

Анти-SARS-CoV-2 и иммуномодулирующая активность полисахаридов морских бактерий

Т. П. СМОЛИНА¹, Н. В. КРЫЛОВА¹, *Т. А. КУЗНЕЦОВА¹, Л. А. ИВАНУШКО¹,
А. К. ГАЖА¹, Е. В. ПЕРСИЯНОВА¹, О. С. МАЙСТРОВСКАЯ¹, А. В. ГАПЕКА¹,
Ю. А. БЕЛОВ¹, М. С. КОКОУЛИН², М. Ю. ЩЕЛКАНОВ^{1,3}

¹ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия

² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

³ Дальневосточный федеральный университет, Школа медицины и наук о жизни, Владивосток, Россия

Резюме

Введение. В настоящее время проводятся интенсивные исследования по поиску новых препаратов для лечения COVID-19, включая изыскание альтернативных противовирусных методов лечения. Полисахариды морских бактерий (ПС) представляют собой безопасные, биоразлагаемые и биосовместимые полимеры с широким спектром биологической активности, в числе которой способность оказывать противовирусные и иммуномодулирующие эффекты. В связи с этим ПС привлекают пристальное внимание учёных как перспективный источник противовирусных лекарственных субстанций. **Цель** — оценка влияния ПС из 3 разных видов морских бактерий на экспрессию поверхностных маркеров активации клеток врождённого иммунитета и изучение противовирусной активности этих ПС в отношении вируса SARS-CoV-2. **Материал и методы.** Влияние ПС на экспрессию поверхностных маркеров активации клеток врождённого иммунитета исследовали методом проточной цитофлуориметрии. Изучение анти-SARS-CoV-2 активности ПС в отношении ранней стадии жизненного цикла вируса изучали методом ингибирования цитопатогенного действия вируса (в МТТ-тесте) и методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ). **Результаты.** Установлено, что исследуемые ПС из морских бактерий, различающиеся по химической структуре, в условиях *in vitro* активируют клетки врождённого иммунитета (моноциты, нейтрофилы, НК-клетки). Результаты, полученные как в тесте ингибирования цитопатогенного действия вируса, так и по снижению уровня РНК вируса SARS-CoV-2 продемонстрировали анти-SARS-CoV-2 активность исследуемых ПС. Наибольшую активность проявил ПС1, эффективно ингибируя ранние стадии взаимодействия SARS-CoV-2 с клеткой. **Заключение.** Исследуемые ПС можно считать перспективным источником противовирусных лекарственных субстанций.

Ключевые слова: полисахариды морских бактерий; иммуномодуляторы; клетки врождённого иммунитета; нейтрофилы; моноциты; НК-клетки; анти-SARS-CoV-2 активность

Для цитирования: Смолина Т. П., Крылова Н. В., Кузнецова Т. А., Иванушко Л. А., Гажа А. К., Персиянова Е. В., Майстровская О. С., Гапека А. В., Белов Ю. А., Кокоулин М. С., Щелканов М. Ю. Анти-SARS-CoV-2 и иммуномодулирующая активность полисахаридов морских бактерий. *Антибиотики и химиотерапия*. 2024; 69 (11–12): 5–15. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-5-15>. EDN: TXWPUH.

Anti-SARS-CoV-2 and Immunomodulatory Activity of Marine Bacteria Polysaccharides

TATYANA P. SMOLINA¹, NATALIA V. KRYLOVA¹, *TATYANA A. KUZNETSOVA¹,
LUDMILA A. IVANUSHKO¹, ANNA K. GAZHA¹, ELENA V. PERSIYANOVA¹,
OLGA S. MAISTROVSKAYA¹, ALENA V. GAPEKA¹, IURII A. BELOV¹,
MAKSIM S. KOKOULIN², MIKHAIL YU. SHCHELKANOV^{1,3}

¹ G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia

² G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch, Russian Academy of Science, Vladivostok, Russia

³ Far Eastern Federal University, School of Medicine and Life Sciences, Vladivostok, Russia

Abstract

Background. Intensive research is currently underway to find new drugs to treat COVID-19, including the search for alternative antiviral treatments. Marine bacteria polysaccharides (PSs) are safe, biodegradable, and biocompatible polymers with a wide range of biological activity, including the ability to exert antiviral and immunomodulatory effects. In this regard,

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: takuznets@mail.ru



*Correspondence to:
E-mail: takuznets@mail.ru

EDN: TXWPUH



PSs attract the close attention of scientists as a promising source of antiviral medicinal substances. *The aim of the work* is to evaluate the effect of PSs from 3 different species of marine bacteria on the expression of surface activation markers of innate immunity cells and to study their antiviral activity against the SARS-CoV-2 virus. *Methods.* The effect of PSs on the expression of surface activation markers of innate immunity cells was studied by flow cytometry. The study of the anti-SARS-CoV-2 activity of the PSs at the early stages of the virus life cycle was evaluated by inhibiting the cytopathogenic effect of the virus (in the MTT assay) and by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR-RV). *Results.* It was found that the studied PSs, differing in chemical structure, induced activation of innate immunity cells (monocytes, neutrophils, NK cells) *in vitro*. The results obtained both in the test of inhibition of the cytopathogenic effect of the virus and in reducing the level of RNA of the SARS-CoV-2 virus demonstrated the anti-SARS-CoV-2 activity of the PSs. PS1 showed the greatest activity, effectively inhibiting the early stages of SARS-CoV-2 interaction with the cell. *Conclusion.* The studied PSs can be considered a promising source of antiviral medicinal substances.

Keywords: polysaccharides of marine bacteria, immunomodulators, innate immune cells, neutrophils, monocytes, NK cells, anti-SARS-CoV-2 activity

For citation: Smolina T. P., Krylova N. V., Kuznetsova T. A., Ivanushko L. A., Gazha A. K., Persiyanova E. V., Maistrovskaya O. S., Gapeka A. V., Belov Iu. A., Kokoulin M. S., Shchelkanov M. Yu. Anti-SARS-CoV-2 and immunomodulatory activity of marine bacteria polysaccharides. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (11–12): 5–15. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-5-15>. EDN: TXWPUH. (in Russian)

Введение

Коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома 2-го типа (SARS-CoV-2 - severe acute respiratory coronavirus 2) (Nidovirales: *Coronaviridae*, *Betacoronavirus*) является этиологическим агентом смертельно опасного для человека коронавирусного заболевания (COVID-19 — coronavirus disease 2019) [1, 2]. Долгое время коронавирусы рассматривались как ветеринарная проблема [3]; лишь в начале XXI века стал очевиден значительный эпидемический потенциал этих вирусов [4–7]; а разразившаяся в 2020–2023 гг. пандемия COVID-19 [7–10] подтвердила предположения отечественных специалистов о существовании у коронавирусов пандемического потенциала [3, 10].

В настоящее время проводятся интенсивные исследования по поиску новых препаратов для лечения COVID-19, в т. ч. изыскание альтернативных противовирусных методов лечения [1, 11–14]. Перспективными источниками анти-SARS-CoV-2 являются морские организмы, продуцирующие уникальные химические соединения, включая полисахариды, аминокислоты, гликозиды, полифенолы, алкалоиды, терпеноиды, пептиды, стероиды и др., проявляющие антивирусную активность [15–21] (что вполне закономерно, учитывая колоссальное количество и многообразие вирусов Океана [22]). Морские микроорганизмы выгодно отличаются от других морских источников, поскольку имеют высокие темпы роста и продуктивности биомассы [20]. Полисахариды морских бактерий (ПС) — это углеводородные биополимеры, секретируемые одноклеточными микроорганизмами, представителями морской флоры и фауны, которые могут находиться на внешней поверхности клеточных стенок, в слизистой капсуле или в окружающей среде [15, 21]. Микробные ПС могут существовать в виде гомо- или гетерополисахаридов с различными свойствами, такими как состав моносахаридов, структурная конформация, молекулярная масса и функциональные группы. Благодаря полимерной повторяющейся структуре

эти ПС способны к поливалентным взаимодействиям, которыми не обладают мономерные полисахариды. В этой связи ПС могут быть модифицированы путём присоединения лигандов, определяющих множественное связывание с рецепторами на поверхности клеток-мишеней [23] или вирусов [24].

ПС из морских микроорганизмов представляют собой безопасные, биоразлагаемые и биосовместимые полимеры и проявляют широкий спектр биологической активности, в числе которой способность оказывать иммуномодулирующие и противовирусные эффекты, в связи с чем привлекают пристальное внимание учёных как перспективный источник противовирусных лекарственных субстанций [15, 20, 21, 23–25].

