

ИВЕРМЕКТИН – МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИВИРУСНОГО И АНТИПАРАЗИТАРНОГО ЭФФЕКТОВ

Носальская Т.Н., Мартынов А.В., Бомко Т.В.

Институт микробиологии и иммунологии
им. И. И. Мечникова Национальной академии
медицинских наук Украины

Транспорт в ядро и из ядра является неотъемлемой частью нормальной функции эукариотических клеток. Ядерный транспорт играет важную роль в случае вирусной инфекции, поскольку на него направлено воздействие вирусов и защитной реакции клеток, которая в значительной степени обусловлена ядерными факторами, такими как факторы транскрипции. Ключевыми сигнально-зависимыми посредниками этого транспорта являются члены IMP – суперсемейства белков, в котором существует несколько форм - α и β . Ядерный транспорт, опосредованный гетеродимером IMP α/β 1, является наиболее изученным, с его помощью белки-хозяева проникают в ядро через ядерные поры. Белки-хозяева, транспортируемые в ядро, включают: ядерный транскрипционный фактор NF- κ B и семейство белков - трансдукторов и активаторов транскрипции (STAT), которые играют ключевую роль в ответе на инфекционное заболевание. Определенные вирусные белки [1,2] также используют этот путь. Таким образом, IMP α в гетеродимере IMP α/β 1 выполняет роль адаптера сигнально-специфического распознавания ядерного импортируемого груза, в то время как IMP β 1 выполняет основные транспортные функции связывания/транслокации через ядерные поры и последующего высвобождения ядерного импортируемого груза внутри ядра при взаимодействии с другим транспортным фактором - мономерным гуанин-нуклеотидсвязывающим белком Ran [1]. Специфическое высокоаффинное распознавание IMP α имеет решающее значение для ядерной локализации различных вирусных белков.

Одним из препаратов, который оказывает влияние на сигнал ядерной локализации различных вирусов, является ивермектин.

Ивермектин – 22,23-дигидро-производное природного авермектина B1, и состоит из смеси равных по силе гомологов 22,23-дегидро-B1a и B1b в соотношении 80:20. Препарат обладает выраженным противопаразитарным действием на личиночные и половозрелые стадии нематод желудочно-кишечного тракта и легких, личинки подкожных, носоглоточных и желудочных оводов, вшей, кровососок и саркоптоидных клещей. Механизм действия ивермектина подробно описан многими исследователями. У нематод он стимулирует выделение гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) нервными окончаниями и усиливает связывание ее с постсинаптическими ГАМК-рецепторами, блокирует

передачу нервных импульсов, что приводит к параличу и последующей гибели гельминтов.

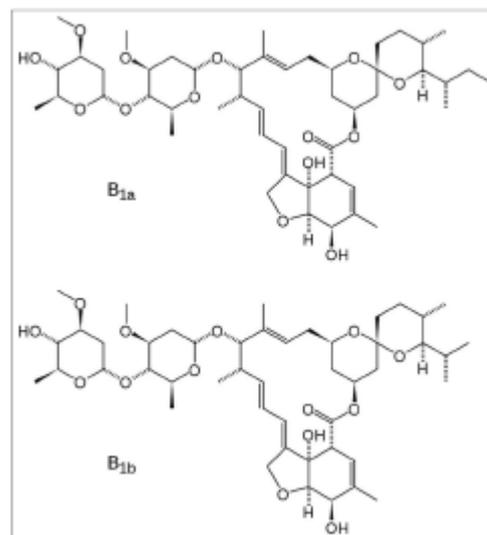


Рис.1. Химическая структура ивермектина

У клещей и насекомых блокируется передача нервных импульсов между нервными окончаниями и клетками мышечной ткани, что также приводит к параличу и гибели паразитов. Ивермектин не действует на ацетилхолин, являющийся основным медиатором нервной системы у млекопитающих [3].

Обладая мощной антигельминтной, инсектицидной и акарицидной активностью, ивермектин используется как активный ингредиент в ветеринарных антипаразитарных препаратах широкого спектра действия, а также в медицине: против эктопаразитов (чесотка) и для лечения онхоцеркоза [4,5]. Антипаразитарная активность ивермектина обусловлена, прежде всего, его воздействием на глутамат-зависимые рецепторы/хлорные каналы беспозвоночных [6,7], в то время как токсический эффект ивермектина на млекопитающих связан с активацией ГАМК-рецепторов [8]. Кроме того, известно, что ивермектин способен специфически связываться еще с одним типом лиганд-зависимых хлорных каналов, а именно: с глицин-активируемыми каналами/рецепторами [9]. Глицин-зависимые каналы представляют особый интерес, поскольку они обнаружены во многих иммунных клетках, включая альвеолярные макрофаги и макрофаги печени (купферовские клетки).

Викторов А.В. и соавт. [10] изучили прямое воздействие ивермектина на иммунокомпетентные клетки. Показано, что сам по себе ивермектин не изменял базальный уровень ионов кальция ни в купферовских клетках, ни в альвеолярных макрофагах, однако существенно блокировал увеличение внутриклеточной концентрации кальция, вызываемое последующим добавлением ЛПС; причем эффект наблюдается только в присутствии ионов хлора в наружной среде. Базируясь на этих данных, авторы предположили, что ивермектин способен

оказывать «защиту» купферовских клеток и от стимуляции другими агонистами, вызывающими мобилизацию внутриклеточного кальция. Так, предварительная инкубация купферовских клеток и альвеолярных макрофагов с ивермектином приводила к значительному подавлению ЛПС-индуцированной секреции ПГЕ₂. Причем замена в наружной клеточной среде ионов хлора на глюконат полностью устраняла вышеописанный эффект препарата. Аналогично прединкубация купферовских клеток с ивермектином приводила к значительному уменьшению секреции TNF α , вызванной последующим добавлением ЛПС, в то время как удаление из культуральной среды ионов хлора перед введением ивермектина полностью снимало его ингибирующее действие.

Абсолютная зависимость инактивирующего действия ивермектина от присутствия во внешней среде ионов хлора свидетельствует о том, что ивермектин является агонистом глицин-зависимых хлорных каналов, которыми обладают макрофаги печени. Способность ивермектина блокировать индуцируемую ЛПС секрецию медиаторов воспалительной реакции макрофагов, а также увеличивать пролиферацию иммунокомпетентных клеток может иметь благоприятные физиологические последствия на уровне всего организма в виде снижения эндотоксемических проявлений и стимуляции клеточных пролиферативных процессов [10].

