

# Нарушение иммунного ответа, опосредованное простагландином E2, способствует тяжелому заболеванию COVID-19.

**Мелани Рике-Хох**<sup>1</sup>\*, **Элизабет Стеллинг**<sup>1</sup>, **Лиза Лассвиц**<sup>2</sup>, **Антония П. Гюнеш**<sup>2,3,4</sup>, **Мартина Кастен**<sup>1</sup>, **Франсиско Х. Сапатеро-Белинчон**<sup>2,5</sup>, **Грэм Бродген**<sup>2</sup>, **Гиза Герольд**<sup>2,7,8</sup>, **Томас Питчманн**<sup>2,3</sup>, **Виржини Монтель**<sup>7</sup>, **Жан-Люк Баллиганд**<sup>7</sup>, **Федерика Фаччиотти**<sup>8</sup>, **Эмилио Хирш**<sup>9</sup>, **Томас Гаузеполь**<sup>3</sup>, **Хусни Эльбахеш**<sup>3</sup>, **Guus Ф. Риммельсваан**<sup>10</sup>, **Анне Хёфер**<sup>11,12</sup>, **Марк П. Кюнель**<sup>11,12</sup>, **Дэнни Джонигк**<sup>11,12</sup>, **Юлиан Эйгендорф**<sup>13</sup>, **Уве Тегтбур**<sup>13</sup>, **Лена Норка**<sup>13</sup>, **Микаэла Шерр**<sup>14</sup>, **Томас Иллиг**<sup>15</sup>, **Аксель Шамбах**<sup>16,17</sup>, **Тобиас Дж. Пфеффер**<sup>1</sup>, **Андрес Хильфикер**<sup>18</sup>, **Аксель Хаверих**<sup>18</sup>, **Дениз Хильфикер-Кляйнер**<sup>1,19</sup>



## ОТКРЫТЫЙ ДОСТУП

**Цитата:** Ricke-Hoch M, Stelling E, Lasswitz L, Gunesch AP, Kasten M, Zapatero-Belinchón FJ и др. (2021) Нарушенный иммунный ответ, опосредованный простагландином E2, способствует тяжелому заболеванию COVID-19. PLoS ONE 16 (8): e0255335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255335>

**Редактор:** Пауло Ли Хо, Институт Бутантана, БРАЗИЛИЯ

**Получили:** 11 марта 2021 г.

**Принято:** 14 июля 2021 г.

**Опубликовано:** 4 августа 2021 г.

**Авторское право:** © 2021 г. Рике-Хох и др. Это статья в открытом доступе, распространяемая в соответствии с условиями Лицензия Creative Commons Attribution, что разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии указания автора и источника.

**Заявление о доступности данных:** Все соответствующие данные находятся в рукописи и ее Вспомогательная информация файлы.

**Финансирование:** Работа поддержана: Немецким исследовательским фондом (DFG, HI 842 / 3-2 до DH-K), Группой клинических исследований DFG (DFG KFO311, HI 842 / 10-1, HI 842 / 10-2 до DH-K; RI 2531 / 2-1, RI 2531 / 2-2 до MR -H.), От REBIRTH I / II до DH-K., От Foundation Leducq (ID проекта 19CVD02) до DH-K. и EH, DFG в рамках Немецкой стратегии совершенствования (EXC 2155 «RESIST», идентификатор проекта 39087428, DJ),

**1** Отделение кардиологии и ангиологии, Ганновская медицинская школа, Ганновер, Германия, **2** Институт экспериментальной вирусологии, TWINCORE, Центр экспериментальных и клинических исследований инфекций, Ганновер, Германия, **3** Немецкий центр инфекционных исследований, Ганновер-Брауншвейг, Брауншвейг, Германия, **4** Отделение гастроэнтерологии, гепатологии и эндокринологии, Ганновская медицинская школа, Ганновер, Германия, **5** Отделение клинической микробиологии, вирусологии и Валленбергского центра молекулярной медицины (WCMM), Умзё Университет, Умзё, Швеция, **6** Департамент биохимии, Университет ветеринарной медицины Ганновера, Ганновер, Германия, **7** Полус фармакологии и терапии, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique и Cliniques Universitaires Saint-Luc, Католический университет Лувена (UCLouvain), Брюссель, Бельгия, **8** Отделение экспериментальной онкологии, Европейский институт онкологии IRCCS, Милан, Италия, **9** Департамент молекулярной биотехнологии и медицинских наук, Центр молекулярной биотехнологии, Туринский университет, Турин, Италия, **10** Исследовательский центр новых инфекций и зоонозов (RIZ), Университет ветеринарной медицины в Ганновере (TiHo), Ганновер, Германия, **11** Биомедицинские исследования конечной стадии и обструктивной болезни легких (ДЫХАНИЕ), Немецкий центр исследований легких, Ганновер, Германия, **12** Институт патологии, Ганновская медицинская школа, Ганновер, Германия, **13** Институт спортивной медицины, Ганновская медицинская школа, Ганновер, Германия, **14** Отделение гематологии, гемостаза, онкологии и трансплантации стволовых клеток, Ганновская медицинская школа, Ганновер, Германия, **15** Ганновский объединенный биобанк (HUB), Ганновская медицинская школа, Ганновер, Германия, **16** Институт экспериментальной гематологии, Ганновская медицинская школа, Ганновер, Германия, **17** Отделение гематологии и онкологии, Бостонская детская больница, Гарвардская медицинская школа, Бостон, Массачусетс, Соединенные Штаты Америки, **18** Отделение кардиологической, торакальной, трансплантационной и сосудистой хирургии, Ганновская медицинская школа, Ганновер, Германия, **19** Отделение сердечно-сосудистых осложнений онкологической терапии, Медицинский факультет Университета Филиппа, Марбург, Марбург, Германия

\* СИГР и МК внесли равный вклад в эту работу как первые соавторы.

\* [hoch.melanie@mh-hannover.de](mailto:hoch.melanie@mh-hannover.de)

## Абстрактный

Коронавирус SARS-CoV-2 привел к пандемии, затронувшей миллионы людей. Настоящее исследование показывает, что факторы риска тяжелого течения заболевания COVID-19, то есть мужской пол, пожилой возраст и малоподвижный образ жизни, связаны с более высокими уровнями простагландина E2 (PGE2) в сыворотке крови здоровых субъектов. У пациентов с COVID-19 уровень PGE2 в крови заметно повышен и положительно коррелирует с тяжестью заболевания. SARS-CoV-2 индуцирует образование и секрецию PGE2 в инфицированных эпителиальных клетках легких за счет активации циклооксигеназы (COX) -2 и снижения фермента, разрушающего PG, 15-гидроксипростагландиндегидрогеназы. Также живые человеческие срезы легких (PCLS), инфицированные SARSCoV-2, демонстрируют повышенную регуляцию COX-2. Регулярные упражнения у пожилых людей снижают PGE2

DEFEAT PANDEMIcs (AP6-9, DJ and M.PK) от (DFG - Projektnummer 158989968 - SFB 900, проект C7 и DFG, проект GE 2145 / 3-2 до G. G.), программа «Niedersächsischen Vorab» (проект 76251-99-3 / 19 для GG) через Министерство Нижней Саксонии (MWK) и Фонд Volkswagen (Volkswagen Stiftung), Федеральное министерство образования и исследований (проект COVID-Protect, проект: 01KI20143C - G. G.), Фонд Кнута и Алисы Валленбергов и Федеральное министерство образования и исследований совместно с Министерством науки и культуры (MWG) в рамках программы «Professorinnen Programm III» для GG в рамках гранта Консолидатора Европейского исследовательского совета (XNale; 771883). к Д. J.), REBIRTH I / II и Центр регенеративной трансляционной медицины REBIRTH (MWK, проект ZN3440) в AS, Фонд Карипло (проект # 2018-0498 для EH), проектом MWG 14-76103184 CORONA-1/20 для TI и проектом Европейского вирусного архива GLOBAL (EVA-GLOBAL), финансируемый программой исследований и инноваций Европейского Союза Horizon 2020 в рамках грантового соглашения № 871029 (Кристиану Дростену). Эта работа была частично поддержана Фондом Александра фон Гумбольдта в рамках профессуры Александра фон Гумбольдта, предоставленной Федеральным министерством образования и исследований Германии, и при финансовой поддержке Министерства науки и культуры (MWK), Нижняя Саксония, Германия (14 - 76103-184 КОРОНА-15/20 по ГФ

P.). APG был поддержан Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF; Немецкий центр исследований инфекций; грант № TTU. 05.816 00 к ТП). Работа JLB была поддержана грантами Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) и WEBIO. JLB - признанный исследователь института WELBIO. Финансирующие организации не играли никакой роли в дизайне исследования, сборе и анализе данных, принятии решения о публикации или подготовке рукописи.

**Конкурирующие интересы:** Авторы заявили, что не существует никаких конкурирующих интересов.

уровни в сыворотке крови, что приводит к повышенной экспрессии Paired-Box-Protein-Pax-5 (PAX5), главного регулятора выживания, пролиферации и дифференцировки В-клеток, в том числе в отношении долгоживущих В-клеток памяти, в пре-В-клеточных линиях человека. Более того, уровни PGE2 в сыворотке пациентов с COVID-19 снижают экспрессию PAX5 в линиях пре-В-клеток человека. Ингибитор PGE2 Таксифолин снижает продукцию PGE2, вызванную SARS-CoV-2. В заключение, SARS-CoV-2, мужской пол, пожилой возраст и малоподвижный образ жизни повышают уровни PGE2, что может снизить раннюю противовирусную защиту, а также развитие иммунитета, способствующее развитию тяжелых заболеваний и множественных инфекций. Регулярные физические упражнения и лечение таксифолином могут снизить эти риски и предотвратить развитие тяжелых заболеваний.

## Вступление

Штамм коронавируса 2019 г. (тяжелый острый респираторный синдром коронавирус-2 SARS-CoV-2) вызвала пандемию COVID-19, поразившую миллионы людей во всем мире. Пациенты с тяжелым течением заболевания часто поступают с тяжелым острым респираторным синдромом, который может прогрессировать до пневмонии, острого респираторного дистресс-синдрома и шока [1-3]. Системное воспаление, острое сердечное повреждение, сердечная недостаточность и гиперкоагуляция являются критическими осложнениями болезни COVID-19 [1, 4-9]. Идентифицированные типы клеток, инфицированные SARS-CoV-2, включают эпителиальные клетки легких, почечные клетки, кардиомиоциты, эндотелиальные клетки и перитциты [10-12].

Было обнаружено, что повышенный риск инфекций и тяжелых заболеваний связан с пожилым возрастом, мужским полом, сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями и загрязнением воздуха [7, 13-15]. Иммуноотромбоз объединяет врожденный иммунитет, активацию тромбоцитов и факторы свертывания крови для борьбы с вторгающимися патогенами и одновременно способствует повреждению тканей, связанных с воспалением; в контексте заболевания COVID-19 это может объяснить системную гиперкоагуляцию, часто наблюдаемую у пациентов с COVID-19 [8]. Сообщалось о дальнейших изменениях в иммунной системе с частично противоположными механизмами при остром и хроническом заболевании COVID-19. С одной стороны, инфекция COVID-19, по-видимому, связана с повышенной регуляцией и активацией нейтрофилов, в то время как лимфоциты уменьшаются [16]. Уменьшение популяции лимфоцитов коррелирует с более тяжелым поражением органов и более высокой смертностью у госпитализированных пациентов с COVID-19 [16]. В связи с этим, истощение Т-лимфоцитов [3, 17[3, 18, 19]. С другой стороны, все больше клинических данных свидетельствует о том, что цитокиновый шторм связан с серьезностью COVID-19, а также является важной причиной смерти от COVID-19 [20-22]. Среди потенциальных механизмов SARS-CoV-2 индуцировал образование аутоантител, повреждение тканей и органов, а также вторичную инфекцию бактериями и грибами [23, 24].

Простагландин (PG) E2, метаболит арахидоновой кислоты, является хорошо известным модулятором вирусной инфекции [25]. Как таковой, PGE2 подавляет адаптивную и врожденную иммунную систему и способствует инфицированию, например, вирусом гриппа А (IAV) [26 год, 27]. Более того, повышенные уровни циркулирующего PGE2 были связаны со снижением иммунитета в ответ на вакцинацию против IAV [26 год, 27]. Интересно, что инфекция IAV также способствует выработке PGE2 [28 год]. Циклооксигеназа2 (ЦОГ-2) является ферментом, ограничивающим скорость образования PGE2, и гидроксипростагландин дегидрогеназа 15- (НАД) (HPGD) является ферментом, ответственным за деградацию PGE2 [29]. Эти результаты, подтвержденные недавним обзором литературы [30] естественно предположил связь между метаболизмом арахидоновой кислоты и PGE2 при болезни COVID-19.

Мы предположили, что PGE2 модулирует иммунный ответ у людей, подверженных риску тяжелого заболевания COVID-19. Чтобы проверить это, мы сначала измерили уровень PGE2 в сыворотке крови при COVID-19.

пациенты с разной степенью тяжести заболевания, а также у субъектов с предполагаемыми факторами риска (возраст, пол, физическая подготовка) тяжелого течения заболевания. Чтобы проанализировать прямое влияние SARS-CoV-2 на продукцию PGE<sub>2</sub>, мы инфицировали эпителиальные клетки легких человека и прецизионные срезы легких человека (PCLS) SARS-CoV-2. Кроме того, мы дополнительно проанализировали механизмы модуляции иммунной защиты PGE<sub>2</sub>, например, посредством созревания В-клеток и образования клеток памяти, и коррелировали тяжесть заболевания с содержанием В-клеток в легких в образцах пациентов. Мы дополнительно протестировали стратегии по снижению выработки PGE<sub>2</sub> или влияния на вышеуказанные параметры в качестве профилактических или терапевтических средств против тяжелого COVID-19.

## Материалы и методы

Если не указано иное, все химические вещества и реагенты были приобретены у Sigma-Aldrich.

### Дизайн исследования

**Исследование COVID-19.** В этом исследовании 89 пациентов с диагнозом COVID-19, 41 имел легкие / умеренные симптомы и 48 были госпитализированы с тяжелым заболеванием. Образцы крови были также получены от мужчин (n = 18) и женщин (n = 28) (возраст 18–50 лет) от здорового населения, учрежденного Ганноверским объединенным биобанком (HUB).

На момент забора крови у 29 пациентов было известно, получили ли они кортикоиды или нет. Среди тех, n = 14 не получали кортикоиды, и n = 15 пациентов с COVID-19 с легким и тяжелым течением заболевания получали кортикоиды (дексаметазон n = 11 или Medrol n = 4). Информация об использовании НПВП или модификаторов лейкотриенов отсутствовала. Ни один из здоровых контролей не проходил лечение кортикоидами или нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП).