Цель работы — оценка влияния ПС из 3-х разных видов морских бактерий на экспрессию поверхностных маркеров активации клеток врождённого иммунитета и изучение противовирусной активности этих ПС в отношении вируса SARS-CoV-2.

Материал и методы

Полисахариды из морских микроорганизмов были получены в лаборатории морской гликобиологии Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН:

- ПС1 выделен из *Pseudoalteromonas nigrificiens* KMM 156 и состоит из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, содержащих два остатка L-Rha, один остаток 2-ацетиамидо-2-дезокси-D-глюкозы (D-GlcpNAc) и один остаток 3-O-[(R)-1-карбокситил]-D-глюкозы [α -D-Glc p3(R-Lac), глюколактиловой кислоты [26] (рис. 1).
- ПС2 выделен из *Cobetia litoralis* KMM 3890T и представляет O-специфический полисахарид, состоящий из раз-

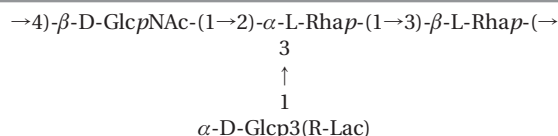


Рис. 1. Структура ПС1.
Fig. 1. Structure of PS1.

ветвлённых трисахаридных повторяющихся звеньев, состоящих из D-глюкозы (D-Glcp), D-маннозы (D-Manp) и сульфатированной по положению О-5 3-дезоксид-Д-манноокт-2-улозоновой кислоты (Kdop5S) [27] (рис. 2).

• ПС3 выделен из *Idiomarina abyssalis* KMM 227Т и также представляет О-специфический полисахарид, состоит из сульфатированных пентасахаридных повторяющихся звеньев и содержит два остатка 2-ацетида-2-дезоксид-Д-глюкуроновой кислоты (D-GlcpNAcA), L-рамнозы (L-Rhap), 2,4-диацетида-2,4,6-тридезоксид-Д-глюкозы (D-QuipNAc4NAc), а также сульфатированный по положению О-2 остаток 3,6-дидезокси-3-(4-гидроксибутирамидо)-Д-глюкозы [D-Quip2S3N(4Hb)] [28] (рис. 3).

Цитометрические методы осуществлялись с использованием периферической крови с гепарином (25 ЕД/мл), полученной от здоровых доноров ($n=6$), не страдавших инфекционными заболеваниями и не предъявлявших на момент обследования жалоб соматического характера. Все доноры дали письменное информированное согласие на участие в исследовании, и протокол исследования был одобрен Комитетом по этике «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора (протокол № 2 от 16.11.2021). Исследуемые ПС вносили в кровь в конечной концентрации 100 мкг/мл (оптимальную дозу определили в предварительных экспериментах). В контрольные пробы вносили физиологический раствор. Уровень экспрессии молекул оценивали через 24 ч методом цитометрического анализа в программе «Cell Quest» на проточном цитометре BD FACSCalibur («Becton Dickinson», США) с использованием моноклональных антител к молекулам CD56-FITC, CD56-PE, CD3-APC, TLR2-PE, TLR4-PE, HLA-DR-PE, CD69-PE, CD62L-FITC, CD62L-PE, CD11b-PE, CD54-PE, CD14-FITC, CD16-PE («Beckman Coulter») и соответствующих изотипических контролей. Гейтирование субпопуляций гранулоцитов, основную часть которых составляют нейтрофилы, осуществляли по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию. Моноциты дифференцировали от других клеток по параметрам FSC и SSC, а также по экспрессии клетками молекул CD14. NK-клетки идентифицировали как CD3-CD56+ клетки. В каждой пробе анализировали не менее 10^4 клеток.

Вирусный штамм SARS-CoV-2/Vladivostok/5130/2020 (Ухань-подобный генотип B.1.1.397) был получен из коллекции ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора (ID в VGARus prim000098, GISAID EPI_ISL_16756941, GenBank OQ363272) [9]. Штамм был выделен из назофарингеального смыва пациента с клинически и лабораторно подтверждённым диагнозом COVID-19 путём последовательного пассирования на модели культуры клеток почки африканской зелёной маргаритки (Vero E6), полученной из Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии (БЕКТОР, Новосибирск, Россия). Штамм накапливали в Vero E6 с использованием среды DMEM (Биолот, Санкт-Петербург, Россия), в которую добавляли 10% эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) (Биолот, Санкт-Петербург, Россия) и 100 ЕД/мл гентамицина (Дальхимфарм, Хабаровск, Россия) при 37°C, 5% CO₂. В поддерживающей среде концентрация ЭТС была снижена до 1%. Концентрация клеток во всех опытах составляла 10^4 клеток/мл. Инфекционный титр SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero E6 после 5-го пассажа составил 5,8 lg(TCID₅₀/мл) (50% tissue cytopathic infectious dose per 1 ml — 50% тканевых цитопатических инфекционных доз в 1 мл). Все эксперименты с инфекционным вирусом проводились в помещении с уров-

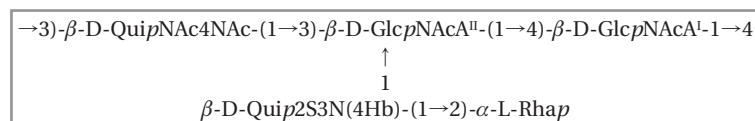


Рис. 3. Структура ПС3.
Fig. 3. Structure of PS3.

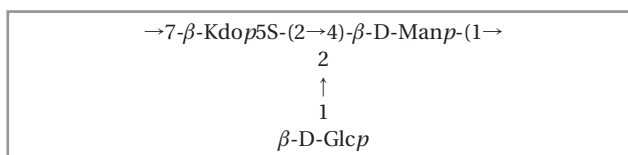


Рис. 2. Структура ПС2.
Fig. 2. Structure of PS2.

нем биологической безопасности 3 ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-ПВ) проводилась с помощью набора реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР-ПВ (Синтол, Россия) на анализаторе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Цитотоксическая активность соединений оценивалась с учётом жизнеспособности клеток в МТТ-тесте [29–31]. На 24-часовой монослой клеток, выращенных в 96-луночных планшетах наносили тестируемые вещества в различных концентрациях (5–2000 мкг/мл) и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 5 сут. После инкубации добавляли 5 мг/мл МТТ (бромид метилтиазаолитетразолия) (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали 2 ч при 37°C. Клетки с внутриклеточными кристаллами формазана растворяли изопропанолом. Оптическую плотность измеряли при $\lambda=540$ нм на планшетном ридере (LabSystems). Индекс цитотоксичности (CI(C) — cytotoxicity index) при данной концентрации (C) тестируемого препарата — полисахаридов (ПС) и Рибавирина® (референсный препарат) — рассчитывали по формуле:

$$CI(C) = (1 - D_s/D_0) \times 100\% (1)$$

где D_s — оптическая плотность в МТТ-тесте клеток, обработанных тестируемыми соединениями; D_0 — оптическая плотность в МТТ-тесте контрольных (не обработанных тестируемыми соединениями) клеток. Значение 50% цитотоксической дозы (CD_{50} — 50% the cytotoxicity dose), вдвое снижающей жизнеспособность клеток по сравнению с контролем, рассчитывали с помощью линейно-логарифмической интерполяции как корень уравнения

$$CI(CD_{50}) = 50\% (2)$$

Максимально нецитотоксичной дозой (MNCD — maximum non-cytotoxic dose) тестируемых соединений считалась концентрация, удовлетворяющая уравнению:

$$CI(MNCD) = 10\% (3)$$

Изучение анти-SARS-CoV-2 активности исследуемых соединений на ранние стадии жизненного цикла SARS-CoV-2 изучали с помощью оценивания уровня подавления цитопатогенного действия (ЦПД) вируса (с помощью МТТ-теста) и репликации вируса (с помощью ОТ-ПЦР-ПВ). Монослой клеток Vero E6, выращенный в 96-луночных планшетах, инфицировали штаммом SARS-CoV-2/Vladivostok/5130/2020 в дозах 1,0 lg(TCID₅₀/мл) и 2,0 lg(TCID₅₀/мл); ПС и Рибавирин добавляли в концентрациях от 5 мкг/мл до 500 мкг/мл и при MNCD (см. далее) (ОТ-ПЦР-ПВ) по нескольким схемам, согласно [17, 18]: клетки обрабатывали ПС или Рибавирином за 1 ч до инфицирования (профилактическое действие); в другом варианте клетки обрабатывали вирусом и ПС или Рибавирином одновременно (одновременное действие). Обработанные клетки инкубировали в течение 5 сут при 37°C, 5% CO₂.