Геруновым Т.В. в эксперименте на свиньях гибридной линии (возраст 144 дня) и крысах линии Вистар (возраст 5 мес.) были изучены возможные иммунотропные эффекты ивермектина, который вводили свиньям однократно подкожно в дозе 0,2 мг/кг, крысам – в десятикратной терапевтической дозе [11].

При исследовании сыворотки крови свиней установлено снижение содержания IgG во все сроки исследования, IgM и IgA – через 7 суток после начала опыта. По окончании эксперимента уровень IgG оставался ниже фонового значения на 16,4%; IgM – на 15,2%; IgA – на 33%. В тимусе крыс отмечено сужение коркового вещества при введении токсической дозы препарата, фолликулы селезенки были уменьшены, центры размножения в них слабо выражены. Вокруг фолликулов наблюдалось скопление гемосидерина. В брыжеечных лимфатических узлах отмечалось утолщение капсулы и расширение трабекул. Корковое вещество сужено, паракортикальная зона расширена. Таким образом, результаты исследования указывают на высокую степень риска иммунотоксических эффектов ивермектина.

По данным Буканова Ю.В. и соавт. [12] ивермектин можно использовать для лечения некоторых форм онкологических заболеваний, а также в качестве противовирусного средства, в частности, для лечения COVID-19. Механизмы действия ивермектина до конца не изучены. Предполагается, что он меняет работу хлорных каналов и увеличивает концентрацию хлора в

цитоплазме. Авторы изучали влияние ивермектина на хлорный ток, индуцированный глицином (I_{Gly}) на изолированных пирамидных нейронах гиппокампа крысы методом patch-clamp. Короткая аппликация (600 мс) ивермектина в концентрации 10 мкМ вызывала генерацию медленного и необратимого при отмывании входящего тока. При низких концентрациях (0.1-1000 нМ) ивермектин не индуцировал собственный ток и при этом быстро, обратимо и дозозависимо уменьшал пиковую амплитуду и ускорял десенситизацию I_{Gly} . Пороговая концентрация ивермектина для уменьшения пиковой амплитуды I_{Gly} составляла 100 нМ, а для ускорения десенситизации I_{Gly} — 0.1 нМ. Показана высокая чувствительность нейрональных глициновых рецепторов к ивермектину [12].

Фармакокинетика

Фармакокинетический профиль ивермектина при пероральном приеме был исследован на здоровых добровольцах с использованием различных методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (чувствительных к 1-2 мкг/л) для измерения концентрации ивермектина в биологических жидкостях. После введения однократной дозы 12 мг ивермектина 12 здоровым мужчинам не было различий в его средней пиковой концентрации в плазме (C_{max}) между таблетками и капсулами (46 против 50 мкг/л). Однако, когда ивермектин вводили 40% растворе этанола (0,6 мг/мл), C_{max} была практически удвоена (81 мкг/л), что отразилось на увеличении системной доступности, оцененной по площади под кривой зависимости концентрации в плазме от времени (855, 1034 и 1473 мкг/л \times ч для таблеток, капсул и растворов соответственно). Исходя из этих значений, биодоступность препарата в форме таблеток относительно биодоступности раствора составляла 60% [13]. Среднее время достижения C_{max} составляло от 3,5 до 4 часов в диапазоне доз от 6 до 15 мг и не зависело от состава [14]. Ивермектин демонстрирует линейную фармакокинетику в этом диапазоне доз. Распределение ивермектина в областях с высокой концентрацией филярий, таких как кожа, глаза и узелки, не охарактеризовано. Однако сообщалось, что он имеет относительно большой кажущийся объем распределения (46,9 л), что указывает на широкое распространение в тканях. Связывание ивермектина с белками плазмы составило 93% [15,16]. Очевидный конечный период полувыведения ивермектина у людей составил 28 часов после перорального приема раствора [17], тогда как пероральный клиренс составил 1,2 л/ч. Метаболит 3'-О-деметил-22,23-дигидровермектин VIa был обнаружен в моче, а моносахарид 22,23-дигидровермектина VIa - в фекалиях 4 здоровых субъектов, которым вводили радиоактивно меченый ивермектин [14].

Фармакокинетические характеристики и профиль безопасности ивермектина позволяют исследовать новые возможности его применения. Miñoz J. и соавт. провели фазу I клинического испытания с участием 54 здоровых взрослых

добровольцев, которые последовательно прошли 2 экспериментальных курса лечения с использованием новых таблеток ивермектина по 18 мг в режиме фиксированных доз 18 и 36 мг по сравнению со стандартным, рассчитанным на основе веса, приемом в дозе 150–200 мкг/кг. Добровольцы были набраны в также в 3 группы по массе тела. Концентрации ивермектина в плазме измеряли с помощью ВЭЖХ в течение 168 часов после приема.

Данные по безопасности не показали значительных различий между группами и серьезных нежелательных явлений: головная боль была наиболее частым нежелательным явлением во всех группах лечения, ни одно из них не было серьезным. Фармакокинетические параметры показали период полувыведения от 81 до 91 ч в различных группах лечения. При сравнении системной биодоступности (AUC_{0-t} и C_{max}) эталонного продукта (WA-ref) с двумя опытными группами (фиксированные дозы 18 мг и 36 мг) наблюдали общее увеличение AUC_{0-t} и C_{max} в двух в опытных группах. $t_{1/2}$ и V/F коррелировали с индексом массы тела (ИМТ) и весом, что, вероятно, отражает высокую липофильность ивермектина и более длительное время удерживания, пропорционально количеству жировой ткани. Системное воздействие ивермектина (AUC_{0-t} или C_{max}) не было связано с ИМТ или весом в данном исследовании. Эти результаты способствуют более глубокому пониманию фармакокинетических характеристик ивермектина и безопасность при различных режимах дозирования. Они также соответствуют известным фармакокинетическим параметрам - стабильным уровням AUC и C_{max} в широком диапазоне масс тела, что оправдывает стратегию фиксированного дозирования с фармакокинетической точки зрения [18].

