,  $p > 0,05$ , MW).

### 3.2. Съответствие Т-клетъчен и хуморален SARS-CoV-2 специфичен отговор

Тъй като Т-клетъчният отговор е водещ за цялостното развитие на имунния отговор в различните му етапи и ефекторни прояви, представляваше интерес паралелното изследване на вирус-специфичния Т-клетъчен и хуморален имунен отговор. За да оценим влиянието на вирус-специфичния Т-клетъчен отговор върху наличието и нивата на SARS-CoV-2-специфичните IgG и IgA, при 68 лица, беше направена едновременна оценка на IFN $\gamma$ +T лимфоцити, RBD-IgG и -IgA, разпределени в 4 групи както следва: 1-3 мес. (A, n=17); 3-6 мес. (B, n=18); 6-9 мес. (C, n=12); 9-14 мес. (D, n=21) след инфекцията.

Въпреки, че детекцията на RBD-специфични IgG в периферната кръв е най-достъпният и най - широко прилаган метод за доказване на SARS-CoV-2 специфичен имунен отговор, полезен за идентифициране на асимптомни инфекции, както и за закъсняло диагностициране на пациенти с отрицателен резултат от PCR тест за COVID-19<sup>35-38</sup>, ясно е, че той е Т- зависим и отразява качествата на вирус-специфичния Т-клетъчен отговор.

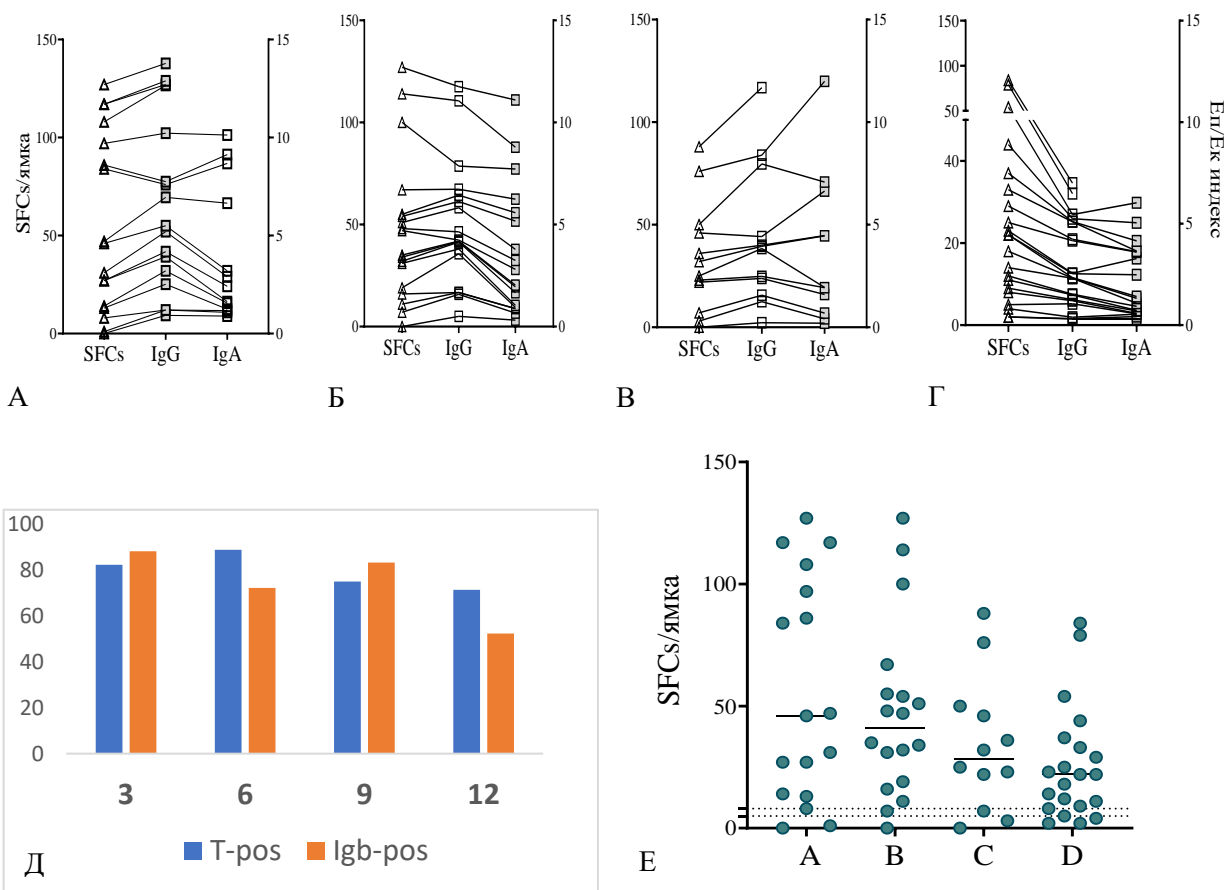


**Фигура 10.** Липса на корелация между Т-клетъчен и хуморален имунен отговор срещу SARS-CoV-2 при преболедали. Обобщени резултати за наличието на SARS-CoV-2 специфични  $IFN\gamma$ +T, IgG и IgA. Пълно съвпадение на хуморалния и Т-клетъчния отговор (маркирани в синьо); Без съвпадение в отговорите (маркирани в червено)

Кумулативните резултати показаха значителна дискордантност: при почти 30% от изследваните липсваше съответствие между наличието на вирус-специфични Т-клетки и IgG антитела. Пълно съответствие се наблюдаваше едва при 53% от пробите, докато наличие и на трите типа специфичен отговор установихме при 49% (фиг.10).

Несъответствието между клетъчния и хуморалния отговор се задълбочава с времето, изминало от инфекцията и то е предимно за сметка на намаляващи титри на специфичните антитела (фиг 11А-Г). Така в група А при 70.5% от донорите се откриват и трите типа отговор, в сравнение с 42.8% в група Д ( $p=0.02$ , ChiSqTest). Делът на донори, при които се открива вирус-специфичен Т-клетъчен отговор на 3-ти, 6-ти, 9-ти и 12-ти месец е, съответно, 82, 89, 75 и 71% срещу 88, 72, 83 и 52% за специфичните имуноглобулини (фиг.11Д). Същевременно, трябва да се отбележи, че с времето значително намаляваше броят на циркулиращите вирус-специфични ефекторни клетки, средно SFCs/ямка 56, 47, 44, 26 - съответно на 3ти, 6-ти, 9-ти и 12-ти месец (фиг.11Е).





**Фигура 11.** Зависимост между наличието на SARS-CoV-2 специфични IFN- $\gamma$  секретирани T клетки, RBD-IgG и RBD-IgA и времето, изминало след COVID-19 инфекцията: до 3 мес. (А); от 3 до 6 мес. (Б); от 6 до 9 мес. (В) и от 9 до 14 мес. (Г); Сравнение на клетъчен и хуморален имуен отговор срещу SARS-CoV-2 при четирите изследвани групи (Д); Индивидуални стойности на вирус-специфични IFN $\gamma$  + T-клетки (SFCs/ямка) разпределени в четирите изследвани групи (Е).

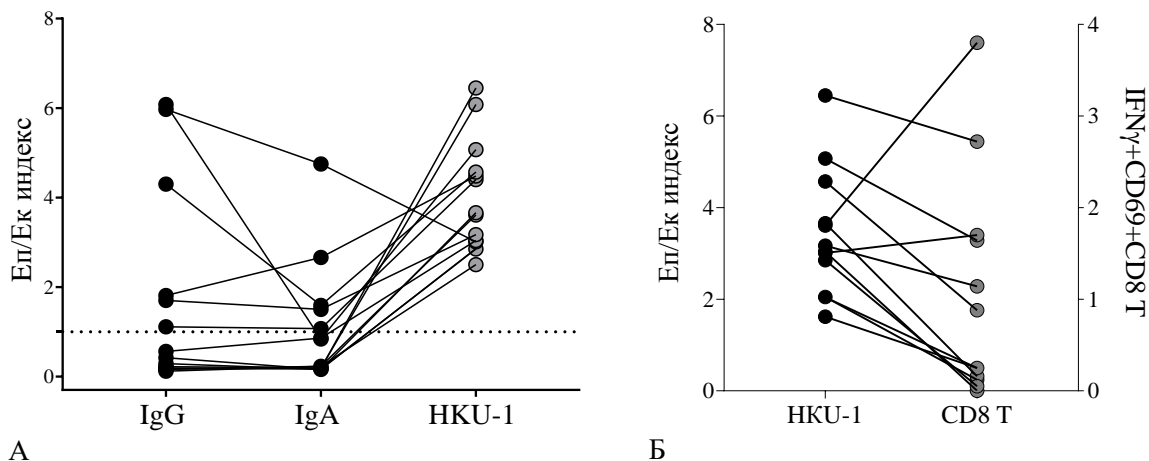
### 3.3 Изследване на кръстосана реактивност чрез определяне на имунитета към сезонните коронавируси и податливост към SARS-CoV-2 инфекция

Човешките не-SARS коронавируси (HCoV) причиняват значителен дял от сезонните настинки<sup>39</sup>. Тяхното структурно сходство със SARS-CoV-2 повдига въпроса за наличието на кръстосана реактивност и защита към двата типа вируси<sup>40,41</sup>. Имуният отговор към SARS-CoV-2 може да бъде повлиян от предишна експозиция на сезонните коронавируси като HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 и HCoV-NKU1, което в определени случаи

може да доведе до по-леки симптоми <sup>42-45</sup>. В някои проучвания са наблюдавани функционални кръстосани реакции <sup>24,46,47</sup>, въпреки факта, че не всички автори установяват това <sup>34</sup>. За да потърсим отговор на този въпрос, изследвахме наличието на IgG антитела към най-често срещаните сезонни коронавируси (NL63, 229E, OC43, HKU1) във връзка с наличието на RBD-специфични IgG и IgA и SARS-CoV-2 специфични CD4 и CD8 Т-клетки в проби от периферна кръв на преболедували средно-тежка SARS-CoV-2 инфекция (група А, n=24; средно 14 дни след PCR+ тест за SARS-CoV-2) или след интензивна експозиция на SARS-CoV-2 (група В, n=24, включва здравни работници, които са били интензивно изложени на SARS-CoV-2 в резултат на професионален или домашен контакт, но никога не са имали PCR+ тест за SARS-CoV-2). Кръвните проби са взети в периода от март 2020 г. до ноември 2021 г. Нито един от участниците не е бил ваксиниран срещу SARS-CoV-2 към момента на пробовземането. NL63-, 229E- и OC43-специфични IgG бяха открити в 100% от изследваните проби, а само двама донори имаха гранични стойности за HKU-1-специфични IgG, съответстващи на 94% положителни резултати.

Наличието на значително по-високи нива анти-HKU-1 IgG в групата на интензивно експонирани и не боледувачи донори (В), показва възможен кръстосан защитен ефект на анти-HKU-1 IgG срещу SARS-CoV-2. Още повече, 85% от донорите (В) с високи нива на анти-HKU-1 се оказаха RBD-IgA-отрицателни, а 69% нямаша нито RBD-IgG, нито RBD-IgA антитела (Фиг.12А). Същевременно, наличието на отчетлив, предимно CD8 Т SARS-CoV-2 специфичен отговор при донори с високи стойности на HKU-1 IgG би могъл да се дължи на кръстосано реагиращи HKU-1 специфични паметови Т клетки (Фиг.12Б). Интересно е да се отбележи, че честотата на SARS-CoV-специфични CD4 и CD8 Т лимфоцити бяха сравними при преболедувалите и експонирани донори (0.33 с/у 0.65 и 0.86 с/у 1.1, съответно,  $p > 0.5$  за двете сравнения).

Познаването на феномена кръстосана реактивност е изключително полезен при разработването на ваксини срещу нововъзникващи варианти на SARS-CoV-2 и други структурно сходни вируси с епидемичен потенциал чрез осигуряване на кръстосана защита



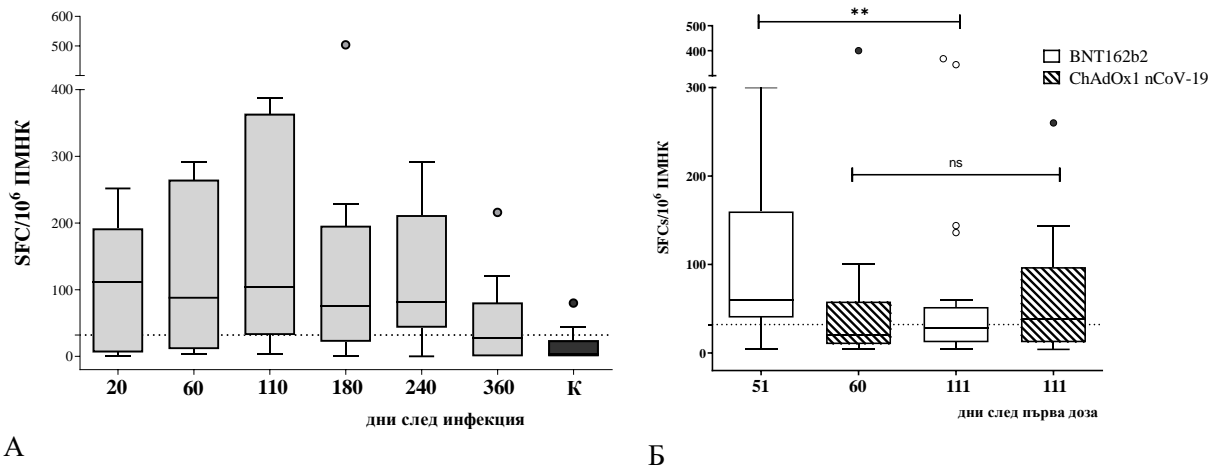
**Фигура 12.** Зависимост между наличието на SARS-CoV-2-специфични IgG, IgA, CD8 T и HKU1-специфични IgG. (А) Повечето донори от група В, които имаха високи нива на анти-HKU-1 IgG (сиво), нямат или са с ниски нива на RBD-IgG и RBD-IgA (черно). (Б) Наличие на SARS-CoV-2 специфичен CD8 T отговор (черно) при безсимптомни донори с високи нива на HKU-1 IgG (сиво).

### 3.4. Сравнение между естествено индуцирания и пост-ваксинален Т-клетъчен имуен отговор срещу SARS-CoV-2

Сравнителната характеристика на естествения и пост-ваксинален имуен отговор е от огромно практическо значение в условията на интензивно развиващ се епидемичен процес. Ето защо, сравнихме Т-клетъчния отговор, измерен с ELISpot при донори, които са били имунизирани, без анамнестични данни за предходна инфекция (здравни работници, имунизирани с BNT162b2  $n=47$  или имунизирани с ChAdOx1 nCoV-19  $n=19$ ) и при донори на различни срокове след COVID-19 инфекция без данни за имунизация по време на пробовземането.

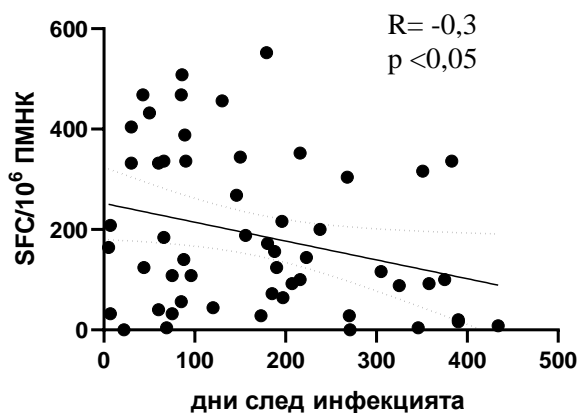
Средният брой вирус-специфични IFN- $\gamma$  секретирани Т клетки след преболедуване беше по-висок отколкото след поставяне на първата доза ваксина, на съответните срокове (фиг. 13). Вирус-специфични Т клетки 51 дни след първата доза установихме при 84% от имунизирани с BNT162b2 (средно 97 SFCs/ $10^6$  ПМНК) и 66% от имунизирани с ChAdOx1 nCoV-19 (средно 59 SFCs/ $10^6$  ПМНК). Процентът на положителни отговори на 111 дни след първата доза с BNT162b2 е все още почти 70%, (средно 61 SFCs/ $10^6$  ПМНК, с

статистическа значимост между изследваните периоди,  $**p < 0.01$ , MW). Имунизирани с векторна ваксина 111 дни след първата доза дадоха 65% положителни отговори (средно 63 SFCs/10<sup>6</sup> ПМНК, без статистическа значимост между изследваните периоди), (фиг.13Б).



