

Основания для использования GcMAF в качестве терапевтического метода для лечения SARS-CoV-2

Основываясь на факте, что около 96% пациентов одолевает инфекцию, при отсутствии антивирусного лечения, направленного непосредственно на коронавирусы человека, можно предположить, что у иммунной системы человека существуют механизмы для борьбы с SARS-CoV2.

Что такое GcMAF?

GcMAF – это активирующие макрофаги лимфокины, чей эффект становится заметен начиная с дозы в 10 нг/мл. GcMAF или фактор активации макрофагов, извлечённый из Gc белка получается путём последовательного дегликозирования своего предшественника – витамин D-связывающего белка.

Что означает таргетирование GcMAF подтипов макрофагов?

В связи с различиями между GcMAF, клинический эффект зависит от патологического состояния, типа и стадии (заболевания), при условии, что его модель поведения отличается от других цитокинов активации макрофагов, таких как интерферон-гамма (IFN- γ), который нацелен исключительно на макрофаги M1. Взаимодействие с GcMAF не ограничивается каким-либо единственным фенотипом. Макрофаги являются весьма пластичными клетками, считается, что их транскрипционный анализ быстро реагирует на стимуляцию GcMAF, и всё разнообразие фенотипов, которые обычно объединяют в типы M1, M2a, M2b и M2c, может в различной степени ответить на воздействие, лучше адаптируя активировавшуюся комбинацию фенотипов под условия текущей задачи. Вполне возможно, что изначально фенотип M1 является наиболее активным и может поляризоваться с M2 вскоре после активации, когда концентрация патогенов инфекции в ткани уменьшается.

В ходе клинических наблюдений были обнаружены следующие эффекты от GcMAF. Было отмечено уменьшение клинических и биохимических маркеров воспаления у пациентов с ревматоидным артритом. Стабильное улучшение нейрокогнитивных функций, внимания и поведения у пациентов с расстройством аутистического спектра, проходящих лечение с помощью GcMAF, что скорее всего является результатом перехода к сравнительно противовоспалительному фенотипу макрофагов, ассоциирующегося с этими условиями провоспалительного состояния микроглии, поскольку макрофаги являются гибкими клетками и могут менять своё состояние. GcMAF также эффективно воздействует в предотвращении первоначальных клинических симптомов, при приёме во время продромального периода гриппа.

Относительно альвеолярных макрофагов

При тестировании на грызунах, в случае пульмональной инфекции альвеолярные макрофаги избавляются от патогенов до установленных границ без возникновения иных симптомов пневмонии, однако когда альвеолярные макрофаги не справляются с контролем субклинической инфекционной нормой воспалительных клеток, в особенности нейтрофилы становятся необходимы для контроля инфекции [Dockrell DH, 2003]. Также было отмечено, что мыши с сокращённым количеством альвеолярных макрофагов или с альвеолярными макрофагами с сниженными бактерицидными свойствами, сильнее подвержены пневмонии и пороговый инокулум, необходимый для её возникновения заметно снижен [Dockrell DH, 2003].

Однако, альвеолярные макрофаги крайне жизнеспособные клетки, которые способны существовать продолжительные промежутки времени пребывая в статичном состоянии [Murphy J, 2008]. GcMAF может стать профилактическим/превентивным средством для предварительной активации макрофагов, переводя их из статичного в активно функционирующее состояние, когда есть риск заражения COVID-19

Альвеолярные макрофаги могут одновременно проявлять свойства характерные для M1 и M2 в случае острого воспаления лёгких. Их способность противодействовать воспалению строго регулируется, дабы обеспечить контроль над повреждением лёгких. Альвеолярные макрофаги типа M2 отвечают за ремодулирование и восстановление тканей, их характеризует высокий уровень Интерлейкина 10, а также проявляют очищающие рецепторы и осуществляют регуляцию противовоспалительных процессов. Как уже упоминалось выше, фенотип M1 чаще реагирует на стимулирование GcMAF, что подтверждается данными *in vitro* об усиленном фагоцитозе. Фенотип M1 может поляризовать с M2 вскоре после активации, когда концентрация патогенов инфекции в ткани уменьшается. Субъективные доказательства усиления функционирования фенотипа макрофагов M2 основаны на наших исследованиях животных и показывают уменьшение количества противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови через 8 дней лечения GcMAF. Ремиссия хронической обструктивной болезни лёгких, наблюдаемая при приёме GcMAF подтверждает утверждение о усилении функционирования фенотипа M2. Есть также иные данные, согласно которым было зарегистрировано, что GcMAF нормализует дисрегуляцию проявления генов в эндоканнабиноидной системе при аутизме и подавляет чрезмерную активацию макрофагов костно-мозгового происхождения у детей, страдающих аутизмом [6]. GcMAF влияет на реконструкцию соединительной ткани [4] и поддерживает её противовоспалительные функции.

