Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»

На правах рукописи

Шкурников Максим Юрьевич

РОЛЬ ГЕНОТИПА ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ КЛАССА 1 И ПРОФИЛЯ МИКРОРНК В ПАТОГЕНЕЗЕ ТЯЖЕЛОЙ И КРАЙНЕ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМ COVID-19

3.3.3. Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН Колесников Сергей Иванович

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН Тоневицкий Александр Григорьевич

оглавление

ВВЕД	ЕНИЕ	5
ГЛАВ	А 1. НОВАЯ КОРОНАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ: ПАТОГ	EHE3
И МОЛЕКУ	ЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ (ЛИТЕРАТУ	РНЫЙ
ОБЗОР)	•••••	15
1.1	Татогенез COVID-19	15
1.2	Формирование иммунитета к SARS-CoV-2	19
1.2.1	Врожденный иммунитет в борьбе с SARS-CoV-2	19
1.2.2	Приобретенный иммунитет к SARS-CoV-2	22
1.3	Роль главного комплекса гистосовместимости класса 1 в формир	овании
противовиру	сного иммунитета	
1.4	Роль микроРНК в противовирусном иммунитете	32
1.5	Молекулярно-генетические особенности SARS-CoV-2	40
1.6	Факторы прогноза тяжести течения COVID-19	46
1.6.1	Демографические факторы риска	48
1.6.2	Метаболические заболевания	49
ГЛАВ	А 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	52
2.1	Трограмма исследования	52
2.2	Методы исследования	59
2.2.1	Пациенты	59
2.2.2	Выделение ДНК	59
2.2.3	Подготовка библиотек для секвенирования генов ГКГС	59
2.2.4	Секвенирование	60
2.2.5	Определение генотипа ГКГС- I по данным секвенирования	60
2.2.6	Определение профиля микроРНК ткани лёгких	60
2.2.7	Забор образцов для генотипирования вируса SARS-CoV-2	61
2.2.8	Подготовка библиотек и секвенирование РНК SARS-CoV-2	61
2.2.9	Определение варианта SARS-CoV-2	62
2.2.10	Оценка количества клеток, секретирующих IFN-ү	63

2.2.11 Прогноз аффинности взаимодействия молекула ГКГС-I – пептид 65		
2.3 Методический опыт оценки роли циркулирующих микроРНК 69		
2.3.1 Профиль микроРНК плазмы 69		
2.3.2 Профиль микроРНК плазмы, ассоциированных с гемолизом 70		
2.3.3 Взаимосвязь уровня циркулирующих в плазме крови микроРНК с их		
экспрессией в ткани		
2.4 Статистическая обработка данных77		
ГЛАВА 3. ВЗАИМОСВЯЗЬ ГКГС-І С ТЯЖЕСТЬЮ COVID-19 78		
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ НА ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ COVID-19		
РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА SARS-COV-2		
4.1 Взаимосвязь прогноза течения COVID-19 с мутациями белка NS8		
SARS-CoV-2 в зависимости от штаммовой принадлежности вируса 81		
4.2 Особенности генотипа ГКГС-І пациентов в первую и третью волну		
COVID-19		
4.3 Особенности презентации пептидов вариантов Омикрон ВА.1–ВА.5		
вируса SARS-CoV-2 молекулами ГКГС 102		
4.4 Оценка влияния мутаций на иммунодоминантные эпитопы вируса		
SARS-CoV-2		
ГЛАВА 5. РОЛЬ МИКРОРНК В РЕГУЛЯЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ		
ВИРУСА И МАКРООРГАНИЗМА 113		
5.1 Мутации SARS-CoV-2 приводят к снижению числа регионов		
связывания с микроРНК ткани лёгких 113		
5.2 Влияние микроРНК на экспрессию рецептора АСЕ2 119		
5.2.1 Профили экспрессии ACE2 и TMPRSS2 в разных органах 120		
5.2.2 Взаимодействия между изо-микроРНК и ACE2/TMPRSS2 121		
5.2.3 Лизин-специфическая деметилаза 5В регулирует ACE2 и TMPRSS2		
посредством репрессии активности let-7e/miR-125a и miR-141/miR-200 123		
5.2.4 Экспрессия JARID1B ассоциирована с экспрессией ACE2 и		
TMPRSS2 в большинстве клеток человека 124		

5.3 Роль циркулирующей микроРНК miR-19b в прогнозе исхода COVID-19		
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА И ПРОВЕРКА КЛИНИЧЕСКОЙ		
ЗНАЧИМОСТИ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ОБОСНОВАННОГО АЛГОРИТМА		
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ ДЛЯ ПРОГНОЗА ТЯЖЕЛОГО И		
КРАЙНЕ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ COVID-19 НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА		
ГЕНОТИПА ГКГС-І 136		
ЗАКЛЮЧЕНИЕ142		
ВЫВОДЫ 148		
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 150		
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ151		
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 156		
ПРИЛОЖЕНИЕ А		

введение

Актуальность темы исследования

SARS-CoV-2 представляет собой одноцепочечный РНК-вирус с положительной цепью, который вызывает у людей вирусную пневмонию, сопряженную с тяжелым респираторным синдромом [Kim и др., 2020]. По данным ВОЗ эпидемия коронавирусной инфекции (COVID-19), вызванная этим вирусом, превратилась в пандемию и унесла более 6,9 миллиона жизней во всем мире в период с декабря 2019 года по май 2023 года. И несмотря на то, что ВОЗ объявила об окончании пандемии, вспышки заболевания и смертность от него продолжают наблюдаться по всему миру, что не снижает актуальность исследования этого заболевания.

В ряде исследований была продемонстрирована взаимосвязь тяжести течения COVID-19 с генотипом главного комплекса гистосовместимости класса 1 (ГКГС-I или HLA-I). Прежде всего была выявлена взаимосвязь частоты встречаемости аллелей HLA-A*01:01 и HLA-A*02:01 с числом случаев заражения и уровнем смертности от COVID-19 в различных регионах Италии [Pisanti и др., 2020]. Также на выборке пациентов с различной тяжестью течения COVID-19 [Iturrieta-Zuazo и др., 2020] были подтверждены результаты теоретического моделирования взаимодействия пептидов SARS-CoV-2 с различными аллельными вариантами молекул ГКГС-I. Была продемонстрирована взаимосвязь тяжести COVID-19 и числа вирусных пептидов с высокой аффинностью к индивидуальному набору молекул ГКГС-I: чем больше таких пептидов связываются с ГКГС-I, тем легче течение заболевания. Позднее нами была показана взаимосвязь генотипа ГКГС-I пациента с риском смерти от COVID-19 в возрасте до 60 лет [Shkurnikov и др., 2021].

Молекулы ГКГС-І являются ключевыми медиаторами первых звеньев развития специфического иммунного ответа на заражение SARS-CoV-2. После попадания в клетку SARS-CoV-2 индуцирует трансляцию своих белков, часть из которых попадает в протеасомы инфицированной клетки, расщепляется до пептидов длиной 8-12 аминокислотных остатков и связывается с молекулами ГКГС-І. После

связывания комплекс из молекулы ГКГС-I и пептида вируса переносится на поверхность зараженной клетки, где может быть распознан Т-клеточным рецептором CD8⁺ Т-лимфоцитов. В результате зрелый CD8⁺ Т-лимфоцит активируется и уничтожает зараженную клетку с помощью перфоринов и сериновых протеаз [Wherry, Ahmed, 2004], прерывая размножение вируса.

В организме человека присутствует три основных вида молекул ГКГС-I, кодируемых генами HLA-A, HLA-B, HLA-C. Каждый из этих генов у отдельного человека может быть представлен в двух вариантах – аллелях, наследуемых от родителей. Таким образом генотип ГКГС-I у отдельного человека может включать от трех до шести аллельных вариантов. В человеческой популяции существуют сотни аллельных вариантов генов HLA-A, HLA-B, HLA-C. Каждый из них кодирует молекулу ГКГС-I, обладающую индивидуальной способностью к узнаванию различных чужеродных белков. Распределение аллелей специфично для разных стран и популяций [Wang и др., 2009].

От индивидуальной комбинации молекул ГКГС-І зависит тяжесть течения ряда инфекционных заболеваний (малярия, туберкулез, СПИД, вирусные гепатиты) [Wang и др., 2009]. Продемонстрирована связь между генотипом ГКГС-І и чувствительностью к SARS-CoV, вирусу возбудителю первого тяжелого острого респираторного синдрома. Так аллели HLA-B*07:03 [Ng и др., 2004], HLA-B*46:01 [Lin и др., 2003], HLA-C*08:01 [Chen и др., 2006] являются факторами предрасположенности к развитию заболевания в тяжелой форме. В свою очередь аллель HLA-C*15:02 ассоциирован с легким течением заболевания [Wang и др., 2011].

За более чем три года пандемии COVID-19 накоплена значительная информация о фактических эпитопах различных вариантов SARS-CoV-2 [Vita и др., 2019], особенностях формирования Т-клеточной памяти [Francis и др., 2022], тенденциях в частоте мутаций в вирусе [Nersisyan и др., 2022а]. Однако взаимосвязь генотипа ГКГС-I и течения COVID-19 преимущественно анализировали по данным первой волны пандемии, вызванной исходным вариантом вируса [Langton и др.,

2021; Lorente и др., 2021; Tavasolian и др., 2021; Venet и др., 2022; Hovhannisyan и др., 2022].

Более того, при исследованиях ассоциаций генотипа и тяжести течения COVID-19 практически не учитывался возраст переболевших, сопутствующие заболевания. Между тем, возраст является значимым фактором в формировании иммунного ответа к COVID-19 [McGroder и др., 2021; Promislow, 2020; Sanchez-Vazquez и др., 2021]. В частности показано, что у людей старше 60 лет в значительной степени падает длина теломер наивных Т-лимфоцитов, что приводит практически к десятикратному падению их способности к делению при активации [Anderson и др., 2022], сокращается репертуар Т-клеточных рецепторов [Britanova и др., 2014].

Всё это обуславливает необходимость тщательного изучения взаимосвязи генотипа ГКГС-I с тяжестью COVID-19, особенностями формирования иммунитета к вирусу, эволюцией SARS-CoV-2, влияющей на его иммуногенные эпитопы. Пробелы в изучении вклада генотипа ГКГС-I в патогенез COVID-19, отсутствие обобщенного отечественного и зарубежного опыта по использованию данных генотипирования в клинической практике, высокая практическая востребованность новых разработок в представленной области в условиях продолжающегося персистирования вируса SARS-CoV-2 в человеческой популяции, делают крайне актуальным и своевременным проведение настоящего исследования.

Степень научной разработанности проблемы

В ходе пандемии COVID-19 беспрецедентные усилия были направлены на изучение вируса SARS-CoV-2 и патогенеза COVID-19, молекулярно-биологических механизмов формирования иммунного ответа при данном заболевании, факторов риска тяжелого течения заболевания. В частности, предпринимались многочисленные попытки выявить генетические факторы риска заражения SARS-CoV-2 и тяжелого течения COVID-19, но таких клинически значимых факторов не найдено.

В то же время анализ отечественной и зарубежной литературы показал, что от индивидуальной комбинации молекул ГКГС-I зависит тяжесть течения ряда

инфекционных заболеваний, в том числе продемонстрирована связь между генотипом ГКГС-I и чувствительностью к SARS-CoV.

Аналогичные наблюдения были опубликованы и для SARS-CoV-2, но большинство исследователей анализировали частоты аллелей ГКГС-I и практически не уделяли внимания особенностям варианта SARS-CoV-2, вызвавшего вирусную пневмонию, а также способности индивидуального набора молекул ГКГС-I пациентов представлять пептиды вируса на поверхности зараженной клетки, влиянию мутаций вируса на эффективность врожденного и приобретенного иммунитета, вкладу этих процессов в патогенез COVID-19.

Практически не исследована роль микроРНК как молекул, влияющих на вирус SARS-CoV-2 и участвующих в патогенезе COVID-19 на уровне целостного организма.

С этих позиций рассматриваемая в диссертации научная проблема является недостаточно проработанной и слабо изученной.

Цель исследования

Установить роль генотипа главного комплекса гистосовместимости класса 1 и профиля микроРНК пациентов в патогенезе тяжелой и крайне тяжелой форм новой коронавирусной инфекции COVID-19 для оптимизации оценки тяжести и прогноза течения заболевания.

Задачи исследования

 Выявить взаимосвязь частоты генотипов главного комплекса гистосовместимости класса 1 с особенностями течения заболевания у пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2 в период 2020 – 2021 гг.

2) Разработать способ оценки риска развития тяжелой и крайне тяжелой форм COVID-19 на основе анализа генотипа главного комплекса гистосовместимости класса 1 у пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2.

3) Определить возможное влияние микроРНК ткани лёгких на эволюцию генома SARS-CoV-2.

4) Выявить взаимосвязь тяжести и исхода заболевания COVID-19 с профилем циркулирующих в плазме крови пациентов микроРНК.

5) Оценить у пациентов, переболевших COVID-19, зависимость Т-клеточного ответа на пептиды SARS-CoV-2 от генотипа главного комплекса гистосовместимости класса 1.

6) Разработать патогенетически обоснованный алгоритм диагностических мероприятий для прогноза тяжелого и крайне тяжелого течения COVID-19 на основе анализа генотипа комплекса гистосовместимости класса 1.

Научная новизна исследования

Впервые установлено, что у пациентов в возрасте до 60 лет с вирусной пневмонией, вызванной двумя наиболее распространенными вариантами штамма Дельта SARS-CoV-2, в случае инфицирования вариантом AY.122 число высокоаффинных для их индивидуального набора молекул ГКГС-I пептидов вируса SARS-CoV-2 значимо сократилось по сравнению с инфицированием вариантом B.1.617.2. Это прежде всего связано с мутацией G8R в белке NS8.

Впервые продемонстрировано, что среди госпитализированных в третью волну пандемии COVID-19 пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, значимо снижено число носителей аллеля HLA-A*01:01 ГКГС-I. Установлено, что носители аллеля HLA-A*01:01 формируют Т-клеточный иммунитет к пептидам, кодируемым геном ORF1ab вируса SARS-CoV-2. Гены SARS-CoV-2 мутируют с разной скоростью. Ген ORF1ab наиболее консервативен среди них, а значит носители аллеля HLA-A*01:01 могут длительное время сохранять Т-клеточный иммунитет.

Продемонстрирована более высокая частота встречаемости иммунодоминантных эпитопов из белков гена ORF1ab вируса SARS-CoV-2 у носителей HLA-A*01:01 по сравнению с эпитопами из белков этого гена у носителей HLA-A*02:01 в когорте выздоровевших пациентов первой волны COVID-19.

Впервые на основании исследования взаимосвязи генотипа ГКГС-I с тяжестью течения заболевания у пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, продемонстрирована взаимосвязь вероятности летального исхода заболевания и числа пептидов вируса SARS-CoV-2, высокоаффинных для индивидуального набора молекул ГКГС-I пациента.

Впервые изучено возможное влияние микроРНК ткани лёгких на эволюцию генома вируса SARS-CoV-2. Показано, что 5р- и 3р-нетранслируемые области вируса SARS-CoV-2 практически не имеют регионов связывания с характерными для ткани лёгких микроРНК, но вирус обладает значительным числом мест связывания с микроРНК в регионе NSP3-NSP5, ответственном за аутопротеолиз вирусных полипептидов и формирование вирионов. В вариантах штамма Омикрон произошло значимое снижение числа мест связывания с микроРНК клеток хозяина, что могло способствовать снижению патогенности данного штамма.

Впервые выявлен механизм регуляции экспрессии генов ACE2 и TMPRSS2 человека молекулами микроPHK. Показано, что лизин-специфическая деметилаза 5В (JARID1B), кодируемая геном KDM5B, может опосредованно влиять на экспрессию ACE2/TMPRSS2 путем репрессии транскрипции hsa-let-7e/hsa-miR-125a и hsa-miR-141/hsa-miR-200. Впервые продемонстрирована взаимосвязь уровня циркулирующих в плазме крови микроPHK hsa-miR-25-3p и hsa-miR-19b-3p с крайне тяжелым течением COVID-19.

Впервые показано, что мутации вируса SARS-CoV-2 практически не затрагивают иммунодоминантные для российской популяции пептиды вируса SARS-CoV-2.

Впервые разработан и апробирован патогенетически обоснованный алгоритм диагностических мероприятий для прогноза тяжелого и крайне тяжелого течения COVID-19 на основе анализа генотипа ГКГС-І пациента. Если значение «Индекса риска» более 89, пациент относится к группе с высоким риском тяжелого течения COVID-19.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе исследования новые научные данные вносят вклад в углубление фундаментальных знаний о патогенезе новой коронавирусной инфекции COVID-19 с позиции обоснования роли ГКГС-I и микроРНК в формировании специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, а также развитии и стойкости постинфекционного иммунитета. Полученные результаты по зависимости Т-клеточного ответа на вирус SARS-CoV-2 от генотипа ГКГС-I могут стать основой для создания высокоэффективных вакцин на основе пептидов ORF1ab.

Практическая значимость заключается в том, что разработанные в процессе исследования и научно обоснованные патофизиологические подходы к анализу особенностей ГКГС-І генотипа индивидуальных пациентов позволят совершенствовать прогноз развития тяжелых и крайне тяжелых форм COVID-19, а значит более эффективно оказывать медицинскую помощь В условиях продолжающейся эпидемии и в периоды ее повторного возникновения.

Разработанные в исследовании предложения и практические рекомендации могут быть внедрены в деятельность медицинских организаций, оказывающих медицинскую помощь в стационарных условиях при новой коронавирусной инфекции COVID-19.

Методология и методы исследования

В исследовании были использованы данные о генотипе добровольцев из Федерального регистра доноров костного мозга (РНИМУ им. Н.И. Пирогова). Группа пациентов первой волны была сформирована в период с мая по август 2020 года. Группа пациентов третьей волны была сформирована в период с июня по июль 2021 года. Все пациенты, участвовавшие в исследовании, были госпитализированы с COVID-19 в ГБУЗ «ГКБ № 15 ДЗМ». ДНК из образцов крови выделялась набором pearentoв QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия). Подготовка библиотек для секвенирования генов ГКГС осуществлялась с помощью набора реагентов для подготовки библиотек фрагментов ДНК генов ГКГС I и II классов для генотипирования высокопроизводительным секвенированием (NGS) «HLA-Эксперт» (ДНК-Технология, Россия). Секвенирование библиотек фрагментов ДНК генов ГКГС I и II классов осуществлялось с помощью секвенатора Illumina MiSeq (Illumina, США) на стандартной проточной ячейке набора pearentoe MiSeq Reagent Kit v2 500-cycles (Illumina, США) в режиме парных прочтений 2х250. Для исследования образцов на наличие PHK SARS-CoV-2 применяли различные наборы реагентов для ОТ-ПЦР и комплектные к ним наборы для выделения РНК: ПОЛИВИР

SARS-CoV-2 Express (ЛИТЕХ, Россия), АмплиПрайм SARS-CoV-2 DUO / МагноПрайм ФАСТ-Р (НекстБио, Россия) и SARS-CoV-2 «СоV-2-Тест» (ТестГен, Россия). После подготовки библиотек фрагментов вируса SARS-CoV-2 и их секвенирования на секвенаторе Illumina MiSeq с использованием набора реактивов MiSeq Reagent Kit v3 600-cycles, запускаемого в режиме 2x250. чтения последовательности аннотировались с применением баз данных Pango-lineage и NextStain. Выделение мононуклеаров периферической крови осуществляли в градиенте плотности фиколла (ПанЭко, Россия). Пептиды с чистотой не менее 95% были синтезированы Peptide 2.0 Inc. или в ФГБУ науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Протеомы вариантов SARS-CoV-2 были получены из базы данных GISAID. В был качестве эталонного вируса использован вариант Wuhan-Hu-1 (EPI ISL 402125). Прогноз аффинности взаимодействия молекула ГКГС-I – пептид осуществляли с помощью netMHCPan версии 4.1. Для статистического анализа использовались следующие функции из библиотеки stats в R: fisher.test для точного критерия Фишера, wilcox.test для U-критерия Манна-Уитни. Кроме того, использовалась поправка на множественность сравнений Бенджамини-Хохберга. Графики были построены с помощью библиотек ComplexHeatmap, pheatmap и ROCit.

Положения, выносимые на защиту

1) Тяжесть течения заболевания пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, связана с генотипом ГКГС-I: чем больше вирусных пептидов с высокой аффинностью связываются с ГКГС-I, тем легче течение заболевания.

2) Среди госпитализированных в третью волну пандемии COVID-19 пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, значимо снижено число носителей аллеля HLA-A*01:01 ГКГС-I. Носители аллеля HLA-A*01:01 формируют Т-клеточный иммунитет к пептидам, кодируемым геном ORF1ab вируса SARS-CoV-2. Гены SARS-CoV-2 мутируют с разной скоростью. Ген ORF1ab наиболее консервативен среди них, а значит носители аллеля HLA-A*01:01 могут длительное время сохранять Т-клеточный иммунитет.

3) МикроРНК ткани лёгких могут влиять на эволюцию SARS-CoV-2, поскольку вирус обладает значительным числом мест связывания с микроРНК в регионе NSP3-NSP5, ответственном за аутопротеолиз вирусных полипептидов и формирование вирионов. Наблюдается значимая тенденция к уменьшению числа мест связывания с микроРНК в геноме вариантов вируса разных волн.

4) Экспрессия генов ACE2 и TMPRSS2 человека регулируется молекулами микроPHK через репрессию транскрипции hsa-let-7e/hsa-miR-125a и hsa-miR-141/hsa-miR-200 лизин-специфической деметилазой 5B. Высокий уровень циркулирующих микроPHK hsa-miR-25-3p и hsa-miR-19b-3p в плазме крови ассоциирован с благоприятным исходом крайне тяжелой формы COVID-19.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертация выполнена в лаборатории исследований молекулярных механизмов долголетия Национального исследовательского университета «Высшая школа экономики», а также в отделе персонализированной и профилактической медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» и является частью тем государственных заданий № 11816п-П8, № 75-00672-22-ПР, а также гранта Минобрнауки России № 075-15-2021-1049.

Достоверность и объективность полученных результатов подтверждается репрезентативностью выборочных совокупностей объектов исследования, достаточным объемом наблюдений, а также использованием генеральных совокупностей и адекватных методов исследования. За основу статистических материалов взят обоснованный массив фактических данных с применением современных подходов к обработке исходной информации. Статистическая обработка материалов осуществлялась в среде для математического анализа R версий 3.6.3 – 4.2.2.

Личный вклад автора

Автором работы проведен анализ отечественных, зарубежных научных источников литературы, официальных источников информации. Диссертантом самостоятельно разработана методика настоящего исследования. Организован и

осуществлен сбор первичного материала. Автор принимал непосредственное участие в проведении экспериментов, анализе полученных данных и подготовке публикаций. Автором диссертационного исследования лично проводилась математико-статистическая обработка результатов работы. Автором проведена аналитическая работа с последующей интерпретацией полученных результатов исследования, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Публикации

По материалам диссертационного исследования были опубликованы 23 печатные работы, в том числе 18 статей в научных журналах и изданиях, входящих в международные базы данных и системы цитирования Scopus и Web of Science, три патента на изобретения, одни клинические рекомендации, одно свидетельство о регистрации программы для ЭВМ.

Структура и объём работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав собственных результатов и их обсуждения, выводов, заключения, списка используемых сокращений и списка использованной литературы, приложения. Работа изложена на 216 страницах и содержит 32 рисунка, 20 таблиц и 419 литературных ссылок.

Апробация работы

Основные положения и результаты работы были доложены и обсуждены на научно-практической конференции «Инфекционные заболевания в XXI веке. Современные подходы к диагностике и лечению» (онлайн, 23 апреля 2021 года), Российском конгрессе по клинической фармакогеномике (г. Москва, 05 февраля 2022 года), научном семинаре с участием сотрудников Института молекулярной биологии НАН РА, Армянского института биоинформатики (ABI) на базе Русско-Армянского университета (г. Ереван, Республика Армения, 20 апреля 2022 года), конгрессе с международным участием «Инновационная кардиология» (г. Минск, Республика Белоруссия, 21 октября 2022 года), II интернет-конференции «Покровские чтения» (онлайн, 01 ноября 2022 года), XI конгрессе «Национальной Ассоциации Фтизиатров» (г. Санкт Петербург, 25 ноября 2022 года).

ГЛАВА 1. НОВАЯ КОРОНАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ: ПАТОГЕНЕЗ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

1.1 Патогенез COVID-19

В 2019 г. были выявлены случаи нового заболевания, получившего название COVID-19, которое вызывалось новым коронавирусом SARS-CoV-2 [Старшинова и др., 2020]. Данный вирус характеризовался быстрым, сложно контролируемым распространением, что связано с его определенными особенностями. В частности, у пациентов без симптомов часто наблюдалась вирусная нагрузка на том же уровне, что и у симптоматических пациентов [Rothe и др., 2020; Yang и др., 2021b; Zou и др., 2020]. Кроме того, выделение вирусных частиц часто начиналось до проявления первых симптомов болезни [Не и др., 2020]. Было оценено, что значимая доля случаев заражения приходится на передачу вируса от пациентов в бессимптомный период [Johansson и др., 2021; Subramanian, He, Pascual, 2021].

Другой причиной быстрого распространения COVID-19 является мутирование вируса и появление новых штаммов [Rambaut и др., 2020]. Ряд штаммов, обладающих одной или несколькими новыми мутациями, называется «вариантом». ВОЗ выделяла 5 вариантов SARS-CoV-2, вызывающих озабоченность (Альфа, Бета, Гамма, Дельта и Омикрон), а также три варианта, вызывающих интерес (Эта, Лямбда и Мю). К началу 2023 года в человеческих популяциях из всех вариантов циркулировал только Омикрон, практически полностью вытеснив остальные варианты [World Health Organization, 2023а].

SARS-CoV-2 представляет собой одноцепочечный РНК-вирус с положительной цепью, который вызывает тяжелый респираторный синдром у людей [Акимкин и др., 2020; Кіт и др., 2020]. По данным всемирной организации здравоохранения новая коронавирусная инфекция, начавшаяся в конце 2019 года (COVID-19) [Драпкина и др., 2020], превратилась в серьезную пандемию, унесшую более 6,9 миллиона жизней во всем мире в период с декабря 2019 г. по май 2023 г. По сравнению с SARS-CoV, SARS-CoV-2 значительно легче передается от человека

к человеку и быстро распространился на все континенты [Chan и др., 2020; Li и др., 2020b].

Как правило, коронавирусы вызывают заболевания органов дыхания, желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы у людей и животных [Li, 2016; Perlman, Netland, 2009]. Коронавирусы способны адаптироваться к новой среде посредством мутаций и запрограммированы на изменение тропизма хозяина [Li, 2013; Perlman, Netland, 2009].

SARS-CoV-2, как и другие коронавирусы, способен передаваться от животных человеку, что приводит к вспышкам тяжелых и смертельных респираторных заболеваний. SARS-CoV был обнаружен у мышей впервые летучих И распространился на других животных в различных регионах. Коронавирусы относятся к семейству Coronaviridae и делятся на альфа (α -CoV), бета (β -CoV), гамма (у-CoV) и дельта (δ-CoV) коронавирусы. Альфа- и бета-коронавирусы могут инфицировать млекопитающих. Вирусы, обнаруженные у людей, генетически схожи с родом β-CoV. β-CoV подразделяются на разные линии (линии A, B, C и D): SARS-CoV и SARS-CoV-2 сгруппированы в линию В, в которой имеется около 200 опубликованных вирусных MERS-CoV последовательностей, тогда как принадлежит к линии C, которая имеет ~ 500 вирусных последовательностей [Letko, Marzi, Munster, 2020].

HCoV-229E и HCoV-NL63 принадлежат к семейству альфакоронавирусов, тогда как HCoV-OC43, HCoV-HKU1 и SARS-CoV относятся к бетакоронавирусам [Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020; Simmons и др., 2013; Wan и др., 2020]. Филогенетический анализ показывает, что белки SARS-CoV-2 имеют высокую степень сродства с линией β-рода коронавирусов летучих мышей [Wan и др., 2020]. Весь геном SARS-CoV-2 на 80% идентичен геному SARS-CoV и на 96% идентичен коронавирусу летучих мышей BatCoV-RaTG13 [Zhou и др., 2020b]. Сходство последовательности Спайк-белка между SARS-CoV-2 и SARS-CoV составляет около 76–78%. Один только рецепторсвязывающий домен (RBD) имеет сходство 73–76%. Напротив, человеческий MERS-CoV схож с коронавирусом летучих мышей Tylonycteris HKU4, имеет меньшее

сходство последовательностей (~ 54%) и распознает DPP4 в качестве своего рецептора. Сходство последовательностей между Спайк-белками SARS-CoV-2 и SARS-CoV объясняет возможность связывания с одним и тем же рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2) в клетке-хозяине [Wan и др., 2020].

Коронавирус обладает одним из самых больших геномов среди всех РНКвирусов размером от 27000 до 32000 п.н. Рецептор-опосредованный эндоцитоз является основным процессом проникновения вируса в клетки-хозяева. SARS-CoV-2 использует ACE2, рецептор клеточной поверхности, который присутствует в почках, кровеносных сосудах, сердце и, что важно, в эпителиальных клетках альвеолярных дыхательных путей легких второго типа [Hamming и др., 2004]. Sбелок, отвечающий за проникновение вируса, имеет N-концевой и C-концевой домены, а также две основные субъединицы S1 и S2, характерные для всех семейств коронавирусов [Li, 2016]. Одна из этих субъединиц S1 или S2 связывается с рецепторами хозяина и действует как RBD.

С момента идентификации первых коронавирусов у человека (229Е и ОС43) в конце 1960-x годов коронавирусные инфекции считались относительно безвредными [Simmons и др., 2013; Wan и др., 2020]. Однако вспышка SARS-CoV на юге Китая зимой 2002 г. имела летальность на уровне около 10% инфицированных пациентов [Hamming и др., 2004; Peiris, Guan, Yuen, 2004; Stadler, Rappuoli, 2005]. Вирусологический анализ вспышки атипичной пневмонии показал, что летучие мыши являются естественными резервуары для SARS-CoV. Циветты и енотовидные собаки – промежуточными хозяевами. В 2012 году у людей был идентифицирован новый высоко патогенный коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) [Zaki и др., 2012]. MERS-CoV имел низкую скорость распространения, заболело около 1700 человек. При этом летальность составила 36% [Li, 2016; Zaki и др., 2012].

Вскоре после открытия SARS-CoV-2 в патогенезе COVID-19 были выделены две фазы: фаза ответа на вирусную инфекцию и фаза воспалительного ответа хозяина (иногда переходящая в фазу цитокинового шторма) (Рисунок 1). Вирусная нагрузка SARS-CoV-2 высока в первые дни инфекции и неуклонно снижается с

течением времени у иммунокомпетентных хозяев [Sette, Crotty, 2021]. В первые несколько дней инфекция SARS-CoV-2 может варьироваться от бессимптомной до слабо выраженной у большинства пациентов и обычно включает симптомы со стороны верхних дыхательных путей и/или системное гриппоподобное заболевание. Тяжелая форма COVID-19 обычно развивается по крайней мере через одну неделю после начала заболевания, что может указывать на большую роль дисрегуляции иммунного ответа, а не прямого вирусного цитопатического эффекта.



Рисунок 1 – Временная шкала COVID-19 среднетяжелого, тяжелого и крайне тяжелого течения и ее взаимосвязь с вирусной нагрузкой, интенсивностью воспалительной реакции, клинической симптоматикой и формированием специфического иммунитета

Оценка последовательности патофизиологических событий позволяет предположить, что среднее время от появления симптомов до госпитализации, одышки, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), потребности в искусственной вентиляции легких и поступления в отделение интенсивной терапии (ОИТ) составляет 7,0, 8,0, 9,0, 10,5 и 10,5 дней соответственно [Глыбочко и др., 2020a; Huang и др., 2020] для исходного варианта SARS-CoV-2. Необходимо отметить, что сроки возникновения симптомов немного различаются в зависимости от варианта вируса, что подтверждает гипотезу о нарушении регуляции иммунного ответа, вызывающего тяжелую форму COVID-19.

1.2 Формирование иммунитета к SARS-CoV-2

1.2.1 Врожденный иммунитет в борьбе с SARS-CoV-2

Первой линией защиты организма от вирусов, включая SARS-CoV-2, является врожденный иммунный ответ, который ограничивает вход вирусов в клетки, трансляцию, репликацию и сборку вирионов, а также позволяет обнаруживать и уничтожать зараженные клетки, координирует и усиливает приобретенный иммунитет [Diamond, Kanneganti, 2022].

После попадания вируса в клетку и синтеза неструктурных белков формируется репликационно-трансляционный комплекс, который считывает с плюс-цепи PHK SARS-CoV-2 антисмысловые минус-цепи PHK, а неструктурные белки реорганизуют мембраны, полученные из эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и комплекса Гольджи, чтобы скрыть область вирусной репликации и транскрипции от иммунных сенсоров клетки-хозяина [Кпоорѕ и др., 2008]. После синтеза структурных белков они переносятся к мембранам ЭПР и комплекса Гольджи, комбинируются с геномной РНК и N-белками для последующей сборки вирион-содержащих везикул, которые в процессе экзоцитоза высвобождают вирионы во внеклеточное пространство [Lee, Channappanavar, Kanneganti, 2020].

Различные этапы жизненного цикла вируса могут подвергаться действию врожденного иммунитета. Например, сенсоры на поверхности клеток могут определять S, E и M-белки во время этапа связывания, а цитоплазматические сенсоры могут обнаруживать вирусные белки и нуклеиновые кислоты до компартментализации с участием неструктурных белков вируса. Это приводит к активации воспалительных сигнальных путей [Смирнов, Тотолян Арег А., 2020], продукции цитокинов и клеточной гибели [Diamond, Kanneganti, 2022].

Клетки врожденного иммунитета, включая макрофаги, моноциты, дендритные клетки, нейтрофилы и лимфоидные клетки врожденного иммунитета, такие как клетки-естественные киллеры (NK-клетки, от англ. Natural killer cells), имеют различные рецепторы распознавания паттернов (PRR, от англ. pattern recognition receptors), узнающие патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP, от англ. pathogen-associated molecular patterns) или молекулярные паттерны, связанные с повреждением клеток, что вызывает развитие воспалительного и иммунного ответа. Выделяют пять основных типов PRR: толл-подобные рецепторы (TLR, от англ. Toll-like receptors), RIG-I-подобные рецепторы I (RLR, от англ. RIG-I-like receptors, где RIG-I – retinoic acid-inducible gene I, индуцируемый ретиноевой кислотой ген I), NOD-подобные рецепторы (NLR, от англ. NOD-like receptors, где nucleotide-binding oligomerization domain, NOD – нуклеотид-связывающий олигомеризационный домен), AIM2-подобные рецепторы (от англ. absent in melanoma 2 – отсутствующий при меланоме белок 2) и рецепторы лектинов С-типа [Kanneganti, 2020].

TLR активируют продукцию воспалительных цитокинов через адапторные молекулы MyD88 и TRIF [Manik, Singh, 2022]. MyD88 активирует ядерный фактор NF-кB, митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK, от англ. mitogen-activated protein kinases) и интерферон-регулирующие факторы (IRF, от англ. interferon regulatory factors), которые перемещаются в ядро клетки и активируют транскрипцию провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли и интерлейкины 1 и 6, экспрессию ряда сенсоров врожденного иммунитета, интерферонов и интерферон-стимулирующих генов. TRIF также активирует продукцию интерферонов и ряда противовирусных факторов [Manik, Singh, 2022]. Е-белок SARS-CoV-2 активирует воспалительную реакцию через TLR2, а ингибирование TLR2 у трансгенных мышей, зараженных SARS-CoV-2, уменьшало выраженность цитокинового шторма и улучшало выживаемость [Potapov,

Каппеganti, Del Sol, 2022; Zheng и др., 2021]. При изучении SARS-CoV было показано, что активация пути TLR3 играет защитную роль при инфекции [Lee, Channappanavar, Kanneganti, 2020]. В исследованиях *in silico* была показана возможность S-белка SARS-CoV-2 связываться с белками TLR1, TLR4 и TLR6 [Choudhury, Mukherjee, 2020]. TLR7 и TLR8 могут распознавать повышенные при COVID-19 антифосфолипидные антитела, а мутации гена *TLR7* были связаны с тяжелым течением COVID-19 [Made van der и др., 2020].

Одноцепочечные PHK SARS-CoV-2, включая геномные, субгеномные и репликативные РНК, могут детектироваться с помощью молекул RLR, таких как MDA5, RIG-I и LGP2 [Yang и др., 2021а]. После посттрансляционных модификаций MDA5 и RIG-I перемещаются в митохондрии, где образуют сигналосому с белком MAVS (от англ. mitochondrial antiviral signaling protein, белок противовирусного сигнального пути митохондрий). Данная сигналосома индуцирует фосфорилирование IRF3 и активацию интерферонов I и III типов [AL Hamrashdi, Brady, 2022]. Секреция интерферонов приводит к стимуляции рецепторов интерферонов по аутокринному и паракринному механизму, что приводит к интерферон-стимулируемых активации множества генов с различными противовирусными функциями [Schoggins, 2019]. Так, Ly6E может предотвращать вход SARS-CoV-2, белки IFIT – ингибировать вирусную репликацию, а BST2 – предотвращать выход вируса из клетки [Martin-Sancho и др., 2021; Pfaender и др., 2020]. Как чрезмерная, так и недостаточная активация интерферонового ответа может быть негативным фактором при COVID-19.

NLR также могут отвечать на инфекцию SARS-CoV-2, индуцируя выработку интерферонов I типа и провоспалительных цитокинов. NLRP3 является одним из самых изученных сенсоров инфламмасомы и приводит к активации каспазы-1, синтезу и высвобождению интерлейкинов 1β и 18 и клеточной смерти [Christgen, Kanneganti, 2020]. NLRP3 может детектировать SARS-CoV и SARS-CoV-2 [Campbell и др., 2021], а уровни интерлейкинов 1β и 18 в плазме крови коррелируют с тяжестью заболевания и смертностью при COVID-19 [Laing и др., 2020]. Помимо NLRP3 при

COVID-19 в инфламмасоме могут активироваться сенсоры AIM2 и NLRC1, связанные с продукцией интерферона бета [Karki, Kanneganti, 2022].

Помимо TLR, RLR и NLR существуют дополнительные цитозольные сенсоры, которые могут детектировать вирусы и активировать провоспалительные сигнальные пути. SARS-CoV-2 может приводить к повреждению митохондрий и активировать сигнальный путь cGAS-STING и стимулировать врожденный иммунитет, однако у SARS-CoV-2 существуют механизмы подавления этого сигнального пути через белки ORF3a и Mpro [Rui и др., 2021]. Агонист STING восстанавливает ответ через данный сигнальный путь и улучшает прогноз при COVID-19 [Humphries и др., 2021].

Ранее уже были упомянуты различные механизмы, с помощью которых SARS-CoV-2 может уклоняться от врожденного иммунного ответа, подавляя выработку интерферонов. Второй линией защиты организма от вирусной инфекции является приобретенный иммунитет.

1.2.2 Приобретенный иммунитет к SARS-CoV-2

Приобретенный иммунитет состоит из клеточного и гуморального иммунных ответов и формируется в ответ на проникновение в организм патогенных микроорганизмов либо их антигенов, в том числе при вакцинации. Антигены первично распознаются иммунными клетками врожденного иммунитета в периферических тканях. После этого антигены либо пассивно дренируются в лимфатические либо узлы, сперва процессируются мигрирующими антигенпрезентирующими клетками, которые в свою очередь перемещаются в лимфатические узлы. После этого в лимфатических узлах происходит активация Вклеток и Т-клеток и их созревание в эффекторные клетки. Антитела, продуцируемые эффекторными В-клетками, и зрелые цитотоксические Т-клетки распространяются по организму, обеспечивая длительную защиту от патогена [Ои и др., 2022].

Активация иммунных клеток в лимфатических узлах является сложным, скоординированным процессом. Антигены микроорганизма и антигенпрезентирующие клетки достигают лимфоузлов в течение нескольких часов. Эти периферические антигенпрезентирующие клетки, такие как мигрирующие дендритные клетки, могут представлять антигены непосредственно наивным Тклеткам в лимфатических узлах или передавать их вместе с пассивно дренируемыми антигенами резидентным дендритным клеткам лимфатических узлов. Активация и созревание CD8⁺ Т-клеток происходят при их взаимодействии с комплексом пептида и молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГС, МНС, от англ. Major Histocompatibility Complex, который у людей называется также HLA, от англ. Human Leukocyte Antigen – человеческий лейкоцитарный антиген) класса I на дендритных клетках при содействии костимуляторных сигналов и цитокинов. После активации CD8⁺ Т-клетки взаимодействуют с CD4⁺ Т-клетками, что превращает их в краткоживущие эффекторные (цитотоксические) Т-клетки или долгоживущие клетки памяти. В свою очередь CD4⁺ Т-клетки для активации должны ГКГС Π взаимодействовать комплексами пептидов с с класса на антигенпрезентирующих клетках, включая В-клетки в лимфатических узлах [Ои и др., 2022].

Активация и созревание В-клеток происходит в В-клеточных фолликулах периферической лимфатической ткани. В-клетки могут напрямую распознавать растворимые антигены, дренирующиеся из периферических тканей. Кроме того, фолликулярные дендритные клетки могут представлять антигены наивным Вклеткам путем захвата и удержания опсонизированных антигенов. Помимо указанных антигенов для активации В-клеток также требуется субпопуляция CD4⁺ клеток, фолликулярные Т-хелперы, обеспечивающие так называемые костимулирующие сигналы. Активированные В-клетки затем мигрируют в герминативные центры периферической лимфатической ткани, претерпевают клональную экспансию и соматическую гипермутацию для увеличения и диверсификации синтезируемых антител. Среди данных мутировавших В-клеток происходит положительная селекция на представленных антигенах, поскольку эти клетки конкурируют между собой за костимулирующие сигналы фолликулярных дендритных клеток и фолликулярных Т-клеток. В итоге зрелые В-клетки покидают герминативные центры в виде эффекторных плазматических клеток, секретирующих антитела, и клеток памяти [Ои и др., 2022].

Приобретенный иммунитет необходим для контроля и элиминации инфекции SARS-CoV-2 [Йокота Шумпей, Куройва Есиюки, Нишиока Кусуки, 2020; Попова и др., 2020а; Попова и др., 2020b]. Существует повышенный интерес к изучению клеточного компонента приобретенного иммунитета. Результаты исследований SARS-CoV и MERS-CoV позволяют предположить, что Т-клетки могут быть основными элементами контроля болезни [Zhao и др., 2017], в то время как некоторые исследования показывают, что повышенный уровень антител, то есть гуморальное звено приобретенного иммунитета, может быть связан с более высоким уровнем воспаления и ухудшенным клиническим исходом [Liu и др., 2019]. Хотя титры антител IgG коррелируют с защитой от инфекции [Khoury и др., 2021; Lumley и др., 2021; Molodtsov и др., 2022], а специфичные IgG могут обеспечивать защиту от SARS-CoV-2 даже в отсутствие клеточного иммунного ответа как в исследованиях на животных [Hasenkrug и др., 2021; McMahan и др., 2021], так и в проспективных клинических исследованиях [McMahan и др., 2021; Wyllie и др., 2020], однако гуморальный ответ развивается значительно позже клеточного ответа [Kalimuddin и др., 2021; Painter и др., 2021], поэтому именно клеточное звено первым встречает и контролирует инфекцию. Кроме того, было показано, что достаточный гуморальный ответ не развивается у определенной доли пациентов, вплоть до 15% [Gudbjartsson и др., 2020; Jain и др., 2022; Wajnberg и др., 2020]. Также гуморальный ответ постепенно снижается после инфекции или вакцинации и может не обнаруживаться на достаточном уровне уже спустя 6 месяцев [Bayart и др., 2021; Sherina и др., 2021; Zuo и др., 2021], в то время как клеточный иммунитет сохраняется значительно дольше [Bilich и др., 2021; Dan и др., 2021; Zuo и др., 2021]. После SARS-CoV клеточный иммунитет обнаруживался вплоть до 17 лет после инфекции [Le Bert и др., 2020].

Нейтрализующие антитела чаще всего взаимодействуют с S-белком, особенно с доменом RBD [Казаков и др., 2021; Львов, Альховский, 2020; Попова и др., 2022], препятствуя взаимодействию S-белка с рецептором ACE2 [Corti и др., 2021]. Кроме того, нейтрализующие антитела могут обеспечивать антителозависимую клеточную цитотоксичность, в результате которой зараженные вирусом клетки,

экспрессирующие на поверхности S-белок, подвергаются элиминации [Tso и др., 2021]. Именно поэтому в качестве варианта терапии COVID-19 разрабатывается ряд нейтрализующих антител против S-белка [Cohen и др., 2021b; Dougan и др., 2021; Reis и др., 2021]. Нейтрализующие антитела также могут связываться с N-концевым и другими доменами S-белка [Amanat и др., 2021; Lok, 2021].

Мутации в S-белке, особенно в домене RBD, приводят к снижению эффективности нейтрализующих антител, накопленных В организме или искусственно введенных в терапевтических целях. Разработаны подходы к изучению молекулярных и структурных характеристик антител, позволяющие предсказывать изменение динамики связывания мутирующего S-белка с антителами и влияние мутаций на нейтрализующую активность [Cui и др., 2022; Mannar и др., 2022; McCallum и др., 2022]. Изменение нейтрализующей активности антител с появлением новых штаммов SARS-CoV-2 было выявлено и в экспериментах in vitro [Liu и др., 2021; Rees-Spear и др., 2021]. Вариант Омикрон избегает большинства нейтрализующих антител, полученных при иммунной реакции на другие варианты вируса [Сао и др., 2022].

Одним из основных средств профилактики COVID-19 являются вакцины. По данным ВОЗ на 7 февраля 2023 г. 199 вакцин находятся на стадии доклинической разработки и 178 вакцин – на стадии клинических исследований [World Health Organization, 2023b]. При этом зарегистрированные и признанные в большинстве стран вакцины показывают высокую эффективность против исходного штамма SARS-CoV-2 [Tregoning и др., 2021], но новые штаммы всё чаще избегают иммунного ответа, выработанного при использовании этих вакцин [Cele и др., 2022; Lu и др., 2022; Planas и др., 2021]. Именно из-за всех перечисленных выше фактов всё больше внимания уделяется именно клеточному звену приобретенного иммунитета.

По-видимому, на развитие успешного приобретенного иммунного ответа и хорошие клинические исходы влияет начальная вирусная нагрузка [Rico-Caballero и др., 2022] и эффективность врожденного иммунитета, в частности, обеспечиваемого интерферонами I типа [Hadjadj и др., 2020]. Тяжелые клинические случаи

характеризуются медленным снижением вирусной нагрузки и ранним развитием воспаления с повышенными уровнями интерферона альфа и гамма и фактора некроза опухоли [Lucas и др., 2020].

Тем не менее, несмотря на важность врожденного иммунитета, скоординированный клеточный иммунный ответ также играет важную роль в контроле болезни. Раннее развитие цитотоксического CD8⁺ Т-клеточного ответа, который обычно развивается в течение первых 7 дней с появления симптомов и имеет пиковое развитие на 14-й день, коррелирует с эффективным снижением вирусной нагрузки [Notarbartolo и др., 2021] и более легким протеканием болезни [Bergamaschi и др., 2021], что характерно и для кинетики развития гуморального иммунитета [Lucas и др., 2021]. В некоторых случаях начальный клеточный иммунный ответ может обеспечиваться не специфичными к SARS-CoV-2 Тклетками, а CD8⁺ Т-клетками, имеющими фенотип NKG2D⁺IL-7R⁺, защищая организм еще до развития иммунитета, специфичного именно к SARS-CoV-2 [Bergamaschi и др., 2021; Maurice, Taber, Prlic, 2021]. Около 20% человек демонстрируют плохо развивающийся приобретенный иммунитет и могут получить пользу от ранней терапии антителами против SARS-CoV-2 [Abani и др., 2021].