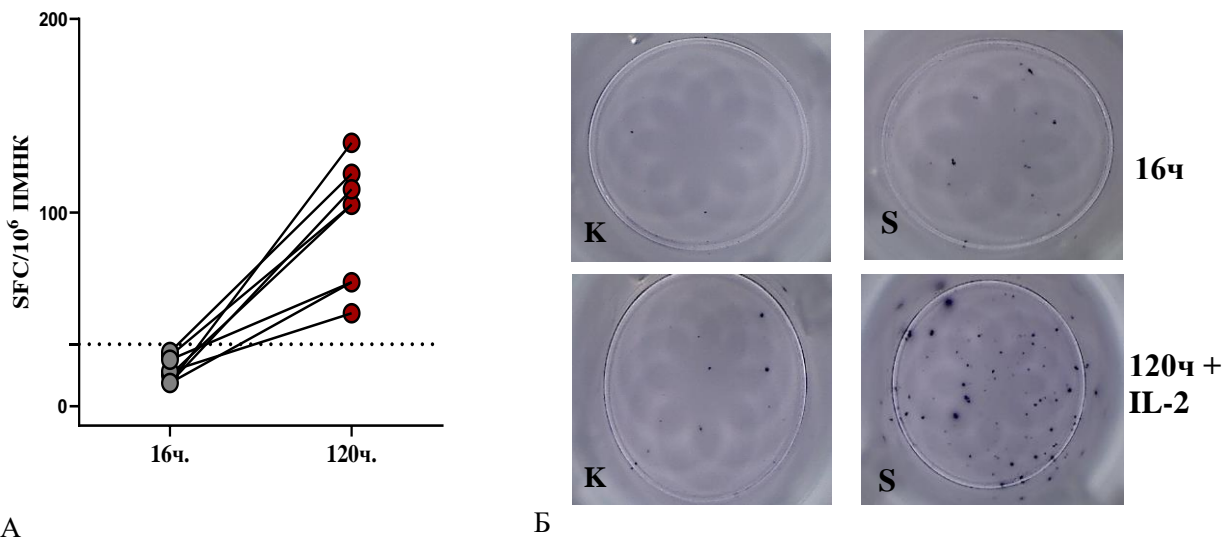
**Фигура 13.** SARS-CoV-2 специфични IFN- $\gamma$  секретирани T клетки определени с ELISpot; (А) При donори на различни срокове след COVID-19 инфекция (сиви символи); К (черно) - контролни проби от donори без лабораторни и анамнестични данни за прекарана COVID-19 инфекция към момента на изследване; (Б) При имунизирани donори (BNT162b2 или ChAdOx1 nCoV-19). Пунктираната линия съответства на граничните нива за положителен резултат (32 SFCs/10<sup>6</sup> ПМНК). Статистическите разлики са определени чрез непараметричен тест на Mann-Whitney ( $**p < 0.01$ ; ns,  $p > 0.05$ ).

Предположихме, че повече от девет месеца след инфекцията (фиг. 14) в периферната кръв би следвало да преобладават дълго-живеещи вирус-специфични паметови клетки, които се нуждаят от по-продължителна стимулация, за да проявят своите функции. Част от тях вероятно имат и различен цитокинов профил<sup>49-52</sup>. По този начин при 16 часова стимулация вероятно се пропускат част от лицата с наличен SARS-CoV-2 специфичен T-клетъчен отговор. И затова приложихме за пръв път собствена модификация на SARS-CoV T-теста за детекция на паметови T клетки продължително време след среща с вируса.



**Фигура 14.** Обратна корелация между циркулиращите SARS-CoV-2-специфични Т клетки и времето (дните след инфекция)

След дългосрочно стимулиране (5 дни) 100% от пробите, останали негативни по стандартния метод, дадоха положителен резултат за наличие на SARS-CoV-2 IFN- $\gamma$ +T (фиг. 15А). Следователно, диагностичните методи за доказване на антиген-специфични Т-клетки следва да се подбират внимателно, в зависимост от времето след индуциране и конкретните епидемични условия.



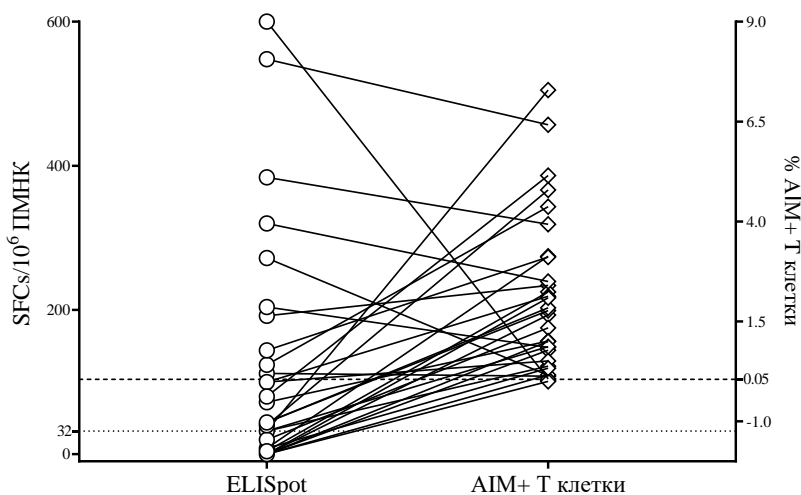
**Фигура 15.** Сравнение на резултатите от ELISpot при 16 часова стимулация и 120 часова стимулация + IL-2. (А) Пунктираната линия съответства на граничните нива за отчитане на положителен резултат (32 SFCs/10<sup>6</sup> ПМНК). Представен е ELISpot резултат при 16ч с/у 120ч + IL-2 след стимулация с S-антиген (Б)

## 4. SARS-CoV-2-специфични паметови CD4 и CD8 T клетки

### 4.1. Изследване на SARS-CoV-2-специфични CD4 и CD8 T клетки посредством многопараметърна флоуцитометрия

Сравняването на положителните резултати за наличие на SARS-CoV-2-специфични  $IFN\gamma^+$ T-клетки, определени чрез ELISpot метод и AIM+ CD4+ и CD8+ T клетки, определени чрез флоуцитометрия, на различни срокове след инфекцията показва, че флоуцитометричното определяне на AIM+ клетки открива значително по-висок дял положителни отговори, отколкото ELISpot метода при едни и същи донори: 97% (30/31) срещу 63% (19/31), (фиг.16).

Активационно-индуциранните молекули се използват за оценка на вирус-специфичните отговори чрез идентифициране и количествено измерване на имунните клетки, активирани след *in vitro* стимулация с подходящи вирус-специфични пептиди като дават възможност за изследване на вирус-специфичните CD4+ и CD8+ T отговори отделно <sup>53-55</sup>

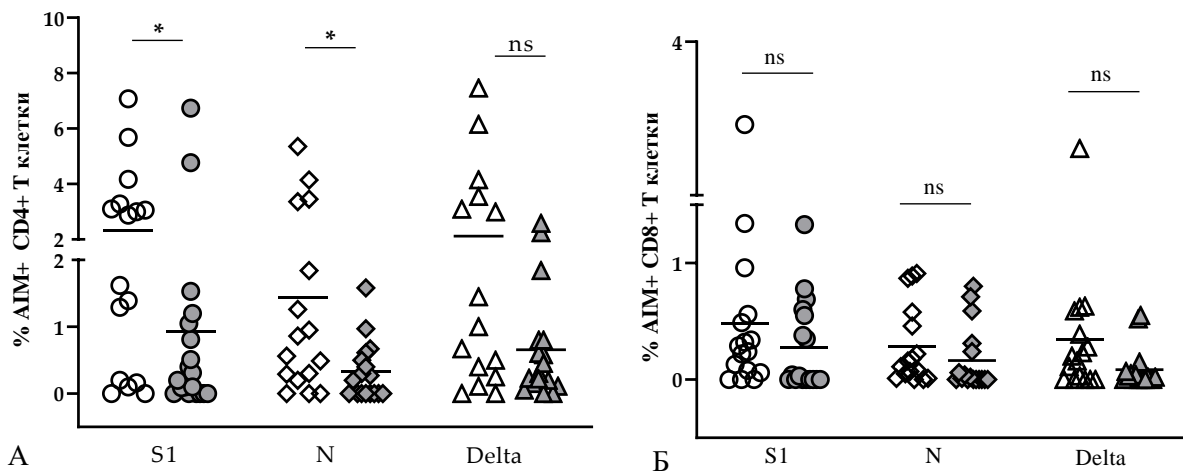


**Фигура 16.** Сравнение между дела на SARS-CoV-2 специфични  $IFN\gamma^+$ T-клетки, определени чрез ELISpot метод и AIM+CD4+ и CD8+T, определени чрез флоуцитометрия, на различни срокове след инфекцията (30 – 750 дни). Пунктираната и прекъсната линии съответстват на граничните нива за положителен резултат от ELISpot (32 SFCs/10<sup>6</sup> ПМНК) и от флоуцитометричното определяне на AIM+T (0.05%)

### 4.2. Динамика, диференциация и реактивност на SARS-CoV-2-специфичния CD4

## и CD8 Тклетъчен пул

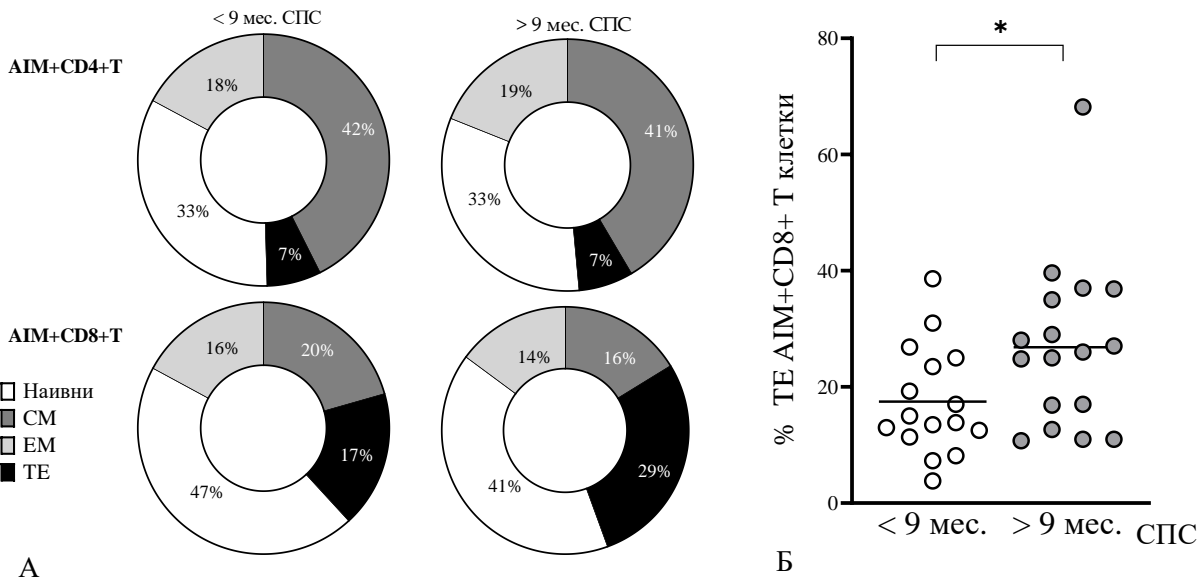
Ефективността на анамнестичния Т-клетъчен отговор зависи от времето на полуживот на вирус-специфичните лимфоцити, степента на диференциация и способността им да разпознават нововъзникнали варианти на вируса. За да оценим ефективността на SARS-CoV-2 специфичния Т-клетъчен пул при преболедали лица изследвахме флоуцитометрично наличието на AIM+CD4 и CD8Т в периферната кръв (след *in vitro* стимулиране с релевантни пептидни пулове) до 2 г. след инфекцията, като анализирахме степента на диференциация на вирус-специфичните Т клетки, както и реактивността им срещу варианти на вируса, различни от индуцирания. Сравнени са Т-клетъчните отговори, изследвани <9 месеца (средно 171 дни) и >9 месеца (средно 454 дни) след инфекцията със SARS-CoV-2, съответно срещу S1 и N антигени на изходния вариант и срещу спайк на делта варианта. Установихме значително намаление на средните стойности на AIM+CD4Т, специфични за S1- (2.3 с/у 0.9) и N-антигени (1.4 с/у 0.3) >9 мес. след инфекцията ( $p < 0.05$  за двете сравнения) и делта-специфичните CD4 (2.2 с/у 0.6), без статистическа значимост (MW  $p = 0.06$ ), (фиг. 17А). Делът на вирус-специфични CD8 Т, независимо от тяхната специфичност и тествания период, беше по-ниска в сравнение с CD4Т (фиг. 17Б), обаче, не намаляваха значимо в късните периоди (>9 мес. след инфекцията): средни стойности на AIM+CD8+Т: 0.5 с/у 0.3; 0.3 с/у 0.3; 0.3 с/у 0.1 съответно за S1; N и делта ( $p > 0.05$ ). В съответствие с предишни проучвания, които установяват, че за разлика от SARS-CoV-2-специфичните CD4+ Т клетки, които разпознават предимно епитопи от S1 протеина, близо 50% от вирус специфичния CD8+ Т клетъчен отговор е насочен към други структурни протеини: М, nsр6, ORF3а и N<sup>28,56,57</sup>. От друга страна, Peng et al., съобщават, че при леки случаи делът на CD8+ Т клетки, специфични за SARS-CoV-2, е по-висок<sup>34,56</sup>. Те обаче откриват специфичния отговор по вътреклетъчната експресия на IFN $\gamma$ , което да голяма степен може да обясни различния резултат.



**Фигура 17.** Индивидуални стойности за AIM+CD4 (А) и AIM+CD8 Т клетки (Б), специфични за антигени на изходния SARS-CoV-2 вариант, съответно: S1 (кръгове) и N (диаманти), или за делта варианта (триъгълници). Сравнени са проби, взети до 9 месеца PSO (бяло) и след повече от 9 месеца СПС (сиво); Статистическите разлики са определени чрез непараметричен тест на Mann-Whitney (\*  $p < 0,05$ ; ns,  $p > 0,05$ ).

Степента на диференциация на AIM+CD4+ и CD8+ Т клетки беше определена в зависимост от ко-експресията на рецепторите CD45RA и CD197, съответно като наивни (CD45RA+CD197+), централно-паметови (CM, CD45RA-CD197+) ефектор паметови (EM, CD45RA-CD197-) и терминално диференциарни ефектори (TE, CD45RA+CD197-). AIM+CD4Т клетките бяха предимно централно-паметови (средно 42% и 41%, съответно <9 и >9 месеца СПС), докато AIM+CD8+Т клетките бяха предимно с наивен фенотип (средно 47% и 41%, съответно <9 месеца и >9 СПС), (фиг.18А). Диференциацията на CD4+Т лимфоцитния пул практически не се отличаваше между двете групи проби. При CD8+Т вирус-специфичните клонове, обаче, наблюдавахме значително нарастване на дела на ТЕ клетки >9 месеца СПС (средно 29% срещу 17%,  $p < 0,05$ ), за сметка на CM и EM субпопулациите. Този резултат показва, че в случай на последващи контакти с антигени от SARS-CoV-2 реагират предимно вирус-специфичните CD8+Т-лимфоцити (фиг.18Б).



