



Медицински университет – Пловдив

Медицински факултет

Катедра по медицинска микробиология и имунология

„Проф. д-р Елисей Янев“

**Проучване на В-клетъчната имунна памет при  
COVID-19 и поствакцинален имунитет**

**Д-р Мартина Радославова Божкова**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на  
образователна и научна степен „ДОКТОР“

Научно направление: 7.1 Медицина,  
в докторска програма по „Имунология“

**Научен ръководител:**

**Доц. д-р Велизар Шиваров, дм**

**Пловдив**

**2025 год.**

Д-р Мартина Радославова Божкова е родена на 29.07.1994 г. в град Пловдив. Завършва медицина с отличен успех през 2019 г. в Медицински университет – Пловдив. От октомври 2020 г. е член на академичния състав на Катедра по медицинска микробиология и имунология „Проф. д-р Елисей Янев“, Медицински университет – Пловдив, където работи като асистент. От 2022 г. е редовен докторант към Катедрата. През декември 2024 г. придобива специалност по Клинична имунология.

Дисертационният труд е написан на 160 страници и включва 7 таблици и 29 фигури. Оформен е в 12 глави. Библиографската справка обхваща 361 литературни източника, от които по-голямата част са публикувани след 2020 г.

Всички изследвания са изработени от докторанта в Катедрата по медицинска микробиология и имунология „Проф. д-р Елисей Янев“ към Медицински факултет на Медицински университет, гр. Пловдив. Статистическите анализи са изготвени в Катедра по социална медицина и обществено здраве, Факултет по обществено здраве към МУ- Пловдив с активното участие на докторанта.

Проучването е финансирано със средства по един вътреуниверситетски проект към Медицински университет, гр. Пловдив (КОВ-03/2021) на тема: „Проучване на продължителността на В-клетъчната имунна памет след имунизация срещу COVID-19“ и един национален проект – Проект № КП-06-Н53/1 „Продължителност на имунната памет след имунизация срещу КОВИД-19 – клетъчен и хуморален имунитет на ниво субпопулации на паметни Т- и В клетки (ФНИ).

# СЪДЪРЖАНИЕ

I. УВОД .....	6
II. ЦЕЛ .....	7
III. ЗАДАЧИ .....	7
IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....	7
1. Материали .....	7
1.1. Критерии за включване и разпределение по групи .....	8
2. Методи .....	8
2.1. Изолиране на периферни мононуклеарни клетки (PBMCs) .....	8
2.2. Замразяване на периферни мононуклеарни клетки (PBMCs) .....	9
2.3. Размразяване на периферни мононуклеарни клетки (PBMCs) .....	9
2.4. Детекция на anti-SARS-CoV-2-специфични RBD-IgG чрез ELFA (Enzyme-Linked Fluorescent Assay) .....	10
2.5. Определяне на степента на вирусната инхибиция чрез ELISA .....	10
2.6. ELISpot .....	11
2.7. Приготвяне на S1-специфични тетрамери за детекция на специфични паметови В лимфоцити .....	12
2.8. Многопараметърна флоуцитометрия .....	12
2.9. Статистическа обработка .....	16
V. РЕЗУЛТАТИ .....	17
1. Демографски характеристики на участниците .....	17
1.1. Разпределение по възраст .....	17
1.2. Разпределение по пол .....	17
2. Резултати по Задача 1 .....	19
2.1. Anti-SARS-CoV-2 RBD IgG .....	19
2.2. Резултати от изследване на степента на инхибиция на вирус-неутрализиращите антитела .....	23
3. Резултати по Задача 2 .....	25
4. Резултати по Задача 3 .....	27
5. Резултати по Задача 4 .....	31
6. Резултати по Задача 5 .....	41
VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	47
VII. ИЗВОДИ .....	48
VIII. ПРИНОСИ .....	49
IX. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И НАУЧНИТЕ СЪОБЩЕНИЯ ПО ТЕМАТА НА НАСТОЯЩИЯ ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД .....	49

## СПИСЪК С ФИГУРИ

Фигура 1. Определяне на оцветителен индекс на CD27. ....	14
Фигура 2. Алгоритъм (гейтинг стратегия) за анализ в DIVA ver.8. софтуер. ....	16
Фигура 3. Разпределение на участниците по възраст. ....	17
Фигура 4. Разпределение на участниците по пол. ....	18
Фигура 5. Разпределение на участниците в проучването по периоди. ....	19
Фигура 6. Разпределение на anti-RBD IgG по групи в съответните периоди. ....	21
Фигура 7. Сравнение на нивата на anti-RBD IgG междугрупово в отделните периоди. ....	22
Фигура 8. Степен на инхибция на вирус-неутрализиращите антитела по групи в съответните периоди. ....	24
Фигура 9 Сравнение на степента на инхибция на вирус-неутрализиращите антитела междугрупово в отделните периоди. ....	24
Фигура 10. Резултати от В-ELISpot по групи в съответните периоди. ....	26
Фигура 11. Сравнение на резултатите от В-ELISpot междугрупово в отделните периоди. ....	27
Фигура 12. Резултати от Т-ELISpot по групи в съответните периоди. ....	29
Фигура 13. Сравнение на резултатите от В-ELISpot междугрупово в отделните периоди. ....	29
Фигура 14. Разпределение по групи на % CD19 <sup>+</sup> клетки, представени от лимфоцитната популация. ....	32
Фигура 15. Разпределение по групи на паметовите В-лимфоцити, представени като процент от CD19 <sup>+</sup> клетки. ....	33
Фигура 16. Разпределение по групи на % CSMB клетки, представени като процент от паметови В-лимфоцити. ....	34
Фигура 17. Разпределение по групи на % CSMB IgG клетки, представени като процент от паметови В-лимфоцити. ....	35
Фигура 18. Разпределение по групи на % NCSMB клетки, представени като процент от паметови В-лимфоцити. ....	36
Фигура 19. Разпределение по групи на % зрели В-лимфоцити. ....	36
Фигура 20. Разпределение по групи на % преходните В-лимфоцити. ....	37
Фигура 21. Разпределение по групи на % наивните В-лимфоцити. ....	38
Фигура 22. Разпределение по групи на % плазмобласти. ....	39
Фигура 23. Разпределение по групи на % плазматични клетки. ....	39
Фигура 24. Разпределение по групи на % S1 CSMB клетки, представени като процент от паметовите В-лимфоцити. ....	42
Фигура 25. Разпределение по групи на % S1 CSMB IgG клетки, представени като процент от паметовите В-лимфоцити. ....	43
Фигура 26. Разпределение по групи на % S1 NCSMB клетки, представени като процент от паметовите В-лимфоцити. ....	44
Фигура 27. Разпределение по групи на % S1 PB клетки. ....	45

## СПИСЪК НА ТАБЛИЦИТЕ

Таблица 1. Използвани антитела срещу човешки левкоцитни антигени и флуоресцентни багрила за многопараметърен флоуцитометричен анализ. ....	13
Таблица 2. Работна концентрация на антителата в панела ( $\mu\text{L}$ ). ....	14
Таблица 3. 13-цветен панел за анализ на В клетъчните субпопулации с добавени S1 тетрамери за детекция на специфични паметови В-лимфоцити. ....	15
Таблица 4. Разпределение на участниците по пол и възраст в отделните периоди. ....	18

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ADCC — Антияло-зависима клетъчно-медирана цитотоксичност	MBC — Паметови В-лимфоцити
AID — Активационно-индуцирана цитидин дезаминаза	MFI — Средна флуоресцентна интензивност
BAU/ml — Единици на свързващи антитела на милилитър	MZB — Маргиналнозонови В-лимфоцити
BCR — В-клетъчен рецептор	NK — Естествените клетки убийци
Breg — Регулаторни В-лимфоцити	NCSMB — Паметови В-лимфоцити без класово превключване
CD — Клъстер на диференциация (Cluster of Differentiation)	PB — Плазмобласти
COVID — Коронавирусна болест	PBMCs — Периферни мононуклеарни клетки
CSMB — Паметови В-лимфоцити с класово превключване	PBS — Фосфатно-буфериран разтвор
CSR — Изотипно превключване	RBD — Рецептор-свързващ домейн
CVID — Общ вариабилен имуен дефицит	SARS — Тежък остър респираторен синдром
ELFA — Ензимно-свързан флуоресцентен анализ	SARS-CoV-2 — Коронавирус 2, причиняващ тежък остър респираторен синдром
ELISPOT — Ензимно-свързан имуоспот анализ	SFU — Спот-образуващи единици
FACS — Флуоресцентно активиран клетъчен сортер	SHM — Соматична хипермутация
GC — Герминативен център	TCR — Т-клетъчен рецептор
IFN — Интерферон	TLR — Toll-подобен рецептор
IgA — Имуноглобулин А	TNF — Тумор-некротизиращ фактор
IgG — Имуноглобулин G	Treg — Регулаторни Т-лимфоцити
IgM — Имуноглобулин М	mRNA — Информационна РНК (messenger RNA)
IL — Интерлевкин	
IQR — Интерквартилен размах	
LLPC — Дългоживеещи плазматични клетки	

# I. УВОД

Осмислянето и дефинирането на понятието имунна (имунологична) памет е от централно значение за съвременната имунология. В зората на обособяването ѝ като наука под него се разбира феноменът за невъзприемчивост към повторно заразно заболяване след преболедуване или ваксиниране. През втората половина на 20-ти век с понятието имунна памет се описва способността за по-бърз, по-мошен и по-специфичен имуен отговор при повторна среща с антиген и отразява съществуването на клонално пролиферирани антиген-специфични лимфоцити. Последната част от определението всъщност отразява догматичното схващане в имунологията през този период, че имунната памет е присъща само за придобития (адаптивния) имунитет, тъй като само неговите клетки могат да претърпяват соматични пренареждания на гените за антигенните рецептори. Поради тази причина в продължения на десетилетия се приема, че имунната памет е присъща само за гръбначните животни и представлява еволюционно предимство, което най-ярко се демонстрира чрез майчино-феталния трансфер на имуноглобулини при бозайниците. Ясно е, че имунната памет запазва информация за вида на антигена именно чрез клоналната пролиферация на антиген-специфични паметови лимфоцити. Информацията относно вида и пътя на проникване на инфекцията чрез различна степен на диференциация на паметовите лимфоцити и тяхната органна локализация. Остава неясно дали и евентуално как може да бъде съхранявана друг тип информация за патогена (например за наличието на молекулярни структури и повторемостта на епитопи). Не на последно място въпросът свързан с продължителността на персистиране на паметовите лимфоцити в организма остава открит.

Двете основни парадигми на определението имунна памет, а именно за нейното ограничаване до адаптивния имунитет и до гръбначните животни, претърпяха своето опровергаване през последните две десетилетия. Недвусмислено беше доказано, че компоненти на имунна памет са характерни и за клетъчните елементи на вродения имунитет, макар че те не са генетично, а епигенетично обусловени. Още по-впечатляващо е, че форми на имунна памет са присъщи както за безгръбначните животни, така и за останалите царства живи организми, макар и не винаги с използване на механизми от адаптивния имунитет на гръбначните (4). В този смисъл някои имунолози дори предлагат да се мисли за имунната памет не само на индивидуално, а и на еволюционно ниво.

Друго основно понятие в имунологията е това за протективен имунитет (6). То не се свежда до количествени измерители на имунния отговор като специфичност, скорост на развитие, обхват, а до неговото качество, а именно да осигури непосредствена защита на организма при повторна експозиция на патоген. Протективният имунитет може да бъде резултат от наличието на неутрализиращи антители, активни ефекторни клетки или други фактори на имунната система, които осигуряват незабавна защита. Той може да отслабне с времето, дори ако имунологичната памет се запази.

Разграничаването на механизмите на персистиращ протективен имунитет от вторичния паметов имуен отговор очевидно има важно значение както за адекватната оценка на имунния статус на индивида, така и за създаването на ефективни ваксини и схеми

на имунизация срещу инфекциозни заболявания в зависимост от динамиката на епидемичния процес и демографските и клиничните характеристики на популацията.

Избухналата през 2020 г. пандемия от COVID-19, която доведе до бързото въвеждане в клинично приложение на различни ваксини, на фона на сравнително широко достъпни имунологични аналитични техники, позволява изследването на развитието и динамиката на протективен имунитет и имунна памет до безпрецедентна до преди това степен и на ново методологично ниво.

## II. ЦЕЛ

Да се оцени динамиката и продължителността на хуморалния и паметовия В-клетъчен имунен отговор след преболеждане и ваксинация с иРНК ваксини срещу SARS-CoV-2.

## III. ЗАДАЧИ

**Задача 1:** Да се оцени динамиката и продължителността на хуморалния имунен отговор чрез определяне на серологични показатели - SARS-CoV-2-специфични RBD-IgG антитела (BAU/ml) и вирус-неутрализиращи антитела (% инхибиция).

**Задача 2:** Да се характеризира паметовия имунен отговор чрез определяне на антитяло-синтезиращи клетки посредством В-ELISpot.

**Задача 3:** Да се оцени Т-клетъчният имунен отговор чрез гама-интерферон базиран тест (Т-Spot).

**Задача 4:** Да се характеризират В-лимфоцитните субпопулации чрез мултипараметрична флоуцитометрия.

**Задача 5:** Да се идентифицират S1-специфични паметови В-лимфоцити чрез мултипараметрична флоуцитометрия.

## IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1. Материали

Проведохме надлъжно, проспективно проучване в Катедрата по медицинска микробиология и имунология – „Проф. д-р Елисей Янев“, Медицинския университет в Пловдив през периода 2021-2023 г. Участниците бяха включени преди или в началото на съответните имунологични събития (заразяване със SARS-CoV-2 или първа доза ваксина), което даде възможност за оценка на изходното ниво и надлъжно проследяване. Цяла периферна кръв беше вземана в 3x6 ml епруветки с натриев хепарин и 1x5 ml епруветка за отделяне на серум в четири времеви точки за ваксинираните участници: T0 (изходно ниво – в момента на поставяне на втора доза от съответната ваксина), T1 (1 месеца след втора доза), T2 (6 месеца след втора доза) и T3 (12 месеца след втора доза). За групата на преболеждащите биологичен материал беше вземан в три времеви точки: T1 (1 месеца след появата на симптоми), T2 (6 месеца след появата на симптоми) и T3 (12 месеца след появата на симптоми). От всички проби бяха изолирани периферни мононуклеарни клетки (PBMCs) и серум, които бяха съхранявани при -80°C или се прехвърляха в резервоар с течен азот (-196°C) за дългосрочно съхранение (до момента на провеждане на съответните имунологични изследвания). Пробите в групата на преболеждащите бяха събирани от

хоспитализирани пациенти в Инфекциозна клиника на УМБАЛ „Свети Георги“ ЕАД – Пловдив, а на ваксинираните лица кръвни проби бяха вземани в Катедрата по медицинска микробиология и имунология. Групата на здравите контроли включваше лица, които не са преболедували и не са ваксинирани срещу SARS-CoV-2. Пробите от тази група са събирани и съхранявани в периода 2019-2020 г., изследвани еднократно. Всички участници са попълнили информирано съгласие, а проучването е проведено в съответствие с етичните стандарти и принципите на Декларацията от Хелзинки.

### **1.1. Критерии за включване и разпределение по групи**

В проучването бяха включени четири добре дефинирани групи лица, за да се даде възможност за сравнителен анализ на имунните отговори, предизвикани от естествена инфекция и ваксинация с иРНК. Група 1 (n=157) включва лица, които са получили ваксина BNT162b2 mRNA (Pfizer-BioNTech), съгласно стандартната схема с две дози и 21 дни интервал между дозите. Група 2 (n=18) – лица, ваксинирани с mRNA-1273 (Moderna), също приложена в две дози съгласно указанията на производителя и 28 дни интервал между дозите. Участниците и в двете ваксинални групи не са имали документирана анамнеза за предшестваща SARS-CoV-2 инфекция, потвърдена чрез медицински документи и серологичен скрининг преди ваксинацията. Група 3 (n=110) се състои от лица, които са преболедували SARS-CoV-2 инфекция, потвърдена с положителен RT-PCR. Тези участници не са ваксинирани срещу SARS-CoV-2 преди или по време на периода на изследването и служат като референтна група, представляваща имунитета, създаден чрез естествено излагане на вируса. Група 4 (n=18) лица, които не са преболедували и не са ваксинирани срещу SARS-CoV-2 (здравни контроли). Броят на участниците в отделните групи за определените времеви периоди е както следва: за ваксинирани с BNT162b2: T0 (преди ваксинация, n=42), T1 (1 месец след пълна имунизация, n=128), T2 (6 месеца, n=78) и T3 (12 месеца, n=22), като в отделните етапи се проследяват и новоприсъединени участници. mRNA-1273 кохортата е по-малка, със съответно T0 (n=6), T1 (n=13), T2 (n=9) и T3 (n=3). В групата на преболедувалите COVID-19 проследяването започва от T1 (n=54), последвано от T2 (n=41) и T3 (n=33).

## **2. Методи**

### **2.1. Изолиране на периферни мононуклеарни клетки (PBMCs)**

За изолиране на периферни мононуклеарни клетки беше използвана венозна кръв, събрана в три вакутейнера по 6 ml, съдържащи натриев хепарин като антикоагулант.

Пробите се съхраняваха при стайна температура (18–22°C) и се обработваха в рамките на 24 часа от вземането, за да се гарантира оптимално състояние на клетките. Изолирането се извършваше чрез градиентно центрофугиране с помощта на Ficoll-Paque™ PLUS ( $\rho = 1.077 \text{ g/ml}$ ; Cytiva, Великобритания). Процедурата започваше с внимателно наслявяване на 6 ml кръв върху 3 ml Ficoll в стерилна 15 ml конична центрофужна епруветка, като се внимаваше да не се наруши границата между двата слоя. Центрофугирането се провеждаше при  $400 \times g$  за 30 минути при стайна температура, без спирачка, което позволяваше разделянето на формените елементи по плътност. След центрофугиране се наблюдаваха четири отчетливи слоя: плазма (отгоре), лимфоцитен пръстен, Ficoll и

еритроцити (на дъното). Клетъчната суспензия се промиваше два пъти с PBS (без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ) чрез центрофугиране при 400 rpm за 15 минути, за отстраняване на остатъчни протеини и Ficoll. Концентрацията и жизнеспособността на изолираните PBMCs се оценяваха чрез оцветяване с Trypan Blue (0.4% в PBS) и автоматично броене с помощта на клетъчен брояч LUNA™ III (Logos Biosystems, Южна Корея).

## **2.2. Замразяване на периферни мононуклеарни клетки (PBMCs)**

Изолираните и пречистени периферни мононуклеарни клетки, които не бяха използвани непосредствено след процедурата, се подлагаха на криопрезервация с цел запазване на тяхната жизнеспособност и функционалност за последващи анализи.

