

*На правах рукописи*

Кашатникова Дарья Алексеевна

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЛАНДШАФТ И ИММУННЫЙ СТАТУС ПРИ  
COVID-19 и ПНЕВМОНИИ**

1.5.7 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва, 2024

Работа выполнена в лаборатории экологической генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва

**Научный руководитель:**

**САЛЬНИКОВА ЛЮБОВЬ ЕФИМОВНА**

доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории экологической генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва

**Официальные оппоненты:**

**ХУСНУТДИНОВА ЭЛЬЗА КАМИЛЕВНА**

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАО, директор Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа

**ХАФИЗОВ КАМИЛЬ ФАРИДОВИЧ**

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией геномных исследований Федерального государственного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.088.01 (Д 002.214.01) в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, г. Москва, ул. Губкина, д. 3, конференц-зал. С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института [www.vigg.ru](http://www.vigg.ru). Контакты: e-mail: [dissovnet@vigg.ru](mailto:dissovnet@vigg.ru), тел.8-499-135-14-31.

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор биологических наук

Горячева И.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность и степень разработанности темы исследования**

Изучение генетических аспектов иммунитета является одним из актуальных направлений науки. Большая часть иммунных функций человека находится под контролем генетики, и только лишь малая часть зависит от факторов окружающей среды (Mangino M. et al., 2017). Нахождение причин многих распространенных иммунных заболеваний и вызываемых ими осложнений затрудняет наличие генетической гетерогенности, при которой клиническое проявление заболевания обусловлено различными генетическими дефектами. Особенно наглядно это показала пандемия инфекции SARS-CoV-2 в 2019 году, распространившаяся по всему миру (Khare K. et al., 2022) и ставшая глобальным кризисом здравоохранения нашего времени. Различия в клиническом проявлении среди схожих по факторам риска групп сравнения дали основания полагать, что генетика оказывает влияние на ход развития COVID-19 (The COVID-19 Host Genetics Initiative, 2020). Инфекции нижних дыхательных путей, включая бактериальную пневмонию, которая также является иммуноопосредованным многофакторным заболеванием, по данным Всемирной организации здравоохранения в 2019 занимали четвертое место среди основных причин смертности в мире (<https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>). С этиологической точки зрения, прогноз и течение пневмонии определяются особенностями возбудителя, факторами окружающей среды и генетическими особенностями человека (Karnaushkina M.A. et al. 2022). Недавние исследования также акцентируют внимание на роли генетики в предрасположенности к инфекционным заболеваниям, тяжести их течения (Lowe A.L. et al., 2021) и варибельности ответа на иммунизацию (Quach H. et al., 2020).

Большинство болезней, связанных со значительным нарушением работы иммунной системы, возникают в раннем возрасте и требуют целенаправленного неотложного лечения. Однако даже при изучении врожденных моногенных иммунологических нарушений могут возникать трудности, так как большинство болезней имеют разнообразные клинические проявления (Notarangelo L.D. et al., 2020). Одними из таких сложных генетических заболеваний являются первичные иммунодефициты (ПИД). Это гетерогенная группа редких врожденных заболеваний, включающая в себя более 450 фенотипов, вызванных нарушением одного или сразу нескольких механизмов иммунной защиты. Информация о генетических и фенотипических особенностях ПИД постоянно обновляется (Tangye S.G. et al. 2022). Варианты лечения таких пациентов отличаются, но основой лечения тяжелых форм иммунодефицитов является донорская трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) (Castagnoli R. et al., 2019). Несмотря на успешность лечения ряда иммунодефицитов, пожизненного приживления ауто-гемопоэтических стволовых клеток не

происходит (Panchal N. et al., 2021), что является довольно сильным ограничением и необходимостью в пожизненной терапии таких пациентов.

Выявление ключевых генов и вариантов, ассоциированных с таким многофакторным заболеванием, как COVID-19, затруднено тем, что иммунная защита организма от инфекций специфична и происходит на нескольких уровнях (Casanova J.L. et al., 2020). Недавно представленная в журнале Cell омнигенная модель, предполагает, что заболевание может быть связано с большим количеством вариантов, находящихся в основных генах, а также периферических генах, которые связаны с основными генами генными сетями (Boyle E. A. et al., 2017; Liu X. et al., 2019). Гены, ассоциированные с заболеванием, как правило, экспрессируются в тех тканях, с заболеваниями которых они связаны. Эти гены также демонстрируют тесную связь в генных сетях (Kolobkov D.S. et al., 2022) и особенно это характерно для генов, ответственных за иммунный ответ (Delavari S. et al., 2021). На основе широкогеномных исследований уже удалось охарактеризовать 23 локуса у людей с COVID-19, которые были ассоциированы с восприимчивостью к инфекции SARS-CoV-2 и с критическим течением заболевания (COVID-19 Host Genetics Initiative, 2022). Особенно подвержены неблагоприятным исходам от инфекции SARS-CoV-2 люди с имеющимися иммунными нарушениями. Например, пациенты с ПИД могут иметь более тяжелое течение COVID-19, по сравнению со здоровыми (Drzymalla E. et al., 2022), однако это характерно не для всех пациентов с ПИД и зависит от конкретного генетического повреждения или формы и стадии ПИД у пациента. Также следует учитывать сопутствующие заболевания, демографические факторы и возраст (Seyed Alinaghi S. et al., 2022). Было показано, что тяжелая форма течения COVID-19 наблюдалась у большого процента здоровых людей с бессимптомным ПИД, который у них не был подтвержден в течение жизни (Gray P.E. et al., 2022). У этих людей были обнаружены генетические дефекты, нарушающие врожденные иммунные функции, опосредованные интерфероном I типа.

Дополнительные исследования в области геномных данных открывают новые перспективы в разработке инновационных методов в диагностике, профилактике и лечении иммунных нарушений и инфекционных заболеваний.

**Цель исследования** - выявить генетические особенности иммуноопосредованных болезней с различными сопутствующими состояниями с помощью секвенирования, молекулярно-генетической диагностики и биоинформатического подхода.

**Задачи исследования:**

1. Провести сбор образцов ДНК пациентов с инфекционными заболеваниями (пневмония и COVID-19).

2. Провести анализ данных секвенирования у пациентов с тяжелой и легкой/умеренной формой течения COVID-19 для оценки эффектов редких потенциально патогенных генетических вариантов (HI (high impact) вариантов) на уровне всего экзома и в различных наборах генов, включая гены первичных иммунодефицитов (ПИД).

3. Охарактеризовать патогенный ландшафт генов, ассоциированных с ПИД, с помощью «генотип-фенотип» баз данных ClinVar и HGMD<sup>®</sup> и ресурса dbSNP, для сравнения представленности HI вариантов между базами данных и экзомными данными пациентов с COVID-19.

4. Провести *in silico* сравнение профилей экспрессии генов ПИД в субпопуляциях клеток крови человека по отношению к другим генам.

5. Рассмотреть гены ПИД и их функциональные гены-партнеры в качестве генов, ассоциированных с развитием тяжелой формы течения COVID-19, используя для анализа результаты полноэкзомного секвенирования молодых пациентов с легкой/умеренной и тяжелой формой COVID-19.

6. Охарактеризовать иммунный статус молодых пациентов с COVID-19 с помощью тестирования косвенных маркеров иммунного ответа, основанного на Т- и В-клеточной рекомбинации (TREC и KREC), и соотнести уровни TREC и KREC с числом редких потенциально патогенных вариантов на уровне всего экзома и в генах ПИД у пациентов с тяжелой и легкой/умеренной формами течения COVID-19.

7. Оценить диагностический потенциал TREC и KREC в других группах пациентов, включая пациентов с бактериальной пневмонией.

### **Научная новизна**

Оценен совокупный вклад редких потенциально патогенных вариантов (HI вариантов) в развитие тяжелого течения COVID-19. Впервые гены, ассоциирующиеся с ПИД, были выявлены ключевыми генами при тяжелом течении COVID-19. Определены наибольшие эффекты совокупного вклада редких потенциально патогенных вариантов (HI вариантов) в основных генах и в совместно связанных функциональных генах-партнерах, ассоциированных с ПИД. У пациентов с тяжелой формой течения COVID-19 обнаружены сниженные уровни TREC при повышенном числе редких потенциально патогенных вариантов. Показана высокая диагностическая эффективность учета уровней TREC/KREC у пациентов с тяжелой формой COVID-19 и бактериальной пневмонией.

### **Теоретическая значимость**

Результаты исследования подтверждают омнигенную гипотезу, согласно которой развитие признаков определяется сетью взаимосвязанных генов,

которые вносят вклад в развитие признака в зависимости от их близости к рассматриваемому фенотипу. В соответствии с данной гипотезой, впервые была показана значимость для тяжелого COVID-19 генов ПИД как коровых генов и их ближайших генов-партнеров из сетей межбелковых взаимодействий как околочоровых периферических генов.

