ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

РОЛЬ УРОВНЯ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ РАЗВИТИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (COVID-19) И ВЛИЯНИЕ НОВОГО КОМБИНИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА (G. LUCIDUM И АЛХАДАЯ) НА ТЕЧЕНИЕ И ПРОГНОЗ БОЛЕЗНИ

Абилов Пулат Мэлисович - Ph.D., ассистент
Ташкентский государственный медицинский университет (Ташкент, Узбекистан)

Аннотация. *В декабре 2019 года в Ухане, столице провинции Хубэй в центральном Китае, была зарегистрирована вспышка острой внебольничной атипичной пневмонии неизвестной этиологии. Возбудитель, которым оказался новый коронавирус, ранее не выявлялся у вирусов папилломы человека и получил название SARS-CoV-2. 11 марта 2020 года ВОЗ признала эпидемию NCI пандемией. SARS-CoV-2 относится к роду Betacoronavirus семейства Coronaviridae. К этому роду также относятся возбудители респираторных заболеваний человека SARS-CoV-1, коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS) MERS-CoV, человеческий коронавирус HCOV-HKU1 и HCOVOC43.*

Материалы и методы исследования. *Для достижения поставленной цели были проанализированы результаты лечения 200 крыс с коронавирусной инфекцией, вызванной COVID-19. Была измерена концентрация 27 цитокинов: IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGF basic, G-CSF, GM-CSF, IFN-g, IP-10, MCP-1(MCAF), MIP-1a, PDGF- bb, MIP-1b, RANTES, TNF-a, VEGF. Статистическая обработка проводилась с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way analysis of variance ANOVA) post Tukey's hoc test или двухфакторного дисперсионного анализа (two-way analysis of variance ANOVA) использовались в работе для множественных сравнений между исследуемыми группами. Все анализы проводились слепым образом по отношению к экспериментальным группам. Статистически значимым считалось значение P < 0,05.*

Результаты исследования. *Для определения уровня экспрессии цитокинов и факторов роста при коронавирусной инфекции с учетом разных периодов заболевания был проведен мультиплексный иммуноферментный анализ. Данная задача выполнялась с целью последующего выявления белковых молекул, оказывающих наибольшее влияние на модуляцию фенотипа при коронавирусной инфекции. В ходе исследования были выявлены значимые различия в содержании некоторых аналитов при коронавирусной инфекции. Уровень провоспалительного цитокина IL-1β был достоверно повышен на 3-и сутки во всех исследуемых группах с коронавирусной инфекцией по сравнению с интактным контролем (P < 0,05). Таким образом, 95% ДИ (доверительный интервал) в III и IV группах находится в пределах 2,4-4,0, что свидетельствует о точной оценке при p ≤ 0,05. Отношение шансов (OR) между применением нового препарата на основе Ganoderma Lucidum и Alkhadaya и тяжестью патологического процесса в легких составило 0,9523107, χ2 (критерий Вилконсона) – 0,93280714, U (критерий Манна-Уинни) – 0,94135082 при p≤0,05.*

Ключевые слова: *коронавирус, цитокины, ANOVA, G. Lucidum, Alkhadaya, ВОЗ.*

THE ROLE OF INTERLEUKIN LEVELS IN THE PATHOGENESIS OF CORONAVIRUS INFECTION (COVID-19) AND THE EFFECT OF A NEW COMBINATION DRUG (G. LUCIDUM AND ALKHADAYA) ON THE COURSE AND PROGNOSIS OF THE DISEASE

Abilov Pulat Malisovich - Ph.D., assistant
Tashkent State Medical University (Tashkent, Uzbekistan)

Annotation. *An outbreak of acute community-acquired atypical pneumonia of unknown etiology was reported in Wuhan, the capital of Hubei Province in central China, in December 2019. The pathogen, which turned out to be a new coronavirus, had not previously been detected in human papillomaviruses and was named SARS-CoV-2. On March 11, 2020, the WHO recognized the NCI epidemic as a pandemic. SARS-CoV-2 belongs to the genus Betacoronavirus family Coronaviridae. This genus also includes the human respiratory pathogens SARS-CoV-1, Middle East respiratory syndrome (MERS) coronavirus MERS -CoV, human coronavirus HCOV-HKU1 and HCOVOC43.*

