



Abilov P.M., Iriskulov B.U., Boboeva Z.N., Maxkamova F.T.

ADAPTIVE MECHANISMS AND CORRECTION OF CORONAVIRUS INFECTION AUSED BY COVID-19 IN-VITRO

Key words: pathophysiological mechanisms; coronavirus infection; G. Lucidum; Alhadaya; acute respiratory syndrome

The article deals with the study effectiveness analyses of use new drug based on G. Lucidum and Alkhadaï in the treatment of coronavirus infection caused by COVID-19. The pathophysiological mechanism of the new drug effect on the course of coronavirus infection is presented.

Abilov P.M., Iriskulov B.U., Boboeva Z.N., Maxkamova F.T.

IN- VITRO COVID-19 KELITIRIB CHIQARADIGAN KORONAVIRUS INFEKSIYASINING MOSLASHUV MEXANIZMLARI VA KORREKSIYASI

Kalit so'zlar: patofiziologik mexanizmlar; coronavirus infeksiyasi; G. lucidum; Alhadaya; o'tkir respirator sindrom

tahlil qilingan. Yangi preparatning coronavirus infeksiyasi kechishiga ta'sirining patofiziologik mexanizmi keltirilgan. Ushbu maqolada G. Lyusidum va Alxadaya asosidagi yangi preparatning COVID-19 keltirib chiqaradigan coronavirus infeksiyasini davolashda samaradorligi

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

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ G. LUCIDUM И АЛХАДАЯ В ЛЕЧЕНИИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ SARSCOV-2

Ташкентская медицинская академия;

Ташкентский педиатрический медицинский институт

Цель исследования. Оптимизация подходов в диагностике и терапии коронавирусной инфекции, вызванной COVID-19.

Материалы и методы. Для осуществления поставленной цели были проанализированы результаты лечения 50 больных с коронавирусной инфекцией, вызванной COVID-19. Все больные были разделены на группы: 1 группа - больные с коронавирусной инфекцией с подтвержденным положительным ПЦР тестом, леченных ивермектином в дозировке 300 мг массы тела (n=12), 2 группа - больные с коронавирусной инфекцией леченные байкалином в дозировке 500 мг (n=14), 3 группа - больные с коронавирусной инфекцией, леченные молнупиравиром 25 мг/кг массы тела, 4 группа - больные с коронавирусной инфекцией леченные новым препаратом на основе G. Lucidum и Алхадая.

Результаты. Учитывая высокие показатели аналитической чувствительности и специфичности разработанных праймеров BDags1F/BDags2R и флуоресцентного зонда BDags-2P для идентификации SARSCoV-2, на следующем этапе работы была изучена их диагностическая информативность при моделировании коронавирусной инфекции на белых мышах.

Нынешняя вспышка коронавирусной болезни (COVID-19) является чрезвычайной ситуацией во всем мире, поскольку ее быстрое распространение и высокий уровень смертности вызвали серьезные нарушения. Число людей, инфицированных коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), возбудителем COVID-19, стремительно растет во всем мире. У пациентов с COVID-19 может развиваться пневмония тяжелые симптомы острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) и полиорганная недостаточность.

Коронавирус представляет собой оболочечный положительный одноцепочечный РНК-содержащий вирус. Он принадлежит к подсемейству Orthocoronavirinae, как следует из названия, с характерными «коронаобразными» шипами на их поверхности⁵. Вместе с SARS-CoV в род бета-коронавирусов попадают также SARS-CoV летучих мышей и другие [6]. 15 января 2019 г. на Тайване COVID-19 (вызванный инфекцией 2019-nCoV) классифицируется как подлежащее регистрации инфекционное заболевание пятой категории. Род бета-коронавирусов можно разделить на несколько подгрупп. 2019-nCoV, SARS-CoV и SARS-подобный CoV летучих мышей относятся к сарбековirusу, а MERS-CoV — к мербековirusу, имеющие различные биологические характеристики и вирулентность [7, 10].