При острой инфекции SARS-CoV-2 часто наблюдается выраженная лимфоцитопения, которая коррелирует с тяжелым клиническим исходом [Chen и др., 2020]. Одновременно с интенсивной пролиферацией примерно 20% пула Т-клеток, а именно CD8⁺ T-клеток, происходит потеря остальных 80% периферических T-клеток [Kuri-Cervantes и др., 2020]. Причины такой лимфоцитопении неясны, однако могут быть связаны с нарушенной пролиферацией, апоптозом и экстравазацией в ткани [Notarbartolo и др., 2021]. Разрешение лимфоцитопении коррелирует с выздоровлением, но может занимать несколько недель [Diao и др., 2020].

Эффективный контроль вирусной инфекции связан с типом 1 CD4⁺ фенотипа, то есть с Т-хелперами, секретирующими интерлейкин 2 и интерферон гамма, в то время как тип 2, связанный с секрецией интерлейкинов 4, 5 и 10, часто можно наблюдать у пациентов с тяжелым течением COVID-19 [Notarbartolo и др., 2021]. Высокий уровень секреции эффекторных молекул CD8⁺ Т-клетками при остром COVID-19 связан с благоприятными клиническими исходами [Su и др., 2020], однако гиперактивация Т-клеток может приводить к ухудшению исходов из-за повреждения собственных клеток [Mathew и др., 2020].

Вирус-специфический Т-клеточный ответ при бессимптомном COVID-19 характеризуется повышенным уровнем интерферона гамма и интерлейкина 2, а также сбалансированной секрецией интерлейкина 10 и провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин 6, фактор некроза опухоли альфа и интерлейкин 1β, в то время как при симптоматическом течении болезни наблюдалась несбалансированная секреция с преобладанием провоспалительных цитокинов [Le Bert и др., 2021].

Специфичный Т-клеточный ответ на SARS-CoV-2 развивается практически у всех заболевших [Малеева и др., 2022; Платонова и др., 2022]. В исследовании с использованием методики ELISpot было обнаружено, что у пациентов с более тяжелой изначальной инфекцией SARS-CoV-2 наблюдается более сильный клеточный ответ [Peng и др., 2020]. Использование наборов пептидов, перекрывающих весь протеом SARS-CoV-2, показало наличие Т-клеточного ответа практически на все белки вируса, сила которого коррелировала с уровнем экспрессии соответствующих белков [Grifoni и др., 2020; Tarke и др., 2021]. Уровень CD4⁺ и CD8⁺ активации коррелирует практически для всех белков, хотя NSP12 вызывает слабый CD8⁺ ответ [Tarke и др., 2021]. S-белок вызывает преимущественно CD4⁺ T-клеточный ответ, что, вероятно, направленно на поддержание выработки антител и повышенный уровень фолликулярных Т-хелперов [Воррапа и др., 2021].

Большинство исследований сконцентрированы на исследовании Т-клеточного ответа на структурные белки, такие как S-, M-, N- и E-белки, однако ORF3, NSP3, NSP4, NSP12 и другие белки также несут важные эпитопы [Quadeer, Ahmed, McKay, 2021]. CD4⁺ Т-клетки при COVID-19 характеризуются полифункциональным профилем с высоким уровнем интерлейкина 2 [Насонов, 2020а], хотя уровень продукции интерферона гамма несколько ниже, чем при других респираторных вирусных инфекциях [Rha и др., 2021]. Транскриптомный анализ отдельных клеток через 4 недели после начала инфекции продемонстрировал высокую степень

развития цитотоксических популяций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, хотя обычно развитие цитотоксических CD4⁺ субпопуляций не является характерным признаком стадии формирования клеток памяти. CD4⁺-ассоциированный ответ был несколько сильнее, чем для CD8⁺-пула [Bieberich и др., 2021], и мог даже усиливаться с течением времени [Bilich и др., 2021], что может отражать персистентное присутствие антигенов вируса в период восстановления [Yang и др., 2020a]. Формируется пул стволовых клеток памяти, специфичных к SARS-CoV-2 [Jung и др., 2021], а среди CD4⁺ клеток преобладают центральные клетки памяти (с фенотипом CCR7⁺ CD45RA⁻) [Cohen и др., 2021а], что создает предпосылки для длительного сохранения иммунного ответа. Есть надежда, что SARS-CoV-2-специфичные Тклетки будут сохраняться многие годы, хотя это может зависеть от тяжести изначальной инфекции [Wheatley и др., 2021]. В ряде исследований устойчивый иммунитет сохранялся в течение 6 месяцев и дольше [Jung и др., 2021; Zuo и др., 2021]. В то же время проспективные исследования показали некоторую переориентацию специфичности Т-клеток с течением времени [Bilich и др., 2021], и период полуэлиминации вирус-специфичных клеток оценивается на уровне 200 дней [Cohen и др., 2021а]. Долговременный Т-клеточный ответ характерен для фенотипа эффекторных клеток памяти CD45RA⁺ И демонстрирует характерный интерфероновый транскриптом [Adamo и др., 2022].

SARS-CoV-2-специфичные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки памяти составляют около 0,5 и 0,2% от пула всех CD4⁺ и CD8⁺ клеток соответственно [Cohen и др., 2021а], хотя характерной особенностью является гетерогенность между донорами. Широта ответа у отдельных доноров оценивается примерно в 19 и 17 эпитоп-специфических ответов у большинства людей для CD4⁺ и CD8⁺ клеток соответственно [Tarke и др., 2021]. Это дает уверенность в том, что вирусной мутации вряд ли будет достаточно для того, чтобы избежать распознавания Т-клетками.

Большинство Т-клеток в организме представлено как резидентные клетки памяти в тканях, и развитие сторожевых вирус-специфичных пулов памяти в дыхательных путях, вероятно, будет иметь важное значение для защиты от повторного заражения. Количество SARS-CoV-2-специфичных резидентных Т- клеток памяти в легких коррелирует с защитой от повторного заражения [Szabo и др., 2021], а поскольку их можно обнаружить в течение как минимум 10 месяцев после заражения, вероятно, они играют важную роль в ограничении тяжести реинфекции [Grau-Expósito и др., 2021]. Индукция этих клеток после вакцинации в животных моделях также обнадеживает [Routhu и др., 2021].

1.3 Роль главного комплекса гистосовместимости класса 1 в формировании противовирусного иммунитета

Риск летального исхода при инфицировании новой коронавирусной инфекцией повышается в зависимости от ряда факторов, в числе которых возраст, мужской пол (вероятность смерти при заражении коронавирусом выше для мужчин, чем для женщин), индекс массы тела, уровень глюкозы. Тяжелое течение с летальным исходом наиболее часто регистрируют у людей старшей возрастной группы с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, цереброваскулярной патологией и злокачественными новообразованиями. Из всех хронических заболеваний наиболее опасным при COVID-19 является сахарный диабет. На втором месте после диабета по опасности при COVID-19 находятся болезни почек и сердечно-сосудистые заболевания [Wang и др., 2020b].

На характер течения COVID-19 также влияет фактор генетической предрасположенности. Известно, что молекулы ГКГС-I являются одним из ключевых медиаторов первых звеньев в развитии специфического иммунного ответа при COVID-19. Сразу после попадания в клетку SARS-CoV-2 индуцирует трансляцию своих белков. Некоторые из этих белков попадают в протеасомы инфицированной клетки, расщепляются до пептидов длиной 8-12 аминокислотных остатков, так называемых эпитопов, и связываются с молекулами ГКГС-I. Т-клеточные эпитопы могут быть не только чистыми пептидами, но и гаптенами, сахарами и посттрансляционно модифицированными пептидами [Petersen, Purcell, Rossjohn, 2009; Sun и др., 2016]. После связывания комплекс, состоящий из молекулы ГКГС-I и эпитопа, переносится на поверхность инфицированной клетки, где он может взаимодействовать с T-клеточным рецептором CD8⁺ T-лимфоцитов. В ответ на данное взаимодействие зрелый CD8⁺ T-лимфоцит активируется и разрушает

инфицированные клетки с помощью перфоринов и сериновых протеаз [Wherry, Ahmed, 2004].

Существует три гена, кодирующие молекулы ГКГС-I: HLA-A, HLA-B и HLA-С. Каждый из этих генов может быть представлен в геноме человека в двух вариантах – аллелях, унаследованных от родителей. Существуют сотни вариантов каждого аллеля генов ГКГС-I. Молекулы, кодируемые каждым аллелем, обладают индивидуальной способностью распознавать различные чужеродные белки. Распределение аллелей является специфичным для отдельных популяций [Wang и др., 2009]. Комбинации молекул ГКГС-I существенно влияют на тяжесть течения различных инфекционных заболеваний, включая малярию [Lima-Junior, Pratt-Riccio, 2016], туберкулез [Mazzaccaro и др., 1996], СПИД [Goulder, Watkins, 2008] и вирусный гепатит [Wang и др., 2009].

Существуют ряд публикаций, в которых описаны взаимосвязи между генотипом ГКГС-I и чувствительностью к SARS-CoV. В частности известно, что аллели HLA-B*07:03 [Ng и др., 2004], HLA-B*46:01 [Lin и др., 2003] и HLA-C*08:01 [Chen и др., 2006] являются факторами предрасположенности к тяжелой форме заболевания; аллель HLA-C*15:02 ассоциирован с легкой формой [Wang и др., 2011]. В исследовании, проведенном китайскими учеными, было выявлено наличие редкого аллеля HLA-C*07:29 и HLA-B*15:27 у китайских пациентов с COVID-19 [Wang и др., 2020а].

Известна взаимосвязь количества пептидов с высокой аффинностью к индивидуальному набору молекул ГКГС-I: чем больше таких пептидов связываются с ГКГС-I, тем легче течение заболевания. Также было показано, что частота встречаемости аллелей HLA-A*01:01 и HLA-A*02:01 связана с заболеваемостью и смертностью от COVID-19 в различных регионах Италии [Pisanti и др., 2020].

Специфичный CD8⁺ Т-клеточный ответ на эпитоп NP_{105–113} с участием HLA-B*07:02 является наиболее распространенным у лиц, инфицированных SARS-CoV-2, и коррелирует с легким течением болезни [Peng и др., 2022]. Для молекулы ГКГС-I, кодируемой HLA-A*02:01, в 81% случаев обнаруживался эпитоп S₂₆₉₋₂₇₇ [Nielsen и др., 2021]. Также было показано, что среди эпитопов, связывающихся с HLA- A*02:01, _{S1}YLQ более иммуногенный в сравнении с _{S8}RLQ [Shomuradova и др., 2020; Wu и др., 2022].

Влияние различных сочетаний аллелей генов ГКГС-І на течение заболевания, SARS-CoV-2, продемонстрировано вызванного В значительном количестве исследований. При этом очевидно, что сочетание отдельных аллелей. прогностически значимых для оценки риска развития тяжелого течения COVID-19, для разных популяций может отличаться. Практически отсутствуют исследования по влиянию комбинации аллелей генов ГКГС-І для российской популяции, которые бы обеспечивали получение достоверных прогнозных оценок по течению данного заболевания.

Подобное исследование было проведено для испанской популяции. Был разработан способ оценки риска развития тяжелой формы COVID-19 [Iturrieta-Zuazo и др., 2020], включающий забор биологического материала, выделение геномной ДНК с последующим генотипированием аллелей генов HLA-A, HLA-B, HLA-C, обработку результатов генотипирования и прогнозирование риска развития тяжелой формы COVID-19 с высокой вероятностью летального исхода. Данный способ основан на исследовании биологического материала 5 пациентов с легкой формой, 20 пациентов средней тяжести и 20 пациентов с тяжелой формой COVID-19. Выделение геномной ДНК с последующим генотипированием аллелей генов HLA-А, HLA-B, HLA-C было проведено с помощью наборов реагентов RSSOW1A, RSSOW1В и RSSOW1C (One lambda inc) и мультиплексного анализатора FlexMap 3D. Критерии для оценки риска развития тяжелой формы COVID-19 были получены на основе анализа аффинности взаимодействия пептидов вируса SARS-CoV-2 с молекулами ГКГС-І пациента, относящегося к одной из трех групп по тяжести течения заболевания; в случае, если аффинность взаимодействия пептида с одной из молекул ГКГС-І была менее 50 нмоль, то Индекс высокоаффинных пептидов увеличивали на 1; пороговые значения для прогноза риска развития тяжелой формы COVID-19 лля пациентов определяли после определения всех Индекса высокоаффинных пептидов.

Однако к числу недостатков данного способа можно отнести то, что пороговые значения для прогноза риска развития тяжелой формы COVID-19 определялись на основе выборки без учета данных об умерших пациентах. При этом малый объем выборки, использование только качественных, а не количественных характеристик взаимодействия вирусный пептид – молекула ГКГС-I, отсутствие этапа проверки чувствительности и специфичности критериев прогноза риска развития тяжелой форма COVID-19 на контрольной выборке, ставят под сомнение точность и достоверность получаемых прогнозных оценок развития тяжелой формы COVID-19.

1.4 Роль микроРНК в противовирусном иммунитете

МикроРНК являются консервативными эндогенными короткими некодирующими РНК, которые в комплексе с белками-аргонавтами образуют микроРНК-индуцируемый сайленсинг-комплекс (miRISC, от англ. microRNAinduced silencing complex), осуществляющий посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов [Макарова и др., 2015]. Механизм регуляции экспрессии с помощью микроРНК обнаружен у различных эукариот, включая растения, животных и человека [Jungers, Djuranovic, 2022]. При этом микроРНК могут не только участвовать в регуляции экспрессии собственных генов клетки, но и играть роль в противовирусном иммунитете [Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022].

У растений в противовирусном иммунитете участвует как минимум два типа коротких РНК: микроРНК и малые интерферирующие РНК (чтобы не создавать путаницу, будет использоваться сокращение сиРНК, от англ. siRNA, small interfering RNA). МикроРНК закодированы в геноме клетки и транскрибируются РНКполимеразой II в виде молекулы-предшественника, при-микроРНК (от англ. primiRNA или long primary miRNA transcript, то есть длинный первичный микроРНКтранскрипт). При-микроРНК сворачивается в структуру в виде шпильки с неполной комплементарностью, из которой в результате нескольких этапов созревания вырезается зрелая микроРНК, регулирующая экспрессию генов в составе уже miRISC упоминавшегося комплекса (Рисунок 2). При микроРНК этом комплементарно связывается с матричной РНК (мРНК) регулируемого гена преимущественно за счет так называемого seed-региона, включающего нуклеотиды

со 2-й по 7-ю позицию с 5'-конца микроРНК [Komatsu, Kitai, Suzuki, 2023]. В то же время сиРНК вырезается из идеально комплементарной двухцепочечной молекулы РНК, эндогенной или экзогенной для растения, и с мРНК-мишенью также взаимодействует по принципу полной комплементарности. Противовирусные сиРНК могут вырезаться из двухцепочечной РНК вируса при инфекции, что впервые было обнаружено именно у растений, а позже было выявлено и у беспозвоночных животных и млекопитающих [Jin и др., 2022].



Рисунок 2 – Биогенез и функциональная активность микроРНК

Различить некоторые эндогенные сиРНК и микроРНК у растений бывает трудно, поскольку локусы микроРНК могут эволюционно формироваться из локусов сиРНК с наличием промежуточных типов коротких РНК, которые сложно классифицировать [Cui, You, Chen, 2017].

Поскольку сиРНК, вырезаемые из двухцепочечных РНК вируса, меняются одновременно с мутированием вируса, то это не позволяют вирусу уходить от сиРНК-ассоциированного противовирусного иммунитета. В то же время микроРНК, которые потенциально могут связываться с вирусной РНК, закодированы в геноме клетки и сохраняют каноническую последовательность, поэтому мутации генома вируса могут позволить избежать микроРНК-ассоциированного противовирусного иммунитета. В этой связи изучение роли микроРНК в противовирусном иммунитете представляет особый интерес. Регуляция экспрессии вирусных РНК с помощью эндогенных микроРНК изучена у растений значительно хуже, чем у животных [Satish, Mukherjee, Gupta, 2019].

Было показано, что вирусные инфекции могут приводить к повышению или понижению экспрессии ряда микроРНК у растений. Так, заражение вирусом штриховатости риса (RSV, от англ. rice stripe virus) приводило к увеличению уровня микроРНК miR-444, а гиперэкспрессия miR-444 повышала резистентность риса *Oryza sativa* к инфекции RSV, однако механизм такого эффекта связан скорее не с прямым взаимодействием микроРНК и РНК вируса, а с регуляцией специфичных генов противовирусного ответа [Wang и др., 2016]. Аналогичным образом заражение риса RSV приводило к уменьшению уровня свободной miR-528 и повышению активности L-аскорбатоксидазы и антивирусного ответа [Wu и др., 2017]. Растения с повышенной экспрессией osa-miR-171b были более устойчивы к инфекции RSV и имели менее выраженные симптомы инфекции, однако это также было связано с изменением экспрессии ряда эндогенных белков [Tong и др., 2017].

О возможности прямого взаимодействия микроРНК и вирусных РНК у растений известно гораздо меньше, чем об опосредованном влиянии через регуляцию собственных генов клетки. Модифицированный вирус скрытой мозаики сливы, несущий таргетные последовательности для микроРНК miR-171, miR-167 и

miR-159, экспрессированных у *Arabidopsis*, имел сниженную инфективность, а при внесении мутаций в данные таргетные последовательности инфективность снова повышалась [Simón-Mateo, García, 2006]. Были получены растения риса, высокорезистентные к RSV за счет экспрессии искусственной микроPHK на основе osa-miR-528, мишенью которой является ген *MP* RSV [Zhou и др., 2022]. Ряд искусственных микроPHK на основе последовательности растительных микроPHK приводил к повышению резистентности к различным вирусам, в частности, данные эффекты были отмечены для микроPHK *Arabidopsis thaliana* ath-miR-156, ath-miR-157, ath-miR-159a, ath-miR-164, ath-miR-167b, ath-miR-169a, ath-miR-171a, ath-miR-19a, ath-miR-390a, также для микроPHK hvu-miR-171 ячменя обыкновенного, miR-169a, sly-miR-168a, sly-miR-319a, микроPHK кукурузы zma-miR-159a [Satish, Mukherjee, Gupta, 2021].

Для ряда микроРНК животных была отмечена роль в обеспечении противовирусного иммунитета. Так, уровень микроРНК оси-miR-155-5р повышался в печени кроликов при инфицировании вирусом геморрагической болезни кроликов (RHDV, от англ. rabbit hemorrhagic disease virus). При этом повышение, вероятно, вызывал процесс воспаления, а сама микроРНК регулирует экспрессию генов, связанных с острой печеночной недостаточностью и воспалительным ответом [Hukowska-Szematowicz и др., 2020]. Уровень микроРНК miR-155-5р повышался при инфекции вирусом птичьего гриппа и коррелировал с тяжестью симптомов, что может объясняться регуляцией экспрессии генов ответа на инфекцию [Woods и др., 2020]. При инфекции вирусом птичьего гриппа в клетках значительно повышается уровень микроРНК miR-146a, что приводит к подавлению продукции интерферонов и развитию воспаления, а снижение уровня данной микроРНК улучшает противовирусный ответ [Zhang и др., 2019]. Уровень микроРНК miR-145 снижался у свиней при инфекции вирусом гриппа, что приводило к повышению экспрессии гемагглютинина и усилению инфекции [Не и др., 2009]. Уровень микроРНК miR-21-5р повышался в ткани легкого свиней при инфекции вирусом гриппа, что может объясняться ролью данной микроРНК в регуляции процессов созревания

лимфоцитов и вовлечения в иммунный ответ моноцитов, макрофагов, Т-клеток и NK-клеток [Skovgaard и др., 2013].

Указанные примеры провирусных и противовирусных микроРНК у животных описывают регуляцию экспрессии генов клетки хозяина в рамках развития вирусных инфекций. В то же время существуют примеры прямого взаимодействия микроРНК клетки-хозяина с РНК вируса в рамках противовирусного ответа. МикроРНК miR-130 связывается с 5'-нетранслируемой областью генома вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней и ингибирует его репликацию [Li и др., 2015]. МикроРНК miR-181 может ингибировать репликацию этого же вируса свиней как напрямую связываясь с его геномом, так и регулируя внутриклеточный ответ на инфекцию [Guo и др., 2013]. МикроРНК miR-24 и miR-93 связывались с геномом вируса везикулярного стоматита и препятствовали репликации вируса у мышей [Otsuka и др., 2007]. Было показано, что возбудитель вирусной диареи коров (BVDV) содержит в своей РНК сайты связывания с микроРНК miR-17, при этом в данном случае связывание микроРНК с вирусной РНК повышает стабильность последней, а не репрессирует её, как это происходит при классическом взаимодействии [Scheel и др., 2016].

У человека микроРНК также могут оказывать противовирусный или провирусный эффект как за счет регуляции собственных генов клетки-хозяина, так и за счет связывания с вирусным геномом. МикроРНК hsa-miR-199a-3p регулирует множество сигнальных путей в клетке, оказывая противовирусный эффект, например, при инфекции цитомегаловирусом [Santhakumar и др., 2010]. Семейства микроРНК hsa-miR-34, hsa-miR-15 и hsa-miR-517 регулируют сигнальный путь Wnt и интерфероновый ответ, противодействуя флавивирусной инфекции [Smith и др., 2017]. МикроРНК hsa-miR-494-3p стимулирует репликацию энтеровируса 71 за счет подавления экспрессии гена *PTEN* [Zhao и др., 2018]. МикроРНК hsa-miR-296-5p может связываться с вирусным геномом энтеровируса 71, подавляя его репликацию [Zheng и др., 2013]. МикроРНК hsa-miR-142-3p связывается с 3'-нетранслируемой областью РНК генома вируса восточного энцефалита лошадей и также подавляет его репликацию [Trobaugh и др., 2014а]. МикроРНК hsa-miR-323, hsa-miR-491 и hsa-
miR-654 ингибируют вирус гриппа A H1N1 через связывание с вирусным геном *PB1* [Song и др., 2010]. МикроРНК hsa-mir-127-3р, hsa-mir-486-5р и hsa-mir-593-5р также ингибируют репликацию вируса гриппа за счет связывания с его геномом [Peng и др., 2018]. Прямое ингибирование репликации вируса гепатита В было продемонстрировано для микроРНК hsa-let-7, hsa-miR-15a, hsa-miR-16-1, hsa-miR-20a, hsa-miR-92a-1, hsa-miR-122, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-196b, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-205, hsa-miR-210, hsa-miR-345, hsa-miR-433 и hsa-miR-511 за счет связывания с различными генами вируса [Bandopadhyay, Bharadwaj, 2020]. Было показано, что различные изоформы микроРНК hsa-miR-122-5p по-разному взаимодействуют с РНК вируса гепатита С, и ряд изоформ может приводить к стабилизации РНК вируса и усилению инфекции [Yamane и др., 2017].

микроРНК в противовирусном ответе была показана Роль И при коронавирусных инфекциях. При инфицировании кишечных клеток свиньи вирусом трансмиссивного гастроэнтерита свиней происходит изменение экспрессии 65 быть микроРНК, которые могут опосредованно связаны с процессами противовирусного ответа клетки [Ма и др., 2018]. В дендритных клетках птиц при заражении коронавирусом инфекционного бронхита птиц происходило изменение экспрессии 19 микроРНК, которые регулируют экспрессию генов цитоскелета и сигнального пути МАРК [Lin и др., 2019]. У куриных эмбрионов, зараженных вирусом инфекционного бронхита птиц, повышалась экспрессия 13 микроРНК в селезенке и 6 микроРНК в легких, причем для всех микроРНК была предсказана цитокинов возможность регуляции транскрипции продукции вируса, И функционирования лимфоцитов [Кетр и др., 2020]. При инфицировании мышей коронавирусом SARS-CoV в ткани легких происходило изменение экспрессии 30 микроРНК, которые потенциально могут быть связаны с патогенезом вирусной инфекции [Peng и др., 2011а]. Белок нуклеокапсида человеческого коронавируса ОС43 может связываться с hsa-miR-9, способствуя активации NF-кВ [Lai и др., 2014а]. Биоинформатический подход позволил сделать предположение, что уровень микроРНК hsa-miR-335-5p и hsa-miR-26b-5p может меняться под воздействием Sбелка SARS-CoV-2 через воздействие на сигнальный путь ACE/ACE2-ATR1-

37

холестерин-гистоновая деацетилаза (HDAC) [Teodori и др., 2020]. Семейства микроРНК hsa-let-7e/hsa-mir-125a и hsa-mir-141/hsa-miR-200 могут участвовать в регуляции экспрессии генов ACE2 и TMPRSS2, потенциально регулируя чувствительность клеток к вирусу SARS-CoV-2 [Nersisyan и др., 2020]. МикроРНК hsa-miR-214, hsa-miR-98 и hsa-miR-32 потенциально могут подавлять экспрессию *TMPRSS2*, при этом для hsa-miR-32 этот эффект был подтвержден гена экспериментально в человеческих клетках [Kaur и др., 2021]. Была показана роль микроРНК hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-142-3p и hsa-miR-15b-5p как потенциальных участников патогенеза тяжелой формы COVID-19, что может быть связано с регуляцией иммунитета [Tang и др., 2020]. В крови пациентов с COVID-19 происходило изменение уровня 73 микроРНК, которые также могут быть связаны с регуляцией иммунного ответа [Li и др., 2020а]. Однако все перечисленные примеры роли микроРНК в противовирусном иммунитете связаны с регуляцией собственных генов клеток-хозяев в ответ на вирусную инфекцию или для борьбы с ней. В то же время существуют примеры прямого взаимодействия микроРНК с геномом коронавирусов.

Биоинформатический анализ указывает, что 288 микроРНК человека потенциально могут связываться с геномом вируса SARS-CoV-2 [Pierce и др., 2020]. В другом исследовании среди 160 микроРНК, seed-регионы которых идеально соответствуют вирусной РНК SARS-CoV-2, для 15 микроРНК наблюдалось более 3 сайтов связывания, а для 12 микроРНК свободная энергия связывания составляла -29 ккал/моль, что указывает на сильную связь. Наибольшее число сайтов связывания наблюдалось для семейства hsa-miR-29 [Jafarinejad-Farsangi и др., 2020]. Анализ профилей связывания человеческих микроРНК с 67 различными геномами SARS-CoV-2 из 24 разных стран с нормализацией на число смертей в этих странах выявил несколько кластеров микроРНК, связанных с повышенной частотой смертей. Всего в этой работе биоинформатически была предсказана возможность связывания 122 и 106 микроРНК человека с генами референсных штаммов вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 соответственно, из которых 27 микроРНК потенциально могут связываться с обоими вирусами [Khan и др., 2020]. В другом исследовании было выявлено 34 микроРНК, которые могут связываться с плюс-цепью SARS-CoV-2, и 45 микроРНК для минус-цепи [Guterres и др., 2020]. После биоинформатического предсказания и экспериментальной валидации выяснилось, что микроРНК hsa-miR-219a-2-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-378d, hsa-miR-29a-3p и hsa-miR-15b-5p могут связываться с PHK SARS-CoV-2 и регулировать экспрессию генов вируса [Siniscalchi и др., 2021]. Была создана база данных miRCOVID-19, описывающая потенциальные взаимодействия человеческих микроРНК с генами SARS-CoV-2 [Alam, Lipovich, 2021].

Мутации в новых штаммах коронавируса SARS-CoV-2 потенциально могут приводить к исчезновению сайтов связывания микроРНК человека, позволяя избежать иммунного ответа. При анализе 24 различных штаммов SARS-CoV-2 было выявлено, что большинство противовирусных микроРНК могут связываться со всеми из изученных в исследовании штаммами, однако для 24 микроРНК были выявлены различные паттерны связывания в зависимости от мутаций в штаммах [Khan и др., 2020]. Мутации в ряде штаммов приводили к потере 3 из 10 сайтов связывания микроРНК в геноме SARS-CoV-2, в частности, для микроРНК hsa-miR-197-5р [Hosseini Rad SM, McLellan, 2020]. Напротив, одна из мутаций SARS-CoV-2 может улучшать связывание с микроРНК hsa-miR-3620-3p, что может объяснять снижение трансмиссивности вируса [Haddad, Walid Al-Zyoud, 2020]. Также ряд мутаций в геноме SARS-CoV-2 приводил к появлению сайтов связывания микроРНК hsa-miR-143-5р и hsa-miR-570-5р с повышенной аффинностью, причем в данном случае микроРНК могли не регулировать репликацию вируса, но при этом связывание этих микроРНК с РНК SARS-CoV-2 приводило к изменению экспрессии генов клетки-хозяина и развитию более тяжелого воспалительного ответа [Zhang и др., 2022]. Такое явление, как отвлечение собственных микроРНК клетки от геновмишеней за счет связывания с РНК вируса, в ряде статей было названо «эффектом губки», что может служить одним из механизмов избегания иммунного ответа вирусом SARC-CoV-2 [Bartoszewski и др., 2020; Li и др., 2022].

Таким образом, потенциальные противовирусные свойства микроРНК были показаны для различных эукариотических организмов, от растений до животных и

человека. При вирусном заражении микроРНК могут регулировать экспрессию собственных генов клетки, увеличивая или уменьшая восприимчивость к инфекции. В то же время отдельного внимания заслуживает непосредственное связывание микроРНК человека с вирусной РНК. Для коронавируса SARS-CoV-2 была предсказана и экспериментально подтверждена возможность регуляции экспрессии генов вируса за счет связывания с микроРНК клетки-хозяина. При этом мутации, возникающие в различных штаммах вируса, могут приводить как к исчезновению сайтов связывания микроРНК, так и к появлению новых сайтов связывания. Благодаря этому вирус может избегать регуляции с помощью микроРНК или наоборот связывать микроРНК клетки хозяина, отвлекая их от регуляции внутриклеточных процессов.

1.5 Молекулярно-генетические особенности SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 является вирусом, геном которого закодирован положительной цепью PHK и содержит 14 открытых рамок считывания (ORF, от англ. open reading frame). Две трети последовательности генома с 5'-конца занимают открытые рамки считывания ORF1a и ORF1b, которые транслируются рибосомами клетки хозяина в два полипротеина, pp1a и pp1ab [Arya и др., 2021]. После этого полипротеины подвергаются процессингу с участием двух вирусных протеаз, папаиноподобной протеазы (PLpro, от англ. Papain-like protease) и главной протеазы (Mpro, от англ. Main protease), с образованием шестнадцати неструктурных белков (NSP, от англ. Nonstructural protein), NSP1–NSP16 [Yan и др., 2022]. Совместно данные белки образуют так называемый репликационно-трансляционный комплекс [Mohan, Wollert, 2021].

Среди неструктурных белков наибольшее внимание с точки зрения изучения функции и разработки лекарств привлекают NSP3, NSP5 и NSP12, которые кодируют соответственно PLpro, Mpro и PHK-зависимую PHK-полимеразу, которая с кофакторами NSP7/8 обеспечивает репликацию и транскрипцию [Naidu и др., 2021; Shin и др., 2020; Yan и др., 2021]. Отмечено, что вариабельность последовательности NSP3 является самой высокой среди неструктурных белков, и у вариантов SARS-CoV-2, вызывающих настороженность, практически отсутствуют одинаковые

40

мутации NSP3 [Sun и др., 2022]. Также NSP3 может ингибировать продукцию интерферонов и нарушать противовирусный иммунный ответ [Low и др., 2022]. NSP5 имеет более консервативную последовательность, причем последовательность NSP5 совпадает на 96% между SARS-CoV и SARS-CoV-2, и оба белка ингибируют выработку интерферонов [Wu и др., 2020с]. Для NSP12 помимо основной функции также отмечена возможность ослабления интерферонового ответа [Yuen и др., 2020].

NSP1 является высококонсервативным белком, участвующим в уклонении от иммунной системы и ингибировании трансляции. NSP1 взаимодействует с малой субъединицей рибосомы, выступая ингибитором трансляции [Schubert и др., 2020], а также взаимодействует с комплексом NXF1-NXT1, участвующем в экспорте мРНК из ядра [Zhang и др., 2021с]. Также NSP1 способствует разрезанию мРНК клеткихозяина через привлечение экзонуклеаз, таких как Xrn1 [Gaglia и др., 2012]. NSP1 влияет на сигнальный путь интерферона альфа через ослабление фосфорилирования STAT1 и STAT2, что препятствует их транслокации в ядро [Lei и др., 2020]. Влияние на трансляцию также снижает уровень интерферона бета, интерферона лямбда-1 и других элементов иммунного ответа [Banerjee и др., 2020a]. NSP2 тоже участвует в регуляции интерферонового ответа, а также вносит вклад развитие В воспалительного ответа [Lacasse и др., 2023].

NSP6 является трансмембранным белком, который взаимодействует с NSP3 и NSP4 и способствует образованию двухмембранных везикул в инфицированных клетках, являющихся основой репликационно-транскрипционных комплексов или репликационных органелл, а также блокирует формирование везикул аутофагосом/аутолизосом [Gordon и др., 2020b]. С другой стороны, NSP6 стимулирует аутофагию через путь омегасом для сборки репликазных белков и деградации иммуномодулирующих белков [Cottam и др., 2020].

NSP7 и NSP8, как уже было сказано, являются кофакторами РНК-зависимой РНК-полимеразы и формируют димерные, линейные гетеротетрамерные или кубические гетеротетрамерные конформации [Courouble и др., 2021]. При этом NSP7

также подавляет путь интерферона альфа [Lei и др., 2020], а NSP8 разрушает комплексы MDA5–MAVS, ингибируя противовирусный ответ [Yang и др., 2020b].

NSP9 образует димеры, формирующие РНК-связывающий сайт И участвующие в вирусной репликации [El-Kamand и др., 2022]. NSP9 также связывается с NSP12 в репликационно-транскрипционном комплексе, привлекая к взаимодействию NSP10 и NSP14 [Littler и др., 2020]. Также NSP9 подавляет транспорт мембранных белков и снижает интерфероновый ответ [Banerjee и др., 2020a]. NSP10 является высококонсервативным белком и уникален для коронавирусов, при этом аналоги этого белка у прокариот и эукариот неизвестны [Rogstam и др., 2020]. NSP10 взаимодействует с экзорибонуклеазой NSP14 [Krafcikova и др., 2020] и метилтрансферазой NSP16 [Vithani и др., 2021]. NSP13 является РНК-трифосфатазой или хеликазой и совместно с NSP10, NSP14 и NSP16 участвует в эффективном образовании кэпа мРНК SARS-CoV-2 [Newman и др., 2021]. NSP14 обладает экзонуклеазной и метилтрансферазной активностью [Yuen и др., 2020]. Одной из функций NSP14 является проверка и удаление ошибок, вносимых РНК-зависимой РНК-полимеразой, и экзонуклеазная активность усиливается при взаимодействии с NSP10 [Ма и др., 2015]. NSP13 также участвует в процессе метилирования и образовании кэпа совместно с NSP12, NSP14 и NSP16 [Low и др., 2022]. NSP15 является важным ферментов, участвующим в процессинге РНК при вирусной репликации [Yoshimoto, 2021].

Оставшаяся часть генома SARS-CoV-2 экспрессируется с участием PHKзависимой PHK-полимеразы вируса, которая также участвует в репликации вирусного генома. Образующиеся субгеномные PHK используют системы транскрипции и трансляции клетки-хозяина для производства четырех структурных белков: S-белок (от англ. Spike – шип), M-белок (от англ. Membrane – мембрана), Eбелок (от англ. Envelope – оболочка) и N-белок (от англ. Nucleocapsid – нуклеокапсид), а также несколько вспомогательных белков, ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c и ORF10 [Redondo и др., 2021]. Эти вспомогательные белки считаются антагонистами интерферонов и играют важную роль в патогенезе COVID-19 [Hassan и др., 2022]. Также вспомогательные белки опосредованно подавляют иммунный ответ через влияние на созревание РНК, трансляцию мРНК, транспорт белков и внутриядерный транспорт [Zandi и др., 2022].

N-белок SARS-CoV-2 участвует в упаковке геномной РНК вируса в спиральную структуру и взаимодействует с М-белком для сборки и созревания вирионов [Ваі и др., 2021]. При этом М-белок – это самый представленный структурный белок SARS-CoV-2, играющий центральную роль в сборке вириона и взаимодействующий со всеми остальными структурными белками [Китаг и др., 2023]. Е-белок – самый маленький структурный белок, который участвует в сборке вирионов, отщеплении вирусных частиц от клеточной мембраны, а также может собираться в пентамеры и образовывать каналы в клеточной мембране [Zhou и др., 2023].

S-белок заключен в мембрану вируса в форме гликопротеина и формирует гомотримеры, непосредственно участвующие в узнавании рецептора ACE2 на поверхности клетки и проникновении в клетку. На один тример приходится 66 Nсвязанных гликанов [Watanabe и др., 2020]. При синтезе S-белка SARS-CoV-2 в клетке-хозяине происходит разрезание белка между субъединицами S1 и S2 внутриклеточными протеазами, такими как фурин [Hoffmann, Kleine-Weber, Pöhlmann, 2020]. Таким образом, S-белок зрелого вириона SARS-CoV-2 состоит из нековалентно связанных субъединиц S1 и S2. При этом S1 несет рецепторсвязывающий домен (RBD), узнающий ACE2, а S2 заякоривает комплекс в мембране вируса и содержит так называемый пептид слияния или фьюжн-пептид, необходимый для слияния мембраны вируса с мембраной клетки-хозяина при заражении [Shang и др., 2020].

До слияния с клеткой-хозяином S1 субъединица уложена таким образом, что формирует 4 домена: N-концевой домен (NTD, от англ. N-terminal domain), рецепторсвязывающий домен (RBD, от англ. Receptor-binding domain) и два С-концевых домена (CTD1 и CTD2, от англ. C-terminal domain). При этом домены S1 субъединицы окружают S2 субъединицу в свернутой конформации, характерной для вириона до слияния с клеткой-хозяином. Три RBD в составе гомотримера формируют верхушку шипа SARS-CoV-2, для которой характерны две конформации, открытая и закрытая (в английской литературе «up» и «down») [Cai и др., 2020].

NTD состоит из четырех бета-складчатых слоев, соединенных гибкими петлями. Остается слабоизученным, играет ли NTD какую-то функциональную роль, однако ряд сильных нейтрализующих антител направлен именно против NTD, что позволяет предположить его роль в осуществлении функции шипа или поддержании его необходимой структуры [Liu и др., 2020].

RBD имеет два субдомена: ядерную структуру из пяти антипараллельных бета-слоев, прикрытых короткими соединяющими альфа-спиралями, И называемую рецептор-связывающим выступающую петлю, мотивом И связывающуюся с ACE2 [Lan и др., 2020]. В закрытой конформации S-тримера до слияния каждый RBD находится в согнутой конформации, прилегая к CTD1 того же протомера и NTD соседнего протомера, а рецептор-связывающий мотив недоступен для взаимодействия с АСЕ2. При переходе в открытую конформацию как минимум один RBD оказывается в приподнятом состоянии, обнажая рецептор-связывающий мотив для взаимодействия с ACE2 [Wells и др., 2021].

СТD1 и 2 состоят преимущественно из бета-слоев. RBD выглядит как вставка между двумя антипараллельными бета-слоями CTD1, а CTD1 выглядит как вставка между двумя антипараллельными бета-слоями CTD2. При переходе RBD в открытую конформацию и обратно происходит вращательное движение CTD1. CTD1 также соединяет RBD с проксимальным участком фьюжн-пептида [Cai и др., 2020]. В CTD2 находится участок разрезания фурином на границе S1 и S2 [Zhang и др., 2021b].

S2 субъединица может находится в конформации до слияния и после слияния. Клеточные протеазы могу разрезать S2 субъединицу, стимулируя переход между двумя конформациями, в результате чего фьюжн-пептид способствует слиянию мембраны вируса и клетки-хозяина [Fan и др., 2020]. Разрезание возможно на поверхности клетки с участием трансмембранной сериновой протеазы TMPRSS2 и других протеаз, таких как TMPRSS4, TMPRSS11A, TMPRSS11E, матриптаза, трипсиноподобная протеаза дыхательных путей человека (HAT), эластаза [Laporte, Naesens, 2017], а также в поздних эндолизосомах катепсинами, особенно катепсином L [Hoffmann и др., 2020а].

Со времени обнаружения вируса SARS-CoV-2 наблюдается постоянное изменение его генома за счет возникающих мутаций, что может приводить к изменению последовательности белков и уклонению от иммунитета, а также изменению трансмиссивности, патогенности и других свойств вируса [Ghosh, Nandi, Saha, 2022]. Поскольку SARS-CoV-2 является РНК-содержащим вирусом, он использует для копирования собственного генома РНК-зависимую РНК-полимеразу, для которой характерна относительно высокая частота ошибок, что и приводит к высокой скорости возникновения мутаций [Pachetti и др., 2020]. Вирусная 3'экзонуклеаза nsp14 должна предотвращать накопление мутантных РНК вируса, однако она не может полностью исключить процесс образования новых штаммов [Hsu и др., 2021]. Начальная эволюция SARS-CoV-2 происходила в природных резервуарах, вероятнее всего, в летучих мышах, где могла происходить рекомбинация с другими вирусами и накопление адаптивных мутаций, которые в дальнейшем позволили вирусу успешно распространиться в человеческих популяциях [MacLean и др., 2021]. При попадании в человеческий организм вирус стал адаптироваться к новым условиям, в частности, стала происходить селекция штаммов, которые более эффективно взаимодействуют с протеазами человеческой клетки, что наблюдалось для трансмембранной сериновой протеазы TMPRSS2 и фурина [Banerjee, Mossman, Grandvaux, 2021]. Также было показано, что у пациентов с иммуносупрессией, которым вводили плазму людей, выздоровевших от COVID-19, происходила селекция и ускоренная эволюция штаммов SARS-CoV-2 с пониженной чувствительностью к нейтрализующим антителам [Кетр и др., 2021].

В то время как репликационные ошибки приводят к небольшим изменениям генома, рекомбинация может приводить к более выраженным мутациям SARS-CoV-2. Прерывистый процесс транскрипции может вести к тому, что PHK-зависимая PHK-полимераза SARS-CoV-2 может сменить реплицируемую цепь PHK в процессе транскрипции и продолжить синтезировать химерную последовательность PHK. В случае заражения клетки более чем одним видом или вариантом коронавируса могут образовываться химерные РНК из двух и более вирусов, что вызывает резкие изменения генома в отличие от точечных мутаций [Wang и др., 2021a].

Также изменения генома SARS-CoV-2 могут происходить за счет механизма гомологичной рекомбинации, когда молекулы РНК с участками с высокой степенью схожести обмениваются частью последовательности. Гомологичная рекомбинация типична для бета-коронавирусов человека [Pollett и др., 2021], а для SARS-CoV-2 могла происходить еще в организме летучих мышей или других животных [Boni и др., 2020].

Появление точечных мутаций и/или вставок/делеций может приводить к изменению свойств вируса. Так, усиление трансмиссивности вируса связывают с мутациями в белке нуклеокапсида R203M [Syed и др., 2021] и R203K/G204R [Wu и др., 2021] и в S-белке N501Y [Liu и др., 2022], D614G [Korber и др., 2020; Ozono и др., 2021] и P681R [Saito и др., 2022]. Также за счет мутаций вирус может избегать иммунного ответа, например, мутации E484K, K417T и делеция H69/V70 в S-белке закрепились в ряде штаммов за счет снижения эффективности иммунного ответа организма человека на эти новые генетические варианты [Chen и др., 2021; Cho и др., 2021; Gaebler и др., 2021; Wang и др., 2021b].

1.6 Факторы прогноза тяжести течения COVID-19

Течение и исход COVID-19 зависят от различных факторов, включая возраст, пол, генетические особенности и сопутствующие заболевания [Белоцерковская, Романовских, Смирнов, 2020; Демидова и др., 2021; Драпкина и др., 2020; Насонов, 2020b; Sonnweber и др., 2023]. Понимание влияния каждого фактора риска на прогрессирование заболевания и смертность от него позволяет определить дальнейший выбор тактики лечения, сделать прогноз течения, а также улучшить понимание патогенеза заболевания [Kowsar и др., 2023; Russell, Lone, Baillie, 2023; Wu и др., 2020b].

Выделяют четыре степени тяжести заболевания, вызванного SARS-CoV-2: лёгкое течение, среднетяжёлое, тяжёлое и крайне тяжёлое [Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», 2022]. Важно отметить, что COVID-19 имеет три фазы,

которые классифицируются как острое вирусное заболевание, иммуноопосредованное воспалительное поражение легких и пост-острые последствия COVID-19 (Post-acute sequelae of COVID-19 – PASC).

1) Раннее вирусное заболевание: репликация вируса максимальна в верхних дыхательных путях; нарушения оксигенации легких нет. Симптомы: лихорадка, недомоганием, миалгия, кишечные симптомы и симптомы со стороны верхних дыхательных путей.

2) Воспалительное поражение легких: происходит иммунно-опосредованное повреждение легких (вызванное моноцитами/макрофагами). Симптомы: одышка, кашель и гипоксическая дыхательная недостаточностью. Как правило, на этой стадии организм чувствителен к противовоспалительной терапии (дексаметазон, блокаторы рецепторов интерлейкина-6, ингибиторы янус-киназ).

3) Пост-острые последствия. Эта фаза связана с изнурительными длительными симптомами: утомляемость, нейрокогнитивные нарушения и респираторные симптомами. Характерным признаком является неразрешающееся воспаление.

Пациенты на каждой стадии заболевания по-разному реагируют на терапию, что обусловлено различиями в молекулярно-биологических механизмах, лежащих в их основе. Наличие сопутствующих заболеваний было признано фактором риска с первых дней пандемии. Но установление причинно-следственной связи и определение лежащих в основе механизмов и клинических последствий было и является в настоящее время сложной задачей из-за множества смешанных факторов [Altschul и др., 2020; Russell, Lone, Baillie, 2023].

Исследования и обзоры, имеющиеся на данный момент, определяют факторы высокой исходной уязвимости человека к коронавирусной инфекции, а также усугубляющие течение болезни. Показано, что худший прогноз течения COVID-19 имеют лица мужского пола старше 60 лет с хроническими заболеваниями, такими как диабет (СД), гипертония (АГ), сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), респираторные заболевания и злокачественные новообразования [Aggarwal и др., 2020; Zeltyn-Abramov и др., 2021].

Повышенный индекс массы тела (ИМТ; более 40 кг/м²) и сопутствующие заболевания связаны с более высоким риском смерти, связанной с COVID-19: диабет (более высокий коэффициент риска для лиц с недавно измеренным уровнем гликированного гемоглобина (HbA1c) не менее 58 ммоль/моль), тяжелая форма астмы (определяемая как астма на фоне недавнего приема пероральных заболевания, кортикостероидов), респираторные хронические сердечные заболевания, заболевания печени, инсульт, деменция, другие неврологические заболевания, снижение функции почек (более высокий коэффициент риска связан с более низкой расчетной скоростью клубочковой фильтрации), аутоиммунные заболевания (ревматоидный артрит, волчанка или псориаз) И другие иммунодепрессивные состояния. У лиц с недавним (т.е. за последние пять лет) гематологическим злокачественным новообразованием в анамнезе риск был повышен как минимум в 2,5 раза. Для других видов рака отношение шансов было меньше. Наличие в анамнезе диализа или терминальной стадии почечной недостаточности ассоциировалось также с повышенным риском крайне тяжёлого течения COVID-19 [Wu и др., 2020а].