• МТТ-тест для оценки анти-SARS-CoV-2-активности исследуемых соединений в конкретной концентрации оценивали на основе индекса протекции (PI(C) — protection index):

$$PI(C) = (D_{st} - D_1)/(D_0 - D_1) \times 100\% (4)$$

где D_0 — оптическая плотность в МТТ-тесте контрольных (не обработанных тестируемыми соединениями) клеток; D_1 — оптическая плотность в МТТ-тесте инфицированных клеток без препарата;

D_{si} — оптическая плотность в МТТ-тесте инфицированных клеток в присутствии препарата.

Значение 50% эффективной дозы (ED_{50} — 50% effective dose) рассчитывали с помощью линейно-логарифмической интерполяции как корень уравнения

$$PI(ED_{50}) = 50\% \quad (5)$$

Итоговая противовирусная активность соединения оценивалась с использованием индекса селективности (SI — selectivity index):

$$SI = CD_{50}/ED_{50} \quad (6)$$

• ОТ-ПЦР-РВ для оценки анти-SARS-CoV-2-активности исследуемых соединений проводили, как описано выше, на основе порогового цикла амплификации (C_t — threshold amplification cycle). Значение $C_t \geq 36$ принималось за отсутствие в образцах РНК SARS-CoV-2.

Индекс протекции по результатам ОТ-ПЦР-РВ ($PCRPI(C)$ — PCR-based protection index) для исследуемых соединений в конкретной концентрации оценивали по формуле:

$$PCRPI(C) = \frac{C_{tsi} - C_{ti}}{(2^0 - C_{ti})} \times 100\% \quad (7)$$

где C_{to} — значение C_t в ОТ-ПЦР-РВ для контрольных (не обработанных тестируемыми соединениями) клеток; C_{ti} — значение C_t в ОТ-ПЦР-РВ для инфицированных клеток без препарата; C_{tsi} — значение C_t в ОТ-ПЦР-РВ для инфицированных клеток в присутствии препарата. Все отрицательные значения $C_t \geq 36$ округлялись до 36 (в частности, заведомо $C_{to} = 36$). Легко видеть, что $PCRPI(C)$, если тестируемый препарат абсолютно не обладает никакой способностью снижать репродукцию вируса (т. е. $C_{tsi} = C_{ti}$), и $PCRPI(C) = 100\%$, если тестируемый препарат полностью подавляет вирусную репродукцию (т. е. $C_{tsi} = C_{to}$).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью Statistica ver. 10.0 (StatSoft, Польша) и макросов собственных разработок в MS Excel ver. 2010 (Microsoft, США).

Таблица 1. Уровень экспрессии молекул на поверхности клеток врождённого иммунитета после инкубации с полисахаридами (ПС) (100 мкг/мл)

Table 1. The level of molecules expression on the surface of innate immune cells after incubation with polysaccharides (100 µg/ml)

№ образца	Антигены (маркеры) клеточной мембраны нейтрофилов						
	CD69	CD62L	CD11b	TLR2	TLR4	CD14	CD16
	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI
Контроль	20,5±1,4	106,0±4,3	303,0±10,8	39,8±0,6	14,3±1,5	17,7±1,4	1326,2±25,1
ПС1	109,0±5,4*	14,4±1,5*	2191,0±52,1*	36,6±1,1	17,7±1,8*	21,8±4,3	782,0±29,0*
ПС2	30,6±1,3*	17,2±1,6*	1630,0±36,7*	44,8±1,02*	10,0±1,04	172,0±9,4*	2040,1±81,8*
ПС3	46,3±4,1*	13,2±1,4*	1789,0±38,9*	45,2±1,97*	13,1±1,2	114,0±5,5*	1096,0±3,1*
№ образца	Антигены (маркеры) клеточной мембраны моноцитов						
	CD62L	CD11b	TLR2	TLR4	CD14	CD16	
	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	
Контроль	34,1±0,6	733±38,1	117±18,7	15,4±0,5	1461±20,5	24,8±1,5	
ПС1	29,0±0,8*	1816±111,9*	103±6,9	30±1,8*	1102±28,6*	65,4±2,9*	
ПС2	30,1±0,4*	1221±63,4*	226±11,1*	13,0±0,4	1742±33,5*	40,2±2,9*	
ПС3	30,6±0,6*	1040±47,2*	132±7,6	19,9±0,6*	1614±21,9*	56,8±3,02*	
№ образца	Антигены (маркеры) клеточной мембраны NK-клеток						
	CD62L	CD11b	CD56bright	CD16	HLA-DR	CD54	
	MFI	MFI	%	MFI	%	%	
Контроль	45,5±0,8	131±16,9	10,4±1,3	398±40,4	4,3±0,3	15,0±1,2	
ПС1	39,9±0,7*	608±10,2*	26,1±1,3*	262±14,5*	13,9±0,6*	69,8±3,9*	
ПС2	45,5±0,8	193±14,9*	14,0±2,0	314±45,8	4,9±0,4	33,5±3,4*	
ПС3	46,6±0,9	186±15,7*	12,2±1,3	274±10,9*	9,9±0,5*	63,2±2,2*	

Примечание. Показатели $M \pm m$, $n=6$; * — различия значимы по отношению к контролю уровень достоверности $p < 0,05$ MFI (mean fluorescence intensity) — средняя интенсивность флуоресценции — отражает количество молекул, экспрессированных на клеточной мембране; % — процент клеток, экспрессирующих соответствующие маркеры.

Note. The results were shown as $M \pm m$, $N=6$; * — marks confidence level $P < 0,05$ — the differences are significant in relation to the control; MFI (mean fluorescence intensity) — reflects the number of molecules expressed on the cell membrane; % — average percentage of cells expressing corresponding markers.

Выборочные данные характеризовали с помощью среднего значения (M) и стандартного отклонения выборочного среднего (m) в форме $M \pm m$. Оценку различий для групп экспериментальных значений проводили с использованием критерия Манна-Уитни-Вилкоксона с пороговым уровнем значимости.

Результаты

Как известно, движение к очагу воспаления нейтрофилов, являющихся одними из главных эффекторных клеток врождённого иммунитета, начинается с серии адгезионных событий, каждое из которых связано с изменением экспрессии ряда поверхностных молекул, в частности селективных и интегринов.

При изучении уровня экспрессии молекул адгезии нейтрофилами под влиянием исследуемых ПС установлено, что значительно по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$) уменьшалась экспрессия L-селективных (CD62L), но увеличивалась экспрессия интегринов (CD11b) на мембранах клеток, что свидетельствует о мобилизации и активации эффекторных клеток, готовности их к миграции. Наибольший эффект по интенсивности экспрессии CD11b на нейтрофилах оказывал ПС1, увеличивая этот показатель до $2191 \pm 52,1$ при контрольных значениях $303 \pm 10,8$ ($p < 0,05$) (табл. 1).

Также наблюдалось увеличение плотности экспрессии молекул активации CD69 и сигнальных молекул CD14 на нейтрофилах (см. табл. 1).

Молекулы CD69 относятся к самым ранним индуцибельным поверхностным маркерам, которые не экспрессируются на интактных клетках, а появляются после активации клеток различными стимулами.

Под влиянием PC1 увеличивалась экспрессия мембранных молекул TLR4, а под влиянием PC2 и PC3 — TLR2 на нейтрофилах. Для TLR характерна низкая плотность экспрессии по отношению к другим мембраносвязанным белкам. Маркер TLR4, экспрессируется на всех нейтрофильных гранулоцитах, его основной функцией является распознавание липополисахаридов грамотрицательных бактерий [32], а интенсивность его экспрессии быстро увеличивается в ответ на воздействие PAMP (pathogen-associated molecular patterns) инфекционных агентов и уменьшается при отсутствии взаимодействия с лигандами [33].

