

CHANGES IN THE BIOPHYSICAL CHARACTERISTICS OF ORAL FLUID IN CHILDREN WITH TYPE 1 DIABETES

Key words: diabetes mellitus, mouth fluid, composition, viscosity, speed of salivation

The article found that studies have identified biophysical aspects of oral fluid for children with type 1 diabetes, including changes in the rate of salivation rate, salivation volume, viscosity and pH. A significant increase in glucose levels disrupts the mineralization potential of solid tissues and mineralization processes, accelerates demineralization processes, increases the

and leads to a violation of the balance of enzyme systems. In the later stages of endocrinopathy, a significant change in the pH level of oral fluid to acidosis indicates a weakening of buffer systems, a lack of functional capabilities and protective mechanisms of speech, and a disbalance in homeostatic reactions in the oral cavity.

Абилов П.М., Ирискулов Б.У., Бобоева З.Н., Махкамова Ф.Т.

АДАПТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И КОРРЕКЦИЯ КОРОНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ВЫЗВАННОЙ COVID-19 IN-VITRO

Ташкентская медицинская академия;
Ташкентский педиатрический медицинский институт

Цель исследования. Провести сравнительное проспективное рандомизированное исследование лечения коронавирусной инфекции SARSCoV-2 новым препаратом на основе G. Lucidum Алхадая.

Материалы и методы. Для осуществления поставленной цели были проанализированы результаты лечения 200 половозрелых крыс обоего пола. 160 крыс заражали коронавирусной инфекцией. Содержание животных, оперативные вмешательства и вывод из эксперимента осуществляли на основе этических принципов, декларированной Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей.

Результаты. После заражения крыс коронавирусной инфекцией COVID-19 проводили рутинное исследование крови 200 крыс на наличие вируса SARSCoV-2 взятием соскоба с ротоглотки и бронхоальвеолярным лаважем.

Пандемия коронавирусной инфекции (COVID-19), вызванная тяжелым острым респираторным синдромом, вызванная коронарусом - 2 (SARS-CoV-2) вызвала почти 270 млн подтвержденных случаев и более 5,2 млн случаев смерти в всем мире. Только на 13-19 декабря 2021 г. выявлено 4,1 млн случаев и чуть менее 45000 новых смертей [4].

На сегодняшний день возбудителем коронавирусной инфекции COVID-19 является SARS-CoV-2 с одонитовой РНК. На основе накопленных исследований по изучению патогенеза коронавируса были выявлены несколько молекулярных мишеней, такие как 3- химотрипсин подобная цистеиновая протеаза (3 CLpro), папаин подобная протеаза (PLpro), и РНК зависящая РНК полимераз (RDRP) [2].

Развитие COVID-19 связано с острым воспалением и иммунным ответом, который может вызвать гипертрофическим синдромом, называемым «цитокиновым штормом» [7].

Патогенетический механизм возникновения «цитокинового шторма» обусловлен чрезмерным высвобождением провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6, TNF-α. activity of microbial flora in the oral cavity,

В исследовании Angelica Jayk Bernaletal. (2021) был исследован молниеправир, который представляет собой низкомолекулярное рибонуклеозидное лекарство N-гидроксидитидина (NHC), которое обладает активностью против SARS-CoV-2 и других РНК-вирусов и является высоким барьером для развития резистентности. После перорального приема молниеправира NHC циркулирует системно и фосфорилируется внутриклеточно до трифосфата NHC [9]. NHC-трифосфат включается в вирусную РНК вирусной РНК-полимеразой и впоследствии неверно направляет вирусную полимеразу, чтобы включить гуанозин или аденозин во время репликации вируса. Это приводит к накоплению вредоносных ошибок по всему вирусному геному, что в конечном итоге делает вирус неинфекционным и неспособным к репликации. Однако более длительное применение данного препарата может вызвать заболевания печени и к тому же анализ нуклеокапсидных антител SARS-CoV-2 не определяет присутствие созданных вакциной нейтрализующих антител к спайковому белку (S) SARSCoV-2 [1].

Согласно исследованию Jia Weetal. (2021) сероконверсия к вирусным спайк-антигенам и

течение 1-3 нед после заражения SARS-CoV-2, а пиковые уровни антител достигают 4-5 нед то ПЦР позитивными был каждый 2 больной (95% ДИ - 1,5-5,6) [5,6].