1.6.1 Демографические факторы риска

Пожилой возраст связан с риском тяжёлого течения и дальнейшего летального исхода COVID-19 [Глыбочко и др., 2020b; Насонов и др., 2021; Старшинова и др., 2020; Wu и др., 2020a]. В соответствии с исследованиями основная часть диагностированных случаев приходилась на возрастную группу от 25 до 60 лет, в то время как большинство госпитализированных случаев приходилось на возрастную группу от 60 до 80 лет [Kostka и др., 2022]. Не выжившие были старше, чем выжившие (76,5 против 46,6 лет), выжившие в отделении интенсивной терапии были младше, чем не выжившие в отделении интенсивной терапии (43,6 против 70,7 лет) [Zhou и др., 2020a; Kowsar и др., 2023].

Согласно данным, основанным на исследованиях когорт пациентов (самая большая когорта включала 4,5 миллиона пациентов) [Kostka и др., 2022], среди общего числа людей с подтверждённым диагнозом COVID-19 доля госпитализированных мужчин больше доли госпитализированных женщин [Deng и

др., 2020; Gajovic и др., 2023]. Среди умерших пациентов процент мужчин составляет 60% [Takahashi и др., 2020; Tian и др., 2020]. Предполагаемыми причинами такого соотношения являются различия во врождённых иммунных реакциях мужчин и женщин, а также уровне эстрогена [Gagliardi и др., 2020; Takahashi и др., 2020; Viveiros и др., 2021; Yildirim и др., 2021].

1.6.2 Метаболические заболевания

Метаболические заболевания, включая дислипидемию, ожирение и сахарный диабет, являются хорошо известными факторами риска тяжелого течения COVID-19 [Sonnweber и др., 2023].

При острой инфекции SARS-CoV-2 сообщалось о быстрых изменениях уровня липидов в крови [Демидова, Волкова, Грицкевич, 2020; Петриков и др., 2020; Tall, Yvan-Charvet, 2015]. Потенциальные механизмы, объясняющие скачки липидов, включают снижение синтеза липидов во время чрезмерного воспаления и дисфункцию печени. Низкий уровень холестерина ЛПВП или нарушение его поглощения надпочечниками может привести к снижению уровня кортикостероидов и повышению уровня смертности.

У пациентов с метаболическими заболеваниями, как правило, был более высокий уровень провоспалительных биомаркеров и маркеров системного воспаления (ИЛ-6, С-реактивный белок (СРБ), сывороточный ферритин и d-димер, а коррелирующие с также адипонектин), экспрессией адипоцитокинов И концентрацией липидов в крови. Недавний комплексный обзор показал, что дислипидемия в анамнезе является фактором риска тяжелого течения острого COVID-19, а острая инфекция SARS-CoV-2 изменяет метаболизм липидов и концентрации ЛПВП и ЛПНП обратно пропорциональны тяжести течения COVID-19 [Choi, Kim, Kang, 2020]. Гипертриглицеридемия может вызывать апоптоз макрофагов и эндотелиальных клеток человека, что может иметь решающее значение для исхода COVID-19 [Wehinger и др., 2007]. Согласно данным клинических исследований, дислипидемия связана с повышением маркеров тромбоза и тенденцией к более тяжелым структурным нарушениям в лёгких в раннем послеостром периоде наблюдения.

1.6.2.1 Генетические факторы

Хотя установленные факторы риска коррелируют с тяжестью заболевания, сами по себе факторы риска не объясняют, почему у некоторых молодых здоровых людей развиваются тяжелые или крайне тяжелые формы COVID-19 [Gupta и др., 2022]. Подобные случаи могут быть обусловлены генетическими факторами, объясняющими индивидуальные различия в восприимчивости к SARS-CoV-2 и тяжести течения COVID-19 [COVID-19 Host Genetics Initiative и др., 2021]. Несколько полногеномных исследований ассоциаций (GWAS) были проведены в различных этнических популяциях. Они позволили выявить потенциальные геномные повышенным маркеры, связанные с риском заражения И прогрессированием до тяжелых клинических проявлений [The Severe Covid-19 GWAS Group, 2020; Wang и др., 2020с]. Были выявлены статистически значимые ассоциации между полиморфизмами ACE1 I/D rs1799752/rs4646994, APOE rs429358, CCR5 rs333 и IFITM3 rs12252 и восприимчивостью к инфекции SARS-CoV-2. Также было обнаружено, что полиморфизмы ACE2 rs2285666, ACE2 rs2106809, ACE2 rs5186 и TNFA rs1800629 связаны с повышенным риском rs2074192, AGTR1 развития тяжелых проявлений заболевания [Gupta и др., 2022].

Клиническое инфекции SARS-CoV-2 течение сильно зависит OT взаимоотношений между вирусом и иммунной системой хозяина. В данном взаимодействии центральную роль играет молекула ГКГС пациента. Генетическое разнообразие пациентов может помочь объяснить множественность вариантов иммунных реакций на вирус. Знание того, как различия ГКГС могут повлиять на прогрессирование COVID-19, может помочь выявлять людей с более высоким риском заболевания [Tavasolian и др., 2021]. Гены ГКГС являются наиболее полиморфными в геномоме человека. На сегодняшний день идентифицировано более 30 000 аллелей генов ГКГС, которые кодируют более 18 000 уникальных белков [Robinson и др., 2015]. Большинство нуклеотидных замен в аллелях генов ГКГС сосредоточено в экзонах, кодирующих пептидсвязывающую бороздку и область взаимодействия с Т-клеточными рецепторами [Augusto, Hollenbach, 2022]. Интенсивность и характер клеточного иммунного ответа на инфекцию SARS-CoV-2

обусловлены разнообразием как репертуара Т-клеточных рецепторов, так и генотипом ГКГС-І. Клетки млекопитающих экспрессируют до шести различных аллелей генов ГКГС-І, которые определяют презентацию антигенов при заболевании, а вместе с тем и восприимчивостью к заболеванию и исход вирусных инфекций. В ряде исследований была продемонстрировано, что аллели HLA-A*01:01, HLA-A*11:01, B*51:01 и C*14:02 были значительно более распространены у пациентов с тяжелой и критической степенью течения заболевания по сравнению с пациентами с легкой и средней степенью тяжести [Shkurnikov и др., 2021; Wang и др., 2020с]. По данным исследования, наличие аллеля HLA-A*01:01 может быть связано с более низким CD8⁺ Т-клеточным ответом [Olafsdottir и др., 2022].

Проведенный анализ отечественных и зарубежных литературных источников показал, что к настоящему моменту имеется большое количество научных сведений, касающихся эпидемиологии, патогенеза, популяционных факторов прогноза предрасположенности и тяжести течения новой коронавирусной инфекции COVID-19, вызванной SARS-CoV-2. При этом практически отсутствуют исследования, посвященные разработке подходов к прогнозу тяжести течения COVID-19 у отдельного человека, что обосновывает актуальность и своевременность проведения настоящего исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Программа исследования

В настоящем диссертационном исследовании применен комплексный подход к решению проблемы стратификации пациентов по группам риска тяжести течения острой коронавирусной инфекции COVID-19 в зависимости от генетических особенностей пациента и вызвавшего заболевание варианта вируса SARS-CoV-2. Концептуальной основой методики данного исследования является монографический подход, согласно которому было произведено подробное описание методических основ оценки тяжести течения COVID-19 в зависимости от ГКГС-I, варианта вируса SARS-CoV-2. генотипа Также в исследовании представлены результаты оценки диагностической значимости предложенного подхода, оценен вклад микроРНК в патогенез COVID-19.

Период проведения исследования затронул первую, третью и четвертую волны пандемии, пришедшиеся на период с марта 2020 года по декабрь 2022 года. Беспрецедентный масштаб пандемии привел к тому, что в мировом научном сообществе был накоплен огромный массив информации об эволюции генома SARS-CoV-2, были оптимизированы и разработаны новые подходы к классификации вируса, предприняты попытки выявить генетические детерминанты восприимчивости человека к вирусу SARS-CoV-2, установлены закономерности формирования иммунитета к нему. Однако, в значительной степени эти усилия базировались на использовании научного аппарата «докомпьютерной эры».

Возникла насущная потребность в разработке методик использования генетической информации о пациентах и огромных массивов данных о геноме вируса для прогноза тяжести течения COVID-19 и продолжительности иммунитета у переболевших и вакцинированных пациентов с применением современных методов компьютерного моделирования и математического анализа.

В рамках настоящей диссертации была разработана комплексная методика, позволившая изучить особенности течения COVID-19 в зависимости от генотипа ГКГС-I, выявить иммунодоминантные эпитопы вируса, оценить их стабильность,

продемонстрировать влияние микроРНК альвеоцитов человека на геном SARS-CoV-2, разработать программное обеспечение для прогноза тяжести течения COVID-19 и клинические рекомендации по его применению, достичь поставленной цели и решить задачи исследования. Программа исследования предусматривала выбор его объектов в зависимости от задач и этапов его проведения, обоснование единиц и объема необходимых наблюдений, разработку программ наблюдения и соответствующих им методов.

Объектом исследования на разных этапах явились: пациенты с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 и её основным осложнением – вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2; их генотипы ГКГС-I; законченные случаи их лечения в условиях стационара; последовательности генома SARS-CoV-2; профиль микроРНК ткани лёгких и плазмы крови.

Предметом исследования явились:

– генотипы ГКГС-І и клиническая характеристика пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, и наличие у них конкурирующей патологии;

- исходы госпитализации при вирусной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2;

– результаты компьютерного моделирования взаимодействия пептидов вируса SARS-CoV-2 с различными аллельными вариантами молекул ГКГС-I;

– интенсивность Т-клеточного ответа в ответ на стимуляцию различными пептидами SARS-CoV-2;

- геном различных вариантов вируса SARS-CoV-2;

– экспрессия микроРНК в ткани лёгких, представленность микроРНК в плазме крови.

В исследовании были использованы сплошной и выборочный способы проведения наблюдения. Предусматривалось использование методов статистического анализа, математического моделирования, клинического обследования, секвенирования следующего поколения, генотипирования ГКГС-I, оценки Т-клеточного ответа.

Обработка собранного первичного материала, а также математикостатистический анализ полученных результатов осуществлялись в среде для математического анализа R версий 3.6.3 – 4.2.2 с использованием следующих пакетов: readr, dplyr, reshape2, ggpubr, stringr, ComplexHeatmap, pheatmap, ROCit и иных связанных пакетов.

Протокол клинического исследования одобрен локальным этическим комитетом РНИМУ им. Пирогова (протокол от 16.03.2020 № 2020/07) и независимым этическим комитетом ГКБ №15 им. Филатова ДЗМ (протокол от 25.06.2021 № 237). Программа настоящего исследования и этапы его проведения представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Программа исследования

Этап	Задачи этапа	Единица	Методы сбора	Источник информации	Метод
исследо-		наблюдения	первичных		исследования
вания			материалов и их		
			объем		
I этап	Анализ отечественных и	Литературный	Отбор 299	РИНЦ, PubMed	Изучения и
	зарубежных литературных	источник	литературных		обобщения
	источников по теме исследования,		источников, в том		опыта.
	обобщение материала, разработка		числе 23		Аналитический
	программы исследования		отечественных и		
			276 зарубежный		
			источник		
II этап	Изучение взаимосвязи генотипа	Законченный	Выборочный	Карта выкопировки	Статистический
	ГКГС-I с тяжестью COVID-19	случай	метод.	данных из формы №	Секвенирование
	Оценка клинической значимости	госпитализации	111 законченных	003/у «Медицинская	генов ГКГС-І
	генотипа ГКГС-І при прогнозе		случаев	карта стационарного	Сравнительного
	тяжести течения COVID-19		госпитализации	больного», образцы	анализа
				периферической крови	Аналитический
				пациентов	

Продолжение Таблицы 1

III этап	Изучение взаимосвязи прогноза	Законченный	Выборочный	Карта выкопировки	Статистический
	течения COVID-19 с мутациями	случай	метод.	данных из формы №	Секвенирование
	белка NS8 SARS-CoV-2 в	госпитализации	45 законченных	003/у «Медицинская	генов ГКГС-І
	зависимости от штаммовой		случаев	карта стационарного	Секвенирование
	принадлежности вируса		госпитализации	больного», образцы	SARS-CoV-2
				периферической крови	Сравнительного
				пациентов, мазки из	анализа
				носо- и ротоглотки	Аналитический
IV этап	Изучение особенностей генотипа	Законченный	Выборочный	Карта выкопировки	Статистический
	ГКГС-І пациентов в первую и	случай	метод.	данных из формы №	Секвенирование
	третью волну COVID-19	госпитализации	147 пациентов	003/у «Медицинская	генов ГКГС-І
			первой волны	карта стационарного	Сравнительного
			COVID-19.	больного», образцы	анализа
			219 пациентов	периферической крови	Аналитический
			третьей волны	пациентов	
			COVID-19		
			428 здоровых		
			добровольцев		
			(контрольная		
			группа)		

Продолжение Таблицы 1

V этап	Изучение особенностей презентации	Первичная	Выборочный	База данных GISAID	Статистический
	пептидов вариантов Омикрон ВА.1-	последовательнос	метод.		Сравнительного
	BA.5 вируса SARS-CoV-2	ть белков	6 первичных		анализа
	молекулами ГКГС	варианта SARS-	последовательнос		Аналитический
		CoV-2	тей		
VI этап	Оценка влияния мутаций на	Первичная	Выборочный	Клинический анамнез,	Статистический
	иммунодоминантные эпитопы	последовательнос	метод.	результаты ELISpot,	Секвенирование
	вируса SARS-CoV-2	ть белков	47 пептидов	образцы периферической	генов ГКГС-І
		варианта SARS-	SARS-CoV-2.	крови пациентов	ИФА
		CoV-2	Т-лимфоциты 133		Сравнительного
		Законченный	пациентов,		анализа
		случай COVID-19	переболевших		Аналитический
			COVID-19		
VII этап	Изучение взаимосвязи эволюции	Первичная	Выборочный	База данных GISAID,	Статистический
	генома SARS-CoV-2 и микроРНК	последовательнос	метод.	база данных Genomic	Сравнительного
	ткани лёгких	ть генома	Профиль	Data Commons Data	анализа
		варианта SARS-	экспрессии	Portal	Аналитический
		CoV-2, профиль	микроРНК 46		
		микроРНК ткани	образцов ткани		
		лёгких	легкого, 219		
			геномов SARS-		
			CoV-2		
		1	1		

Продолжение Таблицы 1

VIII этап	Изучение влияния микроРНК на	Результаты	Выборочный	База данных TCGA	Статистический
	экспрессию рецептора АСЕ2	парных	метод.		Сравнительного
		секвенирований	541 парных		анализа
		мРНК и	секвенирований		Аналитический
		микроРНК			
IX этап	Изучение влияния микроРНК на	Результаты	Выборочный	Публично доступные	Статистический
	тяжесть течения COVID-19	секвенирования	метод.	данные	Сравнительного
		циркулирующих в	11		анализа
		плазме крови	секвенирований		Аналитический
		микроРНК	профиля		
			микроРНК		
Х этап	Разработка и проверка клинической	Законченный	Выборочный	Карта выкопировки	Статистический
	значимости патогенетически	случай	метод.	данных из формы №	Секвенирование
	обоснованного алгоритма	госпитализации	145 законченных	003/у «Медицинская	генов ГКГС-І
	диагностических мероприятий для		случаев	карта стационарного	Сравнительного
	прогноза тяжелого и крайне		госпитализации	больного», образцы	анализа
	тяжелого течения COVID-19 на			периферической крови	Аналитический
	основе анализа генотипа ГКГС-І			пациентов	

2.2 Методы исследования

2.2.1 Пациенты

В исследовании были использованы данные о генотипе 428 добровольцев из Федерального регистра доноров костного мозга (РНИМУ им. Н.И. Пирогова) [Shkurnikov и др., 2021]. Группа пациентов первой волны была сформирована в период с мая по август 2020 года. Группа пациентов третьей волны была сформирована в период с июня по июль 2021. Все пациенты, участвовавшие в исследовании, были госпитализированы с COVID-19 в ГБУЗ «ГКБ № 15 ДЗМ».

2.2.2 Выделение ДНК

ДНК из образцов крови выделялась набором реагентов QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия). Набор предназначен для выделения геномной, митохондриальной, бактериальной или вирусной ДНК из тканей, мазков, клеток, крови, спинномозговой и других биологических жидкостей. Принцип действия набора основан на применении миниколонок с силикагелевой мембраной (спинколонка). Силикатная мембрана имеет положительный заряд, а отрицательно заряженная ДНК обладает высокой аффинностью к такой мембране. При центрифугировании исходного клеточного лизата ДНК задерживается на мембране, а остальные компоненты проходят через неё в раствор, который затем удаляется. Преимущества такого метода заключаются в повышенной чистоте и хорошем качестве выделенных нуклеиновых кислот, высокой воспроизводимости и простоте по сравнению с другими методами выделения ДНК.

После выделения качество ДНК было проверено спектрофотометрически на NanoDrop 2000/2000с (Thermo Scientific, США) в 1 мкл полученной жидкости.

2.2.3 Подготовка библиотек для секвенирования генов ГКГС

Подготовку библиотек осуществляли с помощью набора реагентов для подготовки библиотек фрагментов ДНК генов ГКГС I и II классов для генотипирования высокопроизводительным секвенированием (NGS) «HLA-Эксперт» (регистрационное удостоверение № РЗН 2019/9208 от 08.11.2019, ДНК-Технология, Россия).

Типирование генов ГКГС-І подразумевает определение всех аллелей генов HLA-A, HLA-B и HLA-C, кодирующих одинаковую последовательность белка в антигенсвязывающем домене, и исключение нулевых аллелей, имеющих полиморфизмы при отсутствии экспрессии кодируемого белка на клетке [Harmer, Mascaretti, Petershofen, 2018]. Для решения этой задачи использовано генотипирование 2 и 3 экзона. Для решения задачи определения истинных гомозигот других неопределенностей использовано генотипирование И дополнительных экзонов и интронов.

2.2.4 Секвенирование

Секвенирование библиотек фрагментов ДНК генов ГКГС I и II классов осуществляли с помощью секвенатора Illumina MiSeq (Illumina, США) на стандартной проточной ячейке набора реагентов MiSeq Reagent Kit v2 500-cycles (Illumina, США) в режиме парных прочтений 2x250.

2.2.5 Определение генотипа ГКГС- І по данным секвенирования

Типирование генов ГКГС-I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) на уровне высокого разрешения методом высокопроизводительного секвенирования осуществляли с помощью программного обеспечения «HLA-Эксперт» согласно Руководству пользователя к программному обеспечению с использование базы данных IPD-IMGT/HLA версии 3.41.0 [Robinson и др., 2020]. Минимальная глубина прочтения каждого экзона составила 130х.

2.2.6 Определение профиля микроРНК ткани лёгких

Данные секвенирования микроРНК лёгких были загружены из коллекции LUAD портала GDC (https://portal.gdc.cancer.gov/). В соответствии с прилагавшейся клинической аннотацией среди данных о секвенировании 510 образцов было классифицируемых отобрано 46, как «прилежащие здоровые ткани». Нормализация библиотек секвенирования последующим с удалением низкоэкспрессированных фрагментов была выполнена с помощью алгоритма edgeR-TMM. Из полученных 316 видов микроРНК отобрали наиболее представленные, на которые суммарно приходится 95% всех микроРНК в ткани лёгких. В качестве экспрессии микроРНК рассматривалось усреднение количества ридов на миллион (СРМ-шкала), взятое по ранее отобранным 46 образцам.

2.2.7 Забор образцов для генотипирования вируса SARS-CoV-2

Использовали образцы биологического материала из верхних дыхательных путей пациентов с подозрением на COVID-19.

Для исследования образцов на наличие РНК SARS-CoV-2 применяли различные наборы реагентов для ОТ-ПЦР и комплектные к ним наборы для выделения РНК: ПОЛИВИР SARS-CoV-2 Express (ЛИТЕХ, Россия), АмплиПрайм SARS-CoV-2 DUO / МагноПрайм ФАСТ-Р (НекстБио, Россия) и SARS-CoV-2 «CoV-2-Tect» (ТестГен, Россия).

Пригодными к секвенированию считали образцы, в которых концентрация РНК SARS-CoV-2 при постановке ОТ-ПЦР соответствовала пороговому числу циклов менее 28-31 [Латыпова и др., 2022].

2.2.8 Подготовка библиотек и секвенирование PHK SARS-CoV-2

На первом этапе подготовки библиотек проводилось обогащение образца последовательностями генома SARS-CoV-2 методом обратной транскрипции и мультиплексной амплификацией со специфичными праймерами. Синтез кДНК с матрицы РНК вируса и последующая ее амплификация производились последовательно в одной пробирке, содержащей смесь ферментов для обратной транскрипции и амплификации. Для мультиплексной амплификации использовали набор специфических праймеров (ДиаСистемс, Россия).

Первый этап выполняли на амплификаторах T100 (Bio-Rad, CША): при температуре 55°C проводили реакцию обратной транскрипции с образованием первой цепи кДНК, после чего смесь нагревали до 95°C и проводили этап амплификации полученной кДНК.

Наборы, использовавшиеся для мультиплексной амплификации праймеров (производитель «ДиаСистемс», Россия), содержали ген-специфические части из базы данных международного консорциума исследователей ARTIC network (Advancing Real Time Infection Control).

После данного этапа осуществляли баркодирование продуктов ОТ-ПЦР без промежуточной очистки, с использованием набора адаптерных олигонуклеотидов (ДиаСистемс, Россия), совместимых с платформой секвенирования MiSeq (Illumina, США).

Секвенирование готовых библиотек осуществлялось на секвенаторе Illumina MiSeq, с использованием набора реактивов MiSeq 600 cycles v3, запускаемого в режиме чтения 2x250 п.о. [Латыпова и др., 2022]. Среднее число прочтений на один образец составляло примерно 64000.

2.2.9 Определение варианта SARS-CoV-2

Первичный контроль качества данных, получаемых в ходе биоинформатического анализа, выполняли следующим образом: полученные сырые данные прочтений в формате fastq с прибора Illumina MiSeq Dx (Illumina, США) фильтровали по качеству с помощью ПО Trimmomatic (v.0.39) с качеством более Q20.

Прочтения выравнивались на референсный геном SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (GenBank: MN908947.3), с использованием ПО Minimap2 (2.24). Из выровненных прочтений удалялись последовательности праймеров мультиплексной панели для ОТ-ПЦР, не несущие геномной информации. После чего следовала процедура поиска вариантов, с помощью ПО GATK (4.2.6.1), т.е. сравнение картированных прочтений с геномом сравнения и выявлением отличий анализируемого образца по отношению к референсному геному, при наличии покрытия более 5. На основе найденных вариантов собирались итоговые последовательности геномов SARS-CoV-2 в формате fasta с помощью программы Bsftools.

Последовательности аннотировались, с применением баз данных Pangolineage и NextStain. В процессе аннотации, каждой найденной вариации в геноме присваивалось соответствующее белковое изменение и определялся штамм и подштамм генома нового коронавируса, присутствующего в образце, взятом у пациента с подозрением на COVID-19 [Латыпова и др., 2022].

2.2.10 Оценка количества клеток, секретирующих IFN-γ

2.2.10.1 Выделение мононуклеаров периферической крови (РВМС)

30 мл венозной крови собирали в пробирки с ЭДТА (Sarstedt, Германия) и подвергали центрифугированию в градиенте плотности фиколла (ПанЭко, Россия) (400 g, 30 мин). Изолированные РВМС промывали ФСБ, содержащим 2 мМоль ЭДТА, и использовали для анализов или замораживали в эмбриональной бычьей сыворотке, содержащей 7% ДМСО.

2.2.10.2 Экспансия Т-лимфоцитов

При экспансии Т-клеток использовали методику, описанную ранее Титовым и соавторами [Titov и др., 2022]. Выделенные PBMC размножали в течение 12 дней со смесью 94 пептидов SARS-CoV-2 (конечная концентрация каждого = 10 мкМоль). На 10-й и 11-й дни аликвоту клеточной суспензии использовали для иммуноферментного анализа анти-IFN-γ с целью оценки ответов на отдельные пептиды.

2.2.10.3 Стимуляция Т-лимфоцитов отдельными пептидами

После 10 дней экспансии аликвоту Т-лимфоцитов дважды промывали в 1,5 мл ФСБ, затем переносили в среду AIM-V (Thermo Fisher Scientific, CША), рассевали по 1×10^5 клеток на лунку 96-луночного планшета и инкубировали в течение ночи (12–16 часов) с частичными пулами пептидов (подмножествами исходного набора пептидов). На следующий день культуральную среду собирали и тестировали на IFN- γ , как описано ниже. Если клетки положительно реагировали на один или несколько пулов, снова отбирали аликвоту клеточной культуры на 11–12-й день и стимулировали ее, как описано выше, индивидуально каждым пептидом (2 мкМоль) из соответствующего пула пептидов. Были протестированы только те пептиды, для которых была предсказана высокая аффинность с набором молекул ГКГС-I каждого человека.

2.2.10.4 Анти–IFN-у ИФА

96-луночные культуральные планшеты с клетками, инкубированными с пептидными пулами или отдельными пептидами, центрифугировали в течение 3 минут при 700 g, 100 мкл среды переносили на планшеты для ИФА и проводили

определение IFN-γ [Titov и др., 2022]. ОП измеряли при 450 нм на планшетном фотометре Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) – ОП₄₅₀.

Тестовые лунки (среда из клеток, инкубированных с пептидами) сравнивали с лунками отрицательного контроля (клетки, инкубированные с растворителем для пептидов). Тестовые с лунки соотношением ОП450 тест лунка/ОП450 отрицательный контроль \geq 1,25 разницей И ОП450 отрицательный 0,08 ОП450 тест лунка _ контроль \geq считали положительными. Пептиды с соотношением между 1,25 и 1,5 снова тестировали до 3 раз в качестве биологических повторов, чтобы убедиться в точности их ответа, и пептиды с 2 или 3 положительными результатами считались положительными.

2.2.10.5 Пептиды

Пептиды с чистотой не менее 95% были синтезированы Peptide 2.0 Inc. или в ФГБУ науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (Таблица 2).

Таблица 2 – Панель высокоаффинных пептидов для аллелей HLA-A*01:01 и HLA-A*02:01 из ORF1ab

	Оценка аффинности взаимодействия, нМоль	
Пептид	HLA-A*01:01	HLA-A*02:01
CTDDNALAYY	3	19896
TTDPSFLGRY	5	27903
DTDFVNEFY	6	33483
GTDLEGNFY	9	33917
PTDNYITTY	12	35372
NTCDGTTFTY	14	25394
HTTDPSFLGRY	42	33468
YLDAYNMMI	221	2
FTYASALWEI	5189	17
FLLNKEMYL	13747	2
YLFDESGEFKL	18838	6
ALWEIQQVV	27002	5
NMLRIMASL	29822	46
RQLLFVVEV	31003	17
KLWAQCVQL	33067	8

2.2.11 Прогноз аффинности взаимодействия молекула ГКГС-І – пептид

2.2.11.1 Создание набора последовательностей пептидов SARS-CoV-2

Протеомы вариантов SARS-CoV-2 (27 вирусных белков) были получены из базы данных GISAID [Elbe, Buckland-Merrett, 2017а]. В качестве эталонного вируса был использован вариант Wuhan-Hu-1 (EPI ISL 402125).

Набор вирусных пептидов был создан путем рассмотрения всех возможных фрагментов белков SARS-CoV-2 длинной от 8 до 14 аминокислотных остатков (потенциальные эпитопы CD8⁺ T-лимфоцитов).

Учет мутаций SARS-CoV-2, связанных с конкретным вариантом вируса, осуществляли по следующей методике:

– построили попарное глобальное выравнивание эталонных и мутантных белков с помощью Biopython [Cock и др., 2009]. Это позволило определить соответствие между эталонными и мутантными пептидами, взяв пары пептидов с одинаковыми координатами начала/конца при выравнивании (пропуски были удалены из последовательностей пептидов). Если эталонный и мутированный пептиды были одинаковыми, то такая пара исключалась из последующего анализа. Проанализировали два частных случая:

- либо эталонный, либо мутантный пептид был слишком коротким, чтобы его можно было рассматривать как эпитоп CD8⁺ Т-лимфоцитов. Например, делеция внутри эталонного 8-мерного пептида привела к 7меру, который не подходит для презентации на ГКГС-I. В этом случае эталонный пептид считался не имеющим пары;
- 2) мутированный пептид относился к набору эталонных пептидов (после исключения пробелов). В качестве примера рассмотрим пептид FKLKDCVMY из белка NSP6 эталонного протеома. Делеция SGF 106–108 в штамме UK привела к делеции первой аминокислоты пептида, поэтому рассматриваемый пептид после мутации принимает вид KLKDCVMY. Поскольку эта последовательность принадлежала эталонному пептидому, считали пептид FKLKDCVMY не имеющим пары;

- выбор аллельных вариантов генов ГКГС-І: НLА-А, -В, -С. Стремясь составить список наиболее частых аллелей ГКГС-І, использовали базу данных CIWD v3.0.0 [Hurley и др., 2020]. Были проанализированы частоты аллелей HLA для разных групп населения, таких как AFA (африканцы/афроамериканцы), API EURO (европейцы), MENA (азиатские/тихоокеанские острова), (Ближний Восток/северное побережье Африки), HIS (Южная Центральная или Америка/латиноамериканцы), NAM (индейские популяции) и UNK (множество предков/другое). Затем из объединения 10 наиболее распространенных аллелей для каждой группы населения был составлен окончательный список аллелей. Список рассматриваемых аллелей представлен в Таблице А.1.

2.2.11.2 Выбор модели прогноза и прогноз аффинности взаимодействия молекула ГКГС-I – пептид

Существует несколько подходов к поиску иммуногенных эпитопов. В частности, разработчики двух наиболее популярных программ для поиска высокоаффинных эпитопов – netMHCPan [Reynisson и др., 2020] и MHCflurry [O'Donnell и др., 2018] – рекомендуют отбирать эпитопы по %рангу. Причем рекомендуется использовать два пороговых значения: 0,5% и 2,0%.

Тем не менее, в данном исследовании был применен широко используемый подход на основе анализа прогнозных оценок аффинности взаимодействия ГКГС-I – пептид [Dearlove и др., 2020; Jaeger и др., 2022; Mahapatra и др., 2020; Sekine и др., 2020; Yarmarkovich и др., 2021].

Было проанализировано влияние двух пороговых значений для %ранг (0,5% и 2,0%) на спектр высокоаффинных пептидов по прогнозу программы netMHCPan. При сравнении пороговых значений (%ранг 0,5% и 2,0% против 50 нМоль) был использован индекс Ранда. Индекс Ранда имеет значение 1 при полной согласованности результатов двух различных пороговых значений и равен 0 если результаты полностью разнятся. Для пары пороговых значений %ранг 0,5% и 50 нМоль для различных аллелей индекс Ранда находился в интервале от 0,97 до 0. В свою очередь для пары %ранг 2% и 50 нМоль – от 0,62 до 0. Значение индекса Ранда равное нулю было отмечено только для аллеля HLA-C*04:01. Это обусловлено тем,

что аффинности взаимодействия вирусных пептидов с ней по данным netMHCPan находятся за пределом использованного нами порога в 50 нМоль (в диапазоне от 140 до 5776 нМоль, медиана 3696 нМоль).

Также было проведено сравнение согласованности результатов прогноза высокоаффинных пептидов с помощью NetMHCpan и MHCFlurry для %ранг 0,5% и 2%. Для %ранг 0,5% индекс Ранда составил от 0,68 до 0,33, а для %ранг 2% – от 0,89 до 0,4. В частности, для HLA-A*02:01 индекс Ранда был равен 0,89, а для HLA-A*01:01 – 0,67. Корреляционный анализ оценок аффинности взаимодействия ГКГС-I – пептид для аллелей HLA-A*01:01, HLA-A*02:01, HLA-A*03:01, HLA-A*02:01, HLA-A*03:01, HLA-A*24:02, HLA-B*07:02, HLA-B*08:01, HLA-B*18:01, HLA-C*04:01, HLA-C*06:02, HLA-C*07:01, HLA-C*07:02, HLA-C*12:03 продемонстрировал значимую согласованность между программами NetMHCpan и MHCFlurry (Рисунок 3).

Необходимо отметить, что применение любого порога %ранг приводит к тому, что из анализа исчезает возможность оценить преобладание высокоаффинных пептидов из определенного белка SARS-CoV-2. В клетке пептиды вируса конкурируют с эндогенными пептидами и если их аффинность взаимодействия даже для %ранг 0,5% будет низкой (например, для HLA-C*04:01 140 нМоль), то вероятность их попадания в молекулу ГКГС-I не велика.

Учитывая вышеперечисленное, для предсказания иммуногенных эпитопов был использован, рекомендованную разработчиками базы данных Immune Epitope Database (IEDB) программу NetMHCpan 4.1 и критерий иммуногенности IC50 менее или равно 50 нМоль.

При выборе способа прогноза аффинностей мы также руководствовались результатами сравнения NetMHCPan 4.1 и MHCflurry из работы Reynisson et al. [Reynisson и др., 2020], продемонстрировавшего более высокую точность прогноза NetMHCpan-4.1 по сравнению с MHCFlurry для наиболее частых в анализируемой популяции аллелей (HLA-A*01:01, HLA-A*02:01).



Рисунок 3 – Согласованность оценок аффинности взаимодействия молекула ГКГС-I – пептид

68

2.3 Методический опыт оценки роли циркулирующих микроРНК

2.3.1 Профиль микроРНК плазмы

МикроРНК плазмы крови, вовлечены в межклеточную коммуникацию, а их содержание в плазме может быть использовано для диагностики различных физиологических и патологических состояний организма [Turchinovich и др., 2013]. Поэтому описание полного спектра микроРНК плазмы представляет собой чрезвычайно важную задачу. В настоящее время широкое применение получили три экспериментальных подхода: скрининг микроРНК с помощью ПЦР, гибридизация на чипах и секвенирование. Количество микроРНК, детектируемых первыми двумя методами, ограничено числом зондов и составляет, как правило, ~80-800 для ПЦР (например, Serum & plasma miScript miRNA PCR Array производства Quiagen и microRNA Ready-to-Use PCR panels производства Exiqon) и 800-1500 для чипов (например, miRCURY LNA microRNA Arrays производства Exiqon, США и miRNA 2.0 - 3.0 arrays производства Affymetrix, США). Поэтому профили микроРНК плазмы, полученные с использованием разных наборов зондов, будут существенно различаться. Так, к настоящему времени большинство работ выполнено с использованием систем, позволяющих детектировать несколько десятков-сотен микроРНК, и именно на основании этих данных сложились существующие представления о профилях микроРНК плазмы. Для оценки профиля микроРНК здоровых доноров были использованы чипы нового поколения, содержащие зонды к 2500 микроРНК (GeneChip miRNA 4.0 arrays, Affymetrix, США, созданы на основе MirBase, версия 20).

Чипы GeneChip miRNA 4.0 помимо зондов к микроPHK человека содержат зонды к микроPHK дрозофилы, в частности, D. melanogaster. Некоторые микроPHK D. melanogaster имеют гомологов у человека [Ibáñez-Ventoso, Vora, Driscoll, 2008] и поэтому при гибридизации с препаратами PHK человека давали интенсивный гибридизационный сигнал. Однако большинство микроPHK не имеют гомологов у человека [Ibáñez-Ventoso, Vora, Driscoll, 2008], в связи с чем уровень их гибридизационного сигнала соответствует фоновым значениям. Поэтому фоновым сигналом считали гибридизационный сигнал микроPHK D. melanogaster, не имеющих гомологов у человека. В качестве порогового выбрали значение 1,49 относительных единиц. Определенный таким образом порог соответствовал 95 перцентили, т.е. гибридизационный сигнал 95% микроРНК D. melanogaster оказался ниже порогового значения.

Уровень экспрессии, превышающий фоновые значения, обнаружен для 262 микроРНК. Таким образом, в плазме обнаружено ~ 10% известных микроРНК. Сходные данные получены при изучении профилей экспрессии различных типов клеток, в частности, клеток крови [Liu и др., 2012; Basso и др., 2009; Ward и др., 2011]. Среди 20 микроРНК с наиболее высоким уровнем экспрессии в плазме здоровых людей можно выделить hsa-miR-486-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-16-5p.

Оказалось, что среди обнаруженных нами микроРНК плазмы значительную часть (69 микроРНК; ~30%) составляют микроРНК, кодируемые миртронами. Миртроны – это гены микроРНК, локализованные в коротких интронах, так что в их процессинге роль Drosha выполняет сплайсосома [Curtis, Sibley, Wood, 2012]. Миртронами кодируется ~15% микроРНК человека [Ladewig и др., 2012]. Таким образом, в плазме крови доля транскриптов этих необычных генов в два раза выше ожидаемой (p < 0,01). Следует отметить, что уровень экспрессии миртронов, как правило, ниже, чем у «канонических» микроРНК [Ladewig и др., 2012]. Поэтому высокое содержание транскриптов миртронов в плазме может свидетельствовать о существовании механизмов их специфической секреции, возможно, основанных на разнице в механизмах процессинга миртронов и «канонических» микроРНК.

2.3.2 Профиль микроРНК плазмы, ассоциированных с гемолизом

Несмотря на то, что микроРНК в плазме довольно стабильны и выдерживают несколько циклов замораживания-размораживания, разработка диагностических критериев на их основе осложнена отсутствием общепринятых критериев контроля качества преаналитических стадий работы с образцами. К основным причинам преаналитической погрешности в оценке профиля микроРНК можно отнести контаминацию плазмы клеточными компонентами (прежде всего тромбоцитами) и эритроцитарной микроРНК вследствие гемолиза. Предложено несколько подходов к контролю качества плазмы для последующего анализа профиля микроРНК. Самым простым и высокоэффективным является спектрофотометрическое определение концентрации гемоглобина в плазме крови. Этот метод позволяет на преаналитическом этапе исключить из исследования образцы с высоким уровнем гемолиза (более 0,22 г/л) [Kirschner и др., 2011]. В то же время необходимо эритроциты могут повлиять на концентрацию в плазме понимать, что ограниченного перечня микроРНК. Известно, что преобладающими микроРНК в эритроцитах являются несколько членов семейства let-7, микроРНК, ассоциированные с регуляцией гемопоэза (hsa-miR-181a, hsa-miR-223, hsa-miR-15, hsa-miR-16, hsa-miR-451, hsa-miR-144) [Chen и др., 2008; Rasmussen и др., 2010а]. Уровень экспрессии характерных для эритроцитов микроРНК может быть использован в качестве критерия контроля качества аналогично уровню гемоглобина. Данный подход может быть полезен в случаях, когда исследователи работают с уже выделенной из плазмы микроРНК и не имеют информации об уровне гемоглобина. Несмотря на свою простоту и эффективность, данные подходы не лишены недостатков, в частности они исключают из исследования значительное число образцов при том, что гемолиз затронул лишь незначительный спектр микроРНК.

Была сформирована коллекция плазмы крови, состоящая из 39 образцов. Забор крови производился с использованием вакуумно-аспирационных пробирок S-Monovette EDTA-KE 8 мл (Sarstedt, Германия).

Выделение плазмы производилось с помощью центрифуги 5810 R (Eppendorf, Германия) в два этапа по 10 минут каждый: первый – при 2000 × g, с последующим переносом верхней фазы в новую пробирку, второй этап проводился при 4000 × g. Все этапы проводились при комнатной температуре, скорость разгона и торможения центрифуги устанавливалась на средний уровень.

В каждом образце плазмы определялось содержание гемоглобина. Определение концентрации гемоглобина производилось спектрофотометрически с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США) по формуле $C_{\rm Hb}=1,58A_{415}-0,95A_{450}-2,91A_{700}$ с пределом чувствительности 0,01 г/л [Fairbanks, Ziesmer, O'Brien, 1992]. Выделение РНК осуществляли из 200 мкл плазмы с помощью набора pearentroв miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия). Принцип действия набора основан на гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции с последующей сорбцией РНК на кремниевой мембране.

Анализ некодирующих РНК в образцах проводили с помощью микрочипов GeneChip miRNA 4.0 (Affymetrix, США) по протоколу производителя. Анализируемые данные микрочиповых исследований были совместно предобработаны, после чего была осуществлена оценка экспрессии для входящих в микрочипы наборов проб. Предобработка и оценка экспрессии с использованием метода RMA проводились в Affymetrix Expression Console (версия 1.4.1.46).

Корреляционный анализ по методу Спирмена проводили в среде статистических вычислений R для микроРНК с экспрессией выше 1,49 [Шкурников и др., 2015] в не менее чем 10% образцов. Для коррекции *p*-значения, связанной с учетом множественности проверки гипотез, использовался метод Бенджамини-Хохберга. МикроРНК считали статистически значимо коррелирующей с уровнем гемоглобина при коэффициенте корреляции Спирмена не менее 0 и *p*<0,05 (после поправки Бенджамини-Хохберга).

Концентрация гемоглобина в образцах плазмы составила от 0,1 г/л до 0,64 г/л (интерквартильный размах 0,30 – 0,37 г/л, медиана 0,30 г/л), что свидетельствует о гемолизе в ряде образцов. Один эритроцит содержит около 2–3×10⁻⁴ пг РНК [Chen и др., 2008] и около 30 пг гемоглобина. Интерквартильный размах концентрации гемоглобина в 0,07 г/л соответствует гемолизу около 0,04% (1,87×10⁷) эритроцитов.

В процессе эритропоэза эритробласт теряет ядро, последовательно переходя в ретикулоцит, а затем в зрелый эритроцит. Несмотря на потерю ядра, эритроцит содержит около 600 молекул РНК, а также некоторое количество микроРНК [Goh и др., 2007]. Микрочиповый анализ микроРНК плазмы крови выявил 494 малых некодирующих РНК с уровнем экспрессии в более чем в 10% образцов выше 1,49. Уровень 9 микроРНК значимо коррелировал с концентрацией гемоглобина: hsamiR-486-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-17-5p, hsamiR-93-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-107, hsa-miR-20b-5p. Полученные нами данные

72
согласуются с результатами секвенирования. По результатам глубокого секвенирования транскриптома зрелых эритроцитов около 60% эритроцитарной микроРНК приходится на hsa-miR-451a [Azzouzi и др., 2015]. Необходимо отметить, что интерквартильный размах представленности микроРНК, коррелирующих с концентрацией гемоглобина, составил всего около единицы в log₂-шкале (примерно соответствует одному циклу ПЦР), что не исключает возможности использования уровня этих микроРНК для диагностики даже в частично гемолизированных образцах.

Нами впервые обнаружена связь между представленностью в плазме hsamiR-107, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-93-5p и hsa-miR-20b-5p и концентрацией гемоглобина, что может свидетельствовать о наличие этих микроРНК в эритроцитах.

Результаты исследования свидетельствуют о корреляции ограниченного спектра микроРНК плазмы крови с уровнем гемолиза.

2.3.3 Взаимосвязь уровня циркулирующих в плазме крови микроРНК с их экспрессией в ткани

В рамках предварительных исследований была проверена гипотеза о крови микроРНК взаимосвязи циркулирующих В плазме И поражения определенного типа ткани организма. Была сформирована коллекция образцов плазмы крови. Цельная кровь получена от 18 пациентов с метастатической формой рака предстательной железы (РПЖ) и 18 пациентов с неметастатической формой РПЖ после подписания информированного согласия. Выделение плазмы осуществлялось согласно разработанному ранее протоколу, минимизирующему гемолиз и выход микроРНК из форменных элементов крови [Shkurnikov и др., 2016]. Уровень гемолиза оценивался спектрофотометрически [Шкурников и др., 2015].

Выделение тотальной РНК производилось из 200 мкл плазмы крови путём гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции с последующей сорбцией на кремниевой мембране с помощью набора pearentros miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя.

Образцы РНК анализировались с помощью микрочипов GeneChip miRNA 4.0 (Affymetrix, США), детектирующих все некодирующие и малые РНК, входящие в базу данных miRBase v. 20, включая зрелые и незрелые микроРНК. Совместная предобработка CEL-файлов и оценка экспрессий индивидуальных наборов проб осуществлялась с помощью Affymetrix Expression Console (сборка 1.4.1.46) в режиме «RMA+DAGB-Human only». Оценка характеристик дифференциальной представленности индивидуальных наборов проб В группах образцов, соответствующих метастатической И неметастатической формам РПЖ, осуществлялась с помощью Affymetrix Transcriptome Analysis Console (сборка 3.0.0.466).

Для анализа были оставлены только те наборы проб, для которых уровень представленности в логарифмической шкале находился выше уровня фона, то есть составлял не менее 1,49 [Shkurnikov и др., 2016]. Для коррекции уровней статистической значимости (*p*-value) с учетом множественности одновременно проверяемых гипотез использовалась поправка Бенжамини-Хохберга.

Поиск пар микроРНК, разделяющих группы образцов, соответствующих метастатической и неметастатической формам РПЖ, осуществлялся на основе переборной стратегии [Galatenko и др., 2015]. Последовательно рассматривались все пары, в которых обе микроРНК имели хотя бы в одной из групп представленность выше уровня фона. Для каждой пары методом опорных векторов с линейным ядром строились классификаторы и оценивались их характеристики [Cortes, Vapnik, 1995]. При построении использовалась логарифмическая шкала представленности. Штрафы за ошибки групп брались обратно для пропорциональными размерам групп образцов. Рассматривалось три значения штрафной константы С: 1, 16 и 256. Пара микроРНК считалась обеспечивающей удовлетворительную классификацию, если хотя бы для одного из значений штрафной константы характеристики качества классификации удовлетворяли предустановленным порогам. В качестве значений порогов были выбраны 20% для 70% общего числа ошибок И для чувствительности специфичности И (дополнительный контроль чувствительности и специфичности при основном

контроле общего числа ошибок позволяет обеспечить сбалансированность классификации).

Оценка уровня статистической достоверности гипотезы о том, что разделение сравниваемых групп идентифицированной парой микроРНК не является случайным, осуществлялась с использованием перестановочной техники (Monte Carlo permutation testing) [Ernst, 2004]. Выбирался миллион случайных перестановок меток групп (все перестановки полагались равновероятными), для каждой перестановки описанным выше способом строились линейные классификаторы и вычислялась доля перестановок меток, ДЛЯ которых классификация удовлетворяла описанным выше порогам (не более 20% для общего числа решений и не менее 70% для чувствительности и специфичности). Оценка *р*value полагалась равной этой доле.

После совместной предобработки CEL-файлов и исключения из рассмотрения микроРНК с уровнем представленности не выше фонового в каждой из двух сравниваемых групп (группы образцов, соответствующих метастатической и неметастатической формам РПЖ), в рассмотрении остался 231 набор проб, соответствующий в совокупности 230 видам микроРНК.

Ни одна из микроРНК не была дифференциально представлена в сравниваемых группах образцов (наименьшее нескорректированное $p = 2,2 \times 10^{-4}$, что соответствует скорректированному p = 0,999 при поправке на общее число наборов проб и 0,052 при коррекции на наборы проб, имеющих хотя бы в одной из групп образцов экспрессию выше фоновой). Однако в силу того, что транскрипты сравнительно низким уровнем индивидуальной дифференциальной co представленности могут в совокупности обеспечивать высокую информативность [Galatenko и др., 2015], был осуществлен поиск пар микроРНК, обеспечивающих качественное разделение сравниваемых групп. Метод опорных векторов при настройке классификатора минимизирует не число ошибок, а функционал, одновременно учитывающий ширину разделяющего коридора и суммарный штраф за попадание в разделяющий коридор и далее в неверную полуплоскость. Среди пар, состоящих из микроРНК с представленностью хотя бы в одной из групп на уровне выше фонового, были отобраны все те пары, которые обеспечили совокупное число ошибок не более 20%, а также чувствительность и специфичность не менее 70%.

