



ЭФФЕКТЫ ТОЦИЛИЗУМАБА, АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-6, НА ЭКСПРЕССИЮ ЦИТОКИНОВ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЖИВОТНЫХ В МОДЕЛИ ФАТАЛЬНОГО ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА

В.Н. Каркищенко, И.А. Помыткин^{*}, Н.В. Петрова, С.В. Максименко, М.М. Скрипкина, А.И. Левашова, С.Е. Деньгина

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

Настоящая работа посвящена изучению эффектов тоцилизумаба, моноклонального антитела к рецепторам интерлейкина-6 (IL-6), на экспрессию цитокинов и выживаемость животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), характеризующейся высокой смертностью и повышенной продукцией IL-6 в легких. Экспрессию интерлейкина-1 β (IL-1 β), 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. Продукцию цитокинов оценивали методом иммуноферментного анализа. Тоцилизумаб не влиял на экспрессию исследованных цитокинов в легких животных с ОРДС, но менял профили их высвобождения в легких. Острое многократное повышение уровней IL-6 в легких наблюдалось в первые два часа после введения тоцилизумаба с последующим их снижением до низких значений, близких к наблюдаемым у интактных животных. Тоцилизумаб не снижал смертность животных с ОРДС по сравнению с нелечеными животными с ОРДС. Таким образом, ингибирование только сигнального пути рецептора IL-6 не обеспечивает эффективного решения проблемы снижения смертности от ОРДС, связанного с развитием «цитокинового шторма».

Ключевые слова: тоцилизумаб, острый респираторный дистресс-синдром, мыши линии C57Bl/6Y, «цитокиновый шторм», интерлейкин-6, выживаемость, Каплан — Мейер, COVID-19

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Петрова Н.В., Максименко С.В., Скрипкина М.М., Левашова А.И., Деньгина С.Е. Эффекты тоцилизумаба, антагониста рецептора интерлейкина-6, на экспрессию цитокинов и выживаемость животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома. *Биомедицина*. 2020;16(4):60–70. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-60-70>

Поступила 29.07.2020

Принята после доработки 08.09.2020

Опубликована 26.10.2020

EFFECTS OF TOCILIZUMAB, AN INTERLEUKIN-6 RECEPTOR ANTAGONIST, ON CYTOKINE EXPRESSION AND ANIMAL SURVIVAL IN A MODEL OF FATAL ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

Vladislav N. Karkischenko, Igor A. Pomytkin^{*}, Nataliya V. Petrova, Sergey V. Maksimenko, Mariya M. Skripkina, Anna I. Levashova, Svetlana E. Dengina

*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*

This study aims to investigate effects of tocilizumab, a monoclonal antibody to interleukin-6 (IL-6) receptors, on cytokine expression and animal survival in a model of fatal acute respiratory distress syndrome (ARDS) characterized by high mortality rates and increased IL-6 production in the lungs. The expression of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumour necrosis factor (TNF- α) and interferons α (IFN- α) and β (IFN- β) in the lungs was assessed by real-time PCR. Cytokine production was assessed by enzyme immunoassay. Although tocilizumab did not affect the expression of the studied cytokines in the lungs of animals with ARDS, it changed the profiles of their release. An acute multifold increase in the levels of IL-6 in the lungs was observed in the first two hours after the administration of tocilizumab, followed by a decrease of IL-6 to lower values similar to those observed in intact animals. Tocilizumab did not reduce mortality in treated animals with ARDS compared to those without treatment. Thus, the inhibition of the IL-6 receptor signaling pathway alone does not provide an effective solution to the problem of reducing mortality from ARDS associated with the development of a “cytokine storm”.

