

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2074-5982 (print)

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) 16

2020

4





**Вероника
Игоревна
СКВОРЦОВА**



Выдающийся врач-невролог и клинический нейрофизиолог, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук отмечает свой очередной юбилей. В такие дни принято подводить итоги пройденного пути, строить планы на будущее.

Жизнь Вероники Игоревны наполнена многими важными для неё самой, для отечественной медицины и здравоохранения, для нашей страны событиями. Рожденной в семье потомственных врачей, судьба предопределила быть ей всегда впереди, быть первой. Окончив школу с золотой медалью, медицинский институт с отличием, досрочно завершив аспирантуру с защитой кандидатской диссертации, она уже через пять лет становится доктором медицинских наук, став, по данным авторитетных источников, самой молодой в мире женщиной с высшей ученой степенью. Важно, что напряженная научно-исследовательская работа по изучению и глубокому осмыслению структурно-функциональной организации коры и в целом нейрофизиологии головного мозга сочеталась с признанием Вероники Игоревны как практического невролога, руководителя одной из первых в России нейрореанимационной службы.

Вероника Игоревна Скворцова в 1997 году возглавила созданную ею первую кафедру фундаментальной и клинической неврологии и нейрохирургии, а в дальнейшем — первый Научно-исследовательский институт инсульта Российского государственного медицинского университета. Она является автором основополагающих работ по неврологии, диагностике и лечению тяжелейших нарушений функций центральной нервной системы, создателем научной школы инсультологии. Блестящий ученый и педагог, Вероника Игоревна по праву пользуется заслуженным авторитетом и уважением коллег и её многочисленных учеников.

С 2008 года Вероника Игоревна в должности заместителя Министра, а с 2012 года — в статусе Министра здравоохранения, вводит в действие программы «Земский доктор», «Бережливая поликлиника», возглавляет Правительственную комиссию по вопросам химической и биологической безопасности, комиссию ВОЗ по неинфекционным заболеваниям, инициирует создание и возглавляет Национальную ассоциацию по борьбе с инсультом.

С января 2020 года она становится первой в России женщиной-руководителем Федерального медико-биологического агентства и первым же своим шагом осуществляет перевод ведомства в прямое подчинение Правительству Российской Федерации. Энергия, талант, исключительная трудоспособность, высочайший профессионализм Вероники Игоревны Скворцовой, её интеллигентность и доброжелательность к людям — залог плодотворного развития и успехов в медицинской науке и охране здоровья всех сотрудников и пациентов ФМБА России.

От всей души поздравляем Веронику Игоревну! Желаем блестящего воплощения всех задуманных идей и поставленных целей, новых достижений и побед в науке, успеха в работе и руководстве Федеральным медико-биологическим агентством — передовым отрядом российской медицины и здравоохранения! И, конечно же, крепкого здоровья, счастья, любви и благополучия!

*Коллектив Научного центра
биомедицинских технологий ФМБА России
Редакционный совет научного журнала «Биомедицина»*



ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России»

БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.
4 выпуска в год

2020, Том 16, №4

Scientific Center of Biomedical Technologies
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia

JOURNAL BIOMED

SCIENTIFIC JOURNAL

Published since 2005.
Quarterly.

2020, Vol. 16, No. 4

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

Научный журнал «Биомедицина» основан в 2005 году Научным центром биомедицинских технологий. Журнал издаётся на русском и английском языках. В журнале публикуются исследования по новым биомедицинским технологиям, моделям и методам исследований, конструированию новых линий животных-моделей (в том числе трансгенных, нокаутных, эпигеномных), эпигенетическим аспектам в биомедицине, экспериментальной и спортивной фармакологии, фармнутриентам, восстановительной медицине, биомедицинским аспектам клинической фармакологии. Журнал ориентирован на специалистов в области биологии, медицины, биомедицины и ветеринарии. В журнале опубликованы статьи авторов более чем из 200 различных организаций, география которых включает в себя практически всю Россию, а также Беларусь, Казахстан, Грузию, Украину, Нидерланды, Болгарию.

■ Главный редактор

Каркищенко Николай Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, академик Российской академии ракетных и артиллерийских наук, научный руководитель ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (пос. Светлые горы, Красногорский район, Московская область, Россия)

■ Заместитель главного редактора

Каркищенко Владислав Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, директор ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (пос. Светлые горы, Красногорский район, Московская область, Россия)

■ Ответственный секретарь

Алимкина Оксана Владимировна, научный сотрудник лаборатории фармакоmodellирования ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (пос. Светлые горы, Красногорский район, Московская область, Россия)

■ Члены редакционного совета

Анохин Константин Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, руководитель отдела нейронаук НИЦ «Курчатовский институт» (Москва, Россия)

Ачкасов Евгений Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой спортивной медицины и медицинской реабилитации ФГАОУ ВО «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Баранов Виктор Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заместитель генерального директора — директор НИИ космической медицины ФНKC Федерального медико-биологического агентства (Москва, Россия)

Быков Анатолий Тимофеевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заслуженный врач РФ, заведующий кафедрой восстановительной медицины, физиотерапии, мануальной терапии, ЛФК и спортивной медицины ФПК и ППС, «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России (Сочи, Россия)

Влахов Витан, доктор медицинских наук (Болгария), профессор, академик Болгарской академии наук и искусств, консультант по клинической фармакологии и терапии, Медицинский Университет (София, Болгария)

Воевода Михаил Иванович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал ФГБУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (Новосибирск, Россия)

Галенко-Ярошевский Павел Александрович, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой фармакологии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России (Краснодар, Россия)

Дубина Михаил Владимирович, доктор медицинских наук, академик РАН, директор ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства (Санкт-Петербург, Россия)

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

Дыгай Александр Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки, заместитель академика-секретаря — руководитель секции медицинских наук РАН, директор, заведующий отделом патофизиологии и регенеративной медицины, ФГБУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (Томск, Россия)

Зефилов Андрей Львович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки Российской Федерации и Республики Татарстан, заведующий кафедрой нормальной физиологии, декан лечебного факультета ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (Казань, Россия)

Кузденбаева Раиса Салмаганбетовна, доктор медицинских наук, профессор, академик Национальной академии наук Казахстана, член-корр. Академии медицинских наук Республики Казахстан и Академии профилактической медицины Республики Казахстан, начальник управления фармакологической экспертизы, «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники Минздрава Республики Казахстан (Астана, Казахстан)

Кукес Владимир Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, ФГАОУ ВО «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Макляков Юрий Степанович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, Ростовский государственный медицинский университет (Ростов-на-Дону, Россия)

Максимович Наталия Евгеньевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии им. Д. А. Маслакова УО «Гродненский государственный медицинский университет» (Гродно, Республика Беларусь)

Матишов Геннадий Григорьевич, доктор географических наук, профессор, академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель Южного научного центра РАН, председатель Президиума ЮНЦ РАН (Ростов-на-Дону, Россия)

Мирошников Анатолий Иванович, доктор химических наук, академик РАН, председатель Пушчинского научного центра РАН, заместитель директора ФГБУН «Институт биоорганической химии

им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН», председатель «Пушчинский научный центр РАН» (Москва, Россия)

Мурашёв Аркадий Николаевич, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора, руководитель лаборатории биологических испытаний, Филиал ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН» (Пушино, Московская область, Россия)

Оковитый Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ФГБУ ВО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Помыткин Игорь Анатольевич, кандидат химических наук, заместитель директора по научной работе ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (пос. Светлые горы, Красногорский район, Московская область, Россия)

Пчелинцев Сергей Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, директор ОАО «Институт инженерной иммунологии» (дер. Любучаны, Чеховский район, Московская область, Россия)

Раменская Галина Владиславовна, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Рембовский Владимир Романович, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки, научный руководитель ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства (г.п. Кузьмоловский, Всеволожский район, Ленинградская область, Санкт-Петербург, Россия)

Решетов Игорь Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой онкологии, радиотерапии и пластической хирургии Института Профессионального образования ФГАОУ ВО «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Сычев Дмитрий Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, ректор, заведующий кафедрой клинической фармакологии и терапии, ФГБОУ ДПО «Российская медицин-

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

ская академия непрерывного профессионального образования» (Москва, Россия)

Хритинин Дмитрий Федорович, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, профессор кафедры психиатрии и наркологии ФGAOY BO «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Цыганков Борис Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой психиатрии, наркологии и психотерапии ФГДО ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России (Москва, Россия)

Цысь Валентина Ивановна, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, академик РАЕН, профессор кафедры зоотехнии ФГБОУ ВО «Смо-

ленская государственная сельскохозяйственная академия» (Смоленск, Россия)

Ших Евгения Валерьевна, доктор медицинских наук, профессор, директор института профессионального образования, заведующая кафедрой клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ФGAOY BO «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Шустов Евгений Борисович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГОУ ВО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, главный научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (Санкт-Петербург, Россия)

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

История издания журнала:	Журнал издается с 2005 г.
Периодичность:	4 выпуска в год
Префикс DOI:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print)
Свидетельство о регистрации СМИ:	Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати. Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-21324 от 09.06.2005
Индексация:	Журнал включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук
Подписной индекс:	57995 в каталоге «Издания органов научно-технической информации» ОАО «Роспечать»
Стоимость одного выпуска:	400 руб.
Условия распространения материалов:	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License
Учредитель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1
Издатель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1
Редакция:	143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1 Тел.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Тираж:	3000 экземпляров
Типография:	ООО «БЕАН» 603003, Нижегородская обл., Нижний Новгород, ул. Баррикад, д. 1
Дата выхода в свет:	26.10.2020

The scientific journal “Journal Biomed” was founded in 2005 by the Scientific Center of Biomedical Technologies. The journal is published in Russian and English. The journal publishes research on new biomedical technologies, research models and methods, the construction of new lines of animal-models (including transgenic, knock-out, epigenomic), epigenetic aspects in biomedicine, experimental and sports pharmacology, pharmaceutical ingredients, rehabilitation medicine, biomedical aspects of clinical pharmacology. The journal is aimed at specialists in the field of biology, medicine, biomedicine and veterinary medicine. The journal published articles by authors from more than 200 different organizations, the geography of which includes almost all Russia, and Belarus, Kazakhstan, Georgia, Ukraine, Netherlands, Bulgaria.