Выявлено три пары, удовлетворяющие данным критериям: hsa-miR-320c, hsa-miR-5680; hsa-miR-328-5p, hsa-miR-6805-5p; hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-297. Первые две пары обеспечили сходное качество классификации: чувствительность 72,2%, специфичность 83,3% (совокупная доля ошибок 19,4%), третья пара позволила достичь чувствительности 72,2% при специфичности 88,9% (совокупная доля ошибок также 19,4%). С учетом максимальной чувствительности и специфичности наиболее перспективной для изучения и практического применения представляется третья пара (hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-297). В данной паре обе микроРНК имеют более высокую представленность в плазме крови пациентов с метастатической формой РПЖ. Статистическая значимость разделяющей способности этой пары микроРНК, оцененная с использованием традиционной перестановочной техники, оказалась достаточно высокой $(p < 5, 0 \times 10^{-5}).$

Ранее было показано, что уровень hsa-miR-297 более чем в 2 раза повышен в сыворотке больных РПЖ по сравнению с больными с доброкачественной гиперплазией предстательной железы [Haldrup и др., 2014]. При этом в андрогеннезависимых линиях РПЖ, таких как РСЗ и DU145, hsa-miR-297 экспрессируется на высоком уровне и является необходимой для проявления эффектов прогрессии РПЖ, связанных с онкогенной длинной некодирующей PHK PlncRNA-1 [Fang и др., 2016].

Hsa-miR-19b-3p относится к кластеру hsa-miR-17-92, который характеризуется онкогенными свойствами благодаря регуляции клеточной выживаемости, пролиферации, дифференцировки и клеточного цикла. Было показано, что стимуляция гиперэкспрессии данного кластера в клеточной линии РПЖ DU-145 приводит к повышению пролиферативной, миграционной и инвазивной активности [Zhou и др., 2016].

Таким образом, в ряде предвариварительных экпрериментов был охарактеризован профиль микроРНК плазмы доноров, продемонстрирована возможность работы с образцами плазмы контаминированными гемолизом, показана взаимосвязь профиля микроРНК и поражения определенной ткани организма человека. Данные исследования заложили методические основы для оценки роли микроРНК в патогенезе COVID-19.

2.4 Статистическая обработка данных

Частоты аллелей в рассматриваемых когортах оценивали путем деления числа встречаемости данного аллеля на удвоенное число пациентов в когорте (т.е. идентичные аллели учитывали как две встречаемости). Для статистического анализа использовали следующие функции из библиотеки stats в R: fisher.test для точного критерия Фишера, wilcox.test для U-критерия Манна-Уитни. Кроме того, была использована поправка на множественность сравнений Бенджамини-Хохберга. Графики были построены с помощью библиотек ComplexHeatmap, pheatmap и ROCit.

ГЛАВА 3. ВЗАИМОСВЯЗЬ ГКГС-І С ТЯЖЕСТЬЮ COVID-19

Совместно с В.И. Вечорко и соавторами был разработан способ оценки риска развития тяжелого течения COVID-19 [Shkurnikov и др., 2021]. Данный способ включает забор биологического материала, выделение геномной ДНК с последующим генотипированием аллелей генов HLA-A, HLA-C, обработку результатов генотипирования и прогнозирование по полученным данным риска развития тяжелой формы COVID-19 с высокой вероятностью летального исхода, при этом обработку результатов генотипирования осуществляют с использованием метода главных компонент, посредством определения для каждого аллеля значений 2-ой и 3-ей главных компонент гена HLA-А и значения 4-ой главной компоненты гена HLA-C из базы данных аллелей генов HLA-A, HLA-C, предварительно определенных для популяции, в которую входит исследуемый индивидуум, и содержащей значения упомянутых главных компонент аллелей соответствующих генов, с последующим суммированием всех значений главных компонент, нормированием значения полученной суммы и сравнением с пороговым значением. Прогнозируют риск развития тяжелой формы COVID-19 при получении нормированного значения суммы выше порогового значения.

База данных аллелей генов HLA-A, HLA-C со значениями главных компонент (БД) была сформирована по итогам соответствующего генотипирования популяции, включая пациентов, умерших от COVID-19 [Shkurnikov и др., 2021], расчета коэффициентов связывания всех полученных аллелей HLA-A, HLA-C с вирусными пептидами, вызывающими COVID-19 (штамма SARS-CoV-2 и/или его мутаций), с помощью программы netMHCpan [Reynisson и др., 2020], с последующей обработкой полученных данных методом главных компонент, при этом обработку осуществляли отдельно для каждого гена HLA-A, HLA-C, а количество главных компонент определяли таким образом, чтобы доля дисперсии, обусловленной каждой компонентой, составляла не менее 5% от исходной дисперсии.

Кроме того, было проведено сравнение наблюдаемых частот генотипов с ожидаемыми, согласно равновесию Харди-Вайнберга в исследуемых группах. Наблюдаемые частоты генотипов в группах сравнения соответствовали ожидаемым, данные популяции находились в состоянии равновесия.

Нормирование суммы полученных значений главных компонент (S) аллелей генов HLA-A, HLA-C индивидуума реализовано по формуле $N = (S - S_{min}) / (S_{max} - S_{min})$, где S_{min} – сумма всех минимальных значений главных компонент по каждому аллелю из БД, S_{max} – сумма всех максимальных значений главных компонент по каждому аллелю из базы данных, N – нормированный индекс риска (далее – «Индекс риска»).

Пороговое значение для интерпретации «Индекса риска» было определено на основании использования значений главных компонент умерших пациентов в возрасте до 60 лет и после 60 из БД. При этом для каждого умершего пациента определяли значения 2-ой и 3-ей главных компонент гена НLA-А и значение 4-ой главной компоненты гена НLA-С из БД, с последующим суммированием всех значений главных компонент, нормированием полученных сумм (по формуле выше), после чего из полученных значений $N_1, N_2, ..., N_k$ (N_i – нормированный «Индекс риска» для *i*-го пациента, *k* – общее число пациентов) в качестве порогового значения выбрали значение, характеризующее максимальную долю пациентов, умерших до 60 лет, в группе пациентов, с N_i выше порогового значения. При этом определение максимальной доли пациентов, умерших до 60 лет, было реализовано с помощью точного теста Фишера.

Данный способ был разработан по итогам проведенных исследований генетического материала 539 пациентов, включая генетически материал умерших пациентов в возрасте до 60 лет и после 60 (111 пациентов). В результате были выявлены возможные связи между генотипами умерших пациентов, их возрастом на момент смерти с критическим течением COVID-19.

Использование данных генотипа ГКГС-І пациентов умерших от COVID-19 в возрасте до 60 лет и старше 60 лет значимо повлияло на повышение точности

получаемых оценок. Смерть – сочетание сопутствующих заболеваний, неадекватного ответа иммунной системы, одной из причин которого является генетическая предрасположенность; сравнение умерших от COVID-19 в возрасте до 60 лет с умершими в возрасте старше 60 лет позволило выявить преимущественный вклад наследственного фактора.

Кроме того, в разработанном способе предложены новые критерии оценки аффинности пептидов и аллелей ГКГС-І. В работе Iturrieta-Zuazo и соавторов [Iturrieta-Zuazo И др., 2020], упоминается два способа интерпретации математического моделирования аффинности пептида и молекулы ГКГС-І: при аффинности менее 50 нМоль взаимодействие считалось возможным, при более и равным 50 нМоль – нет; при аффинности менее 500 нМоль взаимодействие считалось возможным, при более и равно 500 нМоль – нет. Способ, предложенный авторами данного исследования, использует непрерывную шкалу значений аффинности от 1 до 5000 в отличие от способа Iturrieta-Zuazo и соавторов, который бинаризует (0 или 1) значение аффинности.

Разработанный способ оценки риска развития тяжелой формы COVID-19 на основе анализа генотипа ГКГС-I демонстрирует более высокую точность прогнозных оценок течения COVID-19 по сравнению со способом-прототипом, что является важным для применения/изменения тактики лечения пациента. Тем не менее, необходимо учитывать, что в популяции постепенно формируется иммунитет и улучшаются протоколы лечения пациентов с COVID-19, но вирус SARS-CoV-2 постоянно мутирует, что может значительно сказываться на точности прогноза.

Разработанный способ был реализован в форме программного обеспечения «Аффисенс» (ПО) для клинической оценки риска развития тяжелой формы течения коронавирусной инфекции COVID-19. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2023619424, 11.05.2023.

80

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ НА ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ COVID-19 РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА SARS-COV-2

4.1 Взаимосвязь прогноза течения COVID-19 с мутациями белка NS8 SARS-CoV-2 в зависимости от штаммовой принадлежности вируса

В середине 2021 года штамм Дельта коронавируса SARS-CoV-2 вызвал третью волну пандемии COVID-19 в ряде стран мира, в том числе и в России. Штамм Дельта активно мутировал, что привело к формированию вариантов вируса значительно отличающихся по профилю мутаций [Klink и др., 2022]. Данное обстоятельство крайне важно, так как изменения аминокислотной последовательности белков SARS-CoV-2 значимо влияют на способность молекул ГКГС-I презентировать их на поверхности зараженной клетки [Nersisyan и др., 2022b].

За более чем два года пандемии COVID-19 накоплена значительная информация об особенностях формирования Т-клеточного иммунитета к COVID-19 [Titov и др., 2022]. Однако ассоциации генотипа ГКГС-I и течения COVID-19 преимущественно анализировали по данным, относящимся к первой волне пандемии и исходному варианту вируса. Более того, при исследованиях ассоциаций и тяжести течения COVID-19 практически не учитывался возраст переболевших.

Ранее на выборке пациентов первой волны нами было показано, что генотип ГКГС-I является значимым фактором риска тяжелого течения COVID-19 только у пациентов в возрасте не старше 60 лет [Shkurnikov и др., 2021]. Нами была изучена взаимосвязь генотипа ГКГС-I пациентов в возрасте не старше 60 лет с тяжестью течения COVID-19, вызванной двумя наиболее распространенными летом 2021 года вариантами штамма Дельта SARS-CoV-2: AY.122 и B.1.617.2.

В августе 2021 года была сформирована выборка из 45 пациентов госпитализированных со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19, проведено генотипирование ГКГС-I и определена штаммовая принадлежность вируса SARS-CoV-2. Характеристика пациентов представлена в Таблице 3.

Секвенирование РНК, выделенной из мазков из носоглотки, позволило установить, что пациенты были инфицированы вариантами AY.122 и B.1.617.2 штамма Дельта SARS-CoV-2. По данным портала GISAID [Elbe, Buckland-Merrett, 2017а] выявленное нами соотношение вариантов SARS-CoV-2 характерно для московского региона в августе 2021 года (ОШ 2,2, p = 0.1, 95% ДИ 0,8 – 5,4).

Показатель	Вариант	Вариант	р		
	AY.122	B.1.617.2			
n	37	8			
Возраст,	35 [32 - 46]	45 [35 - 51,8]	0,26		
медиана [25%-					
75%]					
Пол	10/27	1/7	0,65		
(Муж./Жен.)					
	Тяжесть		0,04		
Средняя	14	8			
Тяжелая	23	0			
Максимальная	степень поражени	я лёгких по КТ	0,37		
КТ-0	3	0			
KT-1	10	4			
КТ-2	5	1			
КТ-3	9	0			
КТ-4	3	0			
н.д.	7	3			
	Исход		1		
Летальный	1	0			
Выписан	36	8			
Сопутствующие заболевания					
Диабет	8	2	1		
Ожирение	7	1	1		
Гипертония	8	2	1		

Таблица 3 – Характеристика выборки пациентов с COVID-19

Нам удалось установить, что тяжесть течения COVID-19 значимо различалась для больных вариантами AY.122 и В.1.617.2 (ОШ неопр., *p* = 0,4, 95% ДИ 0,9 – неопр.). Мы проанализировали различия в профиле мутаций этих вариантов SARS-CoV-2 (Рисунок 4). В варианте AY.122 выявлено 12 мутаций: 6 мутаций в ORF1ab, две мутации во вспомогательных белках и четыре мутации в

структурных белках. В свою очередь вариант В.1.617.2 несет 24 мутации: пять мутаций в ORF1ab, пять мутаций во вспомогательных белках и 14 мутаций в структурных белках. Необходимо отметить, что два варианта SARS-CoV-2 объединяют только две мутации: D614G в спайк-белке и P323L в PHK-зависимой PHK полимеразе из ORF1ab. Обе эти мутации закрепились в геноме SARS-CoV-2 еще в начале 2020 года и ассоциированы с тяжестью течения COVID-19 [Biswas, Mudi, 2020]. Учитывая, что подавляющее большинство мутаций в вариантах вируса различаются, мы проанализировали их влияние на способность молекул ГКГС-I взаимодействовать с мутантными пептидами каждого варианта.



Рисунок 4 – Профиль мутаций в вариантах АҮ.122 и В.1.617.2 SARS-CoV-2

Генотипирование ГКГС-I пациентов показало, что наиболее частыми аллелями в выборке были HLA-A*02:01 (частота 0,26) и HLA-A*01:01 (частота 0,25), что характерно для популяции московского региона [Shkurnikov и др., 2021]. Малый объем выборки не позволил выявить взаимосвязи гаплотипов и отдельных аллелей с тяжестью течения COVID-19 для анализируемых вариантов SARS-CoV-2. Тем не менее, был оценен «Индекс риска» тяжелого течения COVID-19 [Shkurnikov и др., 2021], отражающий интегральную способность индивидуального набора молекул ГКГС-I презентировать пептиды SARS-CoV-2 (Рисунок 5, панель A). Различия в «Индексе риска» между пациентами, переболевшими вариантом AY.122 в среднетяжелой и тяжелой форме оказались недостоверными (p = 0,47). Однако, можно отметить тенденцию к более высокому «Индексу риска» у пациентов с тяжелым течением.

Анализ влияния мутаций на число вирусных пептидов, взаимодействующих с индивидуальным набором молекул ГКГС-I с аффинностью менее 50 нМоль,

показал что различия достоверны для вспомогательных белков вируса (Рисунок 5, панель Б). Так, у инфицированным вариантом АҮ.122 число высокоаффинных пептидов значимо сократилось по сравнению с инфицированными вариантом В.1.617.2 (p < 0,01).



Рисунок 5 – Панель А – Взаимосвязь «Индекса риска» тяжелого течения COVID-19 с фактическим течением заболевания. Панель Б – Влияние мутаций во вспомогательных белках вариантов АҮ.122 и В.1.617.2 на аффинность их взаимодействия с индивидуальным набором молекул ГКГС-I

Значимое снижение числа высокоаффинных пептидов в варианте AY.122 прежде всего связано с мутацией G8R в белке NS8. Данная мутация вызывает падение аффинности взаимодействия пептидов FLGIITTV (с 42 нМоль до 121 нМоль) и FLVFLGIITTV (с 25 нМоль до 59 нМоль) с молекулой ГКГС-I, кодируемой наиболее частым для нашей популяции аллелем HLA-A*02:01. Ранее была показана иммуногенность пептида FLGIITTV у пациентов переболевших COVID-19 [Saini и др., 2021]. Особого внимания заслуживает тот факт, что белок NS8 (ORF8) способен подавлять созревание молекул ГКГС-I и их транслокацию на поверхность зараженной клетки [Matsuoka и др., 2022; Zhang и др., 2021а]. Данные обстоятельства могли внести весомый вклад в превалирование варианта AY.122 в российской популяции и более тяжелое, по сравнению с другими вариантами штамма Дельта, течение COVID-19, вызванной им. Предлагаемый подход к анализу мутаций на уровне вариантов SARS-CoV-2 представляется важным, так как SARS-CoV-2 продолжает активно мутировать.

4.2 Особенности генотипа ГКГС-І пациентов в первую и третью волну COVID-19

Было проведено генотипирование ГКГС-І у 147 пациентов переболевших в первую волну COVID-19 в г. Москва в период с мая по август 2020 года – группа Волна 1. Также были генотипированы 219 пациентов переболевших COVID-19 в период с июня по июль 2021 – группа Волна 3. Клиническая характеристика групп сравнения представлена в Таблице 4. Мы не выявили значимых различий в возрасте пациентов, включенные в группы сравнения, а также в соотношении полов в группах. Доля вакцинированных пациентов в группе Волна 3 была незначительна и составляла 8,7%, что несколько ниже общегородского уровня вакцинации на июнь 2021 года – 15% [Boguslavsky, Sharova, Sharov, 2022]. Необходимо отметить значительное увеличение доли пациентов с хронической обструктивной болезнью лёгких (p = 0.01), ожирением (p = 0.01, ОШ = 3.8), гипертонической болезнью (p = 0.003, OIII = 2,4) в третьей волне COVID-19. Также оценили вклад коморбидностей в риск смерти от COVID-19. Если в первую волну COVID-19 поражения миокарда (p = 5, 2e-5, OIII = 13) и гипертоническая болезнь (p = 0.045, OIII = 3.5) были значимыми факторами риска смерти, то в третью волну подобного влияния не было отмечено (Таблица 5).

Полонота	Группа		
Параметр	Волна 1	Волна 3	р
n	147	219	
Возраст, лет	$43,4 \pm 11$	$42,9 \pm 5,2$	0,4
Пол	·		
мужской	73 (49,7%)	123 (56,2%)	0,24, OⅢ = 0,77
женский	74 (50,3%)	96 (43,8%)	
Вакцинация	0	19 (8,7%)	4,9e-05
Тяжесть			
лёгкая/средняя	120 (81,6%)	192 (87,7%)	0,13, ОШ = 0,63
тяжёлая	27 (18,4%)	27 (12,3%)	
Исход заболевания			
выздоровление	127 (86,4%)	197 (90%)	0,32, OⅢ = 0,71
летальный	20 (13,6%)	22 (10%)	
Реанимация	28 (19%)	51 (23,3%)	0,36, ОШ = 1,3

Таблица 4 – Клиническая характеристика групп сравнения

Продолжение Таблицы 4

Кислородная поддержка				
без	98 (66,7%)	140 (63,9%)		
низкопоточная	24 (16,3%)	38 (17,4%)		
прон позиция	0	11 (5%)	8,8e-05	
высокопоточная	16 (10,9%)	4 (1,8%)		
ИВЛ	9 (6,1%)	26 (11,9%)		
Сопутствующие заболевания				
ХОБЛ	0	9 (4,1%)	0,01	
Ожирение	4 (2,7%)	21 (9,6%)	0,01, OⅢ = 3,8	
Заболевания сердца	20 (9,1%)	14 (9,5%)	1, ОШ = 0,95	
Гипертоническая болезнь	16 (10,9%)	50 (22,8%)	0,003, ОШ = 2,4	
Злокачественные новообразования	3 (2%)	9 (4,1%)	0,4, OⅢ = 2,1	

Таблица 5 – Взаимосвязь коморбидностей с летальным исходом COVID-19 в группах сравнения, ОШ (*p*)

Параматр	Группа		
Параметр	Волна 1	Волна 3	
ХОБЛ	0(1)	0 (0,6)	
Ожирение	0(1)	2,3 (0,24)	
Заболевания сердца	13 (5,2e-05)	2,5 (0,12)	
Гипертоническая болезнь	3,5 (0,045)	1,3 (0,6)	
Злокачественные новообразования	inf (0,002)	5 (0,049)	

Прежде всего была проверена гипотеза о различие в частотах единичных аллелей ГКГС-I у пациентов групп сравнения: пациентов с COVID-19 первой волны, пациентов с COVID-19 третьей волны и популяционной группы. Распределение основных аллелей HLA-A, HLA-B и HLA-C в этих трех группах обобщенно представлено на Рисунке 6. Для формального статистического сравнения использовали точный критерий Фишера.

24.4	25.5	28.4	HLA-A*02:01	
13.3	17.3	9.2	HLA-A*01:01	
13.3	11.6	13.8	HLA-A*03:01	
12.6	11.9	12.0	HLA-C*07:01	
12.5	13.5	10.8	HLA-C*04:01	
12.1	7.5	14.0	HLA-C*07:02	
12.0	13.2	14.6	HLA-C*12:03	
11.8	9.4	11.6	HLA-A*24:02	
11.2	13.2	9.2	HLA-C*06:02	
10.9	6.3	11.0	HLA-B*07:02	
7.0	7.9	6.6	HLA-B*08:01	
7.0	4.1	6.8	HLA-B*44:02	
6.9	7.5	9.0	HLA-B*18:01	
6.3	4.7	5.0	HLA-B*35:01	
5.8	4.4	6.0	HLA-C*02:02	
5.5	7.2	5.0	HLA-B*13:02	
5.1	3.5	7.0	HLA-A*26:01	
5.1	7.9	5.8	HLA-B*51:01	Частота аллеля, %
5.1	6.9	5.6	HLA-C*03:04	30
5.0	5.7	6.6	HLA-A*11:01	20
4.8	4.4	6.4	HLA-B*38:01	- 10
4.8	2.5	4.0	HLA-C*05:01	
4.2	6.3	7.4	HLA-A*25:01	0
3.7	3.1	2.8	HLA-C*03:03	
3.6	4.1	3.8	HLA-B*15:01	
3.4	5.7	4.4	HLA-C*01:02	
3.3	1.3	1.4	HLA-A*68:01	
3.2	2.8	3.2	HLA-A*32:01	
3.0	3.8	3.0	HLA-B*27:05	
3.0	5.7	2.6	HLA-B*40:01	
2.7	3.5	2.4	HLA-A*23:01	
2.7	4.4	3.0	HLA-B*44:03	
2.7	1.3	1.8	HLA-C*17:01	
2.6	2.5	1.8	HLA-C*08:02	
2.5	1.9	2.6	HLA-B*40:02	
2.3	1.6	2.6	HLA-B*35:03	
2.3	3.5	1.0	HLA-C*15:02	
2.2	2.8	1.2	HLA-A*30:01	
2.2	2.2	3.0	HLA-C*12:02	
2.1	2.8	3.2	HLA-B*52:01	
sup	a 1	a		
ЛЯІ	HLC	НГС		
лу.	Вс	В		
Ĕ				

Рисунок 6 – Распределение частот аллелей HLA-A, HLA-B, HLA-C в группах сравнения. Представлены аллели с частотой не менее 5% хотя бы в одной из групп сравнения

В результате обнаружили, что для всех возможных групповых сравнений только один аллель из двенадцати наиболее частых аллелей имел высокое отношение шансов, которое можно считать статистически значимым после поправки на множественность сравнений. В частности, частота аллеля HLA-A*01:01 снизилась с 17,3% в группе Волна 1 до 9,8% в группе Волна 3 (p = 0,025 с поправкой на множественность сравнений, ОШ = 0,5). Частоты ряда аллелей

значимо различались, если не применялась поправка на множественность сравнений (Таблица А.2).

Мы предположили, что снижение частоты встречаемости носителей HLA-A*01:01 среди пациентов третьей волны могло быть связано с особенностями Тклеточного ответа, формируемого у её носителей. Для проверки этой гипотезы были использованы компьютерные методы анализа взаимодействия молекула ГКГС-I – пептид вируса, влияния мутаций в основных вариантах SARS-CoV-2 на эти взаимодействия, а также результаты экспериментальной проверки иммуногенности пептидов у пациентов, переболевших в первую волну.

Анализ числа пептидов вируса SARS-CoV-2, взаимодействующих с 12 наиболее частыми аллелями в европейской популяции [Gonzalez-Galarza и др., 2019], показал, что аллель HLA-A*01:01 относится к числу аллелей со средней способностью к взаимодействию с пептидами как структурных, так и не структурных белков вируса (Рисунок 7). Он способен провзаимодействовать с аффинностью менее 50 нМоль с 28 пептидами из ORF1ab и 8 пептидами из структурных и вспомогательных белков. В свою очередь аллель HLA-A*02:01 имеет 207 высокоаффинных пептидов из ORF1ab и 56 высокоаффинных пептидов из других белков вируса.



Рисунок 7 – Число вирусных пептидов с оценочной аффинностью взаимодействия не более 50 нМоль с молекулами ГКГС-I, кодируемыми наиболее частыми в популяции аллелями

Также были проанализированы различия в способности презентировать вирусные пептиды между генотипами, которые включают HLA-A*01:01, и генотипами, которые не включают этот аллель (Рисунок 8). Генотипы ГКГС-I, которые включали HLA-A*01:01, имели в среднем меньшее количество высокоаффинных пептидов по сравнению с не-носителями независимо от волны (*p* < 0,02).



Рисунок 8 – Число уникальных пептидов вируса SARS-CoV-2 с оценкой аффинности взаимодействия с набором молекул ГКГС-I пациента не более 50 нМоль. Сравнение для аллеля HLA-A*01:01

Следует отметить, что носители аллеля HLA-A*02:01 (Рисунок 9), в отличие от носителей HLA-A*01:01, имеют большее количество высокоаффинных вирусных пептидов (*p* < 3,8e-08).

90



Рисунок 9 – Число уникальных пептидов вируса SARS-CoV-2 с оценкой аффинности взаимодействия с набором молекул ГКГС-I пациента не более 50 нМоль. Сравнение для аллеля HLA-A*02:01

Был проведен анализ иммуногенных эпитопов вируса SARS-CoV-2 по данным IEDB для аллеля HLA-A*01:01 и аллеля HLA-A*02:01. На момент анализа (май 2022 года) в базе содержалась информация об ответе на 365 пептидов. Два эпитопа были проверены для обоих аллелей: S₁₃₆₋₁₄₄(CNDPFLGVY), М ₁₇₀₋₁₇₈ (VATSRTLSY). Для аллеля HLA-A*01:01 была проверена иммуногенность 50 пептидов из ORF1ab и 33 пептидов не из ORF1ab. Для аллеля HLA-A*02:01 было проверено 139 пептидов из ORF1ab и 145 пептидов не из ORF1ab. Среди

91

проверенных пептидов были определены иммунодоминантные эпитопы (вызывали ответ Т-лимфоцитов не менее чем в 50% проверенных образцов). Для аллеля HLA-A*01:01 было выявлено 10 иммунодоминантных эпитопов из ORF1ab и только 3 HLA-A*02:01 ИЗ ORF1ab. Для аллеля был 51 эпитопа не выявлен иммунодоминантный эпитоп из ORF1ab и 59 эпитопов не из ORF1ab. Соотношение иммунодоминантных эпитопов из ORF1ab для аллеля HLA-A*01:01 было в 3,8 раз больше по сравнению с аллелем HLA-A*02:01 (p = 0,04). Этот результат свидетельствует о том, что среди иммунодоминантных пептидов для аллеля HLA-A*01:01 преобладают эпитопы из ORF1ab, характеризующиеся низкой частотой мутаций.

Для проверки гипотезы о том, что у выздоровевших носителей аллеля HLA-A*01:01 первой волны было большее количество иммуногенных эпитопов из белков ORF1ab, проанализировали Т-клеточные ответы 28 пациентов носителей хотя бы одного из двух наиболее распространенных аллелей в европейской популяции с подтвержденным анамнезом COVID-19 во время первой волны пандемии: HLA-A*01:01 (13 пациентов) и HLA-A*02:01 (15 пациентов). Для каждого образца Т-клеток была протестирована индивидуальная иммуногенность 15 подтвержденных эпитопов ORF1ab SARS-CoV-2 (Таблица 2). Пептиды из этой панели не индуцировали Т-клеточный ответ у пациентов, ранее не болевших COVID-19 [Titov и др., 2022]. Количество эпитопов для HLA-A*01:01 равнялось семи, а для HLA-A*02:01 – восьми.

Поскольку время от появления симптомов до момента забора крови для анализа иммуногенности пептидов могло повлиять на силу Т-клеточного ответа, мы сравнили это время между группами носителей HLA-A*01:01 и HLA-A*02:01. Для носителей HLA-A*01:01 среднее время после появления симптомов составило 34 дня, а для носителей HLA-A*02:01 – 41 день; различия были незначительными (Рисунок 10).



Рисунок 10 – Продолжительность промежутка времени между появлением симптомов COVID-19 и забором у пациента крови для анализа

Для оценки силы Т-клеточного иммунитета, сформированного эпитопами ORF1ab у носителей аллелей HLA-A*01:01 и HLA-A*02:01, оценивали частоту истинно положительных ответов (чувствительность) для каждого из эпитопов. Этот показатель отражает отношение истинно положительных ответов к ожидаемому количеству положительных ответов. Частота истинно положительных ответов значимо различались для эпитопов из ORF1ab (Рисунок 11, Таблица A.3). Три из 7 протестированных эпитопов HLA-A*01:01 были иммунодоминантными (ORF1ab₁₆₃₇₋₁₆₄₆ TTDPSFLGRY, ORF1ab₁₆₃₆₋₁₆₄₆ HTTDPSFLGRY, ORF1ab₁₃₂₁₋₁₃₂₉ PTDNYITTY), но не было ни одного иммунодоминантного эпитопа из восьми протестированных для HLA-A*02:01.



Рисунок 11 – Частота истинно положительных ответов на пептиды из ORF1ab

Помимо данных IEDB и собственных данных проверки эпитопов, были проанализированы данные scRNA-seq CD8⁺ Т-клеток переболевших COVID-19, активированных отдельными пептидами [Francis и др., 2022]. Рассматриваемый фенотипированных набор данных включал набор Т-клеточных клонов, полный набор эпитопов, происходящих от SARS-CoV-2, отвечающих на ассоциированных с четырьмя основными аллелями ГКГС-I (HLA-A*01:01, HLA-A*02:01, HLA-A*24:02 и HLA-B*07:02). Было проанализировано распределение эпитопов, происходящих из SARS-CoV-2, которые вызывали ответ Т-клеток, в зависимости от области генома, из которой они произошли. В соответствии с большинство HLA-A*01:01 результатами, упомянутыми выше, эпитопов происходило из ORF1ab. Для остальных аллелей такой тенденции не наблюдалось (Рисунок 12, панель А).

94



Рисунок 12 – (А) Распределение иммуногенных эпитопов, полученных из SARS-CoV-2, в зависимости от их происхождения. Эпитопы, связанные с аллелем HLA-A*01:01, как правило, происходят в основном из консервативной области ORF1ab SARS-CoV-2. (Б) Отношение реагирующих фенотипов Т-клеток к полному набору эпитопов, полученных из SARS-CoV-2. Тст – субпопуляция Т-лимфоцитов центральной памяти; СТЕ – цитотоксические Т-эффекторные клетки. Эпитопы, связанные с аллелем HLA-A*01:01, вызывают более сильный ответ Тст по сравнению с другими аллелями (попарные точные значения критерия Фишера: 5,423e-05 для HLA-A*01:01 по сравнению с HLA-A*02:02), 0,0178 для HLA-A*01:01 по сравнению с HLA-B*07:02, 6,196e-05 для HLA-A*01:01 по сравнению с HLA-A*24:02)

Также были проанализированы фенотипы реагирующих на стимуляцию пептидами клонов Т-клеток (Рисунок 12, панель Б). Эпитопы, ассоциированные с HLA-A*01:01, в основном от субпопуляции вызывали ответы Т-клеток центральной памяти (Tcm). В то же время доля отвечающих Tcm клеток, ассоциированных с другими аллелями, была значительно меньше (попарные сравнения HLA-A*01:01 с HLA-A*02:01, HLA-B*07:02 и HLA-A*24:02, *p* < 0,02). Вместе с наблюдением, что большинство известных эпитопов, связанных с HLA-A*01:01, происходят из консервативной области ORF1ab, эти результаты свидетельствуют о том, что люди, являющимися носителями HLA-A*01:01, могут иметь более высокие шансы развить сильный иммунный ответ при вторичном инфицировании SARS-CoV-2 из-за уже существующей у них популяции Тст клеток иммунной памяти.

Затем были проанализированы изменения аффинности взаимодействий высокоаффинных эпитопов аллелей HLA-A*01:01 и HLA-A*02:01,

ассоциированные с мутациями в основных вариантах SARS-CoV-2. Ни один из высокоаффинных эпитопов HLA-A*01:01 не был затронут мутациями в существующих актуальных на момент исследования вариантах вируса: Дельта G/478K.V1 и Омикрон (BA.1-BA.4). В то же время семь высокоаффинных эпитопов HLA-A*02:01 были затронуты мутациями. Шесть были расположены в Спайкбелке и один в белке NS3. Все мутации, кроме одной, приводили к снижению аффинности взаимодействия с HLA-A*02:01. Так, в варианте Омикрон BA.1 пептид S₄₉₅₋₅₀₃ YGFQPTNGV имел три замены (G496S, Q498R, N501Y), что привело к увеличению аффинности его взаимодействия с HLA-A*02:01 (с 2160 нМоль до 87 нМоль). В вариантах Омикрон BA.1 и BA.3 делеции A67V и HV 69-70 привели к исчезновению иммунопреобладающего эпитопа S₆₂₋₇₀ VTWFHAIHV.

Кроме того, было проанализировано влияние мутаций в основных вариантах SARS-CoV-2 на аффинность связывания всех возможных вирусных пептидов с 12 указанными выше аллелями ГКГС-I (Таблица 6). HLA-A*01:01 имел 51 высокоаффинный пептид из ORF1ab и 13 высокоаффинных пептидов из других белков (структурных и вспомогательных) в варианте Wuhan-Hu-1. Отличительной особенностью этого аллеля было наличие в нем относительно большого количества высокоаффинных пептидов, не подверженных мутациям в основных вариантах SARS-CoV-2 (Рисунок 13). Из 64 высокоаффинных пептидов HLA-A*01:01 только один пептид значительно изменил аффинность в 16 проанализированных вариантах вируса. В то же время, аналогичная по количеству высокоаффинных пептидов из ORF1ab (p = 3e-09, OIII = 0,02). Следует отметить, что высокоаффинные пептиды из ORF1ab для всех проанализированных аллелей были менее подвержены мутациям по сравнению с остальными пептидами (p = 4,3e-05).

Таолица о –	ЧИСЛО ВЫСОК	оаффинных пе	птидов в вариан	тах вируса 5.	AKS-COV-Z
Аллель	Частота в	Общее число	Общее число	Число	Число
	группе	новых или	новых или	высокоафф.	высокоафф.
	Популяция	исчезнувших	исчезнувших	пептидов	пептидов
		высокоафф.	высокоафф.	не из	из ORF1ab
		пептидов не	пептидов не	ORF1ab в	в варианте
		из ORF1ab	из ORF1ab	варианте	Wuhan-Hu-
		во всех	во всех	Wuhan-Hu-	1
		вариантах	вариантах	1	
		вируса	вируса		
HLA-	24,42	43	29	96	305
A*02:01					
HLA-	13,32	36	15	29	100
A*03:01					
HLA-	12,03	7	1	32	72
<i>C*12:03</i>					
HLA-	13,32	18	10	13	51
A*01:01					
HLA-	11,80	9	11	17	46
A*24:02					
HLA-	10,86	51	19	16	39
B*07:02					
HLA-	7,01	10	18	12	29
B*08:01					
HLA-	7,01	10	4	7	25
B*18:01					
HLA-	12,15	2	2	1	10
C*07:02					
HLA-	11,21	4	2	1	5
C*06:02					
HLA-	12,62	0	0	0	0
C*07:01					
HLA-	12,50	0	1	0	0
C*04:01					

Таблица 6 – Число высокоаффинных пептидов в вариантах вируса SARS-CoV-2



Рисунок 13 – Влияние мутаций в основных вариантах SARS-CoV-2 на число высокоаффинных пептидов молекул HLA-A*01:01, HLA-A*02:01, HLA-A*24:02. Оранжевый цвет обозначает число пептидов увеличивших аффинность взаимодействия до 50 иМоль и ниже. Синим цветом обозначено число высокоаффинных пептидов, уменьшивших аффинность взаимодействия до более чем 50 нМоль

Можно заключить, что было проведено сравнительное исследование генотипов ГКГС-I у госпитализированных пациентов с COVID-19 первой и третьей волн пандемии. Изучены генотипы 147 больных (первая волна) и 219 (третья волна). Обнаружено значительное увеличение доли пациентов с обструктивной болезнью легких, ожирением и артериальной гипертензией в третьей волне COVID-19. Это обстоятельство может быть связано не только с особенностями варианта Дельта, но и с возможной усталостью населения от соблюдения противоэпидемических мероприятий, что привело к заражению групп риска, ранее строго соблюдавших режим социального дистанцирования [Chan и др., 2021].

Проверена гипотеза о том, может ли частота аллелей ГКГС-I значимо различаться между тремя группами: пациенты, переболевшие COVID-19 в первую волну пандемии, пациенты, переболевшие COVID-19 в третью волну и популяционной группой. Обнаружили, что для всех возможных групповых сравнений только один аллель из наиболее распространенных аллелей имел статистически значимое отношение шансов после поправки на множественность сравнений. Частота аллеля HLA-A*01:01 в группе Волна 3 снизилась вдвое по сравнению с группой Волна 1. Ранее аллель HLA-A*01:01 считался аллелем риска заражения и тяжелого течения COVID-19 в первой волне [Ishii, 2020; Naemi и др., 2021; Pisanti и др., 2020; Shkurnikov и др., 2021]. В то же время сообщалось и о защитной роли этого аллеля в отношении формирования тяжелой двусторонней пневмонии, вызванной COVID-19 [Suslova и др., 2022].

Было выдвинуто предположение, что снижение частоты носительства HLA-A*01:01 среди больных третьей волны могло быть связано с особенностями ранее сформированного Т-клеточного иммунитета. Известно, что до 50% случаев COVID-19 протекают бессимптомно [Alene и др., 2021; Byambasuren и др., 2020] и приводят к образованию нейтрализующих антител и мультиспецифических Тклеток [Reynolds и др., 2020]. В то время как эффективность нейтрализующих антител для новых вариантов вируса снижается [Dupont и др., 2021], сформированный пул мультиспецифических Т-клеток в большинстве случаев может обеспечить иммунный ответ вне зависимости от мутаций вируса [Nersisyan и др., 2022b].

Для проверки этой гипотезы, было проанализировано количество вирусных пептидов, взаимодействующих с 12 наиболее распространенными аллелями в европейской популяции, с помощью методов биоинформатики. Аллель HLA-A*01:01 оказался одним из аллелей с умеренной способностью взаимодействовать с пептидами как структурных, так и неструктурных белков вируса. Также было показано, что у носителей HLA-A*01:01 меньше предсказанных высокоаффинных пептидов по сравнению с не носителями данного аллеля, независимо от волны COVID-19.

Анализ подтвержденных иммуногенных эпитопов SARS-CoV-2 по базе HLA-A*01:01 IEDB показал, что для идентифицировано 10 данных иммунодоминантных эпитопов из ORF1ab и только три не из ORF1ab. В свою очередь, для молекулы HLA-A*02:01 показан 51 иммунодоминантный эпитоп из ORF1ab и 59 эпитопов не из ORF1ab. Так, соотношение иммунодоминантных эпитопов из ORF1ab для молекулы HLA-A*01:01 было в 3,8 раза больше, чем для молекулы HLA-A*02:01. Среди иммунодоминантных для HLA-A*01:01 эпитопов преобладают эпитопы из ORF1ab. Стабильность этого участка позволяет ожидать, что они сохранят свою иммуногенность в новых вариантах SARS-CoV-2. Данные результаты были дополнительно подтверждены анализом Т-клеточных ответов 28 носителей аллелей HLA-A*01:01 и HLA-A*02:01, переболевших COVID-19 в первую волну пандемии. Частота истинно положительных ответов для эпитопов ORF1ab были значительно выше для HLA-A*01:01 по сравнению с HLA-A*02:01, что согласуется с данными IEDB. Одним из возможных объяснений этих данных может быть более высокая доля сформированных CD8⁺ Т-клеток центральной памяти у носителей аллеля HLA-A*01:01 по сравнению с носителями HLA-A*02:01, HLA-B*07:02 и HLA-A*24:02.

Кроме того, во многих исследованиях было показано, что HLA-A*01:01рестриктированный эпитоп TTDPSFLRGY, происходящий из ORF1ab, индуцирует исключительно высокую частоту T-клеточных ответов по сравнению с другими иммунодоминантными эпитопами [Gangaev и др., 2021; Kared и др., 2021; Saini и др., 2021; Snyder и др., 2020]. Кроме того, было показано, что ответ мононуклеаров периферической крови носителей HLA-A*01:01, переболевших COVID-19, полученные из неструктурных белков, был выше, чем на структурные белки. У переболевших не имеющих HLA-A*01:01 в генотипе этого не наблюдалось [Titov и др., 2022]. Данное обстоятельство также свидетельствует о высокой важности Т-клеточного ответа, сформированного на эпитопы из ORF1ab, для носителей HLA-A*01:01.

Ни один иммунодоминантный эпитоп HLA-A*01:01 существенно не изменил своей аффинности из-за мутаций в циркулирующих вариантах вируса SARS-CoV-2: Дельта G/478K.V1, Омикрон (BA.1 – BA.4). В то же время мутации затронули иммунодоминантные для других аллелей эпитопы. Интересно, что HLA-A*01:01 был единственным аллелем в проведенном анализе с относительно большим количеством высокоаффинных пептидов, не затронутых мутациями. С учетом того, что частота возникновения мутаций в ORF1ab является наиболее низкой [Vilar, Isom, 2021], высокоаффинные пептиды из ORF1ab для всех анализируемых аллелей менее подвержены мутациям по сравнению с пептидами из остальных белков.

В данном исследовании было продемонстрировано значительное снижение HLA-A*01:01 частоты встречаемости носителей аллеля среди госпитализированных пациентов во время третьей волны пандемии COVID-19. Расчет аффинности взаимодействия между молекулами ГКГС-І и пептидами SARS-CoV-2 выявил возможную причину уменьшения частоты встречаемости носителей аллеля HLA-A*01:01. Разные гены и, следовательно, белки SARS-CoV-2 мутируют с разной скоростью. Ген ORF1ab крайне консервативен по сравнению с другими генами SARS-CoV-2. Носители HLA-A*01:01 имеют значительное количество высокоаффинных эпитопов этого гена. В когорте выздоровевших пациентов первой волны COVID-19 были подтверждены результаты компьютерного моделирования и продемонстрирована более высокая частота встречаемости иммунодоминантных эпитопов из белков гена ORF1ab вируса SARS-CoV-2 у носителей HLA-A*01:01 по сравнению с эпитопы этого гена у

носителей HLA-A*02:01. Более того, анализ результатов одноклеточного Т-клеток выздоровевших фенотипирования y пациентов показал, что преобладающим фенотипом у носителей HLA-A*01:01 являются Т-клетки центральной памяти. Преобладание Т-лимфоцитов данного фенотипа может способствовать формированию длительного Т-клеточного иммунитета у носителей аллеля. Наши результаты могут стать основой для данного создания высокоэффективных вакцин на основе пептидов ORF1ab.

4.3 Особенности презентации пептидов вариантов Омикрон ВА.1– ВА.5 вируса SARS-CoV-2 молекулами ГКГС

мутации SARS-CoV-2 Известно, что вируса могут приводить к существенным изменениям аффинностей взаимодействий соответствующих пептидов с молекулами ГКГС [Agerer и др., 2021; Motozono и др., 2021]. Согласно данным портала Nextstrain (https://nextstrain.org) доминирующим вариантом SARS-CoV-2 в 2022 году являлся Омикрон. Известно, что большое число мутаций в Спайк-белке позволили Омикрону эффективно уклоняться от антител против Спайк-белка базового штамма [Planas и др., 2022]. Также Спайк-белок данного варианта потерял способность взаимодействия с сериновой протеазой TMPRSS2, в следствие чего эффективность репликации вируса значительно снизилась [Shuai и др., 2022]. Ранее было показано, что мутации в вариантах Омикрон ВА.1 и ВА.2 приводят к критическому снижению аффинности взаимодействия HLA-DRB1*03:01 и единственного эпитопа Спайк-белка, соответствующего данной молекуле ГКГС [Nersisyan и др., 2022с]. Интересно, что к падению аффинности приводили две различные мутации, затрагивающие единый регион: делеция N211, замена L212I и вставка ЕРЕ 212-214 в случае варианта ВА.1, замена V213G в случае ВА.2. Подобный анализ не проводился для вариантов ВА.3, ВА.4 и ВА.5.

Нами был проведён сравнительный анализ эффективности презентации вирусных пептидов вариантов Омикрон ВА.1–ВА.5 наиболее распространенными вариантами молекул ГКГС.

Первичные последовательности белков различных вариантов SARS-CoV-2 получали из портала GISAID [Elbe, Buckland-Merrett, 2017b] в формате FASTA,

102

используя следующие идентификаторы: уханьский исходный штамм: EPI ISL 6699752; EPI ISL 402125; Омикрон BA.1: BA.2: Омикрон EPI ISL 9884589; Омикрон BA.3: EPI ISL 9854919; Омикрон BA.4: EPI ISL 11873073; Омикрон ВА.5: EPI ISL 13302233.

На Рисунке 14 приведена диаграмма мутаций вариантов Омикрон ВА.1–ВА.5 вируса SARS-CoV-2 (89 уникальных мутаций). Значительная часть мутаций была общей для нескольких вариантов: 24 мутации (27%) были общими для всех вариантов, 9 мутаций (10%) были общими для четырех вариантов, 13 мутаций (15%) – для трех вариантов, 11 мутаций (12%) – для двух вариантов. Остальные изменения (36%) были специфичны для различных вариантов Омикрона. Более половины от всех изменений (46 из 89 мутаций, 52%) приходились на Spike белок. Важно отметить, что специфические мутации были равномерно распределены по всем белкам SARS-CoV-2 (точный тест Фишера применяли для каждого белка в отдельности, p > 0,3 во всех случаях).

Ранее было показано, что большое количество вирусных эпитопов по всем протеоме вируса (включая вспомогательные и неструктурные белки) ограничивает возможность уклонения вируса от презентации антигена за счет единиц-десятков мутаций [Nersisyan и др., 2022с]. Вследствие этого дальнейший анализ был сфокусирован на Спайк-белке SARS-CoV-2, так как на использовании данного белка основано значительное число вакцин против COVID-19. В случае анализа ГКГС-І были получены согласованные изменения аффинностей мутантных пептидов различных вариантов Омикрона. А именно, для всех пяти вариантов было обнаружено существенное снижение аффинностей взаимодействий вирусных пептидов из Спайк-белка с молекулами ГКГС, кодируемыми аллелями HLA-В*07:02 и HLA-C*01:02. В первом случае (HLA-B*07:02) тысячекратное снижение аффинности было следствием аминокислотной замены Р681Н (оригинальный эпитоп – SPRRARSVA), во втором случае (HLA-C*01:02) пятикратное снижение аффинности объяснялось заменой Y505H, попавшей в эпитоп YQPYRVVVL (обе замены Р681Н и У505Н присутствовали во всех вариантах Омикрона, Рисунок 14). Также были найдены мутации, существенно повышающие аффинность связывания

некоторых пептидов с молекулами ГКГС-І. Так, три соседние замены на позициях 371, 373, 375 Спайк-белка приводили к появлению эпитопов с аффинностью меньше 50 нМоль для HLA-A*32:01: VLYNLAPFF (BA.1), VLYNFAPFF (BA.2– BA.5). Позициям 373 и 375 соответствовали замены S373P и S375F, присутствующие в вариантах BA.1–BA.5, позиции 371 соответствовала замена S371L в случае варианта BA.1 и S371F для остальных вирусов.