Клетъчната суспензия се ресуспендираше в 1 ml охладена среда за замразяване, съставена от 90% RPMI 1640 и 10% диметилсулфоксид (DMSO,  $\geq 99.7\%$ ). DMSO се използваше като втреклетъчен криопротектор, предотвратяващ формиране на ледени кристали. Суспензията се разпределяше по 2 ml на криоепруветка (CryoTube™, Nunc), маркирана с идентификатор (код на пробата) и дата. Криоепруветките се поставяха в контролиращ замразяването контейнер (Mr. Frosty™, Thermo Fisher Scientific, Масачузетс, САЩ), съдържащ изопропанол, осигуряващ постепенно понижаване на температурата с 1°C/мин. След 24 часа престой при -80°C, някои от пробите се прехвърляха в резервоар с течен азот (-196°C) за дългосрочно съхранение. За предотвратяване на температурен шок, криозащитната среда се добавяше бавно чрез постепенно накапване, при постоянна ресуспензия на клетките. При последващо използване, клетките се размразяваха бързо при 37°C, след което DMSO се отстраняваше чрез разреждане с предварително загрят PBS или RPMI 1640 и двукратно промиване чрез центрофугиране (400 x g, 10 мин). Всички етапи на манипулация се извършваха при асептични условия в ламинарен бокс клас II, а работата с течен азот се осъществяваше при използване на защитни ръкавици, очила и престилка.

## **2.3. Размразяване на периферни мононуклеарни клетки (PBMCs)**

Замразените криоепруветки, съдържащи криоконсервирани периферни мононуклеарни клетки, се размразяваха бързо във водна баня при 37°C за около 1 минута, до почти пълно втечняване на съдържанието. След изваждане от банята, към всяка епруветка се добавяше 1 ml предварително загрята до 37°C RPMI 1640 среда, бавно и постепенно чрез пипетиране по стената на епруветката, за да се минимизира осмотичният и механичен стрес върху клетките. Клетъчната суспензия се прехвърляше в стерилна 15 ml конична епруветка, като се избягваше директно пипетиране на клетъчната маса, за да се предпази клетъчната мембрана от увреждане. Криоепруветките се промиваха допълнително с 2 ml предварително загрята RPMI 1640 среда, която също се добавяше към конична епруветка. Получената смес се инкубираше за 5 минути при 37°C във водна баня, за да се подпомогне пълната ресуспензия и адаптация на клетките след криостреса. След инкубация, клетките се центрофугираха за 10 минути при 400 x g на стайна температура, с цел отстраняване на DMSO и други остатъчни вещества от криопрезервацията. След премахване на супернатантата, клетъчната утайка се ресуспендираше в 1 ml предварително загрята RPMI 1640 среда. Концентрацията и жизнеспособността на клетките се определяха с автоматичен клетъчен брояч (LUNA III, Logos Biosystems), след оцветяване с Trypan Blue (0.4% в PBS). Преди имунофенотипизиране или култивиране, клетките се оставяха да почиват при стайна

температура за около 1 час, с цел възстановяване на метаболитната активност и стабилизиране на клетъчната мембрана.

#### **2.4. Детекция на anti-SARS-CoV-2-специфични RBD-IgG чрез ELFA (Enzyme-Linked Fluorescent Assay)**

За изследването на SARS-CoV-2-специфични RBD-IgG беше използван кит VIDAS® SARS-CoV-2 IgG (bioMérieux, France), каталожен номер 424114, (LOT: 1008826440), базиран на ензим-свързан флуоресцентен имуноанализ (ELFA). Бяха използвани серумни проби, предварително центрофугирани и съхранявани при  $-80^{\circ}\text{C}$  до провеждане на анализа.

Устройството за проби (SPR) е предварително покрито с рекомбинантен SARS-CoV-2 RBD антиген. В първата стъпка, IgG антителата срещу SARS-CoV-2 от пробата се свързват със съответния антиген. Следва автоматично измиване на несвързаните компоненти и добавяне на конюгат – анти-човешки IgG антитела, свързани с алкална фосфатаза. Последвано от второ измиване и добавяне на специфичен флуорогенен субстрат, който се хидролизира от ензим до флуоресцентен продукт. Флуоресценцията се измерваше автоматично при дължина на вълната 450 nm от апарата VIDAS® PC.

Получените резултати бяха интерпретирани от софтуер VIDAS® PC и са представени като индекс на флуоресценция (Relative Fluorescence Value, RFV).

Интерпретация на резултатите:

- Индекс (i)  $< 1.00$  – отрицателен резултат, IgG антитела срещу SARS-CoV-2 RBD не са открити

- Индекс (i)  $\geq 1.00$  – положителен резултат, наличие на специфични IgG антитела.

За количествена оценка, стойностите на RFV бяха преобразувани в ВАU/ml (антитяло-свързващи единици на милилитър), използвайки формулата:

$$\text{BAU/ml} = \text{Индекс RFV} \times 20.33$$

#### **2.5. Определяне на степента на вирусната инхибиция чрез ELISA**

За серологичното определяне на неутрализиращи антитела срещу SARS-CoV-2 беше използван кит GenScript cPass™ SARS-CoV-2 Surrogate Virus Neutralization Test Kit, каталожен номер L00847-C (GenScript Biotech, САЩ), (LOT: A210608). Методът представлява инхибиращ ензимно-свързан имуносорбентен анализ (sVNT ELISA), който симулира специфичното свързване между вирусния RBD и човешкия ACE2 рецептор, без използване на жив вирус или клетъчна култура. Бяха използвани серумни проби, предварително центрофугирани и съхранявани при  $-80^{\circ}\text{C}$  до провеждане на анализа. Пробите и контролите бяха предварително разреждени 1:10 в предоставения буфер за разреждане. Разредените проби се инкубираха с HRP-свързан RBD антиген (HRP-RBD) при стайна температура за 30 минути. След това сместа се прехвърляше в 96-ямкова ELISA плака, предварително покрита с рекомбинантен човешки ACE2 рецептор, и се инкубираше 15 минути при  $37^{\circ}\text{C}$ . Несвързаният конюгиран антиген се отмиваше чрез трикратно измиване с PBST (PBS + 0.05% Tween-20). Към всяка ямка се добавяше ТМВ субстрат, който реагира с HRP и води до образуване на син цвят, обратно пропорционален на концентрацията на неутрализиращите антитела в пробата. След 15-минутна инкубация на тъмно, реакцията се стопираше чрез добавяне на стопиращ разтвор ( $0.2 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ), при което оцветяването

преминаваше в жълт цвят. Абсорбцията на всяка проба се измерваше при дължина на вълната 450 nm с помощта на четец BioTek 800 TS (Agilent Technologies, САЩ). Процент на инхибиране =  $(1 - (\text{OD стойност на пробата} / \text{OD стойност на негативната контрола})) \times 100\%$ . Вътрешна валидация на теста включваше: задължително включване на позитивна контрола ( $\geq 50\%$  инхибиране) и негативна контрола ( $< 20\%$  инхибиране), като условие за валидност на анализа.

## **2.6. ELISpot**

### **2.6.1. B-SPOT**

За извършване на анализа беше използван кит ELISpot Path: Human IgG (SARS-CoV-2, RBD), каталожен номер 3850-2H, производство на Mabtech AB, Швеция (LOT: 3850-4HPW-R1-1). Процедурата се извърши съобразно указанията на производителя. Изолираните периферни мононуклеарни клетки бяха предварително размразени при 37°C, след което се ресуспендираха в R10 среда за култивиране, съдържаща RPMI-1640, 10% FBS, пеницилин (100 U/ml) и стрептомицин (100 µg/ml) (Cargicorn Scientific, Ебсдорфергруд, Германия). Концентрацията на живите клетки беше определена с помощта на автоматичен клетъчен брояч (Luna II, Logos Biosystems, Анянг, Южна Корея), като клетъчната жизнеспособност беше  $> 90\%$ . За активиране и диференциация на В-лимфоцитите в антияло-секретиращи клетки (ASC), клетките се стимулираха с коктейл, съдържащ: R848 (1 µg/ml) – синтетичен агонист на TLR7/8; IL-2 (10 ng/ml) – цитокин, подпомагащ пролиферацията на В-лимфоцити, включени в кита за ELISpot. Стимулираните клетки се инкубираха в продължение на 5 дни при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, в 24-ямкови плаки. След завършване на стимулацията, клетките се центрофугираха и ресуспендираха в свежа R10 среда (Cargicorn Scientific, Ебсдорфергруд, Германия), подготвени за ELISpot анализ. Клетъчната суспензия се посяваше върху предварително активирани ELISpot плаки, покрити със SARS-CoV-2 RBD антиген. Във всяка ямка се поставяха между 50 000 и 200 000 клетки. Инкубацията на клетките върху плаките се извършваше за 18–24 часа при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. След инкубацията плаките се промиваха петкратно с PBS, за да се отстранят нефиксираните клетки и компоненти. За детекция на секретирания IgG антитела, специфични за SARS-CoV-2 RBD, се добавяше биотинилирано анти-IgG антияло, последвано от стрептавидин-конюгиран ензим (алкална фосфатаза) и субстрат за визуализация (BCIP/NBT, предоставени от производителя на кита). След последната инкубация и промиване, плаките се оставяха на стайна температура до изсушаване. Формираните точки, определяни като спотове, отговарящи на индивидуални антияло-секретиращи В-лимфоцити, се визуализираха и преброяваха с помощта на автоматизиран ELISpot четец BIOREADER® 7000-F (BIO-SYS GmbH, Германия). Получените резултати бяха изразени като брой IgG-секретиращи клетки на 10<sup>6</sup> PBMCs, като се вземаха предвид фоновите сигнали от контролни ямки.

### **2.6.2. T-SPOT**

За оценка на SARS-CoV-2 специфичния Т-клетъчен отговор беше използван търговски кит T-SPOT®.COVID (Oxford Immunotec Ltd., Великобритания), (LOT: VEC7000000), базиран на ELISpot технология за откриване на гама-интерферон, секретирани от Т-ефекторни клетки. Клетъчната концентрация на предварително изолирани PBMCs се определяше с автоматичен брояч, като се осигуряваха по 250 000 жизнеспособни клетки на

ямка. Клетките се посяваха в ELISpot плаки, предварително покрити със специфично анти-IFN $\gamma$  анти тяло, и се обработваха със следните антигенни панели, предоставени от производителя: Панел А: съдържащ SARS-CoV-2 спайк протеин, насочен към оценка на имунния отговор след ваксинация или инфекция; Панел В: съдържащ нуклеокапсиден протеин, показателен за прекарана естествена инфекция; Положителна контрола: фитохемаглутинин (PHA) – неспецифичен митоген за проверка на жизнеспособността и функционалността на Т-клетките; Отрицателна контрола: RPMI 1640 среда – за установяване на нивото на фоновата реакция. Пробите се инкубираха при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> за 16-20 часа, за да се даде възможност на специфичните Т-лимфоцити да секретират гама-интерферон (IFN- $\gamma$ ) при среща с антигените. След инкубацията плаките се промиваха трикратно с PBS и се добавяше вторично анти-IFN $\gamma$  анти тяло, конюгирано с алкална фосфатаза. След промиване се добавяше специфичен хромогенен субстрат, водещ до формиране на тъмносини спотове на местата, където е секретирал IFN- $\gamma$ . Точките се преброяваха с помощта на автоматизиран ELISpot четец BIOREADER 7000-F (BIO-SYS GmbH, Германия), като резултатите се интерпретираха спрямо броя на реактивните клетки и представяха като spot-forming units (SFU). Контролните ямки (PHA и негативна контрола) се използваха за валидиране на теста.

## **2.7. Приготвяне на S1-специфични тетрамери за детекция на специфични паметови В лимфоцити**

Два различни S1-специфични тетрамера бяха приготвяни чрез конюгиране на биотинизиран SARS-CoV-2 S1 протеин със стрептавидин, белязан с флуорохром (BUV395 (BD Biosciences, каталожен номер 564176, LOT 2069860) и BV421 (BD Biosciences, каталожен номер 563259, LOT 2258281)), съгласно модифициран протокол за образуване на тетрамерни комплекси, използвани за имунофенотипизиране на В-лимфоцити. Първоначално, 100  $\mu$ g биотинизиран S1 протеин се разтваряше в 1 ml PBS. За дългосрочно съхранение, 0.5 ml от този разтвор се смесваха с 0.5 ml глицерол и се съхраняваха при -20°C, при крайна концентрация 50  $\mu$ g/ml. За краткосрочно съхранение, други 0.5 ml се смесваха с 0.5 ml PBS, разделяха се в 20 епруветки по 50  $\mu$ l и се съхраняваха при -80°C при същата концентрация. За приготвяне на работен разтвор на стрептавидин, 5  $\mu$ l от разтвор с концентрация 100  $\mu$ g/ml се разреждаха в 45  $\mu$ l PBS, с получаване на крайна концентрация 10 ng/ $\mu$ l. Тетрамерните комплекси се приготвяха чрез смесване на 3  $\mu$ l S1 протеин (50  $\mu$ g/ml) с 47  $\mu$ l PBS и отделно 3.3  $\mu$ l стрептавидинов разтвор (10 ng/ $\mu$ l) с 47  $\mu$ l PBS. Смесването се извършваше поетапно, чрез добавяне на стрептавидиновия разтвор на пет порции по 2  $\mu$ l към 50  $\mu$ l от S1 разтвора, през интервали от 10 минути, при стайна температура и на тъмно. След последната добавка сместа се инкубираше 1 час при същите условия, за да се осигури пълно формиране на тетрамерните комплекси.

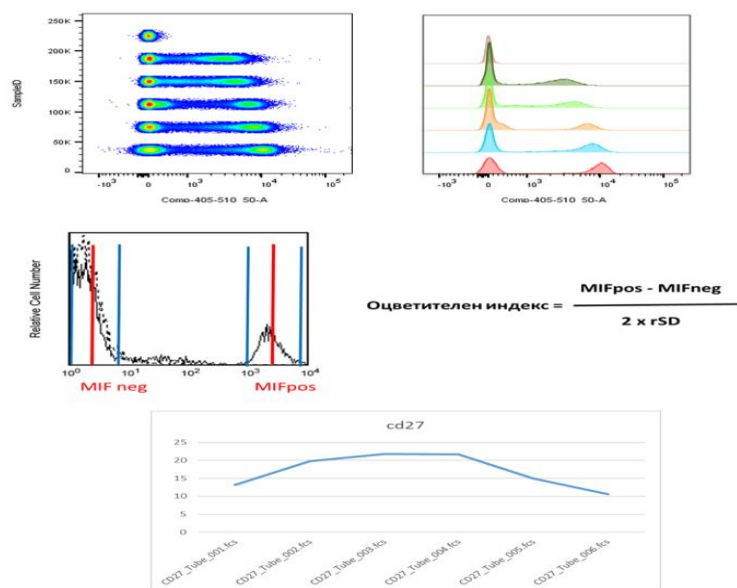
## **2.8. Многопараметърна флоуцитометрия**

Въз основа на експресията на специфични CD маркери, беше разработен 13-цветен панел за анализ на В-клетъчни субпопулации. Чрез него успяхме да идентифицираме 9 субпопулации, подразделени по експресия на IgM и IgG.

**Таблица 1. Използвани антитела срещу човешки левкоцитни антигени и флуоресцентни багрила за многопараметърен флоуцитометричен анализ.**

Специфичност на mAb	Флуорохром	Клон	Производител	Каталожен номер	Партиден номер
CD27	BV480	M-T271	BD, Biosciences	746296	1119770
CD19	BV605	SJ25C1	BD, Biosciences	562653	2115078
CD138	BV650	MI15	BD, Biosciences	743500	2272095
CD45	BUV496		BD, Biosciences	569101	2014198
CD20	BV786	2H7	BD, Biosciences	568713	2279931
IgD	BB515	LA6-2	BD, Biosciences	565243	2101107
CD38	PE	HIT2	BD, Biosciences	560981	1153295
CD24	PE-CF594	ML5	BD, Biosciences	562405	1229319
CD3/CD14/CD16/CD56	PerCP-Cy5.5		BD, Biosciences	340949, 561116, 565421, 560842	2151708 1200688
IgG	PE-Cy7	G18-145	BD, Biosciences	561298	4319686
IgM	APC	G20-127	BD, Biosciences	551062	2082257
CD21	R781	B-ly4	BD, Biosciences	658170	2279913
LIVE/DEAD	APC-Cy7		BD, Biosciences		

За определяне на работната концентрация на моноклоналните антитела бяха приготвени падащи разреждания. С всяко разреждане бяха оцветени  $1 \times 10^6$  клетки. Пробите бяха събрани с FACSAria III и анализирани с FlowJo v10.8.1. За всяка концентрация беше измерена медианата на интензитета на флуоресценцията (MIF) на позитивната и негативната популация и изчислен индекс на флуоресценция. Стойностите на оцветителния индекс бяха нанесени на графика и беше определено разреждането с най-висок оцветителен индекс за получаване на най-висока разделителна чувствителност и специфичност. На фигура 3 като пример е представен оцветителният индекс на антиялото CD27. В таблица 5 са представени титърът и концентрацията на всяко антияло, използвани в 13-цветния панел за оцветяване на периферните мононуклеарни клетки.



**Фигура 1. Определяне на оцветителен индекс на CD27.** Фигурата илюстрира подхода за изчисляване на оцветителния индекс чрез сравнение на сигналите от CD27<sup>+</sup> и CD27<sup>-</sup> популации, като показва dot plot и хистограми, определяне на MFI стойности и изчисление по формулата за разделителна способност на сигнала.

**Таблица 2. Работна концентрация на антителата в панела (μL).** Таблицата представя оптимизираните количества от моноклоналните антитела, необходими за оцветяване на 1 × 10<sup>6</sup> клетки, използвани при многопараметърен флоуцитометричен анализ.