■ Editor-in-Chief

Nikolay N. Karkischenko, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Academician of the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences, Academic Director of the Scientific Center of Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency (Svetlye Gory, Krasnogorsk District, Moscow Region, Russia)

■ Deputy Editor-in-Chief

Vladislav N. Karkischenko, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the Scientific Center of Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency (Svetlye Gory, Krasnogorsk District, Moscow Region, Russia)

■ Executive Secretary

Oksana V. Alimkina, Researcher of the Laboratory of Pharmacomodeling, Scientific Center of Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency (Svetlye Gory, Krasnogorsk District, Moscow Region, Russia)

■ Members of Editorial Council

Evgeniy E. Achkasov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Sports Medicine and Rehabilitation, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Konstantin V. Anokhin, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Neuroscience, Kurchatov Institute (Moscow, Russia)

Viktor M. Baranov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Deputy General Director — Director of the Research Institute of Space Medicine, Federal Scientific and Clinical Center for Specialized

Medical Assistance and Medical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency (Moscow, Russia)

Anatoliy T. Bykov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Rehabilitation Medicine, Physiotherapy, Manual Therapy, Physical Therapy and Sports Medicine of the Faculty of Advanced Training and Professional Retraining, Kuban State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sochi, Russia)

Mikhail V. Dubina, Doctor of Medical Sciences, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of the State Research Institute for Highly Clean Biological Preparations of the Federal Medical and Biological Agency (Saint Petersburg, Russia)

Aleksandr M. Dygay, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Honored Scientist, the deputy Academician-secretary — the Head of section of medical sciences, Director, Head of the Department of Pathophysiology and Regenerative Medicine, E. D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (Tomsk, Russia)

Pavel A. Galenko-Yaroshevskiy, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Pharmacology Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of Russia (Krasnodar, Russia)

Dmitriy F. Khritinin, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor of the Department of Psychiatry and Addiction, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

JOURNAL BIOMED

Vladimir G. Kukes, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Honored Scientist of the Russian Federation, Professor of the Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Raisa S. Kuzdenbayeva, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, Corresponding Member of the Academy of Medical Sciences of the Republic of Kazakhstan and of the Academy of Preventive Medicine of the Republic of Kazakhstan, Head of the Pharmacological Examination Department of the National Center for Expertise of Medicines, Medical Devices and Medical Equipment of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan (Astana, Kazakhstan)

Yuriy S. Maklyakov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Rostov State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation (Rostov-on-Don, Russia)

Nataliya Ye. Maksimovich, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pathological Physiology named after D. A. Maslakov of the Grodno State Medical University (Grodno, Republic of Belarus)

Gennadiy G. Matishov, Doctor of Geographical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Academic Director of the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Chairman of the Presidium of the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences (Rostov-on-Don, Russia)

Anatoliy I. Miroshnikov, Doctor of Chemical Sciences, Academician of the Russian Academy of Sciences, Chairman of the Pushchino Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Deputy Director of the Shemyakin — Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

Arkadiy N. Murashev, Doctor of Biological Sciences, Professor, Deputy Director, Head of the Laboratory of Biological Testing, Branch of the Shemyakin — Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences (Pushchino, Moscow region, Russia)

Sergey V. Okovityi, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Saint-Petersburg State

Chemical Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation (Saint Petersburg, Russia)

Igor A. Pomytkin, Candidate of Chemical Sciences, Deputy Director for Science, Scientific Center of Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency (Svetlye Gory, Krasnogorsk District, Moscow Region, Russia)

Sergey Yu. Pchelintsev, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director, Institute of Immunological Engineering (Lyubuchany, Chekhov District, Moscow Region, Russia)

Galina V. Ramenskaya, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Vladimir R. Rembovsky, Doctor of Medical Sciences, Professor, Honored Scientist, Academic Director of the Research Institute of Hygiene, Professional Pathology and Human Ecology of the Federal Medical and Biological Agency (Kuzmolovsky, Vsevolozsky District, Leningrad Region, Saint Petersburg, Russia)

Igor V. Reshetov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, the Head of the Department of oncology, radiotherapy and plastic surgery of the Institute of Professional Education, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Evgenia V. Shikh, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the Institute of Vocational Education, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Evgeniy B. Shustov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences, Professor of pharmacology and clinical pharmacology Department, Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chief Scientist, Institute of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency (Saint Petersburg, Russia)

Dmitriy A. Sychev, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Rector, Head of Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Russian Medical Academy of Postgraduate Education (Moscow, Russia)

JOURNAL BIOMED

Boris D. Tsygankov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Psychiatry, Psychotherapy and Addiction, A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry (Moscow, Russia)

Valentina I. Tsys, Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences, Professor of the Department of Animal Breeding, Smolensk State Agricultural Academy (Smolensk, Russia)

Vitan Vlahov, Doctor of Medical Sciences (Bulgaria), Professor, Academician of the Bulgarian Academy of Sciences and Arts, Consultant on Clinical

Pharmacology and Therapeutics, Medical University (Sofia, Bulgaria)

Mikhail I. Voevoda, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Research Institute of Therapy and Preventive Medicine — Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia)

Andrey L. Zefirov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Honored Scientist of the Russian Federation and Republic of Tatarstan, Head of the Department of Normal Physiology, Kazan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Kazan, Russia)

JOURNAL BIOMED

Founded:	The journal has been published since 2005.
Frequency:	Quarterly
DOI Prefix:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print)
Mass media registration certificate:	Registered at the State Committee of the Russian Federation on Press under the number ПИ № ФС77-21324 от 09.06.2005
Indexing:	The Journal is included into the Higher Attestation Commission (HAC) list of periodicals (the list of leading per-reviewed scientific journals recommended for publishing the basic research results of doctor and candidate theses)
Subscription index:	57995 in the catalogue "Izdaniya organov nauchno-tehnicheskoy informatsii" of the Rospechat agency
Price:	400 RUR
Content distribution terms:	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License
Founders:	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
Publisher:	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
Editorial office:	143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk district, Svetlye gory village, building 1 Tel.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Circulation:	3000 copies
Printing house:	BEAN, LLC. 603003, Russian Federation, Nizhny Novgorod region, Nizhny Novgorod, Barrikad str., 1
Publication date:	26.10.2020

■ РЕГУЛЯТОРНЫЕ ОПИОИДНЫЕ ПЕПТИДЫ

В.Н. Каркищенко, И.А. Помыткин, В.И. Скворцова

Опиоидэргическая система иммунных клеток: новая фармакологическая мишень в терапии «цитокинового шторма» 14

■ РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

И.А. Помыткин, В.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин, М.С. Нестеров, Н.В. Петрова

Модель фатального острого поражения легких и острого респираторного дистресс-синдрома 24

■ ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ

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

Лейтрагин подавляет экспрессию цитокинов, включая интерлейкин-6, в модели «цитокинового шторма» у мышей линии C57BL/6Y с индуцированным острым респираторным дистресс-синдромом 34

В.Н. Каркищенко, И.А. Помыткин, М.Т. Гасанов, М.С. Нестеров, Ю.В. Фокин, Л.А. Табоякова, О.В. Алимкина, Д.В. Хвостов

Лейтрагин повышает выживаемость животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома при профилактическом и лечебном режимах введения 44

В.Н. Каркищенко, И.А. Помыткин, М.Т. Гасанов, О.И. Степанова, Р.А. Клёсов, Н.С. Огнева, Е.С. Савченко, В.И. Скворцова

Сочетанное применение лейтрагина и легочного сурфактанта-БЛ повышает выживаемость животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома 52

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

Эффекты тоцилизумаба, антагониста рецептора интерлейкина-6, на экспрессию цитокинов и выживаемость животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома 60

■ НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Ю.В. Фокин, Н.Н. Каркищенко, М.М. Борисова

Нейровизуализация фармако-ЭЭГ эффектов лейтрагина посредством нормированных электрограмм мозга кошек 71

■ REGULATORY OPIOID PEPTIDES

- Vladislav N. Karkischenko, Igor A. Pomytkin, Veronika I. Skvortsova**
The Opioidergic System of Immune Cells: A New Pharmacological Target
in the Therapy of “Cytokine Storm” 14

■ RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

- Igor A. Pomytkin, Vladislav N. Karkischenko, Yuriy V. Fokin, Maxim S. Nesterov,
Nataliya V. Petrova**
A Model of Fatal Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome 24

■ PRE-CLINICAL RESEARCH IN BIOMEDICINE

- Vladislav N. Karkischenko, Igor A. Pomytkin, Nataliya V. Petrova,
Maxim S. Nesterov, Ruslan A. Ageldinov, Lyudmila V. Zotova, Elena M. Koloskova,
Vladimir V. Slobodenyuk, Veronika I. Skvortsova**
Leustragin Inhibits Expression of Cytokines, Including Interleukin-6,
in a “Cytokine Storm” Model in C57BL/6Y Mice with Induced
Acute Respiratory Distress Syndrome 34

- Vladislav N. Karkischenko, Igor A. Pomytkin, Melik T. Gasanov, Maxim S. Nesterov,
Yuriy V. Fokin, Lidiya A. Taboyakova, Oksana V. Alimkina, Daniil V. Khvostov**
Prophylactic and Therapeutic Administration of Leustragin Increases the Survival Rate
of Animals in a Model of Fatal Acute Respiratory Distress Syndrome. 44

- Vladislav N. Karkischenko, Igor A. Pomytkin, Melik T. Gasanov, Olga I. Stepanova,
Roman A. Klesov, Nastasya S. Ogneva, Elena S. Savchenko, Veronika I. Skvortsova**
The Combined Use of Leustragin and Pulmonary Surfactant-BL Increases
Animal Survival in a Model of Fatal Acute Respiratory Distress Syndrome 52

- Vladislav N. Karkischenko, Igor A. Pomytkin, Nataliya V. Petrova, Sergey V. Maksimenko,
Mariya M. Skripkina, Anna I. Levashova, Svetlana E. Dengina**
Effects of Tocilizumab, an Interleukin-6 Receptor Antagonist, on Cytokine Expression
and Animal Survival in a Model of Fatal Acute Respiratory Distress Syndrome 60

■ NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

- Yuriy V. Fokin, Nikolay N. Karkischenko, Mariya M. Borisova**
Neuroisualization of Pharmacology-EEG Effects of Leustragine by Normalized Cat Brain
Electrograms 71

ОПИОИДЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ИММУННЫХ КЛЕТОК: НОВАЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ В ТЕРАПИИ «ЦИТОКИНОВОГО ШТОРМА»

В.Н. Каркищенко¹, И.А. Помыткин^{1*}, В.И. Скворцова²

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

В настоящей статье предложен новый фармакологический подход к подавлению «цитокинового шторма», основанный на использовании опиоидных пептидов. Клетки иммунной системы имеют полноценную опиоидную систему сигнализации, состоящую из всех трех типов опиоидных рецепторов: мю (μ), дельта (δ) и каппа (κ). Эти клетки также экспрессируют проопиомеланокортин, проэнкефалин и продинорфин, являющиеся предшественниками агонистов рецепторов — β -эндорфина, метэнкефалина и динорфинов соответственно. Особенностью опиоидной системы иммуноцитов является то, что экспрессия всех компонентов этой системы повышается в ответ на действие цитокинов и воспаление, что указывает на ее участие в регуляции иммунного ответа. Недавно было показано, что динорфины, возможно, играют важную роль в ингибировании экспрессии провоспалительных цитокинов иммунными клетками, подавляя транслокацию активного димера ядерного фактора каппа В (NF- κ B). С учетом ключевой роли канонического пути активации NF- κ B в экспрессии цитокинов, который реализуется при активации множества различных рецепторов, подавление этого пути с использованием опиоидных пептидов обеспечивает новый фармакологический подход к решению проблемы «цитокинового шторма». Актуальность этого подхода связана с пандемией коронавирусной инфекции COVID-19, роль «цитокинового шторма» в которой установлена многочисленными исследованиями.