Местные комитеты по этике Медицинской школы Ганновера, Госпитальный комитет Калифорнийского университета в Лос-Анджелесе и Этический комитет НОО одобрили это исследование (IEO1271). Все пациенты и здоровые контрольные субъекты дали письменное информированное согласие. Исследование соответствует принципам, изложенным в Хельсинкской декларации.

**Физическая оценка и программа упражнений у здоровых пожилых людей (когорты перерождения 60plus, DRKS00013885).** Все субъекты в когорте Rebirth 60plus (DRKS00013885) изначально были протестированы на максимальную выходную мощность на велоэргометре с градуированным тестом с физической нагрузкой (GXT). В зависимости от их активности, физического состояния и патологий каждому испытуемому была предложена программа аэробных упражнений. Раз в месяц с испытуемыми связывались по телефону, чтобы оценить прогресс в тренировках и при необходимости скорректировать программу упражнений. Все участники исследования Rebirth 60plus были проинформированы о преимуществах и рисках, связанных со всеми процедурами исследования. Рост и вес измеряли с помощью весов (seca gmbh & co. Kg, Гамбург, Германия). Жир тела измеряли с помощью медицинского анализатора состава тела mBCA (seca gmbh & co. Kg, Гамбург, Германия). Физическая активность отслеживалась с помощью GPS-часов Forerunner 30 (Garmin Deutschland GmbH, Мюнхен, г. Германия) и ежедневный дневник, в котором дополнительно документировались все физические нагрузки. Все процедуры исследования были одобрены местным комитетом по этике Медицинской школы Ганновера (голосование № 7617), и все субъекты предоставили информированное письменное согласие до начала процедур исследования.

### Забор крови и анализы крови

Образцы крови были собраны в S-Monovette.1 пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА, для плазмы) или активатор сгустка (для сыворотки) во время госпитализации или включения в исследование (исходный уровень, BL) и при последующих посещениях (FU) через 12 месяцев для мужчин Rebirth 60Plus и женщины (возраст > 60 лет). Образцы крови были также взяты у молодых мужчин и женщин (возраст 18–50 лет) из здорового населения, установленного

Ганновский объединенный биобанк (HUB). Плазму или сыворотку отделяли центрифугированием при 1500 об / мин в течение 10 минут и аликвоты хранили при -80 ° С. Лабораторное обследование проводилось как часть рутинного анализа в больничных лабораториях на лейкоциты, нейтрофилы, лимфоциты, тромбоциты, СРБ и ЛДГ. Уровни PGE2 в сыворотке и плазме измеряли с использованием набора для ELISA простагландина E2 (abcam ab133021) в соответствии с протоколом производителя.

### Заражение клеток Calu-3 при лечении SARS-CoV-2 и таксифолином

Клетки Calu-3 (любезно предоставленные профессором Пельманном, Немецкий центр приматов, Геттинген; ATCC Cat # HTB-55; RRID: CVCL\_0609) поддерживали в модифицированной среде Eagle Дульбекко. и клетки Vero (ATCC-CCL-81; лот 58484194) в Advanced MEM при 37 ° С и 5% CO<sub>2</sub>. Обе среды были дополнены 10% эмбриональной бычьей сывороткой, 2 мМ глутамина, 0,1 мМ заменителя. тимальные аминокислоты и 1% пенициллин / стрептомицин. Calu-3 клетки (4.5x10<sup>5</sup> клеток / лунку) высевали в покрытые коллагеном 24-луночные планшеты. Для инфекции SARS-CoV-2 (штамм SARS-CoV-2 / München-1.2 / 2020/984, p3) [31 год], любезно предоставленный Кристианом Дростеном (Шарите, Берлин) через Европейский вирусный архив - Global (EVAg). Изолят размножали и титровали в клетках Vero. Клетки Calu-3 предварительно обрабатывали 100 мкМ таксифолином или ДМСО (0,15%) в течение 24 часов. Заражение изолятом SARS-CoV-2 проводили при множественности инфицирования (MOI) 2.0x10<sup>-5</sup> в течение 4 ч при 37 ° С в присутствии соединений. Вирус, инактивированный нагреванием (15 мин, 70 ° С), служил отрицательным контролем. После заражения клетки дважды промывали PBS перед добавлением среды, содержащей соответствующее соединение. Через 48 ч после инфицирования супернатант культуры собирали и инактивировали нагреванием (15 мин, 70 ° С) до обнаружения PGE2. РНК выделяли из клеточных лизатов с использованием набора NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) в соответствии с инструкциями производителя для анализа количества копий вирусного генома, COX-2, HPD, PTGES2, PTGES3, TNFα и экспрессии IFNγ.

### Титрование вируса в клетках Vero E6 при инфицировании срезов легких SARS-CoV2

Vero E6 (ATCC CRL-1586) и клетки Vero (ATCC CCL-81) поддерживали в минимальной необходимой среде Игла (EMEM) (Lonza) с добавлением 25 мМ HEPES (Gibco), 1 × GlutaMAX (Gibco), 100 Ед / мл пенициллина и 100 мкг / мл стрептомицина. Изолят SARS-CoV2 (штамм SARS-CoV-2 / München-1.2 / 2020/984, p3) [31 год] был любезно предоставлен Кристианом Дростеном. Запасы семян SARS-CoV-2 получали путем инокуляции Vero E6 (ATCC CRL-1586) при MOI 0,001, сбора и аликвотирования культурального супернатанта через 72 часа после заражения (hpi), а затем хранения аликвот при -80 ° С. Рабочие запасы SARS-CoV-2 были получены путем дополнительного пассажа на клетках Vero (ATCC CCL-81) при MOI 0,001. Зубной налет и срединная культура ткани инфекционная доза (TCID<sub>50</sub>) были проведены анализы для титрования культивированного вируса после обоих пассажей с использованием клеток Vero. Эта работа использовалась для *in vivo* инфекции тканей человека.

### Заражение прецизионных срезов легких человека (PCLS) SARS-CoV-2

PCLS поддерживали в среде DMEM / F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) с добавлением 2 мМ HEPES (Gibco), 1 × GlutaMAX (Gibco), 100 Ед / мл пенициллина и 100 мкг / мл стрептомицина; эту среду также использовали для разведения вирусов и инкубации после инфицирования. В день заражения PCLS промывали PBS (без Mg<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup>) затем инокулировали 1 × 10<sup>5</sup> PFU SARS-CoV-2 в 250 мкл среды на лунку в 48-луночных планшетах и инкубируют при 37°C. Через 2 часа инокулят удаляли и затем культивировали PCLS в 250 мкл среды DMEM / F12. При 72 и 120 hpi были собраны супернатанты и PCLS были фиксируется фиксирующим буфером (4% PFA, 0,1% глутарового альдегида и 200 мМ HEPES в ddH<sub>2</sub>O) в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем 24 ч при 4 ° С.

### QRT-PCR для NSP7 для подтверждения инфекции SARS-CoV-2

Инфекции SARS-CoV-2 в человеческих клетках Calu-3 и срезах и тканях легких человека были подтверждены экспрессией мРНК NSP7 с использованием qRT-PCR (прямой праймер: GGG CTC AAT GTG TCC AGT TAC, обратная грунтовка: TTG CCC TGT CCA GCA TT).

### Биопсия легких у пациентов с острым COVID-19

Пациентам с острым COVID-19 (AC, n = 6) был поставлен диагноз COVID-19, и они были положительно протестированы с помощью ПЦР, как описано [4]. Все пациенты с AC, использованные в этом исследовании, показали типичную гистопатологию острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), типичную для болезни COVID-19. Кроме того, экспрессия NSP7 использовалась для обнаружения вируса SARS-CoV-2 в биоптатах с тем ограничением, что из-за гетерогенного распределения вируса или уже устраненной острой инфекции ПЦР не всегда дает положительный результат в каждой области легких, и поэтому NSP7 может быть не обнаружен.

### Мультиплексная иммуногистохимия биопсий легких человека

Срезы FFPE для каждой группы (контроль (Ctrl) n = 3, острый COVID-19 (AC) n = 6, отторжение трансплантата (TR) n = 4) репрезентативно окрашивали с помощью ручного набора Opal 7-Color IHC Kit (Akoya Biosciences, Мальборо, Массачусетс), как описано ранее [32]. Первичные антитела CD4 (Cytomed SP35, 1:50), CD8 (Dako M0755, 1: 600), CD68 (Dako PGM1, 1: 750) и CD20 (Dako M0755, 1: 1000) были последовательно объединены с опаловым флуорофором. CD4-Opal520, CD8-Opal570, CD20-Opal540 и CD68-Opal650. Срезы сканировали с помощью системы Vectra 3 (Akoya Biosciences, Мальборо, Массачусетс). Области интереса (ROI) были выбраны репрезентативными для малых, средних и крупных сосудов для всего среза ткани. Количество проанализированных марок составило 43 для Ctrl, 74 для AC и 56 для TR. Для обнаружения CD20 + В-клеток анализ выполняли с помощью программного обеспечения inFormAdvanced Image Analysis Software версии 2.3.0 (Akoya Biosciences, Мальборо, Массачусетс) и ImageJ 1.53c (Wayne Rasband, Национальные институты здравоохранения, США).

### Стимуляция линий пре-В-клеток человека

Линии пре-В-клеток человека 697 (коллекция ACC42 DSMZ) и SUP-B15 (коллекция ACC389 DSMZ) культивировали в RPMI (Gibco) с добавлением 10% FBS. 5x10<sup>5</sup> клеток на мл предварительно инкубировали либо с антагонистом рецептора EP1 / EP2 AH6809 (10 мкМ, Tocris), либо с антагонистом рецептора EP4 GW627368 (10 мкМ, Tocris) в течение 2 часов. Добавляли PGE2 (10 мкМ, Sigma-Aldrich) и клетки собирали через 48 часов в TRIzol или окрашивали трипановым синим (Bio-Rad Laboratories) и подсчитывали для измерения соотношения живых и мертвых клеток и количества клеток с использованием автоматического счетчика клеток TC20 (Лаборатории Bio-Rad). Контрольные клетки инкубировали с растворителями (ДМСО или этанол (EtOH), среда 1 мкл / мл). В качестве альтернативы 5x10<sup>5</sup> на мл 697 и клетки SUP-B15 инкубировали с 10% человеческой сывороткой от пожилых людей (> 60 лет) до начала программы упражнений на исходном уровне (BL) и после 12М (12М FU) в течение 48 часов и собирали в TRIzol. Клетки SUP-B15 инкубировали с 10% человеческой сывороткой от пациентов с COVID-19 и от здоровых контролей. Клетки собирали через 48 часов в TRIzol.

### Обнаружение PGE2 и простагландина D2 (PGD2) в супернатантах Calu-3

Уровни PGE2 и PGD2 в супернатантах клеточных линий Calu-3 (нормализованные к общему содержанию РНК) измеряли с использованием набора для ELISA простагландина E2 (abcam ab133021) или

набор для ELISA простагландина D2 (Cayman Chemicals, № 512031), соответственно, согласно протоколам производителя.

## Выделение РНК и qRT-PCR

Тотальную РНК выделяли с помощью TRIzol (Thermo Fisher Scientific) и синтез кДНК выполняли, как описано ранее [33]. ПЦР в реальном времени с использованием метода зеленого красителя SYBR (Brilliant SYBR Green Mastermix-Kit, Thermo Fisher Scientific) выполняли с помощью системы ПЦР в реальном времени AriaMx (Agilent Technologies), как описано [33]. Экспрессию уровней мРНК нормализовали с помощью 2-ΔΔМетод КТ в отношении 18S, бета-2-микроглобулина (B2M) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Список праймеров для qRT-PCR, использованных в этом исследовании, представлен в файле добавок. [Таблица S1](#).

## Выделение РНК из фиксированной формалином и залитой парафином ткани

Выделение РНК из фиксированной формалином и залитой парафином ткани проводили с использованием прибора Maxwell. Набор для очистки RSC RNA FFPE (Promega Corporation, Мэдисон, Висконсин). Содержание РНК измеряли с помощью Qubit RNA IQAssay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

## Статистический анализ

Статистический анализ выполнялся с использованием GraphPad Prism версии 5.0a, 7.0 и 8.1.2 для Mac OS X (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

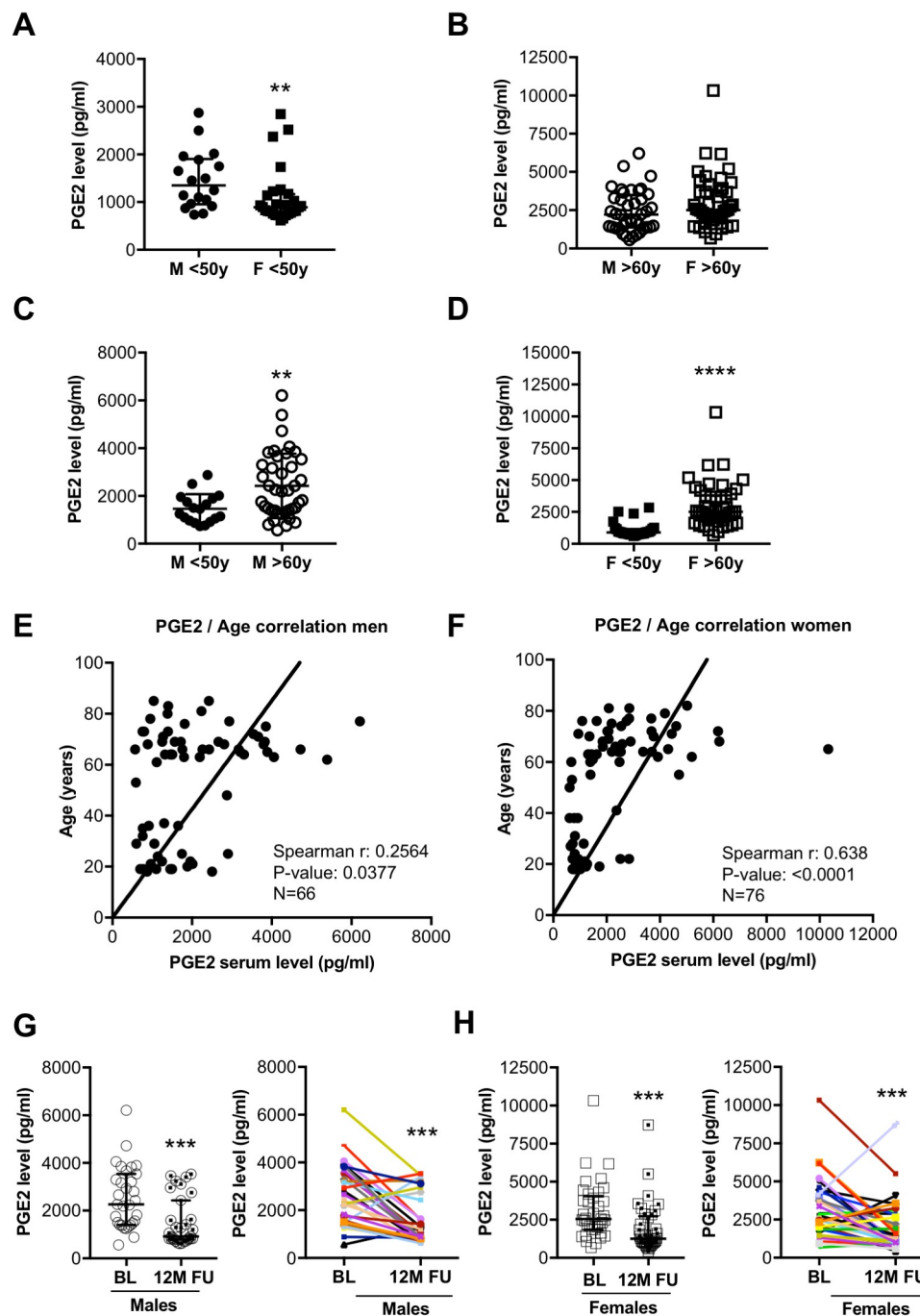
Нормальное распределение проверяли с помощью теста нормальности Д'Агостино или теста нормальности Шапиро-Уилка, если выборка была слишком маленькой для теста нормальности Д'Агостино. Непрерывные данные были выражены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение или медиана и межквартильный размах (IQR) в соответствии с нормальностью распределения. Сравнение двух групп проводилось на одном образце. t-тест или непарный двусторонний t-критерий для данных с распределением по Гауссу и тест Манна-Уитни-U, где хотя бы один столбец не был нормально распределен. При сравнении более двух групп использовались ANOVA и апостериорный тест Бонферрони или апостериорный тест Даннета в соответствии с нормальностью распределения. Категориальные переменные представлены в виде частот (процентов) и сравниваются с использованием точного критерия Фишера. Двусторонний  $p$  значение  $<0,05$  считалось статистически значимым. Корреляция для ИМТ, BW, содержания жира в организме и возраста была проанализирована с помощью анализа корреляции озоны с использованием коэффициентов корреляции Пирсона для гауссовых распределений или непараметрических коэффициентов корреляции Спирмена для ненормального распределения.