### **Практическая значимость**

В данной работе впервые продемонстрирован высокий диагностический потенциал измерения TREC и KREC у пациентов с тяжелыми вирусными и бактериальными инфекциями. Представленный в работе количественный метод определения уровней TREC и KREC может быть использован для прогнозирования групп риска по тяжелому течению и неблагоприятному исходу у пациентов, поступающих в клинику с внебольничной инфекцией, или у пациентов с риском развития внутрибольничной инфекции.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Генетический груз редких потенциально патогенных вариантов (HI вариантов) может быть фактором риска развития более тяжелой формы COVID-19.
2. У молодых пациентов с тяжелой формой COVID-19 наблюдается избыток редких потенциально патогенных вариантов в генах ПИД и их функциональных генах-партнерах, по сравнению с пациентами с легкой/умеренной формой COVID-19.
3. Диагностика иммунного статуса у молодых пациентов с инфекционными заболеваниями (COVID-19 и бактериальная пневмония) с помощью метода TREC и KREC эффективна при оценке вероятности осложненного течения заболевания.

### **Личный вклад соискателя**

Соискателем проанализирована научная литература по исследуемой проблеме, проведены экспериментальные исследования по иммунному статусу у пациентов с COVID-19 и пневмонией, проведена загрузка и анализ данных из генетических онлайн-ресурсов, выполнен анализ и подготовка к публикации экспериментальных данных и данных из биоинформатических ресурсов.

### **Степень достоверности и апробации результатов**

Достоверность результатов работы подтверждается использованием современных экспериментальных и вычислительных методов, используемых при молекулярно-генетических исследованиях и функциональной аннотации геномов. Обсуждение результатов проведено с учетом современных

исследований, опубликованных в области исследований генетических аспектов иммунных особенностей человека, а также особенностей интерпретации функций генов и генетических вариантов. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим материалом.

Основные результаты диссертационной работы были представлены в виде устных докладов на конференциях: конференция с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» (10-13 ноября 2021-2023 г., Москва), научно-практическая конференция «Медицинская наука в век цифровой трансформации» (10 декабря 2021 г., Курск), научная конференции с международным участием, посвященная 50-летию лаборатории популяционной генетики им. Ю. П. Алтухова ИОГен (11-14 октября 2022 г., Москва), итоговая научно-практическая конференция ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА (20-21 декабря 2022 г., Москва). Стеновые доклады были представлены на международной конференции «The 20th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiency (ESID)» (12-15 октября 2022 г., Gothenburg) и на итоговой научно-практической конференции ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА (19-20 декабря 2023 г., Москва).

### **Публикации по результатам исследования**

Результаты исследования представлены в 14 научных публикациях, в том числе в 6 статьях в ведущих научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science и рекомендованных ВАК для защиты диссертаций.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 131 странице машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, благодарности, список литературы и приложение. Иллюстративный материал диссертации представлен в виде 13 таблиц и 28 рисунков. Список литературы включает 260 литературных источников, из которых 255 источников зарубежной литературы.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

Обзор литературы состоит из пяти частей. Первая часть посвящена особенностям определения редких и распространенных заболеваний. Вторая

часть описывает сложную в определении группу редких врожденных и гетерогенных заболеваний – первичных иммунодефицитов (ПИД). Третья часть включает описание генетических и иммунологических особенностей таких инфекционных заболеваний как COVID-19 и пневмония. Четвертая часть содержит информацию о генетических перестройках рецепторов Т- и В-лимфоцитов. Пятая часть посвящена описанию способов аннотирования и предсказания функциональных особенностей генов и вариантов, ассоциированных с заболеваниями.

## **Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Демографические и клинические данные пациентов**

Данное исследование включало 86 пациентов с диагнозом COVID-19 в возрасте от 18 до 96 лет, находившиеся на стационарном лечении в Московском областном научно-исследовательском клиническом институте им. М.Ф. Владимирского (МОНКИ), Московском клиническом центре инфекционных болезней (МКЦИБ) «Вороновское» и Городской клинической больнице Департамента здравоохранения Москвы имени В.П. Демикова с 27 апреля по 28 ноября 2020 года. В исследование включались не вакцинированные пациенты обоих полов. При поступлении всем пациентам был проведен ПЦР-тест на вирус SARS-CoV-2 из мазков носоглотки. Диагноз и тяжесть течения заболевания были установлены в соответствии с международными рекомендациями по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (COVID-19) (World Health Organization, 2020) и «Временными клиническими рекомендациями по профилактике, диагностике и лечению COVID-19 – 2020» Министерства здравоохранения Российской Федерации (BMP\_COVID-19\_V17.pdf (minzdrav.gov.ru)).

Отдельно исследовалась группа из 433 пациентов в возрасте от 18 до 40 лет, из которых 170 контрольных пациентов и 263 пациентов имели внебольничную (ВП) или нозокомиальную пневмонию (НП), госпитализированных в клинические стационары Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии в Москве с января 2008 г. по декабрь 2019 г. Диагноз ВП устанавливался на основании наличия острых симптомов инфекции нижних дыхательных путей, подтвержденных клиническими данными. Диагноз НП был поставлен на основании нового инфильтрата на рентгенограмме грудной клетки при наличии клинико-лабораторных данных. Тяжесть состояния пациента оценивали с использованием шкал оценки острого состояния физиологии и хронического состояния здоровья (APACHE) (Knaus W.A. et al., 1985), которые рассчитывали в течение 24 ч после поступления пациента. Тяжесть



пневмонии оценивали с использованием индекса тяжести пневмонии (PSI) (Fine M.J. et al., 1997).

Для пациентов с COVID-19 и пневмонией диагноз сепсиса определялся в соответствии с версией рекомендаций Surviving Sepsis Campaign 2021 года (Evans L. et al., 2021). Наличие острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) и определение степени его тяжести проводили в соответствии с Берлинским определением (ARDS Definition Task Force et al., 2012).

### **Выделение ДНК пациентов с COVID-19 и секвенирование экзонов**

ДНК выделяли из крови с использованием набора DNA blood mini (Qiagen). 50 образцов были секвенированы в компании Геномед (Москва, Россия). ДНК фрагментировали и штрих-кодировали с использованием набора Swift 2S® Turbo DNA Library Kit. Обогащение проводили с использованием Twist Human Core Exome. Секвенирование осуществляли на платформе Illumina HiSeq X Ten с чтением парных концов длиной 150 п.н. 36 образцов были секвенированы в «Биобанк Центре», научно-исследовательском центре Санкт-Петербургского государственного университета (Санкт-Петербург, Россия). Образцы были подготовлены для секвенирования с помощью набора Illumina TruSeq DNA Exome и секвенированы на Illumina HiSeq2500 и Illumina HiSeq4000 - платформы с чтением парных концов длиной 90 п.н.

Данные секвенирования 86 образцов анализировали в формате FASTQ. Показания были приведены в соответствии с GRCh38.p13 с использованием инструмента выравнивания Burrows-Wheeler Alignment (BWA MEM версии 0.6). Контроль качества результатов секвенирования, выполненный в программе FastQC показал высокое качество показаний и наличие незначительного количества адаптерных последовательностей. Генетические варианты должны были иметь как минимум 10-кратное покрытие. Формирование списков вариантов производилось с помощью HaplotypeCaller пакета GATK. Фильтрацию вариантов осуществляли с помощью программы VariantFiltration пакета GATK.

### **Подготовка наборов генов**

Список генов ПИД был сформирован на основе обновленной классификации Комитета экспертов Международного союза иммунологических обществ (IUIS) 2022 года (Tangye S.G. et al., 2022). Наборы генов-партнеров для ПИД генов были сформированы с помощью базы данных STRING 11.5 версии. База данных GENCODE была использована для отбора переаннотированных и обновленных генов, ассоциирующихся с COVID-19. Иммунные тканеспецифические гены взяты

из работы (Kolobkov D.S. et al., 2022), которые получали с помощью анализа обогащения наборов генов, используя пакет TissueEnrich R (Jain A. et al., 2019). Наборы генов, связанных с заболеваниями человека, поражающими определенные органы и системы, были взяты из работы Kolobkov D.S. et al. (2022), набор эссенциальных генов из Dickinson M. E. et al. (2016), гены цитокинов из Salnikova L. E. et al. (2020).