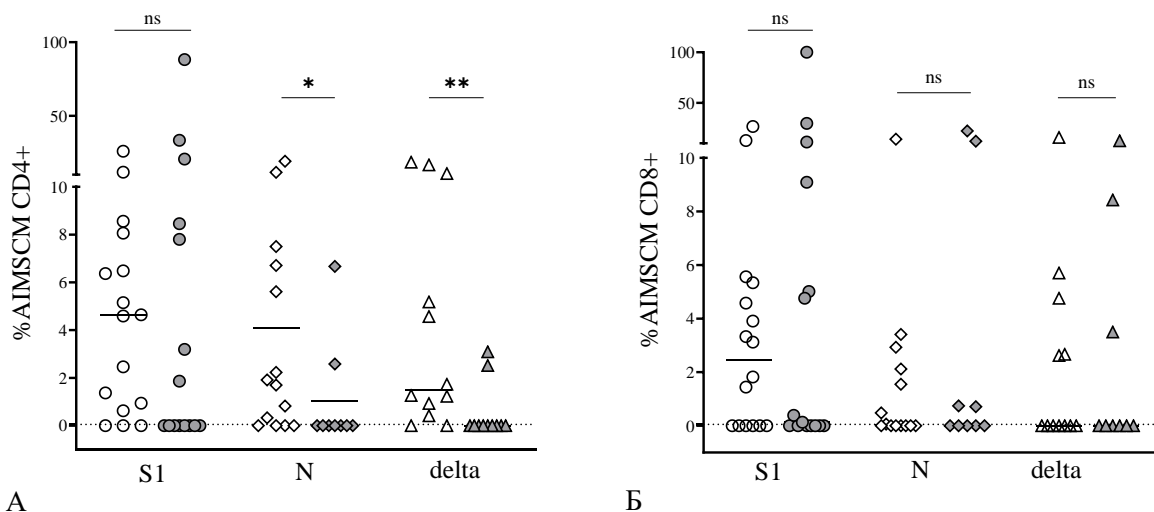


**Фигура 18.** Диференциация на S1- специфичните T лимфоцити на различни етапи след инфекцията. Средни стойности на наивните, СМ, ЕМ и ТЕ клетки в пула на AIM+CD4+T (горен панел) и AIM+CD8+T (долен панел). Представени са резултатите за проби, изследвани < 9 мес. СПС (ляв панел) и > 9 мес. СПС (десен панел). Представени са само S1-специфичните T лимфоцити, тъй като резултатите за N- и делта-специфичните T клетки не се отличаваха съществено (А). Индивидуални стойности за дела на ТЕ клетки в пула на AIM+CD8+ T за двата тествани периода. Статистическите разлики са оценени чрез non-paired t-test (Б).

Значителният дял вирус-специфични CD4 и CD8 T клетки с „наивен“ фенотип (CD45RA+CD197+) ни подтикна да изследваме дела на циркулиращи T стволови паметови клетки (T<sub>SCM</sub>), които фенотипно се дефинират като CD45RA+CD197+CD27+CD95+. Тези дълго-живеещи клетки на имунната памет<sup>49,58</sup>, по литературни данни могат да се открият години след първоначалната експозиция<sup>59</sup>, но винаги ли е така, е причината, поради което тези клетки са специален фокус на интерес е „стволовият“ им характер: възможност за продължително самоподдържане в отсъствие на индуциращия антиген и възстановяване на целия паметов пул, при необходимост. Установихме, че общият пул T<sub>SCM</sub>, представен като дял от CD4 и CD8 T клетките, беше сравним в пробите, взети < 9 и > 9 мес. СПС (средно 0,5% с/у 0,8% и 0,4% с/у 0,7%, съответно от CD4 и CD8 T<sub>SCM</sub> клетките).

SARS-CoV-2-специфичните CD4+ и CD8+T<sub>SCM</sub> бяха определени като дял от общите T<sub>SCM</sub>, експресиращи CD69/CD137/CD154 (AIM+) след стимулиране със съответните пептидни пулове. Нашите резултати показват, че CD4+T<sub>SCM</sub>, специфични за S1 антигена, не

намаляваха значимо повече от 9 мес. СПС, за разлика от N- и делта-специфичните CD4+T<sub>SCM</sub> (фиг.19А). При отделни донори открихме значително увеличен дял S1-специфични CD4+T<sub>SCM</sub> на по-късните етапи след инфекцията, в т.ч. - донори, които не са били ваксинирани след преболедуването. Не установихме сигнификантни разлики във времето по отношение вирус-специфичните CD8+T<sub>SCM</sub>. Важно беше наблюдението, че S1-, N- и делта-специфичните CD8+T<sub>SCM</sub> се поддържаха на сходно ниво в дългосрочен план, като при отделни донори се наблюдаваше и значително увеличена експресия, отново без връзка с допълнително проведена имунизация (фиг.19А и Б). На базата на тези резултати допуснахме, че AIM+CD8+T<sub>SCM</sub> могат да служат като чувствителен маркер за дългосрочна протекция срещу COVID-19, независим от еволюцията на вируса, който превъзхожда IFN $\gamma$ +T, идентифицирани чрез ELISpot.



**Фигура 19.** Индивидуални стойности за AIM+CD4 (А) и CD8 (Б) T<sub>SCM</sub>, определени след стимулиране със съответните пептидни пулове: S1, N и делта, <9 (бяло) и >9 месеца (сиво) СПС

При анализа на реактивността на SARS-CoV-2 специфичните Т клетки срещу различни варианти на вируса, трябва да се вземе пред вид индуцираният вариант. В нашия случай е възможно изкривяване на анализа поради факта, че повечето донори в групата <9 месеца СПС са били заразени с делта вариант, докато тези в групата >9 месеца СПС са били заразени с първоначално циркулиращия алфа вариант. Ето защо, за да изключим

потенциален ефект на първичния антиген върху продължителността на Т-клетъчната памет, сравнихме алфа- и делта-специфичните CD4+ и CD8+T<sub>SCM</sub> при донори, инфектирани през периода на доминиране на алфа и тези, инфектирани през периода на доминиране на делта варианта. Очаквано, донорите, заразени с делта вариант, имаха значително по-голям дял вирус-специфични CD4+T<sub>SCM</sub>, отговарящи на стимулация с делта-пептид, в сравнение с донорите, индуцирани с алфа-вариант. По отношение на вирус-специфичните CD8+T<sub>SCM</sub> пулове, обаче, не са установиха значими разлики, свързани с индуциращия вариант. Интерес представлява фактът, че при един от донорите, тестван >9 месеца СПС, чиято проба бе взета преди появата на делта варианта в България, установихме делта-специфични CD4 и CD8 Т лимфоцити, но не и делта-специфични T<sub>SCM</sub>. От една страна, това е директно доказателство, че антиген специфичните Т-клетки, индуцирани с изходния щам, могат да разпознават и негови варианти. Що се отнася до пула от вирус-специфични T<sub>SCM</sub>, моделирането на неговата специфичност вероятно изисква по-продължително време.

T<sub>SCM</sub> бяха станаха фокус на изследванията, свързани с дълготрайната имунна памет срещу SARS-CoV-2. Kared et al. установяват SARS-CoV-2-специфични CD8+ Т клетки, които имат различен степен на диференциация, средно 42,5 дни след заразяването, и ги отличават като възможен индикатор за дълготрайна защита<sup>60</sup>. Jung et al. установяват нарастване на TSCM клетки между 60 и 120 дни след заразяването свързани със стабилни SARS-CoV-2-специфични CD4 и CD8 Т-клетъчни отговори през 10-месечен период след инфекцията<sup>56</sup>. Ние разширихме тези заключения, потвърждавайки, че стволовите паметови клетки се откриват в циркулацията и функционират повече от 18 месеца след заразяването.

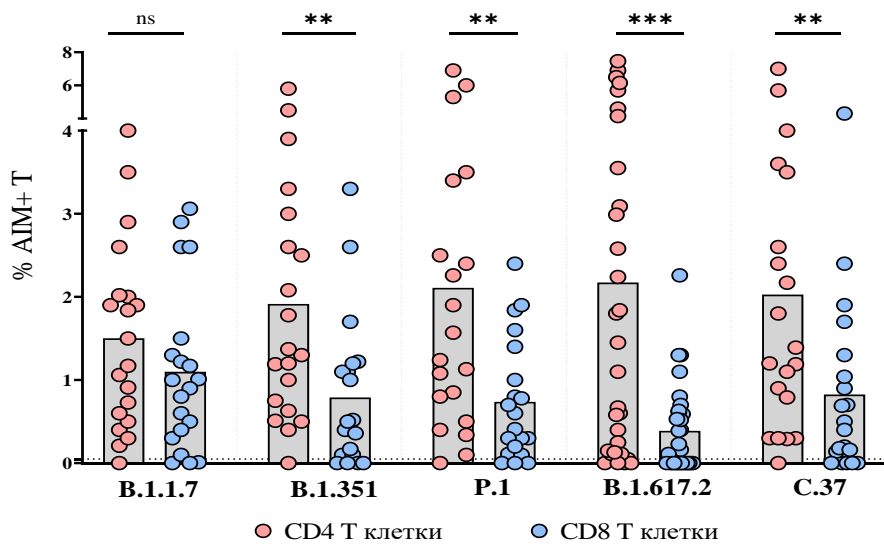
## **4.3 Еволюция на вируса и реактивност на вирус- специфичния Т клетъчен пул**

### **4.3.1. Разпознаване на пептидни пулове от бета, гама, делта и ламбда вариант**

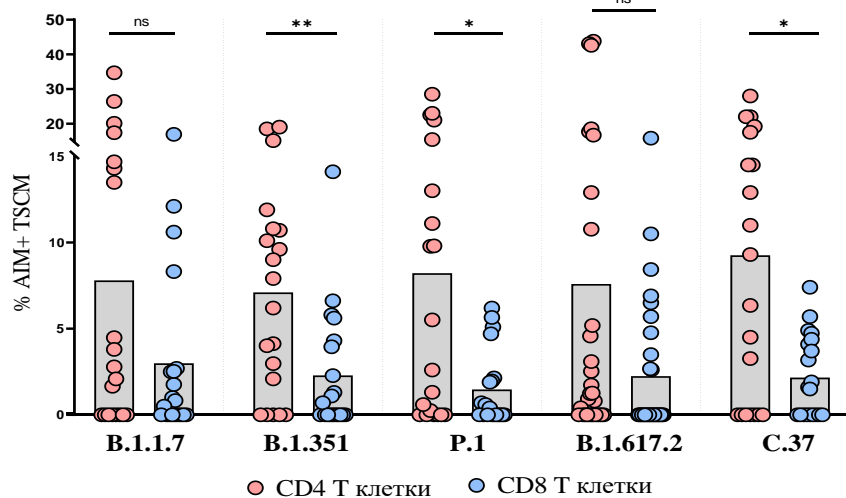
За потвърждение на горната хипотеза, допълнително бяха изследвани 20 лица (7 мъже и 13 жени), на възраст 44.8 (25-63) години, средно 434 (365-810) дни след положителен SARS-CoV-2 PCR тест. Съответно на времето на инфекция и епидемиологичните данни за страната, приехме, че индуциращите варианти са били алфа и делта. Вирус-специфичните Т лимфоцити бяха идентифицирани по експресията на AIM (CD69, CD137, CD154), след стимулация с пептидни пулове от SARS-CoV-2 варианти (Алфа B.1.1.7; Бета B.1.351; Гама

Р.1; Делта В.1.617.2 и Ламбда С.37) чрез 10-параметърна флоуцитометрия (FACSAria). Независимо от използвания за активация вариант, AIM+CD4+Т във всички случаи представляваха по-висок дял, в сравнение с AIM+CD8+Т, както следва: 1,5% с/у 1,1%; 1,9% с/у 0,8%; 2,1% с/у 0,7% и 2% с/у 0,8%, съответно за В.1.1.7, В.1.351, Р.1, В.1.617.2 и С.37. Тази разлика беше статистически значима по отношение на В.1.351, Р.1, В.1.617.2 и С.37 вариантите (фиг.20А). AIM+T<sub>SCM</sub> за тестваните варианти имаха сравними средни стойности в съответния CD4 и CD8 Т-клетъчен пул. Отново дялът на AIM+CD4+T<sub>SCM</sub> беше значително по-висок от техните CD8+ аналози: 7,7%, 8,2%, 8,9%, 6,9% и 8,8% с/у 3,3%, 2,7%, 1,6%, 2,2% и 2,3 %, съответно за В.1.1.7, В.1.351, Р.1, В.1.617.2 и С.37. Тези разлики бяха статистически значими по отношение на В.1.351, Р.1 и С.37 вариантите (фиг.20Б).

Със средствата на биоинформатиката може да се предскаже как Т клетките, индуцирани от инфекция със SARS-CoV-2 или ваксинация срещу вируса, биха реагирани на нововъзникващите варианти на вируса. Проучванията показват, че значителна част от отговорите на Т клетките се запазват, което означава, че еволюцията на SARS-CoV-2 оказва минимално въздействие върху ефективността Т клетъчния имунен отговор срещу вируса<sup>61,62</sup>. Благодарение на структурата на Т-клетъчния рецептор, който разпознава преработен до къси пептиди (6-8 а.к.) антиген, отговорите на CD8 Т клетките демонстрират забележителна способност да разпознават и реагират на новите варианти, в т.ч. значително отдалечените от изходния. Това предполага стабилна и трайна имунна защита, което всъщност е в съответствие с нашето и други заключения<sup>63-67</sup>. Следователно антиген-специфичните паметови и стволови паметови CD8 Т са чувствителен маркер за дългосрочна протекция срещу COVID-19, независим от еволюцията на вируса.