Guzzo, С.А. и соавт. [19] в двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании изучили безопасность и фармакокинетика ивермектина, вводимого в более высоких и/или более частых дозах, чем в настоящее время одобрено для использования у людей. Субъекты ($n = 68$) были разделены на одну из четырех панелей (3:1, ивермектин/плацебо): 30 или 60 мг (три раза в неделю) или 90 или 120 мг (разовая доза). Группа 30 мг (диапазон: 347–594 мкг/кг) также получала однократную дозу с едой после недельного отмытия. Оценки безопасности касались как известных эффектов ивермектина на ЦНС, так и общей токсичности. Первичной конечной точкой безопасности был мидриаз, точно определяемый пупиллометрией. Ивермектин в целом хорошо переносился без каких-либо указаний на связанную с ним токсичность для ЦНС при дозах, до 10 раз превышающих наивысшую дозу 200 мкг/кг, одобренную FDA. Мидриаз возникал с частотой, равноценной плацебо, при всех режимах дозирования. Неблагоприятные эффекты в группе ивермектина и плацебо были одинаковыми и не усиливались с увеличением дозы. После однократных доз от 30 до 120 мг AUC и C_{max} , как правило, были пропорциональны дозе, с $t_{max} \sim 4$ часа и $t_{1/2} \sim 18$ часов. Среднее геометрическое значение AUC 30 мг

ивермектина было в 2,6 раза выше при приеме с пищей. Среднее геометрическое соотношение AUC 7-й день/1-й день составляло 1,24 и 1,40 для доз 30 и 60 мг соответственно, что указывает на минимальное накопление препарата, вводимого каждый четвертый день. Это исследование показало, что ивермектин обычно хорошо переносится при более высоких дозах и более частом приеме [19].

Противовирусная активность

Многочисленные исследования показали, что ивермектин *in vitro* обладает противовирусной активностью широкого спектра действия [20–22].

Первоначально идентифицированный как ингибитор взаимодействия между интегразным белком (IN) вируса иммунодефицита человека-1 (ВИЧ-1) и гетеродимером импортина (IMP) $\alpha/\beta 1$, ответственным за ядерный импорт IN ивермектин имеет с тех пор подтвержденное ингибирование ядерного импорта IN и репликации ВИЧ-1 [23].

Было показано, что ивермектин ингибирует ядерный импорт, в том числе вирусных белков, включая антиген большой опухоли вируса обезьяны SV40 (T-ag) и неструктурный белок 5 вируса денге (DENV) [23,24].

В ряде исследований было продемонстрировано ограничение заражения РНК-вирусами, такими как DENV 1–4 [21], вирус Западного Нила [25], вирус гриппа [26].

Широкий спектр противовирусной активности препарата связан с его способностью воздействовать на ядерные транспортные белки импортины (IMP), а именно IMP $\alpha/\beta 1$, ответственный за проникновение в ядро таких грузов, как интегразы и NS5. Впервые установлено, что ивермектин может вызывать диссоциацию предварительно сформированного гетеродимера IMP $\alpha/\beta 1$, а также предотвращать его образование посредством связывания с доменом повтора IMP α армадилла (ARM), влияя на термостабильность и α -спиральность IMP α . Показано, что ивермектин ингибирует взаимодействие NS5-IMP α в клеточном контексте, используя количественную бимолекулярную комплементацию флуоресценции. Наконец, впервые показано, что ивермектин может ограничивать заражение вирусом Западного Нила, связанным с DENV, в низких (мкМ) концентрациях [25].

Аналогичным образом было показано, что ивермектин эффективен против вируса псевдобешенства ДНК-вируса (PRV) как *in vitro*, так и *in vivo*, при этом лечение ивермектином увеличивало выживаемость у PRV-инфицированных мышей [27].

Wagstaff К.М. и соавт. [28] идентифицировали ивермектин в 2011 году в ходе высокопроизводительного скрининга с использованием белков, экспрессируемых бактериями, и библиотеки малых молекул из 1200 соединений для ингибиторов распознавания интегразы ВИЧ-1 (ИН) с помощью IMP α / $\beta 1$. Из нескольких соединений, которые в настоящее время подтверждены как активные против IMP $\alpha/\beta 1$ и, как

следствие, обладают противовирусной активностью, ивермектин наиболее охарактеризован и имеет широкий спектр действия. Первоначально было показано, что он ингибирует ядерный импорт не только IN, но и большого опухолевого антигена (T-ag) обезьяньего вируса SV40 и других IMP α / β 1- (но не IMP β 1-) зависимых грузов, что согласуется с идеей, что IMP α (не IN) является прямой мишенью ивермектина [28]. Последующие исследования подтвердили это, продемонстрировав способность ивермектина ингибировать накопление в ядрах различных хозяев, включая NF-kB p65 [29] и вирусные белки, продемонстрированные в трансфицированных и инфицированных клеточных системах [28]. Способность ивермектина ингибировать связывание IMP α с вирусными белками NS5 и T-ag также была подтверждена в клеточных исследованиях с использованием метода комплементации бимолекулярной флуоресценции.

Следует отметить, что исследования CD/термостабильности показывают, что связывание ивермектина с IMP α вызывает структурные изменения, которые, вероятно, являются основой ингибирования ивермектином связывания IMP α с вирусными ядерными импортируемыми грузами. Поразительно, что структурные изменения, по-видимому, также нарушают гетеродимеризацию IMP α с IMP β 1 [30].

Таким образом, ивермектин ингибирует ядерный импорт не только за счет предотвращения распознавания сигнала IMP α , но также за счет предотвращения образования комплекса IMP α / β 1, необходимого для последующего транспорта через ядерную пору.

Исследования *in vitro* показали, что ивермектин активен в ограничении инфицирования рядом различных РНК-вирусов [31], включая ВИЧ-1 [32], DENV (все 4 серотипа) и родственные флавивirusы [25,33], гриппа и альфавирусом, таких как вирус венесуэльского конского энцефалита (VEEV) и чикунгунья; он также активен против ДНК-вирусов [30].

В свете способности ивермектина предотвращать репликацию в широком спектре вирусов, подавление импорта вирусных белков в ядро, опосредованное импортином α / β 1, предложено в качестве вероятного механизма, лежащего в основе его противовирусной активности. Поскольку SARS-CoV-2 представляет собой РНК-вирус, может иметь место аналогичный механизм действия. Также сообщалось о возможной ионофорной роли ивермектина.

Можно предположить, что две молекулы ивермектина, реагируя друг с другом по принципу «голова-хвост», могут создавать комплекс, который можно считать таковым (рис. 2).