## Результаты

### Уровни PGE2 у здоровых людей в зависимости от пола и возраста

У здоровых контрольных лиц в возрасте  $<50$  лет уровни циркулирующего PGE2 были выше ( $P > 0,01$ ) у мужчин, чем у женщин (Рис. 1A). Связанные с полом различия в уровнях циркулирующего PGE2 не наблюдались у пожилых ( $<60$  лет) здоровых людей (Рис. 1B). Уровни циркулирующего PGE2 были заметно выше у здоровых мужчин и женщин старшего возраста ( $> 60$  лет), чем у соответствующих аналогичных по полу более молодых ( $<50$  лет) лиц (Рис. 1C и 1D). И мужчины, и женщины показали значительную положительную корреляцию уровней циркулирующего PGE2 с возрастом (Рис. 1E и 1F), тогда как корреляции с ИМТ, массой тела (BW) или содержанием жира в организме не наблюдалось (Таблица S2, S1 Рис). Контролируемые физические упражнения в течение 12 месяцев снижали уровень PGE2 у пожилых мужчин и женщин по сравнению с их исходными уровнями (BL) (Рис. 1G и 1H и Таблица S2). Следуя этим показаниям, мы собираемся изучить, изменяются ли уровни PGE2 при COVID-19 и могут ли различия в уровнях PGE2 объяснять тяжелое течение болезни после заражения SARS-CoV-2.





**Рисунок 1.** (A) Точечные графики суммируют уровни циркулирующего сывороточного PGE2 (пг / мл) мужчин (n = 18) и женщин (n = 28) в возрасте до 50 лет. (B) Точечные диаграммы суммируют уровни циркулирующего сывороточного PGE2 (пг / мл) мужчин (n = 40) и женщин (n = 46) старше 60 лет. (C) Точечные графики суммируют уровни циркулирующего сывороточного PGE2 (пг / мл) мужчин (n = 18) <50 лет и мужчин (n = 40) > 60 лет. (D) Точечные диаграммы суммируют уровни циркулирующего сывороточного PGE2 (пг / мл) женщин (n = 28) <50 лет и женщин (n = 46) > 60 лет. Озоновый корреляционный анализ сывороточных уровней PGE2 с возрастом у (E) мужчин (n = 66, Spearman  $r$ : 0.2564, P-value: 0.0377) и (F) женщин (n = 76, Spearman  $r$ : 0.638, P-value: < 0.0001). Уровни циркулирующего сывороточного PGE2 на исходном уровне (BL) и через 12 месяцев наблюдения (FU) после контролируемой физической подготовки мужчин (G) (n = 31) и (H) женщин (n = 37). (A, Б, Г, P < 0,01, P < 0,001, P < 0,0001, критерий Манна-Уитни-U. (C) Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, P < 0,01, непарный двусторонний t-контрольная работа. (E, F) Озоновая корреляция, коэффициенты корреляции Спирмена, двустороннее значение P. Базовые данные можно найти в [Данные S1](#).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255335.g001>

## Уровни циркулирующего PGE2 у пациентов с COVID-19 и здоровых людей того же возраста

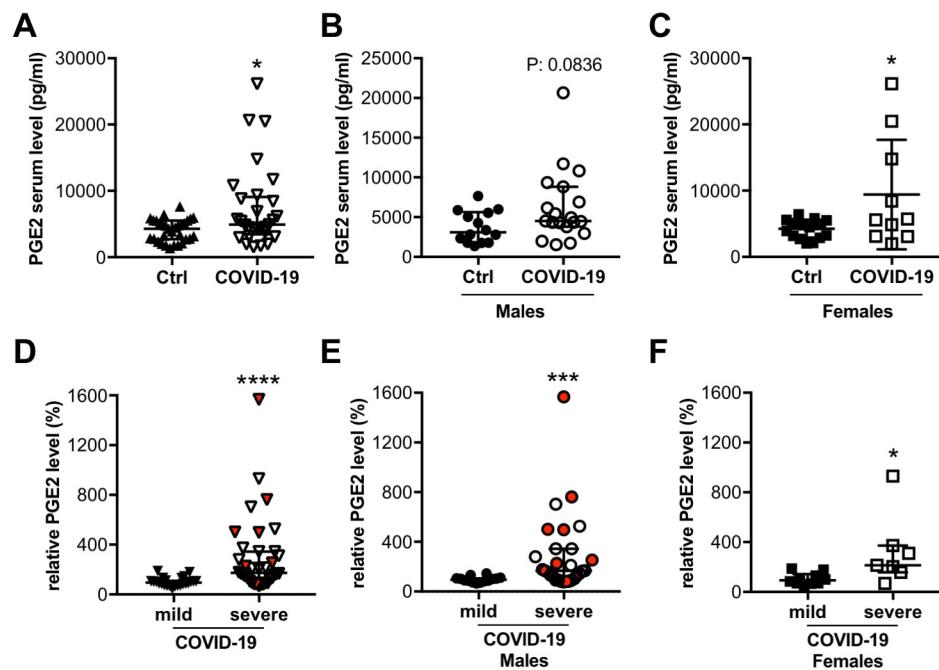
Мы проанализировали уровни PGE2 у лиц с легкой / умеренной ( $n = 41$ ) и тяжелой ( $n = 48$ ) болезнью COVID-19 из больниц в Ганновере (Германия), Милане (Италия) и Брюсселе (Бельгия), а также в контрольной группе здоровых людей соответствующего возраста. ( $n = 31$ ) (Таблица 1, Таблица S3). Клинические данные и лабораторные характеристики пациентов с COVID-19 показали, что пациенты с более тяжелым заболеванием были значительно старше и имели более высокую долю мужчин, чем женщины, по сравнению с группой пациентов с легкой / средней степенью поражения (Таблица 1). ИМТ и частота диабета увеличиваются во всей когорте COVID-19 без существенной разницы между легкой / умеренной и тяжелой группами (Таблица 1). Кроме того, уровень С-реактивного белка (СРБ) был повышен, в то время как общее количество лейкоцитов и нейтрофилов было в пределах нормы, хотя у некоторых пациентов наблюдались заметно повышенные уровни (Таблица 1). Среднее количество лимфоцитов (Т- и В-клеток) было снижено у большинства пациентов с COVID-19 и особенно низко у пациентов с тяжелым течением заболевания (Таблица 1). Уровень тромбоцитов был в пределах нормы во всех группах пациентов с COVID-19, а уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) был повышен и наиболее высок у пациентов с тяжелым поражением (Таблица 1). Смертность составила 15% для всей когорты без случаев смерти пациентов в группе легкой / средней степени тяжести и 27% пациентов, умерших в группе тяжелого заболевания, все были мужского пола (Таблица 1). Уровни циркулирующего PGE2 были увеличены у пациентов с COVID-19 во время госпитализации по сравнению со здоровыми людьми из контрольной группы, а уровни PGE2 были значительно выше у пациентов с тяжелым поражением по сравнению с пациентами с легким / умеренным поражением (Рис. 2A – 2F, Таблица 1). Прямая связь уровней PGE2 с событиями смерти не наблюдалась (Рис 2D – 2F). Пациенты с COVID-19, нуждающиеся в госпитализации, были определены как пациенты с тяжелой формой COVID-19. Индекс массы тела (ИМТ), С-реактивный белок (СРБ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), лейкоциты

**Таблица 1. Сводка клинических данных COVID-19** пациенты.

| Параметры                                                                                                                                                   | Всего больных COVID-19         | COVID-19 от легкой до умеренной степени тяжести | Тяжелая болезнь COVID-19         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------|
|                                                                                                                                                             | (N = 89)                       | (N = 41)                                        | (N = 48)                         |
| Возраст (лет, медиана $\pm$ IQR)                                                                                                                            | 59 (46–68)                     | 51 (40–67)                                      | 62 (51–68,75)                    |
| Пол Женский (%)                                                                                                                                             | 30% (27/89)                    | 44% (18/41)                                     | 19% (9/48)                       |
| Масса тела (кг, медиана $\pm$ IQR)                                                                                                                          | 79,5 (67,75–96,5)              | 75 (65,5–86,5)                                  | 90 (76–100)                      |
|                                                                                                                                                             | (n = 42)                       | (n = 25)                                        | (n = 17)                         |
| Рост (см, среднее $\pm$ стандартное отклонение)                                                                                                             | 171,9 $\pm$ 9,4                | 170 $\pm$ 9,28                                  | 174,6 $\pm$ 9,1                  |
|                                                                                                                                                             | (n = 43)                       | (n = 25)                                        | (n = 18)                         |
| ИМТ (медиана $\pm$ IQR)                                                                                                                                     | 27,2 (23,7–30,2)               | 26,56 (22,96–28,9)                              | 28 (25,5–31,95)                  |
|                                                                                                                                                             | (n = 43)                       | (n = 26)                                        | (n = 17)                         |
| Сахарный диабет (%)                                                                                                                                         | 28% (11/50)                    | 19% (5/26)                                      | 25% (6/24)                       |
| Общее количество лейкоцитов, количество / мкл (среднее $\pm$ стандартное отклонение) Стандартное значение: 3900–10200 импулсов / мкл                        | 8036 $\pm$ 5831                | 6803 $\pm$ 3213                                 | 9373 $\pm$ 7592                  |
|                                                                                                                                                             | (n = 50)                       | (n = 26)                                        | (n = 24)                         |
| Нейтрофилов, количество импулсов / мкл (среднее $\pm$ стандартное отклонение) Стандартное значение: 1500–7700 импулсов / мкл                                | 4999 $\pm$ 2697                | 4664 $\pm$ 2614                                 | 5502 $\pm$ 2839                  |
|                                                                                                                                                             | (n = 35)                       | (n = 21)                                        | (n = 14)                         |
| Лимфоцитов, количество импулсов / мкл (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) Стандарт значение: 1100–4500 импулсов / мкл                           | 1114 $\pm$ 564                 | 1266 $\pm$ 608                                  | <b>902 <math>\pm</math> 428</b>  |
|                                                                                                                                                             | (n = 36)                       | (n = 21)                                        | (n = 15)                         |
| СРБ, мг / л (среднее $\pm$ стандартное отклонение)                                                                                                          | <b>107 <math>\pm</math> 83</b> | <b>69,4 <math>\pm</math> 55,95</b>              | <b>147,1 <math>\pm</math> 89</b> |
| Стандартное значение: <5 мг / л                                                                                                                             | (n = 50)                       | (n = 26)                                        | (n = 24)                         |
| ЛДГ при госпитализации UI / л (медиана $\pm$ IQR)                                                                                                           | <b>363,5 (263,8–518,8)</b>     | <b>299 (229–375)</b>                            | <b>459 (348–659)</b>             |
| Стандартное значение: <248 UI / л                                                                                                                           | (n = 48)                       | (n = 25)                                        | (n = 23)                         |
| Тромбоциты при госпитализации 10 <sup>3</sup> /мкл (среднее $\pm$ стандартное отклонение) Стандартное значение: 160–370 10 <sup>3</sup> /мкл Смертность (%) | 229 $\pm$ 81                   | 235 $\pm$ 80                                    | 221 $\pm$ 83                     |
|                                                                                                                                                             | (n = 50)                       | (n = 26)                                        | (n = 24)                         |
|                                                                                                                                                             | 15% (13/89)                    | 0% (0/41)                                       | 27% (13/48)                      |

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255335.t001>





**Рис. 2. Уровни циркулирующего PGE2 повышены у пациентов с COVID-19.** Точечные диаграммы суммируют уровни циркулирующего сывороточного PGE2 (пг / мл) у (A) пациентов с COVID-19 (n = 29) и здоровых людей контрольной группы (n = 31), а также отдельно (B) для мужчин (пациенты мужского пола COVID19, n = 19; здоровые мужчины контрольной группы n = 14) и (C) женщины (пациенты женского пола с COVID-19 n = 10; здоровые женщины контрольной группы n = 17). Точечные графики суммируют относительные уровни циркулирующего PGE2 в плазме (%) (D) пациентов с тяжелой (n = 36) и легкой (n = 24) формой заболевания и отдельно (E) для мужчин (тяжелобольные мужчины n = 29; легкие пораженные мужчины n = 14) и (F) для женщин (тяжелобольные женщины n = 7; легкие больные женщины n = 10); медиана пациентов с легкой формой заболевания была установлена на уровне 100%. Точки, представляющие пациентов, умерших от COVID-19, выделены красным. (A, B, DF) Данные представлены как медиана  $\pm$  IQR,  $P < 0,05$ ,  $P < 0,001$ ,  $P < 0,0001$ , критерий Манна-Уитни-У. (C) Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение,  $P < 0,05$ , непарный двусторонний t-контрольная работа. Базовые данные можно найти в [Данные S1](#).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255335.g002>

Нормальное количество нейтрофилов, нормальное количество лимфоцитов и количество лимфоцитов ниже нормы анализировались при поступлении в больницу с помощью обычных клинических лабораторных тестов. Стандартные значения показателей крови указаны в столбце параметров. Значения, выходящие за пределы нормального диапазона, выделены жирным шрифтом. Сравнение между группами легкой и тяжелой формы COVID-19 было выполнено с использованием t-критерия Стьюдента для данных с распределением по Гауссу (представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение) и критерия Манна-Уитни-У, где по крайней мере один столбец не был нормально распределен (представлен как медиана и межквартильный размах (IQR)). Категориальные переменные представлены в виде частот (процентов) и сравнивались с использованием точного критерия Фишера.  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$  тяжелая форма COVID-19 по сравнению с COVID-19 от легкой до умеренной степени тяжести. Базовые данные можно найти в [Данные S1](#).

