https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-34-43

CC BY 4.0

ЛЕЙТРАГИН ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ЦИТОКИНОВ, ВКЛЮЧАЯ ИНТЕРЛЕЙКИН-6, В МОДЕЛИ «ЦИТОКИНОВОГО ШТОРМА» У МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6Y С ИНДУЦИРОВАННЫМ ОСТРЫМ РЕСПИРАТОРНЫМ ДИСТРЕСС-СИНДРОМОМ

В.Н. Каркищенко[1], И.А. Помыткин[1,*], Н.В. Петрова[1], М.С. Нестеров[1], Р.А. Агельдинов[1], Л.В. Зотова[1], Е.М. Колоскова[1], В.В. Слободенюк[1], В.И. Скворцова[2]

[1] *ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»*
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1

[2] *Федеральное медико-биологическое агентство России*
123182, Российская Федерация, Москва, Волоколамское шоссе, д. 30

Настоящая работа посвящена изучению эффектов лейтрагина, аналога эндогенного гексапептида динорфина 1-6, на экспрессию провоспалительных цитокинов и интерферонов I типа в экспериментальной фатальной модели острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) у мышей C57BL/6Y. Экспрессию интерлейкина-1β (IL-1β), интерлейкина-6 (IL-6), фактора некроза опухоли (TNF-α), интерферонов α (IFN-α) и β (IFN-β) в легких оценивали методом ПЦР в реальном времени. Индукция ОРДС α-галактозилцерамидом и липополисахаридом *E. coli* приводила к многократному повышению экспрессии цитокинов в легких. Введение лейтрагина в сочетанном режиме, внутримышечная инъекция плюс ингаляция, приводило к статистически значимому снижению уровней мРНК цитокинов в легких уже через 3 ч после начала введения. При этом средний уровень мРНК IL-6, ключевого цитокина в развитии тяжелого ОРДС, снижался в 4,7 раза ($p<0,01$) до значений, близких к наблюдаемым у интактных животных. С учетом особой роли повышенных концентраций IL-6 в развитии тяжелых форм COVID-19 использование лейтрагина для подавления «цитокинового шторма» может быть эффективным подходом к лечению коронавирусной инфекции.

Ключевые слова: лейтрагин, острый респираторный дистресс-синдром, «цитокиновый шторм», мыши C57BL/6Y, цитокины, интерлейкин-6, COVID-19
Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.
Для цитирования: Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Петрова Н.В., Нестеров М.С., Агельдинов Р.А., Зотова Л.В., Колоскова Е.М., Слободенюк В.В., Скворцова В.И. Лейтрагин подавляет экспрессию цитокинов, включая интерлейкин-6, в модели «цитокинового шторма» у мышей линии C57BL/6Y с индуцированным острым респираторным дистресс-синдромом. *Биомедицина.* 2020;16(4):34–43. https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-34-43

Поступила 29.07.2020
Принята после доработки 05.08.2020
Опубликована 26.10.2020

LEUTRAGIN INHIBITS EXPRESSION OF CYTOKINES, INCLUDING INTERLEUKIN-6, IN A "CYTOKINE STORM" MODEL IN C57BL/6Y MICE WITH INDUCED ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

Vladislav N. Karkischenko[1], Igor A. Pomytkin[1,*], Nataliya V. Petrova[1], Maxim S. Nesterov[1], Ruslan A. Ageldinov[1], Lyudmila V. Zotova[1], Elena M. Koloskova[1], Vladimir V. Slobodenyuk[1], Veronika I. Skvortsova[2]

[1] *Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk district, Svetlye gory village, building 1*

[2] *Federal Medical and Biological Agency of Russia 123182, Moscow, Volokolamskoye highway, 30*

This study aims to investigate effects of leutragin, an analogue of endogenous hexapeptide dynorphin 1-6, on the expression of pro-inflammatory cytokines and type I interferons in an experimental model of fatal acute respiratory distress syndrome (ARDS) in C57BL/6Y mice. The expression of interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), tumour necrosis factor (TNF-α), interferons α (IFN-α) and β (IFN-β) in the lungs was assessed by real-time PCR. The induction of ARDS using α-galactosylceramide and *E. coli* lipopolysaccharide led to a multifold increase in the expression of the cytokines in the lungs. The administration of leutragin in a combined mode — intramuscular injection plus inhalation — led to a statistically significant decrease in the mRNA levels of cytokines within three hours after the start of administration. The average mRNA levels of IL-6, a key cytokine in the development of severe acute respiratory syndrome, decreased by 4.7 times ($p<0.01$) to reach values close to those observed in intact animals. Given the crucial role of elevated IL-6 concentrations in the development of severe forms of COVID-19, the use of leutragine for suppressing "cytokine storm" syndromes may be an effective approach to the treatment of this coronavirus infection.