Иммунные модели COVID-19 включают лимфопению, активацию и дисфункцию лимфоцитов, аномалии гранулоцитов и моноцитов, повышенную продукцию цитокинов и повышенное количество антител. Лимфопения является ключевым признаком пациентов с COVID-19, особенно в тяжелых случаях. CD69, CD38 и CD44 в высокой степени экспрессируются на CD4+ и CD8+ Т-клетках пациентов, а вирусспецифические Т-клетки в тяжелых случаях демонстрируют фенотип центральной памяти с высокими уровнями IFN-γ, TNF-α и IL-2. Тем не менее, лимфоциты демонстрируют фенотип истощения с активацией белка запрограммированной гибели клеток-1 (PD1), Т-клеточного домена иммуноглобулина и домена-3 муцина (TIM3) и члена 1 подсемейства С-рецептора, подобного лектину клеток (NKG2A) [2,4]. Уровень нейтрофилов значительно выше у тяжелых больных, тогда как процент эозинофилов,

базофилов и моноцитов снижен. Повышенная продукция цитокинов, особенно ИЛ-1Р, ИЛ-6 и ИЛ-10, является еще одной ключевой характеристикой тяжелого течения COVID-19. Уровни IgG также повышены, и имеется более высокий титр всех антител [8].

Лимфопения является ключевым признаком пациентов с COVID-19, особенно в тяжелых случаях. У пациентов с тяжелым течением COVID-19 чаще наблюдается лимфопения при поступлении, что указывает на значимый предиктор для тяжелых пациентов. Было обнаружено, что процент лимфоцитов ниже 20% в тяжелых случаях. Дальнейший анализ показал значительное снижение количества Т-клеток, особенно CD8+ Т-клеток, в тяжелых случаях по сравнению с легкими случаями. Qin et al. сообщили, что процент Т-клеток-хелперов памяти (CD3+CD4+CD45RO+) также снижается в тяжелых случаях по сравнению с нетяжелыми случаями. Эти данные указывают на то, что лимфопению можно использовать в качестве показателя тяжести заболевания и прогноза у пациентов с COVID-19 [3,5]. Тем не менее, лимфопения присутствовала в некоторых нетяжелых случаях и беременных; однако процент нетяжелых пациентов с лимфопенией значительно ниже, чем у тяжелые пациенты. Интересно, что число В-клеток находится в пределах нормы, что аналогично результатам нашего исследования, указывая на то, что поврежденные В-клетки не так значительны, как поврежденные Т- или НК-клетки [1, 9]. 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 белозольных колец Алхадая и была предложена идея создания нового препарата на основе G. Lucidum Алхадая, и учитывая столь важное значение не только в лечении коронавирусной инфекции, но и в безопасном его применении, то данное исследование считается актуальной темой и требует его дальнейшего изучения.

Цель работы - оптимизация подходов в диагностике и терапии коронавирусной инфекции, вызванной COVID-19.

Материалы и методы

Для осуществления поставленной цели были проанализированы результаты лечения 50 больных с коронавирусной инфекцией, вызванной COVID-19. Все больные были разделены на группы: 1 группа - больные с коронавирусной инфекцией с подтвержденным положительным ПЦР тестом, леченных ивермектином в дозировке 300 мг массы тела (n=12), 2 группа - больные с коронавирусной инфекцией леченные байкалином в дозировке 500 мг (n=14), 3 группа - больные с коронавирусной инфекцией, леченные молнупиравиром 25 мг/кг массы тела, 4 группа - больные с коронавирусной инфекцией леченные новым препаратом на основе G. Lucidum и Алхадая.

Реакцию амплификации и анализ продуктов ПЦР осуществляли в режиме реального времени на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research», Австралия). В состав реакционных смесей входили комплементарные специфическому фрагменту олигонуклеотидные прямые и обратные праймеры, флуоресцентные зонды, меченые флуорофором FAM (карбоксифлуоресцеин) и гасителем флуоресценции (RTQ1), дезоксирибонуклеозид три фосфаты (дНТФ), MgCl₂, 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

Учитывая высокие показатели

аналитической чувствительности и специфичности разработанных праймеров BDags1F/BDags2R и флуоресцентного зонда BDags-2P для идентификации SARSCoV-2, на следующем этапе работы была изучена их диагностическая информативность при моделировании коронавирусной инфекции на белых мышах.

Кроме того, в исследовании использовали человеческую кровь, контаминированную клетками SARSCoV-2, для оценки возможности применения праймеров в целях диагностики заболевания у человека. Для этого использовали взвесь вирусных клеток SARSCoV-2 в дрожжевой форме с концентрацией от $1 \cdot 10^5$ кл/мл до $1 \cdot 10^6$ кл/мл.