### Экспрессия COX-2 и HPGD и секреция PGE2 в эпителиальных клетках легких человека и прецизионных срезах легких, инфицированных SARS-CoV-2

Затем мы исследовали, может ли SARS-CoV-2 увеличивать продукцию PGE2 в инфицированных клетках-хозяевах. Эпителиальные клетки легких человека (клетки Calu-3) были инфицированы SARS-CoV-2 (штамм SARS-CoV-2 / München-1.2 / 2020/984, p3) [31 год] и инфекция была подтверждена с помощью qRT-PCR для гена SARS-CoV-2, кодирующего неструктурный белок (NSP) 7 [34] (Рис. 3A). Тепловая инактивация инфицированных SARS-CoV-2 супернатантов клеток Calu-3 не была связана с деградацией PGE2 (S2A Рис.). Инфицированные клетки проявляли повышенную секрецию PGE2, которую специально предотвращали инкубацией с ингибитором PGE2 Таксифолином [35 год, 36] (Рис. 3B). Синтез

другие простагландины, такие как PGD<sub>2</sub>, не были изменены Таксифолином в инфицированных клетках Calu-3 ([S3A Рис.](#)). Более того, лечение Таксифолином не было связано с изменением пролиферационной способности клеток Calu-3 ([S3B – S3D Рис.](#)).

Инфекция SARS-CoV-2 увеличивала экспрессию COX-2 и снижала экспрессию деградирующего PGE2 фермента HPGD, но не изменяла экспрессию PGE-синтазы (PTGES) в клетках Calu-3 ([Рис. 3C – 3E](#)). Напротив, экспрессия PGE-синтазы 2 (PTGES2) и PGE-синтазы 3 (PTGES3) была значительно снижена SARS-CoV-2 в клетках легких Calu-3 ([Рис 3F и 3G](#)). В соответствии с этими результатами, продукция PGD<sub>2</sub> также увеличивалась в инфицированных клетках Calu-3 ([S3E Рис.](#)). Кроме того, инфекция SARS-CoV-2 заметно индуцировала экспрессию TNF-α (644-кратный;  $P < 0,05$ , [S2B Рис.](#)), который, как известно, индуцирует экспрессию COX-2 и, следовательно, продукцию PGE2 в человеческих фибробластах [37]. Выражение IFNγ не может быть обнаружен в контроле или в SARS-CoV-2, инфицированном в клетках легких человека Calu-3. Так же *in vivo* инфицирование живых PCLS человека SARS-CoV-2 (вирусная инфекция проанализирована с помощью QRT-PCR NSP7, [Рис. 3H](#)) приводили к усилению экспрессии ЦОГ-2 по сравнению с неинфицированными контрольными срезами, в то время как уровни HPGDmRNA не изменялись, а экспрессия PGE-синтазы (PTGES) имела тенденцию к увеличению ([Рис. 3I – 3K](#)).

### Влияние PGE2 на экспрессию пре-В-клеточного фактора дифференцировки и выживания PAX5 в человеческих пре-В-клетках

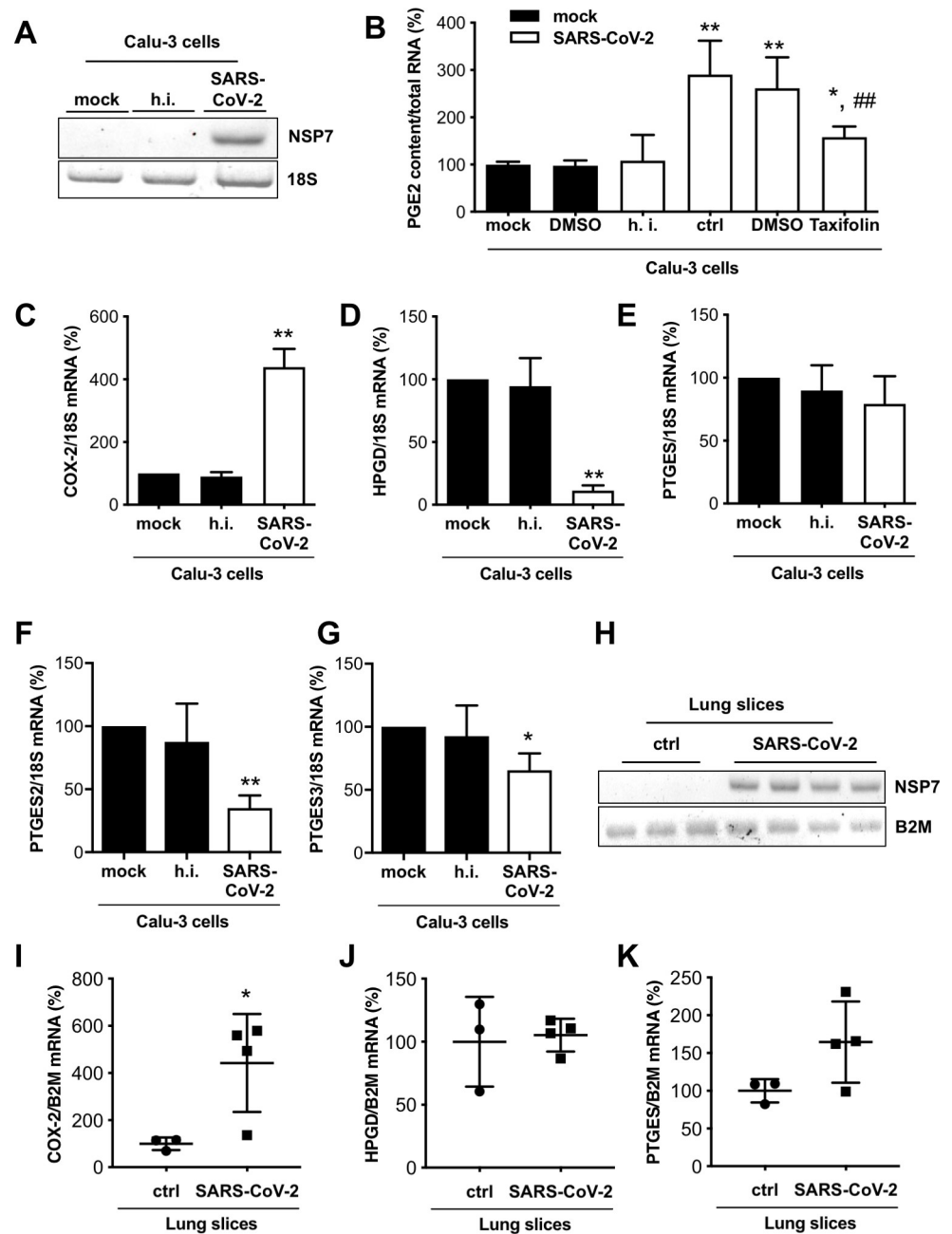
Известно, что PGE2 снижает пролиферацию, дифференцировку и выживаемость В-клеток [38, 39]. Здесь мы наблюдали, что добавление PGE2 (10 мкМ, т.е. 3525 пг / мл) в диапазоне, измеренном в сыворотках пациентов с COVID-19 (от 1300 до > 20000 пг / мл), к двум линиям предшественников В-клеток человека, 697 и SUP-B15, значительно снизили экспрессию мРНК PAX5 ([Рис. 4A и 4B](#)). Эффект PGE2 на PAX5 в клетках 697 и SUP-B15 может быть заблокирован совместной обработкой с антагонистом рецептора PGE2 4 (EP4; PTGER4), GW627368, но не с антагонистом рецептора EP2, AH6809 ([Рис 4A](#)). Экспрессия PTGER4 в 697 и SUP-B15. Клетки подтверждали с помощью qRT-PCR ([S4A и S4B Рис.](#)). Кроме того, стимуляция PGE2 (10 мкМ) была связана с уменьшением количества 697 клеток (51%) по сравнению с контрольными (100%,  $p < 0,01$ ) обработанными 697 клетками. Соотношение живых и мертвых пре-В-клеток не было изменено посредством стимуляции PGE2, что указывает на то, что уменьшение количества пре-В-клеток не опосредовано усилением гибели клеток ([S4C Рис.](#)). Однако стимуляция PGE2 была связана со сниженной экспрессией маркеров пролиферации Ki67, TOP2A и TPX2 ([S4D – S4F Рис.](#)), что указывает на то, что он снижает способность пре-В-клеток к пролиферации.

### Влияние PGE2 на экспрессию воспалительных цитокинов TNFα и IFNγ в человеческих пре-В-клетках

Во время инфекции SARS-CoV-2 активация индуцирующих PANоптоз цитокинов, то есть TNFα и IFNγ сообщалось в иммунных клетках [40]. Здесь стимуляция PGE2 снижает экспрессию TNF-α в обеих линиях пре-В-клеток 697 и SUP-B15 ([S5A и S5B Рис.](#)). Выражение IFNγ не изменился в клетках 697, а в клетках SUP-B15 PGE2 снижал его экспрессию ([S5C и S5D Рис.](#)).

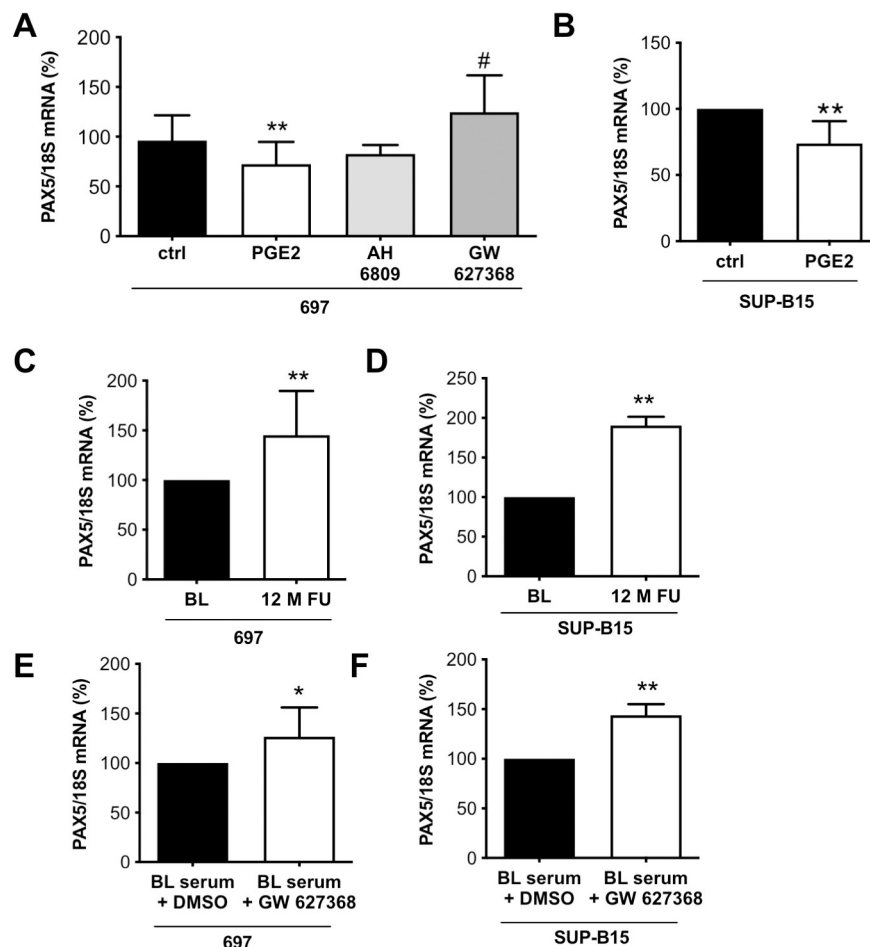
### Влияние сыворотки пожилых людей до / после физических упражнений на экспрессию PAX5 в пре-В-клетках человека

Экспрессия PAX5 была выше в 697 и пре-В-клетках SUP-B15, инкубированных с сывороткой пожилых людей, собранной после 12 месяцев контролируемых физических упражнений, по сравнению с их сывороткой до упражнений ([Рис. 4C и 4D](#) и [Таблица S2](#)). Кроме того, антагонист EP4,



**Рис. 3. Инфекция SARS-CoV-2 модулирует секрецию PGE2 и экспрессию COX-2 и HPGD.** (A) Типичное изображение геля экспрессии мРНК NSP7 клеток Calu-3, инфицированных SARS-CoV-2, и контрольных клеток. (B) Гистограмма суммирует содержание PGE2 в супернатантах клеток Calu-3, инфицированных SARS-CoV-2 и обработанных таксифолином. (n = 4) по сравнению с необработанным маком (n = 6), контролем ДМСО (n = 8) и инактивированным нагреванием (привет) SARS-CoV-2 (n = 6), нормализованными к общей РНК. Гистограммы суммируют экспрессию мРНК (C) COX-2, (D) HPGD, (E) PTGES, (F) PTGES2 и (G) PTGES3 клеток Calu-3, инфицированных SARS-CoV-2 (n = 3). (H) Типичное изображение геля экспрессии NSP7 и B2M мРНК срезов легких, инфицированных SARS-CoV-2 (120 hpi), и контрольных срезов. Гистограммы суммируют экспрессию мРНК (I) COX-2, (J) HPGD и (K) PTGES срезов легких, инфицированных SARS-CoV-2 (120 hpi; n = 3 для ctrl, n = 4 для SARS-CoV-2 инфекция). Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, (B) непарные двусторонние t-контрольная работа,  $P < 0,05$  по сравнению с ложным,  $P < 0,01$  по сравнению с ложным, ##  $P < 0,01$  по сравнению с SARS-CoV-2 + DMSO. (CG) Один образец t-теста,  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  по сравнению с ctrl, (IK) непарный двусторонний t-контрольная работа,  $P < 0,05$  по сравнению с контр. Базовые данные можно найти в [Данные S1](#) и необрезанные изображения геля в [S6 Рис.](#)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255335.g003>