Моноклональные антитела такие как бамланивимаб-этесевимаб-казиривимаб-имдевимаб и сотровимаб в настоящее время разрешены для лечения больных с SARS-CoV-2, однако применение таких препаратов эффективно в начальной стадии коронавирусной инфекции и к тому серьезные побочные эффекты со стороны печени является недостатком такого рода лечения [3].

В настоящее время все большее внимание уделяется природным источникам биологически активных веществ в лечении коронавирусной инфекции. Так, к примеру Байкалин, предложенный для лечения SARS-CoV-2 (ChingjuLinetal, 2021), выделенного из растения *Scutellaria baicalensis* обладает противовоспалительным, антиоксидантным и противовирусным действием. Снижение под действием байкалина окислительного стресса может снизить патогенетическое влияние «цитокинового шторма» и соответственно снижает риск осложнений COVID-19 [8].

Также все большее внимание уделяется другому натуральному продукту, известному грибу *G. Lucidum*. Состав данного натурального продукта очень широк, включая супероксиддисмутазу, которая также снижает патогенетическое влияние «цитокинового шторма» не оказывая на печень побочных эффектов [10].

Также в последнее время все большее внимание уделяется еще одному натуральному продукту Алхадая, который представляет собой масло черного тмина. Я заметил, что и *G. Lucidum* и Алхадая в своем составе содержат карбоксильные группы, причем они не являются продолжением нитрогрупп и сульфгидрильных групп. Эти карбоксильные группы отходят от фенольных колец *G. Lucidum* и бензольных колец Алхадая и была предложена идея создания нового препарата на основе *G. Lucidum* и Алхадая, и учитывая столь важное значение не только в лечении коронаврусной инфекции, но и в безопасном его применении, то данное исследование считается актуальной темой и требует его дальнейшего изучения.

Цель работы - провести сравнительное проспективное рандомизированное исследование лечения коронавирусной инфекции SARSCoV-2 новым препаратом на основе *G. Lucidum* и Алхадая.

Материалы и методы

Для осуществления поставленной цели были проанализированы результаты лечения 200

половозрелых крыс обоего пола. 160 крыс заражали коронавирусной инфекцией. Содержание животных, оперативные вмешательства и вывод из эксперимента осуществляли на основе этических принципов, декларированной Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей. Животные содержались в виварии при свободном доступе к пище и воде и естественной смене дня и ночи. Эксперименты проводились в условиях спонтанного дыхания и температуры окружающей среды 24-25°C. Изоляцию вируса проводили на культуре клеток vitron вирусосодержащего образца клинического материала (мазок из носоглотки). Эффективность репликации вируса SARS-Cov-2 на культуре клеток оценивали по динамике появления цитопатического действия и наличию вирусной РНК при анализе культуральной жидкости методом полимеразной цепной реакции - ПЦР.

Крысы были интраназально заражены штаммом SARS-Cov-2 50% средней инфекционной дозы тканевой культуры (TCID 50) на 50 мкл инокулята (биопрепарат с живыми культурами) после внутривентриальной анестезии с использованием 2,5% раствора тиопентала натрия.

Все животные были разделены на 5 групп.

I группа - абсолютно здоровые крысы (n=40).

II группа - крысы, зараженные коронавирусной инфекцией, леченные ремдесевиром (n=40).

III группа - крысы, зараженные коронавирусной инфекцией, леченные молнупиравиром (n=40)

IV группа - крысы, зараженные коронавирусной инфекцией, леченные байкалином (n=40)

V группа - крысы, зараженные коронавирусной инфекцией, леченные новым препаратом на основе *G. Lucidum* и Алхадая (n=40).

Ремдесевир-традиционный препарат, применяли в дозировке 20 мг/кг массы тела

Молнупиравир как известно представляет собой экспериментальную пероральную форму мощного аналога рибонуклеозида, который ингибирует репликацию SARS-CoV-2 - возбудителя COVID-19. В данном исследовании Молнупиравир применяли в дозе 25 мг/кг массы тела.