Однако одним из функциональных ограничений данного маркера является тот факт, что его распознавание возможно только при условии экспрессии на клеточной мембране вспомогательной корецепторной молекулы CD14. Последующий запуск каскада процессов активации нейтрофилов после взаимодействия комплекса TLR4–CD14 с лигандом регулируется со стороны иммунной системы большим количеством цитокинов и других регуляторных молекул [34]. Под влиянием PC2 и PC3 наблюдалось увеличение экспрессии сигнальной молекулы CD14 на нейтрофилах в 6–10 раз по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Кроме того, PC1 и PC3 снижали уровень экспрессии низкоаффинного рецептора для Fc-фрагмента иммуноглобулинов CD16, а PC2 увеличивал этот показатель (см. табл. 1). CD16 экспрессируется на поверхности нейтрофилов, моноцитов, макрофагов, NK-клеток и играет важную роль в стимуляции мобилизации Ca^{2+} и дегрануляции нейтрофилов, а также способен активировать дегрануляцию, фагоцитоз и окислительный взрыв, которые обеспечивают удаление опсонизированных патогенов нейтрофилами [35].

Влияние исследуемых ПС на экспрессию молекул адгезии моноцитами было аналогично с их действием на нейтрофилы: снижение уровня экспрессии CD62L и возрастание CD11b, причём наибольший эффект на экспрессию CD11b оказывал PC1. Все ПС индуцировали значимые изменения уровня рецепторов TLR на мембранах моноцитов: PC1 и PC3 увеличивали уровень экспрессии TLR4, а PC2 приводил к возрастанию TLR2 (см. табл. 1).

Известно, что микробные ЛПС и ПС на первом этапе иницируют в клетке два основных процесса, связанных с изменением количества рецепторов CD14: слущивание (shedding) молекул с мембран и транслокацию внутриклеточных молекул на поверхность клетки. В зависимости от того, какой из процессов преобладает, наблюдается уменьшение или увеличение мембранных

молекул и возрастание молекул растворимых рецепторов CD14 (sCD14), играющих роль в транспорте ЛПС к мембранам клеток [36]. В нашем случае PC1 снижал, а PC2 и PC3 увеличивали уровень экспрессии CD14 на моноцитах.

Все ПС вызывали возрастание экспрессии CD16, в большей степени PC1, увеличивая плотность этих молекул (MFI) до $65,4 \pm 2,9$ при контрольных показателях $24,8 \pm 1,5$ (см. табл. 1). Таким образом, увеличивалась популяция моноцитов CD14⁺CD16⁺, которая характеризуется более высоким уровнем фагоцитоза, продукции провоспалительных цитокинов и большим потенциалом антигенпредставляющей функции [37].

Главная функция NK-клеток — элиминация заражённых и повреждённых клеток организма. На основе плотности молекул CD56 и CD16 на клеточной поверхности выделяют две подгруппы NK-клеток человека: NK-клетки CD56^{dim}CD16^{bright} и CD56^{bright}CD16^{dim}, каждая из которых играет особую роль в иммунном ответе человека. В периферической крови более 90% NK-клеток принадлежат к субпопуляции CD56^{dim}CD16^{bright}, которые являются медиаторами цитотоксичности. Они экспрессируют высокий уровень киллерных иммуноглобулиноподобных рецепторов (KIR), низкий уровень CD94/NKG2A, а также экспрессируют CXCR1, рецептор провоспалительного цитокина IL-8. Напротив, субпопуляция NK-клеток CD56^{bright}CD16^{dim} составляет менее 10% NK-клеток периферической крови, обладает сниженной цитотоксической активностью, доминирует в лимфатических узлах, а также тканях, отвечая за продукцию цитокинов и хемокинов. Активацию NK-клеток индуцирует появление CD56^{bright} NK-клеток, способных продуцировать провоспалительные цитокины IFN- γ , TNF- α и IL-12 [38].

В результате нашего исследования установлено, что субпопуляционный состав NK-клеток изменился следующим образом: увеличилось относительное количество способных продуцировать цитокины CD56^{bright} NK-клеток под действием PC1 до $26,1 \pm 1,3\%$ (в контроле — $10,4 \pm 1,3\%$). При этом плотность рецепторов CD16 значимо снизилась после инкубации NK-клеток с PC1 и PC3. Отмечено также возрастание плотности молекул адгезии CD11b на NK-клетках под действием ПС, но эффект PC1 был более выражен по сравнению с PC2 и PC3. Значимое снижение селектина CD62L наблюдалось только при инкубации клеток крови с PC1 (см. табл. 1). Изменение экспрессии молекул адгезии определяет особенности активации и осуществление эффекторных функций клеток.

Исследуемые ПС увеличивали относительное количество NK-клеток, экспрессирующих маркеры иммуноглобулинов CD54, а PC1 и PC3 увеличивали и экспрессию маркера активации

Таблица 2. Анти-SARS-CoV-2 активность полисахаридов из морских бактерий (МТТ-тест)
Table 2. Anti-SARS-CoV-2 activity of polysaccharides from marine bacteria (MTT assay)

Соединения	Профилактическое действие				Одновременное действие			
	1,0 lg(TCID ₅₀ /мл)		2,0 lg(TCID ₅₀ /мл)		1,0 lg(TCID ₅₀ /мл)		2,0 lg(TCID ₅₀ /мл)	
	ED ₅₀ , мкг/мл	SI	ED ₅₀ , мкг/мл	SI	ED ₅₀ , мкг/мл	SI	ED ₅₀ , мкг/мл	SI
ПС1	185±20	10,8±1,3	410±45	4,9±0,6	63±7	31,6±3,0	96±10	20,8±2,5
ПС2	128±14	15,6±1,7	253±28	7,9±0,9	83±9	24,0±2,5	182±20	10,9±1,3
ПС3	238±26	8,4±0,9	581±64	3,4±0,4	113±12	17,7±1,9	289±32	6,9±0,9
Рибавирин	Н/а		Н/а		160±18	4,6±0,6	207±23	3,5±0,4

Примечание. Результаты представлены $M \pm \sigma$ и включают данные трех экспериментов; ED₅₀ — 50% вирус-ингибирующая концентрация соединений; SI — селективный индекс соединений ($SI = CD_{50} / ED_{50}$); TCID₅₀/мл — 50% тканевая цитопатическая инфекционная доза вируса; Н/а — нет активности.

Note. The results were shown as $M \pm \sigma$ and include data of 3 experiments; ED₅₀ — 50% virus inhibition concentration of the compounds; SI — selective index of compounds ($SI = CD_{50} / ED_{50}$); TCID₅₀/ml — 50% tissue cytopathic infectious dose of the virus; Н/а — no activity.

HLA-DR (см. табл. 1). Молекулы межклеточной адгезии ICAM-1 (CD54) экспрессируются на клетках при активации и участвуют в обеспечении адгезии нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов к активированному сосудистому эндотелию с последующей их экстравазацией и миграцией в очаг воспаления. Молекулы CD54 также функционируют как сигнальные и принимают участие в передаче сигнала с клеточной мембраны внутрь клетки и запуске каскада событий, результатом чего является продукция супероксидных радикалов [39].

HLA-DR-экспрессирующие NK-клетки проявляют большую литическую способность и экспрессируют хемокиновый рецептор, связанный как с привлечением клеток к очагу воспаления, так и с возвращением их в лимфатический узел. Показано, что HLA-DR-экспрессирующие NK-клетки могут играть существенную роль во время инициации и усиления воспалительных реакций, обеспечивая регуляцию иммунного ответа. Кроме того, выявлена корреляция между процентом NK-клеток, экспрессирующих HLA-DR, и уровнем транскрипции генов IFN- γ NK-клетками [40].

Экспрессия маркера CD16 на NK-клетках под влиянием ПС снижалась (см. табл. 1). Известно, что связывание NK-клеток с лигандом CD16 индуцирует транскрипцию мембранных активных белков, таких как IL-2-R (CD25) и провоспалительных цитокинов IFN- γ и TNF- α [41].

Таким образом, ПС эффективно воздействуют на клетки врожденного иммунитета (нейтрофилы, моноциты и NK-клетки), увеличивая уровень экспрессии активационных и сигнальных молекул. Наиболее выраженное действие оказывает ПС1.

В следующей серии экспериментов проведена оценка цитотоксичности исследуемых ПС, которая показала, что эти соединения обладали низкой цитотоксической активностью по отношению к Vero E6: $CD_{50} > 2000$ мкг/мл; MNCD = 250 ± 23 мкг/мл. Для Рибавирина как референсного препарата $CD_{50} = 730 \pm 88$ мкг/мл, MNCD = 150 ± 18 мкг/мл.

