

ИНГАЛЯЦИОННОЕ ВВЕДЕНИЕ ПРЕПАРАТА ЛЕЙТРАГИН МЫШАМ ЛИНИИ C57BL/6Y В МОДЕЛИ ОРДС ПОВЫШАЕТ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *SIRT1*

Н.С. Огнева*, Л.А. Таболякова, О.В. Алимкина, Н.В. Петрова

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

В настоящей работе описывается методика ингаляционного введения лекарственного средства «Лейтрагин» в лёгкие мышам линии C57BL/6Y в модели острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС). Ингаляции проводились с помощью компрессионного ингалятора OMRON COMP AIR NE-C24 Kids с насадкой для одномоментного введения нескольким мышам, разработанной в НЦБМТ ФМБА России. Моделирование ОРДС осуществлялось последовательным введением α -галактозилцерамида, ингаляционно в дозе 1 мкг/мышь, и через 24 ч — комбинации липополисахарида *E. coli* (LPS) в дозе 300 мкг/мышь. Через 30 мин после введения LPS проводилось ингаляционное введение мышам лекарственного средства «Лейтрагин» в опытной группе и физ. раствора в контрольной группе. После ингаляции проводился отбор биоматериала (тканей лёгкого) для оценки экспрессии гена *SIRT1* методом RT-PCR в качестве маркера успешного проникновения препарата в ткани лёгкого.

Ключевые слова: Лейтрагин, острый респираторный дистресс-синдром, ингаляционное введение, *SIRT1*, мыши C57BL/6Y

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Огнева Н.С., Таболякова Л.А., Алимкина О.В., Петрова Н.В. Ингаляционное введение препарата Лейтрагин мышам линии C57BL/6Y в модели ОРДС повышает уровень экспрессии гена *SIRT1*. *Биомедицина*. 2023;19(3):36–41. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-3-36-41>

Поступила 10.04.2023

Принята после доработки 27.07.2023

Опубликована 10.09.2023

INHALATION ADMINISTRATION OF LEYTRAGIN TO C57BL/6Y MICE IN AN ARDS MODEL INCREASES THE EXPRESSION LEVEL OF *SIRT1* GENE

Nastasya S. Ogneva*, Lidiya A. Taboyakova, Oksana V. Alimkina, Nataliya V. Petrova

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

This paper describes a technique for inhalation administration of Leutragin into the lungs of C57BL/6Y mice in a model of acute respiratory distress syndrome (ARDS). Inhalations were carried out using an OMRON COMP AIR NE-C24 Kids compression inhaler with a nozzle for simultaneous administration to several mice, developed at the Scientific Center of Biomedical Technologies of FMBA of Russia. Modeling of ARDS was carried out by sequential administration of α -galactosylceramide, inhaled at a dose of 1 μ g/mouse, and, following 24 hours, a combination of *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) at a dose of 300 μ g/mouse. Thirty minutes after the administration of LPS, inhalation administration of the Ley-

tragin drug was carried out to mice in the experimental group and normal saline in the control group. After inhalation, a biomaterial (lung tissue) was collected to evaluate the expression of the *SIRT1* gene by RT-PCR as a marker of successful penetration of the drug into the lung tissue.

Keywords: Leytragin, acute respiratory distress syndrome, inhalation administration, *SIRT1*, C57BL/6Y mice

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Ogneva N.S., Taboyakova L.A., Alimkina O.V., Petrova N.V. Inhalation Administration of Leytragin to C57BL/6Y Mice in an ARDS Model Increases the Expression Level of *SIRT1* Gene. *Journal Biomed.* 2023;19(3):36–41. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-3-36-41>

Submitted 10.04.2023

Revised 27.07.2023

Published 10.09.2023

Введение

Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) является тяжёлой патологией лёгких, вызванной прогрессирующим самоподдерживающимся воспалением, в котором участвуют различные клетки иммунной системы, экспрессирующие провоспалительные цитокины, такие как IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α [6]. В предыдущих работах было показано, что разработанный в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России пептидный лекарственный препарат «Лейтрагин», являющийся пептидным агонистом δ -опиоидных рецепторов, искусственным аналогом эндогенного опиоидного пептида динорфина 1–6, достоверно значимо снижает экспрессию вышеописанных цитокинов у мышей в модели ОРДС и, соответственно, способствует более быстрому разрешению воспалительного процесса в опытных группах [2]. Также была показана положительная связь уровня экспрессии HMGB1 и степени тяжести заболевания у человека и животных [4]. HMGB1 является белком из группы ядерных негистоновых белков HMG, секретируется активированными макрофагами и моноцитами в качестве цитокинового медиатора. Его высвобождение из ядра, а далее — во внеклеточную жидкость обусловлено повреждением ткани или некрозом. После высвобождения из клеток HMGB1 связывается с TLR4 и активирует каскад воспалительных реакций посредством выброса цитоки-