Маркер	Количество за 1 проба в μл (1 × 10 <sup>6</sup> клетки)
Staining Buffer	35 μl
CD38	10 μl
IgM	5 μl
IgG	5 μl
CD19	2.5 μl
CD24	2.5 μl
IgD	1.3 μl
CD3	1.3 μl
CD16	1.3 μl
CD21	1 μl
CD27	1 μl
CD138	1 μl
CD14	0.5 μl
CD20	0.5 μl
CD45	0.5 μl
SA BV711	1 μl
Live/Dead	1 μl

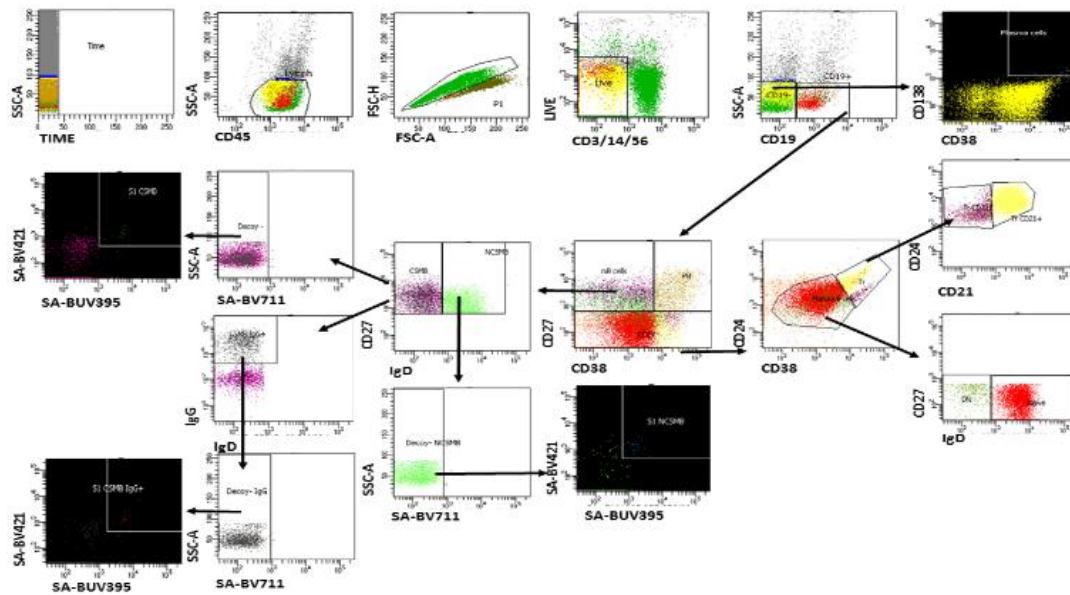
Преходни В-лимфоцити – CD19, CD20, CD24, CD38, IgD; Наивни В-лимфоцити – CD19, CD20, CD24, IgD, IgM; Зрели В-лимфоцити; Паметови В-лимфоцити – CD19, CD20, CD27 -

Паметови В-лимфоцити с класово превключване (CSMBs), IgG<sup>+</sup> CSMBs, Паметови В-лимфоцити без класово превключване (NCSMBs); Плазмобласти – CD19, CD27, CD38, Плазматични клетки – CD27, CD38, CD138

**Таблица 3. 13-цветен панел за анализ на В клетъчните субпопулации с добавени S1 тетрамери за детекция на специфични паметови В-лимфоцити.**

Специфичност на mAb	Флуорохром	Клон	Производител	Каталожен номер
<b>S1-Тетрамер</b>	<b>BUV 395</b>		<b>BD, Biosciences</b>	<b>564176 2069860</b>
<b>S1-Тетрамер</b>	<b>BV 421</b>		<b>BD, Biosciences</b>	<b>563259 2258281</b>
<b>Стрептавидин „примамка“</b>	<b>BV711</b>		<b>BD, Biosciences</b>	<b>563262 1111072</b>
<b>CD27</b>	BV480	M-T271	BD, Biosciences	746296
<b>CD19</b>	BV605	SJ25C1	BD, Biosciences	562653
<b>CD138</b>	BV650	MI15	BD, Biosciences	743500
<b>CD45</b>	BUV496		BD, Biosciences	569101
<b>CD20</b>	BV786	2H7	BD, Biosciences	568713
<b>IgD</b>	BB515	IA6-2	BD, Biosciences	565243
<b>CD38</b>	PE	HIT2	BD, Biosciences	560981
<b>CD24</b>	PE-CF594	ML5	BD, Biosciences	562405
<b>CD3/CD14/ CD16/CD56</b>	PerCP-Cy5.5		BD, Biosciences	340949, 561116, 565421, 560842
<b>IgG</b>	PE-Cy7	G18-145	BD, Biosciences	561298
<b>IgM</b>	APC	G20-127	BD, Biosciences	551062
<b>CD21</b>	R781	B-ly4	BD, Biosciences	658170
<b>LIVE/DEAD</b>	APC-Cy7		BD, Biosciences	

За определяне на S1-специфичните паметови В-лимфоцити използвахме биотинилирания S1 протеин, който беше свързан с четири молекули стрептавидин. За повишаване на специфичността на метода бяха използвани два тетрамера, маркирани съответно с BV421 и/или BUV395. Тези два тетрамера бяха включени в панела с CD-маркери, заедно с трети тетрамер „примамка“ – стрептавидин, свързан с BV711. Клетки, оцветени едновременно от двата тетрамера и неочетени от примамващ стрептавидин, се отчитаха като антиген-специфични. Клетките, които бяха използвани за флоуцитометричен анализ бяха размразявани спрямо описания по-горе протокол. Концентрацията на живите клетки беше определена с помощта на автоматичен клетъчен брояч. Към клетъчната суспензия се прибавяше по 50 µl от давата тетрамера, поседвано от 30 мин. инкубация на тъмно и промиване с PBS за 5 мин на 400 x g. Последвано от оцветяване с изготвения панел от моноклонални антитела в работни концентрации – инкубация 15 мин на тъмно и промиване с PBS за 5 мин на 400rpm. Последна стъпка преди анализ на пробите – отливане на супернатантата и фиксиране на пробите за 30 мин с 250 µl Fix&Perm (BD Cytotfix/Cytoperm) при 4°C. Пробите бяха събрани на флоуцитометър FACSAria III със софтуера DIVA ver.8. Беше създаден алгоритъм за анализ на В клетъчната субпопулация и определяне на специфичните за SARS-CoV-2 паметови В-лимфоцити и плазмобласти.



**Фигура 2. Алгоритъм (гейтинг стратегия) за анализ в DIVA ver.8. софтуер.**

Първоначалното ограждане включваше контрол на качеството на базата на времето, селекция на CD45<sup>+</sup> лимфоцити (SSC-A спрямо CD45), разграничаване на единичните събития (FSC-H спрямо FSC-A) и изключване на мъртви клетки. CD19<sup>+</sup> В-лимфоцитите бяха идентифицирани след отстраняване на CD14<sup>+</sup> моноцити, CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцити и CD56<sup>+</sup> NK-клетки. Плазматичните клетки бяха дефинирани като CD19<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>CD38<sup>hi</sup>. CD19<sup>+</sup> В-лимфоцитите бяха характеризирани въз основа на експресията на CD27 и CD38 за разграничаване на плазматични клетки и паметови В-лимфоцитни субпопулации. Паметовите В-лимфоцити (CSMB и NCSMB) бяха допълнително характеризирани според експресията на CD27 и IgD, като за по-точно разграничаване на преходните В-лимфоцити се използваха маркерите CD21 и CD24. S1-специфичните паметови В-лимфоцити бяха определени като двойно положителни за SA-S1-BV421 и SA-S1-BUV395, но отрицателни за „примамка“ стрептавидин SA-BV711. IgG<sup>+</sup> S1-специфичните паметови В-лимфоцити бяха идентифицирани в рамките на субпопулацията на клас-превключили паметови клетки.

## 2.8. Статистическа обработка

Статистическата обработка е извършена с R Studio и SPSS (v.25). Нормалността на количествените данни е проверена чрез Shapiro–Wilk тест, след което са прилагани подходящи параметрични или непараметрични методи. Данните са представени като mean ± SD при нормално разпределение или като медиана и междуквартилен размах (Me, IQR) при ненормално разпределение. Категориалните променливи са изразени като n (%). Сравненията между независими групи са извършени с t-тест или Mann–Whitney U тест, а при повече от две групи – чрез ANOVA или Kruskal–Wallis с подходящи post-hoc корекции. За зависими измервания са използвани сдвоен t-тест или Wilcoxon тест, както и ANOVA за повторени измервания или Friedman тест. Корелациите са анализирани чрез Spearman ρ.

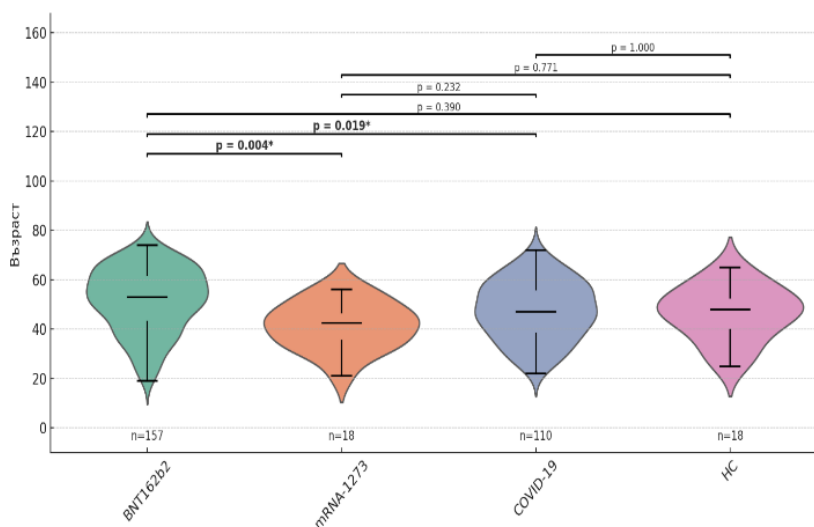
Статистическа значимост е приемана при двустранна  $p < 0.05$ , като при гранични стойности ( $p \approx 0.05$ ) са разглеждани и клиничната значимост и големината на ефекта.

## V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. Демографски характеристики на участниците

#### 1.1. Разпределение по възраст

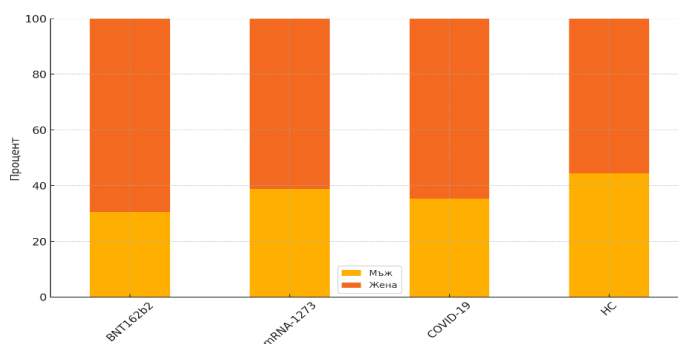
Възрастовото разпределение на участниците в изследването беше оценено отделно за групите: ваксинирани, преболедували COVID-19 и здрави контроли. Тъй като разпределението не следва нормална крива, резултатите се представят чрез медиана и интерквартилен размах (IQR). При ваксинираните медианата на възрастта беше 52 години, с IQR (20) години. В групата на преболедувалите COVID-19 медианата на възрастта беше 47 години, с IQR (19) години. При здравите контроли медианата беше 48 години, а IQR (15) години. Тези резултати показват сравнително близка възрастова структура между групите, като леко по-висока медиана се наблюдава при ваксинираните. Въпреки това, разликите са ограничени в рамките на сходни интерквартилни стойности, което подсказва относително хомогенна възрастова извадка в изследването. Това позволи съпоставимост между групите при анализ на имунологичните параметри.



**Фигура 3. Разпределение на участниците по възраст.** Анализът показва статистически значими разлики между групата с BNT162b2 и групите с mRNA-1273 ( $p=0.004$ ) и с COVID-19 ( $p=0.019$ ). Между останалите групи не се установяват съществени различия ( $p > 0.05$ ).

#### 1.2. Разпределение по пол

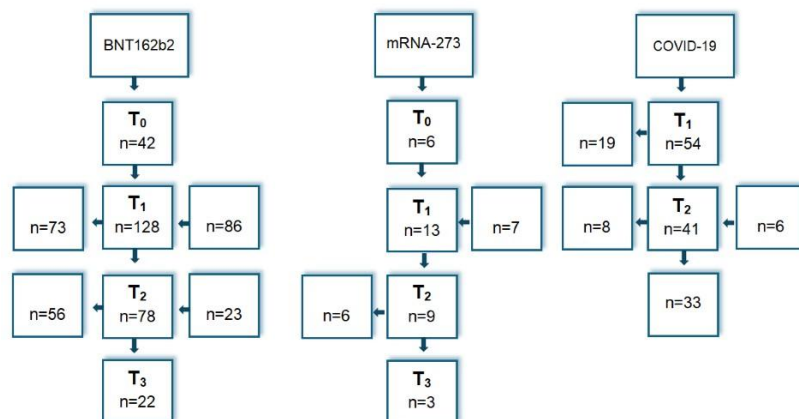
В групата на ваксинираните участваха общо  $n=175$  души, от които  $n=120$  (68.6%) бяха жени и  $n=55$  (31.4%) – мъже. В групата на преболедувалите COVID-19 бяха включени  $n=110$  лица, като  $n=71$  (64.5%) от тях бяха жени и  $n=39$  (35.5%) – мъже. Групата на здравите контроли се състоеше от  $n=18$  участници, от които  $n=10$  (55.6%) бяха жени и  $n=8$  (44.4%) – мъже. Във всички изследвани групи се наблюдава преобладаване на женски пол, което прави групите съпоставими при интерпретация.



**Фигура 4. Разпределение на участниците по пол. Диаграмата представя относителния дял на мъже и жени в изследваните групи – ваксинирани с BNT162b2, с mRNA-1273, преболедували COVID-19 и здрави контроли. Във всички групи преобладава броя на жените, като най-изразено това се наблюдава при ваксинираните с BNT162b2 и COVID-19 групите.**

**Таблица 4. Разпределение на участниците по пол и възраст в отделните периоди. Таблицата представя демографските характеристики на включените групи (BNT162b2, mRNA-1273 и преболедували COVID-19), като показва възрастовото разпределение, пола и броя на участниците във всяка времева точка на проследяване.**

	Групи		
	BNT162b2 n=157	mRNA-1273 n=18	COVID-19 n=110
<b>Променливи</b>			
<b>Възраст (год.) (mean±SD)</b>	53.0, 19.5*	41.4±10.9	47.4±11.8
<b>Пол, n (%)</b>			
<b>Мъже</b>	48 (30.6)	7 (38.9)	39 (35.5)
<b>Жени</b>	109 (69.4)	11 (61.1)	71 (64.5)
<b>Time point 0, n (%)</b>	42 (26.8)	6 (33.3)	0 (0.0)
<b>Time point 1, n (%)</b>	128 (81.5)	13 (72.2)	54 (49.1)
<b>Time point 2, n (%)</b>	78 (49.7)	9 (50.0)	41 (37.3)
<b>Time point 3, n (%)</b>	22 (14.0)	3 (16.6)	33 (30.0)
* median, IQR			



**Фигура 5. Разпределение на участниците в проучването по периоди.** Диаграмата илюстрира броя на включените лица във всяка от трите изследвани групи, проследени в различните времеви точки. За BNT162b2 са включени участници в четири периода: T0 (преди ваксинация, n=42), T1 (1 месец след пълна имунизация, n=128), T2 (6 месеца, n=78) и T3 (12 месеца, n=22), като в отделните етапи се проследяват и новоприсъединени участници. mRNA-1273 кохортата е по-малка, със съответно T0 (n=6), T1 (n=13), T2 (n=9) и T3 (n=3). В групата на преболедевалите COVID-19 проследяването започва от T1 (n=54), последвано от T2 (n=41) и T3 (n=33). Представеното разпределение демонстрира динамиката на включването и проследяването на участниците.

## 2. Резултати по Задача 1

### 2.1. Anti-SARS-CoV-2 RBD IgG

Динамиката на хуморалния имунен отговор беше проследена чрез количествено определяне на IgG антитела, насочени срещу рецептор-свързващия домейн (RBD) на Spike протеина на SARS-CoV-2. Измерванията бяха извършени в четири времеви точки – T0 (изходно ниво), T1 (1-2 месеца след втора доза на ваксината), T2 (6-7 месеца) и T3 (12-13 месеца) при участници, ваксинирани с BNT162b2 или mRNA-1273, в три време точки (T1-T3) за преболедевали SARS-CoV-2 инфекция и изследвани еднократно в контролната група. Здравите контроли запазиха нива под границата на откриваемост и не са включени в сравненията. Данните се представят с медиана и интерквартилен размах (IQR), предвид липсата на нормално разпределение.

- Преди втора доза (T0)

Точка T0 съответства на момента преди поставяне на втората доза от ваксината, т.е. при вече започнал, но незавършен ваксинационен курс. Тя отразява началната фаза на хуморалния отговор след първата доза.

При участниците, получили първа доза от BNT162b2, медианата на RBD-IgG антителата беше 221.34 BAU/ml (IQR 330.56 BAU/ml). Отчетените стойности варират значително – от ниски нива до концентрации близки до горната граница на скалата, което отразява индивидуалните различия в началния отговор към антигена. Групата с първа доза

mRNA-1273 показва по-ниска медиана – 95.15 BAU/ml (IQR 215.87 BAU/ml), с характерно положително асиметрично разпределение. Това предполага, че имунният отговор след първа доза все още е в начален стадий, но индивидуални случаи с по-висока реактивност съществуват.

Резултатите демонстрират, че една доза от иРНК ваксина не е достатъчна за постигане на максимален хуморален отговор и че пълният ефект се разгръща след завършване на ваксинационната схема.

- Пиков отговор (T1)

Един месец след втората доза ваксина групите показаха статистически значимо повишение на RBD-IgG антителата ( $p < 0.001$ ), достигащо пик в T1.

При BNT162b2 медианата беше 568.64 BAU/ml (IQR 303.89 BAU/ml) – стойности, съответстващи на висок имунен отговор при по-голямата част от участниците. Данните показват сравнително симетрично разпределение, което предполага хомогенен серологичен профил след ваксинация. При mRNA-1273 се отчете най-висока медиана – 671.89 BAU/ml (IQR 469.74 BAU/ml). Въпреки сходна средна стойност, тази група се характеризира с по-широко разпределение, отразяващо по-голям индивидуален спектър на отговора – от умерени до изключително високи стойности над 1100 BAU/ml.

В групата на преболедевалите бе наблюдавана медиана 448.84 BAU/ml (IQR 548.75 BAU/ml) – по-ниска от тази при ваксинираните, но със значително по-широко разпределение, включително стойности от 0 до над 1000 BAU/ml. Това потвърждава известната хетерогенност на естествения имунен отговор, която вероятно зависи от тежестта на клиничното протичане и индивидуални фактори.

- T2 – 6 месеца след експозиция

В T2 се регистрира очаквано понижение в нивата на антителата при всички групи, което отразява намаляване на циркулиращите RBD-IgG. Все пак се запазват измерими нива при повечето участници.

При ваксинираните с BNT162b2 наблюдаваме статистически значимо понижаване на стойностите ( $p < 0.001$ ) - медиана 137.84 BAU/ml (IQR 207.52 BAU/ml) – значително по-ниски стойности спрямо T1, но с налични високи индивидуални резултати до 764 BAU/ml. Разпределението е силно асиметрично, което предполага натрупване на стойности в ниския диапазон. В групата на mRNA-1273 наблюдаваме понижение, но без статистическа значимост ( $p = 0.216$ ): медиана 187.64 BAU/ml (IQR 312.78 BAU/ml) и запазване на по-висока серологична активност на шестия месец. Разпределението е по-плоско, което може да отразява по-добре структурирана и стабилна имунна памет.

В групата на преболедевали COVID-19 също се отчете статистически значимо намаляване на нивата ( $p = 0.002$ ): медиана 133.57 BAU/ml (IQR 197.72 BAU/ml) – близки стойности до BNT162b2, но с по-широк спектър на резултатите. Това потвърждава индивидуалната вариабилност в хода на естествения имунен отговор.