Materials and methods of the study. *To achieve the set goal, the results of treatment of 200 rats with coronavirus infection caused by COVID -19 were analyzed. The concentration of 27 cytokines was measured: IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGF basic, G-CSF, GM-CSF, IFN-g, IP-10, MCP-1(MCAF), MIP-1a, PDGF- bb, MIP-1b, RANTES, TNF-a, VEGF. Statistical processing was performed using one-way analysis of variance (one-way analysis of variance ANOVA) post Tukey's hoc test or two-way analysis of*

variance (two-way analysis of variance ANOVA) were used in the work for multiple comparisons between the tested groups. All analyses were performed in a blinded manner with respect to the experimental groups. A P value of <0.05 was considered statistically significant.

Results of the research. *To determine the level of expression of cytokines and growth factors in coronavirus infection, taking into account different periods of the disease, a multiplex immunoassay was performed. This task was performed with the aim of subsequently identifying protein molecules that have the greatest impact on the modulation of the phenotype in coronavirus infection. The study revealed significant differences in the content of some analytes in coronavirus infection. The level of the proinflammatory cytokine IL-1β was significantly increased on day 3 in all studied groups with coronavirus infection compared to the intact control (P < 0.05). Thus, 95% CI (confidence interval) in III and IV groups is between 2.4-4.0, which indicates an accurate assessment at p≤0.05. The OR (odds ratio) was 0.9523107 between the use of a new drug based on Ganoderma Lucidum and Alkhadaya and the severity of the pathological process in the lungs, χ_2 (Wilconson criterion) is 0.93280714, U (Mann- Whiney criterion) is 0.94135082 at p≤0.05*

Key words*: coronavirus, cytokines, ANOVA, G. lucidum, Alkhadaya, WHO.*

KORONAVİRUS INFEKTSIYSI (COVID-19) PATOGENEZIDA INTERLEYKIN DARAJALARINING O‘RNI VA YANGI KOMBINIRLANGAN PREPARATNING (G.LUCIDUM VA ALXADAYA) KASALLIKNING KECHISHI VA PROGNOZIZGA TA’SIRI

Abilov Pulat Malisovich – Ph.D., assistent
Toshkent davlat tibbiyot universiteti (Toshkent, O‘zbekiston)

Annotatsiya*. 2019-yil dekabr oyida Xitoyning markaziy qismidagi Xubey provinsiyasi poytaxti Uxan shahrida noma’lum etiologiyali o‘tkir jamiyat tomonidan yuqtirilgan atipik pnevmoniya avj olgani haqida xabar berilgan edi. Yangi koronavirus bo‘lib chiqqan qo‘zg‘atuvchi ilgari inson papillomaviruslarida aniqlanmagan va SARS-CoV-2 deb nomlangan. 2020-yil 11-martda JSST NCI epidemiyasini pandemiya deb tan oldi. SARS-CoV-2 Coronaviridae oilasining Betakoronavirus jinsiga mansub. Ushbu jinsga shuningdek, inson nafas olish kasalliklarining qo‘zg‘atuvchisi ham kiradi SARS-CoV-1, Yaqin Sharq respirator sindromi (MERS) MERS-CoV koronavirusi, HCOV-HKU1 va HCOVOC43.*

Materiallar va usullar*. Belgilangan maqsadga erishish uchun 200 ta kalamushni COVID-19 keltirib chiqaradigan koronavirus infeksiyasi bilan davolash natijalari tahlil qilindi. 27 sitokin konsentratsiyasi o‘lchandi: IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, G-MCS, asosiy, G-MCS IFN-g, IP-10, MCP-1(MCAF), MIP-1a, PDGF- bb, MIP-1b, RANTES, TNF-a, VEGF. Statistik ishlov berish dispersiyaning bir tomonlama tahlili yordamida amalga oshirildi. ANOVA post Tukey testi yoki ikki tomonlama dispersiya tahlili ANOVA tadqiqot guruhlari o‘rtasida bir nechta taqqoslash uchun ishda qo‘llanildi. Barcha tahlillar eksperimental guruhlarga ko‘r-ko‘rona o‘tkazildi. P <0,05 qiymati statistik jihatdan ahamiyatli deb hisoblanadi.*

