

УДК 57.083.3:571.27:57.086.82:616-002.5:616-097

А.С. Юдина

магистрант 2 курса К(П)ФУ,
г. Казань, РФ

E-mail: alinaju1994@mail.ru

А.Р. Валеева

младший научный сотрудник КГМА,
г. Казань, РФ

E-mail: anna-valeeva@mail.ru

Э.А. Шуралев

канд. вет. наук, доцент К(П)ФУ,
старший научный сотрудник КГМА,
г. Казань, РФ

E-mail: eduard.shuralev@mail.ru

**БИОТЕСТИРОВАНИЕ ЦИТОКИНОВ ПРИ ОЦЕНКЕ КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА
МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ АНТИГЕНЫ МЕТОДОМ ELISPOT**

Аннотация

Актуальным является вопрос создания инновационных способов выявления туберкулеза на разных стадиях инфекционного процесса. Цель данной работы: оценка иммунитета методом биотестирования IFN- γ и IL-2, синтезируемых лимфоцитами в ответ на микобактериальные антигены. Биотестирование проводили используя метод иммуноферментных пятен (ELISPOT), основанный на выявлении продуктов секреции иммунокомпетентных клеток при их стимуляции. Установлено, что при биотестировании цитокинов важное значение имеют комбинации антигенов, используемых для провокации сенсibilизированных лимфоцитов отвечать синтезом IFN- γ и IL-2.

Ключевые слова:

цитокины, туберкулез, ELISPOT, лимфоциты, счетчик клеток Scepter

Введение. При оценке иммунного статуса основополагающим моментом является максимальный охват показателей, по которым можно судить о состоянии здоровья как популяции исследуемой территории, так и каждого ее представителя. Одним из таких показателей является уровень заболеваемости туберкулезом, который в настоящий момент определяется путем массового ежегодного флюорографического обследования населения. Однако данный способ имеет свои минусы. В первую очередь – это риски для здоровья, связанные с облучением организма. К тому же данный способ не позволяет выявлять заболевание на ранних стадиях его развития.

В связи с этим актуальным остается вопрос создания инновационных способов обнаружения туберкулеза на ранних стадиях инфекционного процесса, с последующим проведением оперативного лечения. Такой подход повысит эффективность мер комплексной борьбы с туберкулезом, что в свою очередь приведет к снижению микобактериальной нагрузки населения [4]. К средствам решения проблемы относятся ин-витро тесты, основанные на определении специфических антител [1] и сенсibilизированных иммунокомпетентных клеток, вырабатывающих цитокины в ответ на действие микобактериальных антигенов [5]. Чувствительность ин-витро тестов значительно повышается за счет использования коктейля из специфичных антигенов *Mycobacterium tuberculosis* [3].

Целью данной работы была оценка специфического клеточного иммунитета методом биотестирования гамма-интерферона (IFN- γ) и интерлейкина-2 (IL-2), синтезируемых сенсibilизированными лимфоцитами в ответ на провоцирующее воздействие микобактериальных антигенов.

Материалы и методы. Материалом служили образцы проб крови пациентов (популяция г.Казани) с подтвержденным статусом (диагнозом) на туберкулез (по результатам теста Манту и флюорографии) (группа О, n=12) и потенциально здоровых лиц (группа К, n=12), т.е. с отсутствием подтвержденного статуса (диагноза) на туберкулез, отобранные для клинических исследований с разрешения Этического комитета КГМА (№2/2002). От каждого пациента было получено информированное согласие на проведение исследований.

Пробы крови отбирали в пробирки Improvacuter на 4,5 мл с цитратом натрия (3,8%) (Guangzhou Improve Medical Instruments Co., Ltd., Китай) с последующим выделением чистой популяции мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) методом седиментации [7] в градиенте плотности фиколл-урографина Lymphoprep™ (Alere Technologies AS, Норвегия) с плотностью $\rho=1,077$ г/см³.

Концентрацию полученной суспензии МКПК определяли используя счетчик клеток Scepter™ 2.0 Handheld Automated Cell Counter (рис. 1) с сенсорными наконечниками на 40 мкл Scepter Cell Counter Sensors – 40 μ m (Merck Millipore, США) по описанной методике [9].

В данной системе используется принцип Коултера обнаружения частиц на основе импеданса в миниатюрном формате с использованием комбинации аналогового и цифрового оборудования для измерения, обработки сигналов, хранения данных и графического отображения. Одноразовый наконечник сконструирован с микрообъемной зоной, чувствительной к клеткам, которая позволяет распознавать размер и объем клеток при субмикронном и субпиколитерном разрешении. В результате счетчик выдает статистику популяции клеток, графически отображаемую в виде гистограммы.