В результате работы установлено, что праймеры BDags-1F/BDags-2R способны детектировать ДНК вируса в крови в концентрации от $1 \cdot 10^4$ кл/мл. Для стандартизации эксперимента при моделировании инфекции использовали взвесь дрожжевой культуры с концентрацией $1 \cdot 10^6$ кл/мл. Для реакции амплификации отбор секционного материала от инфицированных белых мышей осуществляли на 7, 14, 21 и 28 сутки после заражения.

Исследование биологических проб с помощью ПЦР в режиме реального времени проводили параллельно с культуральным (микологическим) методом.

При внутрибрюшинном заражении у восприимчивых животных может развиваться коронавирусная инфекция. Вскрытие животных на 7 сутки после заражения обусловлено тем, что данный период совпадает со сроком манифестации данного коронавируса.

Однако при вскрытии зараженных белых мышей макроскопических изменений внутренних органов выявлено не было. ДНК SARSCoV-2 6/85 обнаружена методом ПЦР в 12,5% проб селезенки и крови. При исследовании секционного материала с помощью культурального метода рост SARSCoV-2 6/85 выявлен в пробах печени и селезенки в 12,5%.

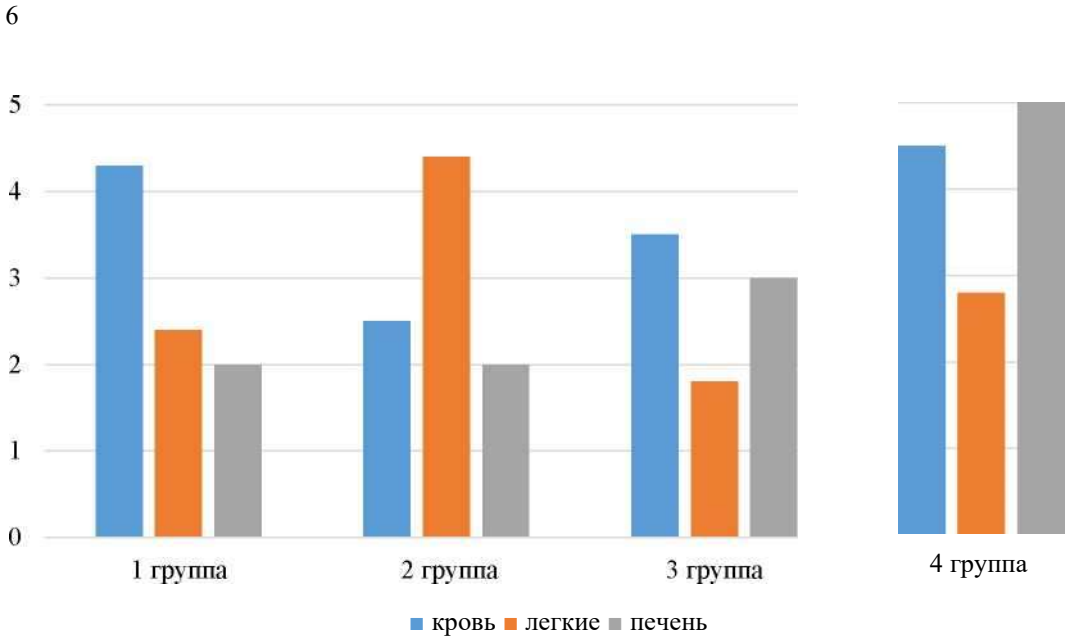


Рис. 1. Результаты обнаружения SARS - CoV-2 при экспериментальной инфекции на 7 сутки заболевания

Так, содержание Т-клеток в норме составляет 0,8-2,5 10⁹/л. В исследовании было выявлено уменьшение содержания Т-клеток <0,8X10⁹/л (рис. 2).