Менее согласованная картина наблюдалась в случае аллелей ГКГС класса II. Для вышеупомянутого аллеля HLA-DRB1*03:01 существует единственный пептид Спайк-белка с предсказанной аффинностью связывания менее 50 нМоль (PINLVRDLPQGFSAL, 27 нМоль), при этом аффинность снижается на два порядка в следствие мутаций ВА.1 (делеция N211, замена L212I, вставка 212–214 ЕРЕ) и на один порядок в случае BA.2 (замена V213G). Предсказанные с помощью методов биоинформатики изменения были ранее валидированы нами экспериментально с использованием ИФА [Nersisyan и др., 2022с]. Интересно, что последовательности вариантов Омикрон ВА.4 и ВА.5 в данном регионе оказались идентичны ВА.2 (замена V213G), тогда как в случае ВА.3 наблюдались делеция N211 и замена L212I, приводящие к неожиданному увеличению аффинности связывания на 30% (Рисунок 15). Таким образом, эффект наблюдаемых мутаций в случае аллеля HLA-DRB1*03:01 можно разделить на три класса: вставка 212-214 ЕРЕ ведет к полной потере взаимодействия, замена V213G уменьшает аффинность взаимодействия на порядок, тогда как замена L212I двукратно увеличивает аффинность связывания (делеция N211 не является релевантной, так как соответствует фланговой части пептида).



Рисунок 14 – Распределение мутаций по пяти вариантам (ВА.1–ВА.5) Омикронштамма SARS-CoV-2. Подписи строк включают в себя название вирусного белка и идентификатор мутации (в локальных координатах соответствующего белка). Цвета на вертикальной полосе слева соответствуют вирусным белкам

Аффинность связывания с HLA-DRB1*03:01

Базовый штамм	T <i>PINLVRDLPQGFSAL</i> EPL	27 нМ
BA.1	TPI -I VR EPE DLPQGFSALEPL	>5000 нМ
BA.2 BA.4 BA.5	TPINL G RDLPQGFSALEPL TPINL G RDLPQGFSALEPL TPINL G RDLPQGFSALEPL	147 нМ
BA.3	TPI -I VRDLPOGFSALEPL	19 нМ

Рисунок 15 – Мутации в эпитопе PINLVRDLPQGFSAL (выделен курсивом) приводят к изменению аффинности взаимодействия с HLA-DRB1*03:01. Жирным шрифтом выделены мутации

Схожий по силе эффект наблюдался для семейства аллелей HLA-DRB1*15 (HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB1*15:02, HLA-DRB1*15:03). В случае вирусов BA.2, BA.4, BA.5 наблюдалось появление нового эпитопа YSVLYNFAPFFAFKC (44 нМоль) в следствие четырех ко-локализованных мутаций S371F, S373P, S375F, T376A. В случае же вирусов BA.1 и BA.3, отличающихся отсутствием мутации T376A, повышения предсказанной аффинности связывания не происходило.

Таким образом, было показано, что пептиды пяти вариантов Омикрон SARS-CoV-2 обладают различными профилями аффинностей связывания с молекулами главного комплекса гистосовместимости. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости изучения Т-клеточного иммунного ответа к каждому из вариантов Омикрон BA.1–BA.5 по отдельности.

4.4 Оценка влияния мутаций на иммунодоминантные эпитопы вируса SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 Для оценки мутаций иммуногенность влияния на валидированных методом ELISpot эпитопов было отобрано 47 пептидов, полученных из различных белков SARS-CoV-2 [Titov и др., 2022]. Для каждого из 133 пациентов, переболевших COVID-19, с известным генотипом ГКГС-I, аффинность взаимодействия проанализировали конкретного пептида С соответствующей молекулой ГКГС. В результате получили 67 уникальных пар

106

«аллель-пептид», для которых известны следующие характеристики: доля пациентов, (не) обладающих заданным HLA аллелем и (не) отвечающих на выбранный пептид. Среди уникальных пар отобрали те, у которых доля пациентов с заданным аллелем, отвечающих на выбранный пептид была не меньше 0,5, а не отвечающих – не больше 0,2. Оказалось, что среди 67 уникальных пар 33 пары, содержащие 25 уникальных пептидов, удовлетворяли этим условиям, т.е. являются иммунодоминантными.

Были отобраны наиболее распространённые варианты вируса SARS-CoV-2 (21 вариант, включая референсный вариант Wuhan-Hu-1 [Carabelli и др., 2023], Таблица 7) и отсортировали их по дате появления их первой расшифрованной последовательности в базе данных GISAID.

GISAID ID	Название штамма	Штамм	Впервые	Дата
	по GISAID		детектирован	
EPI ISL 402125	hCoV-	Wuhan-Hu-1	China	2019-
	19/Wuhan/Hu-			12-31
	1/2019			
EPI_ISL_842052	hCoV-	Zeta GR/484K.V2	Brazil	2020-
	19/England/PORT-	(P.2)		00-00
	2EAFC1/2020			
EPI_ISL_581117	hCoV-	Alpha 202012/01	UK	2020-
	19/England/MILK-	GRY (B.1.1.7)		09-21
	9E2FE0/2020			
EPI_ISL_801973	hCoV-	Iota GH/253G.V1	USA/New	2020-
	19/USA/NY-	(B.1.526)	York	10-09
	MSHSPSP-			
	PV21166/2020			
EPI_ISL_648527	hCoV-	Epsilon	USA/California	2020-
	19/USA/CA-CZB-	GH/452R.V1		10-16
	12872/2020	(B.1.429+B.1.427)		
EPI_ISL_660190	hCoV-19/South	Beta GH/501Y.V2	South Africa	2020-
	Africa/KRISP-	(B.1.351)		10-23
	K004312/2020			
EPI_ISL_1534645	hCoV-	Lambda	Peru	2020-
	19/Peru/LIM-INS-	GR/452Q.V1		11-30
	869/2020	(C.37)		

Таблица 7 – Штаммы SARS-CoV-2 использованные в анализе

Продолжение Таблицы 7

EPI ISL 895058	hCoV-19/Japan/PG-	Delta GK	Japan	2020
	13394/2020	(B.1.617.2+AY.12	-	-12-
		2)		05
EPI_ISL_166351	hCoV-	Delta GK	India	2020
6 – –	19/India/ILSGS00941/2	(B.1.617.2+AY.43		-12-
	020			12
EPI ISL 760883	hCoV-	Eta G/484K.V3	UK/Nigeri	2020
	19/England/CAMC-	(B.1.525)	a	-12-
	C769B3/2020			15
EPI ISL 792680	hCoV-19/Japan/IC-	Gamma	Brazil/Japa	2021
	0561/2021	GR/501Y.V3	n	-01-
		(P.1)		02
EPI ISL 107393	hCoV-	Theta	Philippines	2021
4	19/Norway/3458/2021	GR/1092K.V1		-02-
		(P.3)		05
EPI ISL 165255	hCoV-19/Russia/SPE-	B.1.1.523	Russia	2021
5	RII-MH15668S/2021			-03-
				09
EPI ISL 131507	hCoV-	Delta GK	Australia	2021
	19/Australia/NSW-	(B.1.617.2)		-03-
	R0167/2021			18
EPI ISL 137209	hCoV-	Kappa G/452R.V3	India	2021
3	19/India/ILSGS00308/2	(B.1.617.1)		-03-
	020			18
EPI ISL 309989	hCoV-19/Spain/MD-	Mu GH	Colombia	2021
	51402239/2021	(B.1.621+B.1.621.		-07-
		1)		00
EPI ISL 669975	hCoV-19/South	Omicron (BA.1)	South	2021
	Africa/CERI-KRISP-		Africa	-11-
	K032226/2021			19
EPI ISL 988458	hCoV-19/USA/CA-	Omicron (BA.2)	USA	2022
9	CDPH-			-01-
	3000303104/2022			24
EPI_ISL_985491	hCoV-	Omicron (BA.3)	Denmark	2022
9 – –	19/Denmark/DCGC-			-02-
	362114/2022			06
EPI_ISL_118730	hCoV-	Omicron (BA.4)	Denmark	2022
73	19/Denmark/DCGC-			-04-
	469344/2022			02
EPI ISL 133022	hCoV-19/India/MH-	Omicron (BA.5)	India	2022
33	INSACOG-CSIR-			-06-
	NEERI1872/2022			09
Для каждого из ранее отобранных 25 иммунодоминантных пептидов проверили, не исчезают ли они в результате мутаций РНК вируса. Оказалось, что из них лишь 4 исчезают (Таблица 8), а оставшийся 21 пептид не подвержен мутациям.

GISAID	RWYFYYLGTGP	FQPTNGV	HTTDPSFL	TTDPSFL	Дат
	EAGL	GY	GRY	GRY	a
EPI_ISL_402	Ν	Spike	NSP3	NSP3	201
125		-			9-
					12-
					31
EPI ISL 842		Spike	NSP3	NSP3	202
052		-			0-
					00-
					00
EPI ISL 581	Ν		NSP3	NSP3	202
117					0-
					09-
					21
EPI ISL 801	Ν	Spike	NSP3	NSP3	202
973		-			0-
					10-
					09
EPI ISL 648	Ν	Spike	NSP3	NSP3	202
527		-			0-
					10-
					16
EPI_ISL_660	Ν		NSP3	NSP3	202
190					0-
					10-
					23
EPI ISL 153	Ν	Spike	NSP3	NSP3	202
4645		-			0-
					11-
					30
EPI ISL 895	Ν	Spike	NSP3	NSP3	202
058		-			0-
					12-
					05

Таблица 8 – Пептиды SARS-CoV-2 утратившие иммуногенность в результате мутаций вируса

Продолжение Таблицы 8

EPI_ISL_1663516	Ν	Spike	NSP3	NSP3	2020-
EPI_ISL_760883	N	Spike	NSP3	NSP3	2020-
EPI_ISL_792680	N		NSP3	NSP3	12-15
EPI ISL 1073934	N		NSP3	NSP3	01-02
		a. ''			02-05
EPI_ISL_1652555	N	Spike	NSP3	NSP3	2021- 03-09
EPI_ISL_1315070	N	Spike			2021-
EPI_ISL_1372093	N	Spike			2021-
EPI_ISL_3099892	N		NSP3	NSP3	2021-
EPI_ISL_6699752	N		NSP3	NSP3	2021-
EPI_ISL_9884589	N		NSP3	NSP3	2022- 01-24
EPI_ISL_9854919	N		NSP3	NSP3	2022-
EPI_ISL_11873073	N		NSP3	NSP3	2022-
EPI_ISL_13302233	N		NSP3	NSP3	04-02
					06-09

В Таблице 9 представлены валидированные иммунодоминантные пептиды, не подвергнувшиеся мутациям в наиболее распространенных вариантах SARS-CoV-2.

Аллель ГКГС Пептид Кла Доля ответов Доля ответов cc у носителей у пациентов ГКГ соответствую не С щего аллеля являющихся носителями соответствую щего аллеля **KCYGVSPTK** Ι 1.00 0.06 A*03:01 Ι A*11:01 **ATEGALNTPK** 1.00 0.00 A*30:01 **KTIQPRVEK** Ι 1,00 0,02 DRB1*01:01, LSYYKLGASORV Π 2,60 0.20 DRB3*02:02, AGD DQB1*03:01, DQB1*02:01 IGYYRRATRRIRG 0.00 DRB1*13:01. Π 0.50 DRB1*11:04, GD DRB1*11:01 A*03:01 **MVTNNTFTLK** Ι 0,50 0.03 **ALSKGVHFV** Ι 0,53 0.00 A*02:01 A*02:01 LLLLDRLNOL Ι 0.53 0.07 **IEDLLFNKVTLAD** DRB3*02:02, Π 0,53 0,00 DRB4*01:03 AG **LTDEMIAQY** A*01:01 Ι 0.54 0.00 DRB1*13:01, IGYYRRATRRIRG Π 0.56 0.15 DRB1*11:04 GD FTSDYYQLY A*01:01 Ι 0,56 0,10 B*27:05 GRLQSLQTY Ι 0,60 0,01 IGYYRRATRRIRG Π 0,18 DRB1*11:04, 0,60 DRB1*11:01 GD MEVTPSGTW B*44:03 Ι 0,67 0,07 A*01:01 PTDNYITTY 0.00 Ι 0.69 DRB1*13:01, IGYYRRATRRIRG Π 0,10 0,69 DRB1*11:01 GD DRB1*01:01. **TSRTLSYYKLGA** Π 0,71 0,00 DRB1*07:01 **SORVA QYIKWPWYI** Ι 0,71 0,12 A*23:01 B*40:01 MEVTPSGTWL Ι 0.75 0.05 KCYGVSPTK A*03:01, Ι 0,78 0,00 A*11:01

Таблица 9 – Консервативные Т-клеточные эпитопы вируса SARS-CoV-2, иммуногенность которых экспериментально подтверждена методом ELISpot

Продолжение Таблицы 9

DRB1*13:01,	GAVILRGHLRIAGHHL	II	0,80	0,00
DRB1*11:01,	GR			
DRB1*11:04				
B*07:02	SPRWYFYYL	Ι	0,80	0,00
DRB1*07:01	TSRTLSYYKLGASQR	II	0,80	0,12
	VA			
DRB1*13:01,	GAVILRGHLRIAGHHL	II	0,83	0,20
DRB1*11:04	GR			
A*03:01	KTFPPTEPK	Ι	0,88	0,14
A*03:01,	KTFPPTEPK	Ι	0,92	0,00
A*30:01				
DRB1*13:01,	GAVILRGHLRIAGHHL	II	0,94	0,19
DRB1*11:01	GR			
A*02:01	YLQPRTFLL	Ι	0,98	0,02

Можно заключить, что мутации вируса SARS-CoV-2 практически не затрагивают иммунодоминантные эпитопы. Отсутствие мутаций в иммунодоминантных эпитопах свидетельствует о высокой устойчивости Т-клеточного иммунитета к эволюции вируса.

ГЛАВА 5. РОЛЬ МИКРОРНК В РЕГУЛЯЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСА И МАКРООРГАНИЗМА

5.1 Мутации SARS-CoV-2 приводят к снижению числа регионов связывания с микроРНК ткани лёгких

За более чем два года пандемии вирус SARS-CoV-2 значительно мутировал, причем далеко не все его мутации привели к изменению последовательности вирусных белков в силу вырожденности генетического кода [Nersisyan и др., 2022а]. Не исключено, что данные мутации могли закрепляться в геноме вируса под влиянием микроРНК альвеоцитов. Мы проверили гипотезу об эволюционном давлении микроРНК, характерных для ткани лёгких человека, на геном вируса SARS-CoV-2.

Среди более чем 129 миллионов последовательностей SARS-CoV-2 были отобраны 273, отражающие ключевые штаммы и их варианты, циркулировавшие в Москве и московском регионе с начала пандемии и до сентября 2022 года (Рисунок 16).



Рисунок 16 – Варианты вируса SARS-CoV-2, включенные в анализ

Отобранные варианты SARS-CoV-2 были разделены на две группы хронологически:

– группа «Ранние штаммы» включала в себя штаммы «Альфа» (5 вариантов)
и «Дельта» (52 варианта), циркулировавшие в московском регионе с начала
эпидемии до января 2022 года;

- группа «Штаммы Омикрон» включала 216 вариантов штамма «Омикрон».

Оказалось, что полученные группы имеют схожее качество прочтения РНК: гипотеза доминирования для распределений долей нераспознанных нуклеотидов между двумя группами отклонена (критерий Манна-Уитни, p = 0,5).

Анализ результатов секвинирования образцов ткани лёгких позволил выявить более чем 300 видов микроРНК. В то же время, всего на 32 из них пришлось более 95% всех молекул микроРНК в этой ткани. Список высокопредставленных микроРНК и их доля от всех молекул микроРНК в ткани лёгких приведён на Рисунке 17. Для высокопредставленных микроРНК были определены регионы вирусной РНК, обратно-комплиментарные их seed-региону.

Для проверки гипотезы об эволюционном давлении микроРНК, характерных для ткани лёгких человека, на геном вируса SARS-CoV-2, было оценено изменение числа регионов связывания между группами сравнения. Усреднили количество регионов связывания каждого варианта SARS-CoV-2 с высокоэкспрессированными микроРНК с учётом их представленности в ткани лёгких (Рисунок 18). Для того, чтобы исключить влияние длины вирусной РНК, полученное взвешенное среднее было нормировано на длину РНК и приведено к длине штамма «Wuhan-Hu-1» (30331 нуклеотид). В группе «Ранние штаммы» взвешенное среднее статистически значимо меньше по сравнению с группой «Штаммы Омикрон» (критерий Манна-Уитни, p = 0,0002). Таким образом, более поздние мутации в РНК SARS-CoV-2 приводят к возможной потере регуляторной активности микроРНК.



Рисунок 17 – Взвешенное среднее (по микроРНК с учетом их экспрессии) количества регионов связывания по группам «Ранние штаммы» и «Штаммы Омикрон», приходящихся на 30331 нуклеотид (длина штамма «Wuhan-Hu-1»)

Анализ вклада отдельных микроРНК в данное снижение (Рисунок 18) показал, что оно прежде всего связано с hsa-miR-21-5p, hsa-miR-30a/e- 3p, hsa-miR-451a. Необходимо отметить, что в группе «Штаммы Омикрон» возросло влияние hsa-miR-24-3p.



Рисунок 18 – Отклонение количества регионов связывания каждой высокоэкспрессированной микроРНК в каждом из анализируемых вариантов вируса от штамма «Wuhan-Hu-1», приходящихся на 30331 нуклеотид (длина штамма «Wuhan-Hu-1»). МикроРНК упорядочены по их экспрессии в ткани лёгких. Рядом с названием микроРНК указана их доля от общего числа молекул микроРНК в

115

Тем не менее, вопрос о том, какие именно из кодирующих участков SARS-CoV-2 теряют позиции связывания остается открытым. Выравнивание анализируемых штаммов вируса относительно штамма «Wuhan-Hu-1» позволило сравнить распределение позиций регионов связывания с учетом экспрессии микроРНК. Более строго, каждый регион связывания, обусловленный некоторой микроРНК, вносил вклад в распределение, равный экспрессии этой микроРНК. Для сравнения распределений регионов связывания между группами «Штаммы Омикрон» и «Ранние штаммы», распределения по всем штаммам, принадлежащим к соответствующей группе, были усреднены. Данный анализ позволил установить, что регионы связывания распределены не равномерно по кодирующим участкам РНК (Рисунок 19).



Рисунок 19 – Взвешенное среднее (по микроРНК с учетом их экспрессии) количества регионов связывания по группам «Ранние штаммы» и «Штаммы Омикрон»

Более детальный анализ значимых изменений регуляторного вклада микроРНК по каждому из кодирующих регионов представлен в Таблице 10. В 5ри 3р-нетранслируемых областях вируса практически полностью отсутствуют места связывания с микроРНК ткани лёгких. При этом можно выделить четыре белоккодирующие области вируса на которые приходится подавляющее число мест связывания с микроРНК: NSP3, NSP4, NSP12 и NSP14. Все они принадлежат к ORF1ab.

Таблица 10 – Значимые отличия количества регионов связывания в геноме SARS-CoV-2 с микроРНК ткани лёгких

Кодируемый	Длина,	Число регионов связывания на 100 молекул					
белок	нуклеотидов	микроРНК	микроРНК				
		Ранние	Штаммы	FDR			
		штаммы	Омикрон				
NSP15	1038	33,72	31,14	0,00001			
NS8	366	13,79	14,07	0,00001			
NSP6	870	18,60	11,38	0,00001			
N	1260	19,54	19,60	0,00001			
NSP2	1914	19,15	18,52	0,00001			
NSP13	1803	40,21	38,63	0,00001			
NSP3	5835	106,36	106,58	0,0037			
NSP5	918	32,73	32,70	0,0198			
Весь геном	30331	723,88	711,80	0,00001			
вируса							

FDR – значимость различий после поправки на множественность сравнений

Ген ORF1ab кодирует ряд неструктурных белков, ответственных за дальнейшую экспрессию структурных и вспомогательных белков, а также репликацию вируса [Badua, Baldo, Medina, 2021]. Его трансляция осуществляется вирусом в первую очередь. В результате синтезируется полипептид, который после аутопротеолиза разрезается на 16 отдельных белков (NSP1 – NSP16) [Hartenian и др., 2020]. Аутопротеолическая активность обусловлена наличием папаинподобных протеолитических доменов в мультидоменном белке NSP3 [Hartenian и др., 2020], на который по нашим данным приходится наибольшее число регионов обусловлено связывания с микроРНК клетки-хозяина. Возможно, это эволюционным приспособлением вируса микроРНК-окружению К И использованию его для эпигенетической регуляции своего генома. Более того, в области кодирующей NSP15, NS8, и NSP6, значимо снижается количество регионов связывания с микроРНК в «Штаммах Омикрон» (*p* < 0,01). Ранее было показано, что снижение числа таких регионов приводит к снижению вирулентности вируса восточного конского энцефалита (EEEV) [Trobaugh и др., 2014b]. Более того, белок NS8 (ORF8) способен подавлять созревание молекул главного комплекса гистосовместимости класса I и их транслокацию на поверхность зараженной клетки [Matsuoka и др., 2022; Zhang и др., 2021a].

Можно заключить, что вирус SARS-CoV-2 практически не имеет регионов связывания в 5р- и 3р-нетранслируемых областях с микроРНК характерными для ткани лёгких. Тем не менее вирус обладает значительным числом мест связывания с микроРНК в регионе NSP3-NSP5, ответственном за аутопротеолиз вирусных полипептидов и формирование вирионов. В вариантах штамма Омикрон произошло значимое снижение мест связывания с микроРНК клеток-хозяина, что могло способствовать снижению патогенности данного штамма.

5.2 Влияние микроРНК на экспрессию рецептора АСЕ2

Молекулярный механизм проникновения SARS-CoV-2 в клетки человека еще не до конца изучен и остается предметом активных исследований. Очевидно, что ключевыми игроками при проникновении вируса в клетку-хозяина являются ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) и трансмембранная сериновая протеаза 2 (TMPRSS2). В частности, взаимодействие этих мембранных белков с вирусным шиповидным белком (S-белком) имеет решающее значение для эндоцитоза вирусной частицы [Hoffmann и др., 2020b; Lukassen и др., 2020].

Основной функцией микроРНК является негативная посттранскрипционная и трансляционная регуляция экспрессии генов [Hobert, 2008]. Аберрантная экспрессия микроРНК связана с различными патологиями, включая рак [Galatenko и др., 2018; Maltseva и др., 2014; Reddy, 2015], неврологические [Nelson, Wang, Rajeev, 2008; Sheinerman, Umansky, 2013] и сердечно-сосудистые заболевания [Carè и др., 2007]. Некоторые микроРНК, кодируемые клеткой-хозяином, могут проникновение вируса не моделировать только в клетку-хозяин, но И жизнедеятельность вируса внутри неё. Моделирующая активность может быть реализована путем взаимодействия с мРНК как клетки-хозяина, так и вируса [Bruscella и др., 2017; Veksler-Lublinsky и др., 2010].

МикроРНК представлены в клетке в различных изоформах (изо-микроРНК), которые отличаются друг от друга на 1-3 нуклеотида на 5'- или 3'-концах молекул [Morin и др., 2008]. Важно отметить, что многочисленные исследования подтвердили важность анализа профилей экспрессии изо-микроРНК. Так, на основе профиля изо-микроРНК был построен алгоритм машинного обучения, который позволил различать тридцать два различных типа рака. Авторы продемонстрировали, что подобная классификация возможна только на основе анализа изо-микроРНК [22]. Также важно отметить, что две 5'-изо-микроРНК (т.е. изо-микроРНК, имеющие разные 5'-концы) одной и той же микроРНК имеют разный набор мРНК-мишеней из-за различной последовательности seed-области [Mercey и др., 2017; Маgee и др., 2018]. В данном подразделе мы исследовали механизмы регуляции ACE2 и TMPRSS2, опосредованной изо-микроРНК, в различных органах человека. Биоинформационный анализ был проведен с использованием общедоступных парных наборов данных секвенирования микроРНК/мРНК.

5.2.1 Профили экспрессии ACE2 и TMPRSS2 в разных органах

Для изучения профиля экспрессии ACE2 и TMPRSS2 в тканях человека была использована общедоступная база данных The Cancer Genome Atlas (TCGA; https://www.cancer.gov/tcga). Данная база данных содержит информацию об экспрессии мРНК и микроРНК в опухоли и соседних участках условно здоровой ткани различных органов. В частности, были проанализированы данные 541 образца ткани (11 различных органов). Мы обнаружили, что оба фермента были высоко экспрессированы во всех проанализированных тканях (Рисунок 20) (числовые характеристики приведены в Таблицах А.4 и А.5). Так, ген ACE2 показал наибольшую экспрессии в толстой кишке, почках, желудке и печени, в то время как в других органах его средний уровень экспрессии был на 2-5 log2 единиц меньше и оставался примерно на одном уровне. Экспрессия гена TMPRSS2 была выше по сравнению с ACE2 почти во всех анализируемых тканях (средний log2(кратное изменение) = 3,18), достигая своего пика в простате.



Рисунок 20 – Распределение экспрессии *ACE2* и *TMPRSS2* в органах человека. А – экспрессия ACE2, В – экспрессия *TMPRSS2*

5.2.2 Взаимодействия между изо-микроРНК и ACE2/TMPRSS2

Для выявления предполагаемых взаимодействий между изо-микроРНК и генами ACE2/TMPRSS2 в отдельных тканях была использована двухэтапная процедура. Во-первых, программное обеспечение TargetScan было использовано для создания списка изо-микроРНК, которые потенциально могут связываться с 3'-UTR целевых мРНК. Затем был проведен корреляционный анализ для выявления изо-микроРНК, имеющих значительную отрицательную корреляцию с уровнями экспрессии генов ACE2/TMPRSS2 в каждом органе. В результате было выявлено 10 и 23 изо-микроРНК, которые потенциально могут регулировать ACE2 и TMPRSS2 соответственно. Наибольшее количество изо-микроРНК, нацеленных на ACE2, было обнаружено в ткани почек (6 изо-микроРНК) и легких (3 изо-микроРНК), в то время, как в случае TMPRSS2 наибольшее количество регулирующих изо-микроРНК было экспрессировано в пищеводе (11 изо-микроРНК), желудке (8 изо-микроРНК) и молочной железе (6 изо-микроРНК) (Рисунок 21).



Рисунок 21 – изо-микроРНК, регулирующие ACE2 и TMPRSS2. А) ACE2, В) TMPRSS2. Цвет каждой клетки указывает на уровень экспрессии изомикроРНК. Ячейка пуста (белая), если экспрессия изо-микроРНК не коррелирует с соответствующим геном

Наибольшее пересечение соответствовало изо-микроРНК, регулирующим экспрессию гена TMPRSS2 в пищеводе и желудке (4 общих изо-микроРНК).

Интересно, что некоторые микроРНК (в том числе hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-335-3p и hsa-miR-452-5p) экспрессировались как 5'- изо-микроРНК (+1, -1 и +3 нуклеотида соответственно) так и канонических форм. Кроме того, мы идентифицировали две микроРНК, регулирующие ACE2/TMPRSS2, которые экспрессируются более чем в двух тканях: hsa-miR-125a-5p (нацеленная на ACE2 в пищеводе, почках и легких), а также hsa-miR-199a-5p (регулирующая экспрессию TMPRSS2 в печени, желудке и теле матки, Рисунок 22).



Рисунок 22 – Значимые корреляции hsa-miR-125а-5р/АСЕ2 и hsa-miR-199 5р/TMPRSS2 в разных органах. Голубые области соответствуют 95% доверительному интервалу

Для дальнейшего изучения взаимодействия между различными изомикроРНК и соответствующими мРНК мы сосредоточились на генах, несущих микроРНК в своих интронах. Всего мы обнаружили, что 14 из 33 изо-микроРНК кодируются внутри интронов в смысловой ориентации (Таблица 11). Интересно, что hsa-miR-125a-5p (нацеленная на ACE2 в легких, почках и пищеводе) и hsa-let-7e-5p (нацеленная на TMPRSS2 в желудке и пищеводе) кодируются в одном и том же интроне гена SPACA6.

Пре-микроРНК	Ген-хозяин
hsa-mir-335	MEST
hsa-mir-139	PDE2A
hsa-let-7e, hsa-mir-125a	SPACA6
hsa-mir-23b	AOPEP
hsa-let-7f-2, hsa-mir-98	HUWE1
hsa-mir-28	LPP
hsa-mir-9-1	Clorf6l
hsa-mir-149	GPC1
hsa-mir-204	TRPM3
hsa-mir-664a	RAB3GAP2

Таблица 11 – Пре-микроРНК, закодированные в интронах в смысловой ориентации

5.2.3 Лизин-специфическая деметилаза 5В регулирует ACE2 и TMPRSS2 посредством репрессии активности let-7e/miR-125a и miR-141/miR-200

Для выявления регуляторов взаимодействий между hsa-let-7e-5p/hsa-miR-125a-5p и ACE2/TMPRSS2, был проведен поиск белков, регулирующих транскрипцию данных микроPHK, с использованием литературных баз данных взаимодействий. Так, ранее было показано, что лизин-специфическая деметилаза 5B (JARID1B, кодируемая геном KDM5B) репрессирует транскрипцию микроPHK hsa-let-7e / hsa-mir-125a и семейства miR-200 (включая miR-141, miR- 200a, miR-200b, miR-200c и miR-429), способствуя деметилированию гистона H3K4me3 в регуляторных областях микроPHK, тем самым облегчая эпигенетическую репрессию их транскрипции. Последнее приводит к увеличению экспрессии генов ACE2 и TMPRSS2, поскольку hsa-miR-125a-5p вместе с микроPHK из семейства miR-200 нацелена на 3'-UTR мPHK ACE2, а hsa-let-7e-5p нацелена на 3'-UTR TMPRSS2. В результате эпигенетическая активность JARID1B может косвенно регулировать экспрессию ACE2 и TMPRSS2. Схема данных взаимодействий представлена на Рисунке 23.



Рисунок 23 – Схема взаимодействий JARID1B, микроРНК let-7e/miR-125a и miR-141/miR-200 и ферментов ACE2/TMPRSS2

5.2.4 Экспрессия JARID1B ассоциирована с экспрессией ACE2 и TMPRSS2 в большинстве клеток человека

Для более глубокого понимания предполагаемых взаимодействий между генами JARID1B и ACE2/TMPRSS2, мы проанализировали общедоступные данные секвенирования PHK единичных клеток (scRNA-seq), полученных из отдельных органов человека [Sungnak и др., 2020]. В целом, экспрессия всех трех генов была относительно низкой в большинстве типов клеток, что приводило к высокому уровню отсева результатов секвенирования. В частности, средний показатель отсева (т.е. отношение количества клеток без прочтений, выровненных на JARID1B, ACE2 или TMPRSS2, к общему количеству клеток) для всех типов

клеток составил 87,9% для KDM5B, 99,1% для ACE2 и 93,2% для TMPRSS2. Таким образом, корреляция между экспрессией генов, образующих произвольную пару на уровне одной клетки, сильно смещена из-за большой доли клеток без прочтений.

Чтобы преодолеть проблему, вызванную высокими показателями отсева, мы рассчитали среднюю экспрессию каждого гена для всех типов клеток из наборов данных. За последним последовала бинаризация исследованных полученных профилей экспрессии. В частности, ген считался «экспрессированным» в данном типе клеток, если его средняя экспрессия в этом типе клеток превышала первый квартиль экспрессии во всех типах клеток. В результате ген АСЕ2 был экспрессирован в 114 из 272 проанализированных клеток, а 100 типов клеток (87,7% от общего числа) также экспрессировали KDM5B. Это наблюдение указывает на то, что экспрессия гена KDM5B может быть необходима для экспрессии ACE2 (биномиальный тест $p = 2,2 \times 10^{-7}$) в большинстве клеток. Аналогичный вывод можно сделать для генов KDM5B и TMPRSS2, поскольку 135 из 159 типов клеток (84,9%), экспрессирующих TMPRSS2, также экспрессируют КDM5В (биномиальный критерий $p = 1,61 \times 10^{-7}$).

Также, были определены типы клеток, в которых уровни экспрессии генов KDM5B, ACE2 и TMPRSS2 были выше, чем соответствующие верхние квартили (Таблица 12). Интересно, что в список типов клеток с высоким уровнем экспрессии вышеуказанных генов вошли: клетки носового эпителия (реснитчатые и секреторные), бронхиальные клетки (реснитчатые, секреторные и базальные), а также реснитчатые и альвеолярные клетки паренхимы легких.

Орган	Тип клеток	Экспрессия гена		
		KDM5B	ACE2	TMPRSS2
Эпителий	Реснисчатые	0,85 (96,7%)	0,12	0,74
носоглотки			(97,1%)	(95,2%)
Эпителий	Бокаловидные	0,92 (97,4%)	0,13	0,52
носоглотки			(97,4%)	(91,5%)
Паренхима	Альвеоциты 2 типа	0,32 (87,5%)	0,03	1,02
лёгких			(90,1%)	(97,8%)

Таблица 12 – Типы клеток с наибольшей экспрессией генов KDM5B, ACE2 и TMPRSS2

Предстательная	Клетки Клара	0,30 (86,0%)	0,01	1,00
жедеза			(79,0%)	(97,4%)
Поджелудочная	Протоковые	0,52 (92,3%)	0,01	0,65
железа			(82,0%)	(94,5%)
Эпителий	Секреторные	0,72 (94,5%)	0,07	0,37
бронхов			(95,2%)	(88,2%)
Эпителий	Реснисчатые	0,66 (93,8%)	0,03	0,45
бронхов			(90,4%)	(90,1%)
Прямая кишка	Предшественники	0,26(80,1%)	0,02	0,69
			(89,7%)	(94,9%)
Яички	Сперматогониальные	0,81 (96,3%)	0,04	0,08
	стволовые клетки		(92,6%)	(79,4%)
Паренхима	Реснисчатые	0,40 (89,3%)	0,03	0,44
лёгких			(91,2%)	(89,7%)
Эпителий	Базальные	0,75 (95,2%)	0,04	0,07
бронхов			(92,3%)	(78,3%)
Предстательная	Бугорковые	0,26 (80,5%)	0,01	0,54
жедеза			(77,2%)	(92,3%)
Прямая кишка	Энтероэндокринные	0,33 (87,9%)	0,04	0,32
			(93,8%)	(86,8%)
Почки	Эпителиальные	0,24 (77,6%)	0,02	0,25
	клетки-		(86,0%)	(84.6%)
	предшественники			

Продолжение Таблицы 12

Экспрессия генов представлена в виде log2-преобразованных прочтений гена на десять тысяч картированных прочтений, усредненных по всем клеткам данного типа. Значения в скобках указывают соответствующий процентиль распределения экспрессии по всем типам клеток. Строки таблицы отсортированы по средней экспрессии генов KDM5B, ACE2 и TMPRSS2.

Было исследовано потенциальные взаимодействия между микроРНК и генами ACE2/TMPRSS2 в различных органах человека. Показано, что наряду с ключевой ролью обоих ферментов во время проникновения SARS-CoV/SARS-CoV-2 в клетку, ACE2 и микроРНК, направленных на него, также влияют на развитие острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС). Предыдущие исследования указывали на важную роль ACE2 при OPДС, поскольку дефицит ACE2 в легких усиливал его степень [Imai и др., 2005]. Кроме того, было показано, что экспрессия гена ACE2 подавляется в легких на фоне инфицирования SARS-CoV [Kuba и др., 2005]. В то время другая исследовательская группа сообщила о

значительном увеличении экспрессии кластера микроРНК hsa-miR-200c-3p/hsamiR-141-3p при вирусе птичьего гриппа H5N1, обусловленной белками вируса [Liu и др., 2017]. Интересно, что hsa-miR-200c-3p и hsa-miR-141-3p могут непосредственно взаимодействовать с 3'-UTR мРНК АСЕ2, поскольку трансфекция клеток НЕК293T соответствующими миметиками и ингибиторами микроРНК приводила к значительному снижению или увеличению экспрессии АСЕ2 соответственно [Liu и др., 2017]. Эти результаты указывают на предполагаемую связь между вирусной инфекцией и последующим развитием ОРДС, вызванным снижением экспрессии АСЕ2 в тканях легких. Кроме того, эксперименты по оверэкспрессии и нокдауну микроРНК, проведенные на эпителиальных клетках почечных канальцев НК-2, показали, что hsa-miR-125b (которая принадлежит к тому же семейству микроРНК, что и hsa-miR-125a) непосредственно регулирует АСЕ2 [Huang и др., 2016].

С использованием курируемой базы данных взаимодействий, были обнаружены убедительные признаки того, что ген JARID1B может репрессировать экспрессию семейства микроРНК hsa-let-7e/ hsa-miR-125a, а также семейства hsamiR-200, предположительно посредством эпигенетических механизмов. Ранее Митра и соавт. [Mitra и др., 2011] экспериментально продемонстрировали возможность подавления транскрипции hsa-let-7e и hsa-miR-125a посредством деметилирования H3K4me3 JARID1B. В частности, shPHK-опосредованный нокдаун JARID1B в клетках MCF-7 и T47D приводил к многократному увеличению экспрессии обеих микроРНК, в то время как анализ ChIP подтвердил деметилирование НЗК4 соответствующих регуляторных последовательностей ДНК. Группа Enkhbaatar и соавт. [Enkhbaatar и др., 2013] показала, что JARID1B подавляет транскрипцию семейства hsa-miR-200 по сходному механизму. В частности, сверхэкспрессия JARID1B в клеточной линии рака легкого A549 приводила к 3-кратному снижению экспрессии hsa-miR-200a и hsa-miR-200c, в то время как нокдаун JARID1В приводил к 1,5-кратному увеличению их уровней. Последующий анализ ChIP показал предполагаемые изменения в метилировании H3K4me3 соответствующих участков ДНК. Таким образом, полученные

127

результаты согласуются с экспериментальными данными, показывающими существование регуляторной сети, включающей семейства микроРНК hsa-let-7e/hsa-miR-125a/hsa-miR-200, гистондеметилазу JARID1B, а также гены ACE2/TMPRSS2, а также предполагают новый механизм регуляции экспрессии ACE2. Кроме того, анализ данных секвенирования РНК единичных клеток убедительно подтверждает существование таких взаимодействий в других клетках и показывает, что в большинстве клеток человека ACE2 и TMPRSS2 не экспрессируются без JARID1B.

Потенциальные взаимодействия между АСЕ2 и модификаторами гистонов, такими как HAT1, HDAC2 и JARID1B, в легких ранее были показаны Pinto B. и соавторами [Pinto и др., 2020]. Кроме того, Gordon D. et al. предложил использовать ингибирование гистондеацетилазы 2 (HDAC2) для лечения COVID-19 [Gordon и др., 2020а]. В частности, авторы описали взаимодействие между белком HDAC2 и основной вирусной протеазой NSP5, предполагая, что NSP5 может ингибировать транспорт HDAC2 в ядро, тем самым изменяя его функциональную активность. Кроме того, они предлагают тестировать определенные репрессоры HDAC2, включая вальпроевую кислоту и апицидин, поскольку их влияние на HDAC2 может подавлять активность вируса. Необходимо отметить, что вальпроевая кислота также напрямую ингибирует JARID1B в эмбриональных клетках почек человека (HEK 293) [Ganai, Kalladi, Mahadevan, 2015] и эмбриональных стволовых клетках человека H9 (H9 hESC) [Krug и др., 2013]. Таким образом, подавление активности модификаторов гистонов может регулировать клеточный ответ на вирусную инфекцию, задействуя сложный регуляторный механизм, включающий гены АСЕ2 и TMPRSS2.

Ранее сообщалось, что ряд микроРНК, регулирующих экспрессию ACE2 и TMPRSS2, также способствуют процессу вирусной инфекции. Так, было показано, что нуклеокапсидный белок коронавируса человека OC43 (HCoV-OC43) связывается с hsa-miR-9-5p, важным негативным регулятором транскрипционного фактора NF-кВ [Lai и др., 2014b]. Последнее приводит к активации NF-кВ и последующему изменению врожденного иммунного ответа. Mallick B. и соавт.

[Mallick, Ghosh, Chakrabarti, 2009] показали, что hsa-miR-98-5р взаимодействует с 3'-UTR шиповидного белка SARS-CoV в бронхоальвеолярных стволовых клетках. Авторы также предположили, что такие взаимодействия могут быть использованы вирусом для уклонения от быстрой элиминации иммунной системой.

Хотя также сообщалось об аберрантной экспрессии нескольких других микроРНК коронавирусной инфекции, были во время они не среди предполагаемых регуляторов генов ACE2 или TMPRSS2, идентифицированных в рамках данного исследования. Например, с помощью глубокого секвенирования микроРНома легкого мыши при заражении SARS-CoV Peng и соавторы [Peng и др., 2011b] показали, что непосредственно после заражения в клетках легких возрастает экспрессия hsa-let-7f-5p, hsa-miR-139-3p, hsa-miR-139-5p. Аналогичный эксперимент был проведен на РНК, выделенной из клеток аденокарциномы легких человека Calu-3, инфицированных MERS-CoV [Zhang и др., 2020]. Четыре другие микроРНК экспрессировались аберрантно, экспрессия микроРНК hsa-miR-98-5p была повышена, a hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p и hsa-miR-141-3p – снижена. Важно отметить, что из-за структурного сходства между MERS-CoV/SARS-CoV и SARS-CoV-2 можно предположить, что описанные взаимодействия мРНК/микроРНК могут способствовать поддержанию уровня экспрессии ACE2/TMPRSS2 во время коронавирусной инфекции, тем самым регулируя инфекционный процесс.

5.3 Роль циркулирующей микроРНК miR-19b в прогнозе исхода COVID-19

В данном подразделе мы изучили особенности профиля микроРНК плазмы крови пациентов с различной тяжестью течения новой коронавирусной инфекции COVID-19 и оценили возможность взаимодействия микроРНК с геномом SARS-CoV-2.

Для анализа были использованы первичные данные секвенирования микроРНК (GSE195898), выделенных из плазмы крови из 3 выздоровевших и 8 умерших пациентов (группа сравнения) с крайне тяжелой формой COVID-19, сопоставимых по полу и возрасту, проходивших лечение в отделении интенсивной

терапии IRCCS Policlinico San Donato (Милан, Италия). Для каждого пациента был оценен профиль микроРНК плазмы крови на момент поступлении в больницу (Т0) и перед выпиской или смертью (Т1).

Результаты секвенирования показали, что в момент поступления в лечебное учреждение (T0) в плазме крови пациентов в количестве более 150 rpm присутствовало 932 вида микроРНК и их 5`-изоформ. При этом в момент времени T1 количество видов молекул составляло 990. Причем 54 вида молекул встречались только в T0, а 112 – только в T1. К наиболее высоко представленным в T0 и T1 можно отнести следующие микроРНК: hsa-miR-22-3p|0, hsa-miR-339-3p|0, hsa-miR-451a|0.

Анализ различий в профиле микроРНК у выздоровевших и не выздоровевших пациентов показал, что значимо изменилась экспрессия 46 микроРНК. В T0 у выздоровевших в последствие пациентов была выше экспрессия hsa-miR-19b-3p|0 (в 4,5 раза, p = 0,017), hsa-miR-25-3p|+1 (в 4,8 раза, p = 0,047). В T1 значимо различалась представленность 291 микроРНК. Наибольшие различия представленности в плазме между группой выздоровевших пациентов и группой сравнения были отмечены для следующих микроРНК: hsa-miR-451a|0 (в 13 раз, p =7,65e-07), hsa-miR-22-3p|0 (в 4,3 раза, p = 7,67e-05), hsa-miR-19b-3p|0 (в 14 раз, p =1,23e-06).

В ряде исследований была продемонстрирована взаимосвязь представленности hsa-miR-451a с уровнем гемолиза в образцах крови [Shkurnikov и др., 2016; Rasmussen и др., 2010b]. Была проверена гипотеза о значимости различий в представленности микроРНК ассоциированных с гемолизом между группами сравнения в T0 и T1 (Таблица 13). На момент поступления в стационар уровень микроРНК, ассоциированных с гемолизом и эритропоэзом, не различался между группами сравнения. При этом в T1 у группы выздоровевших пациентов были значимо повышены все микроРНК, ассоциированные с гемолизом и эритропоэзом.

	Представленность микроРНК в плазме в T0, log2RPM			Представленность микроРНК в плазме в T1, log2RPM		
микроРНК	Выздоровевшие	Скончавшиеся	р	Выздоровевшие	Скончавшиеся	р
hsa-miR-						
451a 0	$14,4 \pm 2,2$	$13,2 \pm 1,7$	0,0959	$17,4 \pm 1,8$	$13,9 \pm 1,6$	1,0e-06
hsa-miR-						
16-5p 0	$11,6 \pm 1,5$	$11,6 \pm 1,3$	0,9370	$13,9 \pm 1,3$	$12,1 \pm 0,8$	2,0e-04
hsa-miR-						
486-5p 0	$11,2 \pm 2,8$	$10,3 \pm 1,5$	0,1206	$13,7 \pm 1,8$	$10,5 \pm 1,3$	1,0e-05
hsa-miR-						
93-5p 0	$10,7 \pm 1,9$	$10,1 \pm 1,2$	0,1771	$12,8 \pm 1,3$	$10,1 \pm 0,9$	4,0e-07
hsa-miR-						
17-5p 0	9,3 ± 1,4	9 ± 1	0,4637	$11 \pm 1,1$	$9,4 \pm 0,7$	4,0e-04
hsa-miR-						
20a-5p 0	8,9 ± 1	8,9 ± 1	0,7719	$11,1 \pm 1,1$	$9,4 \pm 0,8$	2,0e-04
hsa-miR-						
107 0	8,8 ± 1,2	$8,8 \pm 0,7$	0,7764	$10,2 \pm 1,1$	9,1 ± 0,4	1,4e-03
hsa-miR-						
106a-5p 0	8,5 ± 1,2	$7,9 \pm 0,7$	0,1640	$10,2 \pm 1,3$	$8,2 \pm 0,7$	2,0e-05
hsa-miR-						
20b-5p 0	$7,8 \pm 0,4$	$7,6 \pm 0,3$	0,6410	$9,1 \pm 0,7$	$7,7 \pm 0,5$	2,0e-04

Таблица 13 – Различия в представленности микроРНК, ассоциированных с гемолизом, между группами сравнения в T0 и T1

Сравнение множеств микроРНК, различающихся между выздоровевшими пациентами и группой сравнения, показал, что только две микроРНК сонаправленно изменялись в T0 и T1 (Таблица 14).

Таблица 14 – Представленность сонаправленно изменившихся микроРНК в группах сравнения с T0 и T1

	Представленность микроРНК в плазме в T0, log2RPM		Представленность микроРНК в плазме в T1, log2RPM				
микроРНК	Выздоровевш	Скончавшие	p	Выздоровевш	Скончавшие	р	<i>р</i> с поправкой
	ие	ся		ие	ся		на
							множественнос
							ть сравнений
hsa-miR-19b-	$11,7 \pm 2,9$	$10,6 \pm 1,5$	0,01	$14,3 \pm 1,8$	$10,6 \pm 1,4$	1,23e-	0,003
3p 0			7			06	
hsa-miR-25-	$3,4 \pm 1,2$	$1,9 \pm 0,8$	0,04	$4,7 \pm 1,2$	$2 \pm 0,7$	2,25e-	0,046
3p +1			7			05	

Были оценены возможные места связывания с геномом SARS-CoV-2 множества микроРНК, различающегося между группой выздоровевших пациентов и группой сравнения в Т0 и Т1 (Рисунок 24). Ряд микроРНК не имел мест связывания с геномом вируса: hsa-miR-1225-3p|+3, hsa-miR-4498|+1, hsa-miR-6787-5p|+2, hsa-miR-1538|+1, hsa-miR-1307-5p|+1, hsa-miR-7111-5p|+2. Число мест

связывания микроРНК hsa-miR-19b-3p|0 и hsa-miR-25-3p|+1 составляло 12 и 9 соответственно. При этом медиана числа мест связывания остальных микроРНК находилась на уровне 3. Можно сделать вывод о том, что у выздоровевших пациентов был значимо повышен уровень микроРНК, имеющих значительное число мест связывания с геномом SARS-CoV-2 (p = 0.048).