### **Аннотация генов и вариантов**

Аннотацию вариантов проводили по программам SnpSift (Cingolani P. et al., 2012a), SnpEff (Cingolani P. et al., 2012b) и FAVOR (Zhou H. et al., 2023) с использованием баз данных dbSNP, ClinVar и популяционных баз данных GnomAD (Karczewski K.J. et al., 2020), 1000G (Консорциум проекта 1000 геномов, 2015) и TopMed (Taliun D. et al., 2021). HI (high impact) варианты были определены при помощи ресурса Ensembl VEP. Данные Haploinsufficiency Predictions Version 3 из ресурса DECIPHER использовались для оценки вероятностной гаплонедостаточности генов. Для создания наборов генов, нетолерантных к LoF (loss of function) вариантам и миссенс-вариантам, использовались рекомендуемые метрики  $pLI > 0,9$  и  $Z \text{ score} > 3,09$ , соответственно, которые были определены на основе метрик из gnomAD v2.1. Частоты аллелей были загружены с веб-сайта GnomAD версии v.2.1.1 (hg19) и v.3.1 (hg38), а также ExAC (hg19). Были включены только те варианты GnomAD, которые прошли проверку качества. Преобразование версии генома человека hg19 в hg38 было реализовано с помощью Lift Genome Annotations. Миссенс-варианты были определены как потенциально патогенные с использованием инструмента изучения редких экзомных вариантов (REVEL) с рекомендуемым порогом  $> 0,5$  для классификации варианта как «вредного» (Ioannidis N.M. et al., 2016). Анализ был сосредоточен на редких вариантах, которые были отфильтрованы в соответствии с частотами альтернативных аллелей (AF) в базе данных геномов (GnomAD), базах данных 1000G и TopMed. Варианты были разделены по AF на три основных группы - бины: с  $AF \leq 0,001$  до  $\leq 0,01$ , с  $AF < 0,001$  и без данных об AF в популяционных ресурсах, т.е. в любой из рассматриваемых баз данных.

### **Создание генетических конструкций TREC, KREC и человеческого альбумина**

Ген альбумина человека, последовательность T-клеточного рецептора  $\delta\text{REC}-\psi\text{Ja}$  и каппа-вырезаемую последовательность (делецию) перестройки B-клеточного рецептора амплифицировали методом ПЦР из ДНК, полученной из периферической крови здорового донора, и отдельно клонировали в вектор pBlueScript SK(II-) (Addgene). Последовательность T-

клеточного рецептора (TREC) лигировали с сайтом рестрикции SpeI, делецию каппа- перестройки В-клеточного рецептора (KREC) лигировали по сайтам рестрикции HindIII и SpeI. Полученные плазмиды ДНК трансформировали в компетентные клетки *E. coli*. Эффективность тестировали на серии разведений плазмидной конструкции.

### **Выделение ДНК пациентов с бактериальной пневмонией и количественная мультиплексная ПЦР Real Time**

Образцы крови, взятые при поступлении пациента, использовали для измерения уровней TREC/KREC. ДНК выделяли из периферической крови с последующей экстракцией ДНК изопропанолом. Образец смеси (20 мкл), содержащий ДНК, праймеры для плазмид TREC, KREC и гена альбумина, меченые зонды, буфер, dNTP и полимеразу, амплифицировали в термоциклере CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). TREC, KREC и копии гена альбумина рассчитывали путем экстраполяции соответствующих количеств образца из стандартной кривой, полученной из серийных разведений ( $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  и 10 (50 для KREC)) плазмидной ДНК, содержащей  $\delta$ TREC- $\psi$ Ja Т-клеточный рецептор, каппа-делетирующую вставку, альбумин человека, которые амплифицировали в одном ПЦР-планшете. Количество TREC/KREC на 100000 клеток рассчитывали по следующей формуле:  $(\text{Количество копий TREC(KREC)})/((\text{Количество копий гена альбумина})/2) \times 100000$ .

### **Базы данных и ресурсы**

ClinVar — это свободный общедоступный ресурс ассоциаций вариантов с фенотипами человека, поддерживаемый Национальным институтом здравоохранения (NIH). Он включает варианты из OMIM, GeneReviews, некоторых локус-специфичных баз данных (LSDB), участвующих испытательных лабораторий и других отправителей (Landrum et al., 2020). База данных мутаций генов человека (HGMD<sup>®</sup>) содержит данные о связанных с заболеванием генетических вариантах, опубликованных в рецензируемой литературе (Stenson et al., 2020). Для детального и более глубокого изучения патогенности генов ПИД, данные по этим генам, представленные в ClinVar и HGMD<sup>®</sup>, были объединены на основе герминальных вариантов.

Все генетические варианты в генах ПИД были загружены из dbSNP 154 версии. Мультиаллельные варианты dbSNP были разделены на двуаллельные варианты, поскольку разные вариантные аллели могут различаться по своим функциональным последствиям. Варианты без информации об аллель-специфических последствиях были удалены.

Данные по профилям экспрессии ПИД генов в тканях были взяты с сайта Атласа белков человека (HPA). Было загружено и проанализировано два набора данных по уровням экспрессии генов в субпопуляциях клеток крови человека: HPA (n=19) и Monaco (n=30). Набор HPA включал 19670 генов, набор Monaco - 18816 генов. Для проведения анализа обогащения генов, специфичных для клеток крови, использовался пакет TissueEnrich R (Jain A. et al., 2019).

### **Статистическая обработка данных**

Статистический анализ и визуализация данных выполнялись с использованием программного пакета R (RStudio 1.4, <https://www.rstudio.com>), по состоянию на 10 июня 2022 г. и Excel 2023. Ассоциативный анализ наборов данных полноэкзомного секвенирования был проведен с использованием двустороннего теста Кокрана-Мантела-Хензеля, который выдает комбинированное значение *p* value и отношение шансов (ОШ). Сравнительный межгрупповой анализ проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Для категориальных переменных использовался точный двусторонний критерий Фишера или отношение правдоподобия  $\chi^2$  для двух и более независимых групп сравнения. Для сравнения двух или более независимых выборок одинакового или разного размера использовали критерий Крускала-Уоллиса, а также его параметрический эквивалент – односторонний дисперсионный анализ (ANOVA). Для измерения силы и направления связи между двумя переменными использовался коэффициент непараметрической корреляции Спирмена. Уровень значимости, при котором отвергалась нулевая гипотеза об отсутствии различий между исследуемыми группами, был установлен равным 0,05. Поправка Бонферрони или метод Бенджамини-Хохберга использовались для корректировки множественных сравнений. ROC-анализ (Receiver Operating Characteristic) использовался для оценки качества моделей бинарной классификации (DeLong E.R. et al., 1988).

## **Глава 3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **Результаты полноэкзомного секвенирования пациентов с COVID-19**

При проведении полноэкзомного секвенирования 86 пациентов с COVID-19 было определено 2504482 генетических варианта. После фильтрации осталось 2419486 вариантов; количество вариантов на человека составило  $28133,56 \pm 914,86$ . Количество уникальных вариантов составило 116932, и они были расположены в 16816 различных генах. Не было

выявлено значимых ассоциаций в масштабах всего экзома с тяжестью COVID-19 (рис.1).

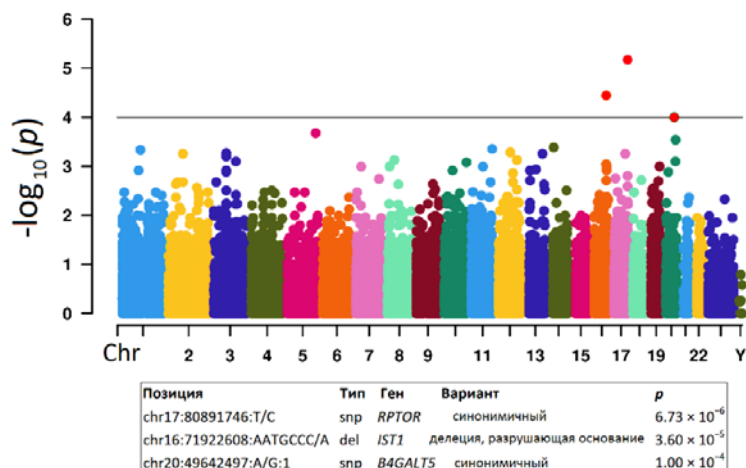


Рис. 1. Манхеттен-плот распределения частот вариантов по хромосомам. (В таблице представлены варианты, превышающие порог  $1,0 \times 10^{-4}$ , порог значимости с учетом поправки Бонферрони -  $4,28 \times 10^{-7}$ ). График был построен с использованием <https://www.bioinformatics.com.cn/en>

Генетические варианты всей выборки были распределены по бинам аллельных частот (AF), согласно популяционным данным, и различным функциональным последствиям. На рис. 2 показано, что наибольшее количество вариантов находилось в бине  $AF > 0,01$  (47%), варианты в бинах  $0,001 \leq AF \leq 0,01$ ,  $AF < 0,001$  и без данных AF составили 17%, 19% и 16%, соответственно. Наиболее многочисленными были миссенс варианты, что составило 51% от всех вариантов, за ними следовали синонимичные варианты (38%). Общее количество НИ вариантов (потенциально патогенные варианты, вызывающие сдвиг рамки считывания, преждевременное образование стоп-кодонов, мутации акцепторного и донорного сайтов сплайсинга, мутации иницирующих и терминальных кодонов) составило 18896, количество уникальных вариантов НИ составило 5044. Наибольшая доля НИ вариантов была обнаружена в бине с отсутствующими данными по аллельной частоте (63%). Количество вариантов НИ на одного индивидуума составило  $217,39 \pm 100,51$ , что согласуется с литературными данными, согласно которым количество НИ вариантов на одного индивидуума может варьироваться от 100 до 800 вариантов (MacArthur M.G. et al., 2012; Консорциум проекта 1000 геномов, 2015; Johnston J.J. et al., 2015; Lek M. et al., 2016).