- T3 – 12-13 месеца след експозиция

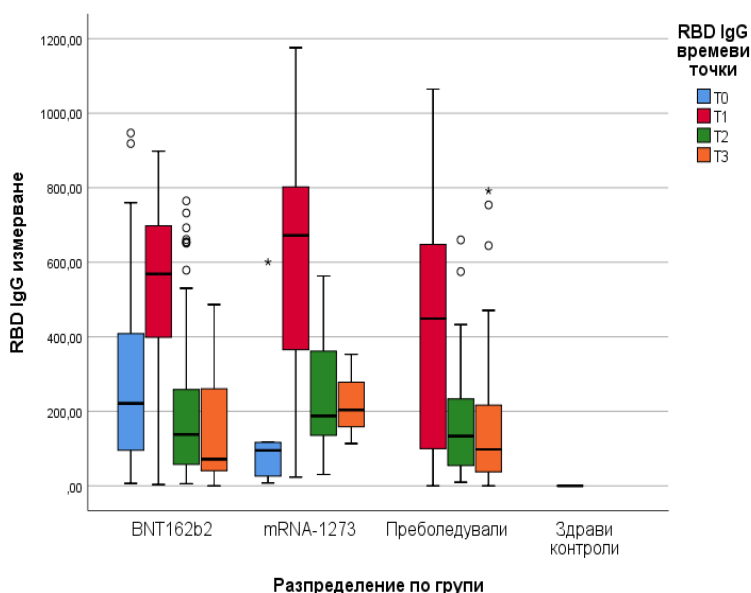
В третия период се наблюдава по-изразено намаление на RBD-IgG нивата, особено при групата с BNT162b2.

BNT162b2: медианата спада до 71.56 BAU/ml (IQR 222.88 BAU/ml), като част от участниците имат нулеви стойности. Това подчертава значително понижаване на циркулиращи антитела в тази група в сравнение с T2 ( $p < 0.001$ ).

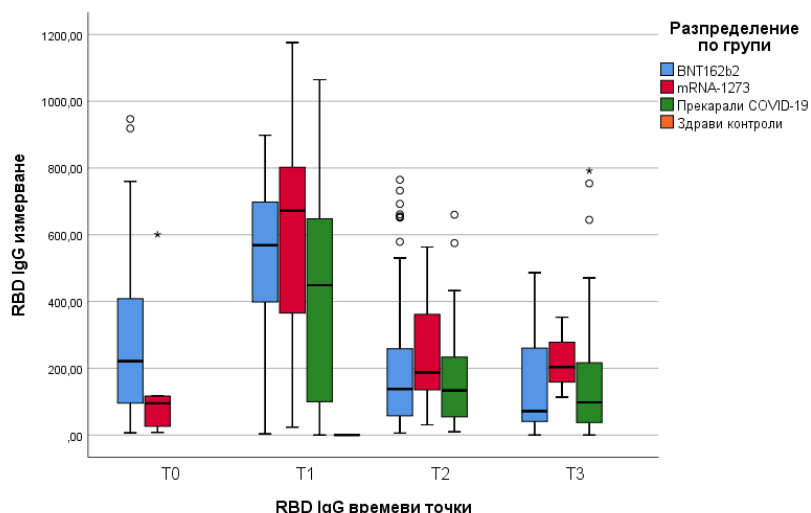
mRNA-1273: медианата остава висока – 203.54 BAU/ml, без нулеви стойности. Данните показват по-трайно запазване на серологичната активност, въпреки липса на изчислен IQR заради ограничен брой наблюдения. Всички стойности се намират в средния до високия диапазон.

Преболедували COVID-19: медианата е 97.99 BAU/ml (IQR 198.73 BAU/ml), но разпределението е силно дясно асиметрично, отразяващо наличие на отделни участници с високи нива на антитела, въпреки че при други е отчетена пълна липса на RBD-IgG. Това говори за дълготрайна, но хетерогенна хуморална памет при естествена инфекция. Отчита се статистически значимо понижаване на антителата в сравнение с T2 ( $p = 0.001$ ).

Хуморалният отговор срещу SARS-CoV-2 се характеризира с бързо генериране на неутрализиращи антитела след експозиция – било то ваксинация или естествена инфекция. В нашето проучване нивата на IgG антитела срещу RBD достигат пик скоро след имунизация (след втората доза на ваксината) или малко след острата фаза на инфекцията, последвано от понижаване в месеците след това. Нашите резултати показват, че до 6-ия месец след имунизация с две дози титрите на анти-RBD IgG спадат рязко, въпреки че при повечето индивиди остават над прага на серопозитивност. Типичното кинетично поведение след ваксина е бифазно: първоначален бърз спад (с изчислен среден полуживот 2–4 месеца) и последващо по-плавно затихване.



**Фигура 6. Разпределение на anti-RBD IgG по групи в съответните периоди.** Фигурата показва динамиката на RBD-IgG антителния отговор във времето при ваксинирани с BNT162b2 и mRNA-1273, както и при преболедували, като се наблюдава пик в T1 и статистически значимо понижаване в T2 и T3, резултатите при здравите контроли остават под границата на откриваемост. С кръгчета са означени стойностите, т. нар. outliers.



**Фигура 7. Сравнение на нивата на anti-RBD IgG междугрупово в отделните периоди.** Фигурата илюстрира сходната динамика на антителния отговор при ваксинираните и преболедувалите – с пик в T1 и понижение до T3, като mRNA-1273 показва по-устойчиви стойности, а естественият имунитет се характеризира с по-голяма индивидуална вариабилност.

Статистически значими разлики между средните стойности на anti-RBD IgG в отделните периоди на изследването не се отчетоха.

Нашето проучване показва, че mRNA-1273 индуцира по-високи и по-дълго персистиращи нива на RBD-специфични антитела в сравнение с BNT162b2. Шест месеца след вакцинация с иРНК платформи хуморалният имуен отговор е по-силен при индивиди, получили mRNA-1273 в сравнение с тези на BNT162b2, както по отношение на количеството антитела, така и на тяхната функционална активност. Отчетените количествени и функционални разлики в хуморалния отговор между двете ваксинирани групи намират своето обяснение с биологични, фармакологични и имунологични фактори. Един от най-важните е различната доза на доставения антигенен товар: ваксината mRNA-1273 съдържа 100 µg иРНК на доза, докато BNT162b2 съдържа 30 µg – повече от трикратна разлика. Повишената антигенна доза води до по-продължителна и интензивна експресия на S протеина *in vivo*, което може да генерира по-силна активация на фоликуларните Т-лимфоцитии по-продължителна герминативна реакция в лимфните възли. Това създава условия за по-ефективно афинитетно узряване на В-лимфоцитите и за селекция на В-лимфоцитните клонове с по-висок афинитет към RBD-епитопите – механизъм, който би обяснил наблюдаваната по-висока авидност и функционална ефективност на антителата при индивидите ваксинирани с mRNA-1273. Интервалът между двете дози при mRNA-1273 е по-дълъг – 28 дни, спрямо 21 дни при BNT162b2, което би могло да благоприятства съзряването на герминативните центрове, водещо до по-добре формиран вторичен хуморален отговор с по-дълготрайна серологична персистенция. Допълнително значение може да има и съставът на липидната наночастица, използвана за капсулиране на иРНК. При

mRNA-1273 съдържа SM-102, а при BNT162b2 – ALC-0315, въпреки че и двете формулировки са ефективни, вариации в стабилността на частиците, фармакокинетиката и степента на транслация в различни тъкани могат да влияят на имуногенността. Имунизацията с двете иРНК ваксини води до мощен хуморален отговор с висок пик в T1, последван от понижаване на нивата в T2 и T3. При mRNA-1273 се наблюдава по-висока медиана и по-устойчиви стойности в късните времеви точки, докато при BNT162b2 има посилен спад и по-голям дял участници с изчезващ отговор на 12 месец. Преболедувалите лица показват най-широка индивидуална вариабилност, отразяваща природата на естествения имунитет. Подобна хетерогенност следва да бъде отчетена при моделирането на имунна защита в популационен мащаб и при планиране на бустерни ваксинации.

## **2.2. Резултати от изследване на степента на инхибиция на вирус-неутрализиращите антитела**

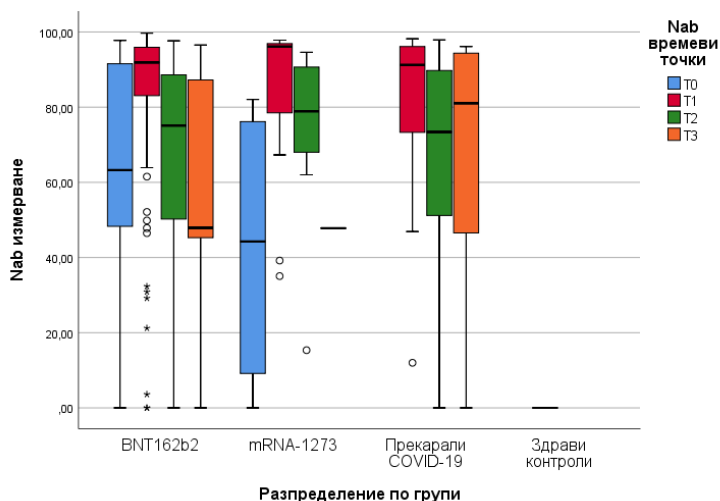
Процентната инхибиция на взаимодействието между рецептор-свързващия домейн (RBD) на SARS-CoV-2 и човешкия ACE2 рецептор бе използвана като индиректна мярка за функционалната активност на неутрализиращите антитела. Анализът беше извършен в същите време точки за четирите групи: лица, ваксинирани с BNT162b2 или mRNA-1273, преболедували COVID-19 (неваксинирани) и здрави контроли. В контролната група резултатите бяха под границата на откриваемост и не са включени в сравненията. Поради липса на нормално разпределение, резултатите са представени чрез медиана и интерквартилен размах (IQR).

В изходна точка T0, преди поставянето на втора доза от ваксината, при участниците на BNT162b2, се отчете медиана на инхибиращата активност от 63.26% (IQR 47.98%), което предполага наличие на базова имунна реактивност при част от тях. Групата на mRNA-1273, имаше по-ниска медиана – 44.29% (IQR 74.52%), с по-широко разпределение, отразяващо хетерогенност в изходния имунен статус. И в двете групи бяха наблюдавани минимални стойности от 0%, което показва липса на неутрализиращи антитела при част от участниците.

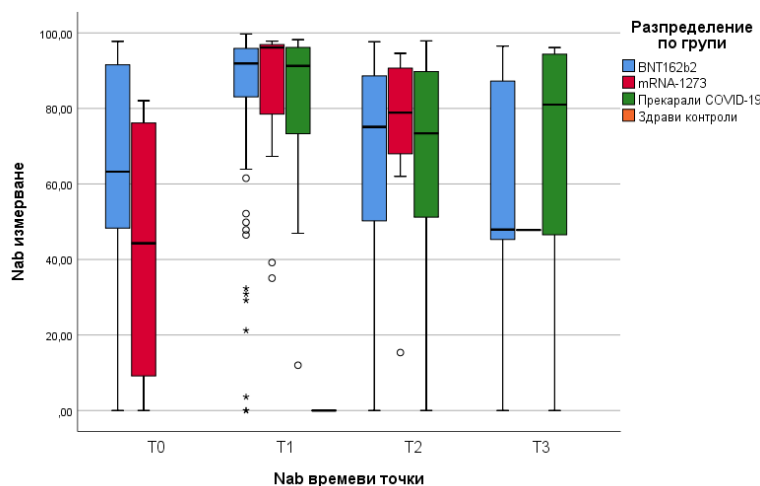
В T1, съответстваща на пиковия имунен отговор след завършване на ваксинационния курс или месец след преболедуване, се наблюдава значително повишение в % на инхибиция на вирус-неутрализиращите антитела. При ваксинираните с BNT162b2 медианата достигна 91.90% (IQR 13.61%), при mRNA-1273 – 96.13% (IQR 29.89%), а при преболедувалите – 91.25% (IQR 24.05%). Високите стойности във всички групи демонстрират ефективна индукция на функционални антитела, както от ваксините, така и от естествената инфекция. По-ниската вариабилност в групата с BNT162b2 предполага по-хомогенен отговор, докато по-широкият интерквартилен размах при mRNA-1273 и преболедувалите подсказва по-голяма индивидуална вариабилност.

Във времева точка T2 (шести месец) се отчете очаквано намаление на неутрализиращата активност. Независимо от спада, и трите групи - BNT162b2 (медиана 75.10%, IQR 39.63%), T1 vs T2 ( $p < 0.001$ ); mRNA-1273 (медиана 78.90%, IQR 27.59%); и преболедували (медиана 73.40%, IQR 39.43%), T1 vs T2 ( $p = 0.038$ ). Запазват се високи остатъчни нива на функционални антитела. Данните потвърждават наличието на стабилен хуморален отговор през първите шест месеца. Най-високата медиана и най-малък IQR отново са отчетени при mRNA-1273, което предполага устойчив и по-концентриран отговор

в тази група. В T3 се наблюдава допълнително плавно намаление на серумната неутрализираща активност. При участниците, имунизирани с BNT162b2, медианата пада до 47.90% (IQR 49.71). За сравнение, групата на преболедувалите COVID-19 запазва висока медиана – 81.02% (IQR 48.83%), което говори за по-устойчив естествен имунен отговор в тази времева точка.



**Фигура 8. Степен на инхибиция на вирус-неутрализиращите антитела по групи в съответните периоди. Отчетлив пик в T1 и постепенно намаляване в T2 и T3, като при преболедувалите се наблюдават по-високи стойности в по-късните периоди. През T2 най-високата медиана и най-малък IQR са отчетени при mRNA-1273.**



**Фигура 9 Сравнение на степента на инхибиция на вирус-неутрализиращите антитела междугрупово в отделните периоди.**

Статистически значими разлики между средните стойности на anti-RBD IgG в отделните периоди на изследването не се отчетоха.

иРНК ваксините индуцират антитела, насочени само срещу спайк протеина, но в изключително високи концентрации и с висока неутрализираща способност. В контекста на нашите три групи това означава, че преболедувалите (най-вече с леки до умерени симптоми)

имат по-ниски пикови RBD-IgG стойности от ваксинираните, макар техните антитела да могат да се задържат относително по-дълго (поради продължителна антигенна стимулация по време на инфекцията). Някои проучвания предполагат именно това – макар пиковите след ваксинация да са по-високи, антителата след инфекция може да се характеризират с по-дълъг функционален полуживот. В крайна сметка и при двата вида имунитет се наблюдава значимо отслабване на хуморалната компонента 6–9 месеца след антигенната експозиция. Епидемиологично, това съвпада с появата на пробивни инфекции около този период. При предходна инфекция намалява риска от повторно заразяване с 80–90% в рамките на 6–9 месеца, след което защитата срещу инфекция отслабва. Аналогично, ваксиналната ефективност срещу симптоматична инфекция спада значително след 6-я месец. Въз основа на нарастващия обем доказателства за постепенното затихване на хуморалния имунен отговор след първичната ваксинация срещу SARS-CoV-2, международните здравни институции като CDC, ECDC и WHO изведоха консенсусни препоръки за въвеждане на бустерни дози. Понастоящем ECDC препоръчва прилагането на бустерни дози, особено за възрастните хора и уязвимите групи, поради отслабване на неутрализиращите антитела и продължаващата еволюция на вируса.

### 3. Резултати по Задача 2

Оценката на клетъчния имунитет, в частност на антицяло-синтезиращите В-лимфоцити, е съществена за разбиране на дългосрочната протекция след ваксинация или прекарана инфекция със SARS-CoV-2. Чрез ELISpot методика беше проследен броят на спот-образуващите единици (SFU), разпознаващи RBD на вируса. Резултатите са представени като брой RBD-специфични антицяло-синтезиращи В-лимфоцити на 1 000 000 PBMC във всяка проба. Данните са анализирани в четири времеви точки – T0 (преди втора доза ваксина), T1 (1 месец след завършен имунизационен курс или възстановяване от заболяване), T2 (6-ти месец) и T3 (12-ти месец) за ваксинираните участници и три времеви точки за преболедувалите.

- T0 – преди втора доза ваксина

Тази времева точка отразява ранния клетъчен отговор след първата доза ваксина. Преобладаващият имунен отговор е все още в начална фаза. В групата с BNT162b2, медианата на RBD-специфичните антицяло-синтезиращи В-лимфоцити е 14 SFU (IQR 26). Отчетени са стойности между 0 и 42, с умерена положителна асиметрия. Това свидетелства за частично активиране на паметови В-лимфоцити още след първата доза при част от участниците. Групата с mRNA-1273 показва медиана 11 SFU, с максимална стойност 24. Отсъствието на IQR (поради ограничен брой наблюдения) не позволява по-точна преценка на разсейването, но индивидуалните стойности предполагат сходна ранна имунна активация. В тази времева точка не са включени преболедували.

- T1 – пик на В-клетъчен отговор

На този етап се измерва пикът на В-клетъчната памет – след втората доза при ваксинираните или след възстановяване при преболедувалите. BNT162b2 води до медиана 150 SFU (IQR 171.5), с максимум 395 SFU; T1 vs T0 ( $p < 0.001$ ). Разпределението е умерено асиметрично и хетерогенно, което говори за висок, но индивидуално вариращ отговор. При

mRNA-1273 медианата е 167.5 SFU (IQR 210.25), а максимумът достига 433 SFU; T1 vs T0 ( $p < 0.001$ ). Наблюдава се по-силна положителна асиметрия, отразяваща присъствието на субгрупа с особено висок отговор. Преболедувалите участници достигат медиана 129.5 SFU (IQR 99) – по-ниска спрямо ваксинираните, но в рамките на очакван силен постинфекциозен отговор. Контролната група не показва RBD-специфична реактивност (всички стойности = 0), което валидира специфичността на метода.

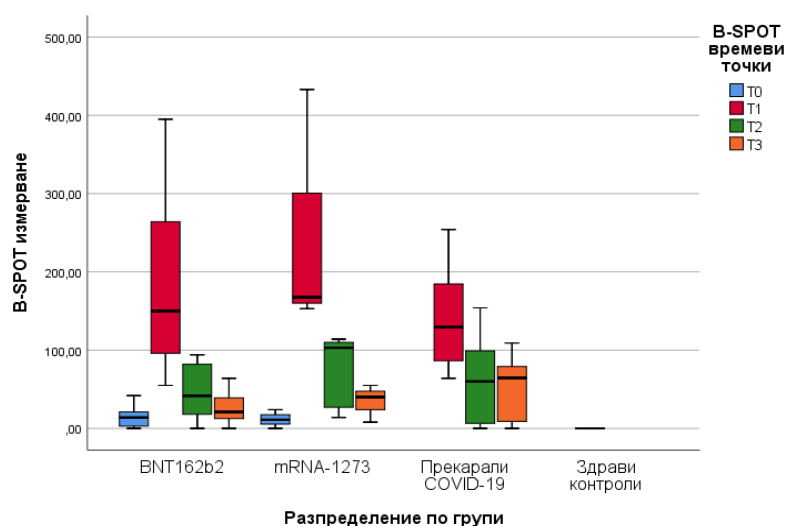
- T2 – 6 месеца след имунизация/инфекция

На шестия месец се наблюдава физиологично понижаване на В-клетъчната активност.