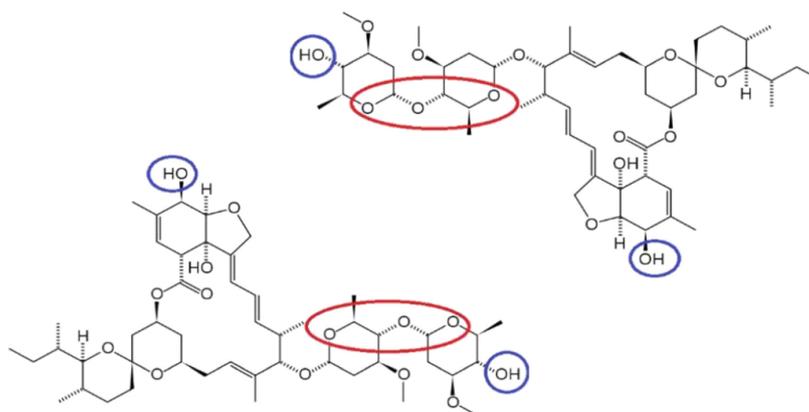


Рис. 2. Возможный механизм взаимодействия между двумя молекулами ивермектина

Это взаимодействие может происходить спонтанно или быть опосредовано связыванием тех же молекул с некоторыми транспортными белками плазмы, в частности с альбумином, что должно было бы иметь значение в их правильном расположении для получения предлагаемой конфигурации. Как можно видеть, таким образом образуется внутренняя полость: атомы кислорода (обозначенные красным), которые теперь присутствуют в большем количестве, работают как основания Льюиса и, следовательно, могут координировать ряд катионов (кислоты Льюиса). С другой стороны, группы -OH (выделены синим цветом) могут играть решающую роль в стабилизации новой структуры с установлением химических связей между этими функциональными группами - одного или нескольких мостиков -O-

(однако затрудняет образование эфирных связей, поскольку кислотный катализ при высокой температуре невозможен при нормальных условиях, как *in vitro*, так и *in vivo*) или, что более вероятно, могут образовываться водородные связи даже между супрамолекулярными комплексами этого типа. Однако нельзя исключить образование других слабых и сильных взаимодействий разного рода. В противном случае конкретные катионы могли бы связывать две молекулы предложенным способом, создавая окончательную структуру и стабилизируя ее. Таким образом, внешняя часть комплекса уже будет иметь все гидрофобные характеристики, необходимые для переноса ионов через вирусную мембрану. Как следствие, будет определен ионный дисбаланс между внешней и внутренней средой с выходом воды и

последующим осмотическим лизисом. Это позволило бы нейтрализовать вирус на ранней стадии заражения, прежде чем он может прилипнуть к клеткам-хозяевам и проникать в них, чтобы использовать их биохимические механизмы для производства других вирусных частиц. Однако эта гипотеза касается только вирусов без протеинового капсида - структуры, которая проявляет определенную устойчивость к осмотическому давлению. Новый коронавирус – один из них, имеющий только фосфолипидную оболочку для защиты генетического материала, куда вставлены его немногочисленные белки, которые он приобретает при выходе из инфицированных клеток. Этот нетрадиционный режим поглощения электролита может также повлиять на потенциал вирусной мембраны, угрожая ее целостности и функциональности. Кроме того, определенное таким образом изменение концентрации некоторых катионов может ингибировать ключевые ферменты вирусной репликации, такие как РНК-зависимые РНК-полимеразы (RdRp), которые уже используются в качестве фармакологических мишеней [34].

Противовирусная активность ивермектина распространяется на большое количество различных вирусов [25,35], включая SARS-CoV-2 [27].

В 2014-2017 г. в Таиланде было проведено рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое испытание фазы III против инфекции DENV. Результаты предыдущего исследования фазы II (неопубликованные данные) показали, что 3-дневное лечение ивермектином перорально (400 мкг/кг; один раз в день) безопасно для пациентов с инфекцией денге.

В исследовании фазы III ивермектин применялся перорально в суточной дозе 400 мкг/кг в течение трех дней (или плацебо) для лечения пациентов с инфекцией денге. Всего было включено 146 пациентов. В модифицированный анализ намерений был включен 131 пациент (66 пациентов в группе ивермектина и 65 пациентов в группе плацебо). Медиана (IQR) клиренса вирусии денге в плазме составляла 80,5 (71,7–89,3) часа и 82 (74,2–89,8) часа в группах ивермектина и плацебо соответственно ($p = 0,766$). Среднее время клиренса NS1 (IQR) составляло 90 (70,3-109,8) часов и 102 (76,6-127,4) ($P = 0,027$). 19 пациентов (74,47%) и 30 пациентов (46,15%) имели неопределяемый NS1 при выписке ($P = 0,001$). Среднее время купирования лихорадки (IQR) составило 79 (73,1-84,9) часов и, 79 (70,7-87,3) часов ($P = 0,736$). В этом исследовании не наблюдалось серьезных нежелательных явлений.

Сделано заключение, что однократная пероральная доза ивермектина была безопасной. Противовирусная эффективность препарата проявлялась в виде значительного различия времени клиренса NS1 и доли пациентов с отрицательным NS1 при выписке между двумя группами лечения [36].

Антивирусные эффекты в отношении COVID

Возбудитель текущей пандемии COVID-19, SARS-CoV2, представляет собой вирус с одноцепочечной положительной смысловой РНК, который тесно связан с возникновением тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV). Исследования белков SARS-CoV выявили потенциальную роль $MP\alpha/\beta 1$ в развитии инфекции сигнально-зависимой нуклеоцитоплазматической блокировки белка нуклеокапсида SARSCoV, что может влиять на деление клеток-хозяев. Кроме того, было показано, что дополнительный белок ORF6 SARS-CoV противодействует противовирусной активности фактора транскрипции STAT1 за счет секвестирования $MP\alpha/\beta 1$ на шероховатой мембране ER/Golgi. Взятые вместе, эти данные позволяют предположить, что ингибирующая активность ивермектина в отношении ядерного транспорта может быть эффективной против SARS-CoV-2. Чтобы проверить противовирусную активность ивермектина в отношении SARS-CoV-2, Caly L. и соавт. инфицировали клетки Vero/hSLAM изолятом SARS-CoV-2 Australia/VIC01/2020 с MOI 0,1 в течение 2 часов с последующим добавлением 5 мкМ ивермектина. Супернатант и осадок клеток собирали на 0–3 дни и анализировали с помощью ОТ-ПЦР на репликацию РНК SARS-CoV-2.