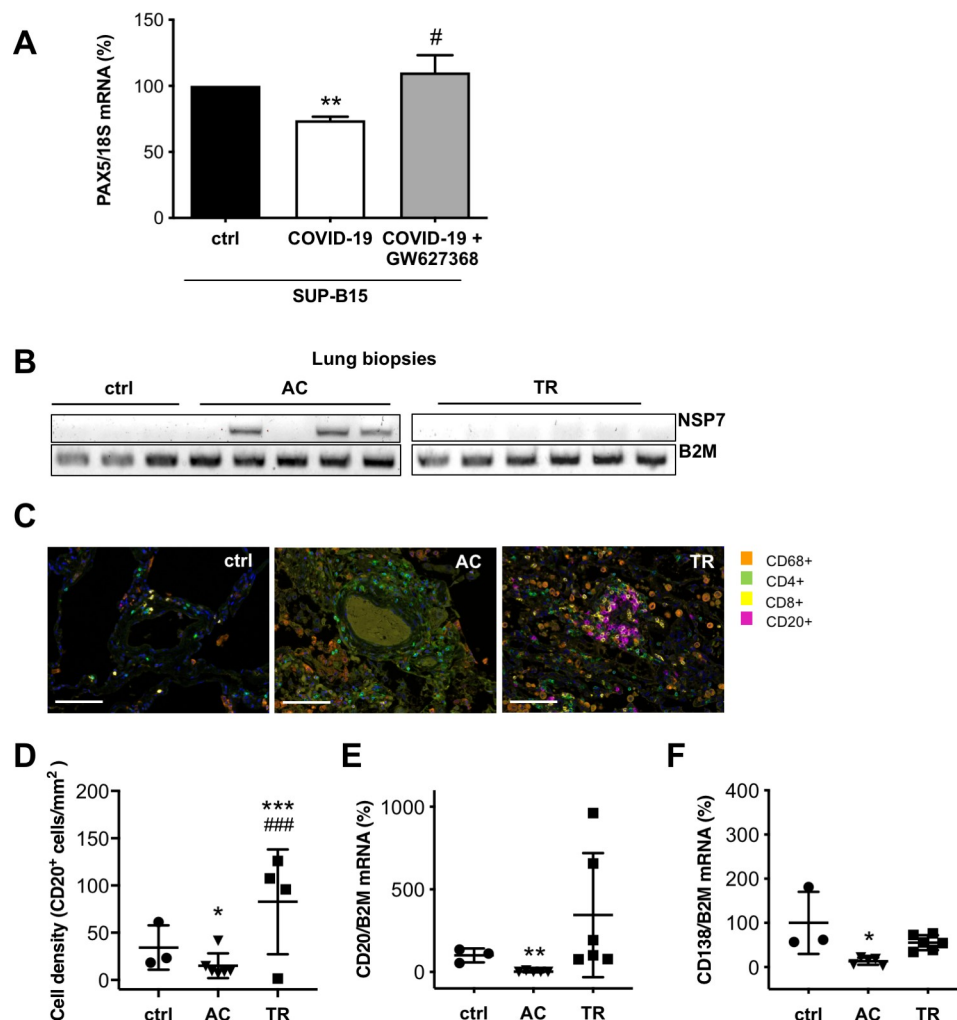
**Рис. 4. Стимуляция В-клеток PGE2 модулирует иммунный ответ.** (A) Гистограмма суммирует экспрессию мРНК PAX5 697 пре-В-клеток, обработанных AH6809 (10 мкМ) или GW627368 (10 мкМ) и PGE2 (10 мкМ) в течение 48 часов ( $n = 18$  для клеток, обработанных ctrl и PGE2,  $n = 3$  для клеток, обработанных AH6809, и  $n = 6$  для клеток, обработанных GW627368). (B) Гистограмма суммирует экспрессию мРНК PAX5 линии пре-В-клеток человека SUP-B15 с PGE2 (10 мкМ) в течение 48 часов ( $n = 9$ ). (C) Гистограмма суммирует экспрессию мРНК PAX5 697 пре-В-клеток, обработанных человеческой сывороткой, собранной в BL и через 12 месяцев FU контролируемой физической тренировки ( $n = 11$ ). (D) Гистограмма суммирует экспрессию мРНК PAX5 пре-В-клеток SUP-B15, обработанных человеческой сывороткой, собранной в BL и через 12 месяцев FU контролируемой физической тренировки ( $n = 4$ ). Гистограмма суммирует экспрессию мРНК PAX5 (E) 697 ( $n = 11$ ) и (F) SUP-B15 ( $n = 2$ ) пре-В-клеток, обработанных сывороткой от пожилых людей с высокими уровнями PGE2 с и без GW627368 (10 мкМ). Контрольные клетки преВ обрабатывали растворителем ДМСО. (A) непарный двусторонний t-контрольная работа,  $P < 0,01$  по сравнению с ctrl, # $P < 0,05$  по сравнению с PGE2, (BF) Один образец t-критерия,  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  по сравнению с ctrl или BL, среднее значение ctrl или BL было установлено на 100%. Базовые данные можно найти в [Данные S1](#).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255335.g004>

GW627368 увеличивал PAX5 в пре-В-клетках 697 и SUP-B15, подвергнутых воздействию сыворотки, собранной перед физической нагрузкой, что указывает на то, что подавляющий эффект опосредуется PGE2-EP4 (Рис. 4E и 4F).

### Влияние сыворотки от пациентов с COVID-19 на экспрессию PAX5 в пре-В-клетках человека

Сыворотка от пациентов с COVID-19 с повышенными уровнями PGE2 снижала экспрессию PAX5 в клетках SUP-B15 по сравнению с сывороткой от здоровых контролей. Опять же, этот эффект блокировался при совместной обработке с антагонистом рецептора 4 PGE2 (EP4), GW627368 (Рис 5A).



**Рис. 5. Модуляция иммунного ответа у пациентов с COVID-19.** (A) Гистограмма суммирует экспрессию мРНК PAX5 пре-В-клеток SUP-B15, обработанных сывороткой от здоровых контролей (сыворотка объединена с 9 контрольными) и от пациентов с COVID-19 (сыворотка объединена от 9 пациентов с COVID-19), инкубированных с и без GW627368 (10 мкМ). Контрольные клетки обрабатывали растворителем ДМСО (n = 6 лунок с контрольной сывороткой и n = 3 лунки с сывороткой пациентов с COVID-19 с GW627368 и без него). (B) Типичное изображение геля экспрессии NSP7 и B2MmRNA в контрольной легочной ткани (ctrl), в легочной ткани пациентов с тяжелой острой болезнью COVID-19 (AC) и в легочной ткани, полученной после отторжения трансплантата (TR). (C) Иммуногистохимическое окрашивание иммунных клеток CD68 +, CD4 +, CD8 + и CD20 + (шкала: 100 мкм). (D) Точечный график, суммирующий иммуногистохимическое количественное определение CD20-положительных В-клеток на площадь (мм). Точечные графики суммируют экспрессию мРНК (E) CD20 и (F) CD138 в контрольной легочной ткани (ctrl), в легочной ткани пациентов с тяжелым острым заболеванием COVID-19 (AC) и в легочной ткани, полученной после отторжения трансплантата (TR). (A) Один образец t-теста, P < 0,01 по сравнению с ctrl, # P < 0,05 по сравнению с сывороткой от пациентов с COVID-19. (D) Статистический анализ проводился с использованием обобщенной линейной модели с распределением Гаусса и весами, скорректированными в соответствии с количеством ROI на пациента. P < 0,001 по сравнению с ctrl, ### P < 0,001 по сравнению с AC. (E, F) непарный двусторонний t-контрольная работа,

P < 0,01 против ctrl, P < 0,05 по сравнению с контр. Базовые данные можно найти в [данных S1](#) и необрезанные изображения геля в [S7 Рис.](#)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255335.g005>

### Анализ В-клеток в легких пациентов, умерших от тяжелой острой болезни COVID19, по сравнению со здоровыми контрольными людьми и биопсиями отторжения трансплантата

В биопсиях легких пациентов, умерших от тяжелого острого заболевания COVID-19 (группа AC, подтвержденная qRT-PCR для NSP7, [Рис. 5B](#)), сигналы для пре-В-клеток CD20 (qRT-PCR и иммуногистохимическая количественная оценка) и плазматических клеток (qRT-PCR для CD138) были едва заметны.

обнаруживается и ниже, чем в контрольной легочной ткани (ctrl), и заметно ниже, чем в легочной ткани, полученной после отторжения трансплантата (TR, [Рис. 5C – 5F](#)). Иммуноокрашивание легочной ткани показало повышенное количество CD68 + макрофагов и CD4 + Т-клеток в AC и TR по сравнению с контрольной биопсией легкого ([Рис. 5C](#)).

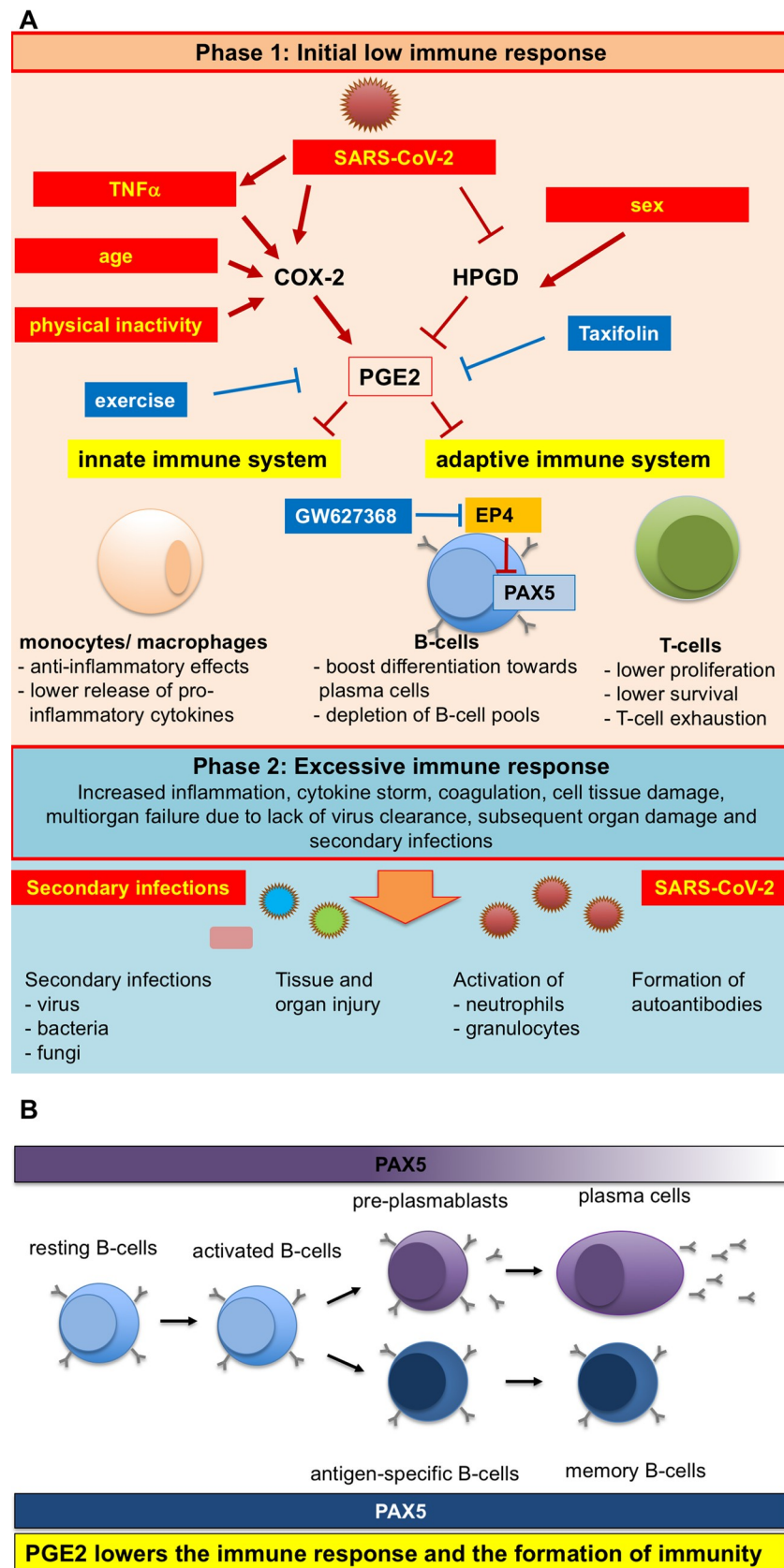
## Обсуждение

Ключевой вывод этого исследования заключается в том, что уровень PGE2 повышен у пациентов с заболеванием COVID-19, причем самые высокие уровни в крови наблюдаются у тех, кто серьезно пострадал. Кроме того, SARS-CoV-2 сам по себе активирует PGE2 в инфицированных клетках-хозяевах, а такие факторы риска, как мужской пол, возраст и малоподвижный образ жизни, также связаны с более высокими уровнями PGE2 в сыворотке. Наконец, PGE2 ослабляет опосредованный В-клетками иммунный ответ, по крайней мере частично, за счет снижения PAX5, в то время как ингибитор PGE2 таксифолин ослабляет индуцированное SARS-CoV-2 производство PGE2. Более того, регулярные упражнения также снижают уровень PGE2 у пожилых людей, что связано с повышенным продуцированием PAX5 в В-клетках, подвергшихся воздействию этих сывороток. Таким образом, PGE2 может выступать в качестве модулирующего фактора тяжести заболевания и развития иммунитета и, следовательно, может быть терапевтической мишенью для профилактики и лечения COVID-19.

Поскольку известно, что PGE2 может оказывать иммунодепрессивное действие во время вирусной инфекции [[25-27](#)], его повышение может критически снизить исходную защиту от SARS-CoV-2 и, таким образом, привести к более тяжелому течению заболевания. Интересно, что наши данные показывают, что вирус SARS-CoV-2 не только захватывает механизм экспрессии генов клетки-хозяина для репликации, но также заставляет инфицированные клетки-хозяева продуцировать PGE2 путем активации фермента, генерирующего PGE COX-2, и, по крайней мере, частично за счет снижения экспрессии фермента, разлагающего PGE2, HPDG ([Рис 6](#)). В соответствии с повышающей регуляцией COX-2, но без специфической повышающей регуляции синтаз PGE2 с помощью SARS-CoV-2 в инфицированных клетках легких человека, также увеличивалась продукция другого простагландина, PGD2. Однако изучение регуляции и роли PGD2 в заболевании COVID19 выходит за рамки настоящего исследования и требует дальнейшего изучения. Кроме того, мы предоставляем доказательства того, что сообщаемые факторы риска более тяжелого течения заболевания COVID-19, то есть мужской пол, возраст и малоподвижный образ жизни [[13, 41 год](#)] связаны с более высокими уровнями PGE2, поскольку уровни PGE2 в сыворотке выше у мужчин, чем у женщин, выше у пожилых (> 60 лет) лиц обоих полов, чем у молодых людей, а уровни PGE2 у пожилых людей могут быть снижены регулярными упражнениями ([Рис 6](#)). Эти данные могут объяснить, почему мужчины или пожилые люди страдают больше, чем женщины или молодые люди. Связанные с полом различия в уровнях циркулирующего PGE2 оказались специфичными для более молодых людей, поскольку в когорте здоровых людей старше 60 лет таких различий не наблюдалось. В будущих исследованиях необходимо выяснить, влияют ли возрастные гормональные изменения у пожилых женщин на возрастной эффект у женщин.