Ключевые слова: опиоидная система иммуноцитов, опиоидные рецепторы, динорфин 1-6, «цитокиновый шторм», транскрипционный фактор NF- κ B, лейтрагин, COVID-19

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Скворцова В.И. Опиоидергическая система иммунных клеток: новая фармакологическая мишень в терапии «цитокинового шторма». Биомедицина. 2020;16(4):14–23. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-14-23>

Поступила 29.07.2020

Принята после доработки 08.09.2020

Опубликована 26.10.2020

THE OPIOIDERGIC SYSTEM OF IMMUNE CELLS: A NEW PHARMACOLOGICAL TARGET IN THE THERAPY OF “CYTOKINE STORM”

Vladislav N. Karkischenko¹, Igor A. Pomytkin^{1,*}, Veronika I. Skvortsova²

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 article proposes a new pharmacological approach to suppressing “cytokine storm” syndromes based on the use of opioid peptides. Immune cells possess a complete opioid signaling system consisting of all three types of opioid receptors: mu (μ), delta (δ) and kappa (κ). These cells also express proopiomelanocortin, proenkephalin and prodynorphin, which serve as precursors for such receptor agonists as β -endorphin, methenkephalin and dynorphins, respectively. A distinct feature of the opioid system of immunocytes consists in an increased expression of all its components in response to the action of cytokines and inflammation, which indicates participation of this system in regulating the immune response. It has been recently shown that dynorphins are likely to play an important role in inhibiting the expression of proinflammatory cytokines by immune cells through impeding the translocation of the active nuclear factor kappa B (NF- κ B) dimer. Given the key role of the canonical pathway of NF- κ B activation in cytokine expression realized when activating a variety of receptors, suppression of this pathway using opioid peptides provides a new pharmacological approach to solving the “cytokine storm” problem. The relevance of this approach is associated with the COVID-19 coronavirus infection pandemic, the role of the “cytokine storm” in which has been established by numerous studies.

Keywords: opioidergic system of immunocytes, opioid receptors, dynorphin-1,6, “cytokine storm”, transcription factor NF- κ B, leutragin, COVID-19

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

For citation: Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Skvortsova V.I. The Opioidergic System of Immune Cells: A New Pharmacological Target in the Therapy of “Cytokine Storm”. *Journal Biomed.* 2020;16(4):14–23. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-14-23>

Submitted 29.07.2020

Revised 08.09.2020

Published 26.10.2020

Введение

В 1979 году Дж. Вибран и соавт. впервые обнаружил, что опиоиды могут влиять на иммунную функцию. Эндогенный опиоидный пептид метэнкефалин, действуя на нормальные Т-лимфоциты крови человека, увеличивал процент активных Т-розеток в тесте розеткообразования, и этот эффект ингибировался налоксоном, неселективным ингибитором опиоидных рецепторов [31]. Накопленные в последующие годы данные позволили утверждать, что опиоидная и иммунная система тесно

взаимосвязаны, а эндогенные опиоидные пептиды обладают многими свойствами цитокинов, главных модуляторов иммунной системы [21].

Классическая опиоидная система представлена тремя белками — предшественниками опиоидных пептидов и тремя основными рецепторами: μ - (MOR), δ - (DOR) и κ -рецептором (KOR). Проопиомеланокортин является предшественником β -эндорфина, агониста μ -рецепторов. Препроэнкефалин является предшественником метэнкефалина

и лейэнкефалина, смешанных агонистов δ - и, в меньшей степени, μ -рецепторов. Продинорфин является предшественником динорфинов А и В, агонистов κ -рецепторов, которые при гидролитическом расщеплении дают множество фрагментов с аффинностью ко всем трем рецепторам. Подавляющее большинство сведений о структуре и свойствах опиоидных рецепторов относится к нейрональным рецепторам, что связано с основным направлением исследований в этой области, а именно изучением роли центральной опиоидной системы в подавлении боли.

Полученный в 1980-х и 1990-х гг. массив данных о взаимодействии опиоидной и иммунной систем при локальном воспалении привел к появлению гипотезы о локальном контроле воспалительной боли [4]. Согласно этой гипотезе иммунные клетки содержат опиоидные пептиды, которые выделяют внутри воспаленной ткани в ответ на воздействие цитокинов. Высвобожденные пептиды, в свою очередь, действуют на опиоидные рецепторы на окончаниях периферических сенсорных нервов, тем самым снижая болевую чувствительность в месте воспаления. Эта гипотеза является расширением представлений о роли опиоидных пептидов как обезболивающих агентов, но действующих не на нейроны центральной нервной системы, а на периферические нейроны в месте локального воспаления.

В ходе этих исследований было обнаружено, что иммунные клетки экспрессируют опиоидные рецепторы, а также опиоидные пептиды, способные связываться с этими рецепторами. Считается, что опиоидные рецепторы иммунных клеток в целом идентичны опиоидным рецепторам в нейронах, хотя преобладающие подтипы опиоидных рецепторов иммуноцитов могут в ряде случаев отличаться [29]. Наличие опиоидных рецепторов и путей внутриклеточной пере-

дачи сигналов этих рецепторов, сопряженных с факторами транскрипции, позволяет утверждать, что иммунные клетки имеют полноценную опиоидергическую систему регуляции.

Ниже мы суммируем имеющиеся данные о роли опиоидергической системы иммуноцитов в модуляции иммунного ответа. При определенных условиях эта система может выступать в качестве негативного регулятора канонического пути активации ядерного транскрипционного фактора κ (NF- κ B), играющего ключевую роль в транскрипции генов провоспалительных цитокинов, хемокинов и др. медиаторов воспаления, чрезмерная экспрессия которых может вызвать неконтролируемый воспалительный ответ, известный как «цитокиновый шторм».

В настоящей статье мы предлагаем новый фармакологический подход к лечению воспалительных заболеваний, основанный на воздействии на опиоидергическую систему иммуноцитов с целью подавления канонического пути активации NF- κ B. По нашему мнению, эта система представляет собой новую, многообещающую фармакологическую мишень в терапии широкого спектра острых и хронических воспалительных заболеваний и в особенности «цитокинового шторма» — жизнеугрожающего состояния, актуальность поиска новых фармакологических подходов к лечению которого растет из-за роста эпидемий вирусных пневмоний и коронавирусной инфекции COVID-19 [1, 10, 12].

Опиоидергическая система иммунных клеток

Иммунные клетки экспрессируют опиоидные рецепторы

Все три основных типа опиоидных рецепторов — μ , δ и κ — были обнаружены в клетках, участвующих в иммунном ответе [27]. В ранних исследованиях с использованием радиолигандов сайты связывания

μ-агонистов были обнаружены в периферических лимфоцитах крови человека, тимоцитах, спленоцитах, моноцитах и макрофагах. Сайты связывания δ- и κ-агонистов были найдены в лимфоцитах и макрофагах. Эти результаты были подтверждены обнаружением транскриптов опиоидных рецепторов. DOR мРНК была найдена в В-клетках, Т-клетках, моноцитах и лимфоцитах. MOR мРНК была обнаружена в перитонеальных макрофагах, мононуклеарных клетках периферической крови, моноцитах, гранулоцитах и CD4+ Т-клетках. KOR мРНК была найдена в лимфоцитах. В целом уровень экспрессии опиоидных рецепторов зависел от типа рецептора и типа клетки и обычно резко повышался при воспалении. Так, моделирование воспаления в тонкой кишке крыс приводило к значительному увеличению уровней мРНК всех трех опиоидных рецепторов: MOR [23], DOR [24, 13] и KOR [24, 13]. Экспрессируемые в иммунных клетках опиоидные рецепторы, как полагают, идентичны нейрональным опиоидным рецепторам, хотя преобладающие подтипы опиоидных рецепторов в некоторых случаях могут отличаться [29].

Транскрипционный фактор NF-κB участвует в экспрессии опиоидных рецепторов

Транскрипционный фактор NF-κB участвует в экспрессии всех трех типов опиоидных рецепторов, в т. ч. KOR [15], DOR [7, 5] и MOR [14]. Как следствие, стимулы, активирующие NF-κB, запускают экспрессию опиоидных рецепторов. Фактор некроза опухоли (TNF-α) индуцировал экспрессию MOR во многих иммунных клетках, включая Т-лимфоциты, лейкоциты, зрелые дендритные клетки [14], а также клетки Jurkat (линия Т-клеток) и TNP-1 моноциты [22]. Стимуляция клеток Jurkat и TNP-1 моноцитов интерлейкином 1β (IL-1β), интерфероном гамма (IFN-γ) или TNF-α повышала содержание MOR протеина, при-

чем химический ингибитор активации NF-κB отменял этот эффект цитокинов [22]. Таким образом, высвобождение цитокинов при воспалении ведет к активации транскрипционного фактора NF-κB и последующему повышению содержания всех трех типов опиоидных рецепторов в иммунных клетках. С учетом того, что активность опиоидной системы в значительной степени регулируется экспрессией опиоидных рецепторов, именно воспаление и высокий уровень провоспалительных цитокинов ведут к повышению активности опиоидергической системы в иммунных клетках.

Иммунные клетки экспрессируют опиоидные пептиды

Все три предшественника эндогенных опиоидных пептидов, а также сами пептиды производятся клетками иммунной системы. мРНК проопиомеланокортина, предшественника β-эндорфина, была найдена в лейкоцитах [28], макрофагах селезенки [17], Т- и В-лимфоцитах, моноцитах, макрофагах [25], циркулирующих лимфоцитах и лимфоцитах, локализованных в лимфатических узлах [2]. Повышенные уровни мРНК проэнкефалина были обнаружены в воспаленных тканях [25] и активированных Т-хелперах [32]. Уровень иммунореактивного динорфина повышался при воспалении в лимфоцитах и макрофагах [11].

Провоспалительные цитокины индуцируют секрецию опиоидных пептидов

Воспаленная ткань аккумулирует значительное количество β-эндорфина и метэнкефалина [30]. По некоторым данным, роль активатора секреции опиоидных пептидов играют цитокины. IL-1β стимулировал выделение β-эндорфина и динорфина А из лимфоцитов [3]. Локальное введение IL-1β в область воспаления стимулировало выделение β-эндорфина, метэнкефалина

и диноρφина А [26]. О выделении опиоидных пептидов в ответ на стимуляцию TNF- α и интерлейкином-6 (IL-6) косвенно свидетельствовал тот факт, что инъекции TNF- α и IL-6 в воспаленную ткань повышали болевой порог, и этот эффект ингибировался антагонистом опиоидных рецепторов — налоксоном [8].

В целом представленные здесь опубликованные данные говорят о наличии полноценной опиоидергической сигнальной системы в клетках, отвечающих за защитный иммунитет. Лейкоциты, лимфоциты, моноциты и макрофаги экспрессируют в совокупности все типы опиоидных рецепторов, а также производят все три предшественника опиоидных пептидов и секретируют опиоидные пептиды в воспаленной ткани в ответ на стимуляцию цитокинами.

Фактор транскрипции NF- κ B: ключевой пункт в развитии «цитокинового шторма»

Канонический путь активации NF- κ B

NF- κ B представляет собой семейство факторов транскрипции, которое регулирует большое количество генов, играющих центральную роль в координации воспалительных реакций, врожденном и адаптивном иммунитете [18]. Активация NF- κ B может идти по двум основным сигнальным путям — каноническому и неканоническому. Канонический путь участвует почти во всех аспектах иммунных ответов, в то время как неканонический путь развивается как дополнительный для регуляции специфических функций адаптивного иммунитета. Канонический путь активации начинается с высвобождения транскрипционно активного димера NF- κ B из неактивного цитоплазматического комплекса, с последующей транслокацией NF- κ B в ядро, связыванием с ДНК и активацией экспрессии целевых генов, включая гены провоспалительных цитокинов, хемокинов и др. медиаторов воспаления (рис. А). Особая

значимость канонического пути активации NF- κ B состоит в том, что он является общим сигнальным путем, опосредующим действие множества различных рецепторов, в т. ч. рецепторов цитокинов, рецепторов T- и В-клеток, а также рецепторов, распознающих молекулярные образы (паттерны) разнообразных патогенов или молекулярных фрагментов поврежденной ткани [16], что более подробно изложено ниже.