Tadqiqot natijalari*. Koronavirus infeksiyasida sitokinlar va o‘sish omillarining ekspressiya darajasini aniqlash uchun kasallikning turli davrlarini hisobga olgan holda, multipleks ferment immunoassay o‘tkazildi. Bu vazifa koronavirus infeksiyasida fenotip modulyatsiyasiga eng katta ta’sir ko‘rsatadigan oqsil molekulalarini keyinchalik aniqlash maqsadida amalga oshirildi. Tadqiqot koronavirus infeksiyasida ba’zi tahlilchilar tarkibidagi sezilarli farqlarni aniqladi. Yallig‘lanish proinflamatuar sitokin IL-1b darajasi 3-kunida koronavirus infeksiyasi bo‘lgan barcha o‘rganilgan guruhlarda buzilmagan nazoratga nisbatan sezilarli darajada oshdi (P <0,05). Shunday qilib, III va IV guruhlarda 95% CI (ishonch oralig‘i) 2,4-4,0 oralig‘ida bo‘lib, bu p ≤ 0,05 da to‘g‘ri baholashni ko‘rsatadi. Ganoderma Lucidum va Alkhadaya asosidagi yangi preparatni qo‘llash va o‘pkadagi patologik jarayonning og‘irligi o‘rtasidagi ziddiyat nisbati (OR) 0,9523107, ch2 (Uilkonson mezoni) - 0,93280714, U (Mann-Vinni mezoni - 0,081) ni tashkil etdi. p≤0,05.*

Kalit so‘zlar*: koronavirus, sitokinlar, ANOVA, G. lucidum, Alxadaya, JSSV.*

Актуальность. Вспышка острой внебольничной атипичной пневмонии неизвестной этиологии была зарегистрирована в Ухане, столице провинции Хубэй в центральном Китае, в декабре 2019 г. Патоген, оказавшийся новым коронавирусом, ранее не обнаруживался в человеческой популяции и получил название SARS-CoV-2. 11 марта 2020 г. ВОЗ признала эпидемию НКИ пандемией. SARS-CoV-2 принадлежит к роду *Betacoronavirus* семейства *Coronaviridae.* Этот род также включает респираторные патогены человека SARS-CoV-1, коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS) MERS-CoV, коронавирус человека HCoV-HKU1 и HCoVOC43 [4]. Это плеоморфный оболочечный вирус (диапазон размеров: 60–140 нм), имеющий на поверхности характерные шипы. Геном вируса состоит из одноцепочечной плюс-нити РНК [2]. Последовательность *ORF1ab*, составляющая две трети всего генома, кодирует большой Гликопротеин шипа (S) на поверхности вириона необходим для связывания с рецептором человече-

ского ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2) и проникновения вируса в клетку [7]. Белок оболочки (E), вероятно, образует виропорин, который важен для сборки и высвобождения вируса, а также является предполагаемой детерминантой вирулентности [1]. Мембранный белок (M) представляет собой обильно экспрессируемый структурный белок внутри липидной оболочки, который также важен для вирусного морфогенеза и подавления синтеза интерферона [5]. Наконец, нуклеокапсидный белок (N) стабилизирует РНК-геном в спиральном комплексе и служит ключевой мишенью адаптивного иммунитета [8]. Кроме того, существует ряд вспомогательных белков, функция некоторых из которых остается неизвестной. ORF3a может функционировать как индуктор апоптоза [3]. ORF6 и ORF8 участвуют в антагонизме к интерферону, в то время как ORF7a может участвовать в ингибировании клеточной трансляции [10]. ORF9b, вспомогательный белок, транслируемый с альтернативной открытой рамки считывания в гене. Этапы цикла репликации SARS-CoV-2 были выведены из эмпирических данных и существующих знаний о других β-коронавирусах [9]. Первым этапом инфекции SARSCoV-2 является связывание S-белка с растворимым рецептором ACE2 на поверхности клетки хозяина. Известно, что ACE2 экспрессируется на клеточной поверхности различных органов, таких как сердце, эндотелий, печень, почки, яички, кишечник, легкие и другие ткани [6]. Другими факторами, облегчающие прикрепление или проникновение вируса, являются нейропилин-1, рецептор тирозин-протеинкиназы UFO (AXL), CD147, рецептор липопротеинов высокой плотности типа B1, интегрины, рецептор ангиотензина II 1-го типа (AT1) и рецептор вазопрессина 2-го подтипа.