Групата с BNT162b2 показва медиана 41.5 SFU (IQR 68.75), с широк диапазон и наличие на нулеви стойности, което показва спад на отговора при част от участниците; T1 vs T2 ( $p < 0.001$ ). mRNA-1273 демонстрира по-запазен отговор, без статистически значимо понижаване – медиана 103 SFU (IQR 91.5), при по-голям обхват на стойностите и лека асиметрия в посока към по-високи стойности. Преболедувалите запазват медиана 60 SFU (IQR 95.75), с отчетлива междуиндивидуална вариабилност; T1 vs T0 ( $p = 0.001$ ). При някои се установяват остатъчно високи нива, което подчертава дългосрочния ефект от естествената инфекция.

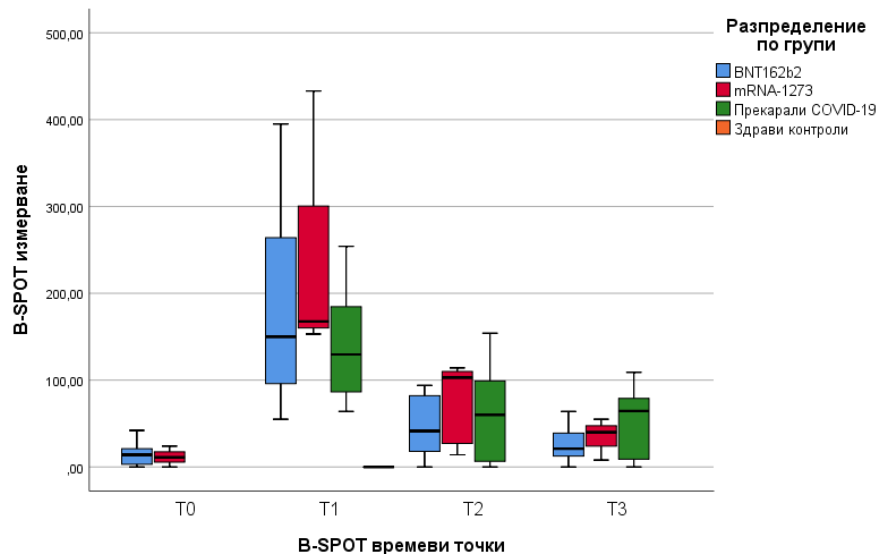
- T3 – 12-ти месец

В най-късната проследена точка се регистрира допълнително намаляване на В-клетъчната реактивност. При BNT162b2 медианата е 21 SFU (IQR 35), с няколко случая под прага на откриваемост. Разпределението е слабо асиметрично, но стабилно. mRNA-1273 показва медиана 40 SFU, с максимални стойности до 55 SFU. Макар липсата на IQR да затруднява анализа, индивидуалните стойности сочат по-запазена В-клетъчна памет спрямо BNT162b2. Преболедувалите демонстрират най-висока медиана – 64.5 SFU (IQR 76.5); T2 vs T3 ( $p = 0.001$ ). Разпределението е симетрично и равномерно, което подсказва, че при част от участниците паметовият В-клетъчен отговор се задържа ефективно до 12 месеца след инфекцията.



**Фигура 10. Резултати от B-ELISpot по групи в съответните периоди. Фигурата представя динамиката на RBD-специфичните антитяло-синтезиращи В-лимфоцити, като**

се отчита изразен пик в T1 след ваксинация или инфекция, последван от постепенно понижаване на честотата им в T2 и T3, с по-устойчив отговор при mRNA-1273 и преболедувалите в късните времеви точки.



**Фигура 11.** Сравнение на резултатите от B-ELISpot междугрупово в отделните периоди.

Статистически значими разлики между средните стойности на SFU в отделните периоди на изследването не се отчетоха.

Анализът на антитяло-синтезиращите SARS-CoV-2 специфични клетки чрез ELISpot показва, че:

Имунизацията с иРНК ваксини води до силен пик на В-клетъчна памет, с по-голяма амплитуда при mRNA-1273.

Шест и дванадесет месеца по-късно се наблюдава физиологичен спад, но остатъчната реактивност се запазва в повечето случаи.

Преболедувалите лица показват по-устойчив, но по-нисък пик в отговора, който се задържа дългосрочно при част от тях.

И при ваксинирани, и при преболедували се наблюдава индивидуална хетерогенност, която трябва да се отчита при оценка на нуждата от бустерни дози и продължителност на имунната защита.

#### 4. Резултати по Задача 3

В хода на изследването Т-клетъчният отговор беше оценен чрез Т-SPOT анализ, измерващ броя спот-образуващите единици (SFU) в отговор на стимул с пептиди в два различни панела – Панел А (S пептид) и Панел В (N пептид). Анализът обхваща три основни групи: ваксинирани лица (две различни иРНК платформи), преболедували COVID-19, както

и здрави контроли. Резултатите са представени по времеви точки – T1 (пиков отговор), T2 (6-ти месец), и T3 (12-ти месец след ваксинация или инфекция).

- Времева точка T1: Пиков T-клетъчен отговор

В T1, отчетен като пиков отговор след завършен ваксинационен курс, се наблюдават отчетливо завишени стойности на SFU в Панел А при всички ваксинирани участници. При лицата, ваксинирани с BNT162b2, медианата на SFU в Панел А достига 78 SFU (IQR: 110.5), резултатите в групата с mRNA-1273 демонстрираха сходна медиана – 91.5 SFU (IQR: 113). Сред преболедувалите, отговорът беше по-нисък – 23 SFU (IQR: 64), макар и с отделни високи стойности. Контролната група очаквано не проявява активност (0 SFU).

В Панел В, който измерва отговор към N пептид, се отчита съществена разлика между групите. При ваксинираните стойностите остават нулеви с единични ниски – медиана 2 SFU (IQR: 3) и 1.5 SFU (IQR: 3.75), докато очаквано при преболедувалите медианата достига 25 SFU (IQR: 61), което отразява разширения антигенен спектър, активиращ T-клетките след естествена инфекция.

- Времева точка T2: Шести месец

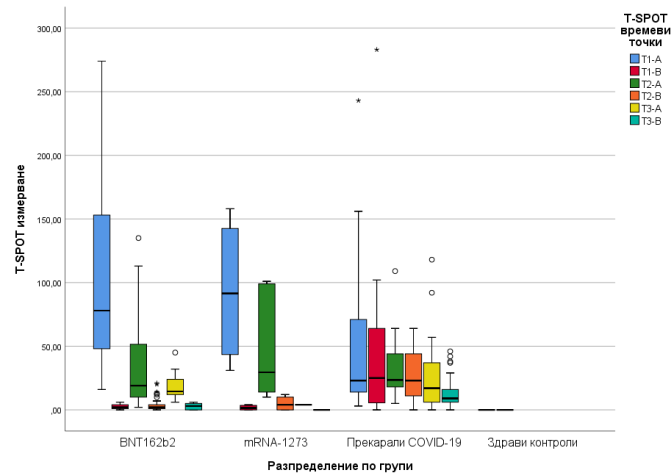
В T2 се наблюдава спад в T-клетъчния отговор при всички групи. При ваксинираните медианата в Панел А намалява за BNT162b2 до 19 SFU (IQR: 45), T1 vs T2 (p=046) и 29.5 SFU (IQR: 86.5) съответно за mRNA-1273. При преболедувалите също се отчита редукция, но остава относително стабилна – 23.5 SFU (IQR: 26.5), което предполага по-продължителен T-клетъчен имунитет след инфекция.

В Панел В ваксинираните запазват нисък, липсващ отговор – 2 SFU (IQR: 3) и 4 SFU (IQR: 10.5). В групата на преболедувалите медианата остава повишена – 23 SFU (IQR: 33.25), показвайки поддържан отговор към N антигени след шест месеца.

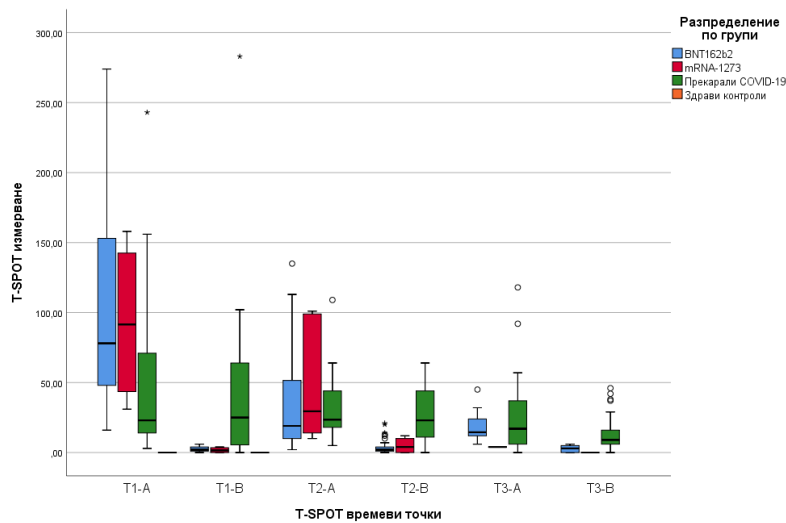
- Времева точка T3: 9–12 месеца

В последната проследена точка T3, T-клетъчният отговор в Панел А продължава да намалява. При ваксинираните медианата спада до 14.5 SFU (IQR: 12.5), докато преболедувалите съхраняват умерен отговор – 17 SFU (IQR: 33.5). Макар абсолютните стойности да са ниски, наличието на отговор в групата на преболедувалите предполага съществуването на паметови T-лимфоцити с по-дълъг живот.

В Панел В при преболедувалите остават с медиана от 9 SFU (IQR: 14.5). Тези резултати отново демонстрират по-широкия епитопен обхват и устойчивост на T-клетъчния отговор при лица с естествено придобит имунитет.



**Фигура 12. Резултати от T-ELISpot по групи в съответните периоди. Фигурата отразява динамиката на T-клетъчния отговор, оценен чрез SFU в панелите за S и N пептиди, с отчетлив пик в T1, последван от спад в T2 и T3, като преболедувалите запазват по-устойчив и по-широкоспектърен отговор спрямо ваксинираните.**



**Фигура 13. Сравнение на резултатите от B-ELISpot междугрупово в отделните периоди.**

Единствено в T1 се установиха статистически значимо по-високи стойности в групата на ваксинираните в сравнение с преболедувалите ( $p=0.021$ ).

T-SPOT анализът разкрива отчетлив пик на T-клетъчен отговор след пълната ваксинация (T1), последван от плавен спад през T2 и T3. Независимо от ваксината, до 12-ти месец T-клетъчният отговор е отслабен, но измерим, което потвърждава наличието на имунологична памет при участниците. Докато ваксинацията индуцира силен отговор към S1-доминирани пептиди (панел A), естествената инфекция предизвиква по-балансиран и

траен отговор и към други антигени (панел В). Това се отразява в по-високите SFU стойности при преболедувалите в Панел В на всички времеви точки.

Нашето изследване се фокусира и върху продължителността и динамиката на Т-лимфоцитния имунен отговор към SARS-CoV-2 след ваксинация и естествена инфекция, като резултатите показват известна разлика в имунния отговор. Наблюдава се, че и ваксинацията, и естествената инфекция водят до формиране на Т-клетъчна памет, която остава измерима през времето, въпреки наблюдавания спад в броя на специфичните Т-лимфоцити след пиковия отговор. Тези данни потвърждават важността на Т-клетъчния имунитет за дългосрочната защита срещу COVID-19, която става все по-критична с появата на нови варианти на вируса. Нашите наблюдения за ваксинираните с иРНК ваксини показват, че пиковият Т-клетъчен отговор след пълна ваксинация е изразен, като на 6-ти и 12-ти месец отговорът намалява, но остава измерим. Тези резултати са в съответствие с проучвания, които също демонстрират, че ваксинално индуцираните Т-клетъчни отговори, въпреки значителния спад във времето, продължават да осигуряват защита срещу тежко протичане на заболяването дори при новите варианти на вируса. Изследванията показват, че шест месеца след ваксинация с иРНК ваксини, CD4+ Т-отговор и CD8+ Т-отговори остават стабилни, което подчертава трайността на ваксиналната Т-клетъчна памет.

Резултатите от групата на преболедувалите показват, че Т-клетъчният отговор е по-дълготраен и по-малко податлив на отслабване с времето в сравнение с ваксинираните. Нашите данни демонстрират, че след шест месеца и година след инфекцията, стойностите на специфичните за спайк протеин Т-лимфоцити продължават да бъдат значително по-високи при преболедувалите в сравнение с ваксинираните. Това е в съответствие с изследванията, които показват, че при преболедувалите, Т-клетъчният отговор не само остава по-дълготраен, но също така се разширява, включвайки различни антигени на вируса, което предлага защита срещу нови варианти. Проучване на Dan et al. докладва, че при преболедувалите, Т-клетъчният отговор към SARS-CoV-2 остава стабилен до 8 месеца след инфекцията, като около 92% от хората запазват паметови CD4+ Т-лимфоцитии около 50% запазват паметови CD8+ Т-лимфоцитисрещу вируса. Това е особено важно в контекста на постоянно мутиращия вирус, тъй като широкият спектър на Т-клетъчния отговор при преболедувалите може да осигури по-голяма защита срещу новите варианти на SARS-CoV-2.

Сравнението на Т-клетъчния отговор при ваксинирани и преболедували лица потвърждава, че хибридният имунитет (комбинирането на ваксинация и естествена инфекция) може да осигури по-силен и по-дълготраен Т-клетъчен отговор. Хибридните имунни отговори водят до по-широкоспектърна и по-устойчива Т-клетъчна памет, която включва не само отговор към спайк протеина, но и към други вирусни антигени, които не са подложени на мутации в новите варианти на вируса. Това дава основа за предположението, че хибридният имунитет може да бъде по-ефективен при защитата срещу новопостъпващите варианти на SARS-CoV-2, като Делта и Омикрон, които са показали еволюция в спайк протеина, правейки хуморалния отговор по-малко ефективен, докато Т-клетъчният отговор продължава да осигурява защита.

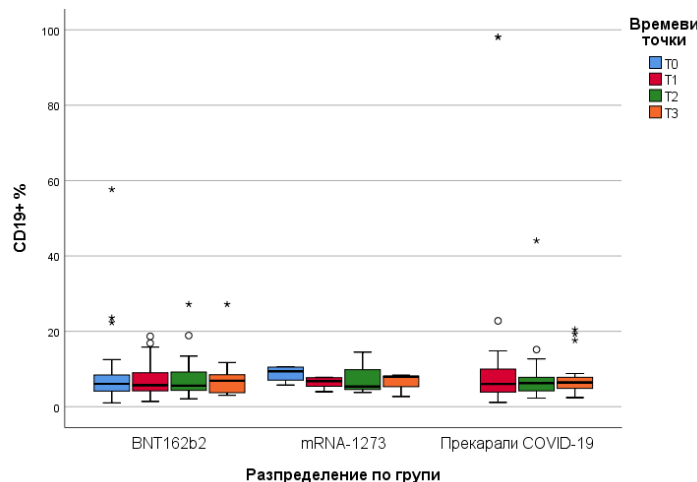
T-клетките осигуряват защита срещу тежки форми на заболяването и могат да предотвратят вирусната репликация, като елиминират инфектираните клетки. Въпреки че антителата играят важна роля в краткосрочен план, когато нивата им започнат да намаляват, T-клетъчният отговор остава критичен за предотвратяване на тежко заболяване и намаляване на вирусния товар. Нашите резултати подкрепят тези наблюдения, показвайки, че дори след значителен спад на нивата на антитела, паметовите T-лимфоцити продължават да циркулират и да осигуряват защита. Това е важно в контекста на новите варианти на вируса, които могат да избягат от неутрализиращите антитела, но не и от T-клетъчния имунитет.

## 5. Резултати по Задача 4

Многопараметърната флоуцитометрия позволява прецизна идентификация на различни субпопулации от B-лимфоцити въз основа на техния фенотип, експресия на повърхностни маркери и антигенна специфичност. В настоящото изследване беше приложена стандартизирана гейтинг стратегия (Фигура 4), с която бяха селектирани живи CD19<sup>+</sup> B-лимфоцити, след изключване на други лимфоидни популации (T-клетки, NK-клетки и моноцити) и мъртви клетки. Това позволи оценка на относителното разпределение на B-клетъчни субпопулации като процент от живите лимфоцити във всяка изследвана група и времева точка, както и допълнителен анализ на антиген-специфични (S1) и превключилите класа си паметови клетки.

- Разпределение на CD19<sup>+</sup> клетки.

При ваксинираните с BNT162b2 дялът на CD19<sup>+</sup> лимфоцити показва известни флукутации във времето. Преди завършване на ваксинационния курс (T0), медианата е 6.07% (1.00–57.66%), като на първия месец след втората доза (T1) стойностите намаляват до 5.69% (1.40–18.66%). На T2 се наблюдава сходна медиана – 5.58% (2.09–27.18%), докато на 12-ия месец (T3) има леко повишение до 6.89% (3.04–27.18%). При ваксинираните с mRNA-1273, разпределението е по-стабилно, с медиана от 9,39% (5.75–10.55%) на T0, която намалява до 6.79% (3.99–7.80%) на T1. На T2 се наблюдава понижение до 5.33% (3.79–14.48%), а на T3 – медиана от 7.93% (2.71–8.36%). При преболедувалите COVID-19 лица, CD19<sup>+</sup> клетките достигат пик на T1 – 6.03% (1.13–98.16%), след което медианата остава сравнително стабилна: 6.27% (2.28–44.07%) на T2 и 6.41% (2.40–20.46%) на T3.



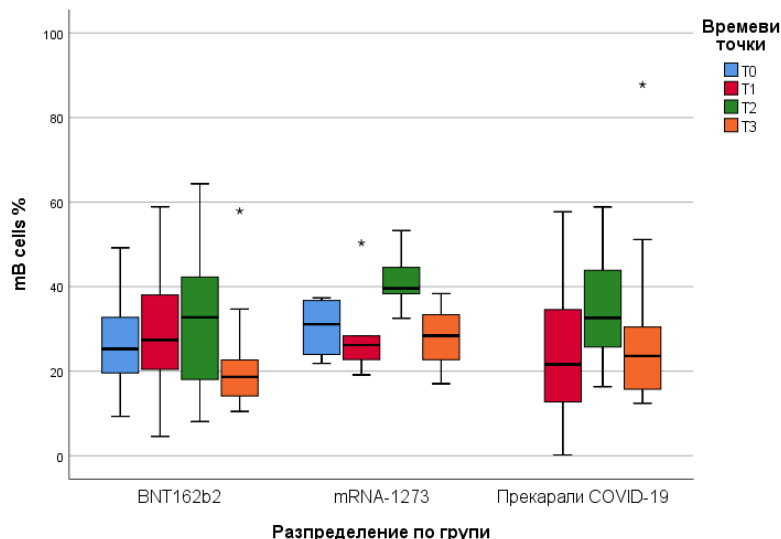
**Фигура 14. Разпределение по групи на % CD19<sup>+</sup> клетки, представени от лимфоцитната популация.** Фигурата показва динамиката на CD19<sup>+</sup> В-лимфоцитите във времето, като при всички групи се наблюдават умерени флукутации, без значими промени.