На рис. 3 приведена предполагаемая схема противовирусного действия ивермектина на коронавирус. Показано, что добавление препарата в концентрации 5 мкМ (вдвое превышающей сообщенную IC_{50}) к клеткам Vero-hSLAM через 2 часа после инфицирования SARS-CoV-2 привело к снижению вирусной РНК-нагрузки на 99,98% через 48 ч. Авторы предположили, что этот препарат может снизить вирусную нагрузку у инфицированных пациентов с потенциальным влиянием на прогрессирование и распространение заболевания. Хотя полученные результаты обнадеживают, факторы фармакокинетики ограничивают прямой перевод их на человека, т.к. отсутствуют доказательства того, что концентрация ивермектина 5 мкМ, использованная в этом эксперименте с SARS-CoV-2 *in vitro*, может быть достигнута *in vivo* [37]. IC_{50} ивермектина в отношении вируса составляла приблизительно 2,5 мкМ. Эти концентрации эквивалентны 4370 и 2190 нг/мл соответственно, что в 50-100 раз превышает пиковую концентрацию (C_{max}), достигаемую в плазме после однократной дозы 200 мкг/кг (14 мг для взрослого с массой тела 70 кг), которая обычно используется для борьбы с онхоцеркозом. Фармакокинетические исследования на здоровых добровольцах показали, что разовые дозы ивермектина до 120 мг могут быть безопасными и хорошо переносимыми. Однако даже с этой дозой, которая в 10 раз больше, чем одобренные FDA, значения C_{max} составили ~ 250 нг/мл, что на порядок ниже, чем эффективные концентрации *in vitro* против SARS-CoV-2.

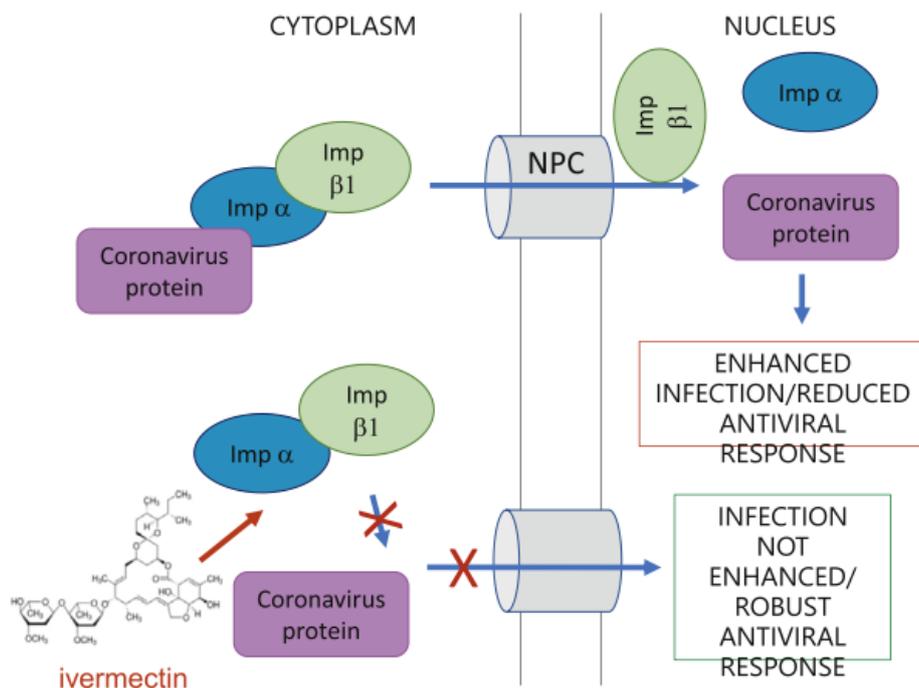


Рис. 3. Схема предлагаемого противовирусного действия ивермектина на коронавирус. $IMP\alpha/\beta1$ связывается с белком-грузом коронавируса в цитоплазме (вверху) и перемещает его через комплекс ядерных пор (NPC) в ядро где комплекс распадается, и вирусный груз может снизить противовирусный ответ клетки-хозяина, что приведет к усилению инфекции. Ивермектин связывает и дестабилизирует гетеродимер $IMP\alpha/\beta1$ предотвращает связывание $IMP\alpha/\beta1$ с вирусным белком (внизу) и предотвращает его попадание в ядро. Это, вероятно, приведет к снижению ингибирования противовирусных реакций, что приводит к нормальному, более эффективному противовирусному ответу.

Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США сообщило, что значения C_{max} составили ~ 250 нг / мл **13**, что на порядок ниже, чем эффективные концентрации *in vitro* против SARS-CoV-2.

Важно отметить, что концентрация лекарственного средства, используемого в исследовании (5 мкМ) для блокирования SARS-CoV-2, была в 35 раз выше, чем концентрация, одобренная FDA для лечения паразитарных заболеваний, что вызывает опасения по поводу его эффективности у людей с использованием одобренной FDA дозы в клинических испытаниях.

Концентрация, приводящая к 50% ингибированию (IC_{50} ; 2 мкМ), была более, чем в 35 раз выше, чем максимальная концентрация в плазме (C_{max}) после перорального введения одобренной дозы ивермектина при приеме натощак. Schmith, V.D. и соавт. [38] проводилось моделирование с использованием доступной популяционной фармакокинетической модели для прогнозирования профилей общей (связанной и несвязанной) и несвязанной концентрации в плазме во времени после однократного и повторного введения одобренной дозы ивермектина (200 мкг/кг) - 60 мг и 120 мг натощак. Определяли общую C_{max} в плазме и затем умножали на соотношение легкие : плазма,

зарегистрированное у крупного рогатого скота, чтобы предсказать C_{max} в легких после введения каждой разовой дозы. Общие (связанные и несвязанные) и несвязанные концентрации ивермектина в плазме не достигают IC_{50} даже для уровня дозы, в 10 раз превышающего утвержденную. Даже при высоком соотношении легкие : плазма ивермектин вряд ли достигнет IC_{50} в легких после однократного перорального приема утвержденной дозы (прогнозируемая доза для легких: 0,0873 мкМ) или при дозах, в 10 раз превышающих утвержденную дозу, вводимую перорально (прогнозируемая доза - 0,820 мкМ). Таким образом, вероятность успешного клинического испытания с использованием одобренной дозы ивермектина невысока [38].

