

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИФА ДЛЯ ОЦЕНКИ НАПРЯЖЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА У ПАЦИЕНТОВ ИММУНИЗИРОВАННЫХ SARS-COV-2

¹Т.И. Давлятшин, ¹Е.В. Давлятшина, ²М.Б. Орынбаев, ²Б.М. Хайруллин,
³А.Т. Маншарипова, ⁴С.С. Решетников, ⁴А. Сизов, ⁵А.В. Рахматуллин,
⁵К.Б. Садыков, ³Т.Т. Давлятшин, ³Д. Маншарипов

¹ТОО «Т-Хелпер» Казахстан, г. Алматы

²ГУ «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»,
Жамбылская область, Кордай

³НУО «Казахстанско-Российский медицинский университет», Казахстан, г. Алматы

⁴АО «ВЕКТОР-БЕСТ», Россия, г. Новосибирск

⁵«Военный клинический госпиталь» МО РК, Казахстан, г. Алматы

Аннотация

В ходе обследования на АТ к белкам зоны «шипов» и нуклеокапсида в группе самообратившихся пациентов, выявлена зависимость формирования стойкого иммунного ответа и тяжести течения заболевания от способности и скорости наработки АТ у инфицированных SARS-CoV-2 к белкам обеих зон вируса.

Ключевые слова: иммунный ответ, напряженность, SARS-CoV-2, иммуноглобулины, Nc-белок, S-белок.

Введение. За прошедший с начала пандемии SARS-CoV-2 период, февраль – сентябрь 2020 года, получены определенные данные [1-7, 9, 10], позволяющие оценить иммунный статус (ИС) организма человека, прошедшего иммунизацию этим вирусом. Большинство из них имеет разобщенный, а во многом даже противоречивый характер.

По имеющимся данным [3; 4; 5], часть пациентов, с установленным диагнозом, вообще не имеет антительного ответа, ни при первичном обращении, ни на выписке при выздоровлении.

Также во всех регионах, где проводятся исследования, отмечается, что часть населения не реагирует на возбудителя или переносит инфекционное воспаление в легкой форме. Как мы указывали раньше [10], такая реакция части населения связана с имеющимся у них иммунным «запасом» антител, способных адекватно реагировать на возбудителя, связывать и элиминировать его, возможно на стадии первичного иммунного ответа, когда еще вирусная масса не достигла критических величин.

Это возможно связано с тем, что организм «использует» предыдущий иммунный опыт по белкам, являющимся общими у вирусов SARS-Cov-1 и Mers, с которыми пациенты могли сталкиваться ранее. Кроме всего прочего нельзя исключать и возможность того, что организм сталкивался с другими представителями семейства SARS-CoV, или даже с этим же вирусом, только в другой инварианте, что связано с высокой мутабельностью вируса.

Отдельные заявления, проскальзывающие в прессе и на телевидении в популярных программах о том, что вирус не имеет высокой мутабельности, не имеют под собой основания.

Мы пришли к этим выводам именно в связи с тем, что на этот вирус нет устойчивого иммунного ответа.

Сегодняшние исследования по вакцинации, проводимые в период не более 3 месяцев, пока не позволяют делать заявлений о возникновении стойкого иммунного ответа к SARS-CoV-2. К заявлениям производителей о том, что найдена вакцина, вырабатывающая стойкий иммунный ответ следует отнестись с определенной степенью осторожности, поскольку наблюдения за вакцинированными ведутся в течение недостаточно длительного промежутка времени.

Эффективность вакцинации будет оцениваться в ближайшие 6-12 месяцев.

Вакцины, разрабатываемые сегодня известными производителями, должны привязываться не только к белкам, являющимся общими для большинства представителей семейства, но и включать в себя инварианты, относящиеся только к определенному виду. Наиболее важным и сложным вопросом здесь является к каким именно белкам возникает относительно устойчивый иммунный ответ.