В дополнение к уже известным эффектам PGE2 на иммунные клетки, мы обнаружили новый механизм, с помощью которого PGE2 в сыворотке от пациентов с COVID-19 специфически воздействует на пре-В-клетки, поскольку PGE2 в сыворотке пациентов с COVID-19 снижает экспрессию PAX5 в пре-В-клетках человека. -В-клетки через свой рецептор EP4. PAX5 является главным регулятором большинства аспектов жизненного цикла В-клеток, поскольку он подавляет транскрипцию генов, необходимых для развития других гемопоэтических клонов и плазматических клеток, и контролируя многочисленные гены, необходимые для раннего развития, рекомбинации антиген-рецептор, , сигнализация и адгезия [[42-44 год](#)]. Более того, хотя для описанных выше процессов необходима высокая экспрессия PAX5, ее снижение важно для окончательной дифференциации короткоживущих плазматических клеток и продукции их антител (AB). Таким образом, высокие уровни PGE2 в сыворотке, с одной стороны, уменьшают количество пре-В-клеток, но, с другой стороны, усиливают терминальную дифференцировку В-клеток в сторону короткоживущих плазматических клеток, две особенности, которые в долгосрочной перспективе могут привести к истощению резервуар В-клеток. Эта особенность может объяснить, почему некоторые пациенты с изначально высокими титрами антител, направленных на SARS-CoV-2, но развивающиеся





**Рис. 6. Схематическое изображение плейотропного влияния инфекции SARS-CoV-2, физической активности и возраста на уровни PGE2 и последующего изменения иммунного ответа.** (А) Модуляторами синтеза и деградации PGE2 являются инфекция SARS-CoV-2, а также отсутствие физической активности, пол и пожилой возраст, которые являются факторами риска для более тяжелых течений заболевания COVID-19 [7, 13-15]. Кроме того, инфекция SARS-CoV-2 индуцирует TNF- $\alpha$  экспрессию, которая, как известно, опосредует повышенную экспрессию ЦОГ-2 [37]. Эти модуляторы повышают экспрессию фермента, вырабатывающего PGE2, COX-2 и, по крайней мере, частично снижают экспрессию фермента, разрушающего PGE2, HPGD, что приводит к увеличению образования и секреции PGE2. PGE2 нацелен на врожденную иммунную систему (моноциты / макрофаги), где он снижает его эффективность по удалению патогенов частично за счет снижения высвобождения цитокинов [46, 59]. Кроме того, PGE2 ухудшает ответ адаптивной иммунной системы против патогенов, снижая пролиферацию и выживаемость Т-клеток и индуцируя Т-клетки [3, 52, 60, 61]. Кроме того, PGE2 нарушает ответ В-клеток на патогены, частично за счет прямого подавления специфического для В-клеток фактора транскрипции PAX5 [62]. Повышенную секрецию PGE2 можно предотвратить с помощью физических упражнений и специфических ингибиторов PGE2, таких как таксифолин. Кроме того, Таксифолин снижает репликацию вирусов. Низкий иммунный ответ (фаза 1) может способствовать появлению вторичных инфекций, вызванных бактериями и грибами, и повторным инфекциям SARS-CoV-2, связанным с повреждением тканей и органов, образованием аутоантител, потенциально ведущим к цитокиновому шторму и чрезмерному иммунному ответу [20-24]. (В) В пре-В-клетках PAX5 отвечает за подавление других программ гемопоэтической дифференцировки и способствует пролиферации, выживанию и дифференцировке пре-В-клеток [42-44 год]. PGE2 снижает экспрессию PAX5 через его рецептор EP4, что не только снижает их выживаемость и пролиферацию, но и повышает дифференцировку В-клеток в направлении плазматических клеток и может даже позволить трансдифференцировку, особенности, которые могут привести к цитокиновому шторму, но также и к истощению В-пул клеток (и зародышевые центры) [19, 42]. Кроме того, поскольку PAX5 важен для формирования клеток памяти, PGE2 также снижает формирование иммунитета [44 год, 47]. Блокирование передачи сигналов EP4 антагонистом рецептора EP4 GW627368 предотвращает подавление PAX5 в пре-В-клетках и может улучшить вирусную защиту и формирование иммунитета против SARS-CoV-2.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255335.g006>

в сторону тяжелого течения заболевания демонстрируют уменьшение зародышевых центров [19] и после этого снизился ответ В-клеток. Наши данные о посмертной ткани легких пациентов, умерших от COVID19, соответствуют этой интерпретации. Действительно, мы обнаружили снижение количества CD20 + В-клеток в ткани легких COVID-19 по сравнению со здоровой контрольной тканью или с биопсией легких после отторжения трансплантата. Аналогичным образом, другие отчеты не показывают значительной инвазии лимфоцитов в сердечную ткань, несмотря на присутствие частиц SARS-CoV-2 [10, 11]. Дополнительные исследования предполагают более высокий риск развития тяжелых заболеваний у пациентов с COVID-19 с дисфункциональными В-клетками из-за общих переменных иммунодефицитных состояний (CVID) [18], в то время как пациенты с более крупными пулами наивных В-клеток, по-видимому, вырабатывают более эффективный иммунный ответ на SARS-CoV-2 [45].

Наблюдаемые низкие сигналы В-клеток в биоптатах легких пациентов, умерших во время острой инфекции SARS-CoV-2, также могут указывать на потерю этих иммунных клеток из-за ПАНоптоза (гибели воспалительных клеток). В связи с этим Karki et al. сообщили, что во время заражения SARS-CoV-2 комбинация TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  может вызвать ПАНоптоз [40]. Однако мы наблюдали обратное, т.е. PGE2 снижал экспрессию TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  в пре-В-клетках - это свойство, о котором также сообщалось для моноцитов и макрофагов [46].

Более того, мы обнаружили, что PGE2 снижает пролиферацию человеческих пре-В-клеток, наблюдение, которое хорошо согласуется с PGE2-опосредованным снижением PAX5 и, таким образом, может способствовать редифференциации В-клеток в инфицированной ткани.

Кроме того, поскольку мы наблюдали, что клетки легких, инфицированные SARS-CoV-2, активируют TNF $\alpha$  экспрессию и поскольку TNF $\alpha$  известно, что индуцирует экспрессию ЦОГ-2, мы обнаружили один возможный механизм, как SARS-CoV-2 может повышать выработку PGE2 в инфицированных тканях (Рис. 6А) [37].

Как сообщалось выше, высокий уровень PGE2 в сыворотке COVID-19 ослабляет опосредованный В-клетками иммунный ответ, по крайней мере частично, за счет снижения PAX5. Экспрессия PAX5 также необходима для развития В-клеток памяти после того, как фолликулярные В-клетки столкнулись с антигенами [44 год, 47]. В связи с этим повышенный уровень PGE2 также снизил бы способность организма развивать длительный иммунитет после заражения COVID-19. Действительно, есть сообщения о повторном инфицировании людей с SARS-CoV-2 [48-50], включая недавний случай пациента с CD20 + В-клеточным острым лимфобластным лейкозом, у которого после первоначального выздоровления развились высокие титры АВ против COVID-19. Однако у пациентки произошла вирусная реактивация после того, как она потеряла COVID-19.

AB после приема ритуксимаба, цитарабина и дазатиниба от лейкемии и перенесла тяжелую пневмонию COVID-19 с лимфопенией и высокими маркерами воспаления [51]. PGE2 не только влияет на В-клетки, но также способствует истощению Т-клеток и вирусной экспансии через EP2 и EP4, как показали недавние исследования [52] и иммуносупрессия, вызванная истощением и истощением Т-клеток, были предложены как вклад в персистенцию вируса и смертность у пациентов с COVID-19 [3].

Основываясь на предполагаемой решающей роли PGE2 в течении заболевания COVID-19, мы проверили потенциал ингибитора PGE2 таксифолина, также известного как дигидрокверцетин, по ограничению индуцированного SARS-CoV2 производства PGE2 в клетках легких человека (Рис. 6A). В соответствии с нашей гипотезой о том, что PGE2 способствует тяжелому заболеванию COVID-19, таксифолин значительно снизил производство PGE2 в инфицированных клетках легких. Кроме того, недавняя публикация о скрининге естественных ингибиторов SARS-CoV-2 *in silico* идентифицировала Таксифолин как прямой ингибитор основной протеазы SARS-CoV-2 [53]. Таксифолин - мощный флавоноид с противовоспалительным действием, который присутствует в виде природного соединения в овощах и фруктах, а также в лиственнице сибирской, *Larix sibirica*, [35 год, 36]. Он легко доступен в продуктах питания и может быть протестирован непосредственно на пациентах с COVID-19. Синтез PGE2 может подавляться НПВП, которые блокируют ЦОГ-1 и -2. Однако известно, что НПВП мешают ПААС [54] и в этом контексте были получены противоречивые данные, свидетельствующие о том, что НПВП могут способствовать проникновению SARS-CoV-2 за счет активации ACE2 [55, 56]. Более того, НПВП, ингибируя ЦОГ-1 и -2, также могут снижать образование дополнительных простагландинов, что может иметь положительные эффекты. Поэтому, поскольку безопасность использования НПВП при лечении пациентов с COVID-19 обсуждается критически, мы решили использовать таксифолин в качестве альтернативной стратегии лечения. Действительно, мы смогли показать, что таксифолин блокировал только синтез PGE2, индуцированный SARS-CoV2, но не синтез PGD2 в инфицированных клетках легких. Ингибирование микросомальной простагландин Е-синтазы-1 (mPGES-1) сонликоманолом (Khondrion; препарат, который в настоящее время проходит фазу 2b исследований митохондриального заболевания), также может быть полезным у пациентов с COVID-19 (Рис. 6A). Более того, пациенты с COVID-19 также могут получить пользу от ингибиторов COX, таких как аспирин и ибупрофен, на ранней стадии заболевания, как было предложено в недавнем обзоре [57 год]. Лечение пациентов с легкими и тяжелыми поражениями кортикоидами, такими как дексаметазон или медрол, было связано с лучшими результатами. Здесь мы наблюдали, что кортикоиды, по-видимому, не влияют на уровни циркулирующего PGE2, хотя количество пациентов в этих анализах подгруппы было слишком низким, чтобы сделать окончательный вывод. Наконец, мы предоставляем доказательства того, что регулярная физическая активность снижает уровень PGE2 в сыворотке крови пожилых людей без инфекции COVID-19 и, таким образом, может поддерживать их иммунную систему в борьбе с инфекцией SARS-CoV-2 (Рис. 6A).

Таким образом, известные факторы риска тяжелого заболевания COVID-19, такие как возраст, пол и отсутствие физической активности, связаны с повышенными уровнями PGE2 до инфицирования и, таким образом, могут способствовать снижению иммунного ответа во время инфекции SARS-CoV-2. Кроме того, инфекция SARS-CoV-2 может еще больше подорвать иммунный ответ за счет дополнительной активации PGE2 у лиц с уже существующими более высокими уровнями PGE2. Кроме того, известно, что воздействие высоких уровней вирусных частиц SARS-CoV-2 способствует тяжелому заболеванию COVID-19 также у лиц с низкими факторами риска (например, тяжелые заболевания у медсестер и врачей) [58]. Поскольку мы могли продемонстрировать, что клетки-хозяева, инфицированные SARS-CoV-2, производят высокие уровни PGE2, массивное заражение вирусом SARS-CoV-2 может привести к высокой секреции PGE2 и высоким уровням циркулирующего PGE2, что впоследствии снижает иммунный ответ также у человека с низким риском тяжелого заболевания.

## Выводы

В заключение, наши данные показывают, что продукция PGE2, вызванная инфекцией SARS-CoV-2 или определяемая эндогенными и экзогенными факторами риска, критически влияет на COVID-19.

тяжесть заболевания, (Рис. 6А). Механически мы показываем, что PGE2 специфически нацелен на В-клетки, уменьшая PAX5, ключевой фактор пролиферации и дифференцировки В-клеток (Рис. 6А и 6В). Поэтому профилактическое снижение уровня PGE2 и / или во время заболевания COVID-19 может обеспечить ценную терапевтическую стратегию для предотвращения и борьбы с инфекцией SARS-CoV-2, а также для повышения и продления иммунитета.

### Ограничения исследования

Ограничения нашего исследования включают ограниченное количество образцов крови от пациентов с COVID-19 и клинические данные о пациентах с COVID-19, то есть о С-реактивном белке (CRP), лактатдегидрогеназе (LDH), нормальном количестве лейкоцитов, нормальном количестве нейтрофилов и лимфоциты были доступны не для всех пациентов.

Синтез PGE2 может быть заблокирован кортикостероидами, ингибирующими фосфолипазы, или НПВП, ингибирующими циклооксигеназу. В этом исследовании во время забора крови часть пациентов с COVID-19 с легкой или тяжелой формой заболевания лечилась кортикостероидами или НПВП. Информация об использовании НПВП или модификаторов лейкотриенов отсутствовала. Уровни PGE2 у этих пациентов могут быть недооценены, поскольку оба препарата могут снижать биосинтез PGE2.

Большинство людей в коллективе здоровых пожилых людей демонстрировали связанный с возрастом нормальный ИМТ, а числа в подгруппе с повышенным или пониженным ИМТ были слишком низкими для проведения окончательного корреляционного анализа с уровнями PGE2.

Образцы сыворотки и плазмы необходимо немедленно хранить при -80 ° C, чтобы избежать деградации PGE2 и дальнейшего синтеза простагландинов под действием COX-2. Для настоящего исследования сыворотку и плазму немедленно обрабатывали, замораживали и хранили при -80 ° C.

Венепункция и *ex vivo* Активация тромбоцитов может изменить концентрацию простаноидов в плазме, что нельзя полностью исключить.