Исследование влияния ПС на ранние стадии жизненного цикла SARS-CoV-2 продемонстрировало, что эти соединения наиболее эффективно подавляли репликацию вируса при условии одновременной обработки клеток Vero E6 вирусом и ПС. По данным МТТ-теста наиболее высокую противовирусную активность проявлял ПС1: при заражающей дозе 2,0 lg(TCID₅₀/мл), $CD_{50} = 96,0$ мкг/мл; при заражающей дозе 1,0 lg(TCID₅₀/мл) (табл. 2, рис. 1). Необходимо отметить, что при предварительной обработке клеток ПС (профилактическое действие) более высокая ингибирующая активность отмечена для ПС2 (табл. 2, рис. 4). При этом Рибавирин проявлял незначительную анти-SARS-CoV-2 активность только при одновременном воздействии на клетки.

Анти-SARS-CoV-2 активность ПС из морских бактерий была также изучена с использованием ОТ-ПЦР-РВ. Наиболее выраженное снижение уровня РНК SARS-CoV-2 обнаружено при одновременном воздействии ПС при MNCD = 250 мкг/мл и заражающей дозе 2,0 lg(TCID₅₀/мл) на Vero E6 (табл. 3). Установлено, что при указанных условиях ПС1 наиболее эффективно подавляет репродукцию вируса (по сравнению с контролем), защищая в среднем 42% инфицированных клеток ($p < 0,05$). При этом индексы протекции ПС2 и ПС3 составляли 22 и 15%, соответственно. В то же время при предварительной обработке клеток исследуемыми соединениями в концентрации 250 мкг/мл и при инфекционной дозе вируса 2,0 lg(TCID₅₀/мл) снижение вирусной репродукции было менее выраженным, и индекс протекции в среднем для всех полисахаридов составлял около 9% (см. табл. 3).

Таким образом, результаты, полученные как в тесте ингибирования цитопатогенного действия вируса (МТТ-тест), так и по снижению уровня РНК вируса SARS-CoV-2 (ОТ-ПЦР-РВ) продемонстрировали антикоронавирусную активность исследуемых ПС. Наибольший эффект показал ПС1, который проявляет значительную антикоронавирусную активность, эффективно

Таблица 3. Анти-SARS-CoV-2 активность полисахаридов из морских бактерий (ОТ-ПЦР-РВ)

Table 3. Anti-SARS-CoV-2 activity of polysaccharide from marine bacteria (RT-PCR)

Соединения	Профилактическое действие			Одновременное действие		
	C_{tsi}	$C_{tsi} - C_{ti}$	$\frac{C_{tsi} - C_{ti}}{(2^{C_{to} - C_{ti}} - 1)} \times 100, \%$	C_{tsi}	$C_{tsi} - C_{ti}$	$\frac{C_{tsi} - C_{ti}}{(2^{C_{to} - C_{ti}} - 1)} \times 100, \%$
ПС1	18,8±2,2*	2,4±0,3	8,8±1,1	26,3±3,4*	9,9±1,3	41,9±5,0
ПС2	19,9±2,4*	3,5±0,4	13,1±1,7	22,0±2,6*	5,6±0,7	21,9±2,8
ПС3	17,9±2,1*	1,5±0,2	5,4±0,7	20,3±2,4*	3,9±0,5	14,8±1,8
Рибавирин	16,9±1,9	0,5±0,1	1,7±0,2	19,8±2,2*	3,4±0,4	12,7±1,5

Примечание. C_t – пороговый цикл; C_{to} – значение C_t для контрольных клеток (не обработанных тестируемыми соединениями), ($C_{to}=36$); C_{ti} – среднее значение C_t для инфицированных клеток без препарата (контроль вируса), ($C_{ti}=16,4\pm1,8$); C_{tsi} – среднее значение C_t для инфицированных образцов после обработки полисахаридами. Показатели $M\pm m$ в трёх независимых экспериментах. * – уровень достоверности $p<0,05$ при сравнении показателей C_{tsi} с таковыми C_{ti} .

Note. C_t – the threshold cycle; C_{to} – C_t value for control cells (not treated with tested compounds), ($C_{to}=36$); C_{ti} – average C_t value for infected cells without the drug (virus control), ($C_{ti}=16.4\pm1.8$); C_{tsi} – average C_t value for infected samples after treatment with polysaccharides. The results were shown as $M\pm m$ and include data of 3 experiments. * – marks confidence level $P<0,05$ when comparing C_{tsi} values with C_{ti} values.

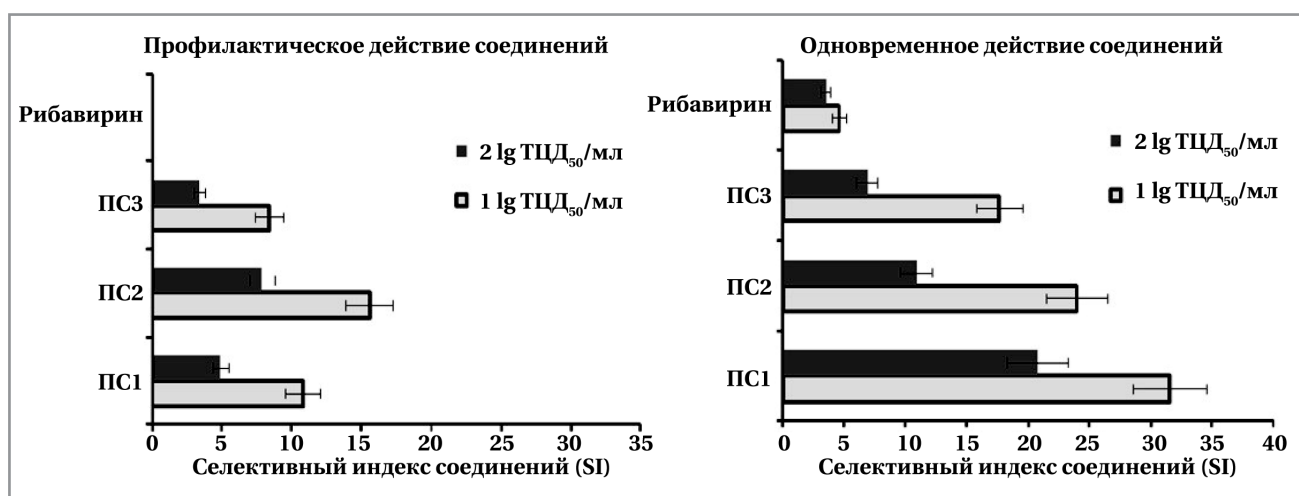


Рис. 4. Селективный индекс (SI) полисахаридов из морских бактерий при разных схемах их применения.

Fig. 4. The selective index (SI) of polysaccharides from marine bacteria in different application schemes.

ингибируя ранние стадии взаимодействия SARS-CoV-2 с клеткой.

Обсуждение

Как показали результаты проведённых исследований, наибольшую анти-SARS-CoV-2 и иммуномодулирующую активность проявил ПС1 из *P. nigrifaciens* KMM 156. Каждый из исследуемых образцов ПС имеет уникальную последовательность, конфигурацию и тип замещения индивидуальных моносахаридных остатков внутри повторяющейся структурной единицы. Кроме того, ПС2 и ПС3 являются сульфатированными по определённому положению в отличие от ПС1.

Тестирование исследуемых ПС в МТТ-тесте показало, что эти соединения обладают низкой цитотоксической активностью по отношению к Vero E6: $CD_{50} > 2000$ мкг/мл.

Что касается токсичности микробных ПС, ранее нами было показано, что эти ПС нетоксичны

при парентеральном введении лабораторным животным и не индуцируют апоптоз лимфоцитов и нейтрофильных лейкоцитов периферической крови человека [42]. Также ранее нами выявлено иммунокорригирующее и противовирусное действие ПС из *P. nigrifaciens* KMM 156 в отношении вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) (*Amarillovirales: Flaviviridae, Flavivirus*). Максимальная концентрация этого ПС (1000 мкг/мл) вызывала снижение титров вируса на 4,0 lg(TCID₅₀/мл), подавляя репродукцию вируса на 66,7% [43].

По данным ряда авторов механизмы противовирусного действия микробных ПС универсальны. Они реализуются как системно, так и при местном воздействии ПС. Системное действие ПС может проявляться путём стимуляции факторов врождённого и адаптивного иммунитета, реализации противовоспалительной, антиоксидантной и др. видов активности [44]. Ускорение элиминации вируса из организма может быть связано со стимуляцией функциональной активности клеток врождённого

иммунитета — пролиферации и цитотоксической активности NK-клеток и выработки провоспалительных цитокинов с противовирусной активностью (интерферонов 1-го типа) [44, 45]. NK-клетки одними из первых реагируют на вирусные инфекции. Цитотоксическая функция NK-клеток реализуется посредством разных механизмов, включая участие рецепторов апоптоза, лиганд Fas (FasL) и лиганд, индуцирующий апоптоз, связанный с фактором некроза опухоли (TRAIL), а также экзоцитоз цитолитических гранул, содержащих перфорины и гранзимы [46].