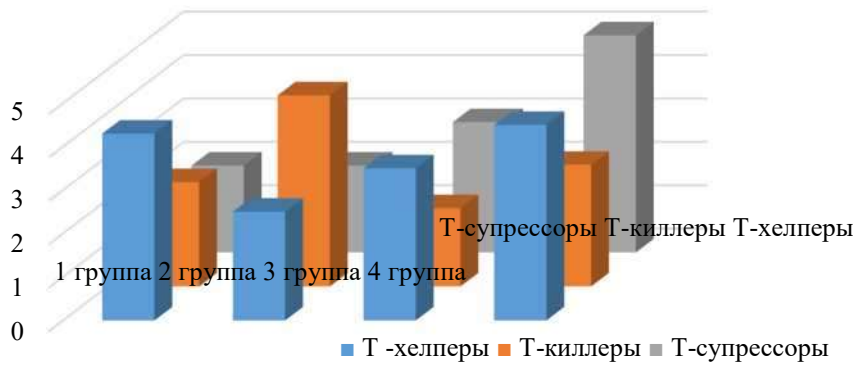


Рис. 2 Содержание Т-клеток на момент поступления больного

Так как, повышение относительного числа Т-клеток чаще отмечается при резко поляризованном Тх1 типе иммунного ответа на вирусный антиген, мы также наблюдали повышенное количество Т-лимфоцитов.

Увеличение относительного числа Т-хелперов может отмечаться при Тх2 типе иммунного ответа, что обусловлено увеличением числа Т-хелперов при Тх2 типе иммунного ответа.

Известно, что тяжелый острый респираторный синдром коронавируса (ОРДС) поражает клетки, экспрессирующие поверхностные рецепторы ангиотензин-превращающего фермента 2 (АПФ2) и TMPRSS2, активная репликация и высвобождение вируса заставляют клетку-хозяина высвобождать связанные с повреждением молекулярные структуры, включая АТФ, нуклеиновые кислоты и олигомеры ASC. Они распознаются соседними эпителиальными клетками, эндотелиальными

клетками и альвеолярными макрофагами, вызывая генерацию провоспалительных цитокинов и

хемокинов (включая IL-6, IP-10, макрофагальный воспалительный белок 1a (MIP1a), MIP1P и MCP1). Эти белки привлекают моноциты,

макрофаги и Т-клетки к месту инфекции, способствуя дальнейшему воспалению.

На рис.3 показано содержание В-лимфоцитов при коронавирусной инфекции

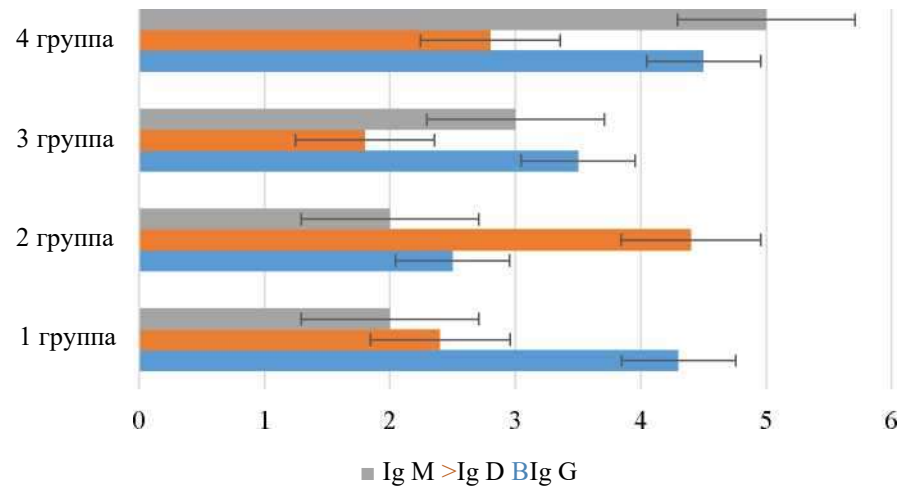


Рис. 3. Содержание В-лимфоцитов в периферической крови больных с коронавирусной инфекцией

Так как уменьшение абсолютного числа В-лимфоцитов может быть результатом лимфопении, наблюдаться в случае активного антителообразования и прикорунарусной инфекции, вызванной SARSCoV-2.

После лечения в 1 исследуемой группе на 14 день у 10 больных происходило улучшение показателей методом ПЦР, что выражалось в уменьшении степени обнаружения SARSCoV-2 у испытуемых.