Рисунок 24 – Число возможных мест связывания микроРНК с геномом SARS-CoV-2

Также было проанализировано расположение возможных мест связывания микроРНК с геномом вируса (Рисунок 25). Наибольшее число мест связывания было расположено в регионе ORF1ab, кодирующем неструктурные белки. У микроРНК hsa-miR-19b-3p|0 наибольшее число мест связывания пришлось на короткий регион (338 нуклеотидов), кодирующий белок NSP9. При этом обе анализируемые микроРНК имели по два возможных места связывания с протяженным регионом (5834 нуклеотидов), кодирующим белок NSP3. Ни одна из микроРНК не имела мест связывания в 5` и 3`-нетранслируемых областях генома SARS-CoV-2.



Рисунок 25 – расположение возможных мест связывания микроРНК с геномом вируса SARS-CoV-2

Молекулы микроРНК вовлечены во многие процессы, включая развитие, пролиферацию и апоптоз. Кроме того, микроРНК связаны со многими патологическими процессами [Russo и др., 2014]. Определение экспрессионных профилей микроРНК может выступать в роли метода для классификации, диагностирования и прогнозирования течения заболевания [Kunej и др., 2011]. МикроРНК обнаруживаются в различных биологических жидкостях и обладают заметной стабильностью, что подчеркивает их возможную роль в качестве перспективных малоинвазивных диагностических и прогностических маркеров [Weber и др., 2010]. Кроме того, в ряде исследований молекулы микроРНК рассматриваются в качестве компонента системы врожденного иммунитета [Leon-Icaza, Zeng, Rosas-Taraco, 2019; Usuelli и др., 2022; Zou и др., 2022].

Был изучен профиль циркулирующих в плазме крови больных крайне тяжелой формой COVID-19 микроPHK. Представленность hsa-miR-19b-3p|0 и hsa-miR-25-3p|+1 значимо различалась в плазме крови пациентов с различным исходом COVID-19, как в момент поступления в стационар, так и в момент выписки или смерти. МикроPHK могут выступать в качестве компонента внутриклеточного иммунитета, регулируя трансляцию и репликацию (+) PHK-вирусов и изменяя патогенез вирусных инфекций [Huang и др., 2007; Ingle и др., 2015]. Учитывая, что площадь ткани легких составляет от 75 до 100 м² и то, что она обильно кровоснабжается [Fröhlich и др., 2016], можно предположить, что циркулирующие микроPHK могут проникать с инфицированные альвеоциты и взаимодействовать с вирусом SARS-CoV-2 [Makarova и др., 2021]. МикроPHK hsa-miR-19b-3p|0, значимо повышенная в группе выздоровевших пациентов, относится к числу наиболее высоко представленных в плазме крови. На неё приходится более 1,5%

всех циркулирующих молекул микроРНК. В рамках данной работы показано, что эта микроРНК обладает значительным числом мест связывания с геномом SARS-CoV-2, причем в наиболее его стабильной части –ORF1ab.

Наибольшее число мест связывания hsa-miR-19b-3p|0 приходится на регион длиной 338 нуклеотидов, кодирующий белок NSP9. Белок NSP9 способен связываться с 7SL PHK, входящей в частицы узнавания сигнала, тем самым нарушая транспорт белков в эндоплазматический ретикулум и на мембрану клетки [Banerjee и дp., 2020b]. Одним из семейств белков, созревающих В эндоплазматическом ретикулуме, является семейство молекул главного комплекса гистосовместимости класса 1. Нарушение их созревания может способствовать нарушению противовирусной активности цитотоксических Т-лимфоцитов. Кроме того, hsa-miR-19b-3p/0 способна связываться с регионом, кодирующим белок NSP3. Белок NSP3 совместно с NSP4 отвечает за формирование в зараженной клетке двухмембранных везикул, защищающих вирус от механизмов внутриклеточного врожденного иммунитета [Klatte, Shields, Agoni, 2022]. Таким образом, высоко представленная в плазме крови выздоровевших пациентов с COVID-19 микроРНК hsa-miR-19b-3p/0 способна связываться с регионами вируса, кодирующими белки, ответственные за подавление механизмов внутриклеточного иммунитета.

Кроме того, hsa-miR-19b-3p|0 способна потенциировать активность цитотоксических Т-лимфоцитов. Было обнаружено, что уровни hsa-miR-19b-3p|0 значительно повышены в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов с длительной ремиссией ВИЧ. Оверэкспрессия hsa-miR-19b-3p|0 способствует пролиферации CD8+T-клеток, а также экспрессии интерферона-ү и гранзима В, ингибируя апоптоз CD8+T-клеток, индуцированный стимуляцией анти-CD3/CD28. Было обнаружено, что мишенью miR-19b является ген PTEN [Yin и др., 2019].

Можно заключить, что у пациентов, выздоровевших после крайне тяжелой формы COVID-19, в плазме крови значимо повышен уровень hsa-miR-19b-3p. Данная микроРНК представлена в плазме крови в значимых количествах, способна связываться с регионами SARS-CoV-2, кодирующими белки подавляющие

внутриклеточные механизмы иммунитета. Кроме того, данная микроРНК способна стимулировать функциональную активность и пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов – одного из ключевых компонентов адаптивного клеточного иммунитета против SARS-CoV-2. Результаты исследования могут быть использованы при разработке противовирусных препаратов на основе РНК-интерференции, а также при разработке прогностических тест-систем для оптимизации тактики лечения пациентов с COVID-19.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА И ПРОВЕРКА КЛИНИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ОБОСНОВАННОГО АЛГОРИТМА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ ДЛЯ ПРОГНОЗА ТЯЖЕЛОГО И КРАЙНЕ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ COVID-19 НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ГЕНОТИПА ГКГС-I

В рамках разработки и проверки клинической значимости патогенетически обоснованного алгоритма диагностических мероприятий для прогноза тяжелого и крайне тяжелого течения COVID-19 на основе анализа генотипа ГКГС-I было проведено исследование, включавшее генотипирование 145 пациентов, переболевших COVID-19 в период с июля по август 2021 года с последующим определением риска развития тяжелой формы COVID-19 и сопоставлением оценок с фактическими исходами заболевания.

В исследование выло включено 145 пациентов. При оценке клинической значимости способа оценки риска развития тяжелой формы COVID-19 на основе анализа генотипа ГКГС-I в исследование не включались следующие группы пациентов: беременные, пациенты с сахарным диабетом 1 и 2 типа. Клиническая характеристика пациентов представлена в Таблице 15.

Показатель	Показатель Тяжелое течение		р
		течение	
n	69	76	
Возраст, медиана [25%-75%]	52 [41 - 66]	49 [41 – 57]	0,064
Пол (Муж,/Жен.)	37/32	34/42	0,32
Максимальная степень	ь поражения лёгких	по КТ	
КТ-0	0	2 (2,6%)	
КТ-1	12 (17,4%)	18 (23,7%)	
КТ-2	12 (17,4%)	32 (42,1%)	5,8e-05
КТ-3	17 (24,6%)	14 (18,4%)	
КТ-4	14 (20,3%)	0	
н.д.	14 (20,3%)	10 (13,2%)	
Летальный исход	15 (21,7%)	0	6,0e-06
Ожирение	11 (16,0%)	0	0,0002
Гипертония	16 (23,2%)	22 (29,0%)	0,45

Таблица 15 – Характеристика выборки пациентов с COVID-19

Данная выборка в значительной степени отличается от выборки, использованной при разработке способа оценки риска. В сформированной выборке подавляющее большинство пациентов выздоровели после COVID-19. Летальный исход был отмечен у 10,3% пациентов. В период формирования выборки в московском регионе преобладал вариант АҮ.122 [Шкурников и др., 2022], значительно отличающийся от исходного штамма вируса [Klink и др., 2022].

Группы сравнения (Таблица 15) были сопоставимы по возрасту и половому составу. Ожидаемо в группе пациентов с тяжелым течением COVID-19 преобладали пациенты с объемным поражением лёгких (p = 5,8e-05) и ожирением (p = 0,0002). Также в группе с тяжелым течением COVID-19 зафиксирована высокая частота летальных исходов (p = 6,0e-06).

Были оценены чувствительность и специфичность «Индекса риска» при прогнозе летального исхода COVID-19 и прогноза тяжелого течения COVID-19 (Рисунок 26).



Рисунок 26 – Результаты оценки «Индекса риска»: А – пациенты с COVID-19 среднетяжелого и тяжелого течения; Б – выздоровевшие пациенты и пациенты с летальным исходом



Рисунок 27 – ROC-кривая прогнозе тяжести течения COVID-19 с помощи «Индекса риска». AUC = 0,57

Нами было предложено два пороговых уровня для оценки риска тяжелого течения COVID-19: значение «Индекса риска» менее 41 – благоприятный прогноз; значение «Индекса риска» более 89 – негативный прогноз [Shkurnikov и др., 2021].

Были оценены характеристики прогноза тяжести течения COVID-19 в зависимости от порогового уровня при интерпретации «Индекса риска» (Рисунок 27). Так при пороговом уровне не менее 41 чувствительность составила 0,7, специфичность 0,36, FDR – 0,51. ОШ составило 1,25 (p = 0,6,95% ДИ 0,59 – 2,69), что не позволяет рассматривать данный пороговый уровень в качестве значимого. При пороговом уровне не менее 89 чувствительность составила 0,14, специфичность 0,97, FDR – 0,17 (Рисунок 28). ОШ составило 6,2 (p = 0,014,95% ДИ 1,25 – 60,4).



Рисунок 28 – Зависимость чувствительности и специфичности прогноза тяжести течения COVID-19 в зависимости от порогового уровня при интерпретации «Индекса риска». Пунктирной линией из штрихов обозначен уровень 41. Пунктирной из точек обозначен уровень 89

Аналогичные характеристики были оценены для прогноза летального исхода COVID-19 (Рисунок 29). При пороговом уровне не менее 41 чувствительность составила 0,8, специфичность 0,35, FDR – 0,88. ОШ составило 2,11 (p = 0,39,95% ДИ 0,53 – 12,23), что не позволяет рассматривать данный пороговый уровень в качестве значимого. При пороговом уровне не менее 89 чувствительность составила 0,27, специфичность 0,94, FDR – 0,67 (Рисунок 30). ОШ составило 5,44 (p = 0,023,95% ДИ 1,03 – 24,7).



Рисунок 29 – ROC-кривая прогноза летального исхода COVID-19 с помощью «Индекса риска». AUC = 0,63

Параметр • Специфичность • Чувствительность



Рисунок 30 – Зависимость чувствительности и специфичности прогноза летального исхода COVID-19 в зависимости от порогового уровня при интерпретации «Индекса риска». Пунктирной линией из штрихов обозначен уровень 41. Пунктирной из точек обозначен уровень 89

140

Таким образом была доказана эффективность разработанного на основе полученных в исследовании данных подхода к диагностике и прогнозу тяжести COVID-19.

Исходя из полученных результатов был предложен следующий алгоритм диагностических мероприятий для прогноза тяжелого и крайне тяжелого течения COVID-19 на основе анализа генотипа ГКГС-I:

1) в приемном отделении необходимо провести взятие образца периферической крови или букального соскоба для проведения исследования генов ГКГС-I пациента методом секвенирования следующего поколения;

2) для пациентов, поступивших в приёмные отделения, с подтвержденным COVID-19:

а) выполнить генетическое исследование генов ГКГС-І с целью определения варианта генотипа пациента;

б) в результате обработки ПО результатов генотипирования генов HLA-A, HLA-B, HLA-C пациенту присваивается так называемый «Индекс риска» – число в диапазоне от 0 (нуля) до 100, что пропорционально связано с повышением риска неблагоприятного течения заболевания;

в) если значение «Индекса риска» более 89, пациент относится к группе с высоким риском тяжелого течения COVID-19.

Можно заключить, что был разработан патогенетически обоснованный алгоритм диагностических мероприятий для прогноза тяжелого и крайне тяжелого течения COVID-19 на основе анализа генотипа ГКГС-І.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значительные усилия мирового научного сообщества были направлены на решение вопроса о генетических детерминантах тяжести COVID-19. Полногеномное исследование ассоциаций было наиболее очевидным решением данной проблемы. Однако интерпретация выявленных генетических детерминант, связанных с COVID-19, остается сложной задачей, поскольку большинство генетических вариантов расположены в некодирующих регуляторных областях с высоким неравновесным сцеплением [Smemo и др., 2014; Kumar, Wijmenga, Withoff, 2012; Claussnitzer и др., 2015] и функциональны во временном и пространственном контекстах [The FANTOM Consortium и др., 2014].

Альтернативные подходы поиску генетических К детерминант восприимчивости к COVID-19 базировались на понимании механизмов формирования специфического иммунного ответа на SARS-CoV-2. Интенсивность и характер клеточного иммунного ответа на инфекцию SARS-CoV-2 обусловлены разнообразием как репертуара Т-клеточных рецепторов, так и генотипом ГКГС-I, аллели которого определяют презентацию антигенов при заболевании, а вместе с тем и восприимчивость к заболеванию и исход вирусных инфекций [Zunec, 2020; MacDonald и др., 2000; Ochoa и др., 2020].

В рамках данной работы была разработана и оценена клиническая информативность способа оценки риска развития тяжелого течения COVID-19. Данный способ оценивает способность молекул ГКГС-I, кодируемых генами HLA-А и HLA-C, презентировать пептиды SARS-CoV-2.

Были оценены характеристики прогноза тяжести течения COVID-19 в зависимости от порогового уровня при интерпретации «Индекса риска». При пороговом уровне не менее 41 чувствительность составила 0,7, специфичность 0,36, FDR – 0,51. При пороговом уровне не менее 89 чувствительность составила 0,14, специфичность 0,97, FDR – 0,17. Отношение шансов составило 6,2 (p = 0,014, 95% ДИ 1,25 – 60,4).

Аналогичные характеристики были оценены для прогноза летального исхода COVID-19. При пороговом уровне не менее 41 чувствительность составила 0,8, специфичность 0,35, FDR – 0,88. Отношение шансов составило 2,11 (p = 0,39,95% ДИ 0,53 – 12,23). При пороговом уровне не менее 89 чувствительность составила 0,27, специфичность 0,94, FDR – 0,67. Отношение шансов составило 5,44 (p = 0,023, 95% ДИ 1,03 – 24,7). Можно заключить, что разработанный на первом этапе работы способ оценки риска развития тяжелого течения COVID-19 на основе анализа генотипа ГКГС-I позволяет прогнозировать тяжелое течение заболевания или летальный исход при пороговом уровне не менее 89.

В рамках исследования была определена штаммовая принадлежность вируса SARS-CoV-2 и изучена взаимосвязь генотипа ГКГС-I с тяжестью течения COVID-19, вызванной распространенными летом 2021 года вариантами штамма Дельта SARS-CoV-2: AY.122 и В.1.617.2. У пациентов в возрасте не старше 60 лет со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19 генотипирование ГКГС-I показало, что наиболее частыми аллелями в выборке были HLA-A*02:01 (частота 0,26) и HLA-A*01:01 (частота 0,25), что характерно для популяции московского Анализ влияния мутаций региона. на число вирусных пептидов, взаимодействующих с индивидуальным набором молекул ГКГС-І с аффинностью менее 50 нМоль, показал, что различия достоверны для вспомогательных белков вируса. Так, у инфицированных вариантом АУ.122 число высокоаффинных пептидов значимо сократилось по сравнению с инфицированными вариантом B.1.617.2 (*p* < 0,01).

Значимое снижение числа высокоаффинных пептидов в варианте AY.122 прежде всего связано с мутацией G8R в белке NS8. Данная мутация вызывает падение аффинности взаимодействия пептидов FLGIITTV и FLVFLGIITTV с молекулой ГКГС-I, кодируемой наиболее частым для российской популяции аллелем HLA-A*02:01. Особого внимания заслуживает тот факт, что белок NS8 (ORF8) способен подавлять созревание молекул ГКГС-I и их транслокацию на поверхность зараженной клетки [Matsuoka и др., 2022; Zhang и др., 2021а]. Данные обстоятельства могли внести весомый вклад в превалирование варианта AY.122 в

российской популяции и более тяжелое, по сравнению с другими вариантами штамма Дельта, течение вызванной им COVID-19.

Как уже упоминалось ранее, молекулы ГКГС-І являются одним из ключевых медиаторов первых шагов в развитии специфического иммунного ответа на COVID-19. В данном исследовании были проанализированы различия в генотипе ГКГС-І пациентов в возрасте не старше 60 лет, переболевших COVID-19 в первую и третью волну, оценено влияние мутаций в вирусе SARS-CoV-2 на иммуногенные эпитопы CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Выявлено значительное снижение частоты встречаемости носителей аллеля HLA-A*01:01 среди госпитализированных пациентов во время третьей волны пандемии COVID-19. Расчет аффинности взаимодействия между молекулами ГКГС-I и пептидами SARS-CoV-2 выявил возможную причину уменьшения частоты встречаемости носителей аллеля HLA-A*01:01. Разные гены и, следовательно, белки SARS-CoV-2 мутируют с разной скоростью. Ген ORF1ab крайне консервативен по сравнению с другими генами SARS-CoV-2. Носители HLA-A*01:01 имеют значительное количество высокоаффинных эпитопов этого гена.

В когорте выздоровевших пациентов первой волны COVID-19 были подтверждены результаты компьютерного моделирования и продемонстрирована более высокая частота встречаемости иммунодоминантных эпитопов из белков гена ORF1ab вируса SARS-CoV-2 у носителей HLA-A*01:01 по сравнению с эпитопами этого гена у носителей HLA-A*02:01.

Более того, анализ результатов одноклеточного фенотипирования Т-клеток у выздоровевших пациентов показал, что преобладающим фенотипом у носителей HLA-A*01:01 являются Т-клетки центральной памяти. Преобладание Т-лимфоцитов данного фенотипа может способствовать формированию длительного Т-клеточного иммунитета у носителей данного аллеля и соответственно снижению заражаемости и тяжести заболевания.

Также в рамках данного исследования было оценено влияние мутаций на 25 иммунодоминантных эпитопов вируса SARS-CoV-2. Оказалось, что мутации,
произошедшие с вирусом за более чем два года пандемии, затрагивают только четыре иммунодоминантных эпитопа (16 %).

В рамках данного исследования проверена гипотеза об эволюционном давлении на геном вируса SARS-CoV-2 микроPHK, характерных для ткани лёгких. В результате анализа было установлено, что вирус SARS-CoV-2 практически не имеет регионов связывания в 5р- и 3р-нетранслируемых областях с характерными для ткани лёгких микроPHK. Тем не менее вирус обладает значительным числом мест связывания с микроPHK в регионе NSP3-NSP5, ответственном за аутопротеолиз вирусных полипептидов и формирование вирионов. В вариантах штамма Омикрон произошло значимое снижение мест связывания с микроPHK клеток хозяина, что могло способствовать снижению патогенности данного штамма.

Нами продемонстрировано, что у пациентов, выздоровевших после крайне тяжелой формы COVID-19, в плазме крови значимо повышен уровень hsa-miR-19b-3р и hsa-miR-25-3р. Данные микроРНК представлены в плазме крови в значимых количествах, способны связываться с регионами SARS-CoV-2, кодирующими белки подавляющие внутриклеточные механизмы иммунитета. Кроме того, hsamiR-19b-3p способна стимулировать функциональную активность И Т-лимфоцитов пролиферацию цитотоксических одного ключевых ИЗ компонентов адаптивного клеточного иммунитета против SARS-CoV-2.

Можно заключить, что индивидуальные особенности генотипа ГКГС-I, а также микроРНК вносят значимый вклад в патогенез COVID-19 и формирование Т-клеточного иммунитета к нему (Рисунок 31).

Вклад в тяжелое и крайне тяжелое течение COVID-19 вносят следующие патогенетические факторы: мутации SARS-CoV-2, в том числе и под влиянием микроРНК клеток хозяина, приводящие к исчезновению иммунодоминантных для генотипа ГКГС-I пациента эпитопов, особенности экспрессии микроРНК и генотип ГКГС-I пациента, приводящие к слабому цитотоксическому T-клеточному ответу на начальных этапах заболевания.

145



Рисунок 31 – Патогенетический вклад генотипа ГКГС-І в COVID-19 средней степени тяжести

Совокупность этих факторов приводит к тому, что в промежутке с 3 – 4 до 14 – 16 дня заболевания возникает «иммунологический провал» в который с SARS-CoV-2 борются только компоненты врожденного иммунитета (Рисунок 32).



Рисунок 32 – Патогенетический вклад генотипа ГКГС-I в COVID-19 тяжелой и крайне тяжелой степени тяжести

выводы

1) У пациентов в возрасте до 60 лет генотип ГКГС-І связан с тяжестью течения COVID-19, вызванной вариантом AY.122 штамма Дельта SARS-CoV-2. Значимое снижение числа высокоаффинных пептидов в варианте AY.122 прежде всего связано с мутацией G8R в белке NS8. Данная мутация вызывает падение аффинности взаимодействия пептидов FLGIITTV (с 42 нМоль до 121 нМоль) и FLVFLGIITTV (с 25 нМоль до 59 нМоль) с молекулой ГКГС-І, кодируемой наиболее частым для российской популяции аллелем HLA-A*02:01.

2) Среди госпитализированных в третью волну пандемии COVID-19 пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, значимо снижено число носителей аллеля HLA-A*01:01 ГКГС-I (p = 0,025 с поправкой на множественность сравнений, ОШ = 0,5). Установлено, что носители аллеля HLA-A*01:01 формируют Т-клеточный иммунитет преимущественно к пептидам, кодируемым геном ORF1ab вируса SARS-CoV-2.

3) Мутации практически не затрагивают пептиды вируса SARS-CoV-2, вызывающие CD8⁺ Т-клеточный ответ у пациентов российской популяции. За два года пандемии из 25 иммунодоминантных пептидов вируса мутировали только четыре, что может способствовать длительному сохранению эффективного Т-клеточного иммунитета против SARS-CoV-2.

4) МикроРНК ткани лёгких влияют на эволюцию вируса SARS-CoV-2, вызывая снижение мест связывания вируса с микроРНК клеток хозяина, что значимо проявилось в случае со штаммом Омикрон.

5) Высокая экспрессия циркулирующих в плазме крови микроРНК hsa-miR-25-3p, hsa-miR-19b-3p ассоциирована с благоприятным исходом тяжелого течения COVID-19.

6) Число высокоаффинных пептидов вируса SARS-CoV-2 для молекул ГКГС-I обратно пропорционально вероятности летального исхода заболевания у пациента. Специфичность прогноза тяжелого течения COVID-19 составляет 0,97, отношение шансов – 6,2 (p = 0,014, 95% ДИ 1,25 – 60,4). Специфичность прогноза

летального исхода COVID-19 равна 0,94, отношение шансов – 5,44 (*p* = 0,023, 95% ДИ 1,03 – 24,7).

7) В результате проведенных исследований разработано и зарегистрировано программное обеспечение для прогноза тяжести и исхода течения вирусной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1) При выборе тактики лечения пациента с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, следует руководствоваться результатами исследования генов ГКГС-I, позволяющими оценить возможную перспективу и тенденцию развития коронавирусной инфекции.

2) Поток пациентов, поступающих в ЛПУ с диагнозом COVID-19, может быть разделен на ранних этапах на группы пациентов с потенциально легким или тяжелым течением вирусной инфекции на основании значения «Индекса риска».

Для этого в приемном отделении необходимо провести взятие образца периферической крови или букального соскоба для проведения исследования генов ГКГС-I пациента методом секвенирования следующего поколения.

3) Можно рекомендовать проводить поступающим в приёмные отделения пациентам с подтвержденным COVID-19:

а) выполнить генетическое исследование генов ГКГС-І с целью определения варианта генотипа пациента;

б) в результате обработки ПО результатов генотипирования генов HLA-A, HLA-B, HLA-C пациенту присваивается так называемый «Индекс риска» – число в диапазоне от 0 (нуля) до 100, что пропорционально связано с повышением риска неблагоприятного течения заболевания;

в) если значение «Индекса риска» более 89, пациент относится к группе с высоким риском тяжелого течения COVID-19.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АГ артериальная гипертензия
- БД база данных
- ВОЗ Всемирная организация здравоохранения
- ГКГС главный комплекс гистосовместимости
- ДИ доверительный интервал
- ДМСО диметилсульфоксид
- ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИВЛ инвазивная механическая вентиляция легких
- ИЛ-6 интерлейкин 6
- ИМТ индекс массы тела
- ИФА иммуноферментный анализ
- кДНК комплементарная ДНК
- ЛПВП липопротеины высокой плотности
- ЛПНП липопротеины низкой плотности
- микроРНК малые некодирующие молекулы РНК длиной 18-25 нуклеотидов
- мРНК матричная рибонуклеиновая кислота
- НАН РА Национальная академия наук Республики Армения
- ОИТ отделение интенсивной терапии
- $O\Pi-$ оптическая плотность
- ОРДС острый респираторный дистресс-синдром
- ОТ-ПЦР полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
- ОХ общий холестерол
- ОШ отношение шансов
- ПО программное обеспечение
- при-микроРНК от англ. pri-miRNA или long primary miRNA transcript; длинный первичный микроРНК-транскрипт
 - РНК рибонуклеиновая кислота
 - РПЖ рак предстательной железы

СД – сахарный диабет

СД2 – сахарный диабет 2 типа

сиРНК – от англ. siRNA, small interfering RNA; малые интерферирующие РНК

СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

 $\Phi C E - \phi oc \phi$ атно-солевой буфер

ЭВМ – электронная вычислительная машина

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

АВІ – Армянский институт биоинформатики

ACE2 – от англ. angiotensin-converting enzyme 2; ангиотензинпревращающий фермент 2

AIM-V – безсывороточная среда для выращивания и активации лимфоцитов

AIM2 – от англ. absent in melanoma 2 – отсутствующий при меланоме белок

2

BVDV – от англ. bovine viral diarrhea virus; вирусная диарея коров

CD – от англ. cluster of differentiation; кластер дифференцировки

COVID-19 – от англ. COronaVIrus Disease 2019; коронавирусная инфекция 2019 года

СТО – от англ. C-terminal domain; С-концевой домен

СРБ – С-реактивный белок

Е-белок – от англ. Envelope – оболочка

ELISpot – от англ. Enzyme-Linked ImmunoSpot; иммуноферментный тест с локальным связыванием для качественного выявления выработки антител и интерлейкинов на клеточном уровне в системе in vitro

FASTA – текстовый формат файлов для нуклеотидных или полипептидных последовательностей

FDR – от англ. false discovery rate; ожидаемая доля ложных отклонений

GISAID – от англ. Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data; база данных Глобальной инициативы по обмену данными о птичьем гриппе

QWAS – от англ. genome-wide association study; полногеномное исследование ассоциаций

HbA1c – гликозилированный гемоглобин

HDAC – от англ. histone deacetylases; гистоновая деацетилаза

HLA – от англ. Human Leukocyte Antigen; человеческий лейкоцитарный антиген

IEDB – от англ. Immune Epitope Database and Analysis Resource; База данных и ресурс для анализа иммунных эпитопов

IFN-*γ* – от англ. interferon gamma; интерферон гамма

IgG – от англ. Immunoglobulin G, иммуноглобулин класса G

IRF – от англ. interferon regulatory factors; интерферон-регулирующие факторы

KDM5B – от англ. lysine demethylase 5B; JARID1B; лизин-специфическая деметилаза 5B

М-белок – от англ. Membrane – мембрана

MAPK – от англ. mitogen-activated protein kinases; митоген-активируемые протеинкиназы

MAVS – от англ. mitochondrial antiviral signaling protein; белок противовирусного сигнального пути митохондрий

MDA5 – от англ. melanoma differentiation-associated protein 5; белок, ассоциированный с дифференцировкой меланомы 5

MERS-CoV – коронавирус ближневосточного респираторного синдрома

МНС – от англ. Major Histocompatibility Complex; главный комплекс гистосовместимости

miRISC – от англ. microRNA-induced silencing complex; микроРНКиндуцируемый сайленсинг-комплекс

Мрго – от англ. Main protease; основная гротеаза

N-белок – от англ. Nucleocapsid – нуклеокапсид

NF-кВ – от англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; транскрипцио́нный фактор NF-кВ

NGS – от англ. next generation sequencing; секвенирование нового поколения

NK-клетки – от англ. Natural killer cells; клетки-естественные киллеры

NLR – от англ. NOD-like receptors, где NOD – nucleotide-binding oligomerization domain, нуклеотид-связывающий олигомеризационный домен; NOD-подобные рецепторы

NSP – от англ. Nonstructural protein; неструктурный белок

NTD – от англ. N-terminal domain; N-концевой домен

ORF – от англ. open reading frame; открытая рамка считывания

РАМР – от англ. pathogen-associated molecular patterns; патогенассоциированные молекулярные паттерны

PBMC – от англ. peripheral blood mononuclear cell; мононуклеарная клетка периферической крови

Plpro – от англ. Papain-like protease; папаиноподобная протеаза

PRR – от англ. pattern recognition receptors; рецепторы распознавания паттернов

RBD – от англ. Receptor-binding domain; рецептор-связывающий домен

RHDV – от англ. rabbit hemorrhagic disease virus; вирус геморрагической болезни кроликов

RLR – от англ. RIG-I-like receptors, где RIG-I – retinoic acid-inducible gene I, индуцируемый ретиноевой кислотой ген I; RIG-I-подобные рецепторы I

RSV – от англ. rice stripe virus; вирус штриховатости риса

S-белок – от англ. Spike — шип

SARS-CoV-2 – от англ. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2; коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома 2

scRNA-seq – от англ. Single cell RNA sequencing; секвенирование РНК одиночных клеток

SIRS – от англ. systemic inflammatory response syndrome; синдром системного воспаления

STAT1 – от англ. Signal transducer and activator of transcription 1; преобразователь сигнала и активатор транскрипции 1

STAT2 – от англ. Signal transducer and activator of transcription 2; преобразователь сигнала и активатор транскрипции 2

TCGA – от англ. The Cancer Genome Atlas; атлас ракового генома

Tcm – от англ. central memory T-cells; Т-клетки центральной памяти

TLR – от англ. Toll-like receptors; толл-подобные рецепторы

TMPRSS2 – от англ. Transmembrane protease, serine 2; мембрано-связанная сериновая протеаза 2

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Белоцерковская, Ю. Г. COVID-19: респираторная инфекция, вызванная новым коронавирусом: новые данные об эпидемиологии, клиническом течении, ведении пациентов / Ю. Г. Белоцерковская, А. Г. Романовских, И. П. Смирнов // Consilium Medicum. – 2020. – Т. 22, № 3. – С. 12-20.
- Взаимосвязь прогноза течения COVID-19 с мутациями белка NS8 SARS-CoV-2 в зависимости от штаммовой принадлежности вируса / М. Ю. Шкурников, Д. А. Аверинская, А. Г. Комаров [и др.]. // Доклады Российской Академии Наук. Науки О Жизни. – 2022. – Т. 507, № 1. – С. 460-464.
- Внеклеточные микроРНК (обзор) / Ю. А. Макарова, М. Ю. Шкурников, А. А. Турчинович [и др.] // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 9. – С. 1344-1355.
- Временные методические рекомендации "Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)." Версия 17. Минздрав России, 2022. 260 с.
- 5. Гипербарическая оксигенация в терапии пациентов с COVID-19 / С. С. Петриков, А. К. Евсеев, О. А. Левина [и др.] // Общая Реаниматология. 2020.
 Т. 16, № 6. С. 4-18.
- Демидова, Т. Ю. Особенности течения и последствия COVID-19 у пациентов с избыточным весом и ожирением. Уроки текущей пандемии / Т. Ю. Демидова, Е. И. Волкова, Е. Ю. Грицкевич // Ожирение и метаболизм. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 375-384.
- Длительность и интенсивность гуморального иммунного ответа у медицинских работников, перенесших COVID-19 / С. П. Казаков, Н. В. Давыдова, С. Б. Путков [и др.] // Медицинский вестник ГВКГ им. Н.Н. Бурденко. – 2021, № 4 (6). – С. 29-37.
- Закономерности эпидемического распространения SARS-CoV-2 в условиях мегаполиса / В. Г. Акимкин, С. Н. Кузин, Т. А. Семененко [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2020. – Т. 65, № 4. – С. 203-211.

- Исходы у больных с тяжелым течением COVID-19, госпитализированных для респираторной поддержки в отделения реанимации и интенсивной терапии / П. В. Глыбочко, В. В. Фомин, С. В. Моисеев [и др.] // Клиническая фармакология и терапия. – 2020. – Т. 29, № 3. – С. 25-36.
- 10.Шумпей, Й. Новая коронавирусная болезнь (COVID-19) и "цитокиновый шторм". Перспективы эффективного лечения с точки зрения патофизиологии воспалительного процесса / Й. Шумпей, К. Есиюки, Н. Кусуки // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 9, № 4 (35). С. 13-25.
- 11.Клинико-лабораторная характеристика пациентов с COVID-19 и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа / Т. Ю. Демидова, К. Г. Лобанова, С. Н. Переходов [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2021. Т. 20, № 1. С. 47-58.
- 12.Клиническая характеристика 1007 больных тяжелой SARS-CoV-2 пневмонией, нуждавшихся в респираторной поддержке / П. В. Глыбочко, В. В. Фомин, С. Н. Авдеев [и др.] // Клиническая фармакология и терапия. 2020. Т. 29, № 2. С. 21-29.
- 13.Коллективный иммунитет к SARS-CoV-2 жителей Москвы в эпидемический период COVID-19 / А. Ю. Попова, Е. Б. Ежлова, А. А. Мельникова [и др.] // Инфекционные болезни. – 2020. – Т. 18, № 4. – С. 8-16.
- 14.Коронавирусная болезнь 2019 (COVID-19) и иммуновоспалительные ревматические заболевания. Рекомендации Общероссийской общественной организации "Ассоциация ревматологов России" / Е. Л. Насонов, А. М. Лила, В. И. Мазуров [и др.] // Научно-практическая ревматология. 2021. Т. 59, № 3. С. 239-254.
- 15.Львов, Д. К. Истоки пандемии COVID-19: экология и генетика коронавирусов (betacoronavirus: coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (подрод sarbecovirus), MERS-CoV (подрод merbecovirus) / Д. К. Львов, С. В. Альховский // Вопросы вирусологии. – 2020. – Т. 65, № 2. – С. 62-70.

- 16.Методические аспекты оценки заболеваемости, распространенности, летальности и смертности при COVID-19 / О. М. Драпкина, И. В. Самородская, М. Г. Сивцева [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2020. Т. 19, № 3. С. 302-309.
- 17.Насонов, Е. Л. Иммунопатология и иммунофармакотерапия коронавирусной болезни 2019 (COVID-19): фокус на интерлейкин 6 / Е. Л. Насонов // Научно-Практическая Ревматология. – 2020. – Т. 58, № 3. – С. 245-261.
- 18.Насонов, Е. Л. Коронавирусная болезнь 2019 (COVID-19): размышления ревматолога / Е. Л. Насонов // Научно-практическая ревматология. 2020. Т. 58, № 2. С. 123-132.
- 19.Новая коронавирусная инфекция: особенности клинического течения, возможности диагностики, лечения и профилактики инфекции у взрослых и детей / А. А. Старшинова, Е. А. Кушнарева, А. М. Малкова [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2020. – Т. 19, № 2. – С. 123-131.
- 20.Организация геномного надзора за SARS-CoV-2 в структуре Департамента здравоохранения города Москвы / М. Ф. Латыпова, А. Н. Цибин, А. Г. Комаров [и др.] // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. – 2022. – Т. 30, № S. – С. 1061-1066.
- 21.Оценка специфического Т-клеточного иммунитета у переболевших и вакцинированных против COVID-19 / Т. А. Платонова, М. С. Скляр, А. А. Голубкова [и др.] // Журнал инфектологии. 2022. Т. 14, № 1. С. 96-104.
- 22.Популяционный иммунитет к SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в период эпидемии COVID-19 / А. Ю. Попова, Е. Б. Ежлова, А. А. Мельникова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. 2020, № 3. С. 124-130.
- 23.Профиль микроРНК плазмы крови здоровых доноров / М. Ю. Шкурников,
 Ю. А. Макарова, Е. Н. Князев [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 160, № 11. С. 577-579.
- 24.Серопревалентность антител к SARS-CoV-2 у детей на фоне эпидемии СОVID-19 в Российской Федерации / А. Ю. Попова, В. С. Смирнов, Е. Е.

Андреева [и др.] // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2022. – Т. 101, № 3. – С. 85-97.

- 25.Смирнов, В. С. Врожденный иммунитет при коронавирусной инфекции / В.
 С. Смирнов, А. А. Тотолян // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 259-268.
- 26. Фенотипическое разнообразие специфичных Т-лимфоцитов в клеточном продукте для терапии ЦМВ-инфекции / А. В. Малеева, М. Ю. Дроков, Я. В. Сердюк [и др.] // Гематология и трансфузиология. 2022. Т. 67, № S2. С. 54-55.
- 27.A broad RNA virus survey reveals both miRNA dependence and functional sequestration / T. K. H. Scheel, J. M. Luna, M. Liniger [и др.] // Cell Host & Microbe. 2016. T. 19, № 3. С. 409-423.
- 28.A common strategy for host RNA degradation by divergent viruses / M. M. Gaglia,
 S. Covarrubias, W. Wong, B. A. Glaunsinger // Journal of Virology. 2012. T.
 86, № 17. C. 9527-9530.
- 29.A comparative recombination analysis of human coronaviruses and implications for the SARS-CoV-2 pandemic / S. Pollett, M. A. Conte, M. Sanborn [и др.] // Scientific Reports. 2021. Т. 11, № 1. С. 17365.
- 30.A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirusinduced lung injury / K. Kuba, Y. Imai, S. Rao [и др.] // Nature Medicine. – 2005.
 – T. 11, № 8. – С. 875-879.
- 31.A diamidobenzimidazole STING agonist protects against SARS-CoV-2 infection / F. Humphries, L. Shmuel-Galia, Z. Jiang [и др.] // Science Immunology. 2021.
 T. 6, № 59. С. eabi9002.
- 32.A distinct ssDNA/RNA binding interface in the Nsp9 protein from SARS-CoV-2 / S. El-Kamand, M.-D. Du Plessis, N. Breen [и др.] // Proteins. 2022. Т. 90, № 1. С. 176-185.
- 33.A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis / A. G. Laing, A. Lorenc, I. del Molino del Barrio [и др.] // Nature Medicine. 2020. Т. 26, № 10. С. 1623-1635.

- 34.A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology / A. Rambaut, E. C. Holmes, Á. O'Toole [и др.] // Nature Microbiology. – 2020. – Т. 5, № 11. – С. 1403-1407.
- 35.A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster / J. F.-W. Chan, S. Yuan, K.-H. Kok [и др.] // The Lancet. 2020. Т. 395, № 10223. С. 514-523.
- 36.A feed-forward regulatory loop between androgen receptor and PlncRNA-1 promotes prostate cancer progression. / Z. Fang, C. Xu, Y. Li [и др.] // Cancer letters. 2016. Т. 374, № 1. С. 62-74.
- 37.A knowledge base for the discovery of function, diagnostic potential and drug effects on cellular and extracellular miRNAs. / F. Russo, S. Di Bella, V. Bonnici [и др.] // BMC genomics. 2014. Т. 15 Suppl 3. С. S4.
- 38.A microRNA screen identifies the Wnt signaling pathway as a regulator of the interferon response during flavivirus Infection / J. L. Smith, S. Jeng, S. K. McWeeney, A. J. Hirsch // Journal of Virology. 2017. T. 91, № 8. C. e02388-16.
- 39.A modified vaccinia Ankara vector-based vaccine protects macaques from SARS-CoV-2 infection, immune pathology, and dysfunction in the lungs / N. K. Routhu, N. Cheedarla, S. Gangadhara [и др.] // Immunity. – 2021. – Т. 54, № 3. – С. 542-556.e9.
- 40.A novel severity score to predict inpatient mortality in COVID-19 patients / D. J. Altschul, S. R. Unda, J. Benton [и др.] // Scientific Reports. – 2020. – T. 10, № 1. – C. 16726.
- 41.A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin /
 P. Zhou, X.-L. Yang, X.-G. Wang [и др.] // Nature. 2020. Т. 579, № 7798. –
 C. 270-273.
- 42.A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing / D. E. Gordon, G. M. Jang, M. Bouhaddou [и др.] // Nature. – 2020. – T. 583, № 7816. – C. 459-468.

- 43.A SARS-CoV-2 vaccine candidate would likely match all currently circulating variants / B. Dearlove, E. Lewitus, H. Bai [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2020. Т. 117, № 38. С. 23652-23662.
- 44.A SARS-CoV-2-human protein-protein interaction map reveals drug targets and potential drug-repurposing / D. E. Gordon, G. M. Jang, M. Bouhaddou [и др.] // bioRxiv: The Preprint Server for Biology. 2020. C. 2020.03.22.002386.
- 45.A signaling cascade from miR444 to RDR1 in rice antiviral RNA silencing pathway / H. Wang, X. Jiao, X. Kong [и др.] // Plant Physiology. 2016. T. 170, № 4. C. 2365-2377.
- 46.A single-cell atlas of lymphocyte adaptive immune repertoires and transcriptomes reveals age-related differences in convalescent COVID-19 patients / F. Bieberich, R. Vazquez-Lombardi, A. Yermanos [и др.] // Frontiers in Immunology. 2021. T. 12. C. 701085.
- 47.ACE2 expression and sex disparity in COVID-19 / M. C. Gagliardi, P. Tieri, E. Ortona, A. Ruggieri // Cell Death Discovery. 2020. T. 6, № 1. C. 37.
- 48.ACE2 expression is increased in the lungs of patients with comorbidities associated with severe COVID-19 / B. G. G. Pinto, A. E. R. Oliveira, Y. Singh [и др.] // The Journal of Infectious Diseases. 2020. T. 222, № 4. C. 556-563.
- 49. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2 / X. Lei, X. Dong, R. Ma [и др.] // Nature Communications. 2020. Т. 11, № 1. С. 3810.
- 50.Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling / O. V. Britanova, E. V. Putintseva, M. Shugay [и др.] // The Journal of Immunology. 2014. Т. 192, № 6. С. 2689-2698.
- 51.Al Hamrashdi, M. Regulation of IRF3 activation in human antiviral signaling pathways / M. AL Hamrashdi, G. Brady // Biochemical Pharmacology. – 2022. – T. 200. – C. 115026.
- 52.Alam, T. miRCOVID-19: Potential targets of human miRNAs in SARS-CoV-2 for RNA-based drug discovery / T. Alam, L. Lipovich // Non-Coding RNA. – 2021. – T. 7, № 1. – C. 18.

- 53.Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools / F. F. Gonzalez-Galarza, A. McCabe, E. J. M. dos Santos [и др.] // Nucleic Acids Research. 2019. T. 48, № D1. C. D783–D788.
- 54. Allelic variation in class I HLA determines CD8+ T cell repertoire shape and cross-reactive memory responses to SARS-CoV-2. / J. M. Francis, D. Leistritz-Edwards, A. Dunn [и др.] // Science immunology. 2022. Т. 7, № 67. С. eabk3070.
- 55.Alterations in SARS-CoV-2 Omicron and Delta peptides presentation by HLA molecules / S. Nersisyan, A. Zhiyanov, M. Zakharova [и др.] // PeerJ. 2022. T. 10. C. e13354.
- 56.Altered accumulation of osa-miR171b contributes to rice stripe virus infection by regulating disease symptoms / A. Tong, Q. Yuan, S. Wang [и др.] // Journal of Experimental Botany. 2017. Т. 68, № 15. С. 4357-4367.
- 57.An atlas of active enhancers across human cell types and tissues / The FANTOM Consortium, R. Andersson, C. Gebhard [и др.] // Nature. 2014. T. 507, № 7493. C. 455-461.
- 58.An immunodominant NP105-113-B*07:02 cytotoxic T cell response controls viral replication and is associated with less severe COVID-19 disease / Y. Peng, S. L. Felce, D. Dong [и др.] // Nature Immunology. 2022. T. 23, № 1. C. 50-61.
- 59.An insight into SARS-CoV-2 membrane protein interaction with spike, envelope, and nucleocapsid proteins / P. Kumar, A. Kumar, N. Garg, R. Giri // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2023. T. 41, № 3. C. 1062-1071.
- 60. Analysis of Plasma microRNA Associated with Hemolysis / M. Yu. Shkurnikov,
 E. N. Knyazev, K. A. Fomicheva [и др.] // Bulletin of Experimental Biology and
 Medicine. 2016. Т. 160, № 6. С. 748-750.
- 61.Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure / Y. Imai, K. Kuba, S. Rao [и др.] // Nature. 2005. T. 436, № 7047. C. 112-116.
- 62.Anti-SARS-CoV-2 receptor-binding domain antibody evolution after mRNA vaccination / A. Cho, F. Muecksch, D. Schaefer-Babajew [и др.] // Nature. 2021.
 T. 600, № 7889. C. 517-522.

- 63.Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection / L. Liu, Q. Wei, Q. Lin [и др.] // JCI insight. 2019. Т. 4, № 4. С. e123158, 123158.
- 64.Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7 / P. Wang, M. S. Nair, L. Liu [и др.] // Nature. 2021. Т. 593, № 7857. С. 130-135.
- 65.Antibody status and incidence of SARS-CoV-2 infection in health care workers / S. F. Lumley, D. O'Donnell, N. E. Stoesser [и др.] // New England Journal of Medicine. 2021. Т. 384, № 6. С. 533-540.
- 66. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. / R. D. Morin, M. D. O'Connor, M. Griffith [и др.]
 // Genome research. 2008. Т. 18, № 4. С. 610-621.
- 67.Association of cardiovascular disease with coronavirus disease 2019 (COVID-19) Severity: A Meta-Analysis / G. Aggarwal, I. Cheruiyot, S. Aggarwal [и др.] // Current Problems in Cardiology. – 2020. – Т. 45. – Association of Cardiovascular Disease With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Severity, № 8. – С. 100617.
- 68.Association of HLA Class I Genotypes With Severity of Coronavirus Disease-19 / M. Shkurnikov, S. Nersisyan, T. Jankevic [и др.] // Frontiers in Immunology. 2021. Т. 12. С. 641900.
- 69.Association of HLA class I with severe acute respiratory syndrome coronavirus infection / M. Lin, H.-K. Tseng, J. A. Trejaut [и др.] // BMC medical genetics. 2003. Т. 4. С. 9.
- 70.Association of human-leukocyte-antigen class I (B*0703) and class II (DRB1*0301) genotypes with susceptibility and resistance to the development of severe acute respiratory syndrome. / М. Н. L. Ng, K.-M. Lau, L. Li [и др.] // The Journal of infectious diseases. 2004. Т. 190, № 3. С. 515-518.
- 71. Attenuated replication and pathogenicity of SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron. / H. Shuai, J. F.-W. Chan, B. Hu [и др.] // Nature. 2022. Т. 603, № 7902. С. 693-699.