Протеазы, такие как поверхностная TMPRSS2 и эндосомальный катепсин L, расщепляют белок S, активируя проникновение вируса в клетку путем эндоцитоза и слияния мембран. Внутри клетки вирус теряет оболочку, и геномная РНК попадает в цитоплазму для дальнейшей репликации. Сборка вируса происходит в эндоплазматическом ретикулуме, комплексе Гольджи и промежуточном комплексе (ERGIC), где мембраны, усеянные вирусными структурными белками, взаимодействуют с N-инкапсулированной вирусной геномной РНК.

Моноциты и макрофаги также экспрессируют на своей поверхности ACE2 и, следовательно, могут быть инфицированы SARS-CoV-2, что может приводить к активации и транскрипции провоспалительных генов. Экспрессия рецептора ACE2 была обнаружена на CD68+- и CD169+-макрофагах в лимфатических узлах и в селезенке больных COVID-19, что позволяет предположить, что SARS-CoV-2 поражает ACE2-положительные миелоидные клетки по всему организму. Было показано, что в CD169+-макрофагах происходит репликация вируса, вносящая весомый вклад в уровень вирусной репликации в результате состояния, невосприимчивости к IFN-зависимой активации I типа, что может способствовать снижению иммунитета.

Для повышения активности иммунитета мною была предложена комбинация препарата G. Lucidum и Алхадая. Состав данного натурального продукта очень широк, включая супероксиддисмутазу, которая также снижает патогенетическое влияние «цитокинового шторма» не оказывая на печень побочных эффектов. 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 коронавирусной инфекции, но и в безопасном его применении, то данное исследование считается актуальной темой и требует его дальнейшего изучения

Цель исследования. Определить значение уровня интерлейкинов после влияния нового комбинированного препарата на основе G. Lucidum и Алхадая.

Материалы и методы исследования. Для осуществления поставленной цели были проанализированы результаты лечения 200 крыс с коронавирусной инфекцией, вызванной COVID-19. 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 внутрибрюшинной анестезии с использованием 2,5% раствора тиопентала натрия. Все крысы были разделены на группы: 1 группа – крысы с коронавирусной инфекцией с подтвержденным положительным ПЦР тестом, леченных ивермектином в дозировке 300 мг массы тела (n=50), 2 группа – крысы с коронавирусной инфекцией леченные байкалином в дозировке 500 мг (n=50), 3 группа – крысы с коронавирусной инфекцией, леченные молнупиравиром 25 мг/кг массы тела, 4 группа – крысы с коронавирусной инфекцией леченные новым препаратом на основе G. Lucidum и Алхадая. Количественный профиль цитокинов в сыворотке крови анализировался с использованием мультиплексной технологии Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Измерялась концентрация 27 цитокинов: IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGF basic, G-CSF, GM-CSF, IFN-g, IP-10, MCP-1(MCAF), MIP-1a, PDGF-bb, MIP-1b, RANTES, TNF-a, VEGF. Статистическую обработку проводили с помощью одностороннего дисперсионного анализа (one-way analysis of variance

ANOVA) post hoc теста Тьюки или двустороннего дисперсионного анализа (two-way analysis of variance ANOVA) использовались в работе для множественных сравнений между тестируемыми группами. Все анализы были выполнены слепым способом по отношению к экспериментальным группам. Статистически значимым считалось значение P <0,05.