Проследяването на относителния дял на CD19<sup>+</sup> В-лимфоцитите във времето демонстрира сходна динамика в различните групи. Независимо от ваксината (BNT162b2 или mRNA-1273), CD19<sup>+</sup> клетките претърпяват умерено понижаване в относителната си честота след пика на имунния отговор (T1), вероятно вследствие на преразпределение на клетъчните субпопулации (например преход към плазматични клетки или тъканна миграция). Интересен е по-високият пик на CD19<sup>+</sup> лимфоцити при преболедувалите на T1, който може да отразява активиране на наивни клетки и хетерогенна реактивация в рамките на реконвалесцентния период.

Не се установиха статистически значими разлики между групите за съответните периоди.

- Разпределение на паметови В-лимфоцити (mB cells).

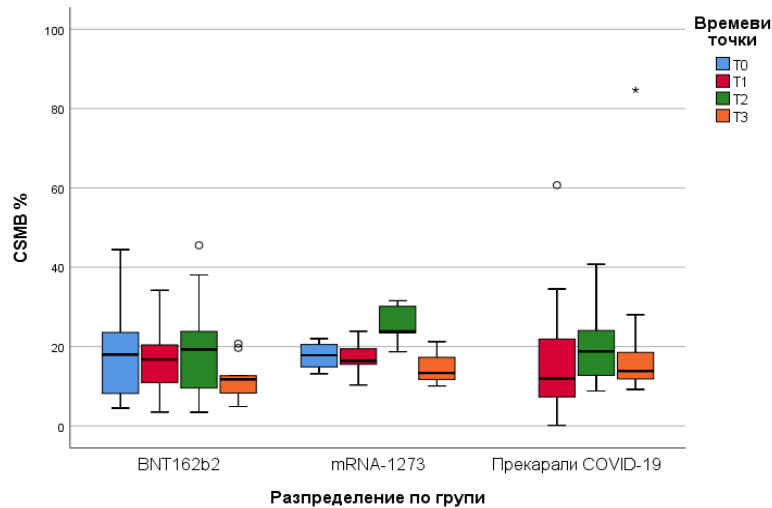
Паметовият В-клетъчен пул при ваксинирани с BNT162b2 започва от медиана 25.26% (9.30–49.18%) на T0. След пълната ваксинация стойностите постепенно се повишават: T1 – 27.39% (4.56–58.88%), T2 – 32.74% (8.08–64.34%). На T3 се отчита понижаване до 18.64% (10.48–57.89%). При ваксинираните с mRNA-1273, паметовите В-лимфоцити са с медиана от 31.09% (21.82–37.32%) на T0. На T1 се наблюдава близка стойност – 26.16% (19.14–50.31%), докато на T2 се регистрира най-високата медиана – 39.58% (32.51–53.26%). На T3 – 28.38% (17.04–38.34%). Преболедувалите участници показват най-голямо разнообразие. Медианата на T1 е 21.60% (0.20–57.72%), със статистически значимо покачване в T2 ( $p=0.038$ ) – 32.60% (16.32–58.86%) и леко понижаване на T3 – 23.60% (12.41–87.77%). Индивидуалните стойности са силно разпръснати, особено в третата времева точка.



**Фигура 15.** Разпределение по групи на паметовите В-лимфоцити, представени като процент от CD19<sup>+</sup> клетки. Фигурата илюстрира динамиката на паметовите В-лимфоцити, установява се пик през T2 и постепенно понижение в T3.

- Превключили класа си паметови В-лимфоцити (представени като процент от паметови В-лимфоцити).

При участниците, имунизирани с BNT162b2, медианата на CSMB в началната точка (T0) е 17.99%, със стойности вариращи от 4.50% до 44.44%. След първата доза (T1) медианата остава стабилна – 16.75%, като стойностите варират от 3.48% до 34.22%. На T2 се наблюдава леко покачване до медиана 19.27% (3.46% – 45.52%), последвано от отчетливо понижениe на T3, при което медианата е 11.74%, а стойностите варират от 4.89% до 20.73%. В групата с mRNA-1273, медианата на CSMB в T0 е 17.83% с по-тесен размах между 13.15% и 21.98%. Стойностите се запазват на сходно ниво на T1 – медиана 16.41% (10.30% – 23.84%). Значително нарастване се отчита на T2, където медианата е 23.85% и стойностите варират от 18.69% до 31.55%. На T3 се наблюдава намаление – медиана 13.34%, с диапазон от 10.07% до 21.24%. При преболелите лица, медианата на CSMB на T1 е 11.96%, но стойностите са силно разпръснати – от 0.15% до 60.70%. На T2 се наблюдава повишение – медиана 18.78% и вариране между 8.82% и 40.75%. На T3 отново се отчита висока дисперсия – медианата е 13.83%, а стойностите варират от 9.19% до 84.68%.

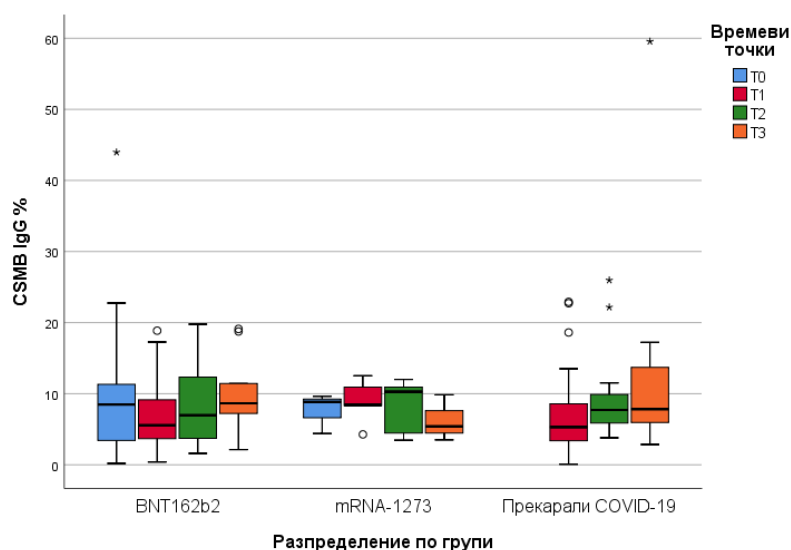


**Фигура 16. Разпределение по групи на % CSMB клетки, представени като процент от паметови В-лимфоцити.** При двете ваксинирани групи се наблюдава умерено повишение до T2 и спад в T3, докато при преболедувалите стойностите са по-хетерогенни с отделни високи индивидуални нива.

- IgG<sup>+</sup> паметови В-лимфоцити (CSMB IgG<sup>+</sup>)

В групата на ваксинираните с BNT162b2, началната медиана на IgG<sup>+</sup> CSMB в T0 е 8.47%, със стойности, вариращи от 0.20% до 43.97%. Месец след втората доза (T1), медианата спада до 5.57%, а размахът е между 0.38% и 18.86%. На T2 се наблюдава леко повишение – медианата е 6.96%, с диапазон от 1.61% до 19.77%. В края на проследяването (T3), медианата се увеличава до 8.64%, а стойностите варират от 2.14% до 19.11%.

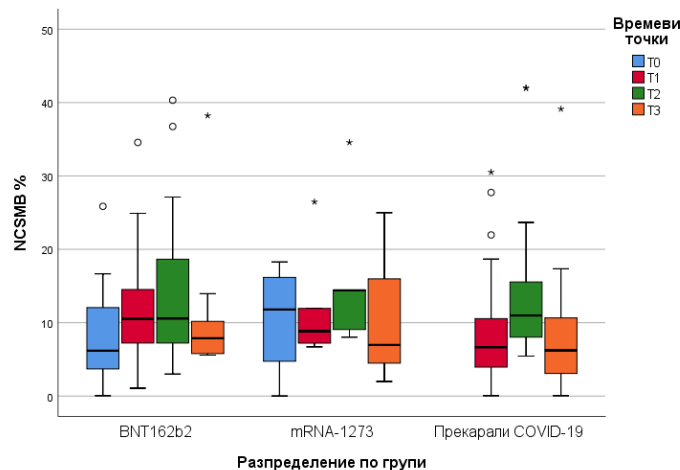
Участниците, имунизирани с mRNA-1273, показват медиана от 8.86% в началната точка (T0), с размах от 4.40% до 9.62%. На T1 стойностите се запазват с близка медиана – 8.43% (4.27% – 12.54%). Интересно е, че на T2 се отчита покачване на медианата до 10.28%, при размах от 3.46% до 11.99%. Впоследствие, на T3, медианата спада до 5.41%, със стойности между 3.51% и 9.84%. При преболедувалите участници, медианата на IgG<sup>+</sup> CSMB след възстановяване (T1) е 5.31%, със силна дисперсия – от едва 0.08% до 22.92%. На T2 медианата се повишава до 7.71%, при стойности от 3.79% до 25.97%. На T3 се отчита ново покачване – медианата достига 7.83%, с изключително широк размах – от 2.87% до 59.55%.



**Фигура 17. Разпределение по групи на % CSMB IgG клетки, представени като процент от паметови В-лимфоцити. При двете ваксинирани групи се наблюдава умерено повишение в T2, докато при преболедувалите стойностите са по-хетерогенни с отделни високи индивидуални нива.**

- Непревключили класа си паметови В-лимфоцити.

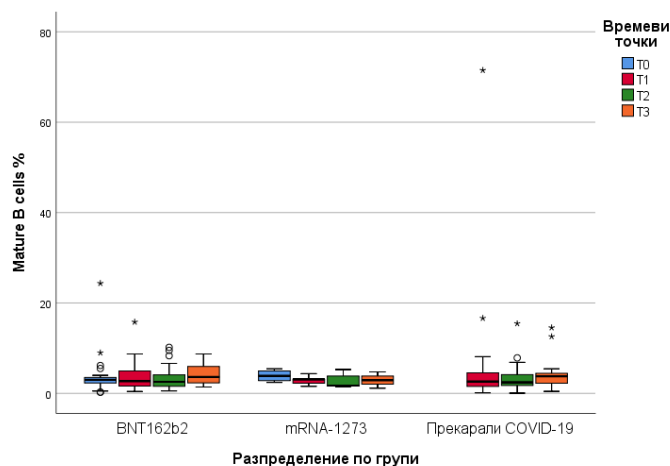
При участниците, ваксинирани с BNT162b2, медианата на NCSMB в началната точка (T0) е 6.18% с отчетен размах от 0.04% до 25.86%. Месец след втората доза (T1) се наблюдава повишение с медиана 10.52% и вариране от 1.08% до 34.56%. Най-високи стойности се регистрират на T2 – медиана 10.58% (2.99% – 40.31%), последвано от леко понижени на T3 – медиана 7.89% с размах 5.59% до 38.22%; T0 vs T2 ( $p=0.036$ ). В групата, имунизирана с mRNA-1273, стойностите също демонстрират динамика. Медианата на T0 е 11.79% при размах от 0.01% до 18.27%. На T1 се отчита по-ниска медиана от 8.84% (6.70% – 26.47%). Стойностите се повишават на T2, като медианата достига 14.41% с отчетено вариране между 8.03% и 34.56%. На T3 медианата отново намалява до 6.97%, а стойностите варират от 1.99% до 24.99%. При преболедувалите участници, медианата на NCSMB на T1 е 6.65% с широк размах между 0.05% и 30.52%. На T2 се отчита повишение – медиана 10.98% и стойности в границите от 5.44% до 42.01%. На T3 медианата е 6.23% при отчетен диапазон от 0.05% до 39.13%.



**Фигура 18. Разпределение по групи на % NCSMB клетки, представени като процент от паметови В-лимфоцити.** Фигурата показва повишение до T2 при всички групи и последващ спад в T3, като най-голяма вариабилност се отчита при преболедувалите.

- Зрели В-лимфоцити

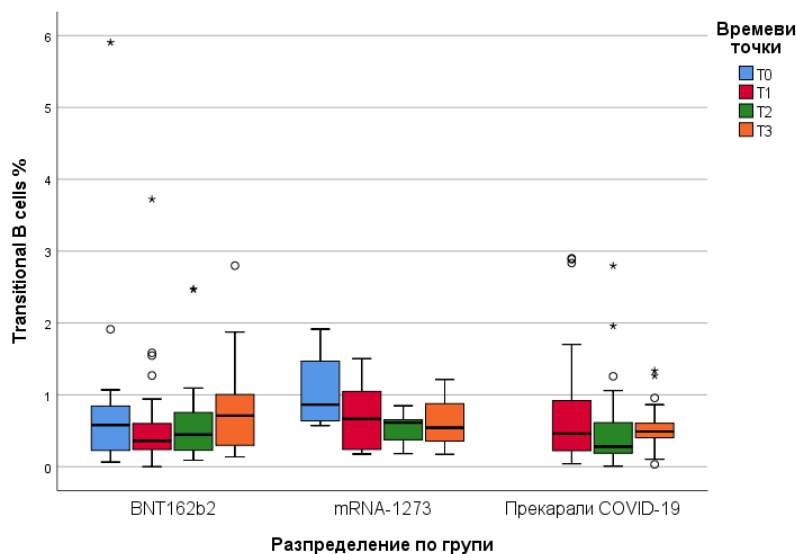
При участниците, имунизирани с BNT162b2, дялт на зрелите В-лимфоцити започва с медиана от 3.00% (0.26–24.36%) преди поставяне на втората доза (T0). На T1 стойностите леко намаляват до медиана 2.71% (0.41–15.79%), като тенденцията за намаление продължава и на T2 – 2.56% (0.54–10.18%). На T3 се наблюдава възстановяване на стойностите до 3.61% (1.39–8.71%). При ваксинираните с mRNA-1273, медианата на зрелите В-лимфоцити на T0 е 3.85% (2.42–5.43%), запазвайки се относително стабилна на T1 – 3.10% (1.57–4.36%). На T2 има леко понижение до 1.71% (1.51–5.28%), а на T3 медианата се възстановява до 2.91% (1.15–4.75%). Преболедувалите лица показват значителна индивидуална вариабилност. На T1 медианата е 2.61% (0.12–71.49%), като изключително високият максимум говори за възможна късна експанзия или активна субпопулация при част от участниците. На T2 стойностите се стабилизират до 2.43% (0.04–15.44%), а на T3 – 3.78% (0.44–14.54%).



**Фигура 19. Разпределение по групи на % зрели В-лимфоцити.** Фигурата илюстрира относително стабилни стойности с леки флукутации във времето.

- Преходни В-лимфоцити

В началната точка (T0) при ваксинираните с BNT162b2 медианата на преходните В-лимфоцити е 0.58%, със стойности от 0.06% до 5.90%. На T1 се отчита намаление, като медианата достига 0.36%, при размах от 0% до 3.72%. На T2 медианата леко се повишава до 0.45%, със стойности в диапазона 0.09% – 2.48%. Към T3 има допълнително покачване на медианата до 0.71%, с отчетени стойности от 0.14% до 2.80%. Участниците, имунизирани с mRNA-1273, показват медиана от 0.86% в T0, с размах от 0.57% до 1.92%. На T1 се наблюдава сходна медиана от 0.66%, с размах между 0.18% и 1.51%. Времева точка T2 показва лек спад – медианата е 0.61%, а стойностите варират от 0.18% до 0.85%. Към T3 стойностите се запазват, като медианата е 0.54% при размах от 0.17% до 1.21%. При преболедувалите медианата на преходните В-лимфоцити след възстановяване (T1) е 0.46%, със стойности от 0.04% до 2.90%. На T2 се отчита спад – медианата е 0.28%, а размахът е между 0.008% и 2.80%. Към T3 медианата леко се повишава до 0.49%, при стойности от 0.03% до 1.34%.

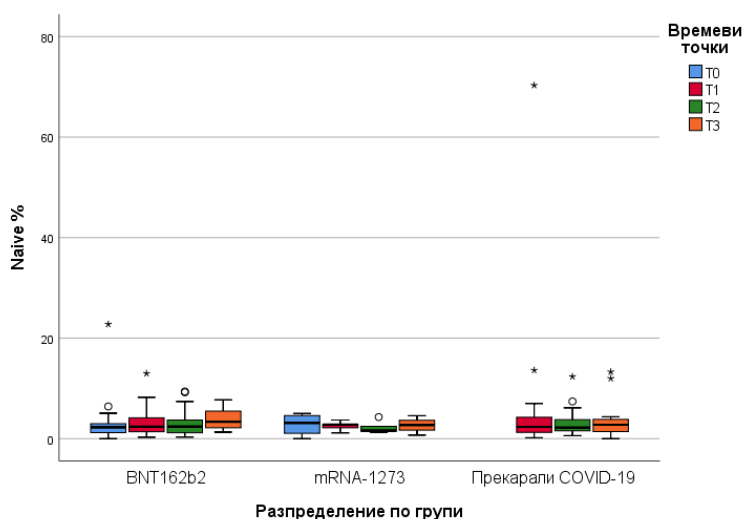


**Фигура 20. Разпределение по групи на % преходните В-лимфоцити.** Фигурата показва ниски и относително стабилни нива на преходните В-клетки при всички групи, с минимални вариации във времето.

- Наивни В-лимфоцити

В началната времева точка (T0) медианата на наивните В-лимфоцити при участниците, имунизирани с BNT162b2, е 2.26%, с отчетени стойности в широк диапазон – от 0% до 22.76%. На T1 медианата е сходна – 2.36%, с размах от 0.27% до 12.97%. В T2 медианата леко се повишава до 2.39%, със стойности от 0.32% до 9.38%. На T3 се наблюдава умерено повишение – медианата достига 3.37%, с размах между 1.30% и 7.72%. При участниците, имунизирани с mRNA-1273, в T0 медианата на наивните В-лимфоцити е 3.13%, с отчетени стойности от 0% до 5.01%. В T1 медианата е близка – 2.79%, при размах

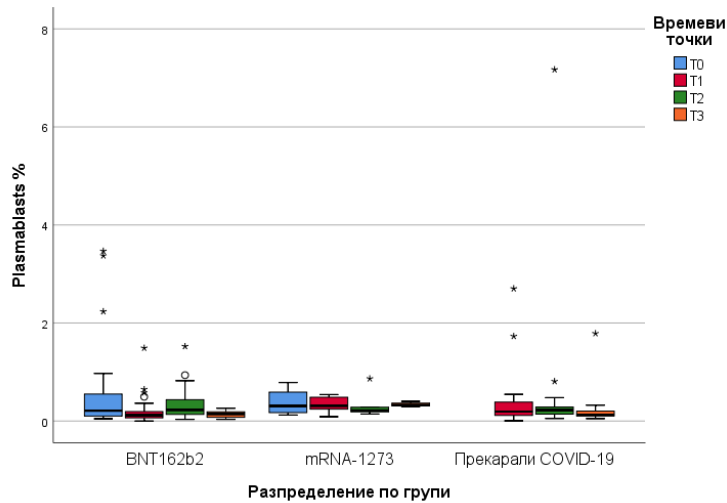
от 1.15% до 3.69%. На T2 се отчита спад – медианата е 1.58%, със стойности между 1.25% и 4.30%. Времева точка T3 показва умерено възстановяване – медианата достига 2.71%, с размах от 0.69% до 4.56%. При преболедувалите медианата на наивните В-лимфоцити на T1 е 2.34%, като стойностите варират от 0.17% до 70.31%, което показва наличието на изолирани екстремни стойности. На T2 се наблюдава леко понижаване – медианата е 2.17%, с диапазон от 0.60% до 12.34%. Към T3 медианата достига 2.75%, при отчетени стойности от 0% до 13.29%.