### Вспомогательная информация

#### **S1 Рис. Уровни PGE2 в сыворотке не коррелировали с ИМТ, BW или содержанием жира в организме.**

Озоновый корреляционный анализ сывороточных уровней PGE2 с (AE) BMI ((A) мужчины: n = 40, Spearman r: -0,1485, значение P: 0,3604; (B) мужчины в нормальном диапазоне BMI 25-30: n = 24, Spearman r: -0,1231, значение P: 0,5667; (C) мужчины с ИМТ > 30: n = 9, Spearman r: 0,3167, значение P: 0,4101 (D) мужчины с BMI <25: n = 7, Spearman r: -0,2143, значение P: 0,6615 (E) женщины: n = 45, значение Pearson r: 0,03956, значение P: 0,7964), (F, G) BW (мужчины: n = 40, Spearman r: -0,08246, значение P: 0,6130 ; женщины: n = 45, Pearson r: 0,05614, значение P: 0,7142) и (H, I) содержание жира в организме (мужчины: n = 37, Pearson r: -0,03295, значение P: 0,8465; женщины: n = 43, Pearson r: 0,1374, значение P: 0,3797) у мужчин (AD, F, H) и женщин (E, G, I). (AI) Озоновая корреляция, коэффициенты корреляции Спирмена или Пирсона, двустороннее значение P. Базовые данные можно найти в [Данные S1](#). (TIFF)

**S2 Рис. Инфекция SARS-CoV-2 в клетках Calu-3.** (A) Термоинактивация (hi) PGE2 в течение 30 минут при 70 ° C по сравнению с необработанным PGE2 (ctrl) из того же образца (n = 4). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, ctrl был установлен на 100%, однократный t-контрольная работа. (B) Гистограмма суммирует экспрессию мРНК TNFα инфекции SARS-CoV-2 в клетках Calu-3 в лизатах клеточных культур (n = 3 независимых эксперимента на клеточных культурах). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, фиктивное значение установлено на 100%, P <0,05 по сравнению с имитацией, #P <0,05 по сравнению с высоким, односторонний дисперсионный анализ, апостериорный тест Даннета.

Базовые данные можно найти в [Данные S1](#). (TIFF)

**S3 Рис. Обработка таксифолином не влияет на секрецию PGD2 или способность клеток Calu-3 к пролиферации.** Гистограмма суммирует содержание PGD2 в супернатантах клеток Calu-3, инфицированных SARS-CoV-2 и обработанных в течение 48 часов таксифолином (100 мкМ; n = 12), по сравнению с контролем DMSO (n = 10). Гистограммы суммируют экспрессию мРНК маркеров пролиферации (B) Ki67, (C) TOP2A и (D) TPX2 клеток Calu-3, обработанных таксифолином.

(100 мкМ) в течение 48 ч (n = 7 для клеток, обработанных ctrl и PGE2). (E) Гистограмма суммирует содержание PGD2 в супернатантах клеток Calu-3, инфицированных SARS-CoV-2 (n = 6), по сравнению с необработанными ложными (n = 6) и инактивированными нагреванием (привет) SARS-CoV-2 (n = 6), нормализованные к общей РНК. (AE) Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, (A, B, C) непарные двусторонний t-тест, нс (D) тест Манна-Уитни-U, нс (E) t-тест был установлен на 100%, P < 0,01 по сравнению с имитацией, #P < 0,05 по сравнению с hi, односторонним дисперсионным анализом, апостериорным тестом Бонферрони. Базовые данные можно найти в [Данные S1](#). (TIFF)

**S4 Рис. Стимуляция пре-B-клеток PGE2 модулирует количество клеток из-за изменений способности к пролиферации.** Типичные изображения геля экспрессии PTGER4 и B2MmRNA в пре-B-клеточных линиях (A) 697 и (B) SUP-B15. (C) Гистограмма суммирует процент живых клеток из контрольных обработанных и обработанных PGE2 (10 мкМ) 697 клеток после 48-часовой стимуляции. Общее количество ячеек было установлено на 100%. (DF) Гистограммы суммируют экспрессию мРНК маркеров пролиферации (C) Ki67, (D) TOP2A и (E) TPX2 пре-B-клеток 697, обработанных PGE2.

(10 мкМ) в течение 48 ч (n = 5 для клеток, обработанных ctrl и PGE2). (CE) Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, (CE) нс, P < 0,01 против ctrl, непарный двусторонний t-контрольная работа. Базовые данные можно найти в [Данные S1](#) и необрезанные изображения геля в [S8 Рис](#). (TIFF)

**S5 Рис. Стимуляция пре-B-клеток PGE2 не связана с повышенной экспрессией TNFa или IFNg.**

Гистограмма суммирует экспрессию мРНК TNFa (A) 697 или (B) пре-B-клеток SUP-B18, обработанных PGE2 (10 мкМ) через 48 часов (n = 5). Контрольные клетки обрабатывали растворителем ETHO (n = 5). Гистограмма суммирует экспрессию мРНК IFNg (C) 697 или (D) SUP-B18 пре-B-клеток, обработанных PGE2 (10 мкМ) через 48 часов (n = 5). Контрольные клетки обрабатывали растворителем ETHO (n = 4). (AD) Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, (A, C, D) нс, P < 0,01 против ctrl, непарный двусторонний t-тест и (B) P < 0,01, критерий Манна-Уитни-U. Базовые данные можно найти в [Данные S1](#). (TIFF)

**S6 Рис. Гель без крышки для Рис. 3A и 3H.**  
(TIFF)

**S7 Рис. Гель без крышки для Рис. 5B.**  
(TIFF)

**S8 Рис. Гель без крышки для S4A и S4B Рис..**  
(TIFF)

**Данные S1. Числовые исходные данные.** Все числовые необработанные данные объединены в один файл Excel «S1\_Data.xlsx», этот файл состоит из нескольких электронных таблиц, каждая из которых содержит данные одного рисунка или таблицы.

(XLSX)

**Таблица S1. Список человеческих праймеров qRT-PCR.**  
(DOCX)

**Таблица S2. Краткое изложение клинических данных для пробандов мужского и женского пола на исходном уровне (BL) и после контрольных упражнений после 12 месяцев наблюдения (FU) (E).** Индекс массы тела (ИМТ) был определен

где ИМТ = масса тела (MT) / рост в квадрате. Вес тела, рост, ИМТ, жировые отложения и активность анализировались в BL и после 12M FU контролируемых упражнений. Сравнение между группами BL и 12M FU проводилось с использованием t-критерия Стьюдента для данных с распределением по Гауссу (представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение) и критерия Манна-Уитни-U, где по крайней мере один столбец не был нормально распределен (представлен как медиана и межквартильный размах). (IQR)).  $P < 0,001$ ,  $P < 0,00001$  BL по сравнению с 12M FU. Базовые данные можно найти в [Данные S1](#).

(DOCX)

**Таблица S3. Резюме клинических данных здоровых контролей из [Рис. 1A](#).**

(DOCX)

## Благодарности

Мы благодарим Сергея Эршова, Сильвию Гуцке, Бригит Брандт, Анжелику Джульет Диас Басабе, Дельфину Де Малдер, Томас Герлах и Джульетту Салетти за отличную техническую помощь, а также доктора Хельге Старка за вклад в биоинформатический анализ. Изолят вируса SARS-CoV-2 любезно предоставил Кристиан Дростен, Шарите, Берлин.

## Вклад авторов

**Концептуализация:** Мелани Рике-Хох, Элизабет Стеллинг, Томас Питчманн, Эмилио Хирш, Дэнни Йонигк, Уве Тегтбур, Аксель Шамбах, Аксель Хаверих, Дениз Хильфикер-Кляйнер.

**Курирование данных:** Мелани Рике-Хох, Элизабет Стеллинг, Мартина Кастен, Томас Гаузепольт, Анне Хёфер, Дэнни Йонигк, Джулиан Эйгендорф, Лена Минк, Микаэла Шерр, Тобиас Дж. Пфеффер, Дениз Хилфикер-Кляйнер.

**Формальный анализ:** Мелани Рике-Хох, Элизабет Стеллинг, Грэм Брогден, Гиза Герольд, Энн Хёфер, Дэнни Йонигк, Дениз Хилфикер-Кляйнер.

**Получение финансирования:** Мелани Рике-Хох, Гиза Герольд, Томас Питчманн, Жан-Люк Баллиганд, Эмилио Хирш, Гус Ф. Риммельцваан, Марк П. Кюнель, Дэнни Йонигк, Томас Иллиг, Аксель Шамбах, Дениз Хилфикер-Кляйнер.

**Расследование:** Мелани Рике-Хох, Элизабет Стеллинг, Лиза Лассвиц, Антония П. Гунеш, Франсиско Дж. Сапатеро-Белинчон, Грэм Брогден, Гиза Герольд, Федерика Фаччиотти, Хусни Эльбахеш, Гус Ф. Риммельцваан, Энн Хёфер, Дэнни Йонигк, Джулиан Эйгендорф, Уве Тегтбур, Лена Минк, Тобиас Дж. Пфеффер, Денизил Хаверик Кляйнер.

**Методология:** Мелани Рике-Хох, Элизабет Стеллинг, Лиза Лассвиц, Антония П. Гунеш, Франсиско Х. Сапатеро-Белинчон, Грэм Брогден, Гиза Герольд, Томас Питчманн, Хусни Эльбахеш, Энн Хёфер, Дэнни Йонигк, Томас Иллиг, Андрес Хильфикер, Аксель Хаверих, Дениз Хилфикер-Кляйнер.

**Администрация проекта:** Мелани Рике-Хох, Гиза Герольд, Дэнни Джонигк, Джулиан Эйгендорф, Уве Тегтбур, Дениз Хилфикер-Кляйнер.

**Ресурсы:** Лиза Лассвиц, Антония П. Гунеш, Франсиско Х. Сапатеро-Белинчон, Грэм Брогден, Гиза Герольд, Виржини Монтель, Жан-Люк Баллиганд, Федерика Фаччиотти, Эмилио Хирш, Энн Хёфер, Марк П. Кюнель, Дэнни Йонигк, Уве Тегтбур, Лена Минк, Томас Иллиг, Тобиас Дж. Пфеффер, Андрес Хильфикер, Аксель Хаверих.

**Надзор:** Мелани Рике-Хох, Гиза Герольд, Томас Питчманн, Марк П. Кюнель, Дэнни Джонигк, Дениз Хилфикер-Кляйнер.

**Проверка:** Мелани Рике-Хох, Элизабет Стеллинг, Гиза Герольд, Энн Хёфер, Дэнни Джонигк, Дениз Хильфикер-Кляйнер.

**Визуализация:** Мелани Рике-Хох, Элизабет Стеллинг, Грэм Брогден, Энн Хёфер, Дэнни Йонигк, Микаэла Шерр, Дениз Хильфикер-Кляйнер.

**Написание - оригинальный черновик:** Мелани Рике-Хох, Элизабет Стеллинг, Лиза Лассвиц, Антония П. Гюнеш, Хусни Эльбахеш, Анне Хёфер, Марк П. Кюнель, Дэнни Йонигк, Дениз Хильфикер-Кляйнер.

**Написание - просмотр и редактирование:** Мелани Рике-Хох, Элизабет Стеллинг, Франсиско Дж. Сапатеро-Белинчон, Грэм Брогден, Гиза Герольд, Томас Питчманн, Виржини Монтель, Жан-Люк Баллиганд, Томас Гаузеполю, Хусни Эльбахеш, Гус Ф. Риммельцваан, Энн Хёфер, Марк П. Кюнель, Дэнни Йонигк, Джулиан Эйгендорф, Уве Тегтбур, Лена, Axel Schambach, Tobias J. Pfeffer, Andres Hilfiker, Axel Haverich, Denise Hilfiker-Kleiner.

#### использованная литература

1. Фрид Дж. А., Рамасуббу К., Бхатт Р., Топкара В. К., Клеркин К. Дж., Хорн Е. и др. Разнообразие сердечно-сосудистых проявлений COVID-19. Тираж. 2020; 141 (23): 1930–6.<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047164> PMID: 32243205
2. Lau MSY, Grenfell B, Thomas M, Bryan M, Nelson K, Lopman B. Характеризация событий сверхраспространения и возрастной заразности передачи SARS-CoV-2 в Джорджии, США. *Proc Natl Acad Sci US A*. 2020; 117 (36): 22430–5.<https://doi.org/10.1073/pnas.2011802117> PMID: 32820074
3. Vardhana SA, Wolchok JD. Многие лица имеют иммунный ответ против COVID. *Журнал экспериментальной медицины*. 2020; 217 (6).<https://doi.org/10.1084/jem.20200678> PMID: 32353870
4. Аккерманн М., Верледен С.Е., Кюхнель М., Хаверих А., Велте Т., Ленгер Ф. и др. Легочный сосудистый эндотелиит, тромбоз и ангиогенез при Covid-19. *N Engl J Med*. 2020; 383 (2): 120–8.<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2015432> PMID: 32437596
5. Инь С., Хуан М., Ли Д., Тан Н. Различия в характеристиках коагуляции между тяжелой пневмонией, вызванной SARS-CoV2, и не-SARS-CoV2. *J Тромб Тромболизис*. 2020.
6. Чжэн Ю.Ю., Ма Ю.Т., Чжан Ю.И., Се Х. COVID-19 и сердечно-сосудистая система. *Обзоры природы Кардиология*. 2020.<https://doi.org/10.1038/s41569-020-0360-5> PMID: 32139904
7. Чжэн З., Пэн Ф., Сюй Б., Чжао Дж., Лю Х., Пэн Дж. И др. Факторы риска критических и смертельных случаев COVID-19: систематический обзор литературы и метаанализ. *J Infect*. 2020.
8. Николай Л., Лойниг А., Брамбс С., Кайзер Р., Вайнбергер Т., Вейганд М. и др. Иммуноотрмботическая дисрегуляция при пневмонии, вызванной COVID-19, связана с дыхательной недостаточностью и коагулопатией. Тираж. 2020; 142 (12): 1176–89.<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048488> PMID: 32755393
9. Szekely Y, Lichter Y, Taieb P, Banai A, Hochstadt A, Merdler I, et al. Спектр сердечных проявлений при COVID-19: систематическое эхокардиографическое исследование. Тираж. 2020; 142 (4): 342–53.<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047971> PMID: 32469253
10. Chen L, Li X, Chen M, Feng Y, Xiong C. Экспрессия ACE2 в сердце человека указывает на новый потенциальный механизм повреждения сердца среди пациентов, инфицированных SARS-CoV-2. *Cardiovasc Res*. 2020; 116 (6): 1097–100. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa078> PMID: 32227090
11. Фокс С.Э., Ли Дж., Акматбеков А., Харберт Дж. Л., Ламейра Ф. С., Браун Дж. К. и др. Неоожиданные особенности сердечной патологии при инфекции COVID-19. Тираж. 2020; 142 (11): 1123–5.<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.049465> PMID: 32689809
12. Шарма А., Гарсия Дж. М., Ван И, Пламмер Дж. Т., Моризоно К., Арумугасвами В. и др. Кардиомиоциты человека, полученные с помощью ИПСС, восприимчивы к инфекции SARS-CoV-2. *Cell RepMed*. 2020; 1 (4): 100052. <https://doi.org/10.1016/j.xcrim.2020.100052> PMID: 32835305
13. Wenham C, Smith J, Morgan R, Gender, Group CW. COVID-19: гендерные последствия вспышки. *Ланцет*. 2020; 395 (10227): 846–8.[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30526-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30526-2) PMID: 32151325
14. Брандт Е.Б., Бек А.Ф., Мерша ТБ. Загрязнение воздуха, расовые различия и смертность от COVID-19. *J Allergy Clin Immunol*. 2020; 146 (1): 61–3.<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.035> PMID: 32389591
15. Мартеллетти Л., Мартеллетти П. Загрязнение воздуха и новая болезнь Covid-19: предполагаемый фактор риска заболевания. *SN Compr Clin Med*. 2020; 1–5.<https://doi.org/10.1007/s42399-020-00274-4> PMID: 32296757