A

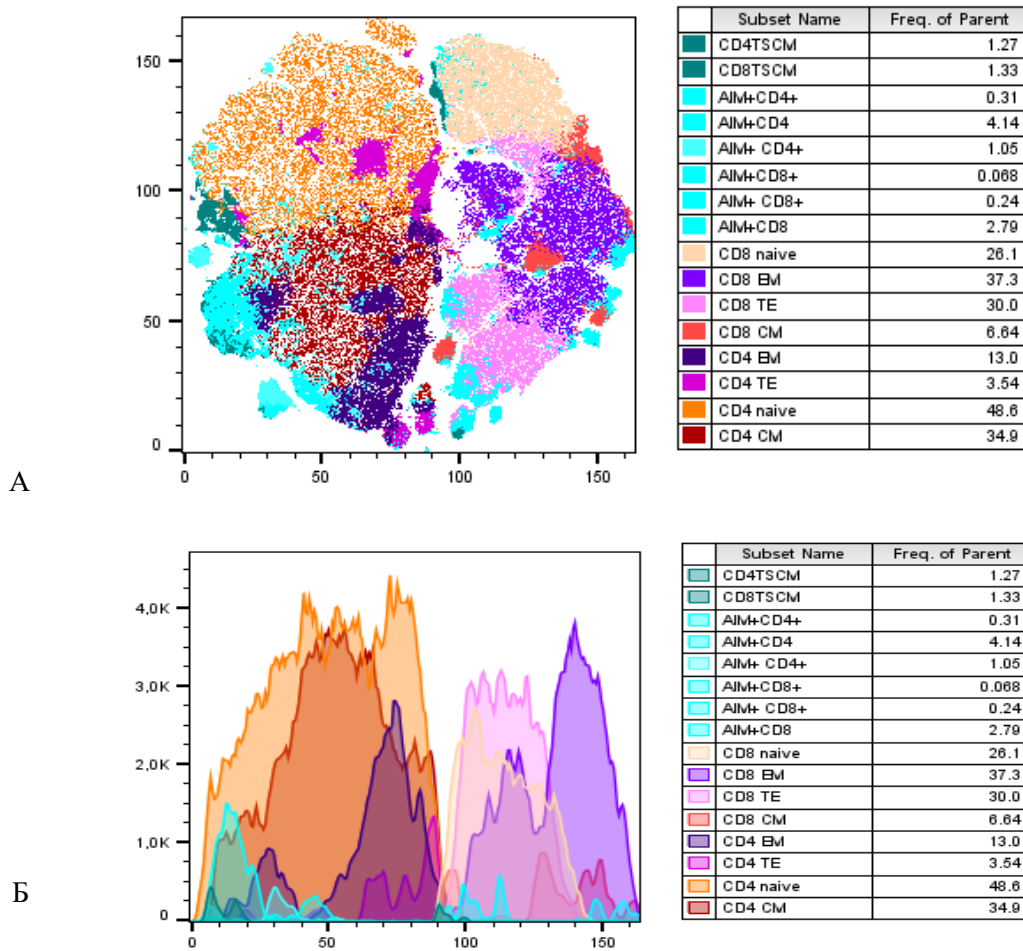


Б

**Фигура 20.** Индивидуални стойности на AIM+ определени след стимулиране с пептидни пулове от SARS-CoV-2 варианти и това B.1.1.7; B.1.351; P.1; B.1.617.2 и C.37 вариантите. Пунктираната линия съответства на граничното ниво за положителен резултат от флоуцитометричното определяне на AIM+ T клетки (0.05%), (\*\*\*) $p < 0,001$ ; \*\*) $p < 0,01$ ; ns,  $p > 0,05$ , MW).

Според tSNE графиките, представени на фигура 21, CD4+T бяха предимно от наивен и централно-паметов фенотип, в сравнение с CD8+T (средно 49% с/у 26% и 35% с/у 7%, съответно за наивни и CM), а от друга страна CD8+T бяха предимно ефектор-паметови (средно 37%), (фиг.21). Докато, стволите-паметови CD4+ и CD8+T клетки бяха с

сравними нива (средно 1.27% с/у 1.33%, съответно), (фиг.21).



**Фигура 21.** Идентифициране на CD4+ и CD8+ T-клетъчни клъстери след стимулация на проби взети 365 – 810 дни след инфекция с алфа или делта вариант на вируса. с пептидни пулове от B.1.351. Използван е “t-SNE” алгоритъм Изследваните супопулации на паметови и B.1.351-специфични T клетки, като dotplot (A) и хистограма (Б)

След стимулиране с пептидни пулове от B.1.351 вариант, AIM+CD4+T (обозначени с светло син цвят) се групират предимно в популацията на централно-паметовите T клетки (обозначени с тъмночервено), което показва, че те притежават паметов фенотип, характеризиращ се с висока експресия на хемокинови рецептори и потенциал за рециркулация и бърза пролиферация при повторна среща с вируса. Докато B.1.351-специфичните CD8+T (обозначени с светло син цвят) според tSNE плотовете се групираха предимно в популацията на терминално-диференцирани T клетки (обозначени в светло-

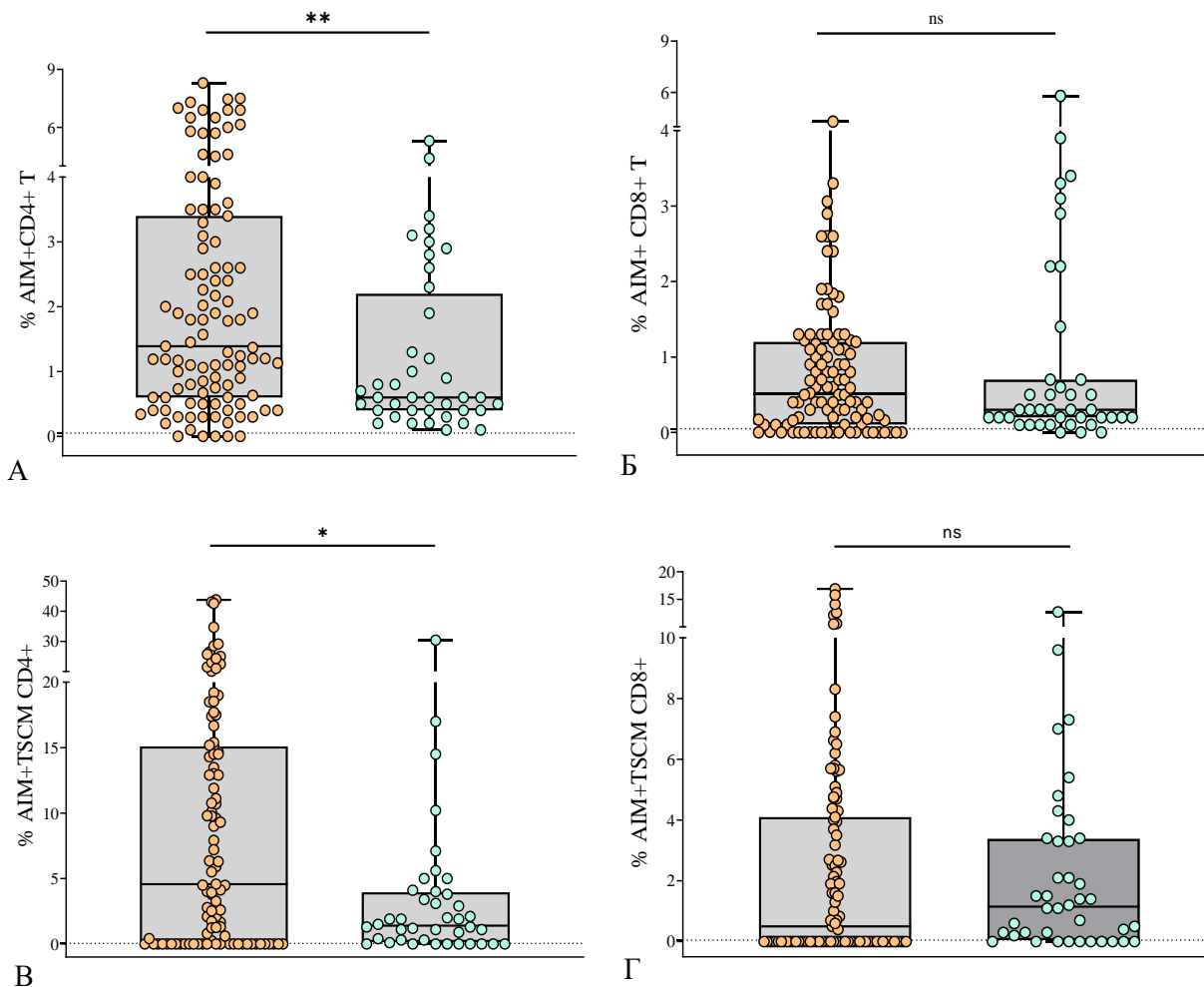
розов цвят), характеризиращи се със силна експресия на ефекторни маркери и намален пролиферативен капацитет. Също така се вижда че малки клъстери както от CD4, така и от CD8 В.1.351-специфични Т-клетки се групират в рамките на T<sub>SCM</sub> (обозначени с тъмносин цвят на фиг.21), характеризиращи се с експресия на маркери на стволови паметови Т клетки и мултипотентност. Това предполага, че малка субпопулация от вирус-специфични Т клетки притежава свойства, подобни на стволови паметови Т клетки, потенциално допринасящи за дългосрочната имунна памет и генерирането на различни паметови Т клетъчни субпопулации при повторна среща с вируса.

#### **4.3.2. Разпознаване на алфа, бета, гама, делта и ламбда от омикрон-индуцирани паметови Т клетки**

За да проверим обратната хипотеза – дали по-късно боледувалите са защитени от изходните варианти, сравнихме нивата на вирус-специфични CD4 и CD8 Т клетки при донори, боледували пред повече от една година (средно 488 (365-810) дни) с проби от лица със скорошна инфекция/експозиция (средно 23 (10-35) дни, боледували/контактни в периода октомври-ноември 2023 година).

Донорите, боледували повече от една година преди взимането на пробата, имаха сравнимо количество AIM+CD8+Т, както и неотдавна експонираните донори (0.8% с/у 0.9%,  $p>0.05$ ) (фиг.22), докато между нивата на AIM+CD4+Т в двете групи беше установена статистическа разлика (2.3% с/у 1.2%,  $p<0.01$ ). По същия начин, неотдавна инфектираните донори се отличаваха със значимо по-ниски нива на AIM+CD4+Т<sub>SCM</sub> срещу пре-Омикрон вариантите (9.1% с/у 3.4%,  $p<0.05$ ), докато нивата на AIM+CD8+Т<sub>SCM</sub> бяха сравними с тези при донори, инфектирани преди повече от една година (2.5% с/у 2.2%,  $p>0.05$ ), (фиг.22).

Групата от неотдавна боледували, всъщност са били инфектирани с варианти на Омикрон, които значително се различават от изходния (Wuhan-Hu-1) щам и от пре-омикрон вариантите. Въпреки това, индуцираните от омикрон варианти CD8 Т паметови клетки успешно разпознават пептидни пулове от своите предшественици. На базата на тези и предишните резултати може да се заключи, че AIM+CD8+Т<sub>SCM</sub> могат да служат като чувствителен маркер на дългосрочна протекция срещу COVID-19, независим от еволюцията на вируса.



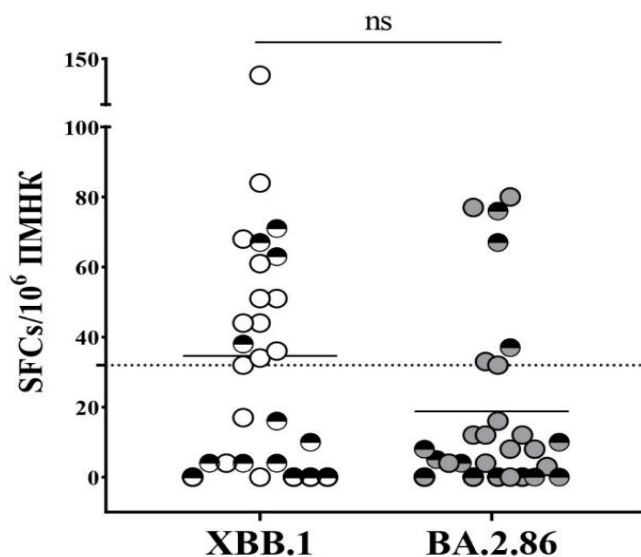
● >1г. след инфекция    ● скорошна инфекция/експозиция

**Фигура 22.** Индивидуални стойности на сборни AIM+CD4/AIM+CD8 (горе) и AIM+TSCM CD4/AIM+TSCM CD8 (долу) определени след стимулиране с пептидни пулове от SARS-CoV-2 пре-омикрон варианти (Alpha B.1.1.7; Beta B.1.351; Gamma P.1; Delta B.1.617.2 и Lambda C.37). Изследвани са проби, взети >1г. след инфекция (оранжево) и проби от лица със скорошна инфекция/експозиция (зелено). Пунктираната линия съответства на граничното ниво за отчитане на положителен резултат от флоуцитометричното определяне на AIM+T (0.05%). Статистическите разлики са определени чрез непараметричен тест на Mann-Whitney (\*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ; ns,  $p > 0.05$ ).



### 4.3.3. Разпознаване на омикрон-варианти (ХВВ.1 и ВА.2.86) от пре-омикрон-индуцирани паметови Т клетки

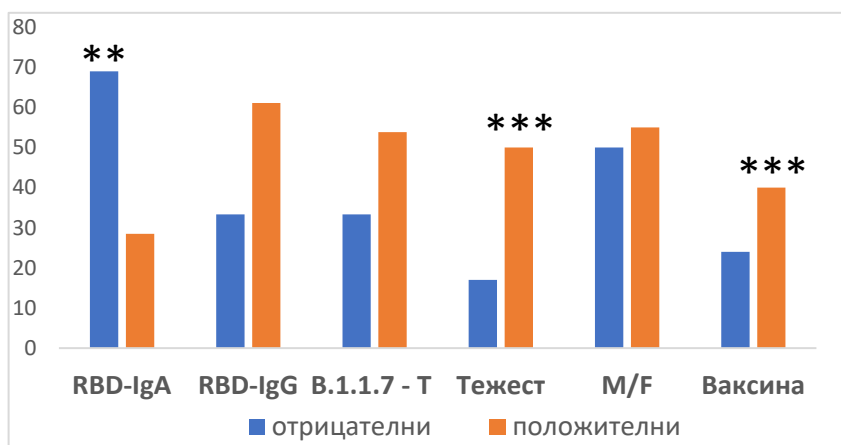
Появата на Омикрон и 32те мутации които бяха открити в спайк протеина - основната антигенна мишена на имунната система, предизвика сериозни опасения за възможно имунно бягство<sup>68-70</sup>. И затова беше важно да разширим нашето проучване и изследвахме ПМНК от 27 лица (16 мъже и 11 жени, инфектирани през периоди, съответстващи на разпространението на изходния, алфа или делта варианта в България), на средна възраст 46 (24-65) години). За оценка на ХВВ.1- и ВА.2.86-специфични Т клетки бяха използвани ELISpot метод (n=27) и многопараметърна флоуцитометрия (n=10) с определяне на експресия на CD69/CD137/CD154 върху CD4 и CD8, след стимулация с пептидни пулове от ХВВ.1 и ВА.2.86.



**Фигура 23.** Индивидуални стойности за ХВВ.1- (празни символи) и ВА.2.86- (сиви символи) специфичните IFN- $\gamma$  секретирани Т-клетки. Пунктираната линия съответства на границата на отрицателен отговор (32 SFCs/10<sup>6</sup> ПМНК). Имунизирани след преболедуван донори (BNT162b2 или AZD1222) са обозначени с черен полукръг; Статистическите разлики са определени чрез непараметричен тест на Mann-Whitney ( ns,  $p>0.05$ ).