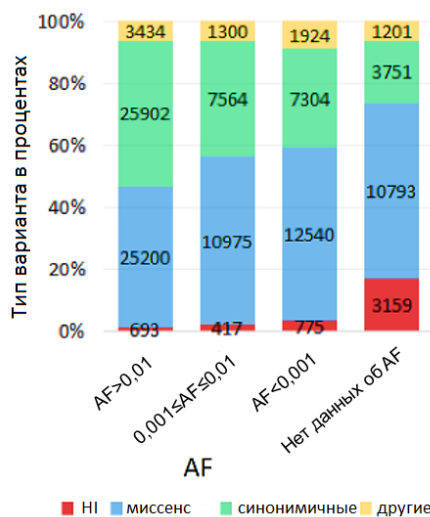


Рис. 2. Распределение вариантов по бинам аллельных частот (AF) в зависимости от функциональных последствий

Принципиальный компонентный анализ (PCA) показал, что выборка из 86 пациентов была представлена европеоидами, за исключением 7 пациентов. При повторном анализе аллельных частот, исключая 7 не европеоидных пациентов, все значимые результаты сохранились.

### Оценка совокупного эффекта редких и патогенных/потенциально патогенных вариантов у пациентов с тяжелой (n=57) и легкой/умеренной (n=29) формой течения COVID-19

В данном исследовании изучался ландшафт редких генетических вариантов при различной степени тяжести заболевания с учетом омнигенной модели, при которой сложные признаки формируются при совместном действии большого числа генетических вариантов, располагающихся по всему геному.

На первом этапе сравнивалось бремя таких генетических вариантов как НИ, миссенс и синонимичных у пациентов с тяжелой и легкой/умеренной формой течения COVID-19 (рис. 3А). У пациентов с тяжелой формой COVID-19 наблюдалось значительно большее количество вариантов, относящихся к бину AF < 0,001 и с отсутствующими данными о AF (по AF data), и при этом значимого эффекта для редких вариантов в бине  $0,001 \leq AF \leq 0,01$  не наблюдалось. Большой эффект наблюдался среди НИ вариантов, по сравнению с миссенс-вариантами, и наименьший эффект был среди синонимичных вариантов. Максимальный эффект наблюдался для НИ вариантов с отсутствующими данными о AF (по AF data), которых было в 3,5 раза больше на человека при тяжелой форме по сравнению с пациентами с нетяжелой формой COVID-19. Варианты в бинах AF < 0,001 и с

отсутствующими данными о AF (no AF data), были объединены в одну группу под названием «редкие варианты», так как для них наблюдались значимые эффекты. Далее было проведено сравнение нагрузки редких вариантов между двумя наборами генов, нетолерантных к потенциально патогенным вариантам: генов с высокой вероятностью нетолерантности к потере функции (оценка  $pLI > 0,9$ ), и генов, нетолерантных к миссенс-мутациям (оценка  $Z > 3,09$ ) (рис 3Б). Чем более нетерпимы гены к вариантам, вызывающим потерю их функции, и чем более патогенными являются эти варианты (в ряду от HI вариантов до синонимичных), тем больший эффект наблюдается при сравнении групп пациентов с различным течением COVID-19.

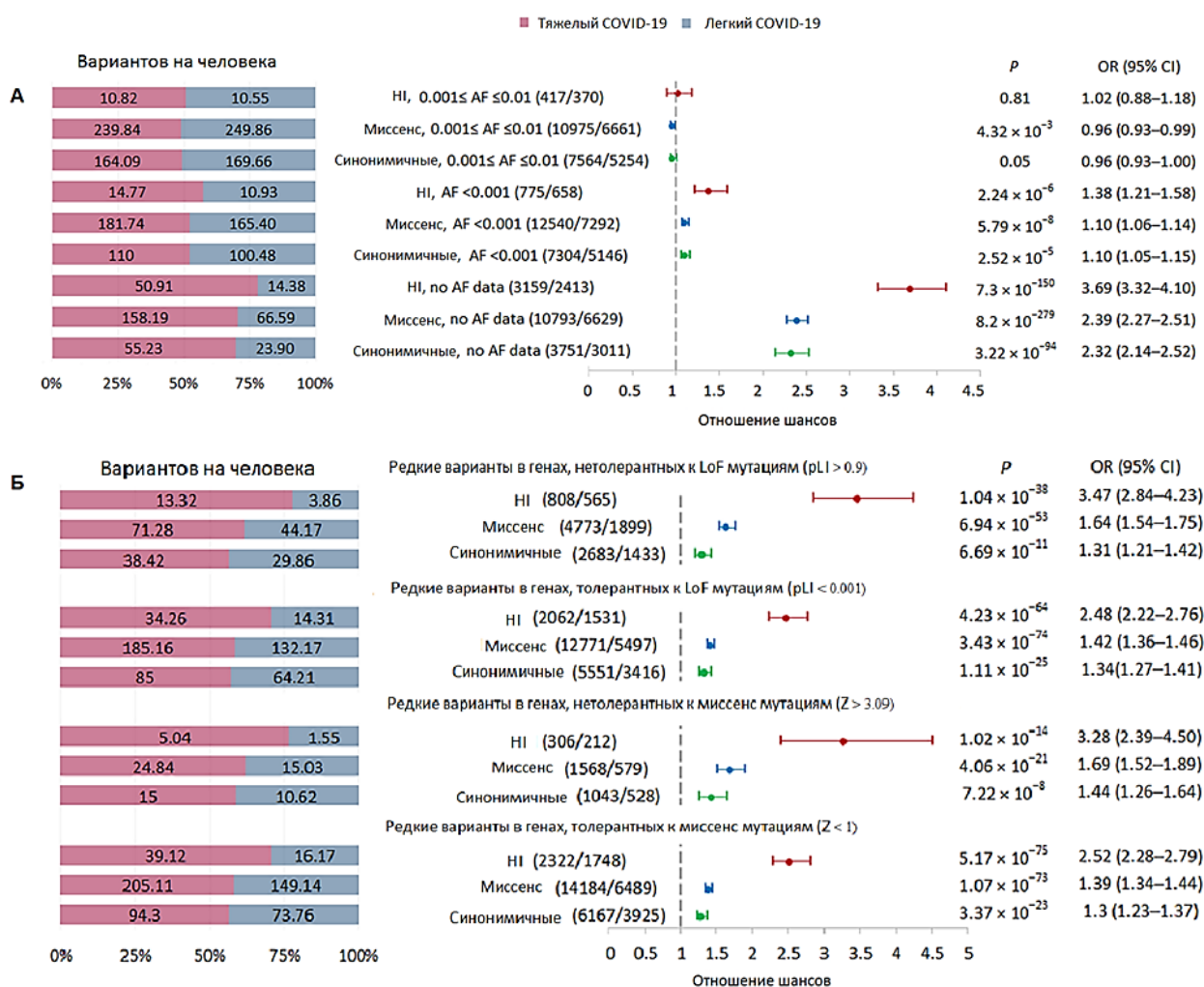


Рис. 3. Распределение генетических вариантов у пациентов с COVID-19. (В скобках указано количество вариантов/генов. Порог значения  $p$  для множественных сравнений с учетом всех протестированных сравнений составляет  $5,21 \times 10^{-4}$ )

Далее сравнивалась нагрузка только редких НИ вариантов в различных наборах генов. Наибольший эффект наблюдался для генов ПИД (n=71), за которыми следовали эссенциальные гены (n=562) (рис 4). В этих двух наборах генов размер эффекта был выше, чем во всем наборе генов с редкими НИ вариантами (n=2926). Два других набора генов, ассоциированных с сетью цитокинов (n=31), и обновленный список генов, связанных с инфекцией SARS-CoV-2 и/или заболеванием COVID-19 из проекта GENCODE (n=48), не показали значимого обогащения у пациентов с тяжелой формой COVID-19, возможно, из-за слишком маленького размера выборки. При сравнении количества редких НИ вариантов в наборах генов, связанных с конкретными системными заболеваниями, самый высокий размер эффекта наблюдался в наборе генов, связанных с иммунными заболеваниями (n=297), которые включали 69 генов ПИД, составляющих 23,2% от всех иммунных генов. Далее следовал набор генов, ассоциирующихся с респираторными заболеваниями (n=386), за которым следовал набор генов заболеваний нервной системы (n=752). Самый слабый эффект был обнаружен для набора генов, ассоциированных с опухолевыми заболеваниями (n=676). Редких НИ вариантов было в 2,9, 3,9 и 2,8 раза больше на человека при тяжелой форме течения COVID-19, по сравнению с пациентами с легкой/умеренной формой течения COVID-19 для наборов - генов болезней, генов иммунных заболеваний и генов опухолевых заболеваний, соответственно.