NF- κ B и рецепторы распознавания молекулярных паттернов

Рецепторы распознавания молекулярных паттернов (PRR) экспрессируются иммунными клетками и распознают т. н. «патоген-ассоциированные молекулярные паттерны» (PAMP), представляющие собой специфические молекулярные компоненты патогена, а также ассоциированные с повреждениями молекулярные паттерны (DAMP), т. е. молекулы, высвобождаемые поврежденными клетками хозяина [16].

Клетки млекопитающих экспрессируют пять семейств PRR, включая toll-подобные рецепторы (TLR), RIG-I-подобные рецепторы, NOD-подобные рецепторы (NLR), лектин-подобные рецепторы С-типа и сенсоры цитозольной ДНК. Такое многообразие рецепторов позволяет клеткам врожденного иммунитета распознавать широкий спектр патогенов. В частности, рецепторы TLR3, TLR8, TLR9, а также RIG-I-подобные рецепторы распознают вирусную одноцепочечную РНК (ssRNA) и двухцепочечную РНК (dsRNA), а рецепторы TLR4 распознают липополисахарид стенки грамотрицательных бактерий. Однако, распознавая разные патогены, эти рецепторы запускают универсальный ответ, активируя общий сигнальный механизм канонического пути активации NF- κ B и последующую транскрипцию NF- κ B-зависимых генов, кодирующих цитокины, хемокины и др. медиаторы воспаления в различных типах иммунных клеток (рис. А).

Как следствие, «цитокиновый шторм» не является специфической реакцией на специфические патогены, но это общая реакция, которая может возникать вследствие чрезмерной активации канонического пути активации NF-κB при стимуляции множества рецепторов PRR множеством разных патогенов. В этом контексте в основе генерации «цитокинового шторма» вирусом SARS-CoV-2 при COVID-19 и эндотоксином при сепсисе лежит один и тот же механизм активации NF-κB.

В целом именно универсальная роль канонического пути активации NF-κB в генерации «цитокинового шторма» делает NF-κB наиболее многообещающей фармакологической мишенью в терапии различных заболеваний с высоким риском развития этого жизнеугрожающего состояния, в т. ч. при COVID-19.

Опиоидные пептиды в регуляции NF-κB

Имеются только ограниченные данные о роли эндогенных опиоидных пептидов в регуляции NF-κB, тем не менее указывающие, что агонисты DOR и KOR могут подавлять канонический путь активации NF-κB [6]. Основные исследования в этом направлении проводились для динорфинов. Динорфины А и В образуются из продинорфина, большого белкового предшественника, который экспрессируется в т. ч. клетками иммунной системы [11]. Согласно имеющимся данным, динорфин А высвобождается из мигрировавших в сайт воспаления лейкоцитов и подвергается быстрой биотрансформации под действием пептидаз с образованием 21-го фрагмента при pH 7,4 и 31-го фрагмента при pH 5,5 [20, 19]. Часть из них обладает опиоидной активностью и аффинностью к κ- и δ-рецепторам, а некоторые — к μ-рецепторам. Динорфин 1-6 образуется как основной фрагмент, имеющий опиоидную активность при pH 7,4, а динорфин 1-5 (лейэнкефалин) — как основной фрагмент при pH 5,5. Было показа-

но, что динорфин 1-17, а также некоторые N-терминальные продукты его биотрансформации, включая динорфин 1-6, ингибируют канонический путь активации NF-κB, запрещая транслокацию активного димера NF-κB в ядро в стимулированных липополисахаридом моноцитах THP-1 [9].

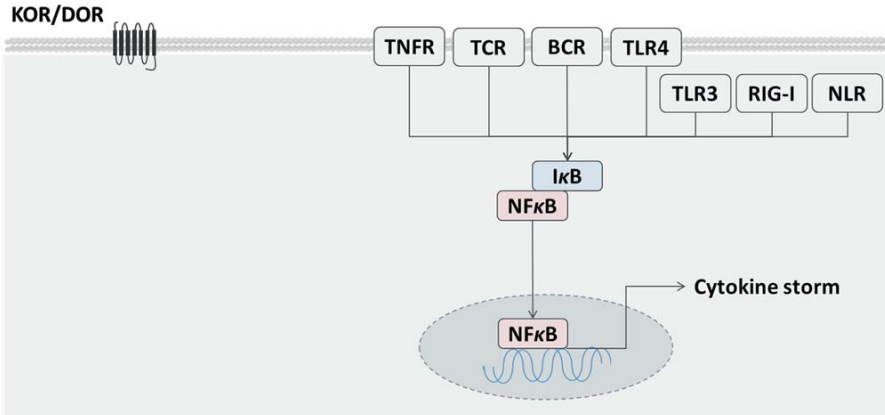
Новый фармакологический подход к ингибированию «цитокинового шторма»

Схема на рисунке показывает функциональное взаимодействие между сигнальными путями рецепторов, запускающих канонический путь активации NF-κB, и сигнальными путями рецепторов KOR/DOR опиоидергической системы иммунных клеток.

Согласно схеме (рис. А), канонический путь активации NF-κB запускается множеством рецепторов, включая рецепторы распознавания молекулярных паттернов (TLR3, TLR4, RIG-I и NLR), а также рецепторами Т-клеток (TCR), В-клеток (BCR) и рецепторами цитокинов (TNFR) [16]. Активация этих рецепторов ведет к высвобождению транскрипционно активного димера NF-κB из неактивного цитоплазматического комплекса IκB-NF-κB с последующей транслокацией NF-κB в ядро, его связыванием с ДНК и транскрипцией генов провоспалительных цитокинов, хемокинов и др. медиаторов воспаления [18]. Чрезмерная экспрессия последних ведет к «цитокиновому шторму». Стимуляция опиоидных рецепторов KOR/DOR опиоидными пептидами (рис. В), напротив, ведет к ингибированию транслокации активного димера NF-κB в ядро и ингибированию «цитокинового шторма» [9].

В контексте указанной схемы опиоидергическая система иммунных клеток, в основном сигнальные подсистемы δ- и κ-рецепторов, является новой фармакологической мишенью в лечении острых и хронических воспалительных заболеваний.

A



B

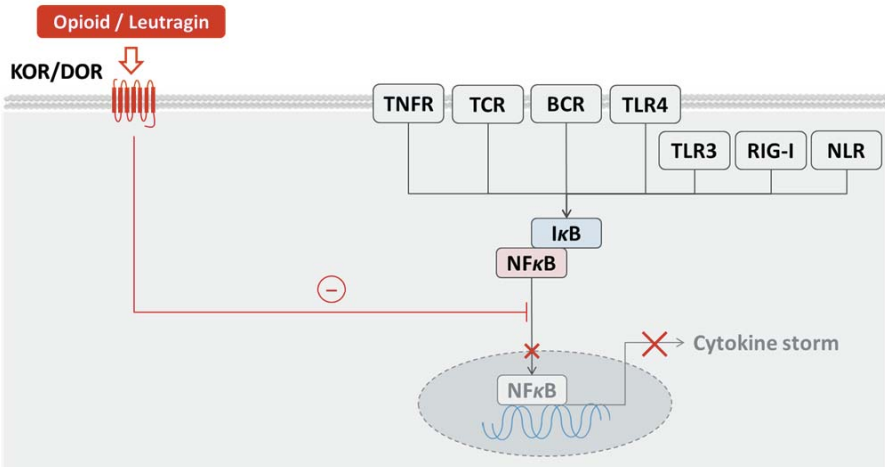


Рис. Взаимодействие между сигнальными путями рецепторов-активаторов канонического пути активации NF-κB и опиоидных рецепторов KOR/DOR в процессе развития «цитокинового шторма». А — схема генерации «цитокинового шторма»; В — схема ингибирования «цитокинового шторма» опиоидными пептидами.

Fig. Interaction between the signaling pathways of receptors-activators of the canonical NF-κB activation pathway and opioid KOR/DOR receptors during the development of a “cytokine storm”. A — a scheme describing the development of a “cytokine storm”; B — a scheme describing inhibition of a “cytokine storm” by opioid peptides.

Опираясь на эти новые представления, мы предлагаем новый фармакологический подход к решению проблемы «цитокинового шторма», основанный на воздействии на опиоидергическую систему иммуноцитов. «Цитокиновый шторм» является жизнеугрожающим состоянием, проблема которого стала особенно острой в связи с эпидемиями вирусных пневмоний

и пандемией коронавирусной инфекции COVID-19.

В рамках решения этой проблемы мы предполагаем провести скрининг опиоидных пептидов на модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома, который характеризуется повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов, что воспроизводит основные особен-

ности «цитокинового шторма» при вирусных пневмониях и COVID-19. Результаты исследований одного из выбранных опиоидных пептидов (лейтрагина), которые подтверждают выдвинутую нами идею о возможности лечения «цитокинового шторма» путем воздействия на опиоидергическую систему иммунцитов, представлены в материалах настоящего выпуска.

Заключение

В настоящей статье мы представили имеющиеся в научной литературе данные, которые свидетельствуют о существовании полноценной опиоидергической системы регуляции в иммунных клетках (иммуноцитах). Иммунные клетки экспрессируют все три известных типа опиоидных рецепторов — MOR (μ), DOR (δ) и KOR (κ), а также опиоидные пептиды-лиганды этих рецепторов и элементы системы внутриклеточной передачи сигналов этих рецепторов.

Опиоидергическая система иммунцитов в значительной степени является индуцибельной, ее активность растет в условиях воспаления. Активация фактора транскрипции NF- κ B индуцирует экспрессию опиоидных рецепторов, а стимуляция иммунных клеток различных типов провоспалительными цитокинами (IL-1 β , TNF- α , IL-6 и IFN- γ) индуцирует как экспрессию опиоидных рецепторов в иммуноцитах, так и секрецию опиоидных пептидов иммунocyтами. Поэтому можно утверждать, что опиоидергическая система иммунцитов активируется при воспалении.

Сигнальные подсистемы рецепторов KOR и DOR опиоидергической системы иммунцитов, будучи активированными, ингибируют канонический путь активации NF- κ B, следовательно, опиоидная сигнализация при воспалении может играть функциональную роль отрицательной обратной связи. Действительно, активация NF- κ B ведет к повышению экспрессии рецепторов

KOR и DOR в иммуноцитах, тогда как последующая активация этих рецепторов опиоидными пептидами ведет к ингибированию NF- κ B и подавлению экспрессии генов провоспалительных цитокинов, хемокинов и др. медиаторов, необходимых для поддержания воспалительного ответа.

По нашему мнению, опиоидергическая система иммунцитов представляет собой новую, многообещающую фармакологическую мишень в терапии широкого спектра острых и хронических воспалительных заболеваний, опосредуемых активацией NF- κ B, с учетом функциональной роли этой системы в модуляции иммунного ответа.

Опираясь на эти представления, мы предлагаем новый фармакологический подход к решению проблемы «цитокинового шторма», основанный на воздействии на опиоидергическую систему иммунцитов. «Цитокиновый шторм» является жизнеугрожающим состоянием, поиск средств лечения которого стоит особенно остро в связи с пандемией коронавирусной инфекции COVID-19.

В рамках решения проблемы «цитокинового шторма» мы предполагаем провести скрининг опиоидных пептидов на модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома, характеризующегося повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов, что воспроизводит основные особенности «цитокинового шторма» при вирусных пневмониях и COVID-19. Результаты исследований одного из опиоидных пептидов (лейтрагина), подтверждающие правильность выдвинутой нами идеи о возможности лечения «цитокинового шторма» путем воздействия на опиоидергическую систему иммунцитов, представлены в материалах настоящего выпуска.