Оба фенотипа являются важными целями для GcMAF для обеспечения контроля над системными и лёгочными заболеваниями, а также предотвращения синдрома острой дыхательной недостаточности при пневмонии COVID-19.

Восстановление пробелов во врождённом иммунном ответе при SARS-CoV-2

Согласно последним исследованиям, была отмечена быстрая фагоцитарная активация в ходе лечения сывороткой GcMAF от Saisei Mirai. Оно также показало трёхкратное увеличение интернализации антигена по сравнению с ЛПС+IFN- γ на макрофаговой линии клетки. Ниже приведена ссылка на короткое видео, которое показывает реконструкцию мембраны макрофага вызванную сывороткой GcMAF, происходящую уже спустя 5 минут с начала лечения, отображённый фагоцитоз в сравнении с контролем выглядит выше:

На видео и схемах 1, 2, 3, 4 представлены данные из следующих публикаций:

1. Кавакацу К., Нисиката Т. и др. Характерные морфологические изменения и стремительное накопление актина в макрофагах, находящихся под воздействием сыворотки MAF. *Anticancer Res.* 2019.
2. Мама Исикава и др. Высокопроизводительная количественная система анализа фагоцитарной деятельности макрофагов. *Macrophage.* 2018.

Схема 1

Морфологические изменения в макрофагах, выведенных из THP-1 в последствии лечения MAF. После процедур 4-h с введением 8,75 $\mu\text{g/ml}$ MAF(B, E), с введением 100 pg/ml ЛПС + 20 ng/ml IFN- γ (C, F) и контрольная группа(A, D); были добавлены и закреплены шарики для РЭМ наблюдения. На низкой кратности увеличения показан вид клетки целиком (A-C) и приближенно рассматриваемая область (выделено белым пунктиром, D-F). Масштаб: 10 μm на изображениях A-C, 1 μm на изображениях D-F.

Схема 2

Разница в накоплении актина на границах клеток. Показаны софокусные изображения макрофагов в которые был введён Lifestact-THP-1 $\mu\text{g/ml}$, обработанные 8.17 ng/ml MAF(B), 100 $\mu\text{g/ml}$ ЛПС + 20 ng/ml IFN- γ (C) или без введения MAF (A). Белые стрелки указывают на накопление актина в оконечностях ламеллиподии. Анализ макрофагов, активированных сывороткой MAF (D) в трёх-пространственном формате показывает сложные активные перемещения в мембране клетки на фоне накопления актина. Масштаб: 10 μm . Используя эти изображения, был проведён количественный анализ накопления актина (E).

Схема 3

- Формирование ламеллиподии • Активные перемещения в мембране клетки (воротообразные)
- Накопления актина

Длина границ клетки с накоплением F-актина(μm)

Контрольная группа

Сыворотка MAF

Время с момента введения сыворотки MAF (мин)

На графике показаны покадровые изображения макрофагов, полученных из Lifestact-THP-1, после начала лечения сывороткой MAF, сопоставленные с контрольной группой. Был проведён количественный анализ накоплений актина.

Схема 4. Сравнение фагоцитарной активности макрофагов, активированных MAF [Мами Исикава и др. 2018]

Цикл размножения вируса SARS-CoV завершается примерно за 6 часов [Ин и др., 2003], по всей видимости, вирус просто достигает высокого титра задолго до введения интерферона типа I. По результатам микроматричного анализа экспрессии генов макрофагов клетки человека, которая была заражена SARS-CoV, SARS-CoV не вызвал заметной IFN- α/β экспрессии генов [Чун Ч.У. и др., 2005]. SARS-CoV выработал механизмы для инициации замедленной реакции врождённой иммунной системы одновременно и в 293 фибробластах, и в дендритных клетках, что позволяет вирусной инфекции развиваться в обоих типах клеток. [Шпегель М и др. 2006].