Байкалин получали из шлемника байкальского с размером частиц 0,1-0,5 мм. Используемый метод экстракции - простая

материя в течение заданного промежутка времени, при соотношении сырье: экстрагент 1:10 м/о и температуре 24±1°С Байкалин содержит активный фермент бета-глюкуронидазу, содержащегося в клетках корня шлемника байкальского, который при смачивании сырья экстрагентом, содержащего воду начинает активно гидролизовать байкалин до его агликона (байкалеина) и глюкуроновой кислоты. Байкалин оказывает стимулирующее влияние на глутатионовое звено NADPH - GSH- зависимой АОС: повышает содержание глутатиона восстановленного в печени у здоровых животных и активности глутатионсинтазы и глюкозо-6-фосфогидрогеназы в печени и почках в условиях развития окислительного стресса при действии различных токсикантов. Байкалин вводили крысам внутривентриально в дозе 15 мг/кг массы тела.

Новый препарат на основе G. Lucidum и Алхадая вводили внутривентриально в дозе 100 мг/кг массы тела.

Реакцию амплификации и анализ продуктов ПЦР осуществляли в режиме реального времени на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» («CorbettResearch», Австралия). В состав реакционных смесей входили комплементарные специфическому фрагменту олигонуклеотидные прямые и обратные праймеры, флуоресцентные зонды, меченые флуорофором FAM (карбокси флуоресцеин) и гасителем флуоресценции (RTQ1), дезоксирибонуклеозид три

фосфаты (дНТФ), MgCl 2, буфер, фермент Taq-полимераза и деионизированная стерильная вода. Для отрицательного контроля в пробирку вместо образца вносили такой же объем дистиллированной воды.

Положительные пробы определяли по наличию фазы логарифмического роста кривой флуоресценции. Регистрацию результатов в режиме реального времени (значение порогового цикла, Ct) проводили в табличной и графической форме с помощью компьютерных программ.

Статистическую обработку проводили с учетом параметрических и непараметрических методов исследования.

Результаты и обсуждение

После заражения крыс коронавирусной инфекцией COVID-19 проводили рутинное исследование крови 200 крыс на наличие вируса SARSCoV-2 взятием соскоба с ротоглотки и бронхоальвеолярным лаважем. Для выявления коронавирусной инфекции использовали 500 копий/мл образца. В таблице 1 до лечения показаны результаты ПЦР теста после заражения коронавирусной инфекцией.

Результаты ПЦР теста до лечения

Таблица 1

Результат	Количество
Истинно-положительный	180
Ложно-положительный	10
Истинно -отрицательный	5
Ложно-отрицательный	5

Проявления COVID-19

В таблице 2 указаны проявления COVID-19

Таблица 2

Проявление	Общее (n=200)	SARSCoV-2 в крови, ПЦР положительный	ПЦР отрицательный	p
Критический	40	40	0	
Тяжелая форма	45	45	0	
Средне-тяжелая форма	57	55	2	<0,05
Легкая форма	38	30	8	<0,05

В таблице 3 указана вирусная нагрузка коронавирусной инфекцией COVID-19



Показатели вирусной нагрузки до лечения

Органы-мишени	Общее	ПЦР положительный	ПЦР отрицательный	p
Респираторный отдел	3680 (595-166,800)	9,404,000 (586,060 10,000,000)	1560 (312 25,160)	<0,001
Кровеносная система	0	694 (209-1023)	0	

При исследовании полученного материала использовался критерий Краскеса-Уоллиса (рис. 1).