Применение опиоидных пептидов в лечении «цитокинового шторма» представляет собой эффективную экономичную

альтернативу дорогостоящей фармакотерапии с использованием моноклональных антител, которая может быть развернута

как массовая технология в условиях эпидемий и пандемий, в т. ч. в странах с невысоким уровнем жизни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- 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 farmako-modelirovaniya* [Biomedicine alternatives. Vol. 1. Fundamentals of biomedicine and pharmaco-modeling]. Moscow: Izdatel'stvo VPK, 2007, 320 p. (In Russian)].
- Cabot P.J., Carter L., Gaiddon C., Zhang Q., Schäfer M., Loeffler J.P., et al. Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats. *J. Clin. Invest.* 1997;100(1):142–148. DOI: 10.1172/JCI119506.
- Cabot P.J., Carter L., Schäfer M., Stein C. Methionine-enkephalin and Dynorphin A-release from immune cells and control of inflammatory pain. *Pain.* 2001;93(3):207–212. DOI: 10.1016/s0304-3959(01)00322-0.
- Cabot P.J. Immune-derived opioids and peripheral antinociception. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2001;28(3):230–232. DOI: 10.1046/j.1440-1681.2001.03425.x.
- Chen Y.L., Law P.Y., Loh H.H. Action of NF-kappaB on the delta opioid receptor gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;352(3):818–822. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.11.103.
- Chen Y.L., Law P.Y., Loh H.H. Nuclear factor kappaB signaling in opioid functions and receptor gene expression. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2006;1(3):270–279. DOI: 10.1007/s11481-006-9028-0.
- Chen Y.L., Law P.Y., Loh H.H. Sustained activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/nuclear factor kappaB signaling mediates G protein-coupled delta-opioid receptor gene expression. *J. Biol. Chem.* 2006;281(6):3067–3074.
- Członkowski A., Stein C., Herz A. Peripheral mechanisms of opioid antinociception in inflammation: involvement of cytokines. *Eur. J. Pharmacol.* 1993;242(3):229–235. DOI: 10.1016/0014-2999(93)90246-e.
- 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.
- 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.
- Hassan A.H., Pzewlocki R., Herz A., Stein C. Dynorphin, a preferential ligand for kappa-opioid receptors, is present in nerve fibers and immune cells within inflamed tissue of the rat. *Neurosci. Lett.* 1992;140(1):85–88. DOI: 10.1016/0304-3940(92)90688-4.
- 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.
- Jiménez N., Puig M.M., Pol O. Antixudative effects of opioids and expression of kappa- and delta-opioid receptors during intestinal inflammation in mice: involvement of nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006;316(1):261–270. DOI: 10.1124/jpet.105.091991.
- Kraus J., Börner C., Giannini E., Höllt V. The role of nuclear factor kappaB in tumor necrosis factor-regulated transcription of the human mu-opioid receptor gene. *Mol. Pharmacol.* 2003; 64(4):876–884.
- Law P.Y., Loh H.H., Wei L.N. Insights into the receptor transcription and signaling: implications in opioid tolerance and dependence. *Neuropharmacology.* 2004;47(1):300–311.
- Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.C. NF-kB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2017;2. DOI: 10.1038/sigtrans.2017.23.
- Lolait S.J., Clements J.A., Markwick A.J., Cheng C., McNally M., Smith A.I., et al. Pro-opiomelanocortin messenger ribonucleic acid and posttranslational processing of beta endorphin in spleen macrophages. *J. Clin. Invest.* 1986;77(6):1776–1779. DOI: 10.1172/JCI112501.
- Mitchell S., Vargas J., Hoffmann A. Signaling via the NFkB system. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2016;8(3):227–241. DOI: 10.1002/wsbm.1331.
- Morgan M., Heffernan A., Benhabib F., Wagner S., Hewavitharana A.K., Shaw P.N., et al. The efficacy of Dynorphin fragments at the kappa, mu and delta opioid receptor in transfected HEK cells and in an animal model of unilateral peripheral inflammation. *Peptides.* 2017;89:9–16. DOI: 10.1016/j.peptides.2016.12.019.
- Morgan M., Herath H.M., Cabot P.J., Shaw P.N., Hewavitharana A.K. Dynorphin A 1-17 biotransformation in inflamed tissue, serum and trypsin solution analysed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012;404(10):3111–3121. DOI: 10.1007/s00216-012-6406-8.
- Peterson P.K., Molitor T.W., Chao C.C. The opioid-cytokine connection. *J. Neuroimmunol.* 1998;83(1–2):63–69. DOI: 10.1016/s0165-5728(97)00222-1.
- Philippe D., Chakass D., Thuru X., Zerbib P., Tscicopoulos A., Geboes K., et al. Mu opioid receptor expression

- is increased in inflammatory bowel diseases: implications for homeostatic intestinal inflammation. *Gut*. 2006;55(6):815–823. DOI: 10.1136/gut.2005.080887.
23. Pol O., Alameda F., Puig M.M. Inflammation enhances mu-opioid receptor transcription and expression in mice intestine. *Mol. Pharmacol.* 2001;60(5):894–899. DOI: 10.1124/mol.60.5.894.
24. Pol O., Palacio J.R., Puig M.M. The expression of delta- and kappa-opioid receptor is enhanced during intestinal inflammation in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003;306(2):455–462. DOI: 10.1124/jpet.103.049346.
25. Przewlocki R., Hassan A.H., Lason W., Epplen C., Herz A., Stein C. Gene expression and localization of opioid peptides in immune cells of inflamed tissue: functional role in antinociception. *Neuroscience*. 1992;48(2):491–500. DOI: 10.1016/0306-4522(92)90509-z.
26. Schäfer M., Carter L., Stein C. Interleukin 1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1994;91(10):4219–4223. DOI: 10.1073/pnas.91.10.4219.
27. Sharp B.M. Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. *Brain Behav. Immun.* 2006;20(1):9–14. DOI: 10.1016/j.bbi.2005.02.00.
28. Smith E.M., Morrill A.C., Meyer W.J. 3rd, Blalock J.E. Corticotropin releasing factor induction of leukocyte-derived immunoreactive ACTH and endorphins. *Nature*. 1986;321(6073):881–882. DOI: 10.1038/321881a0.
29. Stefano G.B., Scharrer B., Smith E.M., Hughes T.K. Jr., Magazine H.I., Bilfinger T.V., et al. Opioid and Opiate Immunoregulatory Processes. *Crit. Rev. Immunol.* 2017;37(2–6):213–248. DOI: 10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.40.
30. Stein C., Hassan A.H., Przewlocki R., Gramsch C., Peter K., Herz A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1990;87(15):5935–5939. DOI: 10.1073/pnas.87.15.5935.
31. Wybran J., Appelboom T., Famaey J.P., Govaerts A. Suggestive evidence for receptors for morphine and methionine-enkephalin on normal human blood T lymphocytes. *J. Immunol.* 1979;123(3):1068–1070.
32. Zurawski G., Benedik M., Kamb B.J., Abrams J.S., Zurawski S.M., Lee F.D. Activation of mouse T-helper cells induces abundant preproenkephalin mRNA synthesis. *Science*. 1986;232(4751):772–775. DOI: 10.1126/science.2938259.

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

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

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

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-24-33>

МОДЕЛЬ ФАТАЛЬНОГО ОСТРОГО ПОРАЖЕНИЯ ЛЕГКИХ И ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА

И.А. Помыткин*, В.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин, М.С. Нестеров, Н.В. Петрова

*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 разработке экспериментальной фатальной модели острого поражения легких и острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) на мышах линии C57Bl/6Y. Модель основана на интратрахеальном введении бактериального липополисахарида (ЛПС) с добавлением иммуномодуляторов мурамилпептида и полного адьюванта Фрейнда мышам, предварительно сенсибилизированным α -галактозилцерамидом. Модель характеризуется диффузным альвеолярным поражением легких, высокой летальностью, многократным повышением мРНК и белка интерлейкина-6 в тканях легкого и может быть использована для оценки эффективности потенциальных средств лечения острого поражения легких и острого респираторного дистресс-синдрома, в т. ч. воспроизводящего существенные признаки ОРДС при COVID-19.

Ключевые слова: острое поражение легких, острый респираторный дистресс-синдром, мыши линии C57Bl/6Y, «цитокиновый шторм», интерлейкин-6, COVID-19

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: 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. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-24-33>

Поступила 29.07.2020

Принята после доработки 08.09.2020

Опубликована 26.10.2020

A MODEL OF FATAL ACUTE LUNG INJURY AND ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

Igor A. Pomytkin*, Vladislav N. Karkischenko, Yuriy V. Fokin, Maxim S. Nesterov, 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, building 1*

This study was aimed at developing an experimental model of fatal acute lung injury and acute respiratory distress syndrome (ARDS) based on the intratracheal administration of bacterial lipopolysaccharide (LPS) in combination with muramylpeptide and Freund's complete adjuvant to C57Bl/6Y mice sensitized with α -galactosylceramide. The developed model is characterized by diffuse alveolar damage to the lungs and high mortality rates, as well as by a multifold increase in the mRNA level of interleukin-6 in the lungs. The model can be used for assessing the efficacy of drug candidates in the treatment of acute lung injury and ARDS, including in COVID-19.

Keywords: acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, C57Bl/6Y mice line, “cytokine storm”, interleukin-6, COVID-19

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

For citation: Pomytkin I.A., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Nesterov M.S., Petrova N.V. A Model of Fatal Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. *Journal Biomed.* 2020;16(4):24–33. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-24-33>

Submitted 29.07.2020

Revised 08.09.2020

Published 26.10.2020

Введение

Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) часто возникает как фатальный конечный результат поражения легких, вызванного инфекцией или другими причинами. ОРДС может возникать при вирусных и бактериальных пневмониях, сепсисе, тяжелой травме, остром панкреатите, аспирации желудочного содержимого, а также при тяжелом течении коронавирусной инфекции COVID-19 [18]. ОРДС характеризуется избыточной продукцией провоспалительных цитокинов и хемокинов, массивной инфильтрацией нейтрофилов в легкие, эндотелиальной дисфункцией, микротромбозом, интерстициальным и альвеолярным отеком, гибелью альвеолярных эпителиальных клеток и активацией макрофагов [16]. Диффузное альвеолярное повреждение легких является типичным гистологическим признаком ОРДС. В настоящее время нет эффективного средства лечения или предупреждения ОРДС, что требует продолжения исследований в этой области, в т. ч. на экспериментальных моделях.

Интратрахеальное введение бактериального липополисахарида широко используется для индукции ОРДС как отдельно, так и в сочетании с другими агентами [4, 8, 12]. Для повышения летальности модели ОРДС мышей иногда сенсибилизируют интратрахеальным введением α -галактозилцерамида за 24 ч до введения липополисахарида. Недостатком этого подхода является необходимость проведения двух хирургических операций под общим наркозом с перерывом 24 ч, что может усложнять интерпретацию результатов, полученных в этой модели,

за счет повышения риска послеоперационных осложнений.

Настоящая работа направлена на разработку менее инвазивной модели фатального ОРДС у мышей линии C57Bl/6Y, воспроизводящей основные характеристические особенности ОРДС, такие как диффузное альвеолярное повреждение легких, высокая летальность и избыточная продукция интерлейкина-6 (IL-6) — ключевого провоспалительного цитокина при многих респираторных заболеваниях, включая COVID-19.