Биотестирование цитокинов IFN- γ и IL-2 проводили используя метод иммуноферментных пятен (ELISPOT), основанный на выявлении продуктов секреции иммунокомпетентных клеток (в данном случае цитокинов) в ответ на воздействие антигенов. С этой целью выделенные МКПК стимулировали тремя комбинациями рекомбинантных и структурных антигенов *M.tuberculosis* (А, В и С). Для обнаружения субпопуляции антиген-специфических лимфоцитов путем измерения высвобождающихся цитокинов IFN- γ и IL-2 использовали наборы LIOSpot-TB/LTBI human и LIOSpot-TB human (Lionex GmbH, Германия) соответственно, согласно инструкциям к применению. На дне лунок планшет каждого набора располагается нитроцеллюлозная мембрана, с нанесенными на ее поверхность моноклональными антителами, улавливающими синтезированные лимфоцитами цитокины. Визуализацию результатов в виде образования синих пятен на мембране достигали путем последующего последовательного внесения в лунки планшет детектирующих антител, конъюгата

и субстрата, входящих в набор. Учет результата вели путем прямого подсчета образовавшихся пятен в каждой лунке, с последующим сравнением количества пятен в лунках при инкубации МКПК в присутствии антигена с количеством пятен в лунках при инкубации МКПК без антигена (отрицательный контроль). Результат считался положительным, если под воздействием антигена образовывалось на 20 пятен больше, чем в лунках без антигена, при этом под воздействием митогена (положительный контроль) в лунках должно образовываться не менее 20 пятен.



Рис. 1. Счетчик клеток Scepter™ 2.0 Handheld Automated Cell Counter с сенсорными наконечниками на 40 мкл (Merck Millipore)

Статистическая обработка результатов. В группах вычисляли средние значения и стандартное отклонение показателей с 95%-ным доверительным интервалом. Для установления различий между группами применяли t-критерий для независимых выборок, при этом использовали калькулятор «t-Test for Independent Samples» (VassarStats), доступный он-лайн (<http://vassarstats.net/tu.html>). При значениях $p < 0,05$ различия считали достоверными.

Результаты и обсуждение.

Получение чистой популяции МКПК. Этот этап исследования проводили в стерильных условиях в ламинарном шкафу БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2 NEOTERIC (LAMSYSTEMS, Россия). 4 мл крови разбавляли равным количеством 0,9% NaCl. В стерильную пробирку типа Falcon на 15 мл вносили 3 мл фиколл-урографина, поверх которого плавно наслаивали 6 мл разбавленной крови, не допуская смешивания. Пробирки помещали в центрифугу (5810R, Eppendorf) с бакет-ротором (A-4-44), образцы центрифугировали при 800 g в режиме без торможения в течение 30 мин при комнатной температуре. В результате центрифугирования образовалось 4 фракции: первая фракция на дне пробирки, содержащая эритроциты и разрушенные клетки крови, вторая фракция – раствор фиколл-урографина, третья фракция – интерфазное кольцо в виде «облака» – живые МКПК, и четвертая фракция – плазма крови (верхний слой). Пипеткой собирали интерфазное кольцо,

содержащее суспензию МКПК, в отдельную пробирку типа Falcon на 15 мл, куда затем добавляли фосфатно-буферный раствор pH 7,4 (ФБР) в объеме, в 10 раз превышающем объем полученной суспензии, для отмывки клеток, с последующим центрифугированием при 250 g в режиме с торможением в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатант сливали, осадок разбивали легкими щелчками по дну пробирки и повторяли отмывку в 10-кратном объеме ФБР. После того, как осадок был разбит, в пробирку вносили 2 мл стерильной культуральной среды RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и по 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина. Полученную суспензию МКПК использовали в биотестировании цитокинов.

Подготовка МКПК к биотестированию. Для стандартизованного биотестирования цитокинов каждый образец суспензии МКПК разводили в культуральной среде, чтоб на каждую лунку планшета приходилось по 250000 клеток. Вначале проводили подсчет числа МКПК в суспензии после их выделения из цельной крови, используя счетчик клеток Scepter с сенсорными наконечниками на 40 мкл (рис. 1). Для этого в пробирке к 10 мкл суспензии клеток добавляли 90 мкл культуральной среды, плавно перемешивали. В разведенную 1:10 суспензию клеток помещали сенсорный наконечник, предварительно вставленный в гнездо для наконечников счетчика, и плавно отбирали необходимый объем (40 мкл). Через несколько секунд на экране счетчика отображалось подсчитанное число клеток в расчете на 1 мл разведенного образца. Полученный результат умножали на 10 для вычисления концентрации клеток в исходной суспензии МКПК.