Кроме того, все больше сообщений [5; 6; 7; 9], в том числе и по телевидению, что растет количество COVID-19-иммунизированных пациентов «безразличных» к вирусу. Эти пациенты составляют как минимум 3 группы:

1) иммунизированные без иммунного ответа или с неполным иммунным ответом – легко переносящие на ногах и случайно обследованные («на всякий случай»);

2) заболевшие которые заболевают с осложнениями в соответствии с имеющимся отягощенным анамнезом – пациенты со средней тяжести заболевания;

3) пациенты с тяжелым течением, вплоть до летальных исходов, без своевременного иммунного обеспечения.

Третья группа заболевших COVID-19 – предмет отдельного очень серьезного исследования, включающего в себя сбор детального анамнеза пациента с учетом всех

особенностей пациента и его генетической конструкции. Это дело ближайшего будущего.

Что касается двух первых групп пациентов, то на сегодняшний день нет сколько-нибудь убедительных систематизированных данных, позволяющих дать вразумительные объяснения относительно того, почему возможно существование носителей вируса без патологизации процесса, а также никак не объясняется тот факт, что достаточно большое количество обследованных COVID-19 иммунизированных пациентов переносит инфекцию легко и без видимых последствий.

Проводимые нами в течение последних 4-х месяцев наблюдения дают нам основания предположить, что это связано со следующими обстоятельствами.

1. Наличием низкоспецифических антител природного происхождения общих для всех коронавирусов у части населения (естественный иммунитет), не реагирующих на вирус.

2. Наличие антител низкой специфичности, способных связывать антигенные детерминанты вирусов всего семейства, или у определенных групп вирусов по определенным белкам, являющимися общими для большинства представителей семейства (особенности генетической конструкции). Это пациенты переносящие инфицирование бессимптомно или в легкой форме или возможно многократно переболевшие другими видами коронавирусов.

3. Имеющие слабый иммунный ответ на определенные антигенные детерминанты, заболевающие, переносящие заболевание средней тяжести, выздоравливающие.

В связи со всем вышесказанным, целью нашего исследования было выяснение напряженности иммунного ответа пациентов в условиях пандемии SARS-CoV-2.

Материалы и методы. Для достижения поставленной цели была поставлена задача провести исследование иммунного ответа (ИО) COVID-19-иммунизированных пациентов, по антигенным детерминантам вируса SARS-CoV-2 - белков зоны «шипов» - Glykoproteinspike (S) и нуклеокапсида. Nucleocapsid (N).

Для решения поставленной задачи, в качестве материала, нами использовалась сыворотка крови 305 пациентов, обратившихся в течение последних 4 месяцев для диагностики в лабораторию ТОО «Хелпер» по собственной инициативе, которые, в ходе исследований разделились на следующие группы:

1) группа это 184 пациентов, пришедшие обследоваться по принципу «на всякий случай» - они были без ИО;

2) группа состояла из 105 пациентов имеющих гриппоподобные симптомами – небольшой температурой, насморком - проходящими в период 3 дня – 7 дней или в более поздние сроки без выраженных симптомов, характерных для течения COVID-19;

3) группа составила 15 пациентов со средней тяжестью течения COVID-19, ПЦР-подтвержденные на заболевание, сдавшие кровь на иммуноферментный анализ вначале на 3-4 недели течения заболевания, после выписки и повторно на 6 - 7 недели в период реабилитации. Все пациенты были разного пола, в возрасте от 18 до 64 лет. Кровь забиралась натощак из локтевой вены. ИФА выполнялся на приборе, сыворотка крови всех пациентов исследовалась на наличие антител (АТ) к белкам зоны «шипов» - Glykoproteinspike (S) и Nucleocapsid (Nc) – нуклеокапсида вируса SARS-CoV-2 с помощью общепринятых методов ИФА по следующим модификациям.