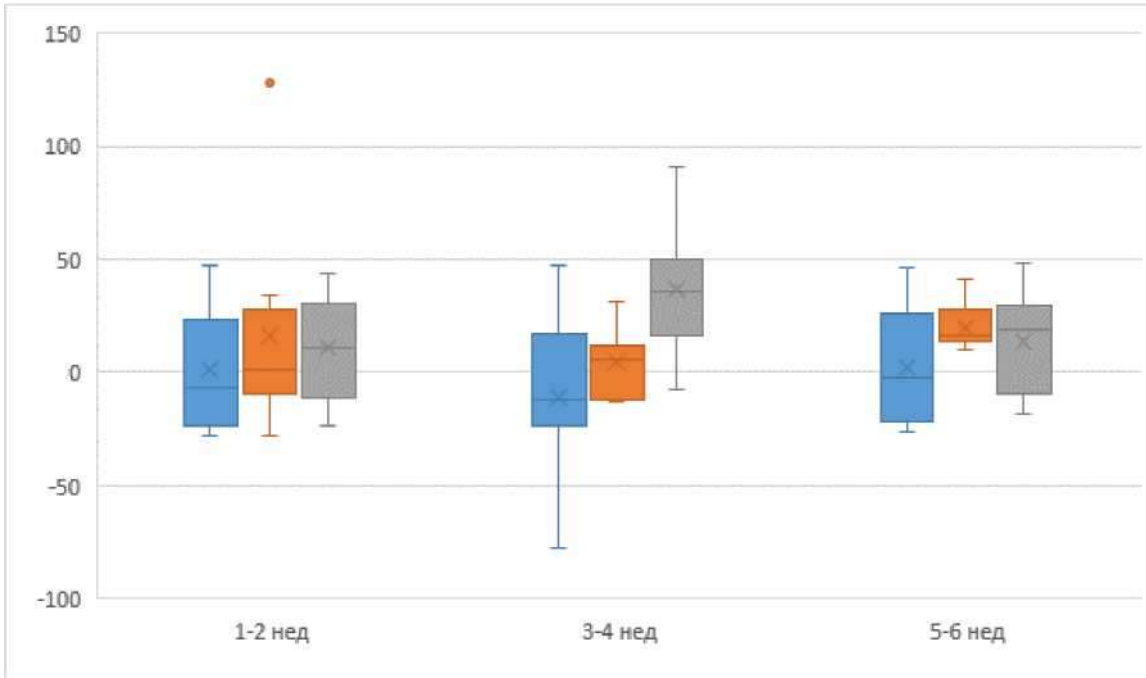


Рис. 1. Изменения в дыхательной и кровеносной системах при воздействии коронавирусной инфекции и их патогенетическая связь (критерий Краскеса-Уоллиса).

В рис. 1 показано распределение нагрузки SARSCoV-2 в зависимости от образца (респираторная или кровеносная система) и времени изменения в крови. Также из рис. 1 показано, что более 90% образцов имели положительный результат на общую РНК SARSCoV-2 вирусной нагрузкой от

1,6x10 до 1,3x10⁴ копий РНК SARSCoV-2 В табл. 3. Показаны результаты обнаружения клинических образцов с помощью обратной транскриптазы - ПЦР.

Таблица 3

Результаты обнаружения клинических образцов с помощью обратной транскриптазы (ПЦР)

Образцы и значения	Бронхоальвеолярный лаваж	Мазки из носа	Кровеносная система
ПЦР положительный	180 (90%)	170 (85%)	148 74%)
Порог цикла (среднее значение)	131.3 (30.0)	132.4 (42.0)	134.6 (47.6)
Диапазон	126.4-136.2	169.8-185.4	134.1-135.4
95% ДИ	28.9-33.2	29.3-33.0	0.0-36.4

Так, 95% ДИ (доверительный интервал) в III, IV и V группах находится между 2,4-4,0, что указывает на точную оценку при $p < 0,05$. ОШ (отношение шансов) составляла 0,9523107 между применением нового препарата на основе Ганодермы Луцидум и Алхадая и выраженностью патологического процесса в легких, X_2 (критерий Вилконсона) составляет 0,93280714, U (критерий Манна-Уини) составляет 0,94135082 при $p < 0,05$

У животных П группы после применения ремдесвира происходило частичное улучшение биохимических параметров. Так как АЛТ и АСТ оставались высокими, то наблюдались гепатомегалия и спленомегалия.

Данный вирус, как известно, заражает человечество воздушно-капельным путем и минимального количества достаточно для заражения. Попадая через дыхательную систему в кровотока этот вирус встречает на своем пути огромное количество ступеней иммунной защиты, но этот вирус научился уклоняться от них. Итак, данный вирус попадая в организм не обнаруживается нашей системой из-за гетерогенной вариативности вируса, большого количества антииммунных механизмов и чрезвычайно низким количеством титра антител (IG G/Ig M) вырабатываемых нашим организмом. А все потому, что HLA антигены нашего организма не могут распознать этот антиген из-за того, что Toll-like рецепторы макрофагов не содержат должного количества N-галактозамина необходимого для распознавания данного вируса. Кроме того, 7-трансмембранные G-белок связанные рецепторы, активирующие альтернативный путь активации макрофагов через систему комплемента также не могут распознать данный вирус и-за генетической перестройки данного вируса [1]. Кроме того, Toll-like рецепторы, присутствующие на поверхности практически всех иммунных клетках не распознают этот вирус как антигенный из-за рецепторов, содержащихся в гликопептидной оболочке данного вируса, которые как только узнают антигены организма-хозяина сразу же начинают экспрессировать полипептиды, равнозначные аминокислотным последовательностям нашего организма [2]. Кроме того, вирусная капсидная оболочка обладает очень мощным защитным механизмом. Так, рецепторы в