Механизм противовирусного действия ПС также может осуществляться путём блокирования прикрепления и проникновения вируса в клетки, ингибируя либо связывание вируса со специфическими рецепторами клеток хозяина, либо прямой инактивацией вирусных частиц [15, 24]. Так, ранее нами показано, что под воздействием ПС из *P. nigrifaciens* KMM 156 на клетки цельной крови, инфицированной ВКЭ, восстанавливалось индуцированное вирусом снижение экспрессии клеточных маркеров CD69, HLA-DR и CD107a на мембране моноцитов, NK и CD8+ Т-клеток и продукции иммунокомпетентными клетками провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8, IFN α , IFN γ). Этот ПС ингибировал репликацию вируса в клетках линии СПЭВ (почки эмбриона свиньи), снижая количество инфицированных клеток и уровень вирусной нагрузки, т. е. проявлял выраженный противовирусный эффект [43].

Выводы

1. Исследуемые ПС из морских бактерий *P. nigrifaciens* KMM 156 (ПС1), *K. litoralis* KMM 3890T (ПС2), *I. abyssalis* KMM 227T (ПС3), различающиеся

по химической структуре, активируют клетки врождённого иммунитета (нейтрофилы, моноциты, естественные NK-киллеры), усиливая их способность к миграции, изменяя уровень экспрессии молекул адгезии и увеличивая их эффекторный потенциал.

2. ПС из морских бактерий проявляют антикоронавирусную активность, эффективно ингибируя ранние стадии взаимодействия SARS-CoV-2 с клеткой.

3. Исследуемые ПС можно считать перспективным источником противовирусных лекарственных субстанций, в т. ч. в борьбе с вирусом SARS-CoV-2. Однако для изучения углублённых механизмов противовирусного действия этих ПС требуются дальнейшие исследования.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках Государственного задания НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора № 141-00089-21-00 на 2021–2025 гг. и Государственного задания Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН № 124042700016-1 на 2024–2026 гг.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. Смолина Т.П., Крылова Н.В., Иванушко Л.А., Гажа А.К., Персиянова Е.В., Майстровская О.С., Гапека А.В., Белов Ю.А. — выполнение методик, получение данных для анализа, анализ и интерпретация результатов; Кузнецова Т.А. — постановка проблемы, анализ и интерпретация результатов, написание текста, редактирование; Кокоулин М.С. — выделение полисахаридов; Щелканов М.Ю. — анализ данных, редактирование, финальное утверждение рукописи.

Литература/References

1. Щелканов М. Ю., Колобухина Л. В., Бургасова О. А., Крузжкова И. С., Малеев В. В. COVID-19: этиология, клиника, лечение. Инфекция и иммунитет 2020; 10 (3): 421–445. doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-CEC-1473>. [Shchelkanov M. Yu., Kolobukhina L. V., Burgasova O. A., Kruzchkova I. S., Maleev V. V. COVID-19: etiology, clinic, treatment. Russian Journal of Infection and Immunity, 2020; 10 (3): 421–445. doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-CEC-1473>. (in Russian)]
2. Щелканов М. Ю. Этиология COVID-19. В кн.: COVID-19: от этиологии до вакцинопрофилактики. Руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2023; 11–53. doi: <https://doi.org/10.33029/9704-7967-4-COV-2023-1-288>. [Shchelkanov M. Yu. Etiology of COVID-19. In book: COVID-19: from etiology to vaccination. A guide for doctors. Moscow: GEOTAR-Media, 2023; 11–53. doi: <https://doi.org/10.33029/9704-7967-4-COV-2023-1-288>. (in Russian)]
3. Щелканов М. Ю., Попова А. Ю., Дедков В. Г., Акимкин В. Г., Малеев В. В. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae). Инфекция и иммунитет, 2020; 10 (2): 221–246. doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-H01-1412>. [Shchelkanov M. Yu., Popova A. Yu., Dedkov V. G., Akimkin V. G., Maleev V. V. Research history of coronaviruses. Russian Journal of Infection and Immunity, 2020; 10 (2): 221–246. doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-H01-1412>. (in Russian)]
4. Пульмонология. Национальное руководство. Краткое издание. Ред.: А. Г. Чучалин. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013; 800. [Pulmonology. National leadership. Short edition. A. G. Chuchalin (ed.). Moscow: GEOTAR-Media, 2013; 800. (in Russian)]
5. Щелканов М. Ю., Ананьев В. Ю., Кузнецов В. В., Шуматов В. Б. Ближневосточный респираторный синдром: когда вспыхнет тлеющий очаг? Тихоокеанский медицинский журнал. 2015; 2: 94–98. [Shchelkanov M. Yu., Ananiev V. Yu., Kuznetsov V. V., Shumatov V. B. Middle East respiratory syndrome: when will smouldering focus outbreak? Tikhookeanskiy Meditsin-Skiy Zhurnal = Pacific Medical Journal, 2015; 2: 94–98. (In Russ.)]
6. Щелканов М. Ю., Ананьев В. Ю., Кузнецов В. В., Шуматов В. Б. Эпидемическая вспышка Ближневосточного респираторного синдрома в Республике Корея (май–июль 2015 г.): причины, динамика, выводы. Тихоокеанский медицинский журнал. 2015; 3: 89–93. [Shchelkanov M. Yu., Ananiev V. Yu., Kuznetsov V. V., Shumatov V. B. Epidemic outbreak of Middle East respiratory syndrome in the Republic of Korea (May–July 2015): causes, dynamics, conclusions. Tikhookeanskiy Meditsin-Skiy Zhurnal = Pacific Medical Journal, 2015; 3: 89–93 (in Russian)]
7. Никифоров В. В., Колобухина Л. В., Сметанина С. В., Мазанкова Л. Н., Плавунин Н. Ф., Щелканов М. Ю. и соавт. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика. М.: Департамент здравоохранения города Москвы, 2020; 71. URL: <https://elibrary.ru/hgqiyyk> [Nikiforov V. V., Kolobukhina L. V., Smetanina S. V., Mazankova L. N., Plavunov N. F., Shchelkanov M. Yu. et al. Novel coronavirus infection (COVID-19): etiology, epidemiology, clinics, diagnostics, treatment, and prophylaxis. Educational and methodological guide. Moscow: Department of Public Health of Moscow city, 2020; 71 p. URL: <https://elibrary.ru/hgqiyyk> (in Russian)]