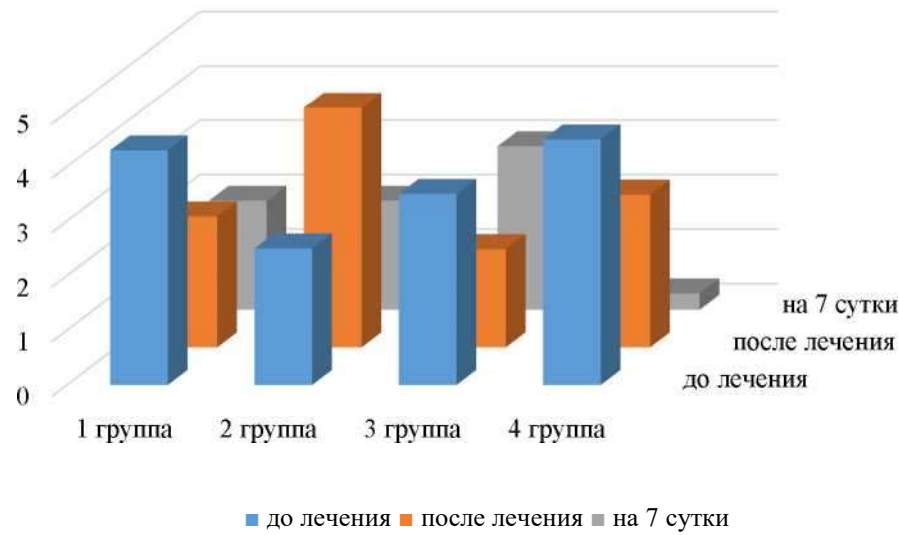


Рис. 4. Результаты обнаружения коронавирусной инфекции, вызванной SARSCoV-2 у испытуемых

Причем, на 21 сутки возбудитель коронавирусной инфекции обнаруживали в 25% проб печени и 37,5% проб селезенки. При осмотре органов брюшной полости мышей при вскрытии

отмечено наличие полнокровия и увеличения печени и селезенки зараженных животных. Методом ПЦР ДНК SARSCoV-2 6/85 выявлена в 12,5% проб печени, крови, и в 25% проб селезенки.

Посвящается к 100-летию со дня рождения профессора Карима Сулеймановича Сулейманова

ПЕДИАТРИЯ

При моделировании экспериментальной инфекции ДНК возбудителя коронаврусной инфекции методом ПЦР была обнаружена у 10 из 32 зараженных мышей (31%).

Однако бактериологический метод потребовал значительно больше времени для исследования. Видимый рост микромицета

наблюдался только на 10-14 сутки после взятия материала на исследование. Еще 7-10 суток потребовалось на появление морфологических признаков, с помощью которых можно было провести идентификацию микроорганизма. Также на результаты ПЦРне влияла возможная контаминация проб посторонней микрофлорой.

Таблица 1

Сопоставление результатов ПЦР после лечения у обследуемых групп

Группы	Результаты ПЦР	
1 группа	Положительная у 6	Отрицательная у 4
2 группа	Положительная у 9	Отрицательная у 3
3 группа	Положительная у 8	Отрицательная у 3
4 группа	Положительная у 1	Отрицательная у 9

Таким образом можно заметить, что применение нового препарата на основе G. Lucidumи Алхадаяявляется эффективным в лечении коронаврусной инфекции.

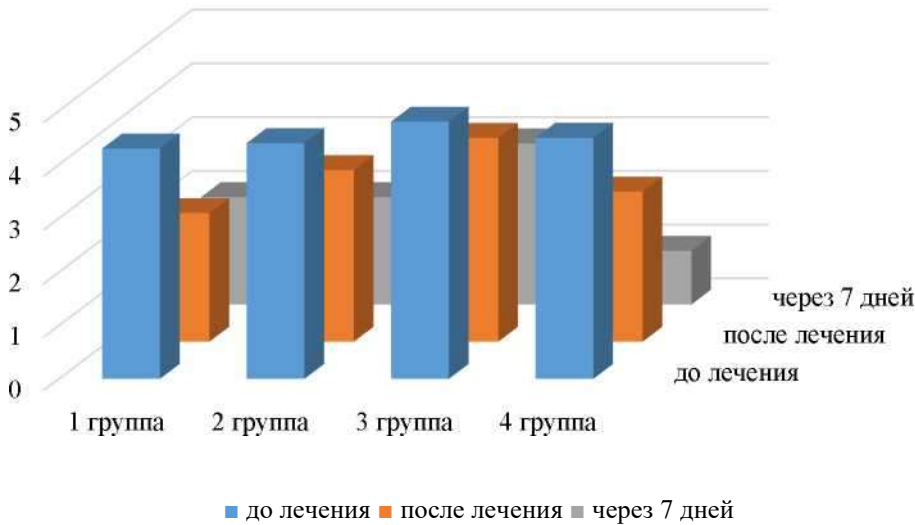


Рис. 5. Содержание Т-клеток после лечения в обследуемых группах

Также происходило и увеличение соотношения CD4/ CD8 за счет увеличения Т-хелперов (при нормальном количестве Т-киллеров) и снижения CD8 лимфоцитов.