Keywords: leutragin, acute respiratory distress syndrome, "cytokine storm", C57BL/6Y mice, cytokines, interleukin-6, COVID-19
Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.
For citation: Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Petrova N.V., Nesterov M.S., Ageldinov R.A., Zotova L.V., Koloskova E.M., Slobodenyuk V.V., Skvortsova V.I. Leutragin Inhibits Expression of Cytokines, Including Interleukin-6, in a "Cytokine Storm" Model in C57BL/6Y Mice with Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *Journal Biomed.* 2020;16(4):34–43. https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-34-43

Submitted 29.07.2020
Revised 05.08.2020
Published 26.10.2020

Введение

Синдром высвобождения цитокинов, или «цитокиновый шторм», наряду с острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС), лимфопенией и нарушениями свертываемости крови, является одним из ключевых факторов тяжелого течения новой коронавирусной инфекции COVID-19, вызываемой вирусом SARS-CoV-2 [7]. Аномальное повышение уровней цитокинов, в т. ч. интерлейкина-1β (IL-1β), интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-10 (IL-10), фактора некроза опухоли (TNF-α) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ведет к формированию клинической картины системного воспалительного ответа, особую роль в котором играет IL-6 [14, 16]. Среди всех цитокинов, уровень которых повышается при COVID-19, особую роль играет IL-6. Существуют доказательства

связи между повышенными уровнями IL-6 и тяжелым течением заболевания, связанным с необходимостью интенсивной терапии у пациентов с COVID-19 [9, 13]. Повышение уровней IL-6 на фоне снижения Т-клеточного иммунитета увеличивает риск летального исхода у этих пациентов [12, 18]. Недавний метаанализ 18-ти исследований COVID-19, включающих в совокупности 2984-х пациентов, показал, что существует пороговый уровень IL-6 в крови, равный 1,7 пг/мл, который является дискриминатором (от лат. *discrimino* — «различаю») легкого и тяжелого течения болезни [10]. При уровне IL-6 в крови менее 1,7 пг/мл заболевание протекало легко, тогда как превышение этого уровня приводило к тяжелому течению болезни. В том же анализе было отмечено, что у невыживших пациентов уровень IL-6 в крови был выше 4,6 пг/мл [10].

Пока существует только ограниченное понимание того, какую роль играет «цитокиновый шторм» в тяжелом течении заболевания у пациентов с COVID-19. По одной из версий [5], высокие концентрации цитокинов, и особенно IL-6, негативно влияют на выживание и пролиферацию Т-клеток, выполняющих основную работу по удалению инфицированных вирусом клеток и снижению вирусной нагрузки. Высокие концентрации IL-6, TNF-α и IL-10 в сыворотке достоверно коррелируют с пониженным количеством CD4+ и CD8+ Т-клеток [5, 17], а снижение концентраций IL-6, IL-10 и TNF-α у выздоравливающих пациентов сопровождается восстановлением пула CD4+ и CD8+ Т-клеток [5]. Предположительно, высокие концентрации IL-6 играют роль триггера апоптоза Т-клеток в селезенке и лимфатических узлах, что объясняет связь между «цитокиновым штормом» и снижением пула Т-клеток пациентов с COVID-19 [4]. В поддержку этой гипотезы свидетельствует тот факт, что тоцилизумаб, антагонист рецептора IL-6, повышал абсолютное число циркулирующих лимфоцитов у пациентов с COVID-19 в течение первых 24 ч после введения [8].