Въпреки че замразените ПМНК от изследваните донори никога не са били в контакт със силно променения S протеин на ХВВ.1 и ВА.2.86, изненадващо установихме, че в 56% от

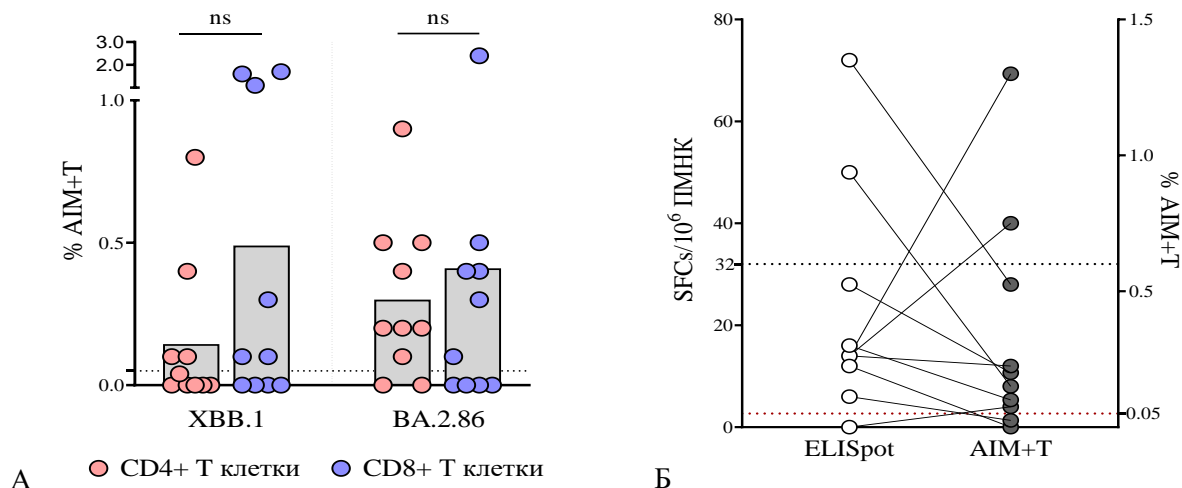
случаите (15/27) донорите реагираха на стимулация с един от или и на двата нови пептидни пулове. След стимулация с ХВВ.1 48% реагираха положително, средно 58 SFCs/10<sup>6</sup> ПМНК (фиг.23), а 26 % бяха с положителен резултат след стимулация с ВА.2.86, средно 51 SFCs/ПМНК (фиг.23). Тези резултати съвпадат с резултатите на други автори<sup>63–66,71,72</sup>. Разликата в отговорите след стимулация с ХВВ.1 с/у ВА.2.86 не достигаше статистическа значимост. На фиг.24 е представен анализ на влиянието на различни фактори върху наличието на Т-клетъчен отговор към новите подварианти на Омикрон: пол, тежест на инфекцията, проведен пълен курс на ваксинация след боледуването, наличие на Т-клетъчен отговор към инфектиращия вариант (алфа), наличието на RBD-специфични IgG и IgA. Установихме, че разпознаването на новите варианти е преобладава статистически значимо при донори с умерено и тежко протекла инфекция, както и с данни за проведена след инфекцията имунизация, демонстрирано и от други учени<sup>73–75</sup>. Обратно, при наличието на положителни RBD-IgA реактивността към новите варианти бе значително по-ниска (фиг.24). Едно вероятно обяснение е, че наличието на RBD-IgA има протективен ефект и може да попречи на индуцирането на Т-клетъчен отговор и диференциране на адекватен паметов пул. Това, до известна степен, може да бъде в подкрепа на заключенията, направени по време на пандемията, че по-тежкото протичане на COVID-19 е свързано с некоординирани адаптивни отговори – т.е. високи нива на антитела при липсващ Т-клетъчен отговор.<sup>43,76,77</sup>



**Фигура 24.** Фактори, влияещи върху кръстосаната реактивност срещу подварианти на Омикрон. Анализирани са проби от пациенти, инфектирани с алфа или делта вариант за наличие на специфични Т-лимфоцити срещу ХВВ.1 и ВА2.86: разпределение на положителните проби, в зависимост от наличието на RBD-IgA, RBD-IgG, B.1.1.7-T +, пол, последваща имунизация. Означени са значимите разлики ( $ChiSq p < 0.05$ )

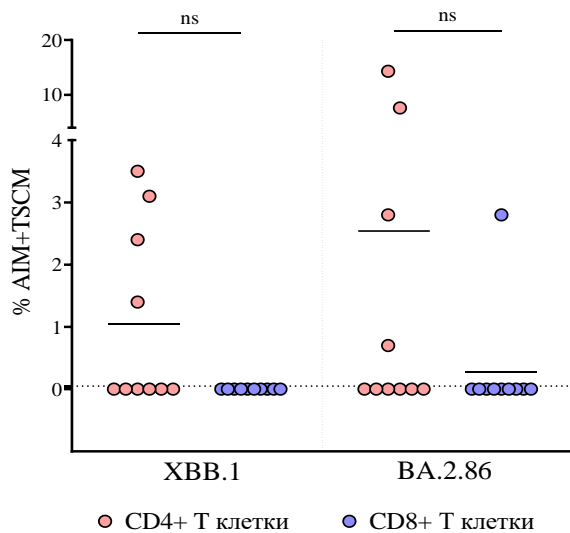
За да изключим потенциален ефект на инфекцирания вариант антиген върху способността на Т клетките да разпознават омикрон-вариантите, сравнихме наличието на ХВВ.1- и ВА.2.86-специфични IFN- $\gamma$  секретирани Т-клетки при донори, инфектирани с изходния вариант (Wuhan-Hu-1), с алфа (B.1.1.7) или с делта (B.1.617.2). Броят на Т-лимфоцитите, секретирани IFN- $\gamma$  при донори, заразени с Wuhan-Hu-1, B.1.1.7 и B.1.617.2 в отговор на стимулация с ХВВ.1 и ВА.2.86, не са различаваха значително помежду си. Следователно, може да се изключи влиянието на индуцирания пре-Омикрон вариант да повлияе на активирането на Т клетките и секрецията на IFN- $\gamma$ , измерени с ELISpot.

При ограничен брой донори (n=10) разширихме проучването, като стимулирахме размразените ПМНК с пептидни пулове от ХВВ.1 и ВА.2.86 и оценихме техните отговори по експресията на AIM (CD69, CD137, CD154), поотделно върху CD4+ и CD8+ субпопулациите. Установихме по-висок дял CD8+Т, разпознаващи новите варианти, в сравнение с CD4+Т, независимо от омикрон подварианта, използван за активация, както следва: 0.5% (0-1.7%) и 0.4% (0-2.4%) с/у 0,1% (0-0,8%) и 0.3% (0-0.9%), съответно за ХВВ.1 и ВА.2.86 (фиг.25А). Тази разлика не достигна статистическа значимост. В допълнение, сравнихме Т-клетъчния отговор, определен с ELISpot и с флоуцитометричната детекция на AIM+ Т клетки (сборни AIM+CD4+ и AIM+CD8+Т). Установихме, че дялът на вирус специфични отговори, установени с ELISpot, е значително по-нисък от положителните отговори, установени флоуцитометрично: 20% (2/10) с/у 80% (8/10) (фиг.25Б). Тези резултати потвърждават, че реагират паметови Т лимфоцити и специфичната експресия на AIM върху Т-клетките е по-подходящият метод за доказване на вирус-специфичната Т клетъчна активация.



**Фигура 25.** (А) Индивидуални стойности на AIM+ CD4 (розови символи) CD8 (сини символи) определени след стимулиране с пептидни пулове от XBB.1 и BA.2.86. Изследваните донори са боледували през периоди съответстващи на разпространението на изходния вариант, алфа или делта варианта в България. Пунктираната линия съответства на границата за отчитане на положителен отговор (съдържаща >0.05% AIM+T, след изваждане на резултата от негативната контрола). Статистическите разлики са определени чрез непараметричен тест на Mann-Whitney (*ns*,  $p > 0,05$ ). (Б) Сравнение между дела на микроп-специфични IFN $\gamma$ +T-клетки, определени чрез ELISpot (отворени символи) и сборни AIM+CD4+ и CD8+T (сиви символи), определени чрез флоуцитометрия. Черната пунктирана линия съответства на граничните нива за положителен резултат от ELISpot (32 SFCs/10<sup>6</sup> ПМНК), а червената пунктирана линия от флоуцитометричното определяне на AIM+T (>0.05%)

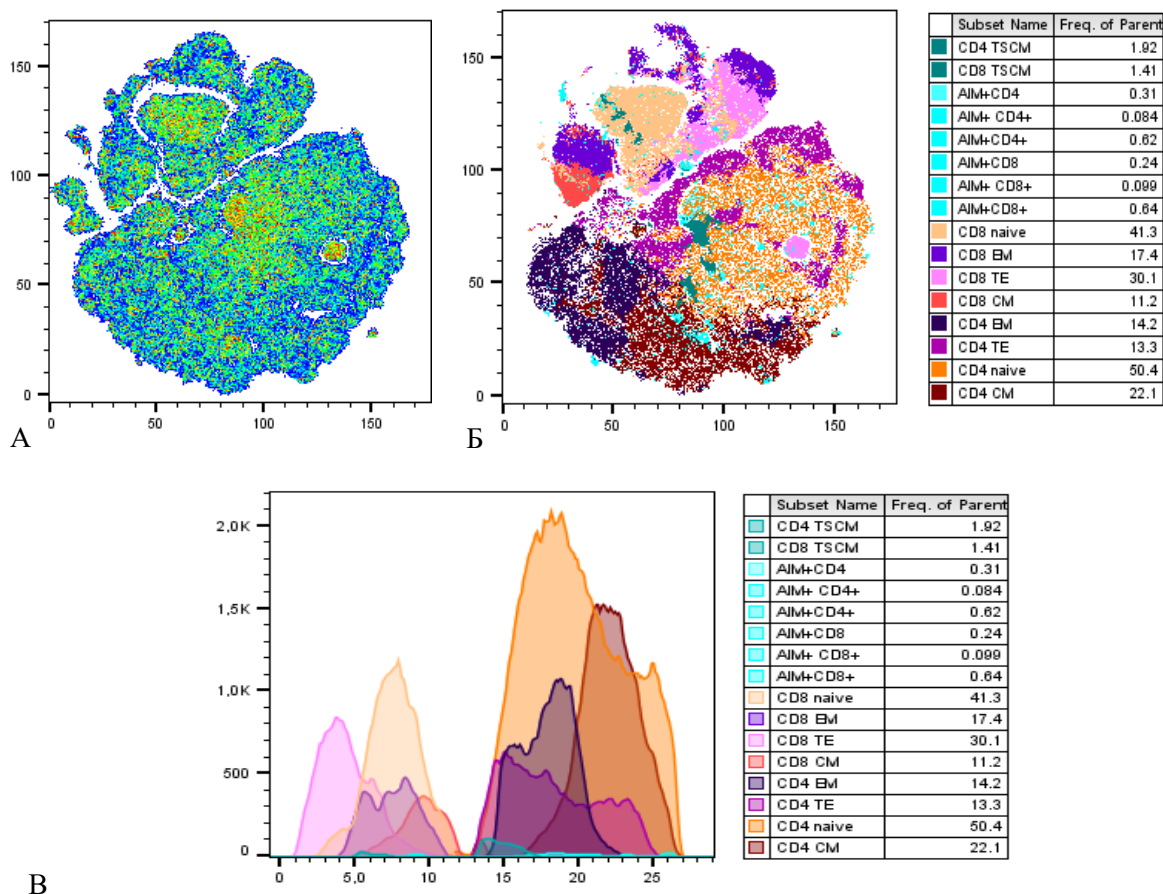
Делът на вирус-специфичните CD4+T<sub>SCM</sub> (AIM+T<sub>SCM</sub>) беше по-висок от техните CD8+ аналози (1% (0% - 0.3%) и 2.5 (0% - 14.3%) с/у 0% и 0.3% (0% - 2.8%), съответно за XBB.1 и BA.2.86). Тази разлика не достига статистическа значимост (фиг.26). Интересен е фактът, че XBB.1- и BA.2.86-специфични CD8+T<sub>SCM</sub> открихме при много по-малък дял от пациентите с положителен Т-клетъчен отговор. Това показва, че за формирането на пул от вирус-специфични стволови паметови клетки е необходим директен и по-продължителен контакт със съответния вирусен вариант.



**Фигура 26.** Индивидуални стойности на AIM+T<sub>SCM</sub> CD4<sup>+</sup> (розово) и CD8<sup>+</sup> (синю) определени след стимулиране с пептидни пулове от XBB.1 и BA.2.86. Изследвани са размразени ПМНК от донори боледували през периоди съответстващи на разпространението на изходния вариант, алфа или делта варианта в България. Пунктираната линия съответства на границата за отчитане на положителен отговор (>0.05%). Статистическите разлики са определени чрез непараметричен тест на Mann-Whitney (ns, p>0,05).

Делът на AIM+T<sub>SCM</sub> беше по-висок от техните CD8<sup>+</sup> аналози (1% (0% - 0.3%) и 2.5 (0% - 14.3%) спрямо 0% и 0.3% (0% - 2.8%), съответно за XBB.1 и BA.2.86). Тази разлика не достига статистическа значимост (фиг.26). Интересен е фактът, че XBB.1- и BA.2.86-специфични CD8<sup>+</sup> T<sub>SCM</sub> открихме при много по-малък дял от пациентите с положителен T-клетъчен отговор. Това показва, че за формирането на пул от вирус-специфични стволови паметови клетки е необходим директен и по-продължителен контакт със съответния вирусен вариант.

Според tSNE след стимулация на размразените ПМНК с пептидни пулове от XBB.1, AIM+CD4<sup>+</sup>T (обозначени с светло-син цвят) се групират предимно в популацията на централно-паметовите и наивни T клетки (обозначени с тъмочервен цвят), докато AIM+CD8<sup>+</sup>T (обозначени с светло син цвят) се предимно в популацията на ефектор-паметови и терминално-диференцирани T клетки (обозначени със светло-лилав цвят), (фиг.27). Важно е да споменем, че някои малки клъстери както от XBB.1-специфични CD4 T-клетки така и XBB.1-специфични CD8 T-клетки групират се в рамките на клъстерите от стволовите паметови T клетки (обозначени с тъмносин цвят на фиг.27), характеризиращи се с експресия на маркери на стволови паметови T клетки и мултипотентност.

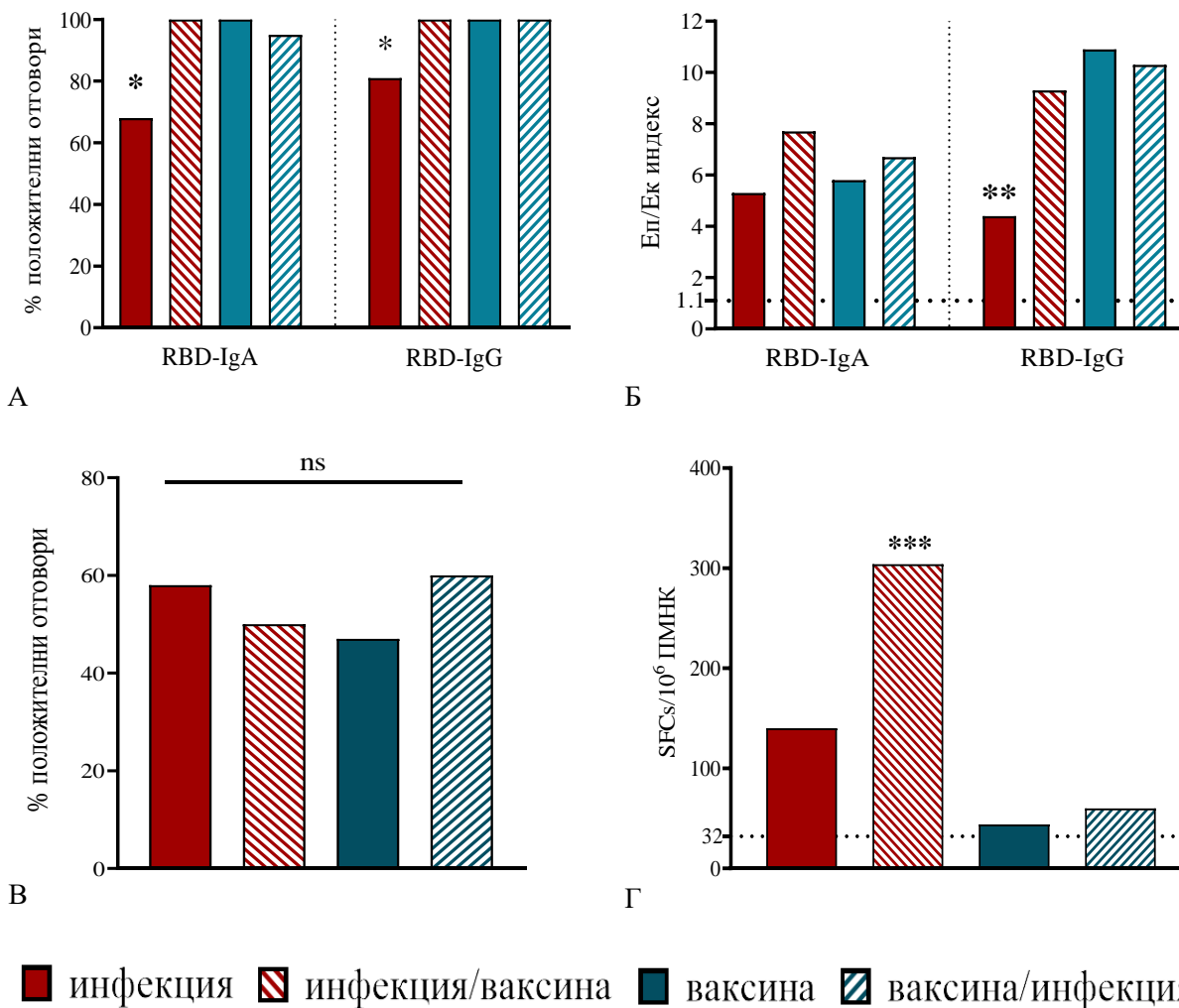


**Фигура 27.** Идентифициране на CD4+ и CD8+ T-клетъчни клъстери след стимулация с пептидни пулове от XBB.1. Използван е “t-SNE” алгоритъм на размразени ПМНК от донори боледували през периоди съответстващи на разпространението на изходния вариант, алфа или делта варианта в България (03/2020 - 06/2022). С легенда на всяка картинка представени са различните супопулации на паметови и XBB.1-специфични T клетки, като dotplot t-SNE (A и Б), хистограм (B)