Keywords: tocilizumab, acute respiratory distress syndrome, C57Bl/6Y mice, “cytokine storm”, interleukin-6, survival, Kaplan — Meier, COVID-19

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

For citation: Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Petrova N.V., Maksimenko S.V., Skripkina M.M., Levashova A.I., Dengina S.E. Effects of Tocilizumab, an Interleukin-6 Receptor Antagonist, on Cytokine Expression and Animal Survival in a Model of Fatal Acute Respiratory Distress Syndrome. *Journal Biomed.* 2020;16(4):60–70. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-60-70>

Submitted 29.07.2020

Revised 08.09.2020

Published 26.10.2020

Введение

Интерлейкин-6 (IL-6) представляет собой небольшой цитокин массой 21 кДа, который преимущественно вырабатывается клетками врожденной иммунной системы. Наряду с другими провоспалительными цитокинами, такими как интерлейкин-1 β (IL-1 β) и фактор некроза опухоли α (TNF- α), IL-6 участвует в регуляции острой фазы иммунного ответа. Повышенные уровни IL-6 в сыворотке крови и бронхоальвеолярном лаваже наблюдаются у пациентов при воспалительных респираторных заболеваниях, в т. ч. при астме [4, 5], хрониче-

ской обструктивной болезни легких [4, 6], пневмониях различной этиологии [7–11] и идиопатическом фиброзе легких [12]. Высокие уровни IL-6 часто наблюдаются у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19, которая вызывается вирусом SARS-CoV-2 и характеризуется диффузным альвеолярным повреждением легких, тяжелым острым респираторным синдромом и микротромбозами [10]. Повышенные уровни IL-6 предсказывают более тяжелое течение заболевания, а также необходимость интенсивной терапии [13] и повышенную внутрибольничную

смертность у пациентов с COVID-19 [14]. Недавний метаанализ, включающий в совокупности 18 исследований COVID-19, 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 [15]. В целом многочисленные исследования указывают на роль IL-6 как активного патогенетического фактора в развитии тяжелых форм респираторных заболеваний, в т. ч. тяжелого острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) при COVID-19.

Антагонисты интерлейкина-6, такие как специфические моноклональные антитела к белку IL-6 (силтуксимаб) и рецептору IL-6 (тоцилизумаб и сарилумаб), рассматриваются в качестве возможных средств для решения проблемы IL-6 при COVID-19.

Тоцилизумаб представляет собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело к человеческому рецептору интерлейкина-6 подкласса иммуноглобулина IgG1 с молекулярной массой приблизительно 148 кДа, которое связывается как с мембранными (mIL-6R), так и с растворимыми (sIL-6R) рецепторами интерлейкина-6 (IL-6R). По некоторым предварительным данным, тоцилизумаб снижал тяжесть заболевания COVID-19 и смертность в группе пациентов с COVID-19 [16], однако многоцентровые клинические испытания не подтвердили его эффективность в снижении смертности от COVID-19.

Целью настоящей работы было исследование эффектов тоцилизумаба, антагониста рецептора интерлейкина-6, на экспрессию цитокинов и выживаемость животных в модели фатального ОРДС, которая характеризуется высокой смертностью и повышенной продукцией IL-6 в легких.

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 $20 \pm 2,0$ 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 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, а также в соответствии с Приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» [1–3].

Модель острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС)

Животным индуцировали острое поражение легких и респираторный дистресс-синдром последовательным введением α -галактозилцерамида ингаляционно в дозе 1 мкг/мышь и, через 24 ч, липополисахара

рида *E. coli* в количестве 300 мкг/мышь с добавлением 100 мкг/мышь мурамилпептида и 10 мкл/мышь полного адьюванта Фрейнда (LPS), интратрахеально под общим наркозом.

Введение препаратов

Исследование выживаемости. Для оценки эффектов тоцилизумаба на выживаемость животных мыши были разделены на 3 группы по 20 особей в каждой. Животным контрольной группы вводили однократно подкожно физ. р-р («Saline»). Животным двух опытных групп индуцировали ОРДС. Через 30 мин после индукции ОРДС животные получили однократно подкожно физ. р-р (группа «LPS») или тоцилизумаб в дозе 28 мг/кг (группа «LPS+TZM»).