16. Ли Д., Чен И, Лю Х, Цзя И, Ли Ф, Ван В. и др. Иммунная дисфункция приводит к смертности и травмам органов у пациентов с COVID-19 в Китае: выводы из исследования ERS-COVID-19. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5 (1): 62. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0163-5> PMID: 32371949
17. Wilk AJ, Rustagi A, Zhao NQ, Roque J, Martinez-Colon GJ, McKechnie JL, et al. Одноклеточный атлас периферического иммунного ответа у пациентов с тяжелой формой COVID-19. *Nat Med.* 2020; 26 (7): 1070–6. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0944-y> PMID: 32514174
18. Quinti I, Lougaris V, Milito C, Cinetto F, Pecoraro A, Mezzaroma I и др. Возможная роль В-клеток в COVID-19? Урок от больных агаммаглобулинемией. *J Allergy Clin Immunol.* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.013> PMID: 32333914
19. Канеко Н., Куо Х. Х., Букау Дж., Фермер Дж. Р., Аллард-Чамард Х., Махаджан В. С. и др. Потеря Bcl-6-экспрессирующих Т-фолликулярных вспомогательных клеток и зародышевых центров при COVID-19. *Клетка.* 2020.
20. Catanzaro M, Fagiani F, Racchi M, Corsini E, Govoni S, Lanni C. Иммунный ответ при COVID-19: решение фармакологической проблемы путем нацеливания на пути, запускаемые SARS-CoV-2. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5 (1): 84. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0191-1> PMID: 32467561
21. Ху Б, Хуан С., Инь Л. Цитокиновый шторм и COVID-19. *J Med Virol.* 2020.
22. Мехта П., Маколи Д. Ф., Браун М., Санчес Э., Таттерсолл Р. С., Мэнсон Дж. Дж. И др. COVID-19: рассмотрите синдромы цитокинового шторма и иммуносупрессию. *Ланцет.* 2020; 395 (10229): 1033–4. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0) PMID: 32192578
23. Ван С. Ф., Ценг С. П., Йен С. Н., Ян Дж. Й., Цао С. Н., Шен С. В. и др. Антителозависимая коронавирусная инфекция SARS опосредуется антителами против белков-шипов. Сообщения о биохимических и биофизических исследованиях. 2014; 451 (2): 208–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.090> PMID: 25073113
24. Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, et al. Врожденные аномалии IFN-иммунитета I типа у пациентов с опасным для жизни COVID-19. *Наука.* 2020; 370 (6515).
25. Сандер WJ, O'Neill HG, Pohl CH. Простагландин E2 как модулятор вирусных инфекций. *Front Physiol.* 2017; 8:89. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00089> PMID: 28261111
26. Coulombe F, Jaworska J, Verway M, Tzelepis F, Massoud A, Gillard J и др. Целевое ингибирование простагландина E2 усиливает противовирусный иммунитет за счет индукции интерферона I типа и апоптоза в макрофагах. *Иммунитет.* 2014; 40 (4): 554–68. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.02.013> PMID: 24726877
27. Full F, Gack MU. Простагландин E2: злодей в ответе хозяина на вирус гриппа. *Иммунитет.* 2014; 40 (4): 453–4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.03.008> PMID: 24745327
28. Лю Л., Цао З., Чен Дж., Ли Р., Цао И, Чжу С. и др. Вирус гриппа А индуцирует интерлейкин-27 посредством передачи сигналов циклооксигеназы-2 и протеинкиназы A. *J Biol Chem.* 2012; 287 (15): 11899–910. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.308064> PMID: 22343630
29. Schmidleithner L, Thabet Y, Schonfeld E, Kohne M, Sommer D, Abdullah Z, et al. Ферментативная активность HPGD в клетках Treg подавляет клетки Tconv для поддержания гомеостаза жировой ткани и предотвращения метаболической дисфункции. *Иммунитет.* 2019; 50 (5): 1232–48 e14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.014> PMID: 31027998
30. Нохам М. А как насчет COVID-19 и пути арахидоновой кислоты? *Eur J Clin Pharmacol.* 2020; 76 (11): 1501–4. <https://doi.org/10.1007/s00228-020-02941-w> PMID: 32583353
31. Вольфель Р., Корман В. М., Гургемос В., Сейлмайер М., Занге С., Мюллер М. А. и др. Вирусологическая оценка госпитализированных пациентов с COVID-2019. *Природа.* 2020; 581 (7809): 465–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x> PMID: 32235945
32. Маско С., Ангелова М., Васатуро А., Бин Дж., Хиджази К., Антуан Дж. И др. Уклонение от иммунитета перед инвазией опухоли при раннем плоскоклеточном канцерогенезе легких. *Природа.* 2019; 571 (7766): 570–5. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1330-0> PMID: 31243362
33. Hoch M, Fischer P, Stapel B, Missol-Kolka E, Sekkali B, Scherr M и др. Эритропоэтин сохраняет способность эндотелиальной дифференцировки сердечных клеток-предшественников и снижает сердечную недостаточность во время противоопухолевой терапии. *Cell Stem Cell.* 2011; 9 (2): 131–43. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.07.001> PMID: 21816364
34. Хайланы Р. А., Сафдар М., Озаслан М. Геномная характеристика нового SARS-CoV-2. *Gene Rep.* 2020; 19: 100682. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100682> PMID: 32300673
35. Hamalainen M, Nieminen R, Asmawi MZ, Vuorela P, Vapaatalo H, Moilanen E. Влияние флавоноидов на продукцию простагландина E2 и на экспрессию COX-2 и mPGES-1 в активированных макрофагах. *Planta Med.* 2011; 77 (13): 1504–11. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1270762> PMID: 21341175
36. Ван И, Ван Ц., Бао Икс, Дин И, Шенту Дж., Цуй В. и др. Таксифолин предотвращает вызванные бета-амилоидом нарушения образования синапсов и дефицит памяти за счет ингибирования содержания цитозольной фосфолипазы A2 / простагландина E2. *Metab Brain Dis.* 2018; 33 (4): 1069–79. <https://doi.org/10.1007/s11011-020-07-5> PMID: 29542038

37. Nakao S, Ogtata Y, Shimizu E, Yamazaki M, Furuyama S, Sugiya H. Индуцированное фактором некроза опухоли альфа (TNF-альфа) высвобождение простагландина E2 опосредуется активацией транскрипции циклооксигеназы-2 (COX-2) через NFκB в фибробласты десен человека. *Mol Cell Biochem.* 2002; 238 (1–2): 11–8. <https://doi.org/10.1023/a:1019927616000> PMID: 12349897
38. Soleymani Fard S, Jeddi Tehrani M, Ardekani AM. Простагландин E2 вызывает ингибирование роста, апоптоз и дифференцировку клеточных линий острого лимфобластного лейкоза, происходящих из Т- и В-клеток (CCRF-CEM и Nalm-6). *Простагландины Leukot Essent Fatty Acids.* 2012; 87 (1): 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2012.04.012> PMID: 22749740
39. Chen R, Cao Y, Tian Y, Gu Y, Lu H, Zhang S и др. PGE2 облегчает развитие вирусного миокардита и способствует увеличению регуляторных В-клеток, продуцирующих IL-10, посредством оси MAPKs / АКТ-AP1 или передачи сигналов Аhr. *Cell Immunol.* 2020; 347: 104025. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.104025> PMID: 31837749
40. Карки Р., Шарма Б. Р., Туладхар С., Уильямс Е. П., Залдуондо Л., Самир П. и др. Синергизм TNF-альфа и IFN-гамма вызывает гибель воспалительных клеток, повреждение тканей и смертность при синдромах инфекции SARS-CoV-2 и цитокинового шока. *Клетка.* 2021; 184 (1): 149–68 e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.025> PMID: 33278357
41. Дэвис Н.Г., Клепак П., Лю Ю., ПремК, Джит М., группа CC-w и др. Возрасто-зависимые эффекты в передаче эпидемии COVID-19 и борьбе с ней. *Nat Med.* 2020; 26 (8): 1205–11. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0962-9> PMID: 32546824
42. Delogu A, Schebesta A, Sun Q, Aschenbrenner K, Perlot T, Busslinger M. Репрессия генов с помощью Pax5 в В-клетках важна для гомеостаза клеток крови и обращена в плазматических клетках. *Иммунитет.* 2006; 24 (3): 269–81. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.01.012> PMID: 16546096
43. Schebesta A, McManus S, Salvaggio G, Delogu A, Busslinger GA, Busslinger M. Фактор транскрипции Pax5 активирует хроматин ключевых генов, участвующих в передаче сигналов В-клеток, адгезии, миграции и иммунной функции. *Иммунитет.* 2007; 27 (1): 49–63. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.019> PMID: 17658281
44. Nutt SL, Tarlinton DM. Зародышевый центр В и фолликулярные вспомогательные Т-клетки: братья и сестры, двоюродные братья или просто хорошие друзья? *Nat Immunol.* 2011; 12 (6): 472–7. <https://doi.org/10.1038/ni.2019> PMID: 21739669
45. Schultheiss C, Paschold L, Simnica D, Mohme M, Willscher E, von Wenserski L, et al. Секвенирование репертуаров рецепторов Т- и В-клеток у пациентов с COVID-19 нового поколения показало сигнатуры, связанные с тяжестью заболевания. *Иммунитет.* 2020; 53 (2): 442–55 e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.024> PMID: 32668194
46. Agard M, Asakrah S, Morici LA. PGE (2) подавление врожденного иммунитета при бактериальной инфекции слизистой оболочки. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013; 3:45. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00045> PMID: 23971009
47. Джонсон К., Шапиро-Шелеф М., Туняплин С., Каламе К. Регуляторные события при ранней и поздней дифференцировке В-клеток. *Мол Иммунол.* 2005; 42 (7): 749–61. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.039> PMID: 15829263
48. Ивасаки А. Что означают повторные инфекции для COVID-19. *Lancet Infect Dis.* 2020. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30783-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30783-0) PMID: 33058796
49. Тиллетт Р.Л., Севинский Дж.Р., Хартли П.Д., Кервин Х., Кроуфорд Н., Горзальский А. и др. Геномные доказательства реинфекции SARS-CoV-2: тематическое исследование. *Lancet Infect Dis.* 2020. [https://doi.org/10.1016/S14733099\(20\)30764-7](https://doi.org/10.1016/S14733099(20)30764-7) PMID: 33058797
50. Legros V, Denolly S, Vogrig M, Boson B, Siret E, Rigaill J и др. Продольное исследование пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, показывает высокую корреляцию между нейтрализующими антителами и тяжестью COVID-19. *Cell Mol Immunol.* 2021; 18 (2): 318–27. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00588-2> PMID: 33408342
51. Lancman G, Mascarenhas J, Bar-Natan M. Тяжелая реактивация вируса COVID-19 после лечения В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. *J Hematol Oncol.* 2020; 13 (1): 131. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00968-1> PMID: 33008453
52. Саджики Ю., Коннаи С., Окагава Т., Нисимори А., Маекава Н., Гото С. и др. Вызванное простагландином E2 иммунное истощение и усиление противовирусных эффектов антителом против PD-L1 в сочетании с ингибитором ЦОГ-2 при инфицировании вирусом лейкемии крупного рогатого скота. *J Immunol.* 2019; 203 (5): 1313–24. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900342> PMID: 31366713
53. Андре Ф., Мануэль С., Сантош Н., Маркус А.Л., Мартин С. Ингибиторы новой коронавирусной протеазы, идентифицированные виртуальным скринингом 687 миллионов соединений 2020.
54. Meune C, Mourad JJ, Bergmann JF, Spaulding C. Взаимодействие между циклооксигеназой и ренин-ангиотензин-альдостероновой системой: обоснование и клиническое значение. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2003; 4 (3): 149–54. <https://doi.org/10.3317/jraas.2003.023> PMID: 14608518
55. Сمارт Л., Фоукс Н., Гоггин П., Пенник Г., Рейнсфорд К.Д., Чарльзурт Б. и др. Повествовательный обзор потенциального фармакологического влияния и безопасности ибупрофена на коронавирусное заболевание 19 (COVID-19), ACE2 и иммунную систему: дихотомия ожидания и реальности. *Инфламмофармакология.* 2020; 28 (5): 1141–52. <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00745-z> PMID: 32797326

56. Валенсуэла Р., ПедросаМА, Гарридо-Хил П., Лабандейра С.М., Наварро Дж., Франко Р. и др. Взаимодействие между ибупрофеном, ACE2, ренин-ангиотензиновой системой и спайковым белком в легких. Последствия для COVID-19. *Clin Transl Med.* 2021; 11 (4): e371.<https://doi.org/10.1002/ctm2.371> PMID: 33931961
57. Baghaki S, Yalcin CE, Baghaki HS, Aydin SY, Daghan B, Yavuz E. Ингибирование COX2 при лечении COVID-19: обзор литературы, предлагающий изменение положения целекоксиба для рандомизированных контролируемых исследований. *Int J Infect Dis.* 2020; 101: 29–32.<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.1466> PMID: 33007455
58. Файнзилбер Дж., Реган Дж., Коксен К., Корри Х., Вонг С., Розенталь А. и др. Вирусная нагрузка SARS-CoV-2 связана с повышением тяжести заболевания и смертности. *Связь природы.* 2020; 11 (1): 5493.<https://doi.org/10.1038/s41467-020-19057-5> PMID: 33127906
59. Тан Ти, Скамблер Т.Э., Смолли Ти, Канлиф Х.Э., Росс Э.А., Рознер Д.Р. и др. Ответы макрофагов на липополисахарид модулируются петлей обратной связи, включающей простагландин E2, фосфатазу 1 двойной специфичности и тристетрапролин. *Научный представитель* 2017; 7 (1): 4350.<https://doi.org/10.1038/s41598-017-04100-1> PMID: 28659609
60. Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y, Blumenschein WM, McGeachy MJ, McClanahan TK и др. Простагландин E2 регулирует дифференцировку и функцию клеток Th17 посредством циклической передачи сигналов рецептора AMP и EP2 / EP4. *Журнал экспериментальной медицины.* 2009; 206 (3): 535–48.<https://doi.org/10.1084/jem.20082293> PMID: 19273625
61. Lee J, Aoki T, Thumkeo D, Siriwach R, Yao C, Narumiya S. Внутренняя передача сигналов простагландина E2-EP2 / EP4 Т-клетками имеет решающее значение при патогенном воспалении, управляемом клетками TH17. *J Allergy Clin Immunol.* 2019; 143 (2): 631–43. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.05.036> PMID: 29935220
62. Симкин Н.Ю., Елинек Д.Ф., Липский П.Е. Ингибирование реакции человеческих В-клеток простагландином E2. *J Immunol.* 1987; 138 (4): 1074–81. PMID:3027169