8. Акимкин В. Г., Попова А. Ю., Плоскирева А. А., Углева С. В., Семененко Т. А., Пишеничная Н. Ю. и соавт. COVID-19: Эволюция пандемии в России. Сообщение I: проявления эпидемического процесса COVID-19. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022; 99 (3): 269–286. doi: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-276>. [Akimkin V. G., Popova A. Yu., Ploskireva A. A., Ugleva S. V., Semenenko T. A., Pshenichnaya N. Yu. et al. COVID-19: The evolution of the pandemic in Russia. Message I: manifestations of the epidemic process COVID-19. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2022; 99 (3): 269–286. doi: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-276>. (in Russian)]
9. Попова А. Ю., Шелканов М. Ю., Крылова Н. В., Белик А. А., Семейкина Л. М., Запорожец Т. С. и соавт. Генотипический портрет SARS-CoV-2 на территории Приморского края в период пандемии COVID-19. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2024; 101 (1): 19–35. doi: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-497>. [Popova A. Yu., Shchelkanov M. Yu., Krylova Natalia V., Belik A. A., Semeikina L. M., Zaporozhets T. S. et al. Genotypic portrait of SARS-CoV-2 in Primorsky Krai during the COVID-19 pandemic. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2024; 101 (1): 19–35. doi: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-497>. (in Russian)]
10. Шелканов М. Ю., Колобухина Л. В., Львов Д. К. Коронавирусы человека (Nidovirales, Coronaviridae): возросший уровень эпидемической опасности. Лечащий врач. 2013; 10: 49–54. [Shchelkanov M. Yu., Kolobukhina L. V., Lvov D. K. Human coronaviruses (Nidovirales, Coronaviridae): increased level of epidemic threat. Lechashchiy Vrach = The Attending Physician, 2013; 10: 49–54. (in Russian)]
11. Грибова В. В., Окунь Д. Б., Шалфеева Е. А., Шеглов Б. О., Шелканов М. Ю. Облачный сервис для дифференциальной клинической диагностики острых респираторных вирусных заболеваний (в том числе — связанных с особо опасными коронавирусами) методами искусственного интеллекта. Якутский медицинский журнал. 2020; 2: 44–47. [Gribova V. V., Okun D. B., Shalfeeva E. A., Shcheglov B. O., Shchelkanov M. Yu. Cloud service for the differential clinical diagnostics of acute respiratory viral diseases (including those associated with highly contagious coronaviruses) with an application of methods of artificial intelligence. Yakut Medical Journal. 2020; 2: 44–47. (in Russian)]
12. Крылова Н. В., Федорев С. А., Иунихина О. В., Мищенко Н. П., Потт А. Б., Персиянова Е. В. и соавт. Средство, обладающее противовирусным действием в отношении коронавируса SARS-CoV-2. Патент Российской Федерации на изобретение RU 2788762 C1 по заявке 2022127457 с приоритетом от 24.10.2022; дата государственной регистрации: 24.01.2023; 12. [Krylova N. V., Fedorev S. A., Iunikhina O. V., Mishchenko N. P., Pott A. B., Persyanova E. V. et al. A drug with antiviral effect against SARS-CoV-2 coronavirus. Patent of the Russian Federation for invention RU 2788762 C1 on application 2022127457 with priority from 24.10.2022; date of state registration: 01/24/2023; 12. (in Russian)]
13. Крылова Н. В., Иунихина О. В., Федорев С. А., Потт А. Б., Персиянова Е. В., Мищенко Н. П., и др. Анти-SARS-CoV-2 активность полифенольного комплекса из *Maackia aturensis*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2023; 176 (8): 216–219. doi: <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-176-8-216-219>. [Krylova N. V., Iunikhina O. V., Fedorev S. A., Pott A. B., Persyanova E. V., Mishchenko N. P. et al. Anti-SARS-CoV-2 activity of the polyphenol complex from *Maackia aturensis*. Bull Exp Biol and Med. 2023; 176 (8): 216–219. doi: <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-176-8-216-219>. (in Russian)]
14. Сомова Л. М., Коцурбий Е. А., Дробот Е. И., Крылова Н. В., Ляпун И. Н., Шелканов М. Ю. Патоморфология лимфатических узлов в случаях тяжёлой инфекции, вызванной SARS-CoV-2, наблюдавшихся в Приморском крае. Клиническая и экспериментальная морфология. 2022; 11 (4): 16–24. doi: <https://doi.org/10.31088/CEM2022.11.4.16-24>. [Somova L. M., Kotsyurbiy E. A., Drobot E. I., Krylova N. V., Lyapun I. N., Shchelkanov M. Yu. Pathomorphology of lymph nodes in cases of severe infection caused by SARS-CoV-2 observed in Primorsky Krai. Clinical and Experimental Morphology. 2022; 11 (4): 16–24. doi: <https://doi.org/10.31088/CEM2022.11.4.16-24>. (in Russian)]
15. Kuznetsova T. A., Besednova N. N., Zaporozhets T. S., Kokoulin M. S., Khotimchenko Yu. S., Shchelkanov M. Yu. Antiviral Potential of Marine Bacteria Polysaccharides. Russian Journal of Marine Biology. 2024; 50 (3): 107–115. doi: <https://doi.org/10.1134/S1063074024700056>.
16. Bello-Morales R., Andreu S., Ruiz-Carpio V., Ripa I., López-Guerrero J. A. Extracellular polymeric substances: still promising antivirals. Viruses. 2022; 14 (6): 1337. doi: <https://doi.org/10.3390/v14061337>.
17. Krylova N. V., Silchenko A. S., Pott A. B., Ermakova S. P., Iunikhina O. V., Rasin A. B. et al. *In vitro* anti-orthohantavirus activity of the high- and low-molecular-weight fractions of fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens*. Mar Drugs. 2021; 19 (10): 577. doi: <https://doi.org/10.3390/md19100577>.
18. Krylova N. V., Kravchenko A. O., Iunikhina O. V., Pott A. B., Likhatskaya G. N., Volod'ko A. V. et al. Influence of the structural features of carrageenans from red algae of the far eastern seas on their antiviral properties. Mar Drugs. 2022; 20 (1): 60. doi: <https://doi.org/10.3390/md20010060>.
19. O'Keefe, B. R., Giomarelli, B., Barnard, D. L., Shenoy, S. R., Chan, P. K., McMahon, J. B. et al. Broad spectrum *in vitro* activity and *in vivo* efficacy of the antiviral protein griffithsin against emerging viruses of the family Coronaviridae. J Virol. 2010; 84 (5): 2511–2521. doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.02322-09>.
20. Mishra N., Gupta E., Walag AMP, Kharwar RN., Singh P., Mishra P. A review of marine natural product resources with potential bioactivity against SARS-CoV-2. Trop J Nat Prod Res. 2023; 7 (1): 2093–2103. doi: <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v7i1.2>.
21. Khotimchenko Yu. S., Shchelkanov M. Yu. Viruses of the Ocean: on the shores of the aqua incognita. Horizons of taxonomic diversity. Russian Journal of Marine Biology. 2024; 50 (1): 1–24. doi: <https://doi.org/10.31857/S0134347524010018>.
22. Bello-Morales R., Andreu S., Ruiz-Carpio V., Ripa I., López-Guerrero J. A. Extracellular polymeric substances: still promising antivirals. Viruses. 2022; 14 (6): 1337. doi: <https://doi.org/10.3390/v14061337>.
23. Bianculli R. H., Mase J. D., Schulz M. D. Antiviral polymers: past approaches and future possibilities. Macromolecules. 2020; 53(21): 9158–9186. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.0c01273>.
24. Besednova N. N., Andryukov B. G., Kuznetsova T. A., Zaporozhets T. S. Antiviral effects and mechanisms of action of water extracts and polysaccharides of microalgae and cyanobacteria. J Pharm Nutr Sci. 2022; 12: 54–73. doi: <https://doi.org/10.29169/1927-5951.2022.12>.
25. Salimi F., Farrokhi P. Recent advances in the biological activities of microbial exopolysaccharides. World J Microbiol Biotechnol. 2023; 39: 213. doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03660>.
26. Горшкова Р. П., Назаренко Е. Л., Зубков А. А., Иванова Е. П., Оводов Ю. С., Пашикова А. С., Книрпель Ю. А. Структура повторяющегося звена кислого полисахарида *Alteromonas haloplanktis* KMM156. Биоорганическая химия. 1993; 19 (3): 327–336. [Gorshkova R. P., Nazarenko E. L., Zubkov A. A., Ivanova E. P., Ovodov Y. S., Shashkov A. S., Knirel Yu. A. Struktura povtornyayushchegosya zvena kislogo polisaharida *Alteromonas haloplanktis* KMM156. Bioorgan Khimiya. 1993; 19 (3): 327–336. (in Russian)]
27. Kokoulin M. S., Kuzmich A. S., Kalinovskiy A. I., Tomshich S. V., Romanenko L. A., Mikhailov V. V., Komandrova N. A. Structure and anticancer activity of sulfated O-polysaccharide from marine bacterium *Cobetia litoralis* KMM 3880T. Carbohydr Polym. 2016; 154: 55–61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.036>.
28. Kokoulin M. S., Komandrova N. A., Kalinovskiy A. I., Tomshich S. V., Romanenko L. A., Vaskovsky A. B. Structure of the O-specific polysaccharide from the deep-sea marine bacterium *Idiomarina abyssalis* KMM 227T containing a 2-O-sulfate-3-N-(4-hydroxybutanoyl)-3,6-dideoxy-d-glucose. Carbohydr. Res. 2015; 41: 100–106. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.05.012>.
29. Шелканов М. Ю., Сахурия И. Б., Полякова Е. Б., Бурунова В. В., Пашикова Т. А., Корнилаева Г. В., Карамов Э. В. Повышение качества МТТ-метода с помощью микродозаторных наконечников специальной конструкции. Иммунология. 1998; 19, 4: 57–59. [Shchelkanov M. Yu., Sakhuria I. B., Polyakova E. B., Baranova V. V., Pashkova T. A., Kornilaeva G. V., Karamov E. V. Improving the quality of the MTT method using microdosing tips of a special design. Immunology. 1998; 19, 4: 57–59 (in Russian)]
30. Шелканов М. Ю., Сахурия И. Б., Бурунова В. В., Пашикова Т. А., Абэлян А. В., Павлова Т. В. и др. Дегидрогеназная активность ВИЧ-инфицированных клеток при анализе результатов МТТ-теста. Иммунология. 1999; 20: 1: 37–41. [Shchelkanov M. Yu., Sakhuria I. B., Burunova V. V., Pashkova T. A., Abelian A. V., Pavlova T. V. et al. Dehydrogenase activity of HIV-infected cells in the analysis of MTT test results. Immunology. 1999; 20: 1: 37–41 (in Russian)]
31. Шелканов М. Ю., Ерёмин В. Ф., Сахурия И. Б., Бурунова В. В., Павлова Т. В., Корнилаева Г. В., Карамов Э. В. Дегидрогеназная активность инфицированных клеток и биологические свойства различных вариантов ВИЧ-1. Биохимия. 1999; 64 (4): 513–519. [Shchelkanov M. Yu., Eremin V. F., Sakhuria I. B., Burunova V. V., Pavlova T. V., Kornilaeva G. V., Karamov E. V. Dehydrogenase activity of infected cells and biological properties of various HIV-1 variants. Biochemistry. 1999; 64 (4): 513–519. (in Russian)]
32. Lu Y. C., Yeh W. C., Ohashi P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine. 2008; 42 (2): 145–151. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2008.01.006>.
33. Ahrens P., Kattner E., Köhler B., Härtel C., Seidenberg J., Segerer H., Möller J., Göpel W., Genetic Factors in Neonatology Study Group. Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants. Pediatr Res. 2004; 55 (4): 652–656. doi: <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000112100.61253.85>.
34. Hansson G. K., Edfeldt K. Toll to be paid at the gateway to the vessel wall. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25(6): 1085–1087. doi: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000168894.43759.47>.
35. Zhang Y., Boesen C. C., Radaev S., Brooks A. G., Fridman W. H., Sautes-Fridman C. et al. Crystal structure of the extracellular domain of a