В ходе выделения клеток из крови, концентрация МКПК в образцах варьировала от 28 до 127×10^5 кл./мл (таблица 1). В связи с этим каждый образец суспензии МКПК подвергали разведению, чтоб финальная концентрация обеспечивала внесение в каждую лунку тест-планшета по 250000 клеток в 0,1 мл культуральной среды. С этой целью проводили расчет разведения суспензии образцов МКПК в культуральной среде с учетом необходимого объема на 20 лунок (16 тест-лунок + запасной объем 0,4 мл). Конечный объем суспензии клеток, необходимый для постановки теста, рассчитывали по формуле (1):

$$V_t = V_w \times n \quad (1)$$

V_t – конечный объем суспензии клеток, мл; V_w – объем суспензии клеток, необходимый для постановки теста в одной лунке, мл; n – число лунок.

Необходимый объем исходной суспензии клеток рассчитывали по формуле (2):

$$V_s = \frac{N}{C} \times n \quad (2)$$

V_s – необходимый объем исходной суспензии клеток, мл; N – число необходимых клеток для каждой лунки; C – концентрация исходной суспензии клеток (кл./мл); n – число лунок.

Необходимый объем культуральной среды для разведения клеток рассчитывали по формуле (3):

$$V_m = V_t - V_s \quad (3)$$

V_m – необходимый объем культуральной среды, мл; V_t – конечный объем суспензии клеток, мл; V_s – необходимый объем исходной суспензии клеток, мл.

Таблица 1

Расчет разведения суспензии образцов МКПК в культуральной среде перед биотестированием цитокинов из расчета 250000 кл./лунка

Группа	№ образца	$C, \times 10^5$ кл./мл	n, лунка	$N, \times 10^5$ кл./мл	V_w , мл	V_t , мл	V_s , мл	V_m , мл
О	1	28	20	2,5	0,1	2,0	1,786	0,214
К	2	53	20	2,5	0,1	2,0	0,943	1,057
К	3	127	20	2,5	0,1	2,0	0,394	1,606
К	4	83	20	2,5	0,1	2,0	0,602	1,398
К	5	117	20	2,5	0,1	2,0	0,427	1,573

О	6	63	20	2,5	0,1	2,0	0,794	1,206
О	7	75	20	2,5	0,1	2,0	0,667	1,333
К	8	49	20	2,5	0,1	2,0	1,020	0,980
К	9	39	20	2,5	0,1	2,0	1,282	0,718
К	10	51	20	2,5	0,1	2,0	0,980	1,020
К	11	40	20	2,5	0,1	2,0	1,250	0,750
О	12	80	20	2,5	0,1	2,0	0,625	1,375
О	13	105	20	2,5	0,1	2,0	0,476	1,524
К	14	51	20	2,5	0,1	2,0	0,980	1,020
О	15	58	20	2,5	0,1	2,0	0,862	1,138
О	16	105	20	2,5	0,1	2,0	0,476	1,524
К	17	107	20	2,5	0,1	2,0	0,467	1,533
О	18	39	20	2,5	0,1	2,0	1,282	0,718
О	19	86	20	2,5	0,1	2,0	0,581	1,419
К	20	115	20	2,5	0,1	2,0	0,435	1,565
О	21	118	20	2,5	0,1	2,0	0,424	1,576
О	22	92	20	2,5	0,1	2,0	0,543	1,457
К	23	82	20	2,5	0,1	2,0	0,610	1,390
О	24	125	20	2,5	0,1	2,0	0,400	1,600

Биотестирование IFN- γ . Ранее проведенными исследованиями было установлено, что рекомбинантный антиген А приводит к неспецифическому синтезу IFN- γ лимфоцитами (данные не представлены). В связи с этим, в данном исследовании при биотестировании этого цитокина антиген А не использовали.

Для биотестирования IFN- γ для каждого образца использовали 8 лунок планшета, в которые внесли по 100 мкл отрицательного контроля (культуральная среда), по 100 мкл положительного контроля, содержащего митоген, и по 100 мкл растворов антигенов В и С в двух повторностях. Затем в каждую лунку внесли по 100 мкл суспензии МКПК из расчета 250000 клеток на 1 лунку. Пробы инкубировали при 37 °С в CO₂-инкубаторе MCO-5AC (Sanyo, Япония) в течение 16-20 часов.