Материалы и методы

Материалы

Все реагенты были получены от Invitrogen («Thermo Fisher Scientific», США) или Sigma-Aldrich («Merck», США).

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, 2, 3].

Модель острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС)

Дизайн

Животные были отобраны в эксперимент методом рандомизации и разделены на 2 группы по 20 особей в каждой. Интактные животные не подвергались какому-либо вмешательству. В другой группе животным вводили ингаляционно внутрилегочно α -галактозилцерамид в дозе 1 мкг/мышь и через 24 ч под общим наркозом вводили интратрахеально смесь липополисахарида *E. coli* в количестве 300 мкг/мышь с добавлением 100 мкг/мышь мурамилпептида, 10 мкл/мышь полного адьюванта Фрейнда, здесь и далее обозначаемую как LPS. После введения LPS выполняли ежедневный подробный клинический осмотр животного в клетке содержания, в руках и на открытой площадке. Отмечали проявление и выраженность, где приемлемо, признаков интоксикации. Оценивались параметры общего состояния подопытных животных: особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координация движений, тонус скелетных мышц, реакция

на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частота и глубина дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова, положение хвоста, количество и консистенция фекальных масс, частота мочеиспускания.

Выделение биоматериала

Животных декапитировали, легкие извлекали и гомогенизировали с использованием прибора для автоматической гомогенизации клеток и тканей MagNa Lyser («Roche»).

ПЦР в реальном времени

Из полученного материала легких выделяли РНК с помощью набора для выделения РНК-экстракта («Синтол», Россия) в соответствии с инструкциями производителя. 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-Л» («ИнтерЛабСервис», Москва) при 37°C — 30 мин в течение одного цикла. Исследование экспрессии гена *IL6*, кодирующего IL-6 в исследуемых пробах, производилось с помощью детектирующего амплификатора CFX-96 («Bio-Rad», США) с использованием прямого праймера 5'-ATGAAGTTCCTCTCTGCAAG-3', обратного праймера 5'-GTGTAATTAAGCCTCCGACT-3', а также ROX-СТТСТТGGGACTGATGCTGGTGACA-VHQ-2 в качестве зонда ПЦР-системы. В качестве референсного гена был выбран ген «домашнего хозяйства» *GAPDH*. Результаты измерений выражались как кратность изменения экспрессии гена *IL6* относительно экспрессии этого же гена у интактных животных.

Измерение цитокинов

Уровни цитокинов определяли в водном экстракте лёгочной ткани и сыворотке крови. Измерения проводились на мульт

типлексном ридере Bio-Plex[®] MAGPIX[™] Multiplex Reader («Bio-Rad», 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).

Гистологические исследования

Гистологическое исследование тканей лёгких проводили на павших или выведенных в установленные сроки животных с помощью передозировки наркоза (диэтилового эфира). Внутренние органы фиксировались в 10% р-ре нейтрального формалина. Затем, после обезвоживания и заливки в парафин, готовились гистологические срезы при помощи микротомы с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином. Гистологические исследования проводились с помощью цифровой микроскопии (микроскоп CX41 фирмы «Olimpus», Япония). Гистологическая картина тканей лёгких представлена рисунками с описанием.

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 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

Состояние животных

После введения LPS наблюдали заторможенную двигательную активность, нарушение координации, недостаточно широкое открытие век и птоз, сниженный блеск глаз и зрачковый статус, низкий тонус мускулатуры и конечностей, нетипичную осанку, низкую реакцию на взятие в руки, сниженный аппетит, потребление воды и мочеиспускание, повышенную вокализацию, атаксию и судорожные реакции. Дыхательный цикл и глубина дыхания были нарушены. В целом общее состояние животных после введения LPS соответствовало развитию ОРДС.

Выживаемость животных

Кривые выживания Каплана — Мейера для интактных животных (Int) и группы мышечной с ОРДС (LPS) показаны на рис. 1. Внутрileгочное ингаляционное введение α -галактозилцерамида с последующим интратрахеальным введением LPS вызвало гибель половины животных в течение первых 24 ч и 90% животных к окончанию эксперимента (336 ч). Существовало статистически значимое отличие между кривыми выживания (логранговый тест Мантеля — Кокса, $p < 0,0001$), причем индукция ОРДС повышала коэффициент риска (логранг hazard ratio) гибели животных в 27,14 раза относительно интактных животных.

Таким образом, настоящая модель ОРДС характеризуется высокой летальностью, что воспроизводит существенный признак ОРДС при различных респираторных заболеваниях, в т. ч. при COVID-19.

Производство цитокинов

Динамика изменений концентраций цитокинов, а именно интерлейкина-1 β (IL-1 β), IL-6, фактора некроза опухоли α (TNF- α) и интерферона- γ (IFN- γ), в сыворотке крови и гомогенатах легких у животных с ОРДС

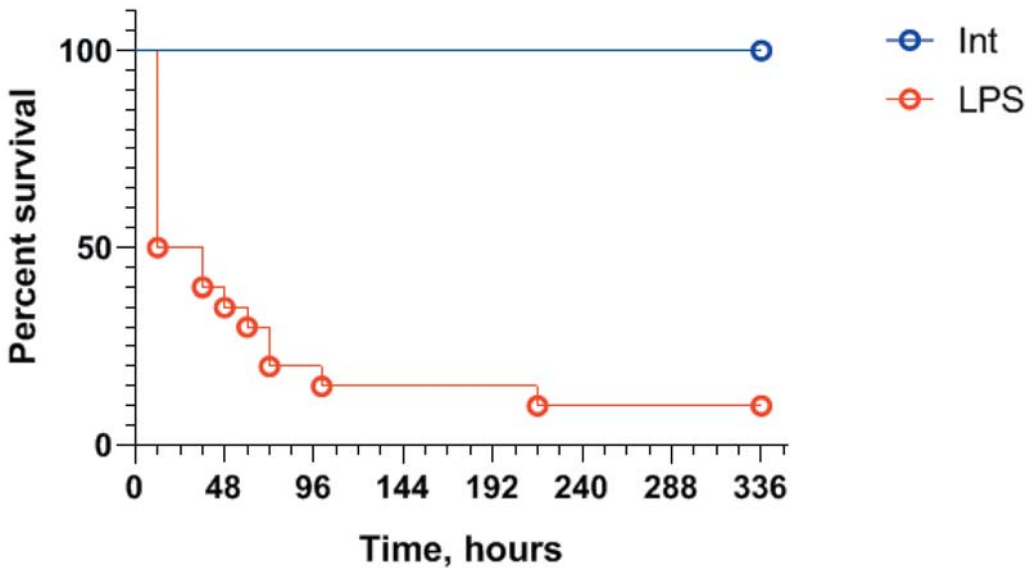


Рис. 1. Кривые выживания Каплана — Мейера для мышей линии C57Bl/6Y с индуцированным острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС). Процент выживания (percent survival) животных с ОРДС (LPS) и интактных животных (Int) в течение всего периода наблюдений (time, hours).

Fig. 1. Kaplan — Meier survival curves for C57Bl/6Y mice with induced acute respiratory distress syndrome (ARDS). The survival rate in animals with ARDS (LPS) and intact animals (Int) during the entire observation period (time, hours).

показана на рис. 2. Не наблюдалось существенных изменений концентраций IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ в сыворотке крови в течение первых 12 ч наблюдений после индукции ОРДС. Не наблюдалось также изменений уровней IL-1 β , TNF- α , IFN- γ в гомогенатах легких животных. Однако уже в первые 2 ч после введения LPS концентрации IL-6 в легких были повышены в 15,9 раза по сравнению с интактным контролем. Еще более значительное повышение концентрации IL-6 в легких в 43,6 раза наблюдалось у погибших животных.

Средний уровень содержания мРНК IL-6 в легких животных с ОРДС ($n=6$) в 6,3 раза ($p<0,01$) превышал уровни мРНК IL-6 у интактных животных.

Таким образом, настоящая модель ОРДС характеризуется многократным повышением уровней как мРНК, так и белка IL-6 в лёгких животных уже в течение первых часов после индукции ОРДС, причем максимальное повышение IL-6 в лёгких на-

блюдалось у погибших животных. Следует отметить, что данное многократное повышение уровней мРНК и белка IL-6 воспроизводит основной характерный признак «цитокинового шторма» у пациентов с тяжелым течением коронавирусной инфекции COVID-19.

Гистологическое исследование

Результаты исследования гистологического строения легких у животных на разных стадиях развития ОРДС показаны на рис. 3.

Индукция ОРДС вызывает существенные изменения в легких. Уже через сутки отмечалась выраженная сосудистая реакция в виде венозного полнокровия капилляров межальвеолярных перегородок, от незначительного до выраженного, с наличием стромальных кровоизлияний разной степени выраженности. Также отмечалась воспалительная инфильтрация вокруг крупных сосудов и по ходу стенок альвеол, интер-

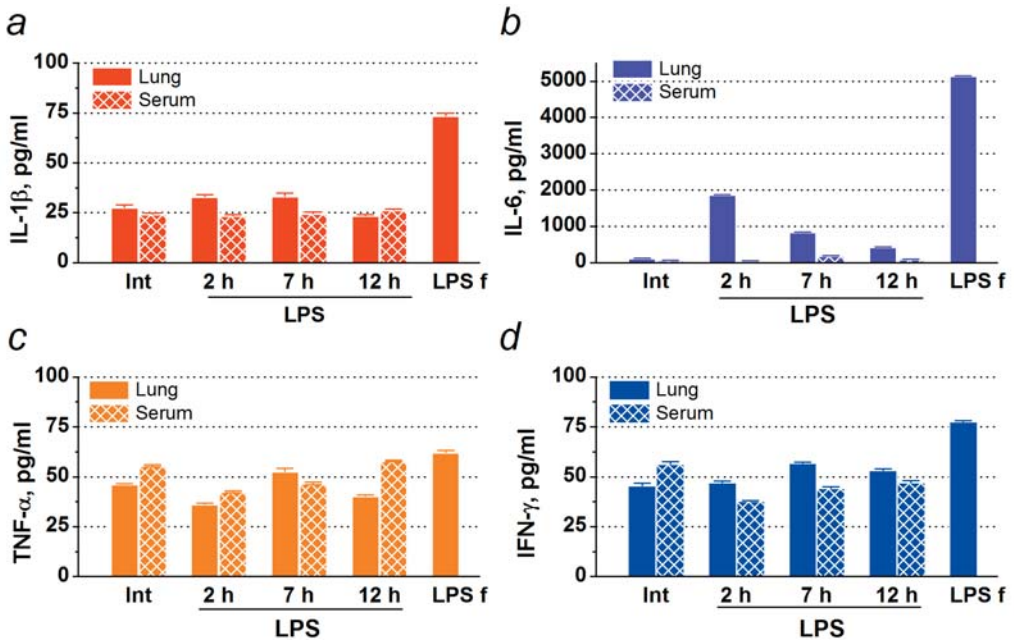


Рис. 2. Концентрации цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ в сыворотке крови и гомогенатах легких у мышей линии C57Bl/6Y через 2, 7 и 12 ч после индукции ОРДС. Int — интактные животные; LPS — животные с индуцированным острым респираторным дистресс-синдромом; LPS f — павшие животные.