## 5. Сравнение между естествено индуцирания пост-ваксинален T-клетъчен имуен отговор срещу SARS-CoV-2

Проблемът за качествата на имунната памет в зависимост от начина на индуцирането ѝ – след инфекция, след имунизация или – след хибридна експозиция, е ключов за разработването на противоепидемичните стратегии. За да потърсим отговор на този въпрос, бяха определени RBD-IgG, RBD-IgA и SARS-CoV-2-специфичните T-лимфоцити в периферна кръв на донори с индуциран по различен начин (инфекция/имунизация/хибридна експозиция) имуен отговор. Изследвани са: лица след доказана SARS-CoV-2-инфекция, със

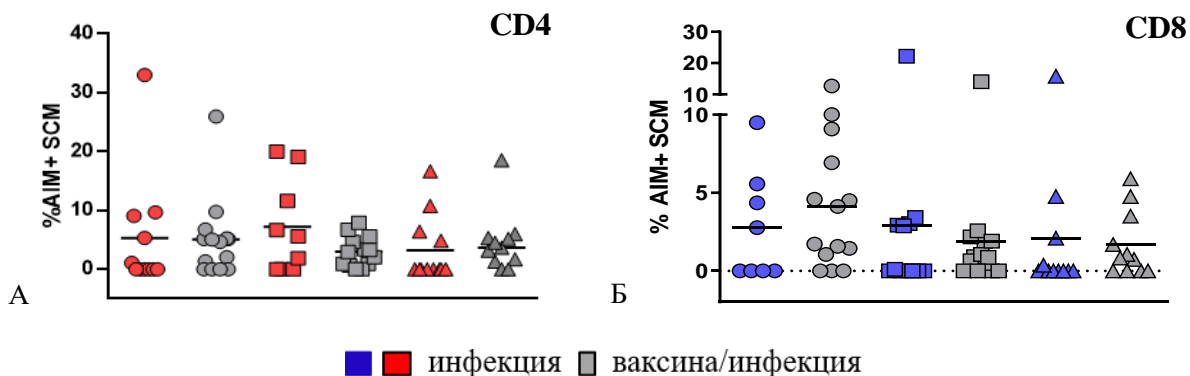
или без последваща имунизация на 6-ти (n=61) и 12-ти месец (n=49) след инфекцията; от тях имунизирани с пълна схема n=10, както и лица 12 мес. след имунизация с векторна ваксина (n=36), от които n=17, с доказана последваща инфекция.



**Фигура 28.** SARS-CoV-2 специфични RBD-IgA и RBD-IgG определени с ELISA в зависимост от начина (инфекция и/или имунизация) на индукция на имунния отговор. Дял на положителни RBD-IgA и RBD-IgG отговори от изследваните проби (А); Среден индекс (Екстинкция на проба/Екстинкция на калибратор, Еп/Ек) (Б); Специфични IFN- $\gamma$  секретирани Т клетки определени с ELISpot в зависимост от начина (инфекция и/или имунизация) на индукция на имунния отговор. Дял на положителни отговори от изследваните проби (В) и среден брой SFCs/10<sup>6</sup> ПМНК (Г).

Независимо от начина на индукция, голяма част от изследваните имаха откриваеми SARS-CoV-2-специфични антитела. Въпреки това, процентът на положителните RBD-IgA и RBD-

IgG отговори бе значително по-нисък след инфекция, отколкото след имунизация или хибридна експозиция (фиг.28А). Докато нивата на RBD-IgA във всяка изследвана група бяха сходни, RBD-IgG бе значимо по-нисък при реконвалесцентните донори без данни за имунизация (фиг.28Б). SARS-CoV-2-специфичните IFN- $\gamma$  секретирани Т клетки се откриваха при около 60% от изследваните независимо от начина на индукция (фиг.28В). Броят на SFCs/10<sup>6</sup> ПМНК бе значително по-висок след хибридна експозиция (инфекция/ваксина), (фиг.28Г). Допуснахме, че IFN- $\gamma$ + отговори изчезват по-бързо след експозицията, което може да доведе до значими разлики между еднократно стимулирани и хибридно експонирани донори. Ето защо сравнихме Т-специфичните отговори, определени по % специфично активирани (AIM+) CD4 и CD8 Т клетки (Фиг.29).

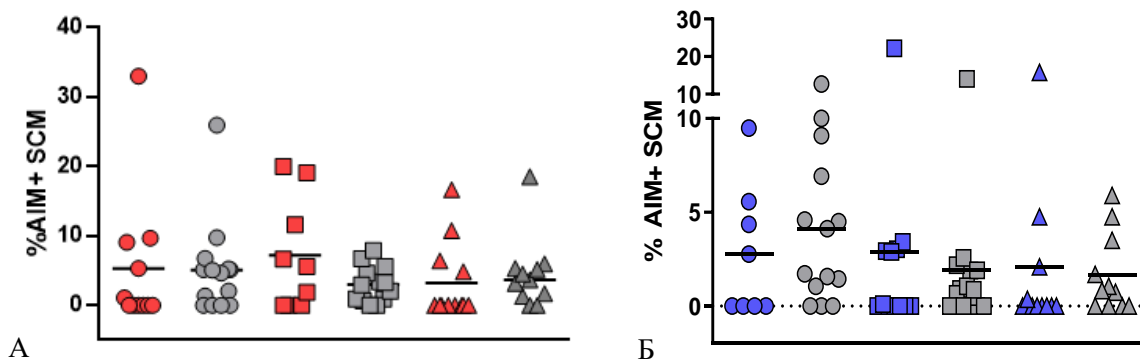


**Фигура 29.** Индивидуални стойности за AIM+T<sub>scm</sub> CD4+ (А) и AIM+T<sub>scm</sub> CD8+(Б), специфични за антигени на изходния SARS-CoV-2 вариант: S1 (кръгове) и N (квадрати), или за делта варианта (триъгълници) при донори на различни срокове след COVID-19 инфекция (червени или сини символи) и след хибридна експозиция (сиви символи)

AIM+Т се откриваха при повечето от изследваните независимо от начина на индукция (инфекция или ваксина/инфекция), но хибридната експозиция се характеризираше с по-голяма честота на S1-специфични CD4 и CD8 Т клетки, като тази разлика достигаше и статистическа значимост ( $p < 0,05$  за AIM+CD4+ и AIM+CD8+Т), (фиг. 29А и Б).

Хибридната експозиция (ваксина/инфекция) се характеризира с по-висок дял CD4 T<sub>scm</sub> в периферната кръв и индуциране на циркулацията на вирус-специфични T<sub>scm</sub> (фиг.30).





**Фигура 30.** Индивидуални стойности за AIM+T<sub>SCM</sub> CD4+ (А) и AIM+T<sub>SCM</sub> CD8+ (Б), специфични за антигени на изходния SARS-CoV-2 вариант. S1 (кръгове) и N (квадрати), или за делта варианта (триъгълници) при донори на различни срокове след COVID-19 инфекция (червени или сини символи) и след хибридна експозиция (сиви символи)

Сравнението на SARS-CoV-2 специфичните стволово-паметови пулове на 6-ти и 12-ти месец след експозицията показва, че CD4+T<sub>SCM</sub> намаляват значително по-бързо в циркулацията, за разлика от CD8+T. Установихме, че 12 месеца след експозицията в периферната кръв се откриват сравними нива CD8+T<sub>SCM</sub>, специфични за S1-, N- и делта пептиди, независимо от начина на индуцирането им.

В заключение, имунизацията и хибридната експозиция осигуряват значително по-силен RBD-специфичен антителиков отговор в сравнение с инфекцията, свързан с образуването на по-голям CD4 T<sub>SCM</sub> пул и по-интензивни CD4 S1-отговори. Естествената експозиция, на фона на завършена имунизация, поддържа постоянен пул от CD8 T с широка SARS-CoV-2 специфичност и директна протективна функция. SARS-CoV-2-специфичните CD4 и CD8 стволови паметови клетки 12 месеца след експозицията са достъпен маркер, отразяващ степента на протекция и имунологичния отпечатък, оставен от предходните срещи с патогена.

## V ИЗВОДИ

1. Регулаторните Т клетки CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>neg</sup> играят ключова роля за имунопатологичните промени при тежките форми на COVID-19, като потискат ефекторните функции на Т лимфоцитите, без да ограничат патологичното имунно възпаление. Субпопулацията CD39<sup>+</sup>Treg отличава пациентите със средно и тежко протичане на COVID-19 и може да се използва като предиктивен маркер.
2. Тежкото протичане на инфекцията е свързано със специфичен цитокинов дисбаланс: значително намалено съотношение IFN- $\gamma$ /IL-10 и нарастване на съотношението IL-6/IL-10, в резултат на което ефекторната функция на Т лимфоцитите е не ефикасна, имунното възпаление не се контролира, а индуцирането на дългосрочна имунна памет е компрометирано.
3. Циркулиращите вирус-специфични IFN $\gamma$ +Т-клетки намаляват значимо след 9-ия месец от инфекцията. Прилагането на модифициран протокол за стимулиране (96h) или маркиране (активационно-индуцирани молекули, AIM) е подходящ метод за детекция на SARS-CoV-2-специфични паметови (в т.ч. стволови паметови) клетки в късните етапи след инфекцията.
4. Липсва корелация между вирус-специфичния хуморален и Т-клетъчен отговор, която се дължи на относително по-бързо спадане на титрите на RBD-IgG и IgA.
5. Значително по-високите стойности на HKU-1 IgG антителата при контактни безсимптомни лица, в съчетание с добре изразен SARS-CoV-2 специфичен CD8 Т отговор и липсващи SARS-CoV-2 антитела допуска възможност за кръстосана протективна роля на предходни инфекции с този сезонен корона вирус.
6. В сравнение с инфекцията, имунизацията и хибридната експозиция осигуряват значително по-силен RBD-специфичен антитялов отговор, свързан с образуването на по-голям CD4 SCM пул и по-интензивни CD4 S1-отговори.
7. След 9-ия месец и до 24 месеца след инфектиране при всички изследвани донори се откриват AIM<sup>+</sup> Т клетки, разпознаващи SARS-CoV-2 пептиди. Вирус-специфичните CD4 Т са с предимно наивен и централно-паметов фенотип, като намаляват по-бързо с времето; вирус-специфичните CD8 Т са предимно с ефекторен и терминално ефекторен фенотип и се поддържат на по-ниско, но постоянно ниво.
8. Повече от 12 месеца след инфектиране се откриват паметови CD4 и CD8 Т клетки, които разпознават варианти, възникнали по-късно и значително дивергирали от индуциращия.

Хибридна експозиция (имунизация след преболедуване) стимулира и поддържа стволово-памятовия пул.

9. CD8<sup>+</sup> T<sub>SCM</sub> имат способност за бърза обратна диференциация в ефektorни клетки, като по този начин осигуряват непосредствена защита, независимо от индуцирания ги вариант. Следователно, вирус-специфичните T<sub>SCM</sub> са стабилен маркер на протекция в условията на циркулиращ и еволюиращ SARS-CoV-2,

## **VI ПРИНОСИ**

### **ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ С ТЕОРЕТИЧЕН ХАРАКТЕР**

1. Осъществено е първото проспективно проучване на Т-клетъчната имунна памет към SARS-CoV-2 върху статистически достоверни групи от българската популация.
2. За пръв път е доказано, че ранното нарастване на индуцираните Т-регулаторни клетки (Treg/CD39<sup>+</sup>) е свързано с по-тежко протичане на SARS-CoV-2 инфекцията.
3. Като оригинален патогенетичен механизъм при тежък Ковид 19 е описана нерегулираната секреция на цитокини с инхибиращ ефект, която компрометира ефektorната функция на Т-лимфоцитите, без да успее да контролира имунното възпаление.
4. Формулирана е хипотеза за кръстосан протективен ефект на инфекции със сезонния HCoV HCU-1, в резултат на стимулиране на паметови CD8 Т клетки, разпознаващи структурно сходни пептидни епитопи от SARS-CoV-2.
5. Демонстрирано е, че SARS-CoV-2-специфичните CD8<sup>+</sup> стволови паметови клетки (T<sub>SCM</sub>) са достъпен и относително независим от вирусната еволюция показател за дългосрочна защита от COVID-19.
6. Установено е, че кръстосаната реактивност на вирус-специфичните паметови Т лимфоцити с еволюирали варианти на SARS-CoV-2 (ХВВ, ВА) зависи значимо от тежестта на инфекцията, последващата имунизация и наличието на RBD-специфични IgA.

### **ПРИНОСИ С НАУЧНО-ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР**

1. Въведена е модификация на IFN gamma базирания ELIspot тест, която позволява да се открият SARS-CoV-2 специфични Т-лимфоцити повече от 12 месеца след експозицията.

2. Сравнена е приложимостта на различни подходи за оценка на SARS-CoV-2 специфичния Т-клетъчен имунен отговор и е доказано, че:
  - a. IFN-gamma базираните тестове зависят от времето след експозиция и са информативни в условия на активна циркулация на вируса;
  - b. Идентифицирането на SARS-CoV-2-специфични Т лимфоцити по експресията на активационни молекули (AIM+T) е по-изчерпателно и не зависи от епидемичната обстановка
3. Демонстрирано е, че съчетаното използване на съотношенията IFN $\gamma$ /IL-10 и IL-6/IL-10 е подходящо за мониториране клиничния ход на COVID-19.
4. Въведен е флоуцитометричен метод за детекция и функционално характеризиране на вирус-специфични стволови паметови Т-клетки.