нов и хемокинов макрофагами, тем самым запуская «цитокиновый шторм» [4]. В нескольких работах было показано, что белок сиртуин-1, кодируемый геном *SIRT1*, регулирует индуцированные инфекцией провоспалительные цитокины и хемокины посредством ингибирования ядерной транслокации в цитоплазму и высвобождения HMGB1 за счёт удаления ацетильных групп из остатков лизина в присутствии НАД⁺ [5, 8–10]. Данный механизм ингибирования воспаления является перспективным для более глубокого и детального изучения путей развития инфекционных и неинфекционных воспалительных заболеваний, а также разработки отечественных лекарственных средств. Полученные ранее данные свидетельствуют о том, что препарат «Лейтрагин» достоверно снижает уровень выброса HMGB1 из ядра во внеклеточную жидкость в модели ОРДС на мышах линии C57BL/6Y, что может говорить о его непосредственном влиянии на экспрессию *SIRT1* [4]. Данная работа направлена на оценку экспрессии гена *SIRT1* у экспериментальных животных после ингаляционного введения «Лейтрагина». Путём измерения уровня экспрессии гена *SIRT1* в лёгких животных возможна валидация метода ингаляционных введений мышам, которые имеют физиологическое расхождение с человеком, а именно облигатное носовое дыхание, в то время как человек может дышать и ртом, и носом, а также не-

возможность объективно проверить факт вдыхания препарата мышами [1].

Целью работы явилась оценка методики ингаляционного введения лекарственного средства «Лейтрагин» в лёгкие мышам линии C57Bl/6Y в биомодели острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) по уровню экспрессии гена *SIRT1*.

Материалы и методы

Материалы

Реагенты были получены от Invitrogen или Sigma-Aldrich («Merck», США).

Животные

Исследования проводились в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России на мышах линии C57BL/6Y, самках в возрасте около 2,5 мес., средней массой $20 \pm 2,0$ г. Животные были получены из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.) и отобраны в эксперимент методом рандомизации. Мышей содержали в микроизоляторной системе Rair IsoSystem по пять особей в группе. Животные соответствовали категории улучшенных конвенциональных. Они 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 °С, относительной влажности 60–70% и искусственном освещении с циклом 12/12. Все эксперименты проводились в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов [3].

Модель острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС)

Животным моделировали острое поражение лёгких и респираторный дистресс-

синдром последовательным введением α -галактозилцерамида, ингаляционно в дозе 1 мкг/мышь, и через 24 ч — комбинации липополисахарида *E. coli* в дозе 300 мкг/мышь с добавлением 100 мкг/мышь мурамил-пептида и 10 мкл/мышь полного адьюванта Фрейнда, здесь и далее обозначаемой как «LPS», интратрахеально под инъекционным наркозом, состоящим из комбинации препаратов — Золетил 100 («Virbac», Франция) и Медитамидин («Api-San», Россия) в дозе 12,5 мг/кг и 1 мг/кг соответственно, а также сразу после проведения хирургической манипуляции вводился Антиседан («Orion Pharma», Финляндия), подкожно в дозе 2,5 мг/кг, что способствовало снятию нежелательных эффектов на организм мыши и быстрому выходу из наркоза.

Лечение

Лечение осуществлялось препаратом «Лейтрагин», мышцы были разделены на две группы по 6 особей в каждой. Через 30 мин после интратрахеального введения LPS опытной группе ингаляционно вводили «Лейтрагин» (в дозе 0,1 мг/кг массы тела, в объёме 100 мкл р-ра), контрольной группе ингаляционно вводили физ. р-р в объёме 100 мкл/мышь.

Ингаляционная установка

Ингаляции препаратом «Лейтрагин» и физ. р-ром проводились компрессорным ингалятором OMRON COMP AIR NE-C24 Kids с заданными характеристиками (размер частиц — приблизительно 3 мкм, производительность — около 0,3 мл/мин). Для более эффективного процесса в НЦБМТ ФМБА России была разработана насадка на ингалятор (рис. 1). Данная модификация позволяет проводить ингаляцию одномоментно нескольким животным с равной дозовой нагрузкой благодаря расположению фиксаторов на одинаковом расстоянии от источника подачи аэрозоля. Каждая мышь помещается в отдельный фиксатор таким образом, чтобы в общий резервуар попадала только