Для определения Ig классов G и M использовались тест-системы «SARS CoV-2-S-IgG-Антитела» и «SARS-CoV-2-S-IgM-Антитела» для выявления антител класса G и M к антигену S SARS-CoV-2, а также «SARS CoV-2-Nc-IgG-Антитела» и «SARS-CoV-2-Nc-IgM-Антитела» для выявления антител класса G и M к антигену Nc SARS-CoV-2, которые представляют собой многокомпонентные наборы реагентов для постановки непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе. Антигены (АГ) белков были любезно предоставлены по нашей просьбе: зоны «шипов» - Glykoproteinspike (S) - ЗАО «Вектор-Бест» РФ, г. Новосибирск; АГ белков Nucleocapsid (Nc) (экспериментальные) – НИИПББ МОН РК. Все пациенты дали информированное согласие на диагностические процедуры (протокол 2 заседания ЛЭК КазРосмедуниверситета).

Полученные результаты и обсуждение. В ходе исследований были обследованы 305 пациентов и получены следующие результаты, сведенные в таблицу 1.

184 пациента не имели ИО и были исключены из дальнейшего исследования.

Среди случайно обследованных пациентов, обратившихся по собственной инициативе, в 40% случаев имеется частичный или полный иммунный ответ. Это позволяет говорить о том, что ИО ответ популяции населения, практически сформирован, а это, в свою очередь наталкивает на мысль, что население имело контакты с возбудителем этого вида значительно раньше, чем была объявлена пандемия. Не исключается так же многократный

Таблица 1. Результаты иммунного ответа у пациентов.

Группы пациентов	N - Общее количество пациентов	S – «отр», Nc – «отр»	S – «+», Nc – «отр»	S – «отр», Nc – «+»	S – «+», Nc – «+»
1 группа (без ИО)	184	184	0	0	0
2 группа частичный:ИО	106	0	0	60	46
3 группа срок 3 - 4 недели частичный ИО	15	0	15	0	0
3 группа срок 6 - 7 недели полный ИО	15	0	0	0	15

контакт с возбудителем и «доработка» ИО до величин, способных противостоять вирусу.

У 92% иммунизированных вирусом пациентов возникает частичный ИО, причем у всех пациентов 2 группы (т.е. 100% в пределах группы), вырабатывались АТ к Nucleocapsid (Nc). Эти пациенты были безразличны к вирусу или болели легко и недолго. Здесь уместно предположить, что формирование АТ к белкам внутренней зоны вируса, особенно Nc, способствует как облегченному варианту течения болезни, в случае перерастания ситуации в патологическую, так и «игнорирования» вируса организмом.

В примерно 8% иммунизированных вирусом пациентов заболевание было средней тяжести. В первые недели формировались АТ к зоне шипов. После длительного лечения (3-4 недели) без осложнений или с осложнениями средней тяжести как - то: пневмония, напряжение в сердечно-сосудистом русле компенсируемого характера и купируемые в ходе применения симптоматической терапии, нарабатывались АТ к Nucleocapsid (Nc). После этого наступал период реабилитации. Эти пациенты дообследуются нами по настоящее время.

Обращает на себя внимание тот факт, что у всех 121 пациентов с ИО на SARS-CoV-2 нарабатываются АТ к белкам нуклеокапсида. Также, 92% пациентов с полным ИО переносили заболевание либо бессимптомно, либо в легкой степени, и лишь 8% пациентов перенесли заболевания средней степени тяжести.

Все вышеозначенное позволяет сделать следующие выводы.

1. Продукция АТ только к S-белку не обеспечивает организм, иммунизированных SARS-CoV-2 достаточной защитой.

2. Продукция АТ к S и Nc белкам вируса, обеспечивают организму инфицированного защиту в достаточной степени и способствуют развитию устойчивого иммунного ответа.

3. Длительное отсутствие продуцирования АТ к Nc-белку вируса, наблюдается в случаях с осложненным течением. Улучшение состояния этих пациентов начинается с наработки АТ к Nc-белку.