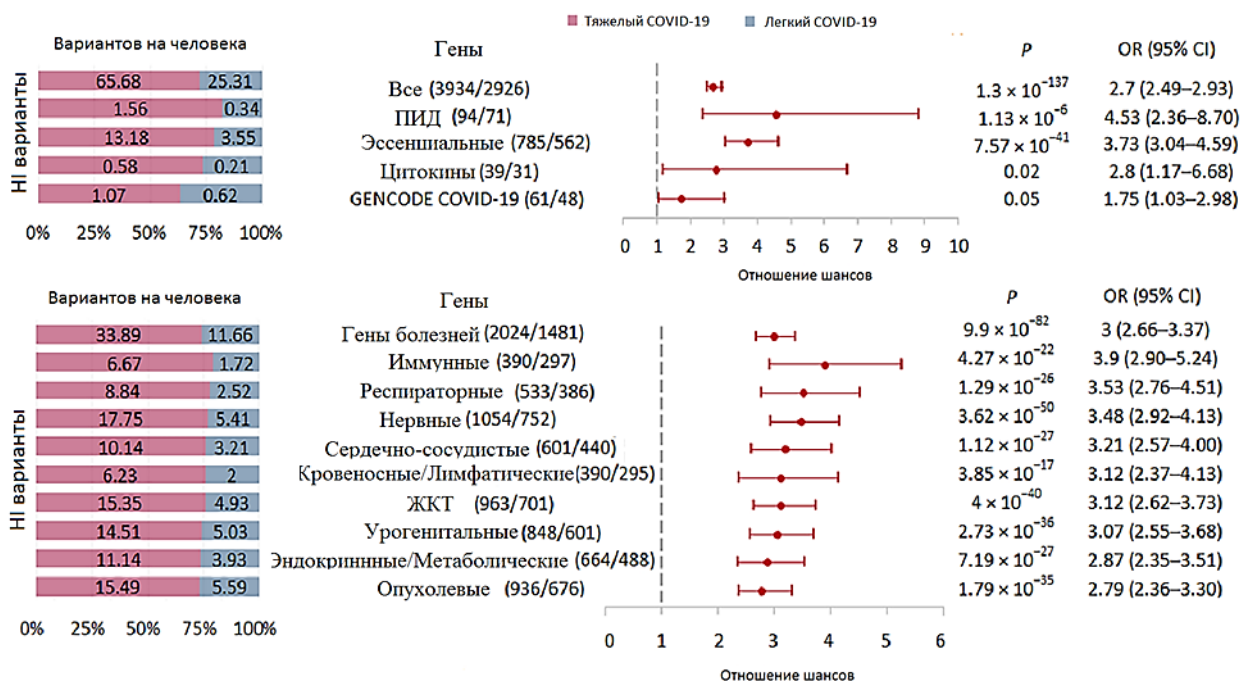


Рис. 4. Распределение НИ вариантов в специфических наборах генов и генов болезней у пациентов с COVID-19. (В скобках указано количество вариантов/генов. Порог значения  $p$  для множественных сравнений с учетом всех протестированных сравнений составляет  $5,21 \times 10^{-4}$ )



## Изучение генов ПИД с помощью «генотип-фенотип» баз данных ClinVar и HGMD®, ресурса dbSNP и транскриптомных данных базы HPA

Известно, что люди с ПИД, редкими наследственными дефектами иммунной системы, более подвержены инфекционным заболеваниям (McCusker C. et al., 2018). Также стало известно, что тяжелая форма течения COVID-19 наблюдалась у большого процента здоровых людей с бессимптомным ПИД, который у них не был подтвержден в течение жизни (Gray P.E. et al., 2022). У этих людей были обнаружены генетические дефекты, нарушающие врожденные иммунные функции, опосредованные интерфероном I типа. Другой обзор также подтвердил, что пациенты с COVID-19 и подтвержденным ПИД имели более высокий уровень госпитализации и смертности (Drzymalla E. et al., 2022). Так как группа заболеваний, относящихся к ПИД, одна из самых сложных в определении и характеризуется довольно широким спектром фенотипов (Bousfha A. et al., 2020; Tangye S.G. et al., 2020), был изучен патогенный ландшафт ассоциированных генов. Список из 403 уникальных генов, ассоциированных с ПИД, был взят из отчета Международного союза иммунологических сообществ (IUIS) и рассмотрен в контексте «генотип-фенотип» баз данных ClinVar и HGMD®.

Результаты, полученные из баз данных, были объединены в одну (ClinVar/HGMD) для более детального изучения патогенных вариантов в ПИД генах (рис. 5).

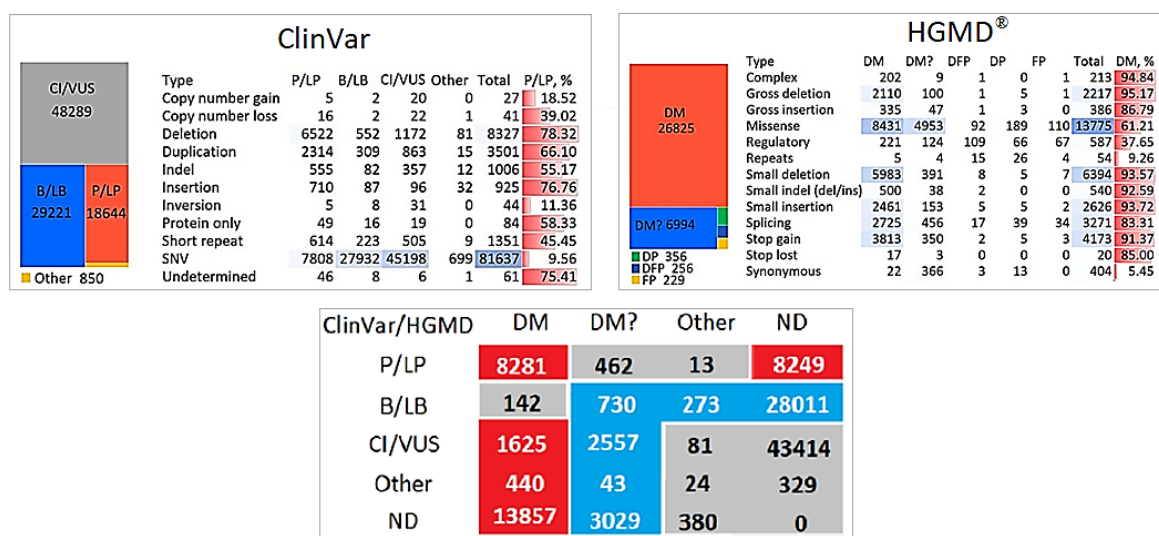


Рис. 5. Классификация вариантов при объединении баз ClinVar и HGMD®

(P/LP – патогенный/вероятно патогенный вариант; B/LB – доброкачественный/вероятно доброкачественный вариант; CI/VUS –

противоречивые данные/вариант неопределенного значения; DM - мутация, вызывающая заболевание; DM? – мутация, вероятно вызывающая заболевание; DP – полиморфизм, ассоциированный с заболеванием; DFP - полиморфизм, ассоциированный с заболеванием и с дополнительными функциональными особенностями; FP – *in vivo/in vitro* функциональный полиморфизм; Total – общее количество; Other – другие; ND – нет данных).

Неполное соответствие вариантов в базах ClinVar и HGMD<sup>®</sup> объясняется различным представлением данных и то, каким образом клинические данные попадают к ним. База ClinVar предоставляет данные всех фенотипов по каждому варианту, тогда как HGMD<sup>®</sup> записывает первый фенотип по варианту, а все остальные фенотипы доступны только через дополнительные параметры. В ClinVar было доступно 2527 генотип-фенотип ассоциаций и 157287 вариант-фенотип ассоциаций (среди них 32641 P/LP), однако после удаления записей с фенотипами, помеченными как «не предоставлено», «не указано» и «-», сохранилось 1829 генотип-фенотип ассоциаций и 111288 вариант-фенотип ассоциаций (27453 P/LP). База HGMD<sup>®</sup> включала данные о 3875 генотип-фенотип ассоциаций и 34743 вариант-фенотип ассоциациях (из них 26825 - DM). Таким образом, в HGMD<sup>®</sup> количество фенотипов для генов ПИД было в 2,1 раза больше, хотя количество вариантов было в 2,8 раза меньше, чем в ClinVar. Это может быть связано не только с большей представленностью фенотипов в HGMD<sup>®</sup>, но также с разными уровнями детализации фенотипических дескрипторов в ClinVar и HGMD<sup>®</sup>.