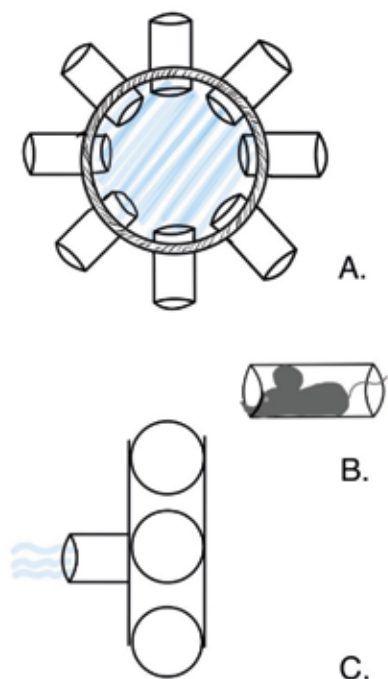


Рис. 1. Схематичное изображение ингаляционной камеры: А — вид сверху; В — нос мыши располагается внутри резервуара с подачей лекарственного средства; С — вид сбоку

Fig. 1. Schematic representation of the inhalation chamber: А — top view; В — the nose of the mouse is located inside the reservoir with the supply of the drug; С — side view

носовая часть мордочки. Одна сессия ингаляции по времени проводилась из расчёта объёма лекарственного препарата, залитого в резервуар, и производительности прибора (0,3 мл/мин).

Оценка экспрессии гена *SIRT1* методом RT-PCR

Через 30 мин после ингаляционного введения «Лейтрагина» производился отбор биологического материала (тканей лёгкого) для дальнейшего изучения экспрессии гена *SIRT1* методом RT-PCR у контрольной и опытной групп. Измерение осуществлялось с помощью детектирующего амплификатора CFX-96 («Bio-Rad», США) при использовании специфических прайме-

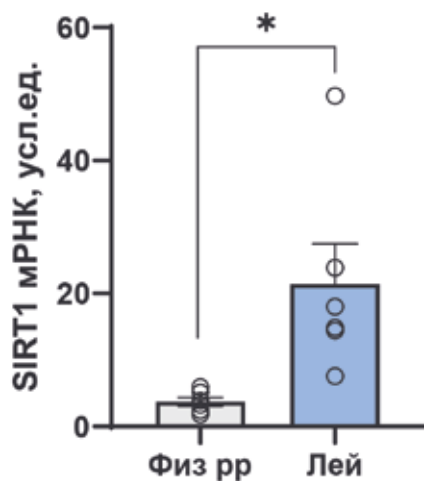


Рис. 2. Эффект ингаляционного введения «Лейтрагина» на экспрессию мРНК *SIRT1* в лёгких мышей C57BL/6Y с ОРДС по отношению к интактному контролю

Примечания: столбцы представляют собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего; * — $p < 0,05$ по сравнению с физраствором (непарный двусторонний t-тест Стьюдента).

Fig. 2. Effect of inhaled Leutragin on *SIRT1* mRNA expression in lungs of C57BL/6Y mice with ARDS relative to intact control

Notes: bars represent mean \pm standard error of the mean; * — $p < 0.05$ compared to normal saline (unpaired two-sided t-test of Student).

ров и флуоресцентных зондов. В качестве референсного гена был выбран ген «домашнего хозяйства» *GAPDH*. Результаты измерений выражались как кратность изменения экспрессии гена относительно экспрессии того же гена у контрольных животных.

Результаты исследований

Результаты представлены как относительные уровни транскрипции мРНК опытных животных по отношению к контролю (рис. 2). Данные, полученные на RT-PCR, удовлетворяли критерию Колмогорова — Смирнова на нормальность распределения. Уровень экспрессии *SIRT1* у опытной группы, получавшей лечение «Лейтрагином»

ингаляционно, значительно превосходит аналогичный в контрольной группе, получавшей физ. р-р.

Заключение

Предложенный метод ингаляционного введения мышам обеспечивает надёжную доставку исследуемого препарата в лёгкие, о чём свидетельствуют изменения экспрессии гена-мишени *SIRT1* в лёгочной ткани.