Результаты исследований. Для определения уровня экспрессии цитокинов и факторов роста при коронавирусной инфекции с учетом различных периодов заболевания проводили мультиплексный иммуноанализ. Данную задачу выполняли с целью последующего определения белковых молекул, оказывающих наибольшее влияние на модуляцию фенотипа при коронавирусной инфекции. В ходе исследования были выявлены достоверные различия в содержании некоторых аналитов при коронавирусной инфекции. Уровень провоспалительного цитокина IL-1β был значительно повышен на 3 сутки во всех исследуемых группах с коронавирусной инфекции по сравнению с интактным контролем (P<0,05).

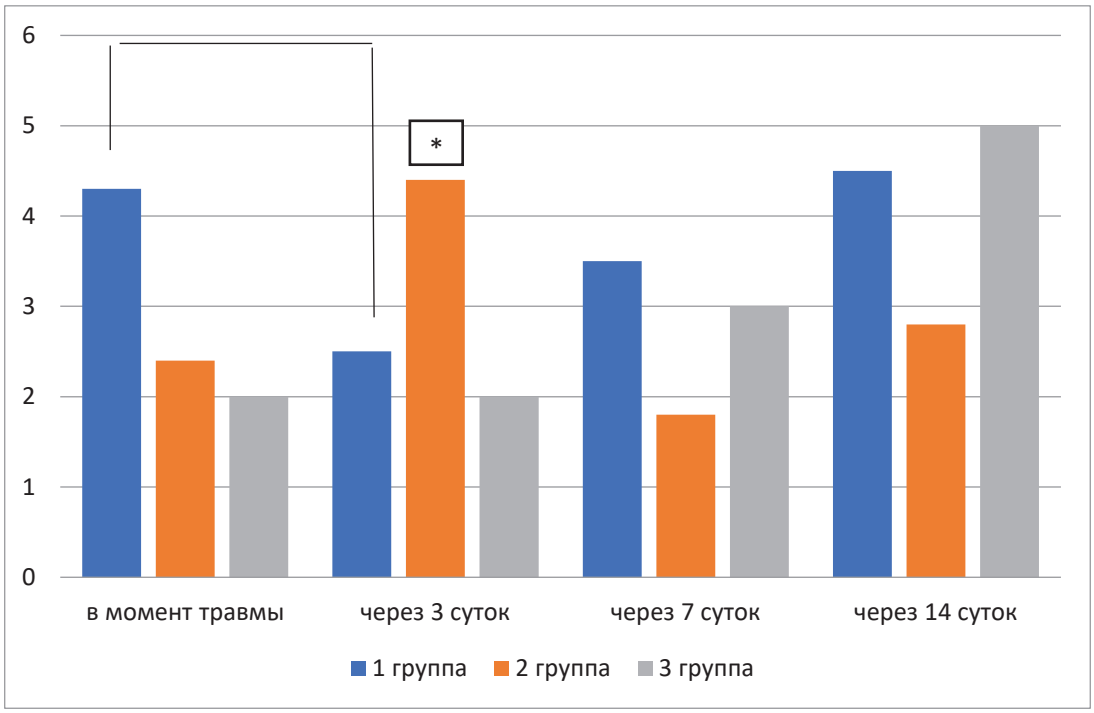

Рис. 1. **Уровень IL-1β в исследуемых группах при коронавирусной инфекции**

*-критерий Манна-Уитни

В этот же период (14 сутки) концентрация IL-4 в группе 4 также была минимальной и при сравнении с группой 3 выявлены различия. На 3 сутки после заражения максимальная экспрессия TNF-α была обнаружена в 4 группе при сравнении с группами 1 и 3. В дальнейшем в этой группе (4) наблюдалось постепенное снижение уровня TNF-α, где на 14 сутки после заражения экспрессия TNF-α была самой низкой.