Фармакокинетические исследования ивермектина у людей показали, что даже при максимальной дозе (примерно 1700 мкг/кг, т.е. в 8,5 раз превышающей дозу 200 мкг/кг, утвержденную FDA) максимальная концентрация в плазме была всего 0,28 мкМ. 93% ивермектина связывается с белками плазмы, которые ограничивают его клеточное поглощение эндотелиальными клетками. С учетом как общей концентрации в плазме, так и связывания с белками, свободная концентрация ивермектина в плазме будет в 250 раз ниже, чем концентрация, необходимая для снижения вирусной репликации SARS-CoV-2 *in vitro*. Хотя нет данных о

проникновении ивермектина в легкие человека, общая концентрация препарата у телят, при дозе 200 мкг/кг, достигла только 100 нг/г (приблизительно 0,1 мкМ) в легочной ткани, что позволяет предположить, что этого накопления будет недостаточно для достижения противовирусного эффекта при использовании обычных доз. Хотя высокие дозы ивермектина взрослыми и детьми хорошо переносятся, его клинические эффекты в диапазоне концентраций 5 мкМ неизвестны и могут быть связаны с токсичностью [39].

Следовательно, ивермектин обладает активностью *in vitro* против SARS-CoV-2, но, возможно, этот эффект не будет наблюдаться *in vivo* при текущих дозировках.

Патология COVID-19 характеризуется быстрой репликацией SARS-CoV-2, запускающей усиленный иммунный ответ, который может привести к цитокиновому шторму, который часто вызывает тяжелую воспалительную реакцию легких. Прогрессирование заболевания может привести к прогрессирующей дыхательной недостаточности, возникающей в результате повреждения альвеол, и к смерти. Более того, мониторинг вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в верхних дыхательных путях и жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ) у пациентов с тяжелым течением заболевания указывает на более высокие нагрузки, а также на большую устойчивость вируса. Помимо показаний к противовирусной терапии, для предотвращения острого повреждения легких при инфекции SARS-CoV-2 также может потребоваться противовоспалительная терапия.

Что касается противовоспалительных свойств, то ивермектин снижает воспаление кожи. Так, Ebbelaar C.C.F. и соавт. [40] в клиническом исследовании протестировали ивермектин при папулопустулезной розацеа средней и тяжелой степени. Показано, что препарат является эффективным вариантом лечения папулопустулезной розацеа и был более эффективен, чем метронидазол через 12 недель лечения.

Важно отметить, что ивермектин в дозе 2 мг/кг значительно уменьшал рекрутирование иммунных клеток, продукцию цитокинов в ЖБАЛ и секрецию OVA-специфических IgE и IgG1 в сыворотке, оцениваемую на модели астмы у мышей. Гистологические исследования показали, что препарат подавляет гиперсекрецию слизи бокаловидными клетками в дыхательных путях [41].

Исследование, оценивающее способность ивермектина подавлять воспаление, вызванное липополисахаридами (ЛПС), показало значительное снижение продукции TNF-альфа, IL-1ss и IL-6 *in vivo* и *in vitro* [42]. Дальнейшие исследования могут установить роль ивермектина в воспалительной реакции, вызванной SARS-CoV-2, помимо его противовирусной активности.

Ивермектин может играть вспомогательную роль адьюванта в микросреде, содержащей враждебную вирусную инфекцию [43].

Ивермектин для лечения SARS-CoV-2 у человека уже одобрен в ряде штатов и стран, включая Республику Перу и северо-восточный регион Бени в Боливии. Важно отметить, что около 70 испытаний во всем мире в настоящее время проверяют клиническую эффективность ивермектина для лечения или профилактики SARS-CoV-2; они включают вариации в режимах дозирования, комбинированную терапию [44] и профилактические протоколы. Предварительные результаты недавно завершеного исследования NCT04422561, посвященного бессимптомному семейному близкому контакту с подтвержденными пациентами с COVID, показывают, что после приема 2 доз ивермектина с интервалом 72 часа только к 7,4% из 203 пациентов сообщали о симптомах инфекции SARS-CoV-2, в отличие от контрольных нелеченных субъектов, среди которых 58,4% сообщили о симптомах, что подчеркивает потенциал препарата в качестве профилактического средства. Результаты ретроспективных/наблюдательных исследований [45-47] также согласуются с клинической пользой. Госпиталь Mumensingh Medical College (Бангладеш) сообщил, что ни у одного из 115 пациентов, получавших однократную дозу ивермектина 12 мг, не развились пневмония / сердечно-сосудистые осложнения, по сравнению с 9,8% (пневмония) и 1,5% (ишемический инсульт) у 133 пациентов контрольной группы [45]. Кроме того, у значительно меньшего числа пациентов из группы ивермектина развился респираторный дистресс (2,6 против 15,8%) или потребовался кислород (9,6 против 45,9%), антибиотики (15,7 против 60,2%) или интенсивная терапия (0,09 против 8,3%). Пациенты, получавшие ивермектин, становились отрицательными по SARS-CoV-2 значительно быстрее (медиана 4 по сравнению с 15 днями), имели значительно более короткое пребывание в больнице (медиана 9 против 15 дней) и значительно более низкую смертность (0,9 против 6,8%). Хотя использовались комбинации методов лечения, результаты когортного исследования 196 пациентов (ICON - ивермектин в COvid Nineteen - исследование) в Медицинском центре Broward Health (Флорида, США) [46] указывают на значительное снижение смертности (13,3%) у 196 пациентов, которые получали 0,2 мг/кг ивермектина (необязательная вторая доза через 8 дней), по сравнению с 24,5% смертностью у тех, кто не получал ивермектин, с более значительными различиями для пациентов с тяжелым поражением легких (показатели смертности 38,8 против 80,7%). Хотя эти ранние результаты согласуются с эффективностью, ясно, что только результаты крупных тщательных рандомизированных клинических испытаний окончательно установят эффективность ивермектина для лечения или профилактики инфекции SARS-CoV-2.

Возможные направления для дальнейшего исследования перепрофилирования ивермектина для лечения SARS-CoV-2 могут заключаться в (I) разработке ингаляционного препарата для эффективной доставки высокой локальной

концентрации в легкие при минимальном системном воздействии и (II) оценке синергетических эффектов ивермектина с другими соединениями, которые также ингибируют репликацию SARS-CoV-2.

Ivermectin - molecular mechanisms of antiviral and antiparasitic effects

Nosalska T.N., Martynov A.V., Bomuko T.V.

Specific highly affinity recognition of imports is crucial for the viral proteins nuclear localization. One of the drugs that affects the viral nuclear localization signal is ivermectin. It is shown that the addition of 5 mcM ivermectin to Vero-hSLAM cells 2 hours after the SARS-COV-2 infection led to a decrease in the viral RNA load by 99.98% after 48 hours. Ivermectin for treatment SARS-COV-2 people have already approved in a number of states and countries, including Peru and the Northeastern region of Beni in Bolivia. It is important to note that about 70 tests around the world are currently checking the clinical efficacy of ivermectin for the treatment or prevention of SARS-COV-2; They include variations in dosing modes, combined therapy and prophylactic protocols. Scientists suggested that this drug can reduce viral load in infected patients with potential influence on the progression and dissemination of the disease. Possible directions for the further study of the recruitment of Ivermectin for the treatment of SARS-COV-2 may be in the development of an inhalation preparation for the effective delivery of high local concentration into the lungs with minimal systemic exposure and estimating the synergistic effects of ivermectin with other connections that also inhibit SARS-COV-2 replication.