С помощью ресурса dbSNP было загружено 5415794 генетических варианта генов ПИД. Среди 111940 вариантов ClinVar/HGMD<sup>®</sup> с вариантами из ресурса dbSNP совпало 79807 (71,3%) вариантов. Чтобы сравнить представленность потенциально патогенных вариантов (HI вариантов) в генах ПИД в базе ClinVar/HGMD и в базе dbSNP, дополнительно использовался ресурс Ensembl для *in silico* выявления HI вариантов. Во всем пуле dbSNP вариантов было выявлено 38291 HI вариант, среди них 25500 HI вариантов (66,6%) отсутствовали в ClinVar/HGMD (рис. 6).

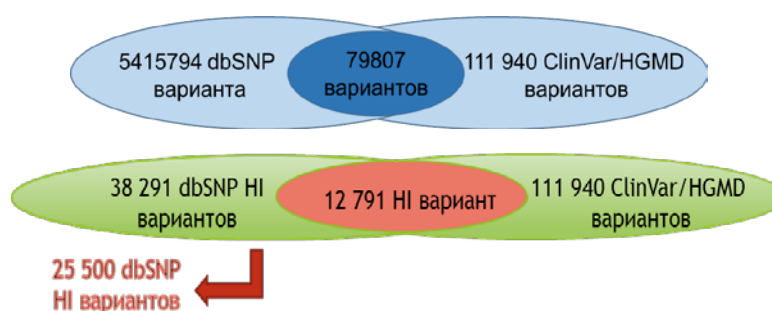


Рис. 6. Совпадение генетических вариантов между базой ClinVar/HGMD и ресурсом dbSNP

Выявленные НИ варианты в генах ПИД были сравнены с полученными данными по редким НИ вариантам в генах ПИД у 86 пациентов с COVID-19. 7 из 105 редких НИ вариантов (6,66%) у 86 пациентов с COVID-19 совпало с вариантами в объединенной базе данных ClinVar/HGMD. Это может объясняться тем, что вклад одиночных патогенных вариантов в заболевание может компенсироваться на длительном и сложном пути реализации генетических эффектов на фенотипическом уровне. При этом наличие нескольких ассоциированных с заболеванием вариантов в генных сетях может значительно ослаблять компенсаторные механизмы. Не вошедшие 93,3% редких потенциально патогенных варианта, выявленных при секвенировании экзома в генах ПИД у пациентов с COVID-19, можно считать ранее не обнаруженными.

Транскриптомный профиль ПИД генов в субпопуляциях клеток крови человека показал более высокий уровень экспрессии ПИД генов по сравнению с остальными генами. В таблице 1 указаны субпопуляции клеток крови человека из базы данных Monaco с наиболее значимой разницей по экспрессии между генами ПИД и всеми остальными генами.

Табл.1. Значимости (*p value*) для уровней экспрессии ПИД генов по сравнению со всеми остальными генами в субпопуляциях клеток крови человека

<b>Субпопуляции клеток крови человека</b>	<b>*<i>P value</i></b>
Эффекторные CD8 Т-клетки памяти	$1,419 \times 10^{-7}$
Классические моноциты	$8,172 \times 10^{-7}$
Центральные CD8 Т-клетки памяти	$3,009 \times 10^{-6}$
Базофилы	$6,16 \times 10^{-6}$
Промежуточные моноциты	$6,528 \times 10^{-9}$
Истощенные В-клетки памяти	$2,772 \times 10^{-9}$
CD4 Т-клетки памяти Th2	$1,681 \times 10^{-6}$
CD4 Т-клетки памяти Th17	$2,523 \times 10^{-8}$
Миелоидные дендритные клетки	$5,762 \times 10^{-8}$
Непереключенные В-клетки памяти	$6,319 \times 10^{-8}$
Неклассические моноциты	$2,264 \times 10^{-9}$
Нейтрофилы	$2,953 \times 10^{-13}$
Терминальные эффекторные CD8 Т-клетки памяти	$5,312 \times 10^{-11}$
Терминальные эффекторные CD4 Т-клетки памяти	$2,551 \times 10^{-7}$
Переключенные В-клетки памяти	$1,282 \times 10^{-9}$

\*Порог значения *p* для множественных сравнений с учетом всех протестированных сравнений составляет 0,0016.

### **Гены ПИД как ключевые гены при COVID-19**

Учитывая наибольший вклад среди редких НИ вариантов в генах ПИД в развитие тяжелого течения COVID-19, гены ПИД были предложены в качестве коровых (основных) генов, ассоциирующихся с тяжелой формой

COVID-19. В контексте омнигенной модели, основные ПИД гены были рассмотрены совместно с их близкими периферическими генами, связанными с основными генами ПИД по сети белков. Так как эффект НИ вариантов при тяжелой форме COVID-19 был самым высоким (выборка из 86 пациентов с COVID-19), акцент был сделан именно на эти варианты во всех наборах сравнения.

В данный анализ были включены 20 молодых пациентов с COVID-19 в возрасте  $\leq 45$  лет (из выборки 86 пациентов с COVID-19). Наборы генов-партнеров для ПИД генов были сформированы с помощью базы данных STRING 11.5 версии. Было сформировано три набора: гены ПИД (I), функциональные партнеры ПИД генов с оценками комбинированных взаимодействий (combined interaction score)  $\geq 0,9$  (II) и от 0,4 до 0,89 (III). Данная оценка показывает, насколько предполагаемая связь между белками является биологически значимой от 0 до 1, где 1 самая высокая взаимосвязь. Полученные наборы включали 450 генов ПИД (I), 4580 генов (II) и 6445 генов (III), которые в значительной степени пересекались, поэтому при последующем анализе гены ПИД были исключены из 2 набора, а также гены ПИД и гены 2 набора из 3 набора. Гены в 3-х наборах были сформированы по группам биологической значимости: гаплонедостаточные, эссенциальные, нетолерантные к LoF-мутациям, иммунные тканеспецифические. Так как размер выборки был небольшим и общее количество редких НИ вариантов в генах ПИД было незначительным (8 вариантов в 7 генах), анализ основывался сначала на сравнении суммарного количества редких НИ вариантов среди всех генов без разделения на конкретные группы, а затем в наборах генов (I+II, I+II+III) между пациентами с тяжелой формой и легкой/умеренной формой течения COVID-19 (рис. 7) (порог для  $p$ , с учетом множественных сравнений равен 0,0025).

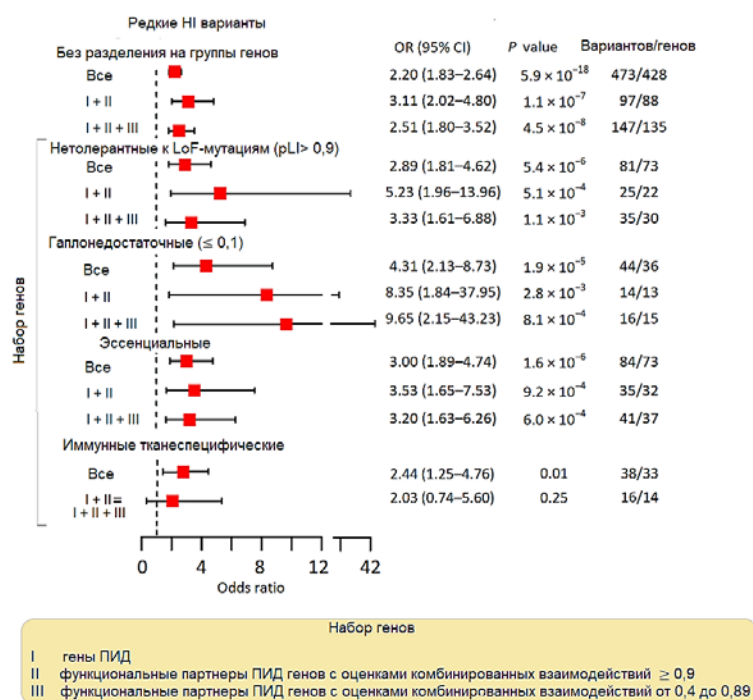


Рис. 7. Генетический груз редких HI вариантов у пациентов с тяжелой и легкой/умеренной формой течения COVID-19

### Иммунный статус у пациентов с инфекционными заболеваниями

Основываясь на результатах анализа генетического ландшафта как ПИД генов, так и наборов других генов, становится ясным, что количество людей, которые потенциально могут быть более восприимчивыми к инфекционным болезням, недооценено, так как иммунный профиль хозяина зависит от его генетики (Salnikova L.E. et al., 2021). Учитывая всю сложность определения фенотипов сложных многофакторных заболеваний человека, эта проблема становится еще более актуальной, так как не всегда возможно оценить разницу между тяжелой и умеренной формами течения COVID-19. В связи с этим, дополнительным фактором, помогающим в определении высоких рисков возникновения тяжелых форм течения инфекционных заболеваний, являются различные иммунологические тесты (Mueller Y.M. et al., 2022; Khadzhieva M.V. et al., 2021). В данной работе в качестве дополнительной оценки тяжести течения таких инфекционных заболеваний, как COVID-19 и бактериальная пневмония, используется тест для количественного определения косвенных маркеров иммунного ответа – TREC/KREC, основанный на рекомбинации T- и B-клеточных рецепторов.