- human FcγRIII. *Immunity*. 2000; 13 (3): 387–395. doi: 10.1016/s1074-7613(00)00038-8.
36. Landmann R., Knopf H. P., Link S., Sansano S., Schumann R., Zimmerli W. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 1996; 64 (5): 1762–1769. doi: 10.1128/iai.64.5.1762-1769.1996.
 37. Grage-Griebenow E., Flad H. D., Ernst M., Bzowska M., Skrzeczyńska J., Pryjma J. Human MO subsets as defined by expression of CD64 and CD16 differ in phagocytic activity and generation of oxygen intermediates. *Immunobiology*. 2000; 202 (1): 42–50. doi: 10.1016/S0171-2985(00)80051-0.
 38. Fauriat C., Long E. O., Ljunggren H.-G., Bryceson Y. T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 2010; 115(11): 2167–2176. doi: 10.1182/blood-2009-08-238469.
 39. Takashi S., Okubo J., Horie S. J. Contribution of CD54 to human eosinophil and neutrophil superoxide production. *J Appl Physiol*. 2001; 91 (2): 613–622. doi: 10.1152/jappl.2001.91.2.613.
 40. Evans J. H., Horowitz A., Mehrabi M., Wise E. L., Pease J. E., Riley E. M. et al. A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG. *Eur J Immunol*. 2011; 41 (7): 1924–1933. doi: 10.1002/eji.201041180.
 41. Mandelboim O., Malik P., Davis D. M., Jo C. H., Boyson J. E., Strominger J. L. Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991; 88(12): 5555–5559. doi: 10.1073/pnas.88.12.5555.
 42. Гажа А. К., Кузнецова Т. А., Смолина Т. П., Кокорулин М. С. Биологическая активность полисахаридов из морских бактерий. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2019; 3 (79): 23–26. doi: https://doi.org/10.5281/zenodo.3559614. [Gazha A. K., Kuznetsova T. A., Smolina T. P., Kokorulin M. S. Biologicheskaya aktivnost' polisaharidov iz morskikh bakterij. *Zdorov'e. Medicinskaya ekologiya. Nauka*. 2019; 3 (79): 23–26. doi: https://doi.org/10.5281/zenodo.3559614 (in Russian)]
 43. Крылова Н. В., Смолина Т. П., Берлизова М. В., Леонова Г. Н. Иммунокорректирующая и противовирусная активность полисахарида из морских бактерий в отношении вируса клещевого энцефалита. *Антибиотики и химиотерапия*. 2019; 64 (11–2): 16–24. doi: https://doi.org/10.37489/0235-2990-2019-64-11-12-16-24. [Krylova N. V., Smolina T. P., Berlizova M. V., Leonova G. N. Immunocorrective and antiviral activity of polysaccharide from marine bacteria against tick-borne encephalitis virus. *Antibiot Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2019; 64 (11–2): 16–24. doi: https://doi.org/10.37489/0235-2990-2019-64-11-12-16-24. (in Russian)]
 44. Saadat Y. R., Khosroushahi A. Y., Gargari B. P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydr Polym*. 2019; 217: 79–89. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.04.025.
 45. van Erp E. A., van Kampen M. R., van Kasteren P. B., de Wit J. Viral infection of human natural killer cells. *Viruses*. 2019; 11 (3): 243. doi: 10.3390/v11030243.
 46. Smyth M. J., Cretney E., Kelly J. M., Westwood J. A., Street S. E., Yagita H. et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*. 2005; 42: 501–510. doi: 10.1016/j.molimm.2004.07.034.

Поступила / Received 21.08.2024
Принята в печать / Accepted 30.09.2024

Информация об авторах

Смолина Татьяна Павловна — к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиологических препаратов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0003-4505-3627

Крылова Наталья Владимировна — д. б. н., ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией респираторных инфекций ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0002-9048-6803

Кузнецова Татьяна Алексеевна — д. м. н., главный научный сотрудник лаборатории иммунобиологических препаратов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0002-4315-6959

Иванушко Людмила Александровна — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории иммунобиологических препаратов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0001-9525-668X

Гажа Анна Константиновна — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории иммунобиологических препаратов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0002-2672-1629

Персиянова Елена Викторовна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории респираторных инфекций ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0002-5686-8672

Майстровская Ольга Сергеевна — младший научный сотрудник лаборатории респираторных инфекций ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0009-0003-8013-4489

About the authors

Tatyana P. Smolina — Ph. D. in Biology, Leading Researcher at the Laboratory of Immunobiological Preparations, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0003-4505-3627

Natalya V. Krylova — D. Sc. in Biology, Leading Researcher, Head of the Laboratory of Respiratory Infections, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0002-9048-6803

Tatyana A. Kuznetsova — D. Sc. in Medicine, Chief Researcher at the Laboratory of Immunobiological Preparations, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0002-4315-6959

Ludmila A. Ivanushko — Ph. D. in Medicine, Senior Researcher at the Laboratory of Immunobiological Preparations, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0001-9525-668X

Anna K. Gazha — Ph. D. in Medicine, Senior Researcher at the Laboratory of Immunobiological Preparations, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0002-2672-1629

Elena V. Persyanova — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Laboratory of Respiratory Infections, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0002-5686-8672

Olga S. Maistrovskaya — Junior Researcher at the Laboratory of Respiratory Infections, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0009-0003-8013-4489

Гапека Алёна Викторовна — младший научный сотрудник, отдел экспериментальной биомедицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0009-0000-3204-5017

Белов Юрий Александрович — младший научный сотрудник, Центр молекулярной диагностики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 000-0001-8313-5610

Кокоулин Максим Сергеевич — к. х. н., старший научный сотрудник лаборатории морской гликобиологии ФГБНУ «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН». ORCID: 0000-0003-2245-6802

Щелканов Михаил Юрьевич — д. б. н., директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия; заведующий кафедрой эпидемиологии, микробиологии и паразитологии Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета. ORCID: 0000-0001-8610-7623

Alena V. Gapeka — Junior Researcher, Department of Experimental Biomedicine, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0009-0000-3204-5017

Iurii A. Belov — Junior Researcher, Center of Molecular Diagnostics, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0001-8313-5610

Maxim S. Kokoulin — Ph. D. in Chemistry, Senior Researcher, Laboratory of Marine Glycobiology, G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch, Russian Academy of Science, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0003-2245-6802

Mikhail Yu. Shchelkanov — D. Sc. in Biology, Director of the G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0001-8610-7623