Нами было показано, что, несмотря на физиологические особенности облигатного носового дыхания мыши, ингаляционный метод введения препарата «Лейтрагин» является валидным, исследуемое лекарственное средство попадает в ткани лёгкого и может быть применено как адекватная модель лечения воспалительных заболеваний лёгких, а именно — острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каргопольцева Д.Р., Кательникова А.Е., Крышень К.Л., Гущин Я.А. Особенности дыхательной системы животных, используемых в доклинических исследованиях, которые необходимо учитывать при моделировании патологий лёгких. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2020;4:71–85. [Kargopol'tseva D.R., Katelnikova A.E., Kryshen K.L., Guschin Ya.A. Osobennosti dykhatel'noy sistemy zhivotnykh, ispol'zuemykh v doklinicheskikh issledovaniyakh, kotorye neobkhodimo uchityvat' pri modelirovaniy patologiy legkikh [Features of the respiratory system of animals used in pre-clinical studies which should be taken account of the modeling lung pathologies]. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* [Laboratory Animals for Science]. 2020;4:71–85. (In Russian)]. DOI: 10.29296/2618723X-2020-04-08.
2. 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. [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. Leytragin podavlyayet ekspressiyu tsitokinov, vlyuchaya interleykin-6, v modeli «tsitokinovogo shtorma» u myshey linii C57BL/6Y s indutsirovannym ostrym respiratornym distress-sindromom [Leutragin inhibits expression of cytokines, including interleukin-6, in a “cytokine storm” model in C57BL/6Y mice with induced acute respiratory distress syndrome]. *Biomedicina* [Journal Biomed]. 2020;16(4):34–43. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-34-43.
3. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. Под ред. Н.Н. Каркищенко и др. М.: Профиль-2С, 2010:358. [*Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i alternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh* [Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical research]. Ed. by N.N. Karkischenko, et al. Moscow: Profil'-2S Publ., 2010:358. (In Russian)].
4. Karkischenko V.N., Skvortsova V.I., Gasanov M.T., Fokin Y.V., Nesterov M.S., Petrova N.V., Alimkina O.V., Pomytkin I.A. Inhaled [D-Ala2]-dynorphin 1-6 prevents hyperacetylation and release of high mobility group box 1 in a mouse model of acute lung injury. *J. Immunol. Res.* 2021;2021:4414544. DOI: 10.1155/2021/4414544.
5. Rahman I., Kinnula V.L., Gorbunova V., Yao H. SIRT1 as a therapeutic target in inflammaging of the pulmonary disease. *Prev. Med.* 2012;54(Suppl):S20–28. DOI: 10.1016/j.ypmed.2011.11.014.
6. Sinha P., Bos L.D. Pathophysiology of the acute respiratory distress syndrome: Insights from clinical studies. *Crit. Care Clin.* 2021;37(4):795–815. DOI: 10.1016/j.ccc.2021.05.005.
7. Vijayakumar E.C., Bhatt L.K., Prabhavalkar K.S. High mobility group box-1 (HMGB1): A potential target in therapeutics. *Curr. Drug Targets.* 2019;20(14):1474–1485. DOI: 10.2174/1389450120666190618125100.
8. Wang Z., Guo W., Yi F., Zhou T., Li X., Feng Y., Guo Q., Xu H., Song X., Cao L. The regulatory effect of SIRT1 on extracellular microenvironment remodeling. *Int. J. Biol. Sci.* 2021;17(1):89–96. DOI: 10.7150/ijbs.52619.
9. Wei L., Zhang W., Li Y., Zhai J. The *SIRT1*-*HMGB1* axis: Therapeutic potential to ameliorate inflammatory responses and tumor occurrence. *Front Cell Dev. Biol.* 2022;10: 986511. DOI: 10.3389/fcell.2022.986511.
10. Zhang Y.F., Wei W., Li L., Tu G., Zhang Y., Yang J., Xing Y. SIRT1 and HMGB1 regulate the AGE-induced pro-inflammatory cytokines in human retinal cells. *Clin. Lab.* 2015; 61(8):999–1008. DOI: 10.7754/clin.lab.2015.150141.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Огнева Настасья Сергеевна*, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

[e-mail: ognevanastya@mail.ru](mailto:ognevanastya@mail.ru)

Nastasya S. Ogneva*, Scientific Center of Bio-
medical Technologies of the Federal Medical and
Biological Agency of Russia;

[e-mail: ognevanastya@mail.ru](mailto:ognevanastya@mail.ru)

Таболякова Лидия Александровна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

[e-mail: lida-vet@mail.ru](mailto:lida-vet@mail.ru)

Lidiya A. Taboyakova, Scientific Center of Bio-
medical Technologies of the Federal Medical and
Biological Agency of Russia;

[e-mail: lida-vet@mail.ru](mailto:lida-vet@mail.ru)

Алимкина Оксана Владимировна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

[e-mail: alimkina@scbmt.ru](mailto:alimkina@scbmt.ru)

Oksana V. Alimkina, Scientific Center of Biomed-
ical Technologies of the Federal Medical and Bio-
logical Agency of Russia;

[e-mail: alimkina@scbmt.ru](mailto:alimkina@scbmt.ru)

Петрова Наталья Владимировна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

[e-mail: m-sklad@yandex.ru](mailto:m-sklad@yandex.ru)

Nataliya V. Petrova, Scientific Center of Biomed-
ical Technologies of the Federal Medical and Bio-
logical Agency of Russia;

[e-mail: m-sklad@yandex.ru](mailto:m-sklad@yandex.ru)

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author