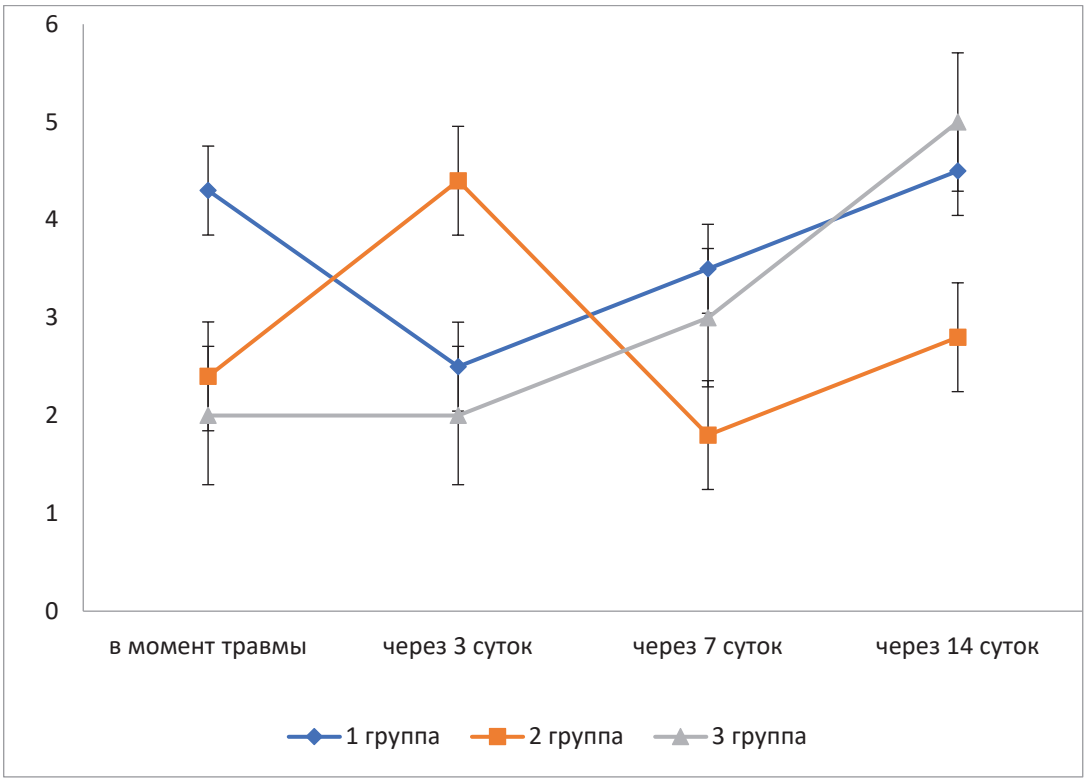

Рис. 2. **Уровень IL-4 в исследуемых группах при коронавирусной инфекции**

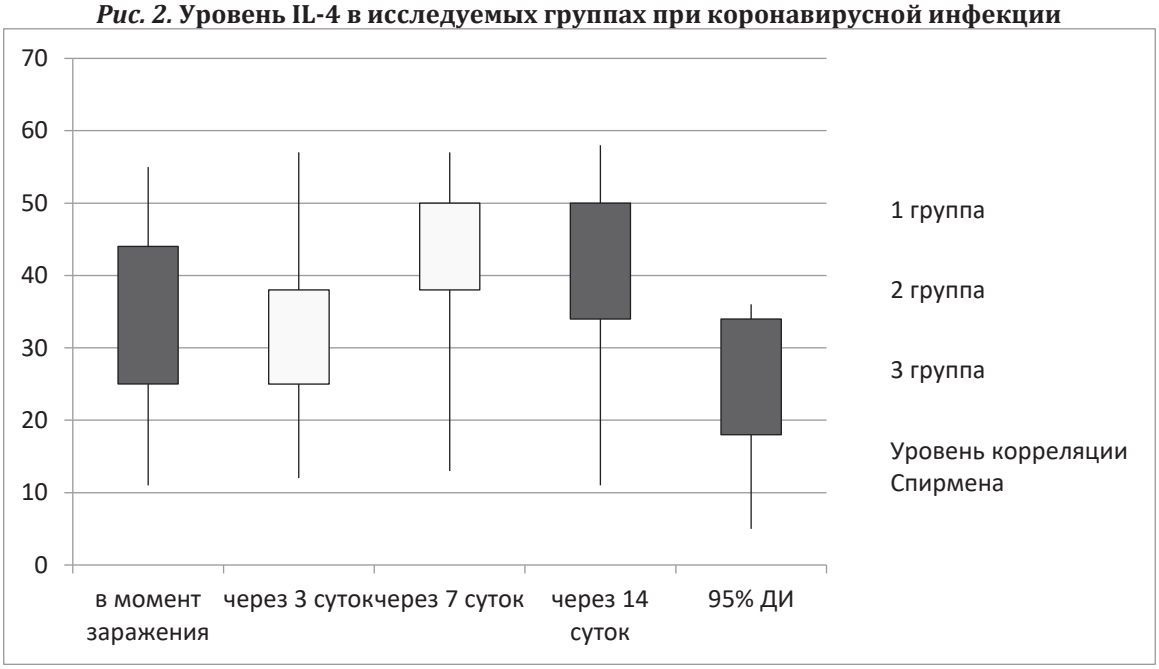

Рис. 3. **Корреляционная взаимосвязь использования про и противовоспалительных цитокинов при коронавирусной инфекции**

ДИ – доверительный интервал

Так, 95% ДИ (доверительный интервал) в III и IV 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, χ_2 (критерий Вилконсона) составляет 0,93280714, U (критерий Манна-Уини) составляет 0,94135082 при p≤0,05

Выводы. Использование цитокинов позволяет прогнозировать состояние травмы спинного мозга при его моделировании на лабораторных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahmed, Hussien et.al. A Clinical Review of COVID-19; Pathogenesis, Diagnosis, and Management Bentham Science Publishers https://doi.org/10.2174/1381612826666201222162509

2. Andri Frediansyah et at. Remdesivir and its antiviral activity against COVID-19: A systematic review https://doi.org/10.1016/j.cegh.2020.07.011

3. Clayton B.Hess et at. Immunomodulatory Low-Dose Whole-Lung Radiation for Patients with Coronavirus Disease 2019-Related Pneumonia // International Journal of Radiation Oncology*Biology* Physics Volume 109, Issue 4, 15 March 2021, Pages 867-879

4. European Centre for Disease Prevention and Control. Threat assessment brief: emergence of SARS-CoV-2 B.1.617 variants in India and situation in the EU/EEA. May 11, 2021 (https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-emergence-sars-cov-2-b1617-variants. opens in new tab).