Так как увеличение соотношения CD4/ CD8 за счет увеличения CD4 и снижения CD8 лимфоцитов обычно выявляется при смешанном Тх1/Тх2 ответе на антиген.

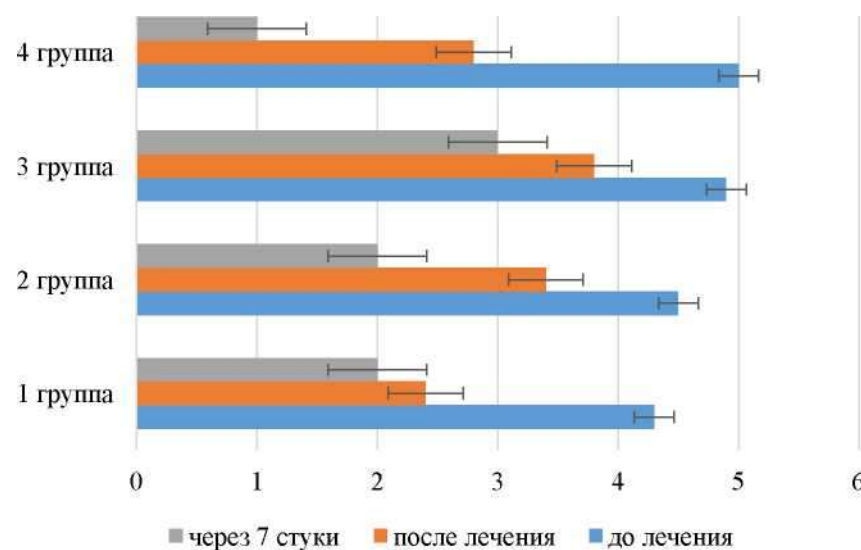


Рис. 6. Содержание В-лимфоцитов в периферической крови после лечения

Результаты представленных исследований указывают на принципиальную возможность применения полимеразной цепной реакции для обнаружения ДНК SARSCoV-2. Показана более высокая информативность ПЦР при анализе образцов крови, в сравнении с бактериологическим методом, что в реальных условиях может позволить обнаружить возбудитель в ранние сроки заболевания.

Таким образом, выявление и уничтожение коронавирусной инфекции, вызванной SARSCoV-2 достигается после применения нового препарата на основе G. Lucidum Алхадая (95% ДИ = 1,3-5,6 при $X^2=0,9321007$, U (критерий Манна-Уинни) = 0,8721093, H (критерий Краскеса-Уоллиса)=0,9102385 при $p<0,05$).

Литература

1. An experimental assessment of the influence of GanodermaLucidum 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. 2020;(9)3:6645-6649.
2. Aromatic constituents from Ganodermalucidum and their neuroprotective and antiinflammatory activities. Shuang-Yang Li et at. Fitoterapia. 2019;1:13.
3. Bioactive metabolites of GanodermaLucidum: Factors, mechanism and broad spectrum therapeutic potential. Chetan Sharma et at. Journal of Herbal Medicine. 2019;10:2.
4. Characterization, hypolipidemic and antioxidant activities of degraded polysaccharides from Ganoderma Lucidum. Yu Xu et at. 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 GanodermaLucidum. 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 Ganodermalucidum by ultrasound and conventional extraction. Qiaozhen Kang et at. International Journal of Biological Macromolecules. 2018;11:215.
7. Dayaolingzhiols A-E, AchE inhibitory meroterpenoids from Ganodermalucidum. Qi Luo et at. Tetrahedron. 2019;04:22.
8. Development of Ganodermalucidum spore powder based proteoglycan and its application in hyperglycemic, antitumor and antioxidant function. Li-Fang Zhu et at. Process Biochemistry. 2019;5:25.
9. DNA damaging potential of Ganodermalucidum extracts. Maria Soledad Vela Gurovic et at. Journal of Ethnopharmacology. 2018;2:5.

10. Efficiency of individual prophylaxis of dental caries using dental gel Ispring based on GanodermaLucidum in schoolchildren in Tashkent. Abilov P.M. Journal Dental and Oral Health.2018;4:1-8.

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).