С учетом вклада «цитокинового шторма» в тяжелое течение и неблагоприятный прогноз при COVID-19 блокирование сигнальных систем цитокинов рассматривается как потенциально эффективный подход к снижению тяжести и летальности COVID-19. На стадии клинических испытаний находятся специфические моноклональные антитела к интерферону-γ (эмапалумаб), TNF-α (адалимумаб), интерлейкину-6 (силтуксимаб) и рецептору интерлейкина-6 (тоцилизумаб и сарилумаб). Однако в синдром высвобождения цитокинов вовлечено множество сигнальных путей и широкий спектр цитокинов. Поэтому, несмотря на высокую эффективность моноклональных антител в блокировании отдельных сигнальных путей, существует необходимость в разработке универсальных средств, способных подавлять или модулировать несколько, а в идеальном случае — большинство сигнальных путей, приводящих к «цитокиновому шторму» при COVID-19.

Активация транскрипционного ядерного фактора каппа B (NF-κB) является общим сигнальным событием, следующим за активацией рецепторов, распознающих патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, в т. ч. toll-подобных рецепторов TLR3, TLR8, TLR9 и RIG-I-подобных рецепторов, распознающих вирусную одноцепочечную РНК (ssRNA) и двухцепочечную РНК (dsRNA) [11]. NF-κB запускает транскрипцию генов, кодирующих цитокины, хемокины и дополнительные медиаторы воспаления в различных типах врожденных иммунных клеток. Поэтому NF-κB представляет собой фармакологическую мишень в контексте подавления «цитокинового шторма» при COVID-19.

Динорфин 1-17 — это гептадекапептид из класса эндогенных опиоидных пептидов, который производится многими клетками, в т. ч. лейкоцитами. При высвобождении из лейкоцитов в месте воспаления динорфин 1-17 подвергается быстрой биотрансформации с образованием набора фрагментов. Фрагмент динорфина 1-6 обладает способностью ингибировать активацию NF-κB и таким образом подавлять транскрипционную активацию NF-κB-зависимых генов, как было показано для цитокинов IL-1β и TNF-α [6]. Однако динорфин 1-6 живет менее одной минуты *in vivo* из-за действия пептидаз, что ограничивает возможность его использования в качестве средства лечения синдрома высвобождения цитокинов.

Лейтрагин представляет собой искусственный гексапептид, имеющий аминокислотную последовательность Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, соответствующую структуре фрагмента динорфина 1-6, в котором остаток Gly во втором положении заменен на D-Ala для повышения устойчивости пептида к действию эндогенных пептидаз.

Целью работы было исследование эффективности лейтрагина в подавлении экспрессии цитокинов IL-1β, TNF-α, IL-6, IFN-α и IFN-β на экспериментальной модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) с выраженными признаками «цитокинового шторма», подобными тем, что наблюдаются при COVID-19.

Материалы и методы

Животные

Исследования проводились в Научном центре биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) на мышах линии C57BL/6Y, самках в возрасте около 2,5 мес., начальной средней массой 20±2,0 г (*n*=80). Животные были получены из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и отобраны в эксперимент методом рандомизации. Мышей содержали в микроизоляторной системе Rair IsoSystem по 5 особей. Животные соответствовали категории конвенциональных. Животные получали стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась *ad libitum* в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды при температуре воздуха 18–22°C, относительной влажности 60–70% и естественно-искусственном освещении с циклом 12/12. Вновь прибывшие животные находились на карантине 7 дней в клетках. Все эксперименты проводились в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов [1, 3], а также в соответствии с Приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Модель острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС)

Животные были разделены на 4 группы по 6 особей в каждой. Интактные животные не подвергались какому-либо вмешательству. В остальных группах животным вводили α-галактозилцерамид в дозе 1 мкг/мышь и через 24 ч под общим наркозом вводили интратрахеально липополисахарид стенки *E. coli* в количестве 300 мкг/мышь с добавлением 100 мкг/мышь мурамилпептида, 10 мкл/мышь полного адъюванта Фрейнда и G2 (ЛПС-микс), чтобы индуцировать острый респираторный дистресс-синдром [2].

Режим дозирования

Через 3 ч после введения ЛПС-микс животные получили однократно лейтрагин внутримышечно в дозе 10 мкг/кг (группа «LPS+L1»), лейтрагин внутримышечно в дозе 10 мкг/кг и внутрилегочно ингаляционно в дозе 100 мкг/кг (группа «LPS+L2») или не получали ничего (группа «LPS»). Через 3 ч после введения лейтрагина животных декапитировали, легкие извлекали и гомогенизировали с использованием прибора для автоматической гомогенизации клеток и тканей MagNa Lyser («Roche») [16].