**Фигура 21. Разпределение по групи на % наивните В-лимфоцити. Показани са стабилни нива на наивните В-клетки с минимални колебания във времето.**

- Плазмобласти

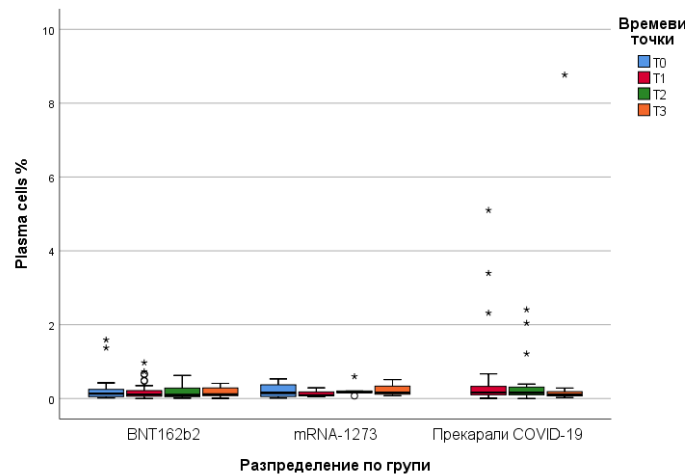
При ваксинираните с BNT162b2 в T0 медианата на плазмобластите е 0.21%, с отчетен размах от 0.045% до 3.47%, което свидетелства за изразена индивидуална вариабилност още преди имунизацията. След втора доза (T1), медианата спада до 0.12%, а диапазонът на стойностите е между 0% и 1.49%. В T2 се наблюдава повишение ( $p=0.013$ ) – медианата е 0.23%, с вариации от 0.03% до 1.52%. В T3 стойностите остават ниски, като медианата е 0,14%, а стойностите варират между 0.03% и 0.26%. При участниците, имунизирани с mRNA-1273, в T0 медианата на плазмобластите е 0.31%, със стойности в рамките от 0.12% до 0.84%. На T1 медианата остава сходна 0.32%, с размах от 0.09% до 0.54%. В T2 стойността на медианата е 0.22%, с вариации между 0.14% и 0.87%. В T3 се отчита лека стабилизация – медианата е 0.33%, с тесен диапазон от 0.29% до 0.40%, което предполага ограничена постваксинална активност на плазмобластите към този момент. При преболедувалите медианата на плазмобластите в T1 е 0.19%, с отчетени стойности между 0.005% и 2.70%, което подсказва за остър постинфекциозен имунен отговор при някои индивиди. На T2 медианата остава сравнително ниска – 0.22%, но с широк размах – от 0.05% до 7.17%, което отново подчертава хетерогенността на имунния отговор. В T3 се наблюдава по-ограничен отговор – медианата е 0.13%, със стойности между 0.05% и 1.78%.



**Фигура 22. Разпределение по групи на % плазмобласти.** Фигурата показва ниски честоти на плазмобластите във всички групи и времеви точки, с краткотрайни колебания след вакцинация или инфекция, като най-изразена индивидуална вариабилност се наблюдава при преболедувалите.

- Разпределение на плазматични клетки

При BNT162b2 ваксинираните, медианата на плазматичните клетки на T0 е 0.13% (0.02–1.59%), като на T1 намалява до 0.11% (0.00–0.97%), запазва се близка стойност на T2 – 0.09% (0.01–0.63%) и отново леко се увеличава до 0.11% (0.01–0.41%) на T3. При mRNA-1273, медианата на T0 е 0.15% (0.01–0.53%), следвана от понижение до 0.09% (0.05–0.29%) на T1. На T2 се наблюдава покачване до 0.16% (0.07–0.60%), като на T3 стойността е сходна – 0.16% (0.08–0.51%). При преболедувалите индивиди, плазматичните клетки достигат най-високи стойности на T1 – медиана 0.16% (0.01–5.10%). На T2 медианата е 0.16% (0.00–2.41%), а на T3 – 0.10% (0.03–8.77%), като се отбелязва голяма индивидуална вариабилност.



**Фигура 23. Разпределение по групи на % плазматични клетки.** Ниски и относително стабилни нива на плазматичните клетки при ваксинираните, докато при преболедувалите се наблюдава по-широка индивидуална вариабилност и изолирани по-високи стойности, особено в ранния постинфекциозен период.

Чрез проведената многопараметърна флоуцитометрия в проучването характеризирахме основните В-клетъчни субпопулации в периферната кръв: общи В-лимфоцити (CD19<sup>+</sup>), плазматични клетки, преходни, наивни, зрели и паметови В-лимфоцити (превключили и непревключили Ig-клас). В периферната кръв нормално циркулират малък брой плазмобласти, но след имунна стимулация (ваксина или инфекция) техният дял временно нараства драстично. Нашите резултати показват ясно изразен пик на CD19<sup>+</sup>CD27<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> плазмобласти в кратък период след антигенната експозиция, последван от бърз спад. Ваксинираните лица (особено след втората доза) демонстрират транзиторно увеличение на плазмобластите след имунизация. Това е в съответствие с резултатите, докладвани от авторски колективи, според които при лица, ваксинирани с BNT162b2, се наблюдава пик на IgG<sup>+</sup> плазмобласти около седмия ден след втората доза. В този период до 0.5–1% от циркулиращите В-лимфоцити са плазмобласти, секретирани анти-Spike антитела – значително над базовите стойности. Установена е положителна корелация между честотата на плазмобластите на 7-мия ден и броя на формираните паметови В-лимфоцити на 6-ия месец, което подсказва, че ранният плазмобластен отговор може да предскаже дългосрочната хуморална памет.

Паметовите В-лимфоцити (идентифицирани като CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) претърпяват по-плавни изменения във времето. Наивните В-лимфоцити, активирани от антигена, или се диференцират директно в плазмобласти, или влизат в герминативни центрове на лимфните възли, където се делят, подлагат се на соматични хипермутации и афинитетна селекция, и оттам излизат като високоафинитетни паметови клетки или дългоживеещи плазматични клетки. Този процес отнема време поради което паметовите В-лимфоцити започват да се появяват в периферията седмици след имунизация/инфекция и броят им може да нараства в следващите месеци. Нашите изследвания показват, че през първият месец след ваксинация се отчита начално нарастване на паметовите В-лимфоцити, докато към 3-ти и 6-ти месец се вижда ясно увеличение на тяхната фракция спрямо изходното ниво. Това съответства на наблюденията, че при ваксинирани лица честотата на спайк-специфичните паметови В-лимфоцити расте между 3-ти и 6-ти месец пост-ваксинация. Дялът на паметовите В-лимфоцити се повишава в периода от 3 до 6 месеца – което показва активно формиране на нови паметови клетки през този период. При преболедувалите има сходна тенденция с повишаване на процента на паметовите В-лимфоцити около 6 месеца след инфекцията. Нашите резултати отразяват тази тенденция – постепенно увеличаване и последващо плато.

Проследяването на динамиката на основните В-клетъчни субпопулации чрез многопараметърна флоуцитометрия разкрива комплексна, но последователна картина на хуморалния имунен отговор в трите изследвани групи – ваксинирани с BNT162b2, с mRNA-1273 и преболедували SARS-CoV-2. При всички групи се наблюдава сходен общ модел: ранна активация на наивни и преходни В-лимфоцити, последвана от нарастване на паметовия пул и постепенен спад на плазмобластната и плазматичната активност. Преобладаващата експанзия на превключили класа (IgG<sup>+</sup>) паметови клетки свидетелства за ефективна антигенна стимулация и дългосрочна хуморална памет.

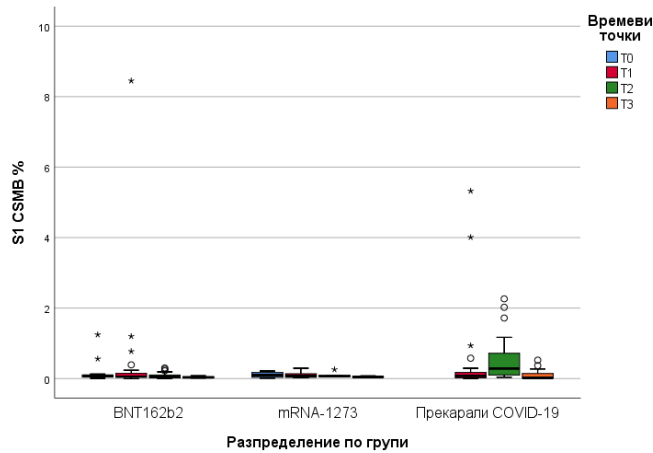
На популационно ниво, ваксинирани и преболедували в дългосрочен план показват сходна организация на В-клетъчните си субпопулации: малък дял плазмобласти (освен веднага след антигенна стимулация), стабилен процент паметови клетки и доминиращ пул от наивни клетки. Разликите са най-очевидни в кратките периоди след експозицията – ваксинираните имат ясно дефинирани пикове на плазмобласти след дозите, докато при преболедувалите такъв пик би бил по време на симптоматичната фаза (извън наблюдаваните реконвалесцентни точки). По отношение на паметовите В-клетки, и двете групи развиват силна памет.

## 6. Резултати по Задача 5

- Динамика на S1-специфичните клас-превключили паметови В-лимфоцити (S1 CSMB)

Проследяването на S1-специфичните изотипно превключени паметови В-лимфоцити (S1 CSMB) разкрива отчетливи различия във времевия профил на отговора при ваксинирани с BNT162b2 и mRNA-1273, както и при преболедували лица.

При участниците, имунизирани с BNT162b2, медианата на S1-специфичните CSMB в изходната точка (T0) е 0.07%, с отчетен диапазон от 0.007% до 1.25%. Това говори за наличие на базов пул от реактивни клетки, преди завършване на ваксинационния курс. Един месец след втората доза (T1), стойностите неочаквано намаляват – медианата е едва 0.06%, при изключително широк размах от 0% до 8.45%, което предполага силно индивидуализиран отговор. След това, на T2 (6-ти месец), медианата леко се понижава до 0.05% (0.004–0.30%), а на T3 (12-ти месец) се регистрира по-ниска стойност – медиана 0.03%, с минимално вариране (0.012–0.081%). В групата, имунизирана с mRNA-1273, S1 CSMB клетките показват относително стабилна и по-висока експресия спрямо BNT162b2. В T0 медианата е 0.097%, с диапазон от 0.010% до 0.213%. На T1 стойностите са сходни – медиана 0.072% (0.023–0.292%). В T2 се отчита медиана – 0.059% (0.054–0.256%), а към T3 медианата се запазва стабилна – 0.047% (0.022–0.077%). Данните показват по-добра консистентност на отговора във времето, без екстремни отклонения, което говори за устойчив и равномерен В-лимфоцитен имунен профил при тази платформа. При преболедувалите участници, след остър инфекциозен епизод се наблюдава пик в T1 – медианата достига 0.075% (0.005–5.32%). Това отразява интензивна генерация на антиген-специфични паметови лимфоцити в ранната конвалесцентна фаза. На T2 се регистрира допълнително повишение – медианата е 0.28%, с широк размах (0.034–2.26%), което може да е свързано с продължаваща антигенна стимулация или тъканна рециркулация. Към T3 обаче се отчита спад – медианата намалява до 0.020%, с отчетен диапазон от 0% до 0.52%; T2 vs T3 ( $p < 0.001$ ). Тези данни подчертават, че макар и трите групи да генерират S1-специфични CSMB клетки, техният дългосрочен профил зависи от вида на имунологичния стимул – ваксина или инфекция. mRNA-1273 индуцира най-стабилен и хомогенен отговор, докато BNT162b2 показва по-голяма индивидуална вариабилност. Постинфекциозният отговор е най-динамичен, но и с най-голяма дисперсия.



**Фигура 24. Разпределение по групи на % S1 CSMB клетки, представени като процент от паметовите В-лимфоцити. mRNA-1273 индуцира по-стабилен и равномерен отговор, BNT162b2 показва по-голяма индивидуална вариабилност, а преболедувалите демонстрират най-динамичен, но и силно хетерогенен имунен профил.**

В T2 се установиха статистически значимо по-високи стойности на S1 CSMB при преболедувалите в сравнение с ваксинираните с BNT162b2 ( $p < 0.001$ ).

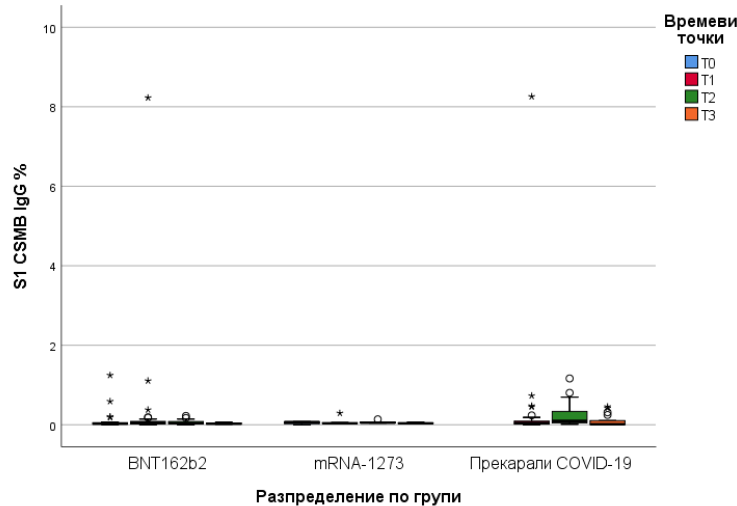
- S1-специфични IgG<sup>+</sup> паметови В-лимфоцити (S1 CSMB IgG<sup>+</sup>)

Проследяването на S1-специфичните IgG<sup>+</sup> CSMB-лимфоцити разкри значими различия в интензивността и устойчивостта на отговора между трите изследвани групи, като стойностите остават ниски, но показват отчетливи динамики.

При участниците, ваксинирани с BNT162b2, медианата в изходна точка (T0) е 0.028% (0.003–1.245%), което говори за изключително ниско базово присъствие на антиген-специфични IgG<sup>+</sup> паметови клетки. След втората ваксинация (T1) се отчита слабо повишение – медианата достига 0.051% (0.000–8.228%), с висок размах, показващ силна индивидуална вариабилност. Времеви точки T2 и T3 показват плавен спад на медианата до 0.037% (0.000–0.222%) и 0.028% (0.011–0.061%) съответно, с по-стабилен и ограничен диапазон, което предполага краткотрайна експанзия и последващо затихване на S1-специфичния IgG<sup>+</sup> паметов отговор.

В групата, имунизирана с mRNA-1273, се наблюдава сходна ниска начална медиана от 0.065% (0.000–0.077%) на T0. На T1 се отчита медиана 0.031% (0.027–0.292%), последвано от стабилна медиана от 0.051% (0.043–0.137%) на T2. На T3 се регистрира лек спад до 0.035% (0.021–0.062%). Макар и стойностите да са ниски, те остават по-постоянни във времето в сравнение с групата, ваксинирана с BNT162b2.

При преболедувалите се наблюдава най-голяма вариабилност. На T1 медианата е 0.043% (0.002–8.257%), което отразява резки индивидуални различия в ранния постинфекциозен период. T2 показва покачване на медианата до 0.094% (0.013–1.165%), а на T3 – ново понижаване до 0.013% (0.000–0.453%); T2 vs T3 ( $p = 0.005$ ). Въпреки че при някои индивиди се регистрират високи стойности, мнозинството от участниците остават в ниски диапазони, което предполага, че активирането на S1-специфични IgG<sup>+</sup> паметови лимфоцити след инфекция е силно зависимо от индивидуалния имунен профил и клиничното протичане.



**Фигура 25. Разпределение по групи на % S1 CSMB IgG клетки, представени като процент от паметовите В-лимфоцити. S1-специфичните IgG<sup>+</sup> CSMB клетки се характеризират с по-устойчив отговор при mRNA-1273, по-голяма индивидуална вариабилност при BNT162b2 и най-динамичен, но хетерогенен профил при преболедувалите, със статистически значимо повишение в T2.**

В T2 се установиха статистически значимо по-високи стойности на S1 CSMB при преболедувалите в сравнение с ваксинираните с BNT162b2 ( $p=0.021$ ).

- S1-специфични паметови В-лимфоцити без изотипно превключване (S1 NCSMB)

S1 NCSMB съставляват функционално важна, но количествено ограничена популация, която също беше проследена в динамика след ваксинация или естествена инфекция. Анализът показва ниски изходни нива и краткотрайна експанзия, последвана от значителен спад, особено при ваксинираните групи.

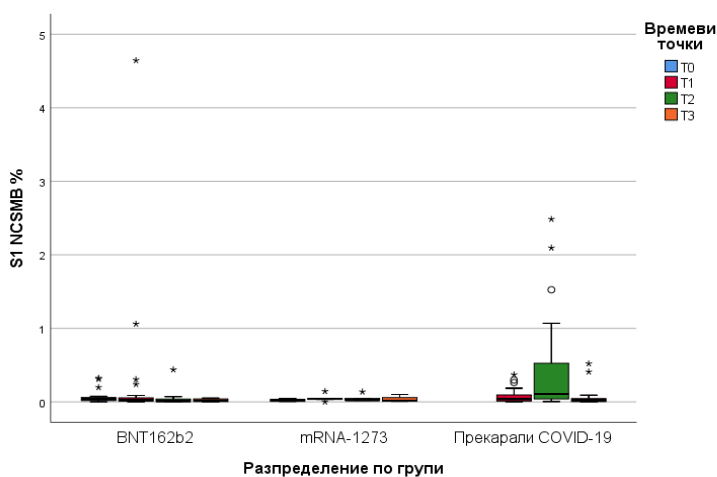
При участниците, ваксинирани с BNT162b2, медианата в начална точка (T0) е 0.036% (0.002–0.324%). Въпреки че на T1 се отчита медиана 0.027% (0.000–4.644%), стойността остава ниска, а размахът – висок, което свидетелства за хетерогенност в индивидуалния имунен отговор. Впоследствие се наблюдава рязък спад – до 0.011% (0.000–0.439%) на T2 и до 0.018% (0.000–0.052%) на T3, което е индикация за слаба устойчивост на тази популация след ваксинация.

Групата, имунизирана с mRNA-1273, показва сходни тенденции, но с още по-ниски стойности. На T0 медианата е 0.017% (0.006–0.047%), а на T1 достига максимум от 0.041% (0.001–0.143%). В следващите две времеви точки се наблюдава задържане на ниски нива – медианата е 0.025% (0.020–0.137%) на T2 и 0.016% (0.007–0.100%) на T3. Това отново подчертава ограничената и бързопреходна природа на NCSMB отговора след ваксинация, независимо от ваксината.