Исследование экспрессии цитокинов. Для оценки эффектов тоцилизумаба на экспрессию цитокинов в легких мыши C57Bl/6Y были разделены на 4 группы по 5 особей в каждой. Через 3 ч после индукции ОРДС животные первой группы (самцы) и второй группы (самки) получили однократно подкожно физ. р-р, а животные третьей и четвертой групп, самцы и самки соответственно, получили однократно подкожно тоцилизумаб в дозе 28 мг/кг.

Исследование высвобождения цитокинов. Для оценки эффектов тоцилизумаба на высвобождение цитокинов в легких мыши были отобраны в 3 группы по 3–5 особей. Через 30 мин после индукции ОРДС животные получили однократно подкожно инъекцию физ. р-ра (группа «LPS») или тоцилизумаба в дозе 28 мг/кг (группа «LPS+TZM»). Интактные животные не подвергались какому-либо вмешательству (группа «Int»).

Выделение РНК из биоматериала

Животных декапитировали, легкие извлекали и гомогенизировали с использованием прибора для автоматической гомо-

генизации клеток и тканей MagNa Lyser («Roche»). Из полученного материала легких выделяли РНК с помощью набора для выделения РНК-экстракта («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) с использованием 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.

Выделение биоматериала и измерение цитокинов

Животных декапитировали, легкие извлекали и гомогенизировали с использованием прибора для автоматической гомогенизации клеток и тканей MagNa Lyser («Roche»). Уровни цитокинов определяли в сыворотке крови и в водном экстракте лёгочной ткани. Измерения проводились на мультиплексном ридере Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex Reader («Bio-Rad»),

Таблица. Олигонуклеотидные праймеры и зонды ПЦП-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
<i>IL1B</i>	F	5'-GAGAACCAAGCAACGACAAA-3'
	R	5'-CTTGTGAAGACAAAACCGTT-3'
	Z	ROX-TAATGAAAGACGGCACACCCACCCT-BHQ2
<i>IL6</i>	F	5'-ATGAAGTTCCTCTCTGCAAG-3'
	R	5'-GTGTAATTAAGCCTCCGACT-3'
	Z	ROX-CTTCTTGGGACTGATGCTGGTGACA-BHQ-2
<i>TNFA</i>	F	5'-TCTGTCTCTCACCTGCTCTG-3'
	R	5'-GGTTCTCAGATGTGTCCACGA-3'
	Z	ROX-GAATGGATGGGCTACATAAGTTACG-BHQ2
<i>IFNA</i>	F	5'-ATCAAACAGCCAGAACACC-3'
	R	5'-GGCTTTCTTGTCCCTGAGGT-3'
	Z	ROX-GGCTCTGTGCTTTCCCTGATGGTTTT-BHQ2
<i>IFNB</i>	F	5'-CACCACAGCCCTCTCCATCA-3'
	R	5'-GCATCTTCTCCGTCATCC-3'
	Z	ROX-GGCTCTGTGCTTTCCCTGATGGTTTT-BHQ2

Примечание: F — прямой праймер, R — обратный праймер, Z — зонд ПЦП-системы.

Note: F is a direct primer, R is a reverse primer, Z is a PCR probe.

SN: 12250707) с использованием стандартной коммерчески доступной панели (Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Th17 Panel A 6-Plex #M6000007NY). Экстракт лёгочной ткани, стабилизированный ЭДТА, вносили в лунки планшета. Дальнейшие операции выполняли в соответствии с протоколом производителя. Анализ полученных данных и сравнение содержания исследованных цитокинов в разных группах проводилось в программе Bio-Plex Data Pro (версия 1.0.0.06) фирмы «Bio-Rad» (США).

Статистическая обработка

Статистический анализ проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с последующим тестом Бонферрони (Bonferroni's test) для множественного сравнения различий между группами с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Для анализа кривых выживания использовался метод Каплана — Мейера с оценкой коэффициентов риска (hazard ratio) по Мантелю — Ханзелу. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Эффект тоцилизумаба

на выживаемость животных с ОРДС

Для того чтобы оценить эффект тоцилизумаба на выживаемость животных в условиях «цитокинового шторма» и ОРДС, животным после индукции ОРДС вводили однократно подкожно физ. р-р (группа «LPS») или тоцилизумаб (группа «LPS+TZM»), как описано в разделе «Материалы и методы». В контрольной группе животные без ОРДС получили однократно подкожно физ. р-р (группа «Saline»). Выживаемость животных отслеживалась в течение 456 ч (19 сут), начиная с момента индукции ОРДС. Результаты представлены на рис. 1 в виде кривых выживания Каплана — Мейера.