Fig. 2. Concentrations of IL-1 β , IL-6, TNF- α and IFN- γ in the blood serum and lung homogenates in C57Bl/6Y mice following 2, 7 and 12 hours after ARDS induction. Int — Intact animals; LPS — animals with induced acute respiratory distress syndrome; LPS f — dead animals.

стициальная периваскулярная и перибронхиолярная инфильтрация разной степени выраженности очагово-диффузного характера, явления незначительно выраженного бронхоолита при отсутствии альвеолярного и бронхолярного экссудата. Клеточный состав инфильтратов характеризовался полиморфностью, был представлен преобладающими лимфоцитами с примесью гистиоцитов, макрофагов, полиморфноядерных лейкоцитов, количество которых было вариабельным, местами с выраженной лейкоцитарной инфильтрацией.

К третьим суткам морфологические изменения в легких в основном характеризовались вентиляционно-перфузионными нарушениями в виде участков мелких ателектазов и дистелектазов, с наличием транссудата в просвете части альвеол, но без формирования лейкоцитарных ста-

зов в микроциркуляторном русле легких. Указанные изменения могут являться морфологическим проявлением нарушений внутриорганной легочной гемодинамики с гипер- и гипоксическим повреждением элементов аэрогематического барьера, и в первую очередь эндотелиоцитов капилляров легких. Вентиляционно-перфузионные нарушения (ателектазы и дистелектазы) могут служить проявлениями первой фазы ОРДС, а в сочетании с наличием разной степени выраженности интерстициальной (преимущественно лимфо-макрофагальной) инфильтрации с утолщением межальвеолярных перегородок, полнокровия (стаза) в сосудах микроциркуляторного русла, интерстициального и альвеолярного отека, наличием геморрагического компонента, разной степени выраженности гигантоклеточной реакции с формированием

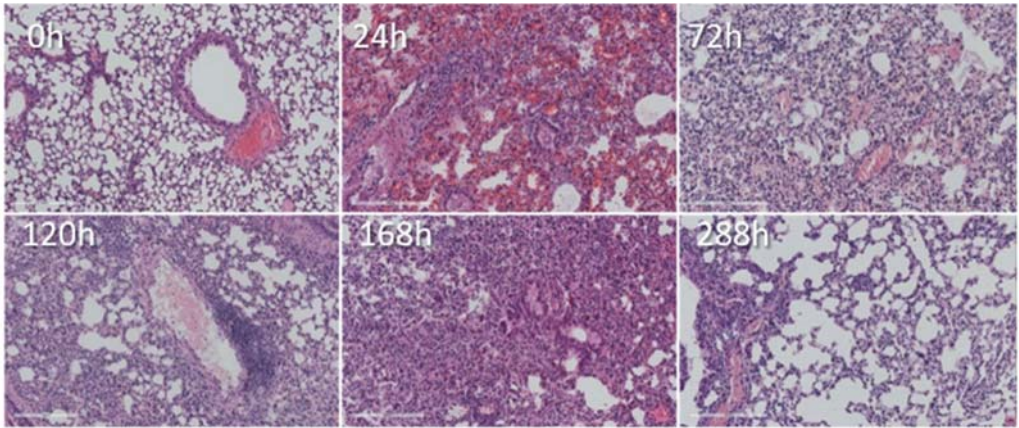


Рис. 3. Гистологическое исследование строения лёгких животных с ОРДС. 0h — до моделирования ОРДС; 24h, 72h, 120h, 168h, 288h — через 24, 72, 120, 168 и 288 ч после индукции ОРДС. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 200$ мкм.

Fig. 3. Histological examination of the lung structure in animals with ARDS. 0h — before ARDS simulation; 24h, 72h, 120h, 168h, 288h — 24, 72, 120, 168 and 288 hours after ARDS induction. Staining with hematoxylin and eosin, magn. $\times 200$.

многоядерных клеток, могут быть проявлением диффузного альвеолярного повреждения.

Особенностью наблюдений стала гистологическая картина бронхопневмонии выраженного характера. При этом слизистая оболочка бронхов и бронхиол отличалась полнокровием, отеком, клеточной инфильтрацией разной степени выраженности с преобладанием полиморфноядерных лейкоцитов и с развитием эндомезобронхита. Выстилающий эпителий слизистой оболочки дистрофически изменен и частично слущен в просвет. Гистологический анализ изменений показал, что все выявленные пневмонии по особенности локализации воспалительного процесса в межуточной ткани легкого носили перибронхиальный и перибронхиолярный характер. Такие пневмонии развиваются, как правило, на фоне вирусных инфекций: воспалительный процесс, начавшись в стенке бронха или бронхиолы, переходит на перибронхиальную ткань и распространяется на прилежащие межальвеолярные перегородки. Также в большей части исследованных образцов морфологические

изменения в легких характеризовались появлением участков ателектазов и дистелектазов разного размера. Данные вентиляционно-перфузионные нарушения проявляются на первой фазе ОРДС, их патогенез развивается во времени и на данном этапе, вероятнее всего, связан с обструкцией и нарушением дренажной функции бронхов в очагах выраженной воспалительной реакции.

В целом гистологическое исследование строения лёгких у животных после индукции ОРДС указывает на острое диффузное альвеолярное повреждение легких с вентиляционно-перфузионными нарушениями (ателектазы и дистелектазы) в сочетании с наличием разной степени выраженности интерстициальной (преимущественно лимфо-макрофагальной) инфильтрации.

Обсуждение результатов

В настоящей работе представлена модель фатального ОРДС, индуцированного ингаляционным внутрилегочным введением α -галактозилцерамида с последующим, через 24 ч, интратрахеальным введением липополисахарида *E. coli* совместно с му-

раммилпептидом и полным адьювантом Фрейнда. Модель характеризуется высокой летальностью, диффузным альвеолярным повреждением легких и многократным повышением экспрессии в легких IL-6, ключевого патогенетического фактора при многих хронических и острых респираторных заболеваниях [5, 6, 9, 17], в т. ч. тяжелом остром респираторном синдроме при COVID-19 [10, 11, 14].

Модель ОРДС построена на гиперактивации системы врожденного иммунитета, а именно на активации рецепторов распознавания патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) липополисахаридом *E. coli*, мурамилпептидом и полным адьювантом Фрейнда. Липополисахарид *E. coli* активирует toll-подобный рецептор 4 (TLR4). Мурамилпептид, являющийся минимальной эффективной структурой в составе адьюванта Фрейнда, активирует NOD2-рецептор [15]. Оба рецептора TLR4 и NOD2 принадлежат PAMP-рецепторам и проявляют синергизм, запуская общий сигнальный механизм канонического пути активации транскрипционного ядерного фактора каппа В (NF-κB) с последующей транскрипцией NF-κB-зависимых генов, кодирующих цитокины, хемокины и другие медиаторы воспаления. Для повышения тяжести моделируемого острого поражения легких в данной модели используется предварительная сенсibilизация клеток иммунной системы α-галактозилцерамидом, активирующим инвариантные натуральные киллеры (iNKT). Последние усугубляют воспалительный ответ, взаимодействуя с другими типами иммунных клеток и секретируя интерферон-γ [7].

Настоящая модель «цитокинового шторма» и ОРДС имеет универсальный характер, т. к. канонический путь активации NF-κB является общим сигнальным путем

для множества рецепторов, распознающих патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, в т. ч. рецепторов, распознающих вирусную одноцепочечную РНК (ssRNA) и двухцепочечную РНК (dsRNA) [13]. В этом контексте воспалительный процесс в легких, моделируемый в настоящей модели ОРДС, имеет те же характерные особенности, что и воспалительный процесс, запускаемый вирусами и др. патогенами.

Таким образом, настоящая модель острого поражения легких и ОРДС может быть использована для тестирования молекул-кандидатов, предназначенных для лечения широкого спектра респираторных заболеваний, для которых активация канонического пути активации NF-κB и избыточная продукция IL-6 являются характерными особенностями. К числу таких заболеваний относятся пневмонии различной этиологии, хроническая обструктивная болезнь легких и тяжелый острый респираторный синдром при COVID-19.

Заключение

В настоящей работе представлена экспериментальная модель «цитокинового шторма», острого поражения легких и острого респираторного дистресс-синдрома. Модель характеризуется высокой летальностью, диффузным альвеолярным поражением легких и многократным повышением интерлейкина-6 в тканях легкого. Эта модель является «стерильной», т. е. исключает использование патогенов в моделировании ОРДС, не требует связанных с этим специальных условий работы и поэтому может быть широко использована для оценки эффективности молекул-кандидатов в лечении инфекционных респираторных заболеваний, сопровождающихся повышенной активностью IL-6, в т. ч. вирусных пневмоний и COVID-19.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Каркищенко Н.Н. *Альтернативы биомедицины. Т. 1. Основы биомедицины и фармакоmodellirovaniya*. М.: Изд-во ВПК, 2007. 320 с. [Karkischenko N.N. *Alternativny biomeditsiny. T. 1. Osnovy biomeditsiny i farmakomodellirovaniya* [Biomedicine alternatives. Vol. 1. Fundamentals of biomedicine and pharmaco-modeling]. Moscow: Izdatel'stvo VPK, 2007. 320 p. (In Russian)].
- Каркищенко Н.Н. *Основы биомоделирования*. М.: Межакадемическое изд-во ВПК, 2004. 607 с. [Karkischenko N.N. *Osnovy biomodellirovaniya* [Basics of biomodeling]. Moscow: Mezhakademicheskoye Izdatel'stvo VPK, 2004. 607 p. (In Russian)].
- 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 zhitvotnym i al'ternativnym 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 p. (In Russian)].
- Aoyagi T., Yamamoto N., Hatta M., Tanno D., Miyazato A., Ishii K., et al. Activation of pulmonary invariant NKT cells leads to exacerbation of acute lung injury caused by LPS through local production of IFN- γ and TNF- α by Gr-1+ monocytes. *Int. Immunol.* 2011;23(2):97–108.
- 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.
- 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.
- Crosby C.M., Kronenberg M. Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2018;18(9):559–574.
- D'Alessio F.R. Mouse Models of Acute Lung Injury and ARDS. *Methods Mol. Biol.* 2018;1809:341–350.
- Davey R.T. Jr., Lynfield R., Dwyer D.E., Losso M.H., Cozzi-Lepri A., Wentworth D., et al. INSIGHT FLU 002 & 003 Study Groups. The association between serum biomarkers and disease outcome in influenza A(H1N1)pdm09 virus infection: results of two international observational cohort studies. *PLoS One.* 2013;8(2):e57121.
- 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.
- 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.
- Kudo D., Toyama M., Aoyagi T., Akahori Y., Yamamoto H., Ishii K., et al. Involvement of high mobility group box 1 and the therapeutic effect of recombinant thrombomodulin in a mouse model of severe acute respiratory distress syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 2013;173(2):276–287.
- Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2017;2. DOI: 10.1038/sigtrans.2017.23.
- 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.
- Ogawa C., Liu Y.J., Kobayashi K.S. Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy. *Curr. Bioact. Compd.* 2011;7(3):180–197.
- Potey P.M., Rossi A.G., Lucas C.D., Dorward D.A. Neutrophils in the initiation and resolution of acute pulmonary inflammation: understanding biological function and therapeutic potential. *J. Pathol.* 2019;247(5):672–685.
- 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.
- Zhao J., Li X., Gao Y., Huang W. Risk factors for the exacerbation of patients with 2019 Novel Coronavirus: A meta-analysis. *Int. J. Med. Sci.* 2020;17(12):1744–1750.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

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

Фокин Юрий Владимирович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: fokin@scbmt.ru

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

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

Yuriy V. Fokin, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: fokin@scbmt.ru

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

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

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



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

В.Н. Каркищенко¹, И.А. Помыткин^{1*}, Н.В. Петрова¹, М.С. Нестеров¹, Р.А. Агельдинов¹,
Л.В. Зотова¹, Е.М. Колоскова¹, В.В. Слободенюк¹, В.И. Скворцова²

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-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. Индукция ОРДС α -галактозилцерамидом и липополисахаридом *E. coli* приводила к многократному повышению экспрессии цитокинов в легких. Введение лейтрагина в сочетании с внутримышечной инъекцией 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. Karkischenko¹, Igor A. Pomytkin^{1*}, Nataliya V. Petrova¹, Maxim S. Nesterov¹, Ruslan A. Ageldinov¹, Lyudmila V. Zotova¹, Elena M. Koloskova¹, Vladimir V. Slobodenyuk¹, Veronika I. Skvortsova²

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 leutrugin, 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-1 β (IL-1 β), 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 leutrugin 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 leutrugin for suppressing “cytokine storm” syndromes may be an effective approach to the treatment of this coronavirus infection.