Выделение РНК из биоматериала

Из полученного материала легких выделяли тотальную РНК с помощью набора для выделения РНК-экстран («Синтол», Россия) в соответствии с инструкциями производителя.

Проведение ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Анализ ПЦР производили на матрице ДНК, полученной в результате обратной транскрипции одноцепочечной РНК в кДНК. Синтез первой цепи кДНК проводили согласно инструкции «Комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК. РЕВЕРТА-L» («ИнтерЛабСервис», Москва) при 37°C — 30 мин в течение одного цикла.

Проведение ПЦР в реальном времени

Исследование экспрессии генов *IL1B*, *IL6*, *TNFA*, *IFNA* и *IFNB*, кодирующих цитокины IL-1β, IL-6, TNF-α, IFN-α и IFN-β соответственно, в исследуемых пробах производилось с помощью детектирующего амплификатора CFX-96 («Bio-Rad», США) при использовании специфических праймеров и флуоресцентных зондов, указанных в таблице. В качестве референсного гена был выбран ген «домашнего хозяйства» *GAPDH*. Результаты измерений выражались как кратность изменения экспрессии гена относительно экспрессии этого же гена у интактных животных.

Статистическая обработка

Статистический анализ проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с последующим тестом Тьюки (Tukey's test) для множественного сравнения различий между

Таблица. *Олигонуклеотидные праймеры и зонды ПЦР-системы для детекции генов IL1B, IL6, TNFA, IFNA и IFNB*
Table. *Oligonucleotide primers and PCR probes used for detecting IL1B, IL6, TNFA, IFNA and IFNB genes*

Ген	Праймер/зонд	Нуклеотидная последовательность
IL1B	F	5'-GAGAACCAAGCAACGACAAA-3'
	R	5'-CTTGTTGAAGACAAACCGTT-3'
	Z	ROX-TAATGAAAGACGGCACACCCACCCT-BHQ2
IL6	F	5'-ATGAAGTTCCTCTCTGCAAG-3'
	R	5'-GTGTAATTAAGCCTCCGACT-3'
	Z	ROX-CTTCTTGGGACTGATGCTGGTGACA-BHQ-2
TNFA	F	5'-TCTGTCTCTCACCTGCTCTG-3'
	R	5'-GGTTCTCAGATGTGTCACGA-3'
	Z	ROX-GAATGGATGGGCTACATAAGTTACG-BHQ2
IFNA	F	5'-ATCAAACAGCCCAGAAGACC-3'
	R	5'-GGCTTTCTTGTTCCTGAGGT-3'
	Z	ROX-GGCTCTGTGCTTTCCTGATGGTTTT-BHQ2
IFNB	F	5'-CACCACAGCCCTCTCCATCA-3'
	R	5'-GCATCTTCTCCGTCATCTCC-3'
	Z	ROX-GGCTCTGTGCTTTCCTGATGGTTTT-BHQ2

Примечание: *F — прямой праймер, R — обратный праймер, Z — зонд ПЦР-системы.*
Note: *F — **d**irect primer, R — reverse primer, Z — PCR probe.*

группами с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Различия между группами считались статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты исследований

Для того чтобы оценить эффекты лейтрагина на экспрессию цитокинов в легких, мышам C57BL/6Y с индуцированным ОРДС вводили лейтрагин одним из двух способов: только внутримышечной инъекцией (LPS+L1) или сочетанным введением, внутримышечной инъекцией и ингаляцией (LPS+L2). Экспрессию IL-1β, TNF-α, IL-6, IFN-α и IFN-β в легких измеряли методом ПЦР в реальном времени. Результаты представлены на рисунке как среднее значение ± ошибка среднего кратного изменения уровней мРНК отдельных цитокинов относительно наблюдаемого у интактных животных (n=6).