- 72.Augusto, D. G. HLA variation and antigen presentation in COVID-19 and SARS-CoV-2 infection / D. G. Augusto, J. A. Hollenbach // Current Opinion in Immunology. – 2022. – T. 76. – C. 102178.
- 73.Badua, C. L. D. C. Genomic and proteomic mutation landscapes of SARS-CoV-2
 / C. L. D. C. Badua, K. A. T. Baldo, P. M. B. Medina // Journal of Medical Virology. 2021. T. 93, № 3. C. 1702-1721.
- 74.Bamlanivimab plus Etesevimab in Mild or Moderate Covid-19 / M. Dougan, A. Nirula, M. Azizad [и др.] // The New England Journal of Medicine. 2021. T. 385, № 15. C. 1382-1392.
- 75.Bandopadhyay, M. Exosomal miRNAs in hepatitis B virus related liver disease: a new hope for biomarker / M. Bandopadhyay, M. Bharadwaj // Gut Pathogens. – 2020. – T. 12. – C. 23.
- 76.Banerjee, A. Molecular determinants of SARS-CoV-2 variants / A. Banerjee, K. Mossman, N. Grandvaux // Trends in Microbiology. 2021. T. 29, № 10. C. 871-873.
- 77.Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics / P. J. A. Cock, T. Antao, J. T. Chang [и др.] // Bioinformatics. 2009. T. 25, № 11. C. 1422-1423.
- 78.Biswas, S. K. Spike protein D614G and RdRp P323L: the SARS-CoV-2 mutations associated with severity of COVID-19 / S. K. Biswas, S. R. Mudi // Genomics & Informatics. – 2020. – T. 18, № 4. – C. e44.
- 79.Boguslavsky, D. V. Public policy measures to increase anti-SARS-CoV-2 vaccination rate in russia / D. V. Boguslavsky, N. P. Sharova, K. S. Sharov // International Journal of Environmental Research and Public Health. 2022. T. 19, № 6. C. 3387.
- 80.Brain innate immune response via miRNA-TLR7 sensing in polymicrobial sepsis / L. Zou, J. He, L. Gu [и др.] // Brain, Behavior, and Immunity. – 2022. – Т. 100. – С. 10-24.

- 81.Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19 / Y. Peng, A. J. Mentzer, G. Liu [и др.] // Nature Immunology. 2020. T. 21, № 11. C. 1336-1345.
- 82.Carbohydrates as T-cell antigens with implications in health and disease / L. Sun, D. R. Middleton, P. L. Wantuch [и др.] // Glycobiology. 2016. T. 26, № 10. C. 1029-1040.
- 83.Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2 / J. Shang, Y. Wan, C. Luo [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2020. – Т. 117, № 21. – С. 11727-11734.
- 84.Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes / J. Huang, F. Wang, E. Argyris [и др.] // Nature Medicine. 2007. T. 13, № 10. C. 1241-1247.
- 85.Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza A virus in infected cells / L. Song, H. Liu, S. Gao [и др.] // Journal of Virology. 2010. Т. 84, № 17. С. 8849-8860.
- 86.Cellular miR-130b inhibits replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vitro and in vivo / L. Li, F. Gao, Y. Jiang [и др.] // Scientific Reports. 2015. Т. 5. С. 17010.
- 87.Changes in MicroRNA expression during rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) Infection / B. Hukowska-Szematowicz, A. Maciejak-Jastrzębska, M. Blatkiewicz [и др.] // Viruses. 2020. Т. 12, № 9. С. 965.
- 88.Characterizing isomiR variants within the microRNA-34/449 family. / O. Mercey,
 A. Popa, A. Cavard [и др.] // FEBS letters. 2017. Т. 591, № 5. С. 693-705.
- 89.Choi, G. J. The Potential Role of Dyslipidemia in COVID-19 Severity: an Umbrella Review of Systematic Reviews / G. J. Choi, H. M. Kim, H. Kang // Journal of Lipid and Atherosclerosis. – 2020. – T. 9, № 3. – C. 435-448.
- 90.Choudhury, A. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs / A. Choudhury, S. Mukherjee // Journal of Medical Virology. 2020. T. 92, № 10. C. 2105-2113.

- 91.Christgen, S. Inflammasomes and the fine line between defense and disease / S. Christgen, T.-D. Kanneganti // Current Opinion in Immunology. 2020. T. 62. C. 39-44.
- 92.Circulating miRNAs: cell-cell communication function? / A. Turchinovich, T. R. Samatov, A. G. Tonevitsky, B. Burwinkel // Frontiers in genetics. 2013. T. 4. C. 119.
- 93.Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019 / G. Chen, D. Wu, W. Guo [и др.] // The Journal of Clinical Investigation. 2020. Т. 130, № 5. С. 2620-2629.
- 94.Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study / F. Zhou, T. Yu, R. Du [и др.] // The Lancet. 2020. Т. 395, № 10229. С. 1054-1062.
- 95.Clinical determinants for fatality of 44,672 patients with COVID-19 / G. Deng, M. Yin, X. Chen, F. Zeng // Critical Care. 2020. T. 24, № 1. C. 179.
- 96.Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China / C. Huang, Y. Wang, X. Li [и др.] // The Lancet. – 2020. – Т. 395, № 10223. – С. 497-506.
- 97.Combined agonist-antagonist genome-wide functional screening identifies broadly active antiviral microRNAs / D. Santhakumar, T. Forster, N. N. Laqtom [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2010. – T. 107, № 31. – C. 13830-13835.
- 98.Common, intermediate and well-documented HLA alleles in world populations: CIWD version 3.0.0 / C. K. Hurley, J. Kempenich, K. Wadsworth [и др.] // HLA. - 2020. – T. 95, № 6. – C. 516-531.
- 99.Comorbidities and multi-organ injuries in the treatment of COVID-19 / T. Wang, Z. Du, F. Zhu [и др.] // The Lancet. – 2020. – T. 395, № 10228. – C. e52.
- 100. Competing endogenous RNA network profiling reveals novel host dependency factors required for MERS-CoV propagation / X. Zhang, H. Chu, L. Wen [и др.] // Emerging Microbes & Infections. 2020. Т. 9, № 1. С. 733-746.

- 101. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases / A. Tarke, J. Sidney, C. K. Kidd [и др.] // Cell Reports. Medicine. – 2021. – T. 2, № 2. – C. 100204.
- 102. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19 / L. Kuri-Cervantes, M. B. Pampena, W. Meng [и др.] // Science Immunology. – 2020. – Т. 5, № 49. – С. eabd7114.
- 103. Comprehensive network of miRNA-induced intergenic interactions and a biological role of its core in cancer / V. V. Galatenko, A. V. Galatenko, T. R. Samatov [и др.] // Scientific Reports. – 2018. – Т. 8, № 1. – С. 2418.
- 104. Computational analysis of Targeting SARS-CoV-2, Viral Entry Proteins ACE2 and TMPRSS2, and Interferon Genes by Host MicroRNAs / J. B. Pierce, V. Simion, B. Icli [и др.] // Genes. – 2020. – Т. 11, № 11. – С. 1354.
- 105. Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization. /
 D. Planas, N. Saunders, P. Maes [и др.] // Nature. 2022. Т. 602, № 7898. С. 671-675.
- 106. Coronaviridae Study Group of the International committee on taxonomy of viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. / Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses // Nature microbiology. 2020. T. 5, № 4. C. 536-544.
- 107. Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegasome intermediate / E. M. Cottam, H. J. Maier, M. Manifava [и др.] // Autophagy. 2011. Т. 7, № 11. С. 1335-1347.
- 108. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques / K. McMahan, J. Yu, N. B. Mercado [и др.] // Nature. – 2021. – Т. 590, № 7847. – С. 630-634.
- 109. Correlation of the two most frequent HLA haplotypes in the Italian population to the differential regional incidence of Covid-19 / S. Pisanti, J. Deelen,

A. M. Gallina [и др.] // Journal of Translational Medicine. – 2020. – Т. 18, № 1. – C. 352.

- Cortes, C. Support-Vector Networks / C. Cortes, V. Vapnik // Machine Learning. – 1995. – T. 20, № 3. – C. 273-297.
- 111. Cross-HLA targeting of intracellular oncoproteins with peptide-centric CARs / M. Yarmarkovich, Q. F. Marshall, J. M. Warrington [и др.] // Nature. – 2021. – T. 599, № 7885. – C. 477-484.
- Cryo-EM analysis of the post-fusion structure of the SARS-CoV spike glycoprotein / X. Fan, D. Cao, L. Kong, X. Zhang // Nature Communications. 2020. T. 11, № 1. C. 3618.
- Cryo-EM Structure of an Extended SARS-CoV-2 Replication and Transcription Complex Reveals an Intermediate State in Cap Synthesis / L. Yan, J. Ge, L. Zheng [и др.] // Cell. – 2021. – Т. 184, № 1. – С. 184-193.e10.
- Crystal Structure of Non-Structural Protein 10 from Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 / A. Rogstam, M. Nyblom, S. Christensen [и др.] // International Journal of Molecular Sciences. 2020. Т. 21, № 19. С. 7375.
- Crystal structure of the SARS-CoV-2 non-structural protein 9, Nsp9 / D. R. Littler, B. S. Gully, R. N. Colson, J. Rossjohn / iScience. 2020. T. 23, № 7. C. 101258.
- 116. Cui, J. The evolution of microRNAs in plants / J. Cui, C. You, X. Chen // Current Opinion in Plant Biology. – 2017. – T. 35. – C. 61-67.
- Curtis, H. J. Mirtrons, an emerging class of atypical miRNA / H. J. Curtis,
 C. R. Sibley, M. J. A. Wood // Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. 2012. –
 T. 3, № 5. C. 617-632.
- Deciphering the immunopeptidome in vivo reveals new tumour antigens / A. M. Jaeger, L. E. Stopfer, R. Ahn [и др.] // Nature. 2022. Т. 607, № 7917. С. 149-155.

- Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications / D. Mathew, J. R. Giles, A. E. Baxter [и др.] // Science. 2020. Т. 369, № 6508. С. eabc8511.
- 120. Deep sequencing and proteomic analysis of the microRNA-induced silencing complex in human red blood cells. / I. Azzouzi, H. Moest, B. Wollscheid [и др.] // Experimental hematology. – 2015. – Т. 43, № 5. – С. 382-392.
- 121. Delayed production of neutralizing antibodies correlates with fatal COVID-19 / C. Lucas, J. Klein, M. E. Sundaram [и др.] // Nature Medicine. – 2021. – Т. 27, № 7. – С. 1178-1186.
- 122. Designing an efficient multi-epitope vaccine displaying interactions with diverse HLA molecules for an efficient humoral and cellular immune response to prevent COVID-19 infection / S. R. Mahapatra, S. Sahoo, B. Dehury [и др.] // Expert Review of Vaccines. – 2020. – Т. 19, № 9. – С. 871-885.
- Diamond, M. S. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2 / M. S. Diamond, T.-D. Kanneganti // Nature Immunology. 2022. T. 23, № 2. – C. 165-176.
- 124. Differential hepatitis C virus RNA target site selection and host factor activities of naturally occurring miR-122 3' variants / D. Yamane, S. R. Selitsky, T. Shimakami [и др.] // Nucleic Acids Research. 2017. Т. 45, № 8. С. 4743-4755.
- 125. Differential microRNA expression in the peripheral blood from human patients with COVID-19 / C. Li, X. Hu, L. Li, J.-H. Li // Journal of Clinical Laboratory Analysis. – 2020. – T. 34, № 10. – C. e23590.
- 126. Differential roles of RIG-I like receptors in SARS-CoV-2 infection / D.-M.
 Yang, T.-T. Geng, A. G. Harrison, P.-H. Wang // Military Medical Research. –
 2021. T. 8, № 1. C. 49.
- 127. Differentially expressed non-coding RNAs induced by transmissible gastroenteritis virus potentially regulate inflammation and NF-κB pathway in porcine intestinal epithelial cell line / X. Ma, X. Zhao, Z. Zhang [и др.] // BMC genomics. 2018. T. 19, № 1. C. 747.

- 128. Discordant neutralizing antibody and T cell responses in asymptomatic and mild SARS-CoV-2 infection / C. J. Reynolds, L. Swadling, J. M. Gibbons [и др.]
 // Science Immunology. 2020. T. 5, № 54. C. eabf3698.
- Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. /
 E. Ladewig, K. Okamura, A. S. Flynt [и др.] // Genome research. 2012. T. 22,
 № 9. С. 1634-1645.
- 130. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein / Y. Cai, J. Zhang, T. Xiao [и др.] // Science. 2020. T. 369, № 6511. C. 1586-1592.
- 131. Distribution of HLA allele frequencies in 82 Chinese individuals with coronavirus disease-2019 (COVID-19) / W. Wang, W. Zhang, J. Zhang [и др.] // HLA. 2020. Т. 96, № 2. С. 194-196.
- Distribution of HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1 allele frequencies in patients with COVID-19 bilateral pneumonia in Russians, living in the Chelyabinsk region (Russia) / T. A. Suslova, M. N. Vavilov, S. V. Belyaeva [и др.] // Human Immunology. 2022. T. 83, № 7. C. 547-550.
- 133. Downregulation of miR-146a inhibits influenza A virus replication by enhancing the type I interferon response in vitro and in vivo / F. Zhang, X. Sun, Y. Zhu, W. Qin // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2019. – T. 111. – C. 740-750.
- Early T cell and binding antibody responses are associated with COVID-19
 RNA vaccine efficacy onset / S. Kalimuddin, C. Y. L. Tham, M. Qui [и др.] //
 Med. 2021. T. 2, № 6. С. 682-688.e4.
- 135. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus– infected pneumonia / Q. Li, X. Guan, P. Wu [и др.] // New England Journal of Medicine. – 2020. – T. 382, № 13. – C. 1199-1207.
- 136. Effect of Bamlanivimab vs Placebo on incidence of COVID-19 among residents and staff of skilled nursing and assisted living facilities: a randomized clinical trial / M. S. Cohen, A. Nirula, M. J. Mulligan [и др.] // JAMA. – 2021. – T. 326, № 1. – C. 46-55.
- 137. Effect of early treatment with Hydroxychloroquine or Lopinavir and Ritonavir on risk of hospitalization among patients with COVID-19: The

TOGETHER randomized clinical trial / G. Reis, E. A. D. S. Moreira Silva, D. C. Medeiros Silva [и др.] // JAMA network open. -2021. - T. 4., № 4. - C. e216468.

- 138. Elbe, S. Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health / S. Elbe, G. Buckland-Merrett // Global Challenges. 2017. T. 1, № 1. C. 33-46.
- 139. Elevated expression of miR-19b enhances CD8+ T Cell function by targeting PTEN in HIV infected long term non-progressors with sustained viral suppression / L.-B. Yin, C.-B. Song, J.-F. Zheng [и др.] // Frontiers in Immunology. – 2019. – T. 9. – C. 3140.
- 140. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant / M. Pachetti, B. Marini, F. Benedetti [и др.]
 // Journal of Translational Medicine. 2020. Т. 18, № 1. С. 179.
- 141. Endogenous cellular MicroRNAs mediate antiviral defense against influenza A virus / S. Peng, J. Wang, S. Wei [и др.] // Molecular Therapy. Nucleic Acids. – 2018. – Т. 10. – С. 361-375.
- 142. Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation / A. Saito, T. Irie, R. Suzuki [и др.] // Nature. 2022. T. 602, № 7896. С. 300-306.
- 143. Epidemiological and genetic correlates of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in the hospital with the highest nosocomial infection rate in Taiwan in 2003. / Y.-M. A. Chen, S.-Y. Liang, Y.-P. Shih [и др.] // Journal of clinical microbiology. 2006. Т. 44, № 2. С. 359-65.
- 144. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature. / Т. Kunej, I. Godnic, J. Ferdin [и др.] // Mutation research. 2011. Т. 717, № 1-2. С. 77-84.
- 145. Epigenetic regulator miRNA pattern differences among SARS-CoV, SARS-CoV-2, and SARS-CoV-2 world-wide isolates delineated the mystery behind the epic pathogenicity and distinct clinical characteristics of pandemic COVID-19 / M. A.-A.-K. Khan, M. R. U. Sany, M. S. Islam, A. B. M. M. K. Islam // Frontiers in Genetics. 2020. T. 11. C. 765.

- 146. Ernst, M. D. Permutation methods: a basis for exact inference / M. D. Ernst
 // Statistical Science. 2004. T. 19, № 4. C. 676-685.
- 147. Estimating clinical severity of COVID-19 from the transmission dynamics in Wuhan, China / J. T. Wu, K. Leung, M. Bushman [и др.] // Nature Medicine. 2020. Т. 26, № 4. С. 506-510.
- Estimating the extent of asymptomatic COVID-19 and its potential for community transmission: Systematic review and meta-analysis / O. Byambasuren, M. Cardona, K. Bell [и др.] // Official Journal of the Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada. 2020. Т. 5, № 4. С. 223-234.
- 149. Ethnic and geographical differences in HLA associations with the outcome of hepatitis C virus infection / J. H. Wang, X. Zheng, X. Ke [и др.] // Virology Journal. 2009. Т. 6. С. 46.
- 150. Evasion of type I interferon by SARS-CoV-2 / H. Xia, Z. Cao, X. Xie [и др.] // Cell Reports. – 2020. – Т. 33, № 1. – С. 108234.
- Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2 / C. Gaebler, Z. Wang, J.
 C. C. Lorenzi [и др.] // Nature. 2021. Т. 591, № 7851. С. 639-644.
- Evolution of immune responses to SARS-CoV-2 in mild-moderate COVID-19 / A. K. Wheatley, J. A. Juno, J. J. Wang [и др.] // Nature Communications. – 2021. – Т. 12, № 1. – С. 1162.
- 153. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic / M. F. Boni, P. Lemey, X. Jiang [и др.] // Nature Microbiology. – 2020. – Т. 5, № 11. – С. 1408-1417.
- 154. Expression of innate immune genes, proteins and microRNAs in lung tissue of pigs infected experimentally with influenza virus (H1N2) / K. Skovgaard, S. Cirera, D. Vasby [и др.] // Innate Immunity. – 2013. – Т. 19, № 5. – С. 531-544.
- 155. Extracellular miRNAs and cell–cell communication: problems and prospects / J. Makarova, A. Turchinovich, M. Shkurnikov, A. Tonevitsky // Trends in Biochemical Sciences. – 2021. – T. 46, № 8. – C. 640-651.

- 156. Fairbanks, V. F. Methods for measuring plasma hemoglobin in micromolar concentration compared. / V. F. Fairbanks, S. C. Ziesmer, P. C. O'Brien // Clinical chemistry. – 1992. – T. 38, № 1. – C. 132-140.
- 157. Frequency of HLA alleles among COVID-19 infected patients: Preliminary data from Saudi Arabia / F. M. A. Naemi, S. Al-adwani, H. Al-khatabi, A. Alnazawi // Virology. – 2021. – T. 560. – C. 1-7.
- 158. FTO obesity variant circuitry and adipocyte browning in humans / M. Claussnitzer, S. N. Dankel, K.-H. Kim [и др.] // New England Journal of Medicine. – 2015. – T. 373, № 10. – C. 895-907.
- 159. Functional landscape of SARS-CoV-2 cellular restriction / L. Martin-Sancho, M. K. Lewinski, L. Pache [и др.] // Molecular Cell. – 2021. – T. 81, № 12. – C. 2656-2668.e8.
- Galectin-3 as an important prognostic marker for COVID-19 severity / N.
 Gajovic, S. S. Markovic, M. Jurisevic [и др.] // Scientific Reports. 2023. Т. 13,
 № 1. С. 1460.
- 161. Ganai, S. A. HDAC inhibition through valproic acid modulates the methylation profiles in human embryonic kidney cells / S. A. Ganai, S. M. Kalladi, V. Mahadevan // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. 2015. T. 33, № 6. C. 1185-1197.
- 162. Gene bi-targeting by viral and human miRNAs / I. Veksler-Lublinsky, Y. Shemer-Avni, K. Kedem, M. Ziv-Ukelson // BMC bioinformatics. 2010. T. 11. C. 249.
- 163. Genetic and epigenetic factors associated with increased severity of Covid-19 / Z. Yildirim, O. S. Sahin, S. Yazar, V. Bozok Cetintas // Cell Biology International. – 2021. – T. 45, № 6. – C. 1158-1174.
- 164. Ghosh, N. A review on evolution of emerging SARS-CoV-2 variants based on spike glycoprotein / N. Ghosh, S. Nandi, I. Saha // International Immunopharmacology. – 2022. – T. 105. – C. 108565.

- 165. Goulder, P. J. R. Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication / P. J. R. Goulder, D. I. Watkins // Nature Reviews Immunology. – 2008. – T. 8, № 8. – C. 619-630.
- 166. Haddad, H. miRNA target prediction might explain the reduced transmission of SARS-CoV-2 in Jordan, Middle East / H. Haddad, Walid Al-Zyoud // Noncoding RNA Research. – 2020. – T. 5, № 3. – C. 135-143.
- 167. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma.
 / M. B. Kirschner, S. C. Kao, J. J. Edelman [и др.] // PloS one. 2011. Т. 6, № 9. С. e24145.
- 168. Harmer, A. Accreditation of histocompatibility and immunogenetics laboratories: Achievements and future prospects from the European Federation for Immunogenetics Accreditation Programme / A. Harmer, L. Mascaretti, E. Petershofen // HLA. – 2018. – T. 92, № 2. – C. 67-73.
- 169. High affinity of host human microRNAs to SARS-CoV-2 genome: An in silico analysis / S. Jafarinejad-Farsangi, M. M. Jazi, F. Rostamzadeh, M. Hadizadeh // Non-coding RNA research. 2020. T. 5, № 4. C. 222-231.
- 170. Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection / N. Le Bert, H. E. Clapham, A. T. Tan [и др.] // The Journal of Experimental Medicine. 2021. Т. 218, № 5. С. e20202617.
- Highly informative marker sets consisting of genes with low individual degree of differential expression / V. V. Galatenko, M. Yu. Shkurnikov, T. R. Samatov [и др.] // Scientific Reports. 2015. Т. 5. С. 14967.
- 172. HLA alleles, disease severity, and age associate with T-cell responses following infection with SARS-CoV-2 / T. A. Olafsdottir, K. Bjarnadottir, G. L. Norddahl [и др.] // Communications Biology. – 2022. – T. 5, № 1. – C. 914.
- HLA genetic polymorphisms and prognosis of patients with COVID-19 / L.
 Lorente, M. M. Martín, A. Franco [и др.] // Medicina Intensiva. 2021. Т. 45, № 2. С. 96-103.

- HLA-associated protection of lymphocytes during influenza virus infection
 / E. E. Ochoa, R. Huda, S. F. Scheibel [и др.] // Virology Journal. 2020. Т. 17,
 № 1. С. 128.
- 175. HLA-C*04:01 Affects HLA Class I Heterozygosity and Predicted Affinity to SARS-CoV-2 Peptides, and in Combination With Age and Sex of Armenian Patients Contributes to COVID-19 Severity / A. Hovhannisyan, V. Madelian, S. Avagyan [и др.] // Frontiers in Immunology. – 2022. – Т. 13. – С. 769900.
- HLA, immune response, and susceptibility to COVID-19 / F. Tavasolian, M. Rashidi, G. R. Hatam [и др.] // Frontiers in Immunology. 2021. T. 11. C. 601886.
- Hobert, O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs / O. Hobert // Science. 2008. T. 319, № 5871. C. 1785-1786.
- 178. Hoffmann, M. A multibasic cleavage site in the Spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells / M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Pöhlmann // Molecular Cell. – 2020. – T. 78, № 4. – C. 779-784.e5.
- Hosseini Rad, S. M. A. Implications of SARS-CoV-2 mutations for genomic rna structure and host microRNA targeting / S. M. A. Hosseini Rad, A. D. McLellan // International Journal of Molecular Sciences. 2020. T. 21, № 13. C. 4807.
- 180. Host MicroRNA hsa-miR-494-3p promotes EV71 replication by directly targeting PTEN / Q. Zhao, Y. Xiong, J. Xu [и др.] // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2018. – Т. 8. – С. 278.
- 181. Human coronavirus OC43 nucleocapsid protein binds microRNA 9 and potentiates NF-κB activation / F. W. Lai, K. B. Stephenson, J. Mahony, B. D. Lichty // Journal of Virology. – 2014. – T. 88, № 1. – C. 54-65.
- 182. Human embryonic stem cell-derived test systems for developmental neurotoxicity: a transcriptomics approach / A. K. Krug, R. Kolde, J. A. Gaspar [и др.] // Archives of Toxicology. – 2013. – Т. 87, № 1. – С. 123-143.

- 183. Human microRNA hsa-miR-296-5p suppresses enterovirus 71 replication by targeting the viral genome / Z. Zheng, X. Ke, M. Wang [и др.] // Journal of Virology. – 2013. – Т. 87, № 10. – С. 5645-5656.
- 184. Human MicroRNAs Interacting With SARS-CoV-2 RNA Sequences: Computational Analysis and Experimental Target Validation / C. Siniscalchi, A. Di Palo, A. Russo, N. Potenza // Frontiers in Genetics. – 2021. – T. 12.– C. 678994.
- 185. Human-leukocyte antigen class I Cw 1502 and class II DR 0301 genotypes are associated with resistance to severe acute respiratory syndrome (SARS) infection. / S.-F. Wang, K.-H. Chen, M. Chen [и др.] // Viral immunology. – 2011. – T. 24, № 5. – C. 421-426.
- 186. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland / D. F. Gudbjartsson,
 G. L. Norddahl, P. Melsted [и др.] // New England Journal of Medicine. 2020. –
 T. 383, № 18. С. 1724-1734.
- 187. Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicerldeficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression / M. Otsuka, Q. Jing, P. Georgel [и др.] // Immunity. – 2007. – Т. 27, № 1. – С. 123-134.
- 188. Ibáñez-Ventoso, C. Sequence relationships among C. elegans, D. melanogaster and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology / C. Ibáñez-Ventoso, M. Vora, M. Driscoll // PLoS ONE. 2008. T. 3, № 7. C. e2818.
- 189. Identification and characterization of a SARS-CoV-2 specific CD8+ T cell response with immunodominant features. / A. Gangaev, S. L. C. Ketelaars, O. I. Isaeva [и др.] // Nature communications. – 2021. – Т. 12, № 1. – С. 2593.
- 190. Identification of host encoded microRNAs interacting with novel swineorigin influenza A (H1N1) virus and swine influenza virus / T. He, G. Feng, H. Chen [и др.] // Bioinformation. – 2009. – T. 4, № 3. – С. 112-118.
- Identification of microRNA transcriptome involved in human natural killer cell activation. / X. Liu, Y. Wang, Q. Sun [и др.] // Immunology letters. 2012. T. 143, № 2. C. 208-17.

- Identification of SARS-CoV-2 spike mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization / Z. Liu, L. A. VanBlargan, L.-M. Bloyet [и др.]
 // Cell Host & Microbe. 2021. Т. 29, № 3. С. 477-488.e4.
- Identification of the human mature B cell miRNome. / K. Basso, P. Sumazin,
 P. Morozov [и др.] // Immunity. 2009. Т. 30, № 5. С. 744-52.
- 194. Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2 / A. Titov, R. Shaykhutdinova, O. V. Shcherbakova [и др.] // JCI Insight. 2022. Т. 7, № 9. С. e157699.
- 195. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection / J. M. Dan, J. Mateus, Y. Kato [и др.] // Science. 2021. T. 371, № 6529. C. eabf4063.
- Impact of SARS-CoV-2 viral load and duration of symptoms before hospital admission on the mortality of hospitalized COVID-19 patients / V. Rico-Caballero, M. Fernández, J. C. Hurtado [и др.] // Infection. 2022. Т. 50, № 5. С. 1321-1328.
- 197. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients / J. Hadjadj, N. Yatim, L. Barnabei [и др.] // Science. 2020. Т. 369, № 6504. С. 718-724.
- 198. Increased expression of microRNA-155-5p by alveolar type II cells contributes to development of lethal ARDS in H1N1 influenza A virus-infected mice / P. S. Woods, L. M. Doolittle, L. E. Rosas [и др.] // Virology. 2020. T. 545. C. 40-52.
- 199. Increasing expression of microRNA 181 inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication and has implications for controlling virus infection / X. Guo, Q. Zhang, L. Gao [и др.] // Journal of Virology. – 2013. – T. 87, № 2. – C. 1159-1171.
- 200. Influence of HLA supertypes on susceptibility and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection / K. S. MacDonald, K. R. Fowke, J. Kimani [и др.] // The Journal of Infectious Diseases. 2000. Т. 181, № 5. С. 1581-1589.

- 201. Initial whole-genome sequencing and analysis of the host genetic contribution to COVID-19 severity and susceptibility / F. Wang, S. Huang, R. Gao [и др.] // Cell Discovery. 2020. Т. 6, № 1. С. 83.
- 202. Integrated longitudinal immunophenotypic, transcriptional and repertoire analyses delineate immune responses in COVID-19 patients / S. Notarbartolo, V. Ranzani, A. Bandera [и др.] // Science Immunology. 2021. Т. 6, № 62. С. eabg5021.
- 203. Integrative analysis of miRNA and mRNA sequencing data reveals potential regulatory mechanisms of ACE2 and TMPRSS2 / S. Nersisyan, M. Shkurnikov, A. Turchinovich [и др.] // PloS One. 2020. Т. 15, № 7. С. e0235987.
- 204. Integrative deep sequencing of the mouse lung transcriptome reveals differential expression of diverse classes of small RNAs in response to respiratory virus infection / X. Peng, L. Gralinski, M. T. Ferris [и др.] // mBio. 2011. T. 2, № 6. C. e00198-11.
- 205. IPD-IMGT/HLA Database / J. Robinson, D. J. Barker, X. Georgiou [и др.] // Nucleic Acids Research. 2020. Т. 48, № D1. С. D948-D955.
- Ishii, T. Human leukocyte antigen (HLA) class i susceptible alleles against COVID-19 increase both infection and severity rate / T. Ishii // Cureus. 2020. T.12, № 12. C. e12239.
- 207. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia / A. M. Zaki, S. van Boheemen, T. M. Bestebroer [и др.] // New England Journal of Medicine. – 2012. – T. 367, № 19. – C. 1814-1820.
- 208. Jumonji/ARID1 B (JARID1B) protein promotes breast tumor cell cycle progression through epigenetic repression of microRNA let-7e / D. Mitra, P. M. Das, F. C. Huynh, F. E. Jones // The Journal of Biological Chemistry. – 2011. – T. 286, № 47. – C. 40531-40535.
- 209. Jungers, C. F. Modulation of miRISC-Mediated Gene Silencing in Eukaryotes / C. F. Jungers, S. Djuranovic // Frontiers in Molecular Biosciences. – 2022. – T. 9. – C. 832916.

- 210. Just 2% of SARS-CoV-2-positive individuals carry 90% of the virus circulating in communities / Q. Yang, T. K. Saldi, P. K. Gonzales [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2021. T. 118, № 21. C. e2104547118.
- Xanneganti, T.-D. Intracellular innate immune receptors: Life inside the cell
 / T.-D. Kanneganti // Immunological Reviews. 2020. T. 297, № 1. C. 5-12.
- 212. Karki R. Innate immunity, cytokine storm, and inflammatory cell death in COVID-19 / R. Karki, T.-D. Kanneganti // Journal of Translational Medicine. 2022. T. 20, № 1. C. 542.
- 213. KDM5B histone demethylase controls epithelial-mesenchymal transition of cancer cells by regulating the expression of the microRNA-200 family / Z. Enkhbaatar, M. Terashima, D. Oktyabri [и др.] // Cell Cycle. 2013. Т. 12, № 13. С. 2100-2112.
- 214. Klatte, N. Modelling the Transitioning of SARS-CoV-2 nsp3 and nsp4 Lumenal Regions towards a More Stable State on Complex Formation / N. Klatte,
 D. C. Shields, C. Agoni // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – T. 24, № 1. – C. 720.
- 215. Komatsu, S. Network Regulation of microRNA Biogenesis and Target Interaction / S. Komatsu, H. Kitai, H. I. Suzuki // Cells. 2023. T. 12, № 2. C. 306.
- 216. Kumar, V. From genome-wide association studies to disease mechanisms: celiac disease as a model for autoimmune diseases / V. Kumar, C. Wijmenga, S. Withoff // Seminars in Immunopathology. – 2012. – T. 34, № 4. – C. 567-580.
- 217. Laporte, M. Airway proteases: an emerging drug target for influenza and other respiratory virus infections / M. Laporte, L. Naesens // Current Opinion in Virology. – 2017. – T. 24. – C. 16-24.
- 218. Lee, S. Coronaviruses: Innate Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines / S. Lee, R. Channappanavar, T.-D. Kanneganti // Trends in Immunology. – 2020. – T. 41, № 12. – C. 1083-1099.

- 219. Leon-Icaza, S. A. microRNAs in viral acute respiratory infections: immune regulation, biomarkers, therapy, and vaccines / S. A. Leon-Icaza, M. Zeng, A. G. Rosas-Taraco // ExRNA. 2019. T. 1, № 1. C. 1.
- 220. Letko, M. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses / M. Letko, A. Marzi, V. Munster // Nature Microbiology. – 2020. – T. 5, № 4. – C. 562-569.
- 221. Li, F. Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus / F. Li // Antiviral Research. 2013. T. 100, № 1. C. 246-254.
- Li, F. Structure, function, and evolution of coronavirus Spike proteins / F. Li
 // Annual Review of Virology. 2016. T. 3, № 1. C. 237-261.
- 223. Lima-Junior, J. da C. Major histocompatibility complex and malaria: Focus on Plasmodium vivax Infection / J. da C. Lima-Junior, L. R. Pratt-Riccio // Frontiers in Immunology. – 2016. – T. 7. – C. 13.
- 224. Lok, S.-M. An NTD supersite of attack / S.-M. Lok // Cell Host & Microbe.
 2021. T. 29, № 5. C. 744-746.
- 225. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19
 / C. Lucas, P. Wong, J. Klein [и др.] // Nature. 2020. Т. 584, № 7821. С. 463-469.
- 226. Longitudinal analysis reveals that delayed bystander CD8+ T cell activation and early immune pathology distinguish severe COVID-19 from mild disease / L. Bergamaschi, F. Mescia, L. Turner [и др.] // Immunity. 2021. Т. 54, № 6. С. 1257-1275.e8.
- 227. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells / K. W. Cohen, S. L. Linderman, Z. Moodie [и др.] // Cell Reports. Medicine. - 2021. – T. 2, № 7. – C. 100354.
- 228. Longitudinal profiling of respiratory and systemic immune responses reveals myeloid cell-driven lung inflammation in severe COVID-19 / P. A. Szabo, P. Dogra, J. I. Gray [и др.] // Immunity. 2021. Т. 54, № 4. С. 797-814.е6.
- 229. Lopez-Gomollon, S. Roles of RNA silencing in viral and non-viral plant immunity and in the crosstalk between disease resistance systems / S. Lopez-Gomollon, D. C. Baulcombe // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2022. – T. 23, № 10. – C. 645-662.
- 230. LY6E impairs coronavirus fusion and confers immune control of viral disease / S. Pfaender, K. B. Mar, E. Michailidis [и др.] // Nature Microbiology. 2020. Т. 5, № 11. С. 1330-1339.
- 231. Magnitude and Dynamics of the T-Cell Response to SARS-CoV-2 Infection at Both Individual and Population Levels. / T. M. Snyder, R. M. Gittelman, M. Klinger [и др.] // medRxiv : the preprint server for health sciences. – 2020.
- 232. Magnitude of asymptomatic COVID-19 cases throughout the course of infection: A systematic review and meta-analysis / M. Alene, L. Yismaw, M. A. Assemie [и др.] // PLOS ONE. 2021. Т. 16, № 3. С. e0249090.
- 233. Main protease of SARS-CoV-2 serves as a bifunctional molecule in restricting type I interferon antiviral signaling / Y. Wu, L. Ma, Z. Zhuang [и др.] // Signal Transduction and Targeted Therapy. 2020. T. 5, № 1. C. 221.
- 234. Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by Mycobacterium tuberculosis infection / R. J. Mazzaccaro, M. Gedde, E. R. Jensen [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1996. – T. 93, № 21. – C. 11786-11791.
- 235. Mallick, B. MicroRNome analysis unravels the molecular basis of SARS infection in bronchoalveolar stem cells / B. Mallick, Z. Ghosh, J. Chakrabarti // PLoS ONE. – 2009. – T. 4, № 11. – C. e7837.
- 236. Manik, M. Role of toll-like receptors in modulation of cytokine storm signaling in SARS-CoV-2-induced COVID-19 / M. Manik, R. K. Singh // Journal of Medical Virology. – 2022. – T. 94, № 3. – C. 869-877.
- 237. Mapping the human genetic architecture of COVID-19 / COVID-19 Host Genetics Initiative, COVID-19 Host Genetics InitiativeLeadership, M. E. K. Niemi [и др.] // Nature. 2021. Т. 600, № 7889. С. 472-477.

- 238. Maurice, N. J. The ugly duckling turned to swan: a change in perception of bystander-activated memory CD8 T Cells / N. J. Maurice, A. K. Taber, M. Prlic // Journal of Immunology. – 2021. – T. 206, № 3. – C. 455-462.
- 239. Measurements of deposition, lung surface area and lung fluid for simulation of inhaled compounds / E. Fröhlich, A. Mercuri, S. Wu, S. Salar-Behzadi. // Frontiers in Pharmacology. – 2016. – T. 7. – C. 181.
- 240. MHCflurry: open-source class I MHC binding affinity prediction / Т. J.
 O'Donnell, A. Rubinsteyn, M. Bonsack [и др.] // Cell Systems. 2018. Т. 7, № 1. С. 129-132.е4.
- 241. Microarray analysis of infectious bronchitis virus infection of chicken primary dendritic cells / J. Lin, Z. Wang, J. Wang, Q. Yang // BMC genomics. – 2019. – T. 20, № 1. – C. 557.
- 242. microRNA-125b contributes to high glucose-induced reactive oxygen species generation and apoptosis in HK-2 renal tubular epithelial cells by targeting angiotensin-converting enzyme 2 / Y.-F. Huang, Y. Zhang, C.-X. Liu [и др.] // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2016. T. 20, № 19. C. 4055-4062.
- 243. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy / A. Carè, D. Catalucci, F. Felicetti [и др.] // Nature Medicine. 2007. Т. 13, № 5. С. 613-618.
- 244. MicroRNAs bioinformatics analyses identifying HDAC pathway as a putative target for existing anti-COVID-19 therapeutics / L. Teodori, P. Sestili, V. Madiai [и др.] // Frontiers in Pharmacology. 2020. Т. 11. С. 582003.
- 245. miR-17-92 plays an oncogenic role and conveys chemo-resistance to cisplatin in human prostate cancer cells. / P. Zhou, L. Ma, J. Zhou [и др.] // International journal of oncology. 2016. Т. 48, № 4. С. 1737-48.
- 246. miRNA repertoire and host immune factor regulation upon avian coronavirus infection in eggs / V. Kemp, A. Laconi, G. Cocciolo [и др.] // Archives of Virology. 2020. Т. 165, № 4. С. 835-843.
- 247. miRNA-200c-3p is crucial in acute respiratory distress syndrome / Q. Liu, J. Du, X. Yu [и др.] // Cell Discovery. 2017. Т. 3. С. 17021.

- 248. miRNome of inflammatory breast cancer / D. V. Maltseva, V. V. Galatenko, T. R. Samatov [и др.] // BMC research notes. 2014. Т. 7. С. 871.
- 249. Mohan, J. Membrane remodeling by SARS-CoV-2 double-enveloped viral replication / J. Mohan, T. Wollert // Faculty Reviews. 2021. T. 10. C. 17.
- 250. Molecular characteristics, immune evasion, and impact of SARS-CoV-2 variants / C. Sun, C. Xie, G.-L. Bu [и др.] // Signal Transduction and Targeted Therapy. 2022. Т. 7, № 1. С. 202.
- 251. Multi-omics resolves a sharp disease-state shift between mild and moderate COVID-19 / Y. Su, D. Chen, D. Yuan [и др.] // Cell. 2020. Т. 183, № 6. С. 1479-1495.e20.
- 252. Natural selection in the evolution of SARS-CoV-2 in bats created a generalist virus and highly capable human pathogen / O. A. MacLean, S. Lytras, S. Weaver [и др.] // PLoS biology. 2021. Т. 19, № 3. С. e3001115.
- 253. Nelson, P. T. MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases / P. T. Nelson, W.-X. Wang, B. W. Rajeev // Brain Pathology. 2008. T. 18, № 1. C. 130-138.
- 254. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data / B. Reynisson, B. Alvarez, S. Paul [и др.] // Nucleic acids research. 2020. T. 48, № W1. C. W449-W454.
- 255. Neutralization of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 Omicron variant by sera from BNT162b2 or CoronaVac vaccine recipients / L. Lu, B. W. Y. Mok, L. L. Chen [и др.] // Clinical Infectious Diseases. 2022. Т. 75, № 1. С. e822-e826.
- 256. Neutralizing antibody activity in convalescent sera from infection in humans with SARS-CoV-2 and variants of concern / L. Dupont, L. B. Snell, C. Graham [и др.] // Nature Microbiology. 2021. Т. 6, № 11. С. 1433-1442.
- 257. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection / D. S. Khoury, D. Cromer, A. Reynaldi [и др.] // Nature Medicine. 2021. T. 27, № 7. C. 1205-1211.

- 258. Novel soluble mediators of innate immune system activation in solid allograft rejection / V. Usuelli, C. Loretelli, A. J. Seelam [и др.] // Transplantation. 2022. Т. 106, № 3. С. 500-509.
- 259. Nsp1 protein of SARS-CoV-2 disrupts the mRNA export machinery to inhibit host gene expression / K. Zhang, L. Miorin, T. Makio [и др.] // Science Advances. 2021. T. 7, № 6. C. eabe7386.
- 260. Nucleocapsid mutations R203K/G204R increase the infectivity, fitness, and virulence of SARS-CoV-2 / H. Wu, N. Xing, K. Meng [и др.] // Cell Host & Microbe. 2021. T. 29, № 12. C. 1788-1801.e6.
- 261. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3 / S. Smemo, J. J. Tena, K.-H. Kim [и др.] // Nature. 2014. Т. 507, № 7492. С. 371-375.
- 262. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies / Y. Cao, J. Wang, F. Jian [и др.] // Nature. 2022. T. 602, № 7898. С. 657-663.
- 263. Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization / S. Cele, L. Jackson, D. S. Khoury [и др.] // Nature. – 2022. – Т. 602, № 7898. – С. 654-656.
- 264. Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity / D. Shin, R. Mukherjee, D. Grewe [и др.] // Nature. 2020. Т. 587, № 7835. С. 657-662.
- 265. PD-1-Expressing SARS-CoV-2-Specific CD8+ T Cells Are Not Exhausted, but Functional in Patients with COVID-19 / M.-S. Rha, H. W. Jeong, J.-H. Ko [и др.] // Immunity. – 2021. – Т. 54, № 1. – С. 44-52.e3.
- 266. Peiris, J. S. M. Severe acute respiratory syndrome / J. S. M. Peiris, Y. Guan,
 K. Y. Yuen // Nature Medicine. 2004. T. 10, № S12. C. S88-S97.
- 267. Peripheral and lung resident memory T cell responses against SARS-CoV-2
 / J. Grau-Expósito, N. Sánchez-Gaona, N. Massana [и др.] // Nature Communications. 2021. Т. 12, № 1. С. 3010.

- 268. Perlman, S. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis / S. Perlman, J. Netland // Nature Reviews Microbiology. 2009. T. 7. Coronaviruses post-SARS, № 6. C. 439-450.
- 269. Persistence of SARS-CoV-2-specific B and T cell responses in convalescent COVID-19 patients 6-8 months after the infection / N. Sherina, A. Piralla, L. Du [и др.] // Med. 2021. Т. 2, № 3. С. 281-295.e4.
- 270. Persistent viral RNA positivity during the recovery period of a patient with SARS-CoV-2 infection / J.-R. Yang, D.-T. Deng, N. Wu [и др.] // Journal of Medical Virology. 2020. Т. 92, № 9. С. 1681-1683.
- 271. Petersen, J. Post-translationally modified T cell epitopes: immune recognition and immunotherapy / J. Petersen, A. W. Purcell, J. Rossjohn // Journal of Molecular Medicine. – 2009. – T. 87, № 11. – C. 1045.
- 272. Phospholipid transfer protein augments apoptosis in THP-1-derived macrophages induced by lipolyzed hypertriglyceridemic plasma / A. Wehinger, I. Tancevski, W. Schgoer [и др.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2007. T. 27, № 4. C. 908-915.
- 273. Phytonutrient inhibitors of SARS-CoV-2/NSP5-encoded main protease (M pro) autocleavage enzyme critical for COVID-19 pathogenesis / S. A. G. Naidu, Y. B. Tripathi, P. Shree [и др.] // Journal of Dietary Supplements. 2021. С. 1-28.
- 274. Population adherence to infection control behaviors during hong kong's first and third COVID-19 waves: a serial cross-sectional study / E. Y. Y. Chan, J. H. Kim, K. Kwok [и др.] // International Journal of Environmental Research and Public Health. 2021. T. 18, № 21. C. 11176.
- 275. Possible role of HLA class-I genotype in SARS-CoV-2 infection and progression: A pilot study in a cohort of Covid-19 Spanish patients / I. Iturrieta-Zuazo, C. G. Rita, A. García-Soidán [и др.] // Clinical Immunology. – 2020. – T. 219. – C. 108572.

- 276. Potapov, I. Fostering experimental and computational synergy to modulate hyperinflammation / I. Potapov, T.-D. Kanneganti, A. Del Sol // Trends in Immunology. – 2022. – T. 43, № 1. – C. 4-7.
- 277. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike / L. Liu, P. Wang, M. S. Nair [и др.] // Nature. 2020. Т. 584, № 7821. C. 450-456.
- 278. Predictors of mortality in hospitalized COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis / W. Tian, W. Jiang, J. Yao [и др.] // Journal of Medical Virology. 2020. Т. 92, № 10. С. 1875-1883.
- 279. Presence of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against SARS-CoV-2 in COVID-19 plasma / F. Y. Tso, S. J. Lidenge, L. K. Poppe [и др.] // PLOS ONE. 2021. Т. 16, № 3. С. e0247640.
- 280. Presence of genetic variants among young men with severe COVID-19 / C.
 I. van der Made, A. Simons, J. Schuurs-Hoeijmakers [и др.] // JAMA. 2020. T.
 324, № 7. C. 663.
- 281. Profiles of miRNA isoforms and tRNA fragments in prostate cancer / R. G. Magee, A. G. Telonis, P. Loher [и др.] // Scientific Reports. 2018. T. 8, № 1. C. 5314.
- Profiling of circulating microRNAs for prostate cancer biomarker discovery.
 / C. Haldrup, N. Kosaka, T. Ochiya [и др.] // Drug delivery and translational research. 2014. Т. 4, № 1. С. 19-30.
- 283. Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape / J. S. Tregoning, K. E. Flight, S. L. Higham [и др.] // Nature Reviews. Immunology. 2021. Т. 21, № 10. С. 626-636.
- 284. Promislow, D. E. L. A geroscience perspective on COVID-19 mortality / D.
 E. L. Promislow // The Journals of Gerontology: Series A. 2020. T. 75, № 9. C. e30-e33.