## VII ЛИТЕРАТУРА

1. WHO-2019-nCoV-clinical-2021.2-eng.pdf. Accessed July 5, 2024. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/349321/WHO-2019-nCoV-clinical-2021.2-eng.pdf>
2. Chen G, Wu D, Guo W, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest.* 2020;130(5):2620-2629. doi:10.1172/JCI137244
3. Diao B, Wang C, Tan Y, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol.* 2020;11:827. doi:10.3389/fimmu.2020.00827
4. Henry B, Cheruiyot I, Vikse J, et al. Lymphopenia and neutrophilia at admission predicts severity and mortality in patients with COVID-19: a meta-analysis. *Acta Biomed.* 2020;91(3):e2020008. doi:10.23750/abm.v91i3.10217
5. Qin C, Zhou L, Hu Z, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020;71(15):762-768. doi:10.1093/cid/cia248
6. Tan L, Wang Q, Zhang D, et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5:33. doi:10.1038/s41392-020-0148-4
7. de Kermenguy F, Meziani L, Mondini M, et al. Chapter One - Radio-induced lymphopenia in the era of anti-cancer immunotherapy. In: Mirjolet C, Galluzzi L, eds. *International Review of Cell and Molecular Biology.* Vol 378. Ionizing Radiation and the Immune Response - Part B. Academic Press; 2023:1-30. doi:10.1016/bs.ircmb.2023.03.002

8. Huang I, Pranata R. Lymphopenia in severe coronavirus disease-2019 (COVID-19): systematic review and meta-analysis. *Journal of Intensive Care*. 2020;8(1):36. doi:10.1186/s40560-020-00453-4
9. DiPiazza AT, Graham BS, Ruckwardt TJ. T cell immunity to SARS-CoV-2 following natural infection and vaccination. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;538:211-217. doi:10.1016/j.bbrc.2020.10.060
10. Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. *N Engl J Med*. 2020;383(23):2255-2273. doi:10.1056/NEJMra2026131
11. Gao Y, Li T, Han M, et al. Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. *J Med Virol*. 2020;92(7):791-796. doi:10.1002/jmv.25770
12. Kaur S, Bansal R, Kollimuttathuillam S, et al. The looming storm: Blood and cytokines in COVID-19. *Blood Rev*. 2021;46:100743. doi:10.1016/j.blre.2020.100743
13. Kuypers FA. Hyperinflammation, apoptosis, and organ damage. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2022;247(13):1112-1123. doi:10.1177/15353702221090454
14. Leisman DE, Ronner L, Pinotti R, et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir Med*. 2020;8(12):1233-1244. doi:10.1016/S2213-2600(20)30404-5
15. Nikkhoo B, Mohammadi M, Hasani S, et al. Elevated interleukin (IL)-6 as a predictor of disease severity among Covid-19 patients: a prospective cohort study. *BMC Infectious Diseases*. 2023;23(1):311. doi:10.1186/s12879-023-08294-w
16. Pasrija R, Naime M. The deregulated immune reaction and cytokines release storm (CRS) in COVID-19 disease. *Int Immunopharmacol*. 2021;90:107225. doi:10.1016/j.intimp.2020.107225
17. Santa Cruz A, Mendes-Frias A, Oliveira AI, et al. Interleukin-6 Is a Biomarker for the Development of Fatal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Pneumonia. *Front Immunol*. 2021;12:613422. doi:10.3389/fimmu.2021.613422
18. Wan S, Yi Q, Fan S, et al. Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP). Published online February 12, 2020:2020.02.10.20021832. doi:10.1101/2020.02.10.20021832
19. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054-1062. doi:10.1016/S0140-6736(20)30566-3
20. Carlini V, Noonan DM, Abdalalem E, et al. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Front Immunol*. 2023;14:1161067. doi:10.3389/fimmu.2023.1161067

21. Dhar SK, K V, Damodar S, Gujar S, Das M. IL-6 and IL-10 as predictors of disease severity in COVID-19 patients: results from meta-analysis and regression. *Heliyon*. 2021;7(2). doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06155
22. Islam H, Chamberlain TC, Mui AL, Little JP. Elevated Interleukin-10 Levels in COVID-19: Potentiation of Pro-Inflammatory Responses or Impaired Anti-Inflammatory Action? *Front Immunol*. 2021;12:677008. doi:10.3389/fimmu.2021.677008
23. Lu L, Zhang H, Dauphars DJ, He YW. A Potential Role of Interleukin 10 in COVID-19 Pathogenesis. *Trends Immunol*. 2021;42(1):3-5. doi:10.1016/j.it.2020.10.012
24. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. 2020;584(7821):457-462. doi:10.1038/s41586-020-2550-z
25. Ng OW, Chia A, Tan AT, et al. Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. *Vaccine*. 2016;34(17):2008-2014. doi:10.1016/j.vaccine.2016.02.063
26. Peng H, Yang L tao, Wang L yun, et al. Long-lived memory T lymphocyte responses against SARS coronavirus nucleocapsid protein in SARS-recovered patients. *Virology*. 2006;351(2):466-475. doi:10.1016/j.virol.2006.03.036
27. Goletti D, Petrone L, Manissero D, et al. The potential clinical utility of measuring severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific T-cell responses. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27(12):1784-1789. doi:10.1016/j.cmi.2021.07.005
28. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020;181(7):1489-1501.e15. doi:10.1016/j.cell.2020.05.015
29. Guerrero G, Mandelli A, Finardi A, et al. Anti-SARS-CoV-2 T-stem cell memory persists in ocrelizumab-treated MS patients. *Mult Scler*. 2022;28(12):1937-1943. doi:10.1177/13524585221102158
30. Gurevich M, Zilkha-Falb R, Sonis P, et al. SARS-CoV-2 memory B and T cell profiles in mild COVID-19 convalescent patients. *Int J Infect Dis*. 2022;115:208-214. doi:10.1016/j.ijid.2021.12.309
31. Huzly D, Panning M, Smely F, et al. Accuracy and real life performance of a novel interferon- $\gamma$  release assay for the detection of SARS-CoV2 specific T cell response. *J Clin Virol*. 2022;148:105098. doi:10.1016/j.jcv.2022.105098
32. Murugesan K, Jagannathan P, Pham TD, et al. Interferon- $\gamma$  Release Assay for Accurate Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 T-Cell Response. *Clin Infect Dis*. 2020;73(9):e3130-e3132. doi:10.1093/cid/ciaa1537
33. Ngalamika O, Lidenge SJ, Mukasine MC, et al. SARS-CoV-2-specific T cell and humoral

- immunity in individuals with and without HIV in an African population: a prospective cohort study. *Int J Infect Dis.* 2023;127:106-115. doi:10.1016/j.ijid.2022.12.009
34. Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol.* 2020;21(11):1336-1345. doi:10.1038/s41590-020-0782-6
  35. Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat Med.* 2020;26(7):1033-1036. doi:10.1038/s41591-020-0913-5
  36. Grzelak L, Temmam S, Planchais C, et al. A comparison of four serological assays for detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in human serum samples from different populations. *Sci Transl Med.* 2020;12(559):eabc3103. doi:10.1126/scitranslmed.abc3103
  37. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med.* 2020;26(6):845-848. doi:10.1038/s41591-020-0897-1
  38. Tantuoyir MM, Rezaei N. Serological tests for COVID-19: Potential opportunities. *Cell Biol Int.* 2021;45(4):740-748. doi:10.1002/cbin.11516
  39. Paules CI, Marston HD, Fauci AS. Coronavirus Infections—More Than Just the Common Cold. *JAMA.* 2020;323(8):707-708. doi:10.1001/jama.2020.0757
  40. Hicks J, Klumpp-Thomas C, Kalish H, et al. Serologic Cross-Reactivity of SARS-CoV-2 with Endemic and Seasonal Betacoronaviruses. *J Clin Immunol.* 2021;41(5):906-913. doi:10.1007/s10875-021-00997-6
  41. Saletti G, Gerlach T, Jansen JM, et al. Older adults lack SARS CoV-2 cross-reactive T lymphocytes directed to human coronaviruses OC43 and NL63. *Sci Rep.* 2020;10(1):21447. doi:10.1038/s41598-020-78506-9
  42. Mateus J, Grifoni A, Tarke A, et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science.* 2020;370(6512):89-94. doi:10.1126/science.abd3871
  43. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol.* 2022;23(2):186-193. doi:10.1038/s41590-021-01122-w
  44. Sagar M, Reifler K, Rossi M, et al. Recent endemic coronavirus infection is associated with less-severe COVID-19. *J Clin Invest.* 131(1):e143380. doi:10.1172/JCI143380
  45. Stoddard CI, Galloway J, Chu HY, et al. Epitope profiling reveals binding signatures of SARS-CoV-2 immune response in natural infection and cross-reactivity with endemic human CoVs. *Cell Rep.* 2021;35(8):109164. doi:10.1016/j.celrep.2021.109164
  46. Sette A, Crotty S. Pre-existing immunity to SARS-CoV-2: the knowns and unknowns. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(8):457-458. doi:10.1038/s41577-020-0389-z
  47. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific

- T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol.* 2020;5(48):eabd2071. doi:10.1126/sciimmunol.abd2071
48. Ng KW, Faulkner N, Cornish GH, et al. Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *Science.* 2020;370(6522):1339-1343. doi:10.1126/science.abe1107
  49. Gattinoni L, Speiser DE, Lichterfeld M, Bonini C. T memory stem cells in health and disease. *Nat Med.* 2017;23(1):18-27. doi:10.1038/nm.4241
  50. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity.* 2018;48(2):202-213. doi:10.1016/j.immuni.2018.01.007
  51. Migueles SA, Rogan DC, Gavil NV, et al. Antigenic Restimulation of Virus-Specific Memory CD8+ T Cells Requires Days of Lytic Protein Accumulation for Maximal Cytotoxic Capacity. *J Virol.* 2020;94(23):e01595-20. doi:10.1128/JVI.01595-20
  52. Sun L, Su Y, Jiao A, Wang X, Zhang B. T cells in health and disease. *Sig Transduct Target Ther.* 2023;8(1):1-50. doi:10.1038/s41392-023-01471-y
  53. Dan JM, Arlehamn CSL, Weiskopf D, et al. A cytokine-independent approach to identify antigen-specific human germinal center Tfh cells and rare antigen-specific CD4+ T cells in blood. *J Immunol.* 2016;197(3):983-993. doi:10.4049/jimmunol.1600318
  54. Gatti A, Zizzo G, Paschale MD, et al. Assessing SARS-CoV-2-specific T-cell reactivity in late convalescents and vaccinees: Comparison and combination of QuantiFERON and activation-induced marker assays, and relation with antibody status. *PLOS ONE.* 2023;18(5):e0285728. doi:10.1371/journal.pone.0285728
  55. Havenar-Daughton C, Reiss SM, Carnathan DG, et al. Cytokine-independent detection of antigen-specific germinal center T follicular helper (Tfh) cells in immunized non-human primates using a live cell Activation Induced Marker (AIM) technique. *J Immunol.* 2016;197(3):994-1002. doi:10.4049/jimmunol.1600320
  56. Jung JH, Rha MS, Sa M, et al. SARS-CoV-2-specific T cell memory is sustained in COVID-19 convalescent patients for 10 months with successful development of stem cell-like memory T cells. *Nat Commun.* 2021;12(1):4043. doi:10.1038/s41467-021-24377-1
  57. Rydyznski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell.* 2020;183(4):996-1012.e19. doi:10.1016/j.cell.2020.09.038
  58. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, et al. A human memory T-cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med.* 2011;17(10):1290-1297. doi:10.1038/nm.2446
  59. Flynn JK, Gorry PR. Stem memory T cells (TSCM)—their role in cancer and HIV immunotherapies. *Clin Transl Immunology.* 2014;3(7):e20. doi:10.1038/cti.2014.16
  60. Kared H, Redd AD, Bloch EM, et al. SARS-CoV-2-specific CD8+ T cell responses in



- convalescent COVID-19 individuals. *J Clin Invest.* 2021;131(5):e145476, 145476. doi:10.1172/JCI145476
61. Grifoni A, Sette A. From Alpha to omicron: The response of T cells. *Curr Res Immunol.* 2022;3:146-150. doi:10.1016/j.crimmu.2022.08.005
  62. Tarke A, Sidney J, Kidd CK, et al. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases. *Cell Rep Med.* 2021;2(2):100204. doi:10.1016/j.xcrm.2021.100204
  63. Gao Y, Cai C, Grifoni A, et al. Ancestral SARS-CoV-2-specific T cells cross-recognize the Omicron variant. *Nat Med.* 2022;28(3):472-476. doi:10.1038/s41591-022-01700-x
  64. GeurtsvanKessel CH, Geers D, Schmitz KS, et al. Divergent SARS-CoV-2 Omicron-reactive T and B cell responses in COVID-19 vaccine recipients. *Science Immunology.* 2022;7(69):eabo2202. doi:10.1126/sciimmunol.abo2202
  65. Keeton R, Tincho MB, Ngomti A, et al. SARS-CoV-2 spike T cell responses induced upon vaccination or infection remain robust against Omicron. Published online December 28, 2021:2021.12.26.21268380. doi:10.1101/2021.12.26.21268380
  66. Madelon N, Heikkilä N, Sabater Royo I, et al. Omicron-Specific Cytotoxic T-Cell Responses After a Third Dose of mRNA COVID-19 Vaccine Among Patients With Multiple Sclerosis Treated With Ocrelizumab. *JAMA Neurol.* 2022;79(4):399-404. doi:10.1001/jamaneurol.2022.0245
  67. Tarke A, Coelho CH, Zhang Z, et al. SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron. *Cell.* 2022;185(5):847-859.e11. doi:10.1016/j.cell.2022.01.015
  68. Shah M, Woo HG. Omicron: A Heavily Mutated SARS-CoV-2 Variant Exhibits Stronger Binding to ACE2 and Potently Escapes Approved COVID-19 Therapeutic Antibodies. *Front Immunol.* 2022;12. doi:10.3389/fimmu.2021.830527
  69. Sharma V, Rai H, Gautam DNS, Prajapati PK, Sharma R. Emerging evidence on Omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2 variant. *J Med Virol.* 2022;94(5):1876-1885. doi:10.1002/jmv.27626
  70. Tian D, Sun Y, Xu H, Ye Q. The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Med Virol.* 2022;94(6):2376-2383. doi:10.1002/jmv.27643
  71. Belik M, Lieder O, Vara S, et al. Persistent T cell-mediated immune responses against Omicron variants after the third COVID-19 mRNA vaccine dose. *Front Immunol.* 2023;14:1099246. doi:10.3389/fimmu.2023.1099246
  72. Yu F, Tai W, Cheng G. T-cell immunity: a barrier to Omicron immune evasion. *Sig Transduct Target Ther.* 2022;7(1):1-3. doi:10.1038/s41392-022-01142-4

73. Crotty S. Hybrid immunity. *Science*. Published online June 25, 2021. doi:10.1126/science.abj2258
74. Lasrado N, Barouch DH. SARS-CoV-2 Hybrid Immunity: The Best of Both Worlds. *J Infect Dis*. 2023;228(10):1311-1313. doi:10.1093/infdis/jiad353
75. Spinardi JR, Srivastava A. Hybrid Immunity to SARS-CoV-2 from Infection and Vaccination—Evidence Synthesis and Implications for New COVID-19 Vaccines. *Biomedicines*. 2023;11(2):370. doi:10.3390/biomedicines11020370
76. Almendro-Vázquez P, Laguna-Goya R, Paz-Artal E. Defending against SARS-CoV-2: The T cell perspective. *Front Immunol*. 2023;14:1107803. doi:10.3389/fimmu.2023.1107803
77. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*. 2020;183(1):158-168.e14. doi:10.1016/j.cell.2020.08.017

#### ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Milena Aleksova**, Yana Todorova, Radoslava Emilova, Magdalena Baymakova, Nina Yancheva, Radina Andonova, Anelia Zasheva, Alba Grifoni, Daniela Weiskopf, Alessandro Sette and Maria Nikolova VIRUS-SPECIFIC STEM CELL MEMORY CD8+ T CELLS MAY INDICATE A LONG-TERM PROTECTION AGAINST EVOLVING SARS-COV-2, *Diagnostics* 2023, 13(7),1280; Q2, IF 3.6  
<https://doi.org/10.3390/diagnostics13071280>
2. **Milena Aleksova**, Yana Todorova, Radoslava Emilova, Magdalena Baymakova, Nina Yancheva, Maria Nikolova, PRE-EXISTING IMMUNITY TO BETA-CORONAVIRUSES HKU1 AND OC43 MAY AFFECT SUSCEPTIBILITY TO SARS-COV-2 INFECTION, *Acta Microbiologica Bulgarica*, Volume 38/4 (2022), p294-300, Q4, IR: 0.115  
<amb-4-2022-article-5.pdf> ([actamicrobio.bg](http://actamicrobio.bg))
3. **М. Алексова**, Я. Тодорова, Р. Емилова, Н. Кючукова, Н. Янчева, М. Баймакова, М. Николова, SARS-COV-2-СПЕЦИФИЧНИ Т- КЛЕТКИ И СЕРУМНИ ИМУНОГЛОБУЛИНИ ПОВЕЧЕ ОТ ДЕВЕТ МЕСЕЦА СЛЕД ПРЕКАРАНА ИНФЕКЦИЯ. Сборник статии от IX Национална научна конференция на тема HIV/AIDS в условия на пандемията COVID-19. Екзотични инфекциозни и паразитни болести. Сборник статии, Пловдив 2022, ISBN 978-619-237-101-2, стр. 17- 27.
4. Дамян Вангелов, **Милена Алексова**, Яна Тодорова, Радослава Емилова, Мария Николова IMMUNE RESPONSE TO SARS-COV-2 IN PATIENTS WITH CHRONIC HIV INFECTION, *Probl Infect Parasit Dis* 2023 <https://doi.org/10.58395/jww92v65>

## УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

- **Участия в международни научни форуми, по темата на дисертацията**

1. **ESCV 2022 - 24th Annual Conference of the European Society for Clinical Virology, Manchester, United Kingdom 7-10.09.2022:** No correlation between cellular and humoral post-exposure SARS-CoV-2-specific immune response, **М. Aleksova**, Y. Todorova, R. Emilova, N. Kuychukova, N. Yancheva, M. Baymakova, M. Nikolova
2. **33<sup>rd</sup> European Congress of Clinical Microbiology & Infectious 15-18.04.2023, Copenhagen:** SARS-COV-2-SPECIFIC B- AND T-CELL IMMUNE MEMORY BEYOND ONE YEAR AFTER INFECTION, **Milena Aleksova**, Martina Bozhkova, Yana Todorova, Radoslava Emilova, Magdalena Baymakova, Teodora Kalfova, Stelyan Petrov, Nina Yancheva, Hristo Taskov, Mariana Murdjeva, Maria Nikolova
3. **12тия международен конгрес на Югоизточния медицински форум (SEEMF) 6-10.09 2023, Солун:** T-cell immunity to SARS-COV-2 in the post-COVID-19 era, **Милена Алексова**, Яна Тодорова, Радослава Емилова, Магдалена Баймакова, Алба Грифони, Даниела Вайскопф, Алесандро Сете, Мария Николова
4. **12то EFIS/ЕЈИ Югоизточно Европейско Училище по Имунология (SEEIS 2023), 20-23.10.2023, Трогир, Хърватия:** Identification and characterization of circulating SARS-COV-2-specific CD4+ and CD8+ T-lymphocytes, **М. Алексова**, Я. Тодорова, Р. Емилова, Мария Николова и сътр.
5. **12то EFIS/ЕЈИ Югоизточно Европейско Училище по Имунология (SEEIS 2023), 20-23.10.2023, Трогир, Хърватия:** Detection and characterization of SARS-COV-2 specific IgG and IgA in IVIG (intravenous immunoglobulin) produced from plasma collected during COVID-19 pandemic, Ванчо Донеv, **Милена Алексова**, Яна Тодорова, Радослава Емилова, Георги Николов, Мария Николова

- **Участие в национални научни форуми, по темата на дисертацията**

1. **Национална научна конференция на тема - HIV/AIDS в условия на пандемията COVID-19. Екзотични инфекциозни и паразитни болести, Цигов Чарк, 26-29.05.2022:** SARS-CoV-2-специфични Т-клетки и серумни имуноглобулини повече от девет месеца след прекарана инфекция, **М. Алексова**, Я. Тодорова, Р. Емилова, Н. Кючукова, Н. Янчева, М. Баймакова, М. Николова
2. **Втора научна конференция-КОВИД19 през 20-22, 08-11.09.2022, НДК, София:** SARS-CoV-2: Колко дълго помнят Т-лимфоцитите? **Милена Алексова**, Яна Тодорова, Радослава Емилова, Магдалена Баймакова, Нина Янчева-Петрова, Христо Тасков, Алба Грифони, Даниела Вайскопф, Алесандро Сете, Мария Николова
3. **XX Юбилеен Национален конгрес по Клинична микробиология и инфектология на БАМ, Пловдив, 16-18.09.2022:** Детекция и характеризирание на SARS-CoV-2 специфичните

паметови Т лимфоцити 6 и 12 месеца след прекарана инфекция, **Милена Алексова**, Яна Тодорова, Радослава Емилова, Никол Кючукова, Нина Янчева, Магдалена Баймакова, Христо Тасков, Мария Николова

4. **XX Юбилеен Национален конгрес по Клинична микробиология и инфектология на БАМ, Пловдив, 16-18.09.2022: Т-КЛЕТЪЧЕН ИМУНИТЕТ СРЕЩУ SARS-COV-2: КАКВО НАУЧИХМЕ**, Мария Николова, **Милена Алексова**, Яна Тодорова, Радослава Емилова, Магдалена Баймакова, Нина Янчева, Георги Попов, Христо Тасков
5. **6-та Национална научна конференция по HIV и коинфекции, 2-3.12.2022, София: Имунен отговор срещу SARS-CoV-2 в контекста на хроничната HIV инфекция**, Мария Николова, **Милена Алексова**, Дамян Вангелов, Яна Тодорова, Радослава Емилова
6. **Годишна Научна Конференция по Имунология, БАКИ, 16.12.2022, София: Имунитет към сезонни коронавируси и податливост към SARS-CoV-2**, **Милена Алексова**, Яна Тодорова, Радослава Емилова, Магдалена Баймакова, Нина Янчева, Мария Николова
7. **III научна конференция “COVID-19 до 2023 – Ранни и късни усложнения“ 8-10.09 2023, София: Фактори, влияещи върху дългосрочната имунна памет към SARS-CoV-2**, **М. Алексова**, Я. Тодорова, Р. Емилова, М. Баймакова, Н. Янчева-Петрова, Х. Тасков, М. Николова
8. **XXI Национален конгрес по Клинична микробиология и инфектология на БАМ, 29.09-01.10.2023, Пловдив: Дългоживеещи SARS-COV-2 вариант-специфични Т-лимфоцити**, **Милена Алексова**, Яна Тодорова, Радослава Емилова, Магдалена Баймакова, Алба Грифони, Даниела Вайскопф, Алесандро Сете, Мария Николова
9. **XXI Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ, 29.09 - 01.10.2023, Пловдив: Дълъг COVID-19 и синдром на хронична умора: пресечните точки**, Мария Николова, Христо Тасков, Мария Ивановска, Мартина Божкова, Теодора Калфова, Стилиян Петров, Яна Тодорова, **Милена Алексова**, Радослава Емилова, Мариана Мурджева
10. **XVI-та Национална годишна конференция по инфекциозни болести, която се проведе в периода 05 – 07.10.2023, Плевен: Вирусологични и имунологични проучвания върху SARS-CoV-2**, Ива Христова, Иван Иванов, Ивайло Алексиев, Любомира Григорова, Ренета Димитрова, Иван Стойков, Деян Дончев, Нели Корсун, Ивелина Трифонова, **Милена Алексова**, Ива Трифонова, Мария Николова
11. **Национална конференция по Ваксинапредотвратими заболявания, 10-12.11.2023, София: Дълготрайна ли е Т-клетъчната памет срещу SARS-CoV-2**, **Милена Алексова**, Яна Тодорова, Радослава Емилова, Магдалена Баймакова, Христо Тасков, Мария Николова,
12. **Годишната Научна Конференция по Имунология 15.12.2023, София: Характеризиране на реконвалесцентна плазма от пациенти с COVID-19 и интравенозен имуноглобулин като спасителна пасивна имунизация при инфекция със SARS-CoV-**, Ванчо Донев, **Милена Алексова**, Яна Тодорова, Радослава Емилова, Георги Николов, Мария Николова

## УЧАСТИЯ В ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ КАТО ИЗПЪЛНИТЕЛ

1. **„Продължителност на имунната памет след имунизация срещу КОВИД-19: клетъчен и хуморален имунитет на ниво субпопулации на паметови Т и В клетки“**. Статус на проекта: текущ, приключва през 2024г., КП-06-ПН-53/1; 11.11.2021
2. **„Имунологична памет при SARS-CoV-2/COVID-19: механизми, продължителност и кръстосана реактивност“**. Статус на проекта: приключил, юли 2023, КП-06-ДК1/9 от 29.03.2021
3. **„Биомаркери на преждевременното имунологично остаряване при клинично здрави българи в активна възраст“** Статус на проекта: текущ, приключва през септември 2024 г., КП-06-Н33/17 от 21.12.2019
4. **Фундаментални, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология**, Наука и образование за интелигентен растеж, договор BG05M2OP001-1.002-0001-C04, приключил, декември 2023
5. **Оксидативният стрес и митохондриалната активност в Т-лимфоцити: потенциални биомаркери за мониториране на дългосрочната антиретровирусна терапия при HIV+ лица**, КП-06-Н73/9 от 14.12.2023г.
6. **Сигнална трансдукция и молекулярни механизми на клетъчна сигнализация при IgE-медирано активиране на мастоцити от различни алергени**, КП-06-ПН73/11 от 14.12.2023г от 2023г
7. **Изследване на имунния дисбаланс и дисфункция при синдром на хроничната умора**, „Програма за стратегически изследвания и иновации за развитие на МУ – Пловдив (ПСНИИР-МУП)“, код по НКПД: 2422 5089 от 2023г.

## SUMMARY

**Introduction:** Coronaviruses are a constant threat to the public health and the economy. In the past two decades, two outbreaks with pandemic potential have been associated with the betacoronaviruses: SARS-CoV (2002-2003) and MERS-CoV (2012). The World Health Organization (WHO) declared a public health emergency of international concern on January 30, 2020, due to the rapid spread of SARS-CoV-2. The pandemic was declared on March 11, 2020, and as of March 30, 2024, it had affected over 774 million people and caused the death of more than 7 million people. Understanding the immunological response to SARS-CoV-2 depends mostly on research focusing on the processes involved in the development, activation, functionality and durability of virus-specific-T and B cells. The role of immunological memory in controlling infectious diseases lies in creating long-lasting protection, ensuring a faster immune response upon re-exposure, and thus preventing re-infection and/or disease. A thorough grasp of these mechanisms was crucial for creating and producing new vaccines that could effectively train the immune system to recognize and respond to SARS-CoV-2 while maintaining a long-lasting immune memory. Naturally, studying the immune response to the virus and the factors influencing immune memory is essential not just on an individual level. These studies are pivotal in developing a comprehensive strategy to fight the evolving virus and contain the pandemic.

**Aim:** The dissertation aims to investigate the emergence, persistence and functional characteristics of SARS-CoV-2-specific T cells induced after infection, immunization or hybrid exposure. The main objectives include identifying phenotypic characteristics of peripheral T-lymphocytes regarding clinical progression and introducing methods to detect and characterize the SARS-CoV-2-specific T-cell pool. Moreover, evaluating T cell memory subsets and stem cell-like memory T cells (T<sub>SCM</sub>), up to 24 months post-induction/immunization, additionally investigating the SARS-CoV-2 evolution effects on T-cell reactivity.

**Material and methods:** The assessment of the immune response was based on a combination of well-known and modified methods. Luminex assay was used for the assessment of 25 cytokines and 9 chemokines in serum, analysed with ProcartaPlex Analyst 1.0 Software (Invitrogen). The proportions of Th1, Th2, Th17, Treg (CD39+/CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup>), apoptotic (CD28-CD57+) and activated (CD38+/HLA-DR+) T cells were determined by 8-color flow cytometry (FACSCanto II). RBD-binding IgG and IgA were measured in plasma using semi-quantitative ELISA

(Euroimmune, Germany). SARS-CoV-2-specific T-cells were detected after 16-18h and modified-120h in vitro stimulation with peptide pools of SARS-CoV-2 and its variants by the expression of IFN- $\gamma$  (T-SPOT.COVID/Discovery, Oxford), and/or AIM (CD69/CD137/CD154) and AIMT<sub>SCM</sub> using 10-parameter flow cytometry (BD FACSAriaFusion), after 20h stimulation with peptide pools from S1, N, and its variants (Alpha B.1.1.7; Beta B.1.351; Gamma P.1; Delta B.1.617.2 and Lambda C.37). Moreover, visualizing and analyzing T cell memory clusters using tSNE and UMAP algorithms (FlowJo v.10.8.1).

**Results and conclusions:** According to our findings, Tregs (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>) play a key role in immunopathological changes in severe forms of COVID-19 by suppressing the effector functions of T lymphocytes without limiting pathological immune inflammation. The CD39<sup>+</sup>Treg subpopulation distinguishes patients with moderate and severe COVID-19 and can be used as a predictive marker. In our study, the severe progression of the infection correlated with a distinct cytokine imbalance. This imbalance manifested as a notable decrease in the IFN- $\gamma$ /IL-10 ratio and an elevation in the IL-6/IL-10 ratio. Consequently, T lymphocyte effector functions were compromised, immune inflammation remained unregulated, and the formation of long-term immune memory was hindered. Beyond the ninth month post-infection, there was a significant decrease in circulating virus-specific IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-cells. Employing a modified protocol involving extended stimulation (120h) or using AIM assays proves to be an effective approach for detecting SARS-CoV-2-specific memory cells, including T<sub>SCM</sub>, during the later stages post-infection. The lack of correlation between virus-specific humoral and T-cell responses was due to a relatively faster decrease in RBD-IgG and IgA levels. The significantly higher levels of HKU-1 IgG antibodies observed in the asymptomatic (exposed to SARS-CoV-2) donors were combined with a robust SARS-CoV-2-specific CD8 T response, moreover, the absence of SARS-CoV-2-specific antibodies among these donors demonstrates the possibility of a cross-protective role of previous infections with seasonal coronaviruses. Compared to natural infection, both immunization and hybrid exposure elicited a significantly stronger RBD-specific antibody response associated with generating a greater CD4<sup>+</sup>T<sub>SCM</sub> pool and more robust S1-specific CD4 T responses. Furthermore, beyond the 9th month post-infection up to 24 months, AIM<sup>+</sup> T cells recognizing SARS-CoV-2 peptides were detected in all donors examined. Notably, virus-specific CD4 T cells exhibited predominantly naïve and central-memory phenotypes, declining more rapidly over time and virus-specific CD8 T cells predominantly displayed effector and terminal effector phenotypes yet were

maintained at a lower but steady level. Beyond 1-year post-infection and/or immunization, memory CD4 and CD8 T cells remained detectable and were capable of recognizing variants distinct from those initially eliciting the T cell response. Moreover, hybrid exposure, which involves both vaccination and infection, stimulates and maintains the stem-cell memory pool. AIM<sup>+</sup>T<sub>SCM</sub> CD8<sup>+</sup> are capable of rapid reverse differentiation into effector cells, thereby providing immediate protection regardless of the variant that induced them. Therefore, virus-specific T<sub>SCMs</sub> are a robust marker of protection in the setting of circulating and evolving SARS-CoV-2.