В связи с этим представляется интересным продолжать исследования по означенным направлениям и ввести в обязательный список исследований пациентов с подозрениями на SARS-CoV-2 полный АТ-ответ.

Список литературы:

1. <https://medikom.ua/ru/koronavirus-simptomy-i-profilaktika/#>
2. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/176982/WHO_MERS_LAB_15.1_rus.pdf;jsessionid=0A6C2E1836AF1163B53A56713DAA80B6?sequence=8
3. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2019-29-6-655-672>
4. <https://medikom.ua/ru/koronavirus-simptomy-i-profilaktika/#>
5. yandex.ru>heals/turbo/articles/diseases/medelement.com>
6. lookmedbook.ru>distress-sindrom.msk.ru>blog/echo/msk/2579
7. medvestnik.by>rudistress-sindrom
8. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., «Биохимия», уч. 3-е изд. – М.: Медицина, 2004, 704 с.
9. Джайнабаев Н.Т., Шарипов К.О. «Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины» №1/27/2020 с.17-20.
10. Давлятшин Т.И., Давлятшина Е.В., Маншарипова А.Т., Решетников С.С., Рахматулин А.В., Давлятшин Т.Т. «ИФА метод для оценки, мониторинга и прогнозирования иммунного статуса у пациентов с SARS-CoV-2», «Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины», № 2/28/2020 стр. 32.
11. Новое интерпретации индекса авидности. Давлятшин Т.И., Давлятшина Е.В., Сизов А.А., Сизов Д.А. Медицинская картотека 6.2013.
12. Мецлер Д. «Биохимия» под ред. Браунштейна, уч. В 3-х томах – М.: Мир, 1980, 1505 с.
13. Николаев А.Я. «Биохимия», уч. 3-е изд. – М, Медицина, 2007, 568 с.
14. Овчинников Ю.А. «Биоорганическая химия», Москва, «Просвещение», 1987 7,819 с.
15. Ярилин А.А. «Основы иммунологии», Москва, «Медицина», 1999 г, 608 с.

SARS-COV-2 ИММУНИЗАЦИЯ ЛАНҒАН ПАЦИЕНТТЕРДЕ ИММУНДЫҚ ЖАУАПТЫҢ БЕРІКТІГІН БАҒАЛАУ ҮШІН ИФТ ҚОЛДАНУ

¹Т.И. Давлятшин, ¹Е.В. Давлятшина, ²М.Б. Орынбаев, ²Б.М. Хайруллин,
³А.Т. Маншарипова, ⁴С.С. Решетников, ⁴А. Сизов, ⁵А.В. Рахматуллин,
⁵К.Б. Садыков, ³Т.Т. Давлятшин, ³Д. Маншарипов

¹ «Т-Хелпер» ЖШС, Қазақстан, Алматы қ.

² «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ММ, Жамбыл облысы, Қордай

³ «Қазақстан-Ресей медициналық университеті» МББМ, Қазақстан, Алматы қ.

⁴ «ВЕКТОР-БЕСТ» АҚ, Ресей, Новосибирск қ.

⁵ ҚР ҚМ «Әскери клиникалық госпиталь», Қазақстан, Алматы қ.

Түйінді

Өздігінен қалпына келетін науқастар тобындағы «тіккенектер» мен нуклеокапсидтік аймақ белоктарына антиденелерді зерттеу барысында тұрақты иммундық жауаптың қалыптасуының және ауырлық дәрежесінің екі вирустың белоктарына SARS-CoV-2 жұқтырғандарда антиденелердің түзілу қабілеті мен жылдамдығына тәуелділігі анықталды.

Кілт сөздер: иммундық жауап, кернеу, SARS-CoV-2, иммуноглобулиндер, Nc-ақуыз, S-ақуыз.