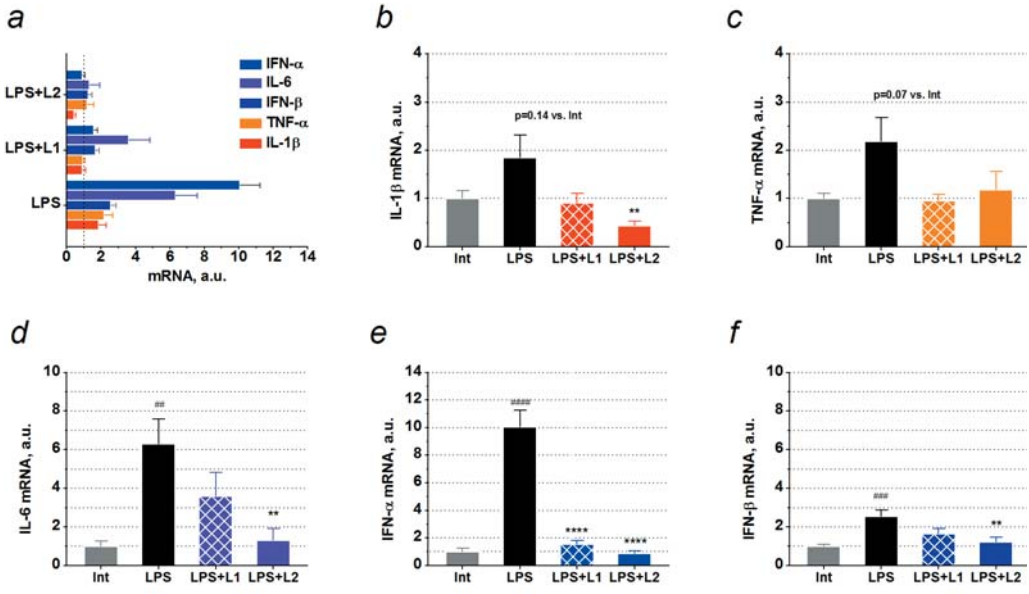

Рис. *Эффекты лейтрагина на экспрессию цитокинов в легких мышей линии C57BL/6Y с индуцированным острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС): (a) — кратное изменение уровней мРНК (mRNA) цитокинов IL-1β, TNF-α, IL-6, IFN-α и IFN-β в легких животных с ОРДС («LPS»), а также получивших лейтрагин внутримышечной инъекцией («LPS+L1»), сочетанно лейтрагин внутримышечной инъекцией и ингаляционно («LPS+L2»), относительно уровней мРНК у интактных животных; (b), (c), (d), (e) и (f) — кратное изменение уровней мРНК (mRNA) отдельных цитокинов IL-1β, TNF-α, IL-6, IFN-α и IFN-β в легких животных с ОРДС («LPS»), а также получивших лейтрагин внутримышечной инъекцией («LPS+L1»), сочетанно лейтрагин внутримышечной инъекцией и ингаляционно («LPS+L2»), относительно уровней мРНК у интактных животных («Int»). ## — $p<0,01$; ### — $p<0,001$ и #### — $p<0,0001$ по сравнению с группой «Int»; ** — $p<0,01$ и **** — $p<0,0001$ по сравнению с группой «LPS» (однофакторный дисперсионный анализ, тест Тьюки).*

Fig. *Effects of leutragine on cytokine expression in the lungs of C57BL/6Y mice with induced acute respiratory distress syndrome (ARDS): (a) — multifold changes in the mRNA levels of IL-1β, TNF-α, IL-6, IFN-α and IFN-β in the lungs of animals with ARDS (LPS), as well as in the lungs of mice having received leutragine by both intramuscularly injection ("LPS+L1") and in a combined mode (intramuscularly injection and inhalation) ("LPS+L2"), relative to the corresponding mRNA levels in intact animals; (b), (c), (d), (e) and (f) — multifold changes in the mRNA levels of individual cytokines — IL-1β, TNF-α, IL-6, IFN-α and IFN-β — in the lungs of animals with ARDS ("LPS"), as well as in the lungs of mice having received leutragine by both intramuscularly injection ("LPS+L1") and in a combined mode (intramuscularly injection and inhalation) ("LPS+L2"), relative to the corresponding mRNA levels in intact animals ("Int"). ## — $p<0.01$; ### — $p<0.001$ and #### — $p<0.0001$ compared to the "Int" group; ** — $p<0.01$ and **** — $p<0.0001$ compared to the "LPS" group (single factor dispersion, Tukey' test).*

Внутрилегочное введение α-галактозилцерамида с последующим интратрахеальным введением липополисахарида вызвало статистически значимое увеличение экспрессии IL-6 в 6,3 раза (p<0,01), IFN-α — в 10,0 раза (p<0,0001) и IFN-β — в 2,6 раза (p<0,001) в легких животных с ОРДС (группа «LPS») по сравнению с интактным контролем (группа «Int»). Экспрессия IL-1β повышалась в 1,9 раза (p=0,14), а TNF-α — в 2,2 раза (p=0,07), но недостоверно при размере выборки n=6. Следует отметить, что наблюдаемое в данной экспериментальной модели статистически значимое многократное повышение экспрессии IL-6 воспроизводит основной характерный признак «цитокинового шторма» у пациентов с тяжелым течением коронавирусной инфекции COVID-19.

Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) результатов показал, что введение лейтрагина существенно изменило профили экспрессии всех исследованных цитокинов. Статистически значимые различия между группами были найдены в отношении экспрессии IL-1β (рис. 1b; $F_{3,20}$=4,968; p<0,01), TNF-α (рис. 1c; $F_{3,20}$=3,280; p<0,05), IL-6 (рис. 1d; $F_{3,20}$=6,877; p<0,01), IFN-α (рис. 1e; $F_{3,20}$=52,14; p<0,0001) и IFN-β (рис. 1f; $F_{3,20}$=8,648; p<0,001). Сравнение между группами с помощью теста Тьюки показало, что сочетанный режим введения лейтрагина, инъекция плюс ингаляция, наиболее эффективно снижал экспрессию цитокинов, в т. ч. IL-1β — в 4,3 раза (p<0,01), TNF-α — в 1,9 раза (p=0,15), IL-6 — в 4,7 раза (p<0,01), IFN-α — в 11,2 раза (p<0,0001) и IFN-β — в 2,1 раза (p<0,01) у животных с ОРДС («LPS+L2») по сравнению с контролем («LPS»). Лейтрагин при инъекционном способе введения («LPS+L1») был менее эффективен, чем при комбинированном введении, и также снижал экспрессию цитокинов, но статистически значимый результат был получен только для снижения IFN-α.

В целом полученные результаты показывают, что лейтрагин при сочетанном инъекционном и ингаляционном введении эффективно подавляет экспрессию как провоспалительных цитокинов, так и интерферонов I типа в легких животных с «цитокиновым штормом», и поэтому может быть использован как средство, блокирующее синдром выделения цитокинов.

Особенно важно, что лейтрагин подавляет экспрессию IL-6, ключевого цитокина в развитии тяжелого ОРДС у пациентов с коронавирусной инфекцией COVID-19.

Обсуждение результатов

В настоящей работе показано, что лейтрагин, представляющий собой стабилизированный аналог динорфина 1-6, подавляет экспрессию цитокинов в условиях «цитокинового шторма», причем ингибиторный эффект реализуется на уровне транскрипции, о чем свидетельствуют результаты ПЦР в реальном времени. Ингибирование транскрипции цитокинов IL-1β, TNF-α, IL-6, IFN-α и IFN-β в легких происходило уже через 3 ч после введения лейтрагина, причем эффективность сочетанного введения лейтрагина (внутримышечной инъекцией и ингаляцией) превышала эффективность инъекционного моновведения. Более высокая эффективность сочетанного введения, по-видимому, связана с тем, что «цитокиновый шторм» в данной модели развивается в первую очередь именно в легких, и ингаляционное введение обеспечивает прямую доставку пептида к очагу поражения.

Главный результат настоящей работы состоит в том, что лейтрагин снижал уровни мРНК IL-6, ключевого цитокина в развитии респираторных заболеваний, в т. ч. тяжелого ОРДС при COVID-19. Сочетанное введение лейтрагина снижало экспрессию IL-6 в легких у животных с «цитокиновым штормом» в 4,7 раза (p<0,01), до уровня, незначительно превышающего наблюдаемый у интактных животных.

Молекулярные механизмы ингибирования лейтрагином транскрипции провоспалительных цитокинов IL-1β, TNF-α и IL-6, а также интерферонов I типа IFN-α и IFN-β не изучались в настоящей работе. Этот механизм известен для динорфина 1-6, эндогенного аналога лейтрагина, который ингибирует транслокацию фактора NF-κB в ядро и так препятствует транскрипции генов, кодирующих провоспалительные цитокины [6]. По аналогии с динорфином 1-6 эффекты лейтрагина также, по-видимому, связаны с подавлением активности NF-κB. Однако ингибирование NF-κB не объясняет подавления лейтрагином транскрипции интерферонов I типа. В данной модели «цитокиновый шторм» вызывался активацией рецептора TLR4 липополисахаридом. Известно, что TLR4 трансдуцирует сигналы по двум различным внутриклеточным путям [15]. Сигнальный путь TLR4/MyD88/NF-κB ведет к экспрессии IL-1β, TNF-α и IL-6, а сигнальный путь TLR4/TRIF/IRF3,7 ведет к транскрипции IFN-α и IFN-β. Поэтому универсальный ингибирующий эффект лейтрагина в отношении транскрипции цитокинов затрагивает не только транскрипционный фактор NF-κB и требует дополнительного изучения.