В контрольной группе за весь период наблюдений не погибло ни одного животного. Анализ кривых выживания показывает, что индукция ОРДС статистически значимо вызвала гибель животных (LPS; логранговый тест Мантеля — Кокса; $p < 0,0001$) по сравнению с контролем (Saline), причем 50% животных с ОРДС погибли в течение первых 72 ч. Сравнение кривых выживания животных с ОРДС, получивших тоцили-

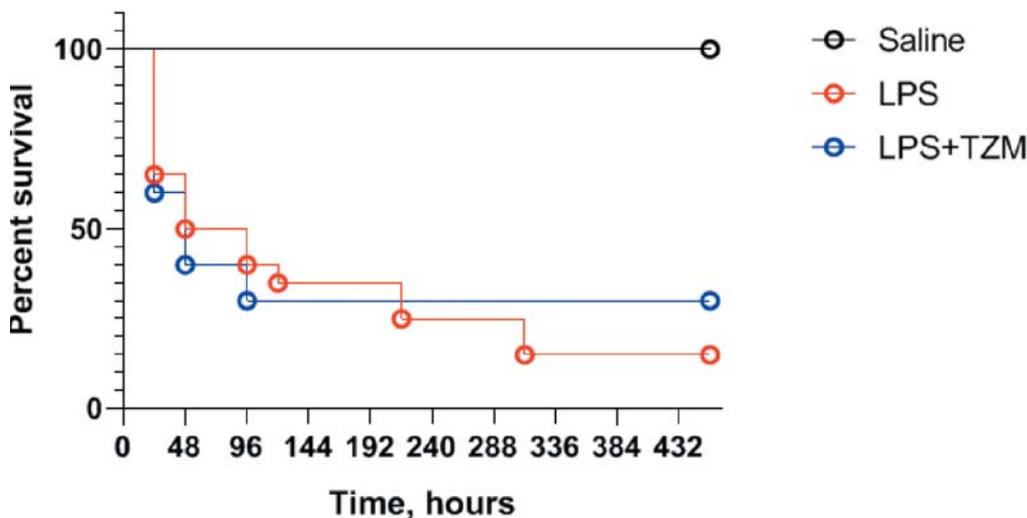


Рис. 1. Кривые выживания Каплана — Мейера для мышей с острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС). Процент выживания (percent survival) животных без ОРДС, получивших однократно подкожно физ. р-р (Saline), а также животных с ОРДС, получивших однократно подкожно физ. р-р (LPS) или тоцилизумаб (LPS+TZM).

Fig. 1. Kaplan — Meyer survival curves for mice with acute respiratory distress syndrome (ARDS). Survival rates of animals without ARDS having received a single subcutaneous injection of saline and those with ARDS having received a single subcutaneous injection of saline (LPS) or tocilizumab (LPS+TZM).

зумаб (LPS+TZM) или физ. р-р (LPS), не выявило статистически значимого отличия между этими группами (логранговый тест Мантеля — Кокса, $p=0,65$).

Таким образом, тоцилизумаб не влиял на выживаемость животных с ОРДС.

Эффект тоцилизумаба на экспрессию цитокинов в легких животных с ОРДС

Для того чтобы оценить эффекты тоцилизумаба на экспрессию цитокинов в легких в условиях «цитокинового шторма» и ОРДС, животным (самцы и самки) после индукции ОРДС вводили однократно подкожно физ. р-р (группа «LPS») или тоцилизумаб (группа «LPS+TZM»), как описано в разделе «Материалы и методы». Спустя 3 ч легкие извлекли и методом ПЦР в реальном времени измерили уровни мРНК для IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- α и IFN- β . Результаты представлены на рис. 2 как среднее значение \pm ошибка средне-

го кратного изменения уровней мРНК отдельных цитокинов в легких относительно наблюдаемого у нелеченых животных с ОРДС.

Двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) результатов с последующим тестом Бонферрони для множественных сравнений показал, что введение тоцилизумаба не привело к статистически значимым изменениям профилей экспрессии всех исследованных цитокинов у животных с ОРДС. Статистически значимых основных эффектов тоцилизумаба в зависимости от пола животных не было обнаружено в отношении экспрессии IL-1 β ($F_{1,16}=0,4003$, $p=0,536$ и $F_{1,16}=0,3824$, $p=0,545$ соответственно), TNF- α ($F_{1,16}=1,474$, $p=0,242$ и $F_{1,16}=0,2752$, $p=0,607$ соответственно), IL-6 ($F_{1,16}=1,349$, $p=0,2624$ и $F_{1,16}=0,027$, $p=0,8728$ соответственно), IFN- α ($F_{1,16}=1,680$, $p=0,2133$ и $F_{1,16}=2,919$, $p=0,1069$ соответственно)

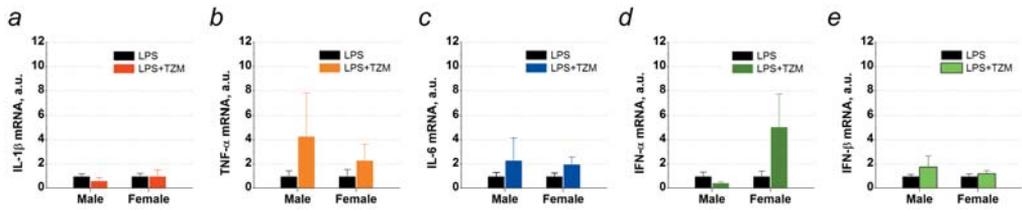


Рис. 2. Эффекты тоцилизумаба на экспрессию цитокинов в легких мышей с острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС). Кратное изменение уровней мРНК (mRNA) цитокинов (a) IL-1β, (b) TNF-α, (c) IL-6, (d) IFN-α и (e) IFN-β в легких самцов (male) и самок (female), получивших инъекцию тоцилизумаба подкожно (LPS+TZM) относительно уровней мРНК у нелеченых животных с ОРДС, получивших инъекцию физ. р-ра подкожно (LPS).
Fig. 2. Effects of tocilizumab on cytokine expression in the lungs of mice with acute respiratory distress syndrome (ARDS). Multifold changes in the mRNA levels of IL-1β, (b) TNF-α, (c) IL-6, (d) IFN-α and (e) IFN-β cytokines (a) in the lungs of males and females having received a subcutaneous injection of tocilizumab (LPS+TZM) compared to the mRNA levels in the lungs of untreated animals with ARDS having received a subcutaneous injection of saline (LPS).

и IFN-β ($F_{1,16}=0,9082$, $p=0,3548$ и $F_{1,16}=0,3047$, $p=0,5886$ соответственно). Тест Бонферрони для множественных сравнений также не выявил статистически значимых отличий между группами.

Таким образом, тоцилизумаб не влиял на экспрессию всех исследованных цитокинов в легких животных с ОРДС.

Эффект тоцилизумаба на высвобождение цитокинов в легких при ОРДС

Для того чтобы оценить эффекты тоцилизумаба на высвобождение цитокинов в легких в условиях «цитокинового шторма» и ОРДС, животные через 30 мин после индукции ОРДС получили однократно подкожно инъекцию физ. р-ра (группа «LPS») или тоцилизумаба (группа «LPS+TZM»), как описано в разделе «Материалы и методы». Интактные животные не подвергались какому-либо вмешательству (группа «Int»). Уровни цитокинов IL-1β, TNF-α, IL-6 и интерферона-γ (IFN-γ) в сыворотке крови и легких измерили через 2, 7 и 12 ч после индукции ОРДС, как описано в разделе «Материалы и методы». Результаты представлены как среднее значение уровней цитокинов после индукции ОРДС в сыворотке крови и гомогенатах легких животных на рис. 3 и 4 соответственно.