- 285. Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: Cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research / G. Simmons, P. Zmora, S. Gierer [и др.] // Antiviral Research. 2013. Т. 100, № 3. С. 605-614.
- 286. Pulmonary fibrosis 4 months after COVID-19 is associated with severity of illness and blood leucocyte telomere length / C. F. McGroder, D. Zhang, M. A. Choudhury [и др.] // Thorax. 2021. Т. 76, № 12. С. 1242-1245.
- 287. Pulmonary recovery from COVID-19 in patients with metabolic diseases: a longitudinal prospective cohort study / T. Sonnweber, P. Grubwieser, A. Pizzini [и др.] // Scientific Reports. 2023. T. 13, № 1. С. 2599.
- Quadeer, A. A. Landscape of epitopes targeted by T cells in 852 individuals recovered from COVID-19: Meta-analysis, immunoprevalence, and web platform / A. A. Quadeer, S. F. Ahmed, M. R. McKay // Cell Reports. Medicine. 2021. T. 2, № 6. C. 100312.
- 289. Rapid assessment of SARS-CoV-2-evolved variants using virus-like particles / A. M. Syed, T. Y. Taha, T. Tabata [и др.] // Science. 2021. Т. 374, № 6575. С. 1626-1632.
- 290. Rapid induction of antigen-specific CD4+ T cells is associated with coordinated humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 mRNA vaccination / M. M. Painter, D. Mathew, R. R. Goel [и др.] // Immunity. 2021. T. 54, № 9. C. 2133-2142.e3.
- 291. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus / Y. Wan, J. Shang, R. Graham [и др.] // Journal of Virology. – 2020. – Т. 94, № 7. – С. e00127-20.
- 292. Recovery from acute SARS-CoV-2 infection and development of anamnestic immune responses in T Cell-depleted Rhesus Macaques / K. J. Hasenkrug, F. Feldmann, L. Myers [и др.] // mBio. 2021. T. 12, № 4. C. e01503-21.

- 293. Recovery from the Middle East respiratory syndrome is associated with antibody and T-cell responses / J. Zhao, A. N. Alshukairi, S. A. Baharoon [и др.] // Science Immunology. 2017. T. 2, № 14. C. eaan5393.
- 294. Reddy, K. B. MicroRNA (miRNA) in cancer / K. B. Reddy // Cancer Cell International. – 2015. – T. 15. – C. 38.
- 295. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization / D. Planas, D. Veyer, A. Baidaliuk [и др.] // Nature. – 2021. – Т. 596, № 7871. – C. 276-280.
- 296. Reduction and functional exhaustion of t cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) / B. Diao, C. Wang, Y. Tan [и др.] // Frontiers in Immunology. 2020. Т. 11. С. 827.
- 297. Regulation of neutrophil senescence by microRNAs. / J. R. Ward, P. R. Heath, J. W. Catto [и др.] // PloS one. 2011. Т. 6, № 1. С. e15810.
- 298. Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies / R. E. Chen, X. Zhang, J. B. Case [и др.] // Nature Medicine. 2021. T. 27, № 4. C. 717-726.
- 299. Revealing the structural plasticity of SARS-CoV-2 nsp7 and nsp8 using structural proteomics / V. V. Courouble, S. K. Dey, R. Yadav [и др.] // Journal of the American Society for Mass Spectrometry. 2021. Т. 32, № 7. С. 1618-1630.
- 300. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China / C. Wu, X. Chen, Y. Cai [и др.] // JAMA Internal Medicine. – 2020. – Т. 180, № 7. – С. 934.
- 301. Risk factors of adverse outcome of COVID-19 and experience of Tocilizumab administration in patients on maintenance hemodialysis due to diabetic kidney disease / E. M. Zeltyn-Abramov, M. A. Lysenko, N. F. Frolova [и др.] // Diabetes mellitus. – 2021. – T. 24, № 1. – С. 17-31.
- 302. Risk of mortality in COVID-19 patients: a meta- and network analysis / R. Kowsar, A. M. Rahimi, M. Sroka [и др.] // Scientific Reports. 2023. Т. 13, № 1. С. 2138.

- 303. RNA viruses can hijack vertebrate microRNAs to suppress innate immunity
 / D. W. Trobaugh, C. L. Gardner, C. Sun [и др.] // Nature. 2014. Т. 506, № 7487. С. 245-248.
- 304. RNA–RNA interactions between SARS-CoV-2 and host benefit viral development and evolution during COVID-19 infection / S. Zhang, K. Amahong, C. Zhang [и др.] // Briefings in Bioinformatics. 2022. T. 23, № 1. C. bbab397.
- 305. RNAi-Based Antiviral Innate Immunity in Plants / L. Jin, M. Chen, M. Xiang, Z. Guo // Viruses. 2022. T. 14, № 2. C. 432.
- 306. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months
 / A. Wajnberg, F. Amanat, A. Firpo [и др.] // Science. 2020. Т. 370, № 6521.
 C. 1227-1230.
- 307. Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection / J. Zuo, A. C. Dowell, H. Pearce [и др.] // Nature Immunology. – 2021. – T. 22, № 5. – С. 620-626.
- 308. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19 / T. Sekine, A. Perez-Potti, O. Rivera-Ballesteros [и др.] // Cell.
 2020. – Т. 183, № 1. – С. 158-168.e14.
- 309. ROS accumulation and antiviral defence control by microRNA528 in rice / J. Wu, R. Yang, Z. Yang [и др.] // Nature Plants. 2017. Т. 3, № 1. С. 16203.
- Russell C. D. Comorbidities, multimorbidity and COVID-19 / C. D. Russell,
 N. I. Lone, J. K. Baillie // Nature Medicine. 2023. T. 29, № 2. C. 334-343.
- 311. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum / K. Knoops, M. Kikkert, S. H. E. van den Worm [и др.] // PLoS biology. 2008. Т. 6, № 9. С. e226.
- 312. SARS-CoV-2 accessory protein ORF8 is secreted extracellularly as a glycoprotein homodimer / K. Matsuoka, N. Imahashi, M. Ohno [и др.] // Journal of Biological Chemistry. 2022. T. 298, № 3. C. 101724.
- 313. SARS-CoV-2 accessory proteins in viral pathogenesis: knowns and unknowns / N. Redondo, S. Zaldívar-López, J. J. Garrido, M. Montoya // Frontiers in Immunology. – 2021. – T. 12. – C. 708264.

- 314. SARS-COV-2 as potential microRNA sponge in COVID-19 patients / C. Li,
 R. Wang, A. Wu [и др.] // BMC Medical Genomics. 2022. T. 15, № S2. C. 94.
- 315. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor / M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder [и др.] // Cell. – 2020. – Т. 181, № 2. – С. 271-280.e8.
- 316. SARS-CoV-2 D614G spike mutation increases entry efficiency with enhanced ACE2-binding affinity / S. Ozono, Y. Zhang, H. Ode [и др.] // Nature Communications. 2021. Т. 12, № 1. С. 848.
- 317. SARS-CoV-2 disrupts splicing, translation, and protein trafficking to suppress host defenses / А. К. Banerjee, М. R. Blanco, E. A. Bruce [и др.] // Cell. 2020. Т. 183, № 5. С. 1325-1339.e21.
- 318. SARS-CoV-2 E protein: Pathogenesis and potential therapeutic development / S. Zhou, P. Lv, M. Li [и др.] // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2023. – T. 159. – SARS-CoV-2 E protein. – C. 114242.
- 319. SARS-CoV-2 elicits robust adaptive immune responses regardless of disease severity / S. S. Nielsen, L. K. Vibholm, I. Monrad [и др.] // EBioMedicine. 2021. Т. 68. С. 103410.
- 320. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes / W. Sungnak, N. Huang, C. Bécavin [и др.] // Nature Medicine. – 2020. – Т. 26, № 5. – С. 681-687.
- 321. SARS-CoV-2 epitopes are recognized by a public and diverse repertoire of human T Cell receptors / A. S. Shomuradova, M. S. Vagida, S. A. Sheetikov [и др.] // Immunity. 2020. Т. 53, № 6. С. 1245-1257.е5.
- 322. SARS-CoV-2 evolution during treatment of chronic infection / S. A. Kemp,
 D. A. Collier, R. P. Datir [и др.] // Nature. 2021. Т. 592, № 7853. С. 277-282.
- 323. SARS-CoV-2 genome-wide T cell epitope mapping reveals immunodominance and substantial CD8+ T cell activation in COVID-19 patients.

/ S. K. Saini, D. S. Hersby, T. Tamhane [и др.] // Science immunology. – 2021. – T. 6, № 58.

- 324. SARS-CoV-2 may regulate cellular responses through depletion of specific host miRNAs / R. Bartoszewski, M. Dabrowski, B. Jakiela [и др.] // American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology. – 2020. – Т. 319, № 3. – С. L444-L455.
- 325. SARS-CoV-2 mRNA vaccination induces functionally diverse antibodies to NTD, RBD, and S2 / F. Amanat, M. Thapa, T. Lei [и др.] // Cell. 2021. T. 184, № 15. C. 3936-3948.e10.
- 326. SARS-CoV-2 mutations in MHC-I-restricted epitopes evade CD8+ T cell responses. / B. Agerer, M. Koblischke, V. Gudipati [и др.] // Science immunology. 2021. T. 6, № 57. C. eabg6461.
- 327. SARS-CoV-2 non-structural proteins and their roles in host immune evasion
 / Z. Y. Low, N. Z. Zabidi, A. J. W. Yip [и др.] // Viruses. 2022. Т. 14, № 9. –
 C. 1991.
- 328. SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation / K. Schubert, E. D. Karousis, A. Jomaa [и др.] // Nature Structural & Molecular Biology. – 2020. – Т. 27, № 10. – С. 959-966.
- 329. SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists / C.-K. Yuen, J.-Y. Lam, W.-M. Wong [и др.] // Emerging Microbes & Infections. 2020. Т. 9, № 1. С. 1418-1428.
- 330. SARS-CoV-2 Nsp16 activation mechanism and a cryptic pocket with pancoronavirus antiviral potential / N. Vithani, M. D. Ward, M. I. Zimmerman [и др.]
 // Biophysical Journal. – 2021. – Т. 120, № 14. – С. 2880-2889.
- 331. SARS-CoV-2 Nsp2 Contributes to Inflammation by Activating NF-кB / É. Lacasse, L. Gudimard, I. Dubuc [и др.] // Viruses. 2023. Т. 15, № 2. С. 334.
- 332. SARS-CoV-2 Omicron variant: Antibody evasion and cryo-EM structure of spike protein-ACE2 complex / D. Mannar, J. W. Saville, X. Zhu [и др.] // Science.
 2022. T. 375, № 6582. C. 760-764.

- 333. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells / S. Lukassen, R. L. Chua, T. Trefzer [и др.] // The EMBO journal. – 2020. – Т. 39, № 10. – С. e105114.
- 334. SARS-CoV-2 responsive T cell numbers and anti-Spike IgG levels are both associated with protection from COVID-19: A prospective cohort study in keyworkers. SARS-CoV-2 responsive T cell numbers and anti-Spike IgG levels are both associated with protection from COVID-19 / D. Wyllie, H. E. Jones, R. Mulchandani, [и др.]. // medRxiv. 2020. C. 10.1101/2020.11.02.20222778.
- 335. SARS-CoV-2 spike L452R variant evades cellular immunity and increases infectivity. / C. Motozono, M. Toyoda, J. Zahradnik [и др.] // Cell host & microbe. 2021. Т. 29, № 7. С. 1124-1136.e11.
- 336. SARS-CoV-2 transmission from people without COVID-19 symptoms / M.
 A. Johansson, T. M. Quandelacy, S. Kada [и др.] // JAMA Network Open. 2021.
 T. 4, № 1. C. e2035057.
- 337. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness / A.
 M. Carabelli, T. P. Peacock, L. G. Thorne [и др.] // Nature Reviews Microbiology.
 2023. T.21, № 3. C. 162-177.
- 338. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients
 / L. Zou, F. Ruan, M. Huang [и др.] // New England Journal of Medicine. 2020.
 T. 382, № 12. C. 1177-1179.
- 339. SARS-CoV-2-specific circulating T follicular helper cells correlate with neutralizing antibodies and increase during early convalescence / S. Boppana, K. Qin, J. K. Files [и др.] // PLoS pathogens. – 2021. – Т. 17, № 7. – С. e1009761.
- 340. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls / N. Le Bert, A. T. Tan, K. Kunasegaran [и др.] // Nature.
 2020. Т. 584, № 7821. С. 457-462.
- 341. 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 / J. H. Jung, M.-S. Rha, M. Sa [и др.] // Nature Communications. 2021. T. 12, № 1. C. 4043.

- 342. SARS-CoV-2-specific CD8+ T cell responses in convalescent COVID-19 individuals / H. Kared, A. D. Redd, E. M. Bloch [и др.] // Journal of Clinical Investigation. – 2021. – T. 131, № 5.
- 343. SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, and HIV-1 derived ssRNA sequences activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages through a non-classical pathway / G. R. Campbell, R. K. To, J. Hanna, S. A. Spector // iScience. 2021. T. 24, № 4. C. 102295.
- 344. Satish, D. PAmiRDB: A web resource for plant miRNAs targeting viruses /
 D. Satish, S. K. Mukherjee, D. Gupta // Scientific Reports. 2019. T. 9, № 1. –
 C. 4627.
- 345. Satish, D. The landscape of microRNAs in plant viral infections / D. Satish,
 S. K. Mukherjee, D. Gupta // Plant Gene. 2021. T. 26. C. 100293.
- 346. Schoggins, J. W. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? / J.
 W. Schoggins // Annual Review of Virology. 2019. T. 6, № 1. C. 567-584.
- 347. Seroprevalence of SARS-CoV-2 among potential convalescent plasma donors and analysis of their deferral pattern: Experience from tertiary care hospital in western India / R. Jain, M. V. Mallya, S. Amoncar [и др.] // Transfusion Clinique et Biologique. 2022. T. 29, № 1. C. 60-64.
- 348. Sette, A. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19 / A. Sette, S. Crotty // Cell. 2021. T. 184, № 4. C. 861-880.
- 349. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)–specific T cells and antibodies in coronavirus disease 2019 (COVID-19) protection: a prospective study / I. A. Molodtsov, E. Kegeles, A. N. Mitin [и др.] // Clinical Infectious Diseases. 2022. T. 75, № 1. C. e1-e9.
- 350. Sex differences in COVID-19: candidate pathways, genetics of ACE2, and sex hormones / A. Viveiros, J. Rasmuson, J. Vu [и др.] // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2021. Т. 320, № 1. С. H296-H304.

- 351. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes / T. Takahashi, M. K. Ellingson, P. Wong [и др.] // Nature. – 2020. – T. 588, № 7837. – C. 315-320.
- 352. Sheinerman, K. S. Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies / K. S. Sheinerman, S. R. Umansky // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2013. – T. 7. – C. 150.
- 353. Shorter telomere lengths in patients with severe COVID-19 disease / R. Sanchez-Vazquez, A. Guío-Carrión, A. Zapatero-Gaviria [и др.] // Aging. 2021.
 T. 13, № 1. C. 1-15.
- 354. Signature of long-lived memory CD8+ T cells in acute SARS-CoV-2 infection / S. Adamo, J. Michler, Y. Zurbuchen [и др.] // Nature. 2022. T. 602, № 7895. C. 148-155.
- 355. Simón-Mateo, C. MicroRNA-guided processing impairs Plum pox virus replication, but the virus readily evolves to escape this silencing mechanism / C. Simón-Mateo, J. A. García // Journal of Virology. – 2006. – T. 80, № 5. – C. 2429-2436.
- 356. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike / Y. Watanabe, J. D. Allen, D. Wrapp [и др.] // Science. 2020. Т. 369, № 6501. С. 330-333.
- 357. Stadler, K. SARS: understanding the virus and development of rational therapy / K. Stadler, R. Rappuoli // Current Molecular Medicine. – 2005. – T. 5. – SARS, № 7. – C. 677-697.
- 358. Structural analysis of the SARS-CoV-2 methyltransferase complex involved in RNA cap creation bound to sinefungin / P. Krafcikova, J. Silhan, R. Nencka, E. Boura // Nature Communications. – 2020. – T. 11, № 1. – C. 3717.
- 359. Structural and functional characterizations of infectivity and immune evasion of SARS-CoV-2 Omicron / Z. Cui, P. Liu, N. Wang [и др.] // Cell. 2022. Т. 185, № 5. С. 860-871.e13.

- 360. Structural assessment of HLA-A2-restricted SARS-CoV-2 spike epitopes recognized by public and private T-cell receptors / D. Wu, A. Kolesnikov, R. Yin [и др.] // Nature Communications. – 2022. – Т. 13, № 1. – С. 19.
- 361. Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14– nsp10 complex / Y. Ma, L. Wu, N. Shaw [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – T. 112, № 30. – C. 9436-9441.
- 362. Structural basis of SARS-CoV-2 Omicron immune evasion and receptor engagement / M. McCallum, N. Czudnochowski, L. E. Rosen [и др.] // Science. – 2022. – Т. 375, № 6583. – С. 864-868.
- 363. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies / W.
 Yan, Y. Zheng, X. Zeng [и др.] // Signal Transduction and Targeted Therapy. –
 2022. T. 7, № 1. C. 26.
- 364. Structural impact on SARS-CoV-2 spike protein by D614G substitution / J. Zhang, Y. Cai, T. Xiao [и др.] // Science. 2021. T. 372, № 6541. C. 525-530.
- 365. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins / R. Arya, S. Kumari, B. Pandey [и др.] // Journal of Molecular Biology. 2021. T. 433, № 2. C. 166725.
- 366. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor / J. Lan, J. Ge, J. Yu [и др.] // Nature. – 2020. – Т. 581, № 7807. – C. 215-220.
- 367. Structure, mechanism and crystallographic fragment screening of the SARS-CoV-2 NSP13 helicase / J. A. Newman, A. Douangamath, S. Yadzani [и др.] // Nature Communications. – 2021. – Т. 12, № 1. – С. 4848.
- 368. Subramanian, R. Quantifying asymptomatic infection and transmission of COVID-19 in New York City using observed cases, serology, and testing capacity
 / R. Subramanian, Q. He, M. Pascual // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2021. T. 118, № 9. C. e2019716118.
- 369. Suppression of MDA5-mediated antiviral immune responses by NSP8 of SARS-CoV-2 / Z. Yang, X. Zhang, F. Wang, [и др.] // bioRxiv. – 2020. – С. 10.1101/2020.08.12.247767.

- 370. Sustained delivery approaches to improving adaptive immune responses / B.
 S. Ou, O. M. Saouaf, J. Baillet, E. A. Appel // Advanced Drug Delivery Reviews.
 2022. T. 187. C. 114401.
- 371. Systematic review and meta-analysis of human genetic variants contributing to COVID-19 susceptibility and severity / K. Gupta, G. Kaur, T. Pathak, I. Banerjee // Gene. 2022. T. 844. C. 146790.
- 372. T cell and antibody kinetics delineate SARS-CoV-2 peptides mediating long-term immune responses in COVID-19 convalescent individuals / T. Bilich, A. Nelde, J. S. Heitmann [и др.] // Science Translational Medicine. 2021. T. 13, № 590. C. eabf7517.
- 373. T cell response against SARS-CoV-2 persists after one year in patients surviving severe COVID-19 / F. Venet, M. Gossez, F. Bidar [и др.] // eBioMedicine. – 2022. – T. 78. – C. 103967.
- 374. T-CoV: a comprehensive portal of HLA-peptide interactions affected by SARS-CoV-2 mutations / S. Nersisyan, A. Zhiyanov, M. Shkurnikov, A. Tonevitsky // Nucleic Acids Research. – 2022. – T. 50, № D1. – C. D883-D887.
- 375. Tackling COVID-19 with neutralizing monoclonal antibodies / D. Corti, L.
 A. Purcell, G. Snell, D. Veesler // Cell. 2021. T. 184, № 17. C. 4593-4595.
- 376. Tall, A. R. Cholesterol, inflammation and innate immunity / A. R. Tall, L. Yvan-Charvet // Nature Reviews Immunology. 2015. T. 15, № 2. C. 104-116.
- 377. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals / A. Grifoni, D. Weiskopf, S. I. Ramirez [и др.] // Cell. – 2020. – Т. 181, № 7. – С. 1489-1501.e15.
- 378. Telomere-length dependent T-cell clonal expansion: A model linking ageing to COVID-19 T-cell lymphopenia and mortality / J. J. Anderson, E. Susser, K. G. Arbeev [и др.] // eBioMedicine. – 2022. – Т. 78. – С. 103978.
- 379. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19 / X. He, E. H. Y. Lau, P. Wu [и др.] // Nature Medicine. – 2020. – T. 26, № 5. – C. 672-675.

- 380. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome / D. Kim, J.-Y. Lee, J.-S. Yang [и др.] // Cell. 2020. Т. 181, № 4. С. 914-921.e10.
- 381. The effect of spike mutations on SARS-CoV-2 neutralization / C. Rees-Spear, L. Muir, S. A. Griffith [и др.] // Cell Reports. – 2021. – Т. 34, № 12. – С. 108890.
- 382. The evolutionary history of ACE2 usage within the coronavirus subgenus Sarbecovirus / H. L. Wells, M. Letko, G. Lasso [и др.] // Virus Evolution. 2021. Т. 7, № 1. С. veab007.
- 383. The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases. / S.-Y. Chen, Y. Wang, M. J. Telen, J.-T. Chi // PloS one. 2008. T. 3, № 6. C. e2360.
- 384. The human reticulocyte transcriptome. / S.-H. Goh, M. Josleyn, Y. T. Lee [и др.] // Physiological genomics. 2007. Т. 30, № 2. С. 172-8.
- 385. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update / R. Vita, S. Mahajan,
 J. A. Overton [и др.] // Nucleic Acids Research. 2019. Т. 47, № D1. С. D339-D343.
- 386. The importance of accessory protein variants in the pathogenicity of SARS-CoV-2 / S. S. Hassan, P. P. Choudhury, G. W. Dayhoff [и др.] // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2022. – Т. 717. – С. 109124.
- 387. The influence of HLA genotype on the severity of COVID-19 infection / D.
 J. Langton, S. C. Bourke, B. A. Lie [и др.] // HLA. 2021. Т. 98, № 1. С. 14-22.
- 388. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases / J. Robinson, J.
 A. Halliwell, J. D. Hayhurst [и др.] // Nucleic Acids Research. 2015. T. 43. The IPD and IMGT/HLA database, № D1. C. D423-D431.
- 389. The microRNA miR-485 targets host and influenza virus transcripts to regulate antiviral immunity and restrict viral replication / H. Ingle, S. Kumar, A. A. Raut [и др.]. Text : electronic // Science Signaling. 2015. T. 8, № 406. C. ra126.

- 390. The microRNA spectrum in 12 body fluids. / J. A. Weber, D. H. Baxter, S. Zhang [и др.] // Clinical chemistry. 2010. Т. 56, № 11. С. 1733-41.
- 391. The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis / K. D. Rasmussen, S. Simmini, C. Abreu-Goodger [и др.] // Journal of Experimental Medicine. 2010. T. 207, № 7. С. 1351-1358.
- 392. The molecular virology of coronaviruses / E. Hartenian, D. Nandakumar, A. Lari [и др.] // Journal of Biological Chemistry. 2020. Т. 295, № 37. С. 12910-12934.
- 393. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 infection and transmission / Y. Liu, J. Liu, K. S. Plante [и др.] // Nature. – 2022. – T. 602, № 7896. – C. 294-299.
- 394. The noncoding and coding transcriptional landscape of the peripheral immune response in patients with COVID-19 / H. Tang, Y. Gao, Z. Li [и др.] // Clinical and Translational Medicine. 2020. Т. 10, № 6. С. e200.
- 395. The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I / Y. Zhang, Y. Chen, Y. Li [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2021. T. 118, № 23. C. e2024202118.
- 396. The rise and spread of the SARS-CoV-2 AY.122 lineage in Russia / G. Klink, K. Safina, E. Nabieva [и др.] // Virus Evolution. 2022. T. 8, № 1.
- 397. The role of SARS-CoV-2 accessory proteins in immune evasion / M. Zandi,
 M. Shafaati, D. Kalantar-Neyestanaki [и др.] // Biomedicine & Pharmacotherapy.
 2022. T. 156. C. 113889.
- 398. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation / Z. Bai, Y. Cao, W. Liu, J. Li // Viruses. 2021. T. 13, № 6. C. 1115.
- 399. The SARS-CoV-2 subgenome landscape and its novel regulatory features / D. Wang, A. Jiang, J. Feng [и др.] // Molecular Cell. 2021. T. 81, № 10. C. 2135-2147.e5.

- 400. The Severe Covid-19 GWAS Group. Genomewide Association study of severe COVID-19 with respiratory failure / The Severe Covid-19 GWAS Group // New England Journal of Medicine. – 2020. – T. 383, № 16. – C. 1522-1534.
- 401. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis / I. Hamming, W. Timens, M. Bulthuis [и др.] // The Journal of Pathology. 2004. T. 203, № 2. C. 631-637.
- 402. TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines / M. Zheng, R. Karki, E. P. Williams [и др.] // Nature Immunology. 2021. Т. 22, № 7. С. 829-838.
- 403. TMPRSS2 specific miRNAs as promising regulators for SARS-CoV-2 entry checkpoint / T. Kaur, S. Kapila, R. Kapila [и др.] // Virus Research. 2021. T. 294. C. 198275.
- 404. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial / O. Abani, A. Abbas, F. Abbas [и др.] // The Lancet. 2021. Т. 397, № 10285. С. 1637-1645.
- 405. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus / B. Korber, W. M. Fischer, S. Gnanakaran [и др.] // Cell. 2020. Т. 182, № 4. С. 812-827.e19.
- 406. Transgenic rice plants expressing artificial miRNA targeting the rice stripe virus MP gene are highly resistant to the virus / L. Zhou, Q. Yuan, X. Ai [и др.] // Biology. 2022. Т. 11, № 2. С. 332.
- 407. Translational shutdown and evasion of the innate immune response by SARS-CoV-2 NSP14 protein / J. C.-C. Hsu, M. Laurent-Rolle, J. B. Pawlak [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2021. T. 118, № 24. C. e2101161118.
- 408. Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany / C. Rothe, M. Schunk, P. Sothmann [и др.] // New England Journal of Medicine. 2020. Т. 382, № 10. С. 970-971.

- 409. Unique and complementary suppression of cGAS-STING and RNA sensingtriggered innate immune responses by SARS-CoV-2 proteins / Y. Rui, J. Su, S. Shen [и др.] // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2021. – T. 6, № 1. – C. 123.
- 410. Unraveling COVID-19: A Large-Scale Characterization of 4.5 Million COVID-19 Cases Using CHARYBDIS / K. Kostka, T. Duarte-Salles, A. Prats-Uribe [и др.] // Clinical Epidemiology. 2022. Т. 14. С. 369-384.
- Vilar, S. One Year of SARS-CoV-2: How much has the virus changed? / S.
 Vilar, D. G. Isom // Biology. 2021. T. 10, № 2. C. 91.
- 412. Viruses and miRNAs: more friends than foes / P. Bruscella, S. Bottini, C. Baudesson [и др.] // Frontiers in Microbiology. 2017. Т. 8. С. 824.
- Waning of IgG, total and neutralizing antibodies 6 months post-vaccination with BNT162b2 in healthcare workers / J.-L. Bayart, J. Douxfils, C. Gillot [и др.]
 // Vaccines. 2021. Т. 9, № 10. С. 1092.
- 414. What is the potential function of microRNAs as biomarkers and therapeutic targets in COVID-19? / A. Guterres, C. H. de Azeredo Lima, R. L. Miranda, M. R. Gadelha // Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases. 2020. T. 85. C. 104417.
- Wherry, E. J. Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection /
 E. J. Wherry, R. Ahmed // Journal of Virology. 2004. T. 78, № 11. C. 5535-5545.
- World Health Organization. COVID-19 vaccine tracker and landscape.
 [Электронный pecypc] URL: https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines (дата обращения: 20.02.2023).
- 417. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants.
 [Электронный ресурс]. URL: https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants (дата обращения: 20.02.2023).
- 418. Yoshimoto, F. K. A Biochemical Perspective of the Nonstructural Proteins (NSPs) and the Spike Protein of SARS CoV-2 / F. K. Yoshimoto // The Protein Journal. 2021. T. 40, № 3. C. 260-295.

 Zunec R. A review of HLA and COVID-19 association studies / R. Zunec // Molecular and experimental biology in medicine. – 2020. – T. 3, № 2. – C. 25-30.

Таблица А.1 – Пер	ечень аллелей ГКГС	-I, анализируемых і	в исследовании

Аллель	Ген
HLA-A*01:01	HLA-A
HLA-A*02:01	HLA-A
HLA-A*02:02	HLA-A
HLA-A*02:06	HLA-A
HLA-A*02:11	HLA-A
HLA-A*03:01	HLA-A
HLA-A*03:02	HLA-A
HLA-A*11:01	HLA-A
HLA-A*23:01	HLA-A
HLA-A*24:02	HLA-A
HLA-A*25:01	HLA-A
HLA-A*26:01	HLA-A
HLA-A*29:02	HLA-A
HLA-A*30:01	HLA-A
HLA-A*30:02	HLA-A
HLA-A*31:01	HLA-A
HLA-A*32:01	HLA-A
HLA-A*33:03	HLA-A
HLA-A*68:01	HLA-A
HLA-A*68:02	HLA-A
HLA-A*74:01	HLA-A
HLA-B*07:02	HLA-B
HLA-B*08:01	HLA-B
HLA-B*14:02	HLA-B
HLA-B*15:01	HLA-B
HLA-B*15:03	HLA-B
HLA-B*18:01	HLA-B
HLA-B*27:05	HLA-B
HLA-B*35:01	HLA-B
HLA-B*35:03	HLA-B
HLA-B*38:01	HLA-B
HLA-B*40:01	HLA-B
HLA-B*40:02	HLA-B
HLA-B*40:06	HLA-B
HLA-B*42:01	HLA-B

Продолжение Таблицы А.1

HLA-B*44:02	HLA-B
HLA-B*44:03	HLA-B
HLA-B*45:01	HLA-B
HLA-B*50:01	HLA-B
HLA-B*51:01	HLA-B
HLA-B*52:01	HLA-B
HLA-B*53:01	HLA-B
HLA-B*57:01	HLA-B
HLA-B*58:01	HLA-B
HLA-B*58:02	HLA-B
HLA-C*01:02	HLA-C
HLA-C*02:02	HLA-C
HLA-C*02:10	HLA-C
HLA-C*03:02	HLA-C
HLA-C*03:03	HLA-C
HLA-C*03:04	HLA-C
HLA-C*04:01	HLA-C
HLA-C*05:01	HLA-C
HLA-C*06:02	HLA-C
HLA-C*07:01	HLA-C
HLA-C*07:02	HLA-C
HLA-C*08:01	HLA-C
HLA-C*08:02	HLA-C
HLA-C*12:02	HLA-C
HLA-C*12:03	HLA-C
HLA-C*14:02	HLA-C
HLA-C*15:02	HLA-C
HLA-C*16:01	HLA-C
HLA-C*17:01	HLA-C

Аллель	Частота,	Частота	Частота	р, Волна	ОШ,	<i>р</i> , Волна 3	ОШ,	<i>р</i> , Волна 1	ОШ,
	Популяци	, Волна	, Волна	3 – Волна	Волна 3 –	_	Волна 3 –	_	Волна 1 –
	я	1	3	1	Волна 1	Популяци	Популяци	Популяци	Популяци
						Я	я	Я	Я
HLA-	13,3	17,3	9,2	0,00	0,49	0,03	0,66	0,10	1,36
A*01:01									
HLA-	12,1	7,5	14	0,02	1,84	0,66	1,08	0,03	0,59
C*07:02									
HLA-	2,3	3,5	1	0,02	0,28	0,09	0,42	0,31	1,50
C*15:02									
HLA-	5,1	3,5	7	0,04	2,04	0,14	1,45	0,42	0,71
A*26:01	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,			ŕ	-	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	,		-
HLA-	0,9	1,9	0,4	0,06	0,21	0,34	0,43	0,22	2,04
C*03:02	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,			ŕ	-	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	,		-
HLA-	2,2	2,8	1,2	0,11	0,42	0,21	0,54	0,52	1,28
A*30:01	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,			ŕ	-	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	,		-
HLA-	1,6	2,2	0,8	0,12	0,36	0,23	0,49	0,62	1,35
A*33:01									
HLA-	1,1	1,9	0,6	0,10	0,31	0,55	0,57	0,25	1,81
A*33:03	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,			ŕ	-	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	,		-
HLA-	11,2	13,2	9,2	0,10	0,68	0,40	0,85	0,29	1,24
C*06:02				ŕ	-	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	,		-
HLA-	24,4	25,5	28,4	0,40	1,17	0,26	1,17	1,00	1,00
A*02:01									

Таблица А.2 – Взаимосвязь генотипа ГКГС-І с волнами пандемии COVID-19

HLA-	13,3	11,6	13,8	0,51	1,17	0,93	1,02	0,55	0,87
A*03:01									
HLA-	12,6	11,9	12	1,00	1,02	0,73	0,93	0,76	0,92
C*07:01	,	,		,		,		,	,
HLA-	12,5	13,5	10,8	0,26	0,77	0,47	0,87	0,54	1,13
C*04:01									
HLA-	12	13,2	14,6	0,59	1,14	0,26	1,22	0,76	1,07
C*12:03									
HLA-	11,8	9,4	11,6	0,64	1,15	0,86	0,96	0,46	0,84
A*24:02	, ,		ŕ			-			-
HLA-	10,9	6,3	11	0,12	1,57	0,71	0,92	0,04	0,58
B*07:02									
HLA-	7	7,9	6,6	0,48	0,80	0,74	0,91	0,61	1,13
B*08:01									
HLA-	7	4,1	6,8	0,16	1,66	0,91	0,96	0,08	0,58
B*44:02									
HLA-	6,9	7,5	9	0,51	1,24	0,20	1,31	0,80	1,06
B*18:01									
HLA-	6,3	4,7	5	1,00	1,06	0,47	0,81	0,40	0,76
B*35:01									
HLA-	5,8	4,4	6	0,41	1,39	1,00	1,02	0,37	0,73
C*02:02									
HLA-	5,5	7,2	5	0,17	0,65	0,70	0,89	0,26	1,37
B*13:02									

HLA-	5,1	7,9	5,8	0,31	0,75	0,53	1,16	0,12	1,55
B*51:01	5 1	6.0	-	0.06	0.54	0.00	1.0.0	0.10	1 4 4
HLA-	5,1	6,9	5,6	0,36	0,74	0,80	1,06	0,19	1,44
C*03:04									
HLA-	5	5,7	6,6	0,55	1,25	0,22	1,34	0,88	1,07
A*11:01									
HLA-	4,8	4,4	6,4	0,35	1,44	0,20	1,38	1,00	0,96
B*38:01									
HLA-	4.8	2.5	4	0.33	1.61	0.59	0.85	0.13	0.53
C*05:01) -)		-)) -	-)	-)	-) -	-)
HLA-	4,2	6,3	7,4	0,48	1,25	0,01	1,87	0,21	1,49
A*25:01			,	,	,	·	, ,	,	
HLA-	3,7	3,1	2,8	0,83	0,89	0,53	0,79	0,86	0,89
C*03:03						ŕ			
HLA-	3.6	4,1	3.8	0.85	0.93	0.88	1,05	0.73	1,13
B*15:01	,	,	,	,	,	,	,	,	,
HLA-	3.4	5.7	4.4	0.49	0.78	0.55	1.19	0.23	1.52
C*01:02	,	,	,	,	,	,	,	,	,
HLA-	3,3	1,3	1,4	1,00	1,11	0,05	0,42	0,07	0,38
A*68:01	,	,	,	,	,	,	,	,	,
HLA-	3,2	2,8	3,2	0,84	1,13	1,00	1,01	0,85	0,89
A*32:01									
HLA-	3	3,8	3	0,69	0,86	1,00	1,03	0,70	1,19
B*27:05					-		-		

HLA-	3	5,7	2,6	0,02	0,41	0,61	0,79	0,06	1,91
B*40:01									
HLA-	2,7	3,5	2,4	0,39	0,69	1,00	0,93	0,43	1,36
A*23:01									
HLA-	2,7	4,4	3	0,33	0,67	0,73	1,17	0,13	1,74
B*44:03									
HLA-	2,7	1,3	1,8	0,78	1,44	0,36	0,66	0,19	0,46
C*17:01									
HLA-	2,6	2,5	1,8	0,62	0,71	0,45	0,70	1,00	0,98
C*08:02									
HLA-	2,5	2,8	2	0,81	0,90	0,71	0,81	1,00	0,90
A*31:01									
HLA-	2,5	1,9	2,2	0,81	1,17	0,85	0,89	0,67	0,76
B*39:01									
HLA-	2,5	1,9	2,6	0,64	1,39	0,86	1,11	0,82	0,80
B*40:02									
HLA-	2,5	1,6	2	0,79	1,28	0,71	0,81	0,50	0,64
B*57:01									
HLA-	2,3	2,2	1,8	0,80	0,81	0,57	0,77	1,00	0,94
B*14:02									
HLA-	2,3	1,6	2,6	0,46	1,67	0,86	1,12	0,50	0,67
B*35:03									
HLA-	2,2	0,9	1,2	1,00	1,27	0,21	0,54	0,22	0,42
B*41:02									

HLA- C*12:02	2,2	2,2	3	0,66	1,28	0,58	1,27	1,00	0,99
HLA- B*52:01	2,1	2,8	3,2	1	1,06	0,36	1,44	0,51	1,36
HLA- C*07:04	1,9	1,6	2,4	0,61	1,41	0,69	1,18	1,00	0,84
HLA- B*49:01	1,8	1,3	2,6	0,31	1,93	0,42	1,38	0,79	0,71
HLA- B*50:01	1,5	1,6	1	0,52	0,63	0,47	0,66	1,00	1,04
HLA- B*58:01	1,5	1,9	0,8	0,20	0,42	0,32	0,52	0,61	1,25
HLA- B*37:01	1,4	1,3	1,4	1,00	1,11	1,00	1,00	1,00	0,90
HLA- A*29:02	1,2	0,3	0,6	1	1,91	0,39	0,51	0,31	0,27
HLA- B*44:05	1,2	0,6	0,4	0,64	0,63	0,23	0,34	0,53	0,54
HLA- B*55:01	1,2	0,9	1,2	1,00	1,27	1	1,03	1,00	0,81
HLA- A*02:05	1,1	0,9	0,8	0,68	0,64	0,55	0,57	1,00	0,90
HLA- B*27:02	1,1	0,3	1,2	0,26	3,85	0,79	1,14	0,30	0,30

HLA- B*35:02	1,1	1,6	0,6	0,27	0,38	0,55	0,57	0,54	1,50
HLA- B*35:08	0,9	0,9	0,2	0,30	0,21	0,17	0,21	1	1,01
HLA- B*56:01	0,9	1,3	1	0,74	0,79	1,00	1,07	0,74	1,35
HLA- B*15:17	0,8	0,3	0,4	1	1,27	0,50	0,49	0,69	0,38
HLA- B*41:01	0,8	0,9	0,8	1,00	0,85	1	0,98	0,74	1,15
HLA- C*14:02	0,8	2,2	2,4	1,00	1,09	0,03	2,98	0,07	2,73
HLA- C*16:01	0,8	0	0,8	1	0	1	0,98	1	0
HLA- A*29:01	0,7	0,6	1	0,71	1,60	0,55	1,43	1,00	0,90
HLA- B*48:01	0,7	0	0,2	1	0	0,43	0,28	1	0
HLA- C*15:05	0,7	0,3	1	0,41	3,20	0,55	1,43	0,68	0,45
HLA- B*07:05	0,6	0,3	1	0,41	3,20	0,51	1,72	1,00	0,54
HLA- A*66:01	0,5	0	0,4	1	0	1	0,86	1	0

HLA-	0,5	0,6	0,2	0,56	0,32	0,66	0,43	0,66	1,35
A*68:02									
HLA-	0,5	0,9	1	1,00	1,06	0,30	2,15	0,40	2,03
C*16:02				·	, ,	·	, ,	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	
HLA-	0,4	0,3	0,6	1	1,91	0,68	1,72	1	0,90
A*02:06									
HLA-	0,4	0	0,2	1	0	1	0,57	1	0
A*03:02									
HLA-	0,4	0,3	0,4	1	1,27	1,00	1,14	1	0,90
B*47:01									
HLA-	0,4	0	0,4	1	0	1,00	1,14	1	0
C*08:01									
HLA-	0,4	0	0,2	1	0	1	0,57	1	0
C*08:03									
HLA-	0,4	0,6	0,2	0,56	0,32	1	0,57	0,62	1,80
C*16:04									
HLA-	0,2	0,3	0,2	1	0,64	1,00	0,86	1,00	1,35
B*27:14									
HLA-	0,2	0	0,2	1	0	1,00	0,86	1	0
B*40:06									
HLA-	0,1	0	0,4	1	0	0,56	3,43	1	0
A*02:17									
HLA-	0,1	0	0,2	1	0	1	1,71	1	0
B*15:12									

HLA- D*15.19	0,1	0	0,2	1	0	1	1,71	1	0
HLA- B*18:03	0,1	0,9	0	1	0	1	0	0,06	8,13
HLA- B*39:06	0,1	0	0,6	1	0	0,14	5,15	1	0
HLA- B*45:01	0,1	0	0,2	1	0	1	1,71	1	0
HLA- B*51:07	0,1	0,6	0	1	0	1	0	0,18	5,40
HLA- C*15:04	0,1	0	0,2	1	0	1	1,71	1	0
HLA- A*02:07	0	0	0,2	1	0	1	0	_	_
HLA- A*26:08	0	0,3	0	1	0	_	_	1	0
HLA- A*68:12	0	0,3	0	1	0	_	_	1	0
HLA- B*07:04	0	0	0,2	1	0	1	0	_	_
HLA- B*07:17	0	0,3	0	1	0	_	_	1	0
HLA- B*13:01	0	0	0,2	1	0	1	0	_	_

HLA- D*14:01	0	0,6	0	1	0	_	_	1	0
HLA- B*15.02	0	0	0,2	1	0	1	0		
HLA- B*15:08	0	0	0,4	1	0	1	0		
HLA- B*27:07	0	0,3	0	1	0	_	_	1	0
HLA- B*39:24	0	0	0,2	1	0	1	0	_	_
HLA- B*42:05	0	0,3	0	1	0	_	_	1	0
HLA- B*44:27	0	0,9	0	1	0	_	_	1	0
HLA- B*46:01	0	0	0,2	1	0	1	0	_	_
HLA- B*51:09	0	0	0,2	1	0	1	0	_	_
HLA- B*53:01	0	0,3	0	1	0	_	_	1	0
HLA- B*54:01	0	0,3	0	1	0	_	_	1	0
HLA- B*55:02	0	0,6	0	1	0	_	_	1	0

HLA-	0	0,3	0	1	0	_	_	1	0
C*04:09									
HLA-	0	0,3	0	1	0	_	_	1	0
C*04:10									
HLA-	0	0,3	0	1	0	_	_	1	0
C*06:21									
HLA-	0,2	0	0	_	—	1	0	1	0
A*01:02									
HLA-	0,2	0	0	_	_	1	0	1	0
A*24:03									
HLA-	0,2	0	0	_	_	1	0	1	0
A*30:02									
HLA-	0,2	0	0	_	_	1	0	1	0
A*30:04									
HLA-	0,2	0	0	_	—	1	0	1	0
A*31:08									
HLA-	0,2	0	0	_	_	1	0	1	0
B*15:03									
HLA-	0,2	0	0	_	_	1	0	1	0
B*51:05									
HLA-	0,1	0	0	_	_	1	0	1	0
A*01:03									
HLA-	0,1	0	0	_	_	1	0	1	0
A*02:02									

HLA-	0,1	0	0	_	_	1	0	1	0
A*02:12	ŕ								
HLA-	0,1	0	0	_	_	1	0	1	0
A*68:24									
HLA-	0,1	0	0	_	-	1	0	1	0
B*44:04									
HLA-	0,1	0	0	_	_	1	0	1	0
B*57:03									
HLA-	0,1	0	0	_	_	1	0	1	0
B*73:01									

Пептид	HLA-A*01:01					HLA-A*02:01				
	ЛО	ЛП	ИО	ИП	НД	ЛО	ЛП	ИО	ИП	НД
TTDPSFLGRY	1	0	0	12	0	0	0	4	0	11
CTDDNALAYY	8	0	0	5	0	0	0	0	0	15
ALWEIQQVV	0	1	8	0	4	9	0	0	6	0
GTDLEGNFY	10	0	0	3	0	0	0	1	0	14
YLFDESGEFKL	0	0	7	0	6	12	0	0	3	0
FLLNKEMYL	0	0	13	0	0	13	0	0	2	0
HTTDPSFLGR	1	0	0	12	0	0	0	2	0	13
Y										
NTCDGTTFTY	12	0	0	1	0	0	0	2	0	13
PTDNYITTY	4	0	0	9	0	0	0	3	0	12
FTYASALWEI	0	0	7	0	6	2	0	0	0	13
NMLRIMASL	0	0	6	0	7	15	0	0	0	0
RQLLFVVEV	0	0	9	0	4	15	0	0	0	0
YLDAYNMMI	0	0	13	0	0	15	0	0	0	0
DTDFVNEFY	7	0	0	6	0	0	1	2	0	12
KLWAQCVQL	0	0	4	0	9	10	0	0	5	0

Таблица А.3 – Т-клеточный ответ на эпитопы ГКГС-І носителей аллелей HLA-A*01:01 и HLA-A*02:01

ЛО – ложно-отрицательные реакции; ЛП – ложно-положительные реакции; ИО – истинно-отрицательные реакции; ИП – истинно-положительные реакции, НД – данные отсутствуют

Орган	Мин.	Q1	Q2	Q3	Макс.	Сред.	Ст. откл.
Толстый кишечник	17,9	17,9	18,2	18,7	22,8	18,8	1,5
Почки	12,3	15,4	17,9	19,4	20,7	17,3	2,4
Желудок	10,7	14,6	15,6	18,6	23,6	16,5	3,5
Печень	12,9	14,4	15,3	16,1	17,5	15,3	1,2
Лёгкие	12,3	13,7	14,2	14,5	15,8	14,1	0,7
Щитовидная железа	12,8	13,5	14,0	14,3	15,0	13,9	0,6
Пищевод	12,0	12,5	13,3	14,9	16,6	13,8	1,5
Мочевой пузырь	11,2	12,1	13,2	13,8	17,2	13,5	1,7
Молочная железа	9,2	12,7	13,1	13,5	16,6	13,1	0,8
Матка	10,8	12,2	12,8	13,3	16,6	12,8	1,2
Предстательная железа	10,2	11,6	12,6	13,4	20,9	12,8	1,8

Таблица А.4 – Экспрессия *ACE2* в различных органах, log2FPKM-UQ

Таблица А.5 – Экспрессия *TMPRSS2* в различных органах, log2FPKM-UQ

Орган	Мин.	Q1	Q2	Q3	Макс.	Сред.	Ст. откл.
Предстательная железа	17,5	20,7	21,8	22,6	23,3	21,4	1,5
Толстый кишечник	20,3	20,7	20,9	21,2	21,7	21,0	0,4
Пищевод	12,8	18,7	20,0	20,8	21,2	19,2	2,3
Желудок	10,1	17,7	19,5	20,3	20,9	18,2	3,2
Лёгкие	17,9	18,9	19,3	19,7	20,9	19,3	0,6
Почки	9,9	18,4	18,8	19,2	20,2	18,8	1,0
Печень	17,0	18,1	18,4	19,1	20,7	18,6	0,9
Мочевой пузырь	7,1	12,3	17,2	18,0	19,3	15,2	4,4
Молочная железа	0,0	16,2	17,1	17,6	19,2	15,7	4,4
Щитовидная железа	13,6	16,0	16,5	16,9	17,7	16,3	0,8
Матка	7,3	11,4	13,0	15,7	17,1	13,2	2,9

216