5. Joint Committee on Vaccination and Immunisation. Priority groups for coronavirus (COVID-19) vaccination: advice from the JCVI, 30 December 2020. London: Department of Health and Social Care, January 6, 2021 (https://www.gov.uk/government/publications/priority-groups-for-coronaviruscovid-19-vaccination-advice-from-the-jcvi-30-december-2020. opens in new tab).

6. Matthias Götte et at. Remdesivir for the treatment of Covid-19: the value of biochemical studies Current Opinion in Virology Volume 49, August 2021, Pages 81-85 https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.04.014

7. Ridolo E, Pucciarini F, Barone A, et al. Dermatological manifestations during COVID-19 infection: a case series and discussion on the problem of differential diagnosis. *Acta Biomed*. 2021;92(1): e2021103. Published 2021 Feb 9. doi:10.23750/abm. v92i1.11236

8. Rubin EJ, Baden LR, Udwadia ZF, Morrissey S. India's Covid-19 crisis. N Engl J Med 2021;384(18): e84-e84.

9. Schreiber G. The Role of Type I Interferons in the Pathogenesis and Treatment of COVID-19. *Front Immunol*. 2020; 11:595739. Published 2020 Sep 30. doi:10.3389/fimmu.2020.595739

10. Zheng, J., Wong, LY.R., Li, K. *et al.* COVID-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE2 mice. *Nature* 589**,** 603–607 (2021). Https://doi.org/10.1038/s41586-020-2943-z

UDK: 616.994.41-006.6-018.1:616.19-002