Рис. 3 показывает, что индукция ОРДС не привела к существенным изменениям профиля цитокинов в сыворотке крови по сравнению с интактным контролем. Инъекция тоцилизумаба также не влияла на уровни цитокинов в сыворотке крови животных с ОРДС.

Рис. 4 показывает, что уже через 2 ч после индукции ОРДС наблюдалось существенное 16-кратное повышение уровней IL-6 в легких по сравнению с интактным контролем, но при этом не было изменений уровней остальных исследованных цитокинов. Однократная подкожная инъекция тоцилизумаба привела к изменению профиля IL-6 в легких животных с ОРДС. В первые 2 ч после введения тоцилизумаба вызвал острое 48-кратное временное повышение уровней IL-6 в легких животных с ОРДС по сравнению с интактным контролем. Однако уже к 12-ти ч после введения тоцилизумаба наблюдалось резкое снижение уровней IL-6 до значений, наблюдаемых у интактных животных. Сходная картина временного острого повышения уровней IL-1β в 3,5 раза, TNF-α в 3,3 раза и IFN-γ в 1,9 раза с последующим падением до низких значений наблюдалась после введения тоцилизумаба в легких у животных с ОРДС.

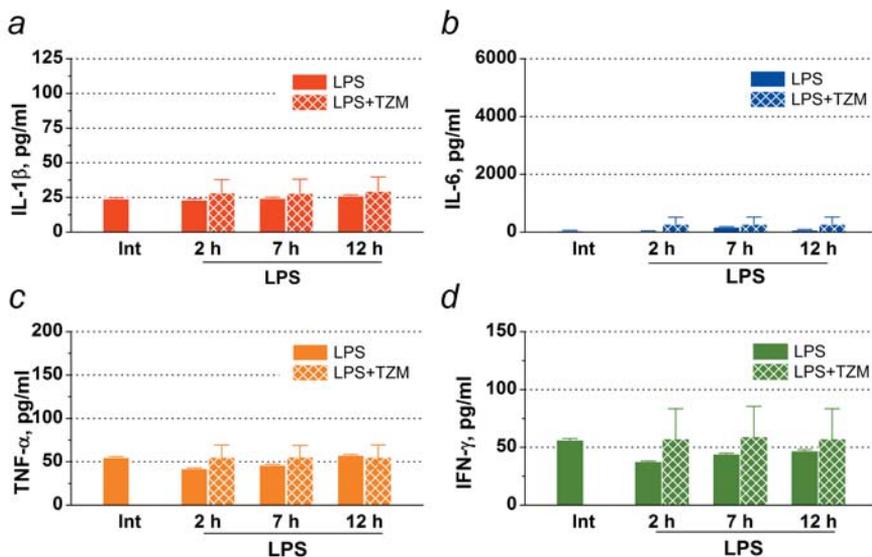


Рис. 3. Эффект однократной подкожной инъекции тоцилизумаба на уровни цитокинов (а) IL-1β, (б) IL-6, (с) TNF-α и (д) IFN-γ в сыворотке крови мышей с ОРДС. Int — интактные животные; LPS — животные с ОРДС, получившие инъекцию физ. р-ра; LPS+TzM — животные с ОРДС, получившие инъекцию тоцилизумаба.
Fig. 3. Effect of a single subcutaneous injection of tosilizumab on the levels of (a) IL-1β, (b) IL-6, (c) TNF-α and (d) IFN-γ in the blood serum of mice with ARDS. Int — intact animals; LPS — animals with ARDS having received saline injections; LPS+TzM — ARDS animals administered with tosilizumab.