данной оболочке мгновенно реагируют на антитела, выделяемые В-клетками и нейтрализуют эти антитела и не образуется самого комплекса антиген-антитело, который не в дальнейшем не представляется макрофагам и не презентуется антителопродуцирующим клеткам. Также данный вирус способен активно размножаться из-за неконтролируемыми темпами роста. Так, у данного организма отсутствует лимит Хейфлика, который как известно, помогает многим злокачественным опухолям бесконтрольно размножаться. Toll-like рецепторы как уже было сказано, не способны определить данный вирус как патогенный с высокой вирулентностью и также данные рецепторы по принципу обратной связи через лигандактивируемый убиквитин-протеасомный путь не способны активировать сигнальный путь WNT/ β -катенин, являющим основным сигнальным путем для репарации клеток. 7-трансмембранные G-белок связанные рецепторы также не способны должным образом активизироваться и таким образом не TH1- и TH2-клетки не активизируются и конечно не происходит роллинговых связей лейкоцитов, так как Syalil-Lewis X-гликопротеин не активизируется через кофакторы и лиганды [3]. Также даже если небольшое число лейкоцитов активизировать и мигрировало через кровеносные сосуды, то этого количества явно не хватает для киллинга данного вируса. Цитокины, такие как суперсемейство TNF и Ig, интерлейкины (IL-1, IL-6, IL-10) известные как противовоспалительные цитокины также не обладают должным киллинговыми свойствами из-за недостаточной активации этих веществ, которые по принципу обратной связи также не активизируют дальнейшее представление антигена на антигенпрезентирующих клетках. МНС - клетки I и II типа также не способны активизироваться самостоятельно так как отсутствует сигнал, получаемый этими клетками через лигандопосредованные взаимодействия дендритных клеток и макрофагов [4-7]. Дальнейшее активирование макрофагов через альтернативный и лектиновый пути не приводит к стабилизации процесса и активные формы кислорода (АФК) и свободные радикалы, такие как хлор и азот не образуют сильнейших веществ с антидетоксикантными свойствами, такими как

пациентов из-за повышения выхода Na^+ из клетки вместе с хлором и водой. Жидкость накапливается в межклеточном пространстве и может грозить тяжелыми осложнениями, такими как анасарка и др. Также Cl^- , входящий в состав многих препаратов, применяемых для лечения коронавируса COVID-19 обладает неконтролируемым бактерицидным эффектом и может в при тяжелых состояниях приносить вред. Также за действенная система $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ насоса задействует большое количество АТФ для поступления K^+ в клетку. ГанодермаЛуцидум может активизировать выработку АТФ в митохондриях посредством энергозависимых каналов, по которым часть аденозина переносится в сами органеллы при помощи белков-переносчиков. Также ГанодермаЛуцидум активизирует переносчики Zn зависимых каналов, по которым цинк переносится в митохондрии, посредством которого и образуется АТФ [8-10]. Далее ГанодермаЛуцидум задействует ферменты, участвующие в синтезе витамина А (ретинола) посредством влияния ее на лиганды рецепторов ретиноевой кислоты (RAR) вызывая их дифференцировку т.е. провитамин синтезируется в витамин. Так, рецепторы RAR усиленные под действием Ганодермы Луцидум приводят к инактивации вируса. Так как витамин А является жирорастворимым витамином и для его формирования необходим Р-каротин то Алхадая или масло черного тмина является большим источником холестерина и полиненасыщенных жирных кислот, которые преобразуются в организме сначала в ЛПНП (липопротеины низкой плотности), которые затем преобразуются в ЛПВП (липопротеины высокой плотности). Также ГанодермаЛуцидум влияет на количество и состав матричных металлопротеиназ, в частности (ММП-3 и ММП-9), образующихся в больших количествах при данном типе вируса [1,3]. Так, ГанодермаЛуцидум активизирует тканевой ингибитор матричных металлопротеиназ