Keywords: ivermectin, SARS-COV-2, nuclear signal localization inhibitor, cells culture, pilot clinical trials

References

1. Fulcher A. J., Jans D. A. Regulation of nucleocytoplasmic trafficking of viral proteins: an integral role in pathogenesis? // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* – 2011. – 1813, №12, - P. 2176-2190.
2. Caly L., Wagstaff K. M., Jans D. A. Nuclear trafficking of proteins from RNA viruses: potential target for antivirals? // *Antiviral res.* - 2012.- 95, №3. – P. 202-206.
3. Turner M.J., Schaeffer J.M. Mode of Action of Ivermectin. Ivermectin and Abamectin. – 1989. – P. 73–88.
4. Campbell W.C. Ivermectin and abamectin. Springer-Verlag, New York, Berlin, London, Paris, Tokyo. – 1989.
5. Goa K.L., McTavish D., Clissold S.P. Ivermectin: A review of its antifilarial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy in onchocerciasis // *Drug.* – 1991. – 42. – P. 640–658.
6. Forrester S.G., Hamdan F.F., Prichard R.K., Beech R.N. Cloning, sequencing, and developmental expression levels of a novel glutamate-gated chloride channel homologue in the parasitic nematode *Haemonchus contortus* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – 254, № 3. – P. 529–534.

7. Genetic and biochemical evidence for a novel avermectin-sensitive chloride channel in *Caenorhabditis elegans*. Isolation and characterization / Vassilatis D.K., Arena J.P., Plasterk R.H.A., Wilkinson H.A., Schaeffer J.M., Cully D.F., Van der Ploeg L.H.T. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – 272, № 52. – P. 33167–33174.
8. Anticonvulsant and adverse effects of avermectin analogs in mice are mediated through the α -aminobutyric acidA receptor / Dawson G.R., Wafford K.A., Smith A., Marshall G.R., Bayley P.J., Schaeffer J.M., McKernan R.M. // *J Pharmacol. Exp. Ther.* – 2000. – 295, № 3. – P. 1051–1060.
9. Shang Q., Haddrill J.L., Lynch J.W. Ivermectin, an unconventional agonist of the glycine receptor chloride channel // *J. Biol. Chem.* – 2001. – 276, № 16. – P. 12556–12564.
10. Viktorov A.V., Cherkasova TD, Yurkiv V.A., Pokrovsky V.I. The mechanisms of immunomodulating actions of avermectin-containing drugs in infectious pathology // *Infectious diseases.* - 2009. - t. 7, №1. - C.20-22.
11. Gerunov T.V. Immunotropic effects of ivermectin in productive and laboratory animals // *Toxicological messenger.* - 2020. - 160, №1.
12. Bukanova Yu.V., Solntva E.I., Kondratenko R.V., Strbstsky V.G. Ivermectin anti-virus drug in nanomolar concentrations inhibits chlorine current induced by glycine, in the pyramidal neurons of the rat hippocampus // *Bull. experimental biology and medicine.* - 2020. - T.170, №11. - P. 613-617.
13. The relative systemic availability of ivermectin after administration as capsule, tablet, and oral solution / Edwards G., Dingsdale A., Helsby N., Orme M.L.E., Breckenridge A.M. // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 1988. – 35, №6. – P. 681–684.
14. Fink D.W., Porras A.G. Pharmacokinetics of Ivermectin in Animals and Humans. // *Ivermectin and Abamectin.* – 1989. – P.113–130.
15. Klotz U., Ogbuokiri J.E., Okonkwo P.O. Ivermectin binds avidly to plasma proteins // *Eur. j. clin. pharmacol.* – 1990. – 39, №6. – P. 607-608.
16. The pharmacokinetics and interactions of ivermectin in humans—a mini-review / Canga A.G., Prieto A.M.S., Liébana M.J.D., Martínez N.F., Vega M.S., Vieitez J.J.G. // *AAPS j.* – 2008. – 10, №1. – P.42-46.
17. Edwards G., Breckenridge A.M. Clinical pharmacokinetics of anthelmintic drugs // *Clin. pharmacokinetics.* – 1988. – 15, №2. – P. 67-93.
18. Safety and pharmacokinetic profile of fixed-dose ivermectin with an innovative 18mg tablet in healthy adult volunteers / Muñoz J., Ballester M.R., Antonijoan R.M., Gich I., Rodriguez M., Colli E., Gold S., Krolewieck A.J. // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2018. – 12, №1. – P. 1-16.
19. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of escalating high doses of ivermectin in healthy adult subjects / Guzzo, C.A., Furtek, C.I., Porras, A.G., Chen, C., Tipping, R., Clineschmidt, C.M., Lasseter, K.C. // *J. Clin. Pharmacol.* – 2002. – 42, №10. – P. 1122-1133.
20. Influenza A viruses escape from MxA restriction at the expense of efficient nuclear vRNP import / Götz, V., Magar, L., Dornfeld, D., Giese, S., Pohlmann, A., Höper,