Содержимое лунок удаляли путем встряхивания планшеты в перевернутом виде. Лунки промывали буферным раствором (входит в состав набора) 4 раза по 200 мкл, с последующим внесением по 100 мкл раствора детектирующих антител, специфичных к IFN- γ , которые инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Вновь промывали лунки и вносили по 100 мкл раствора конъюгата, который также инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После очередной промывки лунок вносили по 100 мкл раствора ТМБ субстрата и инкубировали в течение 10 мин в темноте. Содержимое лунок удаляли путем встряхивания планшеты в перевернутом виде с последующим внесением по 200 мкл 1М раствора H₂SO₄ для остановки реакции. Содержимое лунок удаляли, процедуру промывки раствором H₂SO₄ повторяли еще 2 раза. В финале лунки оставляли сушиться при комнатной температуре в течение не менее 16 часов для завершения процесса визуализации результатов. В таком виде планшеты могут храниться до 12 месяцев в сухом помещении при темноте и комнатной температуре.

Для учета результатов биотестирования применяли цифровой USB-микроскоп DigiMicro Prof (DigiMicro, Китай), с программным обеспечением «MicroCapture Pro Version 2.2». В каждой лунке проводили подсчет образовавшихся синих пятен, указывающих на наличие в образце сенсibilизированных лимфоцитов (рис. 2).

Активизация синтеза цитокинов в ответ на воздействие антигенов, которая проявлялась в виде образования синих пятен на мембране лунки планшеты, указывает на специфический клеточный иммунный ответ сенсibilизированных иммунокомпетентных клеток (Т-лимфоцитов). Визуализация результатов биотестирования цитокинов проявлялась в виде однотипного формирования синих пятен в месте локализации выработанных лимфоцитами IFN- γ и IL-2.

Как в группе потенциально здоровых лиц (группа К), так и в группе пациентов с подтвержденным статусом на туберкулез (группа О), наблюдалась интенсивная выработка IFN- γ в ответ на воздействие митогена (положительный контроль биотестирования) (таблица 2). В лунках в среднем обнаруживалось 64,1±15,1 и 67,9±18,0 специфических пятен, соответственно, что достоверно не отличалось (p>0,05). При отсутствии активаторов (отрицательный контроль биотестирования) пятна на мембранах лунок планшет регистрировались в количестве 6,0±3,2 (группа К) и 4,8±3,1 (группа О) (p>0,05).

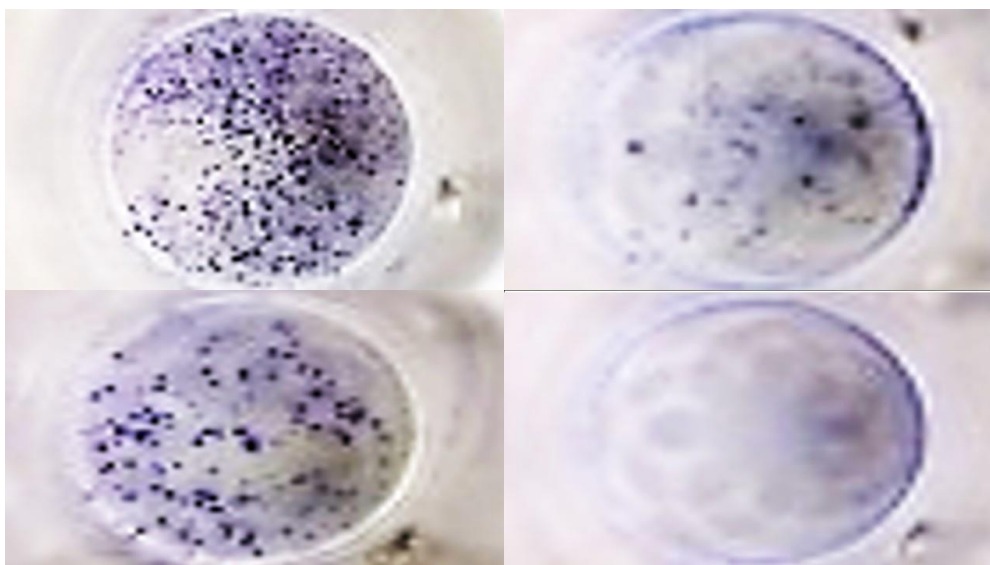


Рис. 2. Образование видимых синих пятен в результате синтеза цитокинов лимфоцитами на мембране, расположенной на дне лунки планшета