Согласно текущим представлениям, «цитокиновый шторм» начинается с активации рецепторов, распознающих патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP), к числу которых принадлежат TLR-рецепторы. Рецепторы TLR3, TLR8 и TLR9 распознают вирусную одноцепочечную РНК (ssRNA) и двухцепочечную РНК (dsRNA). Рецептор TLR4 распознает липополисахарид стенки грамотрицательных бактерий. Хотя TLR-рецепторы имеют различные структурные свойства и распознают разные паттерны, все они активируют канонический путь активации NF-κB, что является общим сигнальным событием, который отвечает за транскрипционную индукцию провоспалительных цитокинов, хемокинов и дополнительных медиаторов воспаления в различных типах врожденных иммунных клеток [11]. Опираясь на эту общность механизмов генерации «цитокинового шторма», можно полагать, что результаты, полученные в настоящем исследовании на экспериментальной модели ОРДС, индуцированной активацией рецептора TLR4 липополисахаридом, могут транслироваться на случаи активации «цитокинового шторма» при вирусных заболеваниях, в т. ч. при COVID-19.

Заключение

В настоящей работе впервые показано, что лейтрагин, представляющий собой стабилизированный аналог динорфина 1-6, подавляет экспрессию цитокинов IL-1β, TNF-α, IL-6, IFN-α и IFN-β в условиях «цитокинового шторма», вызванного интратрахеальным введением липополисахарида. Ингибирующий эффект лейтрагина реализуется на уровне активации транскрипции, о чем свидетельствуют результаты ПЦР в реальном времени. Сочетанное введение лейтрагина, внутримышечной инъекцией и ингаляцией, позволяет достичь большего эффекта ингибирования, чем только инъекцией. Главный результат настоящей работы состоит в том, что лейтрагин снижал уровни мРНК IL-6, ключевого цитокина в развитии респираторных заболеваний, в т. ч. тяжелого острого респираторного синдрома при COVID-19. Опираясь на общность механизмов генерации «цитокинового шторма», можно полагать, что результаты, полученные в настоящем исследовании на экспериментальной модели, особенно относящиеся к подавлению экспрессии IL-6, могут быть основанием для клинической проверки эффективности лейтрагина в подавлении «цитокинового шторма» при многих заболеваниях респираторной системы человека, в т. ч. при коронавирусной инфекции COVID-19.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Харитонов С.Ю. Нейровизуализация эффектов психоактивных средств посредством нормализации электрограмм головного мозга. *Биомедицина*. 2019;15(1):12–34. [Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Kharitonov S.Yu. Nejrovizualizaciya effektov psihoaktivnyh sredstv posredstvom normalizacii elektrogramm golovnogo mozga [Neuroimaging of the Effects of Psychoactive Substances by Means of Normalization of Brain Electrograms]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2019;15(1):12–34. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-1-12-34.
2. Помыткин И.А., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Нестеров М.С., Петрова Н.В. Модель фатального острого поражения легких и острого респираторного дистресс-синдрома. *Биомедицина*. 2020;16(4):24–33. [Pomytkin I.A., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Nesterov M.S., Petrova N.V. Model' fatal'nogo ostrogo porazheniya legkih i ostrogo respiratornogo distress-sindroma [A fatal model of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):24–33. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-24-33.
3. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях* / Под ред. Н.Н. Каркищенко и др. М.: Профиль-2С, 2010. 358 p. [*Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modelyam v biomedicinskih issledovaniyah [Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical research]*. Ed. by N.N. Karkischenko, et al. Moscow: Profil'-2S Publ., 2010. 358 p. (In Russian)].
4. Chen Y., Feng Z., Diao B., Wang R., Wang G., Wang C., et al. The Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Directly Decimates Human Spleens and Lymph Nodes. *MedRxiv*. 2020. DOI: 10.1101/2020.03.27.20045427.
5. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* 2020;1(11):827. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00827.
6. Fazalul Rahiman S.S., Morgan M., Gray P., Shaw P.N., Cabot P.J. Dynorphin 1-17 and Its N-Terminal Biotransformation Fragments Modulate Lipopolysaccharide-Stimulated Nuclear Factor-kappa B Nuclear Translocation, Interleukin-1beta and Tumor Necrosis Factor-alpha in Differentiated THP-1 Cells. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153005. DOI: 10.1371/journal.pone.0153005.