(ТММР), посредством влияния на трансформирующий фактор роста Р (TGF-Р) через активацию тучных клеток и макрофагов. Как известно, матричные металлопротеиназы имеют на своей поверхности Zn -связанный домен, и разрушающие компоненты ВКМ (внутриклеточного матрикса). Так как при воздействии данного вируса не образуются проколлагеназы, и поэтому не происходит его активация свободными радикалами для дальнейшего превращения в коллаген. Также ГанодермаЛуцидум влияет и на мембраносвязанные металлопротеиназы ADAM контролирующие посредством тканевых ингибиторов матричных металлопротеиназ нежелательные эффекты этих протеаз. Так как дефицит ADAM приводит непосредственно к гипоплазии легких, то конечно влияние Ганодермы Луцидум и усиление его функции приводит к не сращению альвеол и образованию соединительной ткани, которую так сильно контролирует вирус. Также в результате перегруппировки генов и повышение экспрессии данного вируса задействуются рецепторы тирозинкиназного типа. Также получается, что организм хозяина стимулирует выработку еще большего количества данного вируса из-за неспособности парафолликулярных С-клеток щитовидной железы поддерживать на балансе данные рецепторы. Происходит как бы постоянная демиризация и активация рецептора его в изначально неправильной химической формуле, локализующимся в цитоплазматическом каталитическом домене, и таким образом нарушается субстратная специфичность тирозинкиназы.

Таким образом, применение нового препарата на основе G. Lucidum и Алхадая эффективно против коронавирусной инфекции, вызванной COVID-19 и не имеет побочных эффектов, что доказано проведенным исследованием.

Литература

1. An experimental assessment of the influence of Ganoderma Lucidum on the state of oxidative stress. Iriskulov B.U., Saydalikhodjaeva O.Z., Abilov P.M., Seytkarimova G.S., Norboeva S.A., MusaevKh.A. International journal of scientific & technology research, Volume 9, Issue 03, March 2020: 6645-6649.
2. Aromatic constituents from Ganoderma lucidum and their neuroprotective and antiinflammatory activities. Shuang-Yang Li et al. Fitoterapia. 2019;01:13.
3. Bioactive metabolites of Ganoderma Lucidum: Factors, mechanism and broad spectrum therapeutic potential. Chetan Sharma et al. Journal of Herbal Medicine. 2019;10:2.
4. Characterization, hypolipidemic and antioxidant activities of degraded polysaccharides from Ganoderma Lucidum. International Journal of Biological Macromolecules. 2019;5:166.



5. Clinical and functional evaluation of the effectiveness of treatment of chronic catarrhal gingivitis in children with the use of biologically active additives based on Ganoderma Lucidum. Abilov P.M., Makhkamova F.T. Pediatric, Scientific and practical journal. 2018;1:108-111.
6. Comparison on characterization and antioxidant activity of polysaccharides from Ganoderma lucidum by ultrasound and conventional extraction. Qiaozhen Kang et al. International Journal of Biological Macromolecules. 2018;11:215.
7. Dayaolingzhiols A-E, AchE inhibitory meroterpenoids from Ganoderma lucidum. Qi Luo et al. Tetrahedron. 2019;04:22.
8. Development of Ganoderma lucidum spore powder based proteoglycan and its application in hyperglycemic, antitumor and antioxidant function. Li-Fang Zhu et al. Process Biochemistry. 2019;5:25.
9. DNA damaging potential of Ganoderma lucidum extracts. Maria Soledad Vela Gurovic et al. Journal of Ethnopharmacology. 2018;2:5.
10. Efficiency of individual prophylaxis of dental caries using dental gel Ispring based on Ganoderma lucidum in schoolchildren in Tashkent. Abilov P.M. Journal Dental and Oral Health. 2018;5: 1-4.
11. Ahmedova, Dildora, and G. Kézdi. "The Impact of Population Ageing on Private Savings Rate: Empirical Evidence from the OCDE Members Countries." Submitted to the Central European University Department of Economics. Budapest. Hungary (2011).
12. Ахмедова, Дилором Ильхамовна, Т. О. Даминов, and Ш. А. Агзамова. "Клинико-диагностические особенности основных синдромов у детей при внутриутробном инфицировании TORCH." Детские инфекции 8.1 (2009): 29-31.
13. Akcura, F., D. Ahmedova, and P. Menlikulov. "Health For All: A Key Goal for Uzbekistan in the New Millennium." Tashkent: United Nations Development Programme (2006).