Для группы из 20 молодых пациентов с COVID-19, которые тяжело перенесли COVID-19 (n=11), и тех, кто легко перенес (n=9) были измерены уровни TREC/KREC. Корреляционный анализ числа редких вариантов в генах ПИД и редких HI вариантов среди всех генов показал обратную корреляцию между уровнем TREC и количеством вариантов. Для TREC

наблюдались более низкие уровни у пациентов с тяжелым течением COVID-19, по сравнению с пациентами с легким течением (рис. 8).

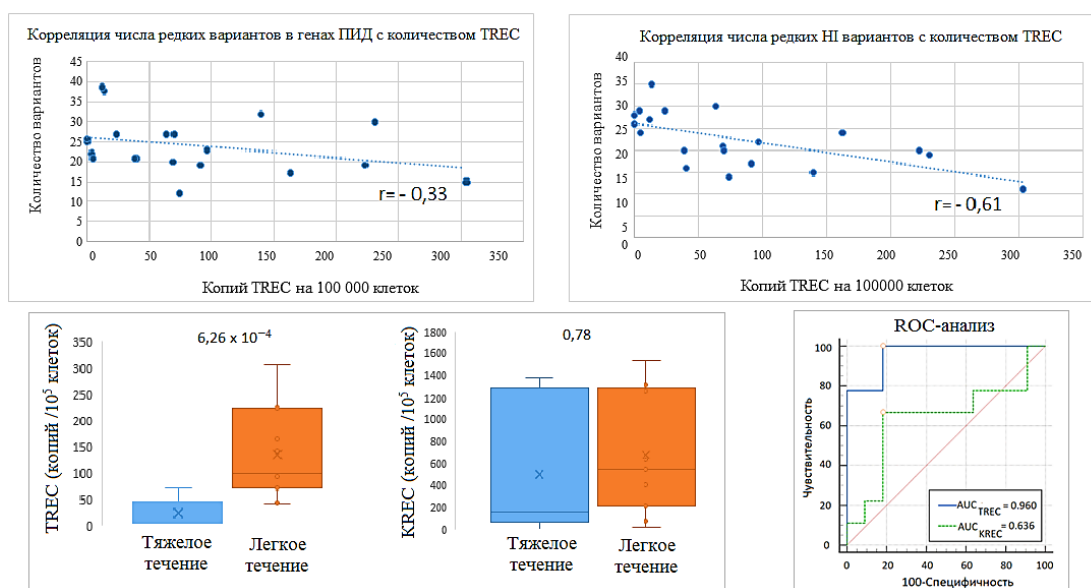


Рис. 8. Корреляционный анализ редких генетических вариантов с количеством TREC

Показанная диагностическая ценность анализа TREC (ROC-анализ, рис.8) для дифференциации пациентов с повышенным риском тяжелого течения COVID-19 указывает на возможность его использования в качестве самостоятельного анализа для выявления пациентов с повышенным риском развития тяжелого течения COVID-19. Далее количественные уровни TREC/KREC были измерены для пациентов с инфекционными заболеваниями (COVID-19 и бактериальная пневмония) с различными сопутствующими состояниями (рис. 9). При всех сравниваемых сопутствующих состояниях у пациентов (ОРДС, сепсис, тяжесть пневмонии и т.д.) количественные уровни TREC/KREC ниже, по сравнению с теми пациентами, у которых данные осложнения отсутствовали. Также данный анализ показал, что значения TREC в контроле были ниже, чем у пациентов с ВП, и выше, чем у пациентов с НП. Уровни KREC были выше в контроле, чем у пациентов с НП, и не отличались между контролем и пациентами с ВП.

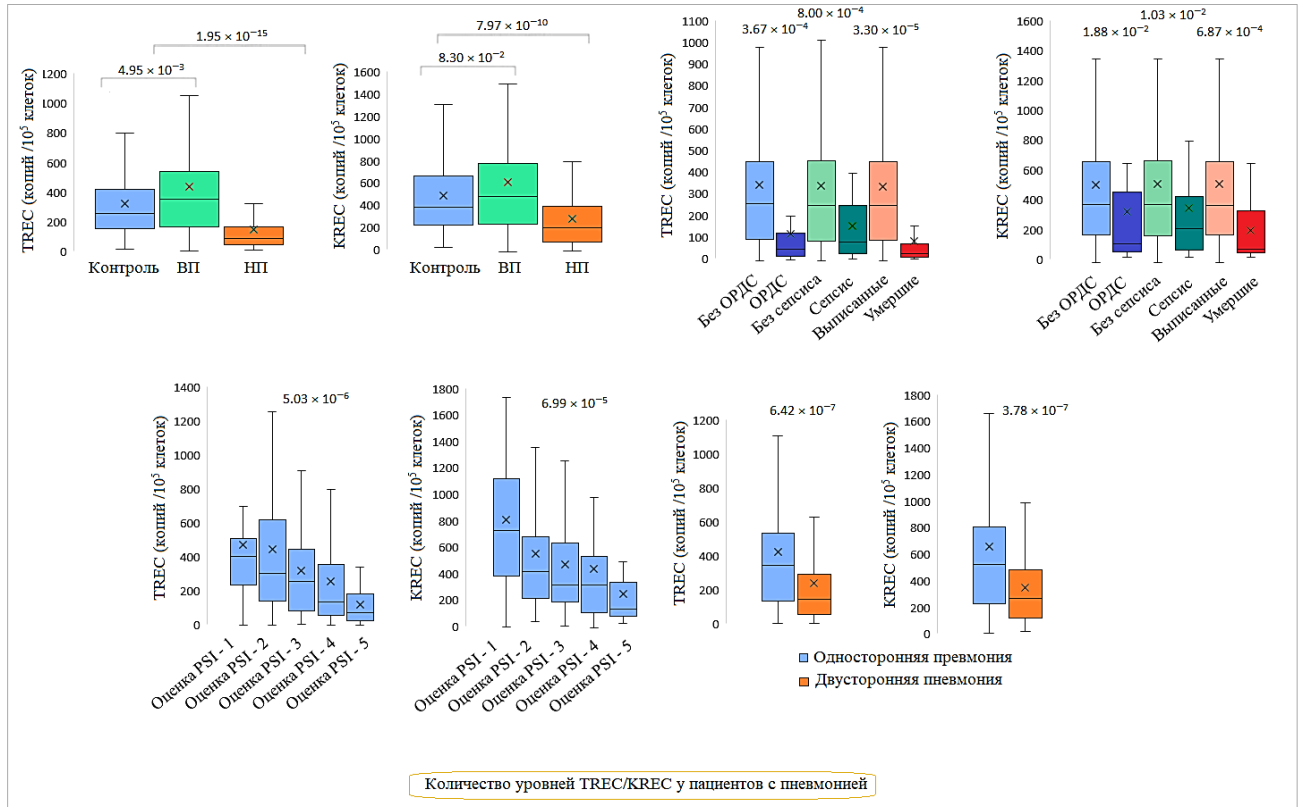
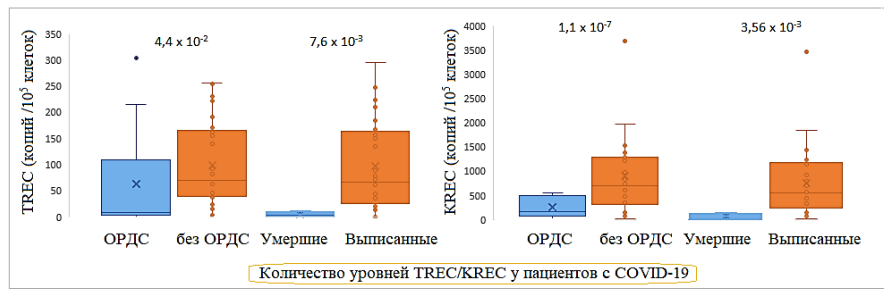


Рис. 9. Количественные уровни TREC/KREC при различных сопутствующих состояниях

Анализ TREC продемонстрировал удовлетворительную диагностическую эффективность для НП, ОРДС и сепсиса/септического шока (AUC 0,7–0,8) и хорошую диагностическую эффективность (AUC 0,8–0,9) для летальных исходов. Анализ KREC имел худшую диагностическую точность по отношению ко всем изученным конечным точкам, по сравнению с анализом TREC (рис. 10).