При участниците с прекарана SARS-CoV-2 инфекция, на T1 се наблюдава медиана от 0.039% (0.000–0.371%), съпоставима с ваксинираните групи. Въпреки това, на T2 има

отчетливо увеличение до 0.107% (0.004–2.484%), с много широк размах, последвано от спад до 0.022% (0.000–0.520%) на T3; T2 vs T3 ( $p=0.004$ ). Тези резултати предполагат, че инфекцията предизвиква по-голямо, макар и преходно, разширение на S1-специфичните NCSMB-лимфоцити при подгрупа от индивиди.

S1-специфичните NCSMB-лимфоцити остават слабо представени и непостоянни във времето, независимо от произхода на антигенното стимулиране – ваксина или естествена инфекция. Само при някои преболедали се отчита значима експанзия, но тя не се задържа дългосрочно. Тези резултати подкрепят тезата, че дълготрайният паметов отговор към SARS-CoV-2 се осъществява предимно чрез клас-превключили клетки, докато NCSMB играят по-ограничена роля и присъстват като малка фракция в общия пул от S1-специфични В-лимфоцити.



**Фигура 26. Разпределение по групи на % S1 NCSMB клетки, представени като процент от паметовите В-лимфоцити.** Фигурата показва ниски и краткотрайни нива на S1 NCSMB при ваксинираните, със слаб и непостоянен отговор, докато при преболедалите се наблюдава временна експанзия в T2, която не се задържа в дългосрочен план.

В T2 се установиха статистически значимо по-високи стойности на S1 CSMB при преболедалите в сравнение с ваксинираните с BNT162b2 ( $p<0.001$ ).

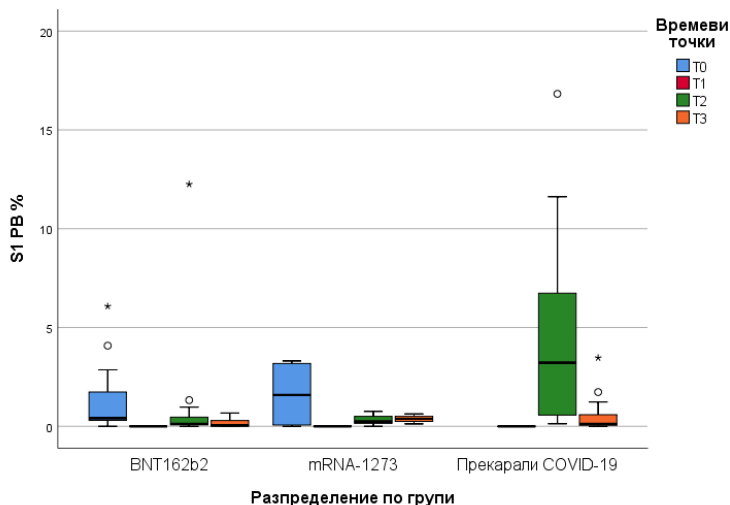
- S1 PB

S1-специфичните PB представляват краткоживееща, но функционално важна популация, свързана с интензивно секретирание на антитела след антигенно стимулиране. Данните показват отчетливи разлики във времето разпределение и интензитета на отговора между групите.

В групата, ваксинирана с BNT162b2, още в изходна точка (T0) се наблюдава наличие на S1-специфични плазматични клетки с медиана 0.41% (0.00–6.08%), което отразява активност от първата доза ваксина. В T1 всички участници в тази група показват липса на S1 PB (0.00%). На T2 се отчита повторна поява на тази популация с медиана 0.12% (0.00–12.25%), след което следва рязък спад на T3 до 0.05% (0.00–0.67%). Високата дисперсия и асиметрия на разпределението при T2 предполага, че само част от индивидите реагират с експанзия на S1-специфични плазматични клетки.

При ваксинираните с mRNA-1273 изходното ниво (T0) е с медиана 1.59% (0.00–3.31%), съпоставимо с BNT162b2. На T1 няма детектирани S1 PB (0.00%). На T2 се отчита медиана от 0.24% (0.00–0.75%), а на T3 – 0.38% (0.12–0.62%), което може да показва по-умерен, но по-устойчив отговор в сравнение с BNT162b2. При тази група не се наблюдават резки пикове, а по-равномерно разпределение на реакцията с ограничена амплитуда.

Най-силно изразен отговор се наблюдава при участниците с прекарана SARS-CoV-2 инфекция. Въпреки че на T1 не се откриват S1 PB (0.00%), на T2 се регистрира рязка експанзия с медиана 3.22% (0.13–16.83%), което отразява интензивна плазмобластна активация в постинфекциозния период. На T3 тази популация намалява, но остава налична при част от участниците – медианата е 0.12% (0.00–3.46%), с широк размах и значителна асиметрия на разпределението; T2 vs T3 ( $p=0.014$ ).



**Фигура 27. Разпределение по групи на % S1 PB клетки.** Фигурата показва краткотрайна поява на S1-специфични плазмобласти след вакцинация или инфекция, с по-умерен и равномерен отговор при mRNA-1273, по-колеблив профил при BNT162b2 и най-силна, но преходна експанзия при преболедувалите в T2.

В T2 се установиха статистически значимо по-високи стойности на S1 CSMB при преболедувалите в сравнение с ваксинираните с BNT162b2 ( $p<0.001$ ).

Чрез флоуцитометричен анализ характеризирахме и три подтипа S1-специфични В-лимфоцити: CSMB, NCSMB и PB. CSMB са класическите по-дългоживеещи паметови клетки, претърпели афинитетно узряване в герминативни центрове. NCSMB запазват IgM изотип (често и експресия на повърхностен IgD). Тези клетки обикновено са продукт на извънзародишни отговори и се смятат за по-първични паметови клетки. PB представляват ефекторните антитяло-продуциращи клетки в циркулацията, които разпознават S1-домейна. Резултатите са представени като процент от паметовите В-лимфоцити във времето. Тази подробна характеристика ни позволява да видим качествения състав на В-клетъчната памет, формирана при различните групи. иРНК ваксините предизвикват мощни герминативно-центрови реакции, подкрепени от Т-фоликуларни хелпери, което води до образуване преимуществено на клас-превключени паметови В-лимфоцити. Очаквано ваксинираните лица да имат висок дял S1-специфични CSMB и нисък дял NCSMB. В подкрепа, Ciabattini и

колектив установяват, че паметовите В-лимфоцити 6 месеца след BNT162b2 ваксинация са преимуществено IgG<sup>+</sup> клас-превключени. Нашите данни показват, че процентът на S1-специфични CSMB нараства след ваксинация и остава доминиращ компонент от антиген-специфичната памет до 6-ти месец. От друга страна, NCSMB при ваксинирани са слабо представени.

При преболедалите картината е по-разнообразна. SARS-CoV-2 инфекцията едновременно активира фоликуларни отговори и екстрафоликуларни пътища. Особено при силно възпаление, част от В-клетките се диференцират бързо извън герминативни центрове, давайки наивна памет – това са именно IgM<sup>+</sup> паметовите клетки. Такива клетки са описани при редица инфекции като атипични или marginal zone-like В-клетки, които носят маркери на памет (напр. CD27<sup>+</sup>), но запазват IgM изотип. Pape et al. отбелязват, че извънзародишно-центровите паметови клетки най-често експресират IgM. Затова може да се очаква, че преболедалите COVID-19 имат измерим процент S1-специфични NCSMB. Нашите данни демонстрират по-висок дял на NCSMB в групата на преболедалите в сравнение с ваксинираните, особено в по-ранните месеци след инфекцията. С времето, някои от тези IgM паметови клетки могат допълнително да се диференцират или да изчезнат, но на 6 месец пост-инфекция все още се откриват. В същото време, инфекцията генерира и клас-превключена памет (CSMB) чрез класически герминативни центрове – особено при продължително боледуване. Шест месеца след преболедуване се наблюдава наличието както на IgG<sup>+</sup> паметови В-клетки, така и на IgM<sup>+</sup> клетки. Паметови клетки се запазват до година след първоначалната експозиция и включват функционални субпопулации, асоциирани с по-висок авидитет на В-клетъчния рецептор. Сред които са описани CD21<sup>-</sup>/CD27<sup>-</sup>, CD21<sup>-</sup>/CD27<sup>+</sup> и CD21<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>, което показва висока пластичност и множество функции при повторна експозиция към антигена. По-конкретно клетки с фенотип CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> или CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> (т.нар. „интермедиерен“ паметов фенотип) се свързват с висока неутрализираща способност – паметови клетки, известни като гранично-зонови клетки, които имат междинни характеристики между наивни и класически паметови клетки. Тези наблюдения подкрепят идеята, че IgM паметовите В-лимфоцити след инфекция са важни и всъщност допринасят съществено към неутрализиращия потенциал на паметта.

Анализът на качествения състав на В-клетъчната памет хвърля светлина върху потенциалната дълготрайност и адаптивност на имунитета. Преобладаването на клас-превключена памет (IgG/IgA) при ваксинираните означава, че при повторен контакт те бързо ще синтезират високоефективни антитела и е вероятно да бъдат защитени от тежко заболяване. По-малкият дял IgM памет при тях може да ги прави малко по-уязвими при много изменени варианти – затова постоянното обновяване на ваксините (напр. бивалентни и вирус-адаптирани ваксини, насочени към нови щамове) е важно, за да се обогатява паметта към актуалните вирусни характеристики. При преболедалите, наличието и на IgG, и на IgM памет дава една двупластова защита: IgG памет за бърз отговор и IgM памет като резерв за еволюционно далечни варианти. Това може да е една от причините поради която хибридният имунитет (инфекция + ваксина) да се свързва с особено добра протекция, тъй като обединява предимствата и на двата вида паметови отговори.

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение данните от настоящото проучване очертават сложната и динамична природа на имунния отговор срещу SARS-CoV-2, като потвърждават същественото значение на имунната памет за дългосрочната защита. Въпреки наблюдавания спад в серумните нива на антитела няколко месеца след ваксинация или инфекция, персистирането на паметови В- и Т-лимфоцити демонстрира, че хуморалната и клетъчната памет могат да осигурят клинична протекция дори при нисък титър на циркулиращи антитела. В частност, ваксинацията с mRNA-1273 води до по-високи и по-дълготрайни нива на RBD-специфични антитела в сравнение с BNT162b2 – наблюдение, което е в съответствие с данни от независими кохортни проучвания. Това предимство може да бъде обяснено с по-високата доза иРНК, по-дългия интервал между дозите и съответните имуномодулиращи характеристики на липидната наночастица.

Проведеният многопараметърен анализ на В-лимфоцитните субпопулации подчертава, че както ваксинацията, така и инфекцията водят до формиране на стабилна S1-специфична памет. Въпреки това, естествената инфекция индуцира по-разнообразен В-клетъчен репертоар, включително IgM<sup>+</sup> паметови клетки, които могат да участват в афинитетно узряване при среща с нов вариант. От своя страна, ваксинираните изграждат преимуществено клас-превключена (IgG<sup>+</sup>) памет с висок авидитет. Това обяснява защо хибридният имунитет, възникнал при комбиниране на инфекция и ваксинация, води до по-широкоспектърна защита и устойчивост срещу вирусната еволюция.

Отделен акцент заслужава Т-клетъчният компонент на имунната памет, който се запазва във времето и демонстрира по-ниска податливост към вариации в Spike-протеина. Преболедувалите показват по-широкоспектърни Т-клетъчни отговори, насочени не само срещу Spike, но и срещу вътрешни вирусни протеини. Това разширяване на антигенната специфичност може да допринесе за по-добра защита срещу нови варианти. По този начин, устойчивостта на клетъчния имунитет подсилва ролята му като критичен защитен механизъм при отслабване на хуморалната компонента.

Събраните данни подкрепят необходимостта от прилагане на бустерни дози, особено сред уязвимите групи, както и от бъдещо персонализиране на ваксинационните схеми, отчитащо възраст, предходен имунен статус и история на инфекция. Допълнително, проследяването на функционални параметри – като авидитет, епитопна специфичност и клетъчен фенотип – следва да се включи в бъдещите стратегии за оценка на имунния статус.

В условията на продължаваща вирусна еволюция и поява на варианти с повишена имунна инвазивност, като ХВВ.1.5, ВQ.1.1 и ВА.2.86, се очертава необходимост от ваксини с адаптиран антигенен състав. иРНК платформите позволяват бърза актуализация и вече се прилагат бивалентни ваксини, съдържащи компоненти от оригиналния ухански щам и актуални циркулиращи варианти. Проучванията показват, че подобни адаптирани ваксини възстановяват неутрализиращата активност на серума и предизвикват засилена Т-клетъчна реактивност. В допълнение към бивалентните формули, пан-сарбековирните ваксини, които таргетират консервативни епитопи на S2-домейна, се разглеждат като дългосрочно решение с потенциал за кръстосана защита срещу цялото семейство β-коронавируси. Тези

ваксини целят да ограничат необходимостта от честа актуализация, като стимулират по-широка и устойчива имунна памет.

Въз основа на настоящите данни, бъдещият напредък в имунопрофилактиката срещу SARS-CoV-2 зависи не само от количествените характеристики на имунния отговор, но и от способността за гъвкаво адаптиране на ваксиналните платформи, интегриране на индивидуални фактори и задълбочено разбиране на качествените параметри на имунната памет.

## VII. ИЗВОДИ

1. Имунизацията с двете иРНК ваксини индуцира силен хуморален отговор с пик в ранния период и постепенно понижение до 12-ия месец; при mRNA-1273 се очертава по-устойчив профил в сравнение с BNT162b2, а при преболедувалите – по-голяма индивидуална вариабилност.
2. Неутрализиращата активност следва сходна динамика, като при mRNA-1273 се запазват по-високи и по-хомогенни стойности във времето, докато преболедувалите демонстрират по-устойчив остатъчен отговор в края на периода на наблюдението.
3. Имунизацията с иРНК ваксини индуцира мощен пик на В-клетъчна памет по отношение на антияло-синтезиращите клетки, последван от физиологичния спад между шестия и дванадесетия месец, остатъчната реактивност се запазва при повечето участници поне до една година след контакт с вирусен антиген. Преболедувалите лица демонстрират по-слаб, но по-устойчив отговор.
4. Т-клетъчният отговор достига максимум след пълна имунизация и остава измерим до 12-ия месец, което свидетелства за формиране на дълготрайни паметови Т-лимфоцити, произвеждащи IFN- $\gamma$ .
5. Многопараметърният флоуцитометричен анализ разкрива ранен преходен отговор с активация на наивни и преходни В-клетки, последван от устойчиво нарастване на паметови популации и експанзия на IgG<sup>+</sup> клас-превключени клетки, свидетелстваща за ефективна антигенна стимулация и формиране на трайна хуморална памет.
6. Проследяването на S1-специфичните В-клетъчни субпопулации показва различен времеви профил при ваксинирани и преболедували: mRNA-1273 предизвиква по-стабилен и хомогенен отговор, докато BNT162b2 и преболедувалите лица демонстрират по-изразена динамика и вариабилност, като дълготрайната памет се поддържа основно от IgG<sup>+</sup> клас-превключени В-клетки.

## VIII. ПРИНОСИ

1. Разработен е многопараметърен флоуцитометричен панел за В-клетъчна хетерогенност, позволяващ едновременен детайлен анализ на различни субпопулации В-лимфоцити (CD19<sup>+</sup>, паметови В-клетки, CSMB, IgG<sup>+</sup> CSMB, NCSMB, преходни В-лимфоцити, плазмобласти и плазматични клетки). Панелът е оптимизиран за работа чрез ясно дефинирана гейтинг стратегия, което осигурява висока възпроизводимост и чувствителност.
2. Описани са за пръв път при българска популация S1-специфични паметови В-лимфоцити чрез използване на тетрамери във флоуцитометричния анализ.
3. За първи път в национален мащаб е проведено комплексно и дългосрочно проследяване на хуморалния и В-клетъчния имунен отговор след mRNA ваксинация (BNT162b2 и mRNA-1273) и естествена инфекция със SARS-CoV-2, като е установено, че ваксината mRNA-1273 индуцира по-продължителен и високоспецифичен В-клетъчен отговор в сравнение с BNT162b2.
4. Доказано е, че антиген-специфичните паметови В-лимфоцити се запазват поне до 12 месеца след ваксинация и естествена инфекция, независимо от динамиката на антитялов отговор.
5. Предложен е интегриран лабораторен подход за проследяване на имунния статус, с потенциално приложение както в клиничната практика, така и в научните изследвания. Разработената платформа може да бъде използвана за оценка на популационния имунитет в България и за оптимизиране на ваксинационните стратегии при специфични групи, включително пациенти с първични и вторични имунни дефицити.

## IX. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И НАУЧНИТЕ СЪОБЩЕНИЯ ПО ТЕМАТА НА НАСТОЯЩИЯ ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

1. **Bozhkova M.**, Raycheva R., Petrov S., Dudova D., Kalfova T., Murdjeva M., Taskov H., Shivarov V. Humoral and Memory B Cell Responses Following SARS-CoV-2 Infection and mRNA Vaccination. *Vaccines* 2025, 13(8), 799; <https://doi.org/10.3390/vaccines13080799>
2. **Bozhkova M.**, Gardzheva P., Rangelova V., Taskov H., Murdjeva M. Cutting-edge assessment techniques for B cell immune memory: an overview. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2024;38(1):2345119. <https://doi.org/10.1080/13102818.2024.2345119>
3. **Bozhkova M**, Petrov S, Velyanova T, Stoycheva M, Murdjeva M. Immunological Enigma: A Case Report of COVID-19 Survival in a Patient With Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis C Virus, and Tuberculosis Co-infection. *Cureus*. 2024 Sep 17;16(9):e69588. doi: 10.7759/cureus.69588. PMID: 39421098; PMCID: PMC11484182.

## X. БЛАГОДАРНОСТИ

Изразявам своята най-искрена благодарност към:

- моя научен ръководител доц. д-р Велизар Шиваров, дм за изключителната подкрепа, професионално направление и ценните научни съвети през целия период на подготовка и изпълнение на настоящата дисертация. Неговата отдаденост и експертност бяха ключови за успешното реализиране на труда;
- проф. Ралица Райчева, дм за компетентния и задълбочен статистически анализ на резултатите, както и за конструктивните препоръки, които значително допринесоха за научната стойност на дисертационния труд;
- уважаемото научно жури за отделеното време, задълбочените рецензии и ценните препоръки, които допринесоха за усъвършенстването на настоящия труд.
- ръководството на Медицински университет – Пловдив за предоставената възможност да осъществя изследването и за оказаната подкрепа в хода на докторантурата;
- колегите от Катедрата по медицинска микробиология и имунология – „Проф. д-р Елисей Янев“, в частност на д-р Гергана Ленгерова, за тяхната подкрепа, професионално съдействие и колегиалност, които допринесоха значително за реализирането на проекта;
- Стелиян Петров, Добриня Дудова и Теодора Калфова за тяхната отдаденост, прецизност и принос за извършената работа;
- моето семейство и приятели за тяхната неизчерпаема подкрепа, търпение и вяра в мен. Тяхното присъствие и вдъхновение бяха опората ми през всички етапи на този дълъг и предизвикателен процес.