Классическая активация макрофагов типа M1 нуждается в комбинации IFN- γ и сигнализирующего TLR4 и характеризуется увеличением экспрессии провоспалительных медиаторов и эффекторов, усиливающих фагоцитоз, устраняя патогены. Однако, GcMAF сам по себе показывает способность к вызыванию стабильной активации макрофагов полученных из Lifestact-THP-1, которую можно наблюдать уже через 5 минут после начала лечения (схема 3). Столь скорая активация макрофагов, за которой следует быстрое фагоцитозное перестроение структуры мембраны (схема 1, 2) и более чем трёх-кратная интернализация антигена зарегистрирована впервые в сравнении со всеми наиболее эффективными известными комбинациями ЛПС+IFN- γ (схема 4) активации макрофагов.

Ожидается, что управление GcMAF в организме человека на самых ранних стадиях инфекции SARS-CoV вызовет аналогичную наблюдениям *in vitro* пре-активацию альвеолярных макрофагов слизистой оболочки, что в последствии должно быть завершено с регуляцией синтеза интерферона типа I. Это может стать способом для преодоления механизма размножения SARS-CoV через подавление ответа IFN- α/β в собственных макрофагах клетки с задержкой реакции врождённой иммунной системы.

Инфекция SARS-CoV в макрофагах ведёт к вирусной транскрипции гена и синтезу белков, но инфекционный вирус выработан не был, таким образом инфицирование макрофагов человека SARS-CoV можно считать обратимой [Чжун У. Чун и др., 2005]. В связи с этим, есть шанс, что способность GcMAF существенно усилить фагоцитоз вирусных частиц SARS-CoV макрофагами на фоне скорого ответа IFN- α/β может увеличить вероятность остановление хода инфекции SARS-CoV. Даже ограничение размножения вируса крайне важно, поскольку будучи неподконтрольным врождённой иммунной системе, оно ведёт к увеличению концентрации вируса в организме, что в свою очередь побуждает систематичную гиперактивную провоспалительную реакцию – драматичную сторону болезни SARS-CoV, являющуюся основной причиной клинической тяжести и смертности от заболевания.

Выработка антигенов

Разнообразные исследования in vitro показали, что GcMAF вызывает фагоцитоз, завершаемый выработкой антигенов. Разрушающая вирусная деятельность, о чём можно судить по снижению pH и переход к фаголизосомам или лизосомам, а также выделение молекул реактивного кислорода и реактивного азота, была заметно усилена GcMAF [12-14]. Это может привести к передаче антигенов в лимфоциты на ранних стадиях инфекции SARS-CoV, когда функционирование и количество этих клеток ещё не подверглось влиянию болезни COVID, и усилению вовлечения адаптивного иммунитета и процесса формирования антител.

Если рассматривать возможные перспективы, помимо антивирусного воздействия, GcMAF также представляется идеальным вспомогательным средством для вакцины от SARS-CoV-2.

Синтез ослабленного GcMAF

Активация макрофагов GcMAF частично нуждается в мембранных гликозидазах воспалительно стимулированных лимфоцитов, которые активно перерабатывают Gc протеин сыворотки в действенный фактор активации макрофагов. Воспалительно стимулированный процесс активации макрофагов представляется главным каскадом активации макрофагов. Дефект в индуцибельной β -галактозидазе В лимфоцитов в каскаде активации макрофагов приводит к возникновению не функционирующих макрофагов (Энциклопедия Иммунологии, 1998).

Было отмечено, что SARS-CoV может не только заражать лимфоциты, но и размножаться в них. Лимфопения была обнаружена у 63% пациентов, госпитализированных с пневмонией. Также сообщается о повышенном уровне истощения и сокращение функционального разнообразия Т-клеток в периферической крови [Чжэн Х. и др. 2020]. Всё вышеперечисленное влияет на преобразование Gc протеина в GcMAF из-за недостатка мембранных гликозидаз, вырабатываемых Т и В лимфоцитами.

Экзогенная GcMAF терапия может обойти дефекты функционирования лимфоцитов и воздействовать непосредственно на фагоциты и, что более важно, позволяет инициативе, подконтрольной адаптивным иммунитетом активации макрофагов GcMAF открыть возможность для того, чтобы прошла естественная активация необходимых лимфоцитов на несколько дней раньше в ходе течения болезни.

Заключение

Активация макрофагов в респираторных путях при помощи GcMAF может стать ключём к более скорой и действенной реакции врождённого иммунитета по отношению к COVID-19, что крайне важно в условиях того, что у населения нет врожденного иммунитета к нему. Полная безопасность и нацеленность на критические точки инфекции COVID-19, такие как контроль над репродукцией вируса и предотвращение патологического гипериммунного ответа, делают GcMAF убедительным кандидатом на скорое введение в клинические испытания.