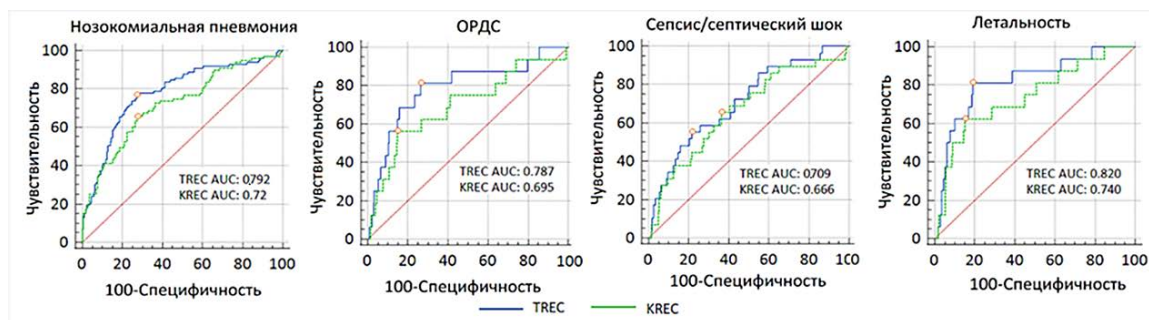


Рис. 10. ROC-анализ для количественных уровней TREC и KREC при прогнозировании тяжести течения пневмонии

## ВЫВОДЫ

1. На основании анализа данных пациентов с тяжелой и легкой/умеренной формой течения COVID-19, впервые с помощью молекулярно-генетических и биоинформатических подходов показано влияние совокупного числа редких потенциально патогенных генетических вариантов на уровне всего экзона и в различных наборах генов, включая гены ПИД.
2. Охарактеризован патогенный генетический ландшафт генов, ассоциированных с ПИД, с помощью «генотип-фенотип» баз данных ClinVar и HGMD<sup>®</sup> и ресурса dbSNP. Показано, что подавляющее число редких потенциально патогенных вариантов в генах ПИД у пациентов с COVID-19 отсутствует в объединенной базе данных ClinVar/HGMD.
3. Показан более высокий уровень экспрессии генов ПИД по отношению к другим генам в субпопуляциях клеток крови человека.
4. На основе анализа результатов полноэкзомного секвенирования молодых пациентов с COVID-19, гены ПИД и их функциональные гены-партнеры были определены в качестве генов, ассоциированных с развитием тяжелой формы течения COVID-19.
5. С помощью тестирования косвенных маркеров иммунного ответа, основанного на T- и B-клеточной рекомбинации (TREC и KREC), было показано, что иммунный статус молодых пациентов с COVID-19 был снижен при тяжелом течении заболевания. Также сниженный количественный уровень TREC коррелировал с большим числом редких потенциально патогенных вариантов на уровне всего экзона и в генах ПИД у молодых пациентов с тяжелой и легкой/умеренной формами течения COVID-19.
6. Показан диагностический потенциал определения уровней TREC и KREC при COVID-19 и бактериальной пневмонии с различными сопутствующими состояниями.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в журналах, соответствующих Перечню ВАК:

1. Salnikova L.E., Kolobkov D.S., Sviridova D.A. (Kashatnikova D.A.), Abilev S.K. An overview of germline variations in genes of primary



immunodeficiencies through integrative analysis of ClinVar, HGMD® and dbSNP databases // Human Genetics. 2021. №140. С.1379–1393.

2. Khadzhieva M.B., Kalinina E.V., Larin S.S., Sviridova D.A. (Kashatnikova D.A.), Gracheva A.S., Chursinova J.V., Stepanov V.A., Redkin I.V., Avdeikina L.S., Rumyantsev A.G., Kuzovlev A.N., Salnikova L.E. TREC/KREC levels in COVID-19 young patients // Diagnostics. 2021. №11(8). С. 1486.

3. Kolobkov D.S.; Sviridova D.A. (Kashatnikova D.A.); Abilev S.K.; Kuzovlev A.N.; Salnikova L.E. Genes and Diseases: Insights from Transcriptomics Studies // Genes. 2022. №13. С. 1168.

4. Kashatnikova D.A.; Khadzhieva M.B.; Kolobkov D.S.; Belopolskaya O.B.; Smelaya T.V.; Gracheva A.S.; Kalinina E.V.; Larin S.S.; Kuzovlev A.N.; Salnikova L.E. Pneumonia and Related Conditions in Critically Ill Patients—Insights from Basic and Experimental Studies // Int. J.Mol. Sci. 2022. №23. С. 9896.

5. Khadzhieva M.B., Gracheva A.S., Belopolskaya O.B., Kolobkov D.S., Kashatnikova D.A., Redkin I.V., Kuzovlev A.N., Grechko A.V. and Salnikova L.E. COVID-19 severity: does the genetic landscape of rare variants matter? // Front. Genet. 2023. №14. С. 1152768.

6. Khadzhieva M.B.; Kolobkov D.S.; Kashatnikova D.A.; Gracheva A.S.; Redkin I.V.; Kuzovlev A.N.; Salnikova L.E. Rare Variants in Primary Immunodeficiency Genes and Their Functional Partners in Severe COVID-19 // Biomolecules. 2023. №13. С. 1380.

#### **Публикации в сборниках материалов конференций:**

7. Сальникова Л.Е., Колобков Д.С., Свиридова Д.А. (Кашатникова Д.А.), С.К. Абилев. Моно- и полигенные заболевания, связанные с одним и тем же геном, в онтологии фенотипа человека и каталоге широкогеномных исследований. Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции «Медицинская наука в век цифровой трансформации», Курск, 10 декабря 2021 г. С. 173-175.

8. Хаджиева М.Б., Калинина Е.В., Грачева А.С., Свиридова Д.А. (Кашатникова Д.А.), Кузовлев А.Н., Сальникова Л.Е. анализ эксцизионных колец V(D)J-рекомбинации В- и Т-лимфоцитов у пациентов с COVID-19. Материалы XXIII Всероссийской Конференции с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях», г. Москва, Россия, 12-13 ноября 2021 г. С. 121.

9. Грачева А.С., Хаджиева М.Б., Кашатникова Д.А., Кузовлев А.Н., Сальникова Л.Е. Анализ полноэкзомного секвенирования ДНК пациентов с коронавирусной инфекцией COVID-19. Материалы XXIV Всероссийской Конференции с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях», 11-12 ноября 2022 г. М.: Издательство ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 2022. С. 130.

10. Sviridova D.A. (Kashatnikova D.A.); Kolobkov D.S.; Abilev S.K.; Salnikova L.E. Pathogenic landscape in genes of primary immunodeficiencies.

Abstract of 20th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiency (ESID), 12-15 October 2022, Gothenburg. P. 230.

11. Свиридова Д.А. (Кашатникова Д.А.), Колобков Д.С., Абилов С.К., Сальникова Л.Е. Сравнительный анализ вариантов в генах первичных иммунодефицитов с использованием баз данных генотип-фенотип и dbSNP. Научная конференция с международным участием, посвященная 50-летию юбилею лаборатории популяционной генетики им. Ю. П. Алтухова ИОГен РАН и 85-летию со дня рождения академика Юрия Петровича Алтухова 11–14 октября 2022, Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, г. Москва. С. 123.

12. Кашатникова Д.А., Хаджиева М.Б., Сальникова Л.Е. Оценка иммунного статуса методом TREC/KREC у пациентов с тяжелым течением пневмонии. Сборник тезисов по итоговой научно-практической конференции ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА России, Москва, 20-21 декабря 2022 г. С. 22.

13. Грачева А.С., Хаджиева М.Б., Белопольская О.Б., Колобков Д.С., Кашатникова Д.А., Кузовлев А.Н., Сальникова Л.Е. Генетический ландшафт редких вариантов и тяжесть течения COVID-19. Материалы XXV Всероссийской конференции с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях», Москва, Россия, 10-11 ноября 2023 г. С. 130.

14. Кашатникова Д.А., Захаржевская Н.Б., Сальникова Л.Е. Гены, ассоциированные с первичными иммунодефицитами (ПИД), как ключевые гены при SARS-CoV-2 инфекции. Сборник тезисов по итоговой научно-практической конференции ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА России, Москва, 19-20 декабря 2023 г. С. 35.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность главному научному сотруднику ИОГен, д.б.н. Сальниковой Л.Е., под руководством которой выполнена данная диссертационная работа. Автор благодарен лаборатории молекулярной иммунологии НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева за предоставление возможности проводить молекулярно-генетическое исследование, а также лаборатории молекулярной биологии за предоставление возможности к доступу профессиональной версии базы HGMD<sup>®</sup>. Автор благодарен ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии за предоставление ценных биологических образцов пациентов.