THE USE OF ELISA TO ASSESS THE INTENSITY OF THE IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS IMMUNIZED WITH SARS-CoV-2

¹T.I. Davlyatshin, ¹Y.V. Davlyatshina, ²M.B. Orynbaev, ²B.M. Khairullina,
³A.T. Mansharipova, ⁴S.S. Reshetnikova, ⁴A. Sizov, ⁵A.V. Rakhmatullina,
⁵K.B. Sadykov, ³T.T. Davlyatshin, ³D. Mansharipov

¹ «T-Helper» LLP, Kazakhstan, Almaty

² PA «Scientific Research Institute of Biological Safety Problems», Zhambyl region, Kordai

³ NEI «Kazakh-Russian Medical University», Kazakhstan, Almaty

⁴ JSC «VECTOR-BEST», Russia, Novosibirsk

⁵ «Military Clinical Hospital» MD RK, Kazakhstan, Almaty

Summary

During the examination for antibodies to proteins of the «thorns» and nucleocapsid zone in a group of self-reversing patients, the dependence of the formation of a stable immune response and the severity of the disease on the ability and rate of production of antibodies in those infected with SARS-CoV-2 to proteins of both virus zones was revealed.

Key words: *immune response, tension, SARS-CoV-2, immunoglobulins, Nc-protein, S-protein.*

UCD: 615.382:612.111.7

МРПТИ: 76.29.33.

IS THE TECHNOLOGY USING PLASMA ENRICHED WITH PLATELETS AND WHITE BLOOD CELLS NECESSARY

T.R. Fazylov, N.B. Duisenov

NEI «Kazakh-Russian Medical University», Kazakhstan, Almaty

Summary

Background. Platelet and white blood cell rich plasma (PLRP) therapy is a newly developed method that uses autologous plasma to improve and accelerate bone healing.

Purpose. To determine the level of safety and effectiveness of the technique using plasma enriched with platelets and white blood cells.

Materials and methods. A search was performed using PUBMED, Cochrane, and web of Science databases. The search was performed using keywords with no language restrictions.

Relevance. Therapy in bone defects is a serious challenge for a trauma Clinician. Bone defects often develop with severe trauma or as a result of large volume resections as a result of pathologies such as tumors or bone infection.

Conclusion. Despite the existing advantages, the use of PLRP technology is not fully justified. It is necessary to perform many more high-quality clinical trials that will finally put an end to the effectiveness of the method.

Key words: *platelet-rich plasma, bone graft, bone repair.*

Introduction. The technology using platelet-and white blood cell-rich plasma (PLRP) is a recently developed technique that can speed up the regeneration of various tissues. This method uses a part of the blood in which the number of shaped elements containing a significant number of growth factors and angiogenic factors increases by means of the centrifugation process. Today, there is a significant interest in PRLP technology from researchers in various fields of medical science, including clinicians of operative traumatology. This is primarily due to the fact that autoplasm-based products are safe and easy to manufacture. Based on these attractive qualities of PLRP technology, its use in clinical traumatology can be a great acquisition for the entire healthcare system. The purpose of this review is to search for up-to-date data on the effect of PLRP on bone regeneration after various injuries. Therapy for bone defects is a challenge for a trauma Clinician. Bone

defects often develop with severe trauma or as a result of large volume resections. For example, for pathologies such as bone tumors or infection of the bone [4]. Often in such cases, bone grafting is required, as there is a need to fill in the resulting defect. Today, autologous bone substitutes are considered the gold standard in the treatment of bone defects, as they have the necessary osteogenic properties, as well as significant safety [25]. It is known that autologous bone materials can be used in the treatment of non-fusion, large fragmented fractures and osteomyelitis. However, bone auto transplants often have disadvantages such as low availability, development of hematomas, risk of infection, violations at the site of sampling [15]. How it works? Bone tissue initially has the ability to regenerate after injuries, both after surgery and after various diseases leading to a bone defect. Bone restoration takes place with the participation of growth factors [21].