- D., Schwemmler, M. // Scientific reports. – 2016. – 6, №1. – P. 1-15.
21. Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1–4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin / Tay, M.Y.F., Fraser, J.E., Chan, W.K.K., Moreland, N.J., Rathore, A.P., Wang, C., Jans, D.A. // *Antiviral res.* – 2013. – 99, №3. –P. 301-306.
22. Nuclear import and export inhibitors alter capsid protein distribution in mammalian cells and reduce Venezuelan Equine Encephalitis Virus replication / Lundberg, L., Pinkham, C., Baer, A., Amaya, M., Narayanan, A., Wagstaff, K. M., Kehn-Hall, K. // *Antiviral res.* – 2013. – 100, №3. – P. 662-672.
23. Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus / Wagstaff, K.M., Sivakumaran, H., Heaton, S.M., Harrich, D., Jans, D.A. // *Biochem. J.* – 2012. – 443, №3. – P. 851-856.
24. The importin α/β -specific inhibitor Ivermectin affects HIF-dependent hypoxia response pathways / Kosyna, F.K., Nagel, M., Kluxen, L., Kraushaar, K., Depping, R. // *Biol. chem.* – 2015. – 396, №12. – P.1357-1367.
25. The broad spectrum antiviral ivermectin targets the host nuclear transport importin α/β heterodimer / Yang, S.N., Atkinson, S.C., Wang, C., Lee, A., Bogoyevitch, M.A., Borg, N.A., Jans, D.A. // *Antiviral res.* – 2020. – 177. – P. 1-38
26. Influenza A viruses escape from MxA restriction at the expense of efficient nuclear vRNP import / Götz, V., Magar, L., Dornfeld, D., Giese, S., Pohlmann, A., Höper, D., Schwemmler, M. // *Sci. reports.* – 2016. – 6, №1. –P. 1-15.
27. Ivermectin inhibits DNA polymerase UL42 of pseudorabies virus entrance into the nucleus and proliferation of the virus in vitro and vivo / Lv, C., Liu, W., Wang, B., Dang, R., Qiu, L., Ren, J., Wang, X. // *Antiviral res.* – 2018. – 159. – P. 55-62.
28. Wagstaff K. M., Rawlinson S. M., Hearps A. C., Jans D. A. An AlphaScreen®-based assay for high-throughput screening for specific inhibitors of nuclear import // *J. biomol. screen.* – 2011. – 16, №2. – P. 192-200.
29. Avermectin exerts anti-inflammatory effect by downregulating the nuclear transcription factor kappa-B and mitogen-activated protein kinase activation pathway / Ci X., Li, H., Yu, Q., Zhang, X., Yu, L., Chen, N., Deng, X. // *Fundament. clin. pharmacol.* – 2009. – 23, №4. – P. 449-455.
30. Inhibition of human adenovirus replication by the importin α/β nuclear import inhibitor ivermectin / King, C. R., Tessier, T. M., Dodge, M. J., Weinberg, J. B., Mymryk, J. S. // *J. Virol.* – 2020. – 94, №18. –P. 1-13.
31. Jans, D. A., Martin, A. J., Wagstaff, K. M. Inhibitors of nuclear transport // *Curr. opin. cell biol.* – 2019. – 58. – P. 50-60.
32. Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus / Wagstaff, K. M., Sivakumaran, H., Heaton, S. M., Harrich, D., Jans, D. A. // *Biochem. J.* – 2012. – 443, №3. – P. 851-856.
33. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug / Mastrangelo, E., Pezzullo, M., De Burghgraeve, T., Kaptein, S., Pastorino, B., Dallmeier, K., Milani, M. // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2012. – 67, №8. – P. 1884-1894.
34. Rizzo, E. Ivermectin, antiviral properties and COVID-19: a possible new mechanism of action // *Naunyn-Schmiedeberg's arch. pharmacol.* – 2020. – 393. – P. 1153-1156.
35. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug / Mastrangelo E., Pezzullo M., De Burghgraeve T., Kaptein S., Pastorino B., Dallmeier K., Milani M. // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2012. – 67, №8. – P. 1884-1894.
36. Efficacy and safety of ivermectin against dengue infection: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled trial / Yamasmith E., Saleh-arong F.A., Avirutnan P., Angkasekwinai N., Mairiang D., Wongsawat E., Tanrumluk S. Fongsri U. // In: He 34th Annual Meeting the Royal College of Physicians of Thailand. Internal Medicine and One Health, Chonburi, Thailand. – 2018.
37. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro / Caly, L., Druce, J. D., Catton, M. G., Jans, D. A., Wagstaff, K. M. // *Antiviral res.* – 2020. – 178. – P. 1-4.
38. Schmith, V.D., Zhou, J., Lohmer, L.R. The approved dose of ivermectin alone is not the ideal dose for the treatment of COVID-19 // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2020. – 108, №4. – P. 762-765.
39. Pharmacokinetic considerations on the repurposing of ivermectin for treatment of COVID-19 / Peña-Silva, R., Duffull, S.B., Steer, A.C., Jaramillo-Rincon, S.X., Gwee, A., Zhu, X. // *Br J Clin Pharmacol.* – 2020. – P. 1–2.
40. Ebbelaar, C.C.F., Venema, A.W., Van Dijk, M.R. Topical ivermectin in the treatment of papulopustular rosacea: a systematic review of evidence and clinical guideline recommendations // *Dermatol. ther.* – 2018. – 8, №3. – P. 379-387.
41. Anti-inflammatory effects of ivermectin in mouse model of allergic asthma / Yan, S., Ci, X., Chen, N., Chen, C., Li, X., Chu, X., Deng, X. // *Inflammation Res.* – 2011. – 60, №6. – P. 589-596.
42. Ivermectin inhibits LPS-induced production of inflammatory cytokines and improves LPS-induced survival in mice / Zhang, X., Song, Y., Ci, X., An, N., Ju, Y., Li, H., Deng, X. // *Inflammation Res.* – 2008. – 57, №11. – P. 524-529.
43. Gupta, D., Sahoo, A. K., Singh, A. Ivermectin: potential candidate for the treatment of Covid 19 // *Brazil. J. Infect. Dis.* – 2020. – 24, №4. –P. 369-371.
44. Effects of Ivermectin-azithromycin-cholecalciferol combined therapy on COVID-19 infected patients: A proof of concept study / Espitia-Hernandez, G., Munguia, L., Diaz-Chiguer, D., Lopez-Elizalde, R., Jimenez-Ponce, F. // *Biomed. Res.* – 2020. – 31, №5. – P. 129-133.
45. Ivermectin treatment may improve the prognosis of patients with COVID-19 / Khan, M. S. I., Khan, M. S. I., Debnath, C. R., Nath, P. N., Al Mahtab, M., Nabeka, H., Akbar, S. M. F. // *Arch. bronconeumol.* – 2020. – 56, №12. – P. 828-830.

46. ICON (Ivermectin in COvid Nineteen) Study: use of ivermectin is associated with lower mortality in hospitalized patients with COVID-19 / Rajter, J. C., Sherman, M. S., Fatteh, N., Vogel, F., Sacks, J., Rajter, J. J. // CHEST. – 2020. – P. 1-19
47. Effect of Ivermectin on Time to Resolution of Symptoms Among Adults With Mild COVID-19: A Randomized Clinical Trial / López-Medina, E., López, P., Hurtado, I. C., Dávalos, D. M., Ramirez, O., Martínez, E., Caicedo, I. // JAMA. – 2021. – P. 1-10.