7. Gao Y.M., Xu G., Wang B., Liu B.C. Cytokine storm syndrome in coronavirus disease 2019: A narrative review. *J. Intern. Med.* 2020. DOI: 10.1111/joim.13144.
8. Giamarellos-Bourboulis E.J., Netea M.G., Rovina N., Akinosoglou K., Antoniadou A., Antonakos N., et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe*. 2020;27(6):992–1000.e3. DOI: 10.1016/j.chom.2020.04.009.
9. Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Polinova A.I., Drutskaya M.S. IL-6: Relevance for immunopathology of SARS-CoV-2. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020;53:13–24. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2020.05.009.
10. Henry B.M., de Oliveira M.H.S., Benoit S., Plebani M., Lippi G. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2020;58(7):1021–1028. DOI: 10.1515/cclm-2020-0369.
11. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2017;2:17023. DOI: 10.1038/sigtrans.2017.23.
12. Luo M., Liu J., Jiang W., Yue S., Liu H., Wei S. IL-6 and $CD8^+$ T cell counts combined are an early predictor of in-hospital mortality of patients with COVID-19. *JCI Insight.* 2020;5(13):139024. DOI: 10.1172/jci.insight.139024.
13. McGonagle D., Sharif K., O'Regan A., Bridgewood C. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmun. Rev.* 2020;19(6):102537. DOI: 10.1016/j.autrev.2020.102537.
14. Perricone C., Triggianese P., Bartoloni E., Cafaro G., Bonifacio A.F., Bursi R., et al. The anti-viral facet of anti-rheumatic drugs: Lessons from COVID-19. *J. Autoimmun.* 2020;111:102468. DOI: 10.1016/j.jaut.2020.102468.
15. Sin W.X., Yeong J.P., Lim T.J.F., Su I.H., Connolly J.E., Chin K.C. IRF-7 Mediates Type I IFN Responses in Endotoxin-Challenged Mice. *Front. Immunol.* 2020;11:640. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00640.
16. Vabret N., Britton G.J., Gruber C., Hegde S., Kim J., Kuksin M., et al. Sinai Immunology Review Project. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity*. 2020;52(6):910–941. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.05.002.
17. Wang F., Nie J., Wang H., Zhao Q., Xiong Y., Deng L., et al. Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J. Infect. Dis.* 2020;221(11):1762–1769. DOI: 10.1093/infdis/jiaa150.
18. Xu B., Fan C.Y., Wang A.L., Zou Y.L., Yu Y.H., He C., et al. Suppressed T cell-mediated immunity in patients with COVID-19: A clinical retrospective study in Wuhan, China. *J. Infect.* 2020;81(1):e51–e60. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.04.012.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Помыткин Игорь Анатольевич*, к.х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: ipomytkin@mail.ru

Igor A. Pomytkin*, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ipomytkin@mail.ru

Петрова Наталья Владимировна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

Nataliya V. Petrova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

Нестеров Максим Сергеевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: mdulya@gmail.com

Maxim S. Nesterov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: mdulya@gmail.com

Агельдинов Руслан Андреевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: ageldinov@gmail.com

Ruslan A. Ageldinov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ageldinov@gmail.com

Зотова Людмила Вадимовна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: vcentre4udes@gmail.com

Lyudmila V. Zotova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: vcentre4udes@gmail.com

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: heleko3@yandex.ru

Elena M. Koloskova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: heleko3@yandex.ru

Слободенюк Владимир Владимирович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: prof-v-iprim@mail.ru

Vladimir V. Slobodenyuk, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: prof-v-iprim@mail.ru

Скворцова Вероника Игоревна, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, Федеральное медико-биологическое агентство России;
e-mail: priemnaya@fmba.gov.ru

Veronika I. Skvortsova, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: priemnaya@fmba.gov.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author