Сверху слева – под действием митогена (положительный контроль), снизу слева – под действием антигена (высокий уровень сенсibilизированных лимфоцитов), сверху справа – под действием антигена (низкий уровень сенсibilизированных лимфоцитов), снизу справа – без активации (отрицательный контроль)

Таблица 2

Активность цитокин-продуцирующих лимфоцитов*

Группа	№ образца	Число образовавшихся пятен									
		IFN- γ				IL-2					
		М	В	С	0	М	А	В	С	0	
О	1	38	35	37	0	>100	5	59	55	16	
К	2	31	5	5	0	83	3	4	17	0	
К	3	48	5	0	2	>100	1	4	3	3	
К	4	81	4	11	9	>100	1	2	5	2	
К	5	>100	0	1	0	>100	0	5	3	5	
О	6	>100	13	0	9	>100	68	13	18	8	
О	7	65	13	9	6	>100	37	8	6	3	
К	8	69	10	13	8	>100	11	6	6	6	
К	9	67	25	24	8	>100	43	7	18	38	
К	10	59	8	10	8	56	6	8	7	10	
К	11	53	10	18	8	>100	1	10	10	10	
О	12	79	20	35	5	>100	48	7	4	7	
О	13	>100	25	30	4	>100	76	57	29	10	
К	14	85	6	20	15	>100	7	13	8	10	
О	15	>100	58	48	18	>100	11	54	32	9	
О	16	79	6	2	4	>100	27	34	7	8	
К	17	34	6	3	0	64	2	8	0	6	
О	18	>100	13	52	0	>100	5	56	72	9	
О	19	48	3	32	0	>100	2	5	11	2	
К	20	>100	18	22	12	>100	5	11	22	15	
О	21	32	34	4	3	>100	72	29	2	8	
О	22	36	3	2	4	>100	68	6	5	4	
К	23	42	3	6	2	>100	4	8	6	7	
О	24	38	5	32	5	>100	14	9	58	10	

* М – митоген (положительный контроль); А, В, С – комбинации микобактериальных антигенов А, В, С; 0 – отсутствие воздействия (отрицательный контроль).

При использовании антигена В в группе О установлена выраженная активация синтеза IFN- γ – $19,0 \pm 10,5$ пятен, в то время как в группе К – $8,3 \pm 4,4$ ($p < 0,05$). Активация выработки данного цитокина также наблюдалась и при использовании

антигена С – $23,6 \pm 12,1$ и $11,1 \pm 5,3$ пятен, соответственно ($p < 0,05$). Однако, необходимо отметить, что в 4 случаях с подтвержденным диагнозом на туберкулез (пациенты 6, 7, 16 и 22) не наблюдалось выраженного синтеза IFN- γ в ответ ни к антигену В, ни к антигену С, что указывает на отсутствие или очень низкое содержание популяции сенсibilизированных лимфоцитов. Это, вероятнее всего, связано с тем, что у этих пациентов туберкулез был диагностирован впервые (т.е. новый случай). У остальных 8 пациентов этой группы туберкулез был диагностирован давно и на момент обследования у них отмечалось обострение инфекционного процесса, с чем и связано увеличение популяции сенсibilизированных лимфоцитов в организме. Полученные данные совпадают с результатами других ученых, указывающих на эффективность использования тестов для выявления IFN- γ -специфически синтезирующих иммунокомпетентных клеток крови при диагностике латентного туберкулеза, и на отсутствие ее при обследовании больных с новыми острыми проявлениями болезни [2, 6].

Биотестирование IL-2. Биотестирование цитокина IL-2 проводили аналогично IFN- γ , но в дополнение использовали комплексный антиген А. Детектирующие антитела в данном случае были специфичны к IL-2.

В обеих группах (группа К и группа О) наблюдалась выраженная выработка IL-2 в ответ на воздействие митогена (положительный контроль биотестирования) (таблица 2), со средним числом проявившихся пятен в диапазоне от 56 до >100 , при этом достоверного различия в группах не отмечалось ($p > 0,05$). В лунках отрицательного контроля, где активаторы синтеза цитокинов не вносились, пятна на мембранах лунок планшет регистрировались в количестве $9,3 \pm 6,3$ (группа К) и $7,8 \pm 2,4$ (группа О), что также достоверно не отличалось ($p > 0,05$).