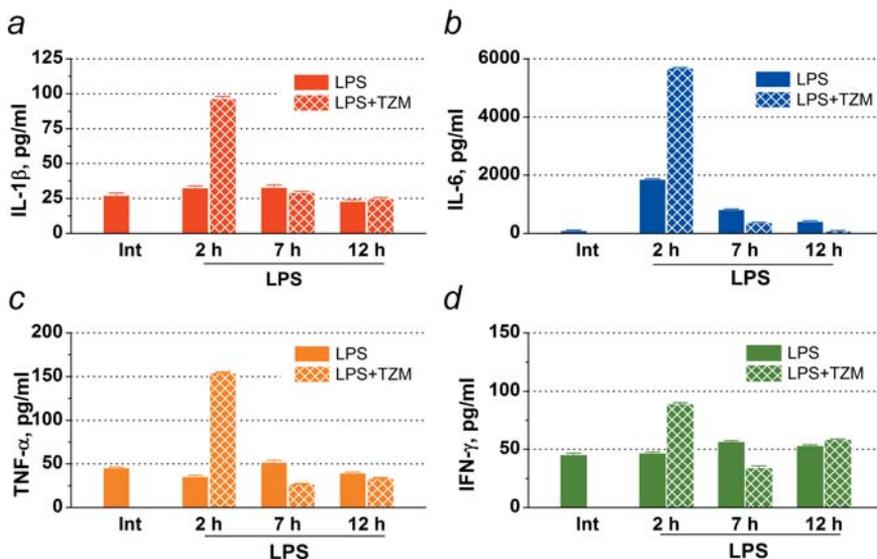


Рис. 4. Эффект однократной подкожной инъекции тоцилизумаба на уровни цитокинов (а) IL-1β, (б) IL-6, (с) TNF-α и (д) IFN-γ в легких мышей с ОРДС. Int — интактные животные; LPS — животные с ОРДС, получившие инъекцию физ. р-ра; LPS+TzM — животные с ОРДС, получившие инъекцию тоцилизумаба.
Fig. 4. Effect of a single subcutaneous injection of tosilizumab on the levels of (a) IL-1β, (b) IL-6, (c) TNF-α и (д) IFN-γ in the lungs of mice with ARDS. Int — intact animals; LPS — animals with ARDS having received saline injections; LPS+TzM — ARDS animals administered with tosilizumab.

Обсуждение результатов

Главный результат настоящей работы состоит в том, что ингибирования сигнализации только одного рецептора IL-6 оказалось недостаточным для снижения смертности животных с ОРДС в условиях «цитокинового шторма».

В настоящей работе были исследованы эффекты тоцилизумаба, антагониста рецептора интерлейкина-6, на экспрессию цитокинов и выживаемость животных с фатальным ОРДС, для которого характерна высокая смертность и повышенная продукция цитокинов в легких, преимущественно IL-6. Тоцилизумаб не влиял на уровни мРНК цитокинов IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- α и IFN- β в легких животных с ОРДС, измеренные методом ПЦР в реальном времени. В то же время тоцилизумаб влиял на высвобождение IL-6, вызывая многократное кратковременное повышение и последующее резкое снижение уровней IL-6 в легких до низких значений, наблюдаемых у интактных животных. Эта двухфазная картина изменения профилей IL-6 в легких никак не проявлялась в сыворотке крови животных с ОРДС, из чего следует, что мониторинг уровней цитокинов в крови при ОРДС не отражает реальных процессов высвобождения цитокинов, происходящих в легких. Даже 48-кратное повышение IL-6 в легких не привело к заметному изменению уровней IL-6 в сыворотке крови.

Обнаруженный нами эффект временного острого повышения IL-6 в легких животных с ОРДС при введении тоцилизумаба, по-видимому, частично связан с блокированием рецепторов IL-6 тоцилизумабом и снижением клиренса IL-6 через процессы связывания с рецептором и интернализации рецепторных комплексов. Однако одновременное острое повышение в легких уровней других провоспалительных цитокинов (IL-1 β и TNF- α) после введения тоцилизумаба указывает на сложный кооперативный ответ иммунной системы при блокировании рецептора IL6R и на недостаточность ингибирования только одного сигнального пути для получения терапевтического эффекта в условиях «цитокинового шторма».

Заключение

В настоящей работе показано, что блокирование сигнализации рецепторов интерлейкина-6 тоцилизумабом — антагонистом как мембранных, так и растворимых рецепторов IL-6 — не снижает смертности животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома.

Таким образом, ингибирование только сигнального пути рецептора IL6R не обеспечивает эффективного решения проблемы снижения смертности от ОРДС, связанного с развитием «цитокинового шторма».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко Н.Н. *Альтернативы биомедицины. Т. 1. Основы биомедицины и фармако-моделирования*. М.: Изд-во ВПК, 2007. 320 с. [Karkischenko N.N. *Alternativy biomeditsiny. T. 1. Osnovy biomeditsiny i farmakomodelirovaniya [Biomedicine alternatives. Vol. 1. Fundamentals of biomedicine and pharmacomodeling]*. Moscow: Izdatel'stvo VPK, 2007. 320 p. (In Russian)].
2. Каркищенко Н.Н. *Основы биомоделирования*. М.: Межакадемическое изд-во ВПК, 2004. 607 с. [Karkischenko N.N. *Osnovy biomodelirovaniya [Basics of biomodeling]*. Moscow: Mezhakademicheskoye Izdatel'stvo VPK, 2004. 607 p. (In Russian)].
3. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях* / Под ред. Н.Н. Каркищенко и др. М.: Профиль-2С, 2010. 358 с. [*Rukovodstvo po laboratornym zhitotnym i alternativnym modelyam v biomeditsinskikh 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)].

- Rincon M., Irvin C.G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 2012;8(9):1281–1290.
- Yokoyama A., Kohno N., Fujino S., Hamada H., Inoue Y., Fujioka S., et al. Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995;151(5):1354–1358.
- Celli B.R., Locantore N., Yates J., Tal-Singer R., Miller B.E., Bakke P., et al. ECLIPSE Investigators. Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012;185(10):1065–1072.
- Bordon J., Aliberti S., Fernandez-Botran R., Uriarte S.M., Rane M.J., Duvvuri P., et al. Understanding the roles of cytokines and neutrophil activity and neutrophil apoptosis in the protective versus deleterious inflammatory response in pneumonia. *Int. J. Infect. Dis.* 2013;17(2):e76–83.
- Bacci M.R., Leme R.C., Zing N.P., Murad N., Adami F., Hinnig P.F., et al. IL-6 and TNF- α serum levels are associated with early death in community-acquired pneumonia patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2015;48(5):427–432.
- Andrijevic I., Matijasevic J., Andrijevic L., Kovacevic T., Zaric B. Interleukin-6 and procalcitonin as biomarkers in mortality prediction of hospitalized patients with community acquired pneumonia. *Ann. Thorac. Med.* 2014;9(3):162–167.
- 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.
- Liu B., Li M., Zhou Z., Guan X., Xiang Y. Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)? *J. Autoimmun.* 2020;111:102452.
- Papiris S.A., Tomos I.P., Karakatsani A., Spathis A., Korbila I., Analitis A., et al. High levels of IL-6 and IL-8 characterize early-on idiopathic pulmonary fibrosis acute exacerbations. *Cytokine.* 2018;102:168–172.
- 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.
- 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):e139024.
- 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.
- Zhang C., Wu Z., Li J.W., Zhao H., Wang G.Q. Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020;55(5):105954.

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

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

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

Максименко Сергей Васильевич, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: vx136@rambler.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

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

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

Sergey V. Maksimenko, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: vx136@rambler.ru

Скрипкина Мария Михайловна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентст-
ва России»;
e-mail: skripkina.fmba@gmail.com

Левашова Анна Игоревна, к.х.н., ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентст-
ва России»;
e-mail: annalevashova3@gmail.com

Деньгина Светлана Евгеньевна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентст-
ва России»;
e-mail: gloria-69@list.ru

Mariya M. Skripkina, Scientific Center of
Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
e-mail: skripkina.fmba@gmail.com

Anna I. Levashova, Cand. Sci. (Chem.), Scientific
Center of Biomedical Technologies of the Federal
Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: annalevashova3@gmail.com

Svetlana E. Dengina, Scientific Center of
Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
e-mail: gloria-69@list.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author