В группе О отмечалась выраженная активация синтеза IL-2 под действием антигена А – $36,1 \pm 18,5$ пятен, в то время как в группе К – $7,0 \pm 7,5$ пятен ($p < 0,05$). Антиген В также активировал выработку лимфоцитами данного цитокина, в группе О активность иммунокомпетентных клеток была несколько ниже, чем к антигену А, – $28,1 \pm 14,5$ пятен, а в группе К практически не отличалась от антигена А – $7,2 \pm 2,0$ пятен, однако разница в группах была достоверной ($p < 0,05$). Достоверные отличия результатов биотестирования IL-2 в группах при использовании антигена С, говорит о его значимости в данном исследовании. Так, в группе О выявлялось $24,9 \pm 15,5$ пятен в каждой лунке планшеты, а в группе К – $8,8 \pm 4,3$ пятен ($p < 0,05$). Необходимо отметить, что в одном случае с подтвержденным диагнозом на туберкулез (пациент 19) не наблюдалось выраженного синтеза IL-2 в ответ ни к одному из 3 антигенов, что указывает на отсутствие или очень низкое содержание популяции сенсibilизированных лимфоцитов. Несмотря на это, данный пациент реагировал положительно при биотестировании IFN- γ . Это объясняется тем, что у этого пациента туберкулез протекал в латентной форме. Таким образом, результаты данных исследований подтверждают значимость биотестирования цитокина IL-2 в диагностике острого туберкулеза или процесса обострения хронического туберкулеза, о чем высказывались и другие ученые [8]. Однако необходимо отметить, что биотестирование IL-2 не позволяет дифференцировать активный туберкулез от латентного, на что указывают результаты наших исследований, а также других ученых [10].

Заключение. Биотестирование цитокинов методом ELISPOT обладает высокой чувствительностью и специфичностью при диагностической оценке специфического клеточного иммунитета у пациентов с туберкулезом. Важное значение при этом имеют комбинации микобактериальных антигенов, используемых для провокации сенсibilизированных лимфоцитов отвечать синтезом IFN- γ и IL-2.

Список использованной литературы:

1. Хисматуллина Н.А., Хаертынов К.С., Шуралев Э.А. и др. Сравнительное изучение активности субъединичных антигенов в полном лизате *M.tuberculosis* H37Rv и *M.bovinus*-8 в иммуноферментном анализе // Биотехнология: реальность и перспективы. Сб. трудов междунар. науч.-практ. конф. Саратов, 2014. С. 215-217.
2. Auguste P., Tsertsvadze A., Pink J. et al. Comparing interferon-gamma release assays with tuberculin skin test for identifying latent tuberculosis infection that progresses to active tuberculosis: systematic review and meta-analysis // BMC Infect Dis. 2017. V.17(1): 200.
3. Chegou N.N., Black G.F., Loxton A.G. et al. Potential of novel Mycobacterium tuberculosis infection phase-dependent antigens in the diagnosis of TB disease in a high burden setting // BMC Infect Dis. 2012. V.12: 10.
4. Dye C., Williams B.G. The population dynamics and control of tuberculosis // Science. 2010. V.328(5980). P.856-861.
5. Lawn S.D., Zumla A.I. Tuberculosis // Lancet. 2011. V.378(9785). P.57-72.

6. Lee H.W., Lee Y.J., Kim S.J. et al. Comparing tuberculin skin test and interferon γ release assay (T-SPOT.TB) to diagnose latent tuberculosis infection in household contacts // *Korean J Intern Med.* 2017. V.32(3). P.486-496.
7. Mallone R., Mannering S.I., Brooks-Worrell B.M. et al. Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society // *Clin Exp Immunol.* 2011. 163(1). P.33-49.
8. Movahedi B., Mokarram P., Hemmati M. et al. IFN- γ and IL-2 responses to recombinant AlaDH against ESAT-6/CFP-10 fusion antigens in the diagnosis of latent versus active tuberculosis infection // *Iran J Med Sci.* 2017. V.42(3). P.275-283.
9. Ongena K., Das C., Smith J.L. et al. Determining cell number during cell culture using the Scepter cell counter. // *J. Vis. Exp.* 2010. V.45. pii: 2204.
10. Santin M., Morandeira-Rego F., Alcaide F., Rabuñal R. et al. Detection of interleukin-2 is not useful for distinguishing between latent and active tuberculosis in clinical practice: a prospective cohort study // *Clin Microbiol Infect.* 2016. V.22(12). P.1007.e1-1007.e5.

© А.С. Юдина, А.Р. Валеева, Э.А. Шуралев, 2018