Keywords: leutrugin, 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. Leutrugin 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-1 β (IL-1 β), 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, антаго-

нист 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 В (NF- κ B) 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- κ B запускает транскрипцию генов, кодирующих цитокины, хемокины и дополнительные медиаторы воспаления в различных типах врожденных иммунных клеток. Поэтому NF- κ B 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 Tug-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 естественном-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 адьюванта 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 внутривенно 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-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 про-

водили согласно инструкции «Комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК. РЕВЕРТА-Л» («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
<i>IL1B</i>	F	5'-GAGAACCAAGCAACGACAAA-3'
	R	5'-CTTGTTGAAGACAACCGTT-3'
	Z	ROX-TAATGAAAGACGGCACCACCCCT-BHQ2
<i>IL6</i>	F	5'-ATGAAGTTCCTCTGCAAG-3'
	R	5'-GTGTAATTAAGCCTCCGACT-3'
	Z	ROX-CTTCTGGGACTGATGCTGGTGACA-BHQ-2
<i>TNFA</i>	F	5'-TCTGTCTCTCACCTGCTCTG-3'
	R	5'-GGTTCACAGATGTGTACAGA-3'
	Z	ROX-GAATGGATGGGCTACATAAGTTACG-BHQ2
<i>IFNA</i>	F	5'-ATCAAACAGCCAGAACACC-3'
	R	5'-GGCTTCTTGTCTCCTGAGGT-3'
	Z	ROX-GGCTCTGTGCTTTCCTGATGGTTTT-BHQ2
<i>IFNB</i>	F	5'-CACCACAGCCCTCCATCA-3'
	R	5'-GCATCTTCTCCGTCATCC-3'
	Z	ROX-GGCTCTGTGCTTTCCTGATGGTTTT-BHQ2

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

Note: F — direct 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: толь-

ко внутримышечной инъекцией (LPS+L1) или сочетанным введением, внутримышечной инъекцией и ингаляцией (LPS+L2). Экспрессию IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- α и IFN- β в легких измеряли методом ПЦР в реальном времени. Результаты представлены на рисунке как среднее значение \pm ошибка среднего кратного изменения уровней мРНК отдельных цитокинов относительно наблюдаемого у интактных животных ($n=6$).

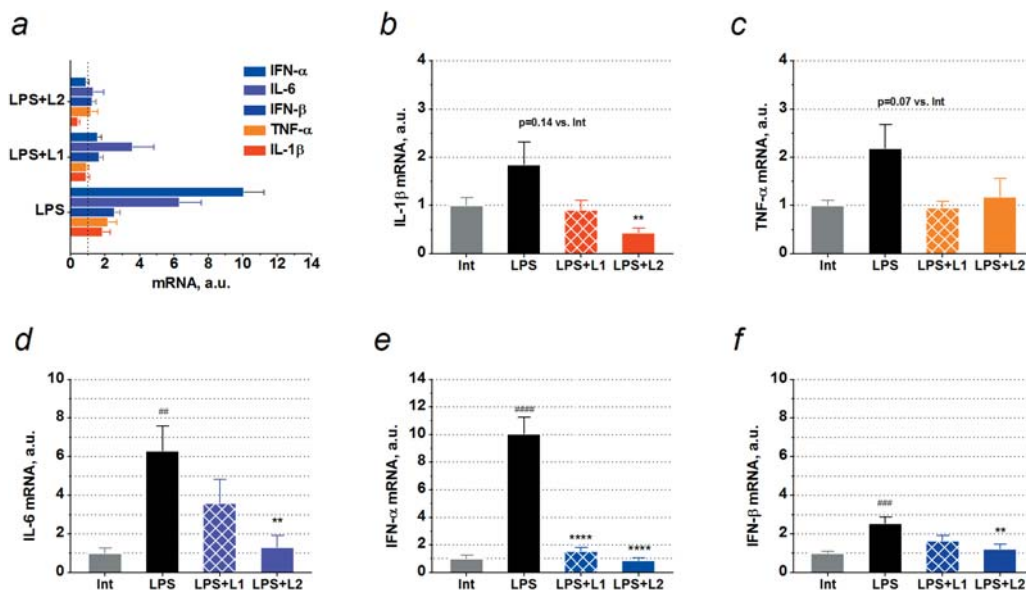


Рис. Эффекты лейтрагина на экспрессию цитокинов в легких мышей линии C57BL/6Y с индуцированным острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС): (a) — кратное изменение уровней мРНК (mRNA) цитокинов IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- α и IFN- β в легких животных с ОРДС («LPS»), а также получивших лейтрагин внутримышечной 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-1 β , 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» (одnofакторный дисперсионный анализ, тест Тьюки).

Fig. Effects of leutragin 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-1 β , 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 leutragin 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-1 β , 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 leutragin 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’s 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-1 β 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-1 β (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-1 β — 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 динарфина 1-6, подавляет экспрессию цитокинов в условиях «цитокинового шторма», причем ингибиторный эффект реализуется на уровне транскрипции, о чем свидетельствуют результаты ПЩР в реальном времени. Ингибирование транскрипции цитокинов IL-1 β , 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 моноведения. 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-1 β , 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- κ B 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- κ B. Однако ингибирование NF- κ B 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- κ B ведет к экспрессии IL-1 β , 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- κ B 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- κ B, 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-1 β , 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. Neirovizualizatsiya effektivov psikoaktivnykh sredstv posredstvom normalizatsii 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 zhitotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskih 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

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

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

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

Зотова Людмила Вадимовна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
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

Слободенюк Владимир Владимирович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
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

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

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

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

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

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

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

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



ЛЕЙТРАГИН ПОВЫШАЕТ ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЖИВОТНЫХ В МОДЕЛИ ФАТАЛЬНОГО ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА ПРИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОМ И ЛЕЧЕБНОМ РЕЖИМАХ ВВЕДЕНИЯ

В.Н. Каркищенко, И.А. Помыткин^{*}, М.Т. Гасанов, М.С. Нестеров, Ю.В. Фокин,
Л.А. Таболякова, О.В. Алимкина, Д.В. Хвостов

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 лейтрагина, опиоидного пептида — аналога эндогенного динорфина 1-6, на выживаемость животных в экспериментальной фатальной модели «цитокинового шторма» и острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) у мышей линии C57Bl/6Y при разных режимах введения. Актуальность поиска новых средств лечения ОРДС связана с пандемией COVID-19, для которого эти факторы обуславливают тяжелое течение болезни. Нами впервые показано, что введение лейтрагина в сочетанном режиме, внутримышечная инъекция плюс ингаляция, приводило к статистически значимому повышению выживаемости животных как в режиме лечения (после индукции ОРДС), так и при профилактическом курсовом введении (до индукции ОРДС). Лейтрагин многократно снизил коэффициенты риска гибели животных с ОРДС относительно контроля. Обнаруженное нами профилактическое действие лейтрагина заслуживает особого внимания, т. к. оно позволяет предотвратить возникновение заболевания, переход легкой стадии поражения легких в тяжелую, а также уменьшить риск развития ОРДС и снизить риск летального исхода. Таким образом, использование лейтрагина может быть новым эффективным подходом к лечению и профилактике респираторных заболеваний, сопровождающихся «цитокиновым штормом» и ОРДС, в т. ч. коронавирусной инфекции COVID-19.

Ключевые слова: лейтрагин, острый респираторный дистресс-синдром, мыши линии C57Bl/6Y, «цитокиновый шторм», выживаемость, лечение, профилактика, COVID-19

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Гасанов М.Т., Нестеров М.С., Фокин Ю.В., Таболякова Л.А., Алимкина О.В., Хвостов Д.В. Лейтрагин повышает выживаемость животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома при профилактическом и лечебном режимах введения. *Биомедицина*. 2020;16(4):44–51. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-44-51>

Поступила 29.07.2020

Принята после доработки 08.09.2020

Опубликована 26.10.2020

PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC ADMINISTRATION OF LEUTRAGIN INCREASES THE SURVIVAL RATE OF ANIMALS IN A MODEL OF FATAL ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

Vladislav N. Karkischenko, Igor A. Pomytkin*, Melik T. Gasanov, Maxim S. Nesterov,
Yuriy V. Fokin, Lidiya A. Taboyakova, Oksana V. Alimkina, Daniil V. Khvostov

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 leutrugin, an opioid peptide analogue of endogenous dynorphin 1-6, on animal survival in an experimental model of “cytokine storm” and fatal acute respiratory distress syndrome (ARDS) in C57Bl/6Y mice under different administration regimens. The aforementioned factors cause a severe course of COVID-19, which explains the current interest in seeking new treatments for ARDS. It was shown that both the prophylactic (before ARDS induction) and therapeutic (after ARDS induction) administration of leutrugin in a combined mode — intramuscular injection plus inhalation — leads to a statistically significant increase in the survival rate of animals. Compared to the control, leutrugin significantly reduced the risk of death in animals with ARDS. The discovered prophylactic effect of leutrugin deserves special attention due to its potential in preventing the onset of the disease and impeding the development of severe lung damage, thus reducing the risk of ARDS and fatal outcomes. Thus, the use of leutrugin can be seen as a new effective approach to the treatment and prevention of respiratory diseases associated with a “cytokine storm” and ARDS, including the coronavirus infection COVID-19.

Keywords: leutrugin, acute respiratory distress syndrome, C57Bl/6Y mice, “cytokine storm”, survival, treatment, prophylaxis, COVID-19

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

For citation: Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Gasanov M.T., Nesterov M.S., Fokin Yu.V., Taboyakova L.A., Alimkina O.V., Khvostov D.V. Prophylactic and Therapeutic Administration of Leutrugin Increases the Survival Rate of Animals in a Model of Fatal Acute Respiratory Distress Syndrome. *Journal Biomed.* 2020;16(4):44–51. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-44-51>

Submitted 29.07.2020

Revised 08.09.2020

Published 26.10.2020

Введение

Лейтрагин — это опиоидный пептид с аминокислотной последовательностью Туг-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, структурный аналог эндогенного опиоидного пептида динорфин 1-6, полученный заменой остатка Gly во втором положении динорфина на D-Ala. Лейтрагин обладает сходным с динорфином 1-6 профилем опиоидной активности и преимущественно связывается с δ -рецепторами [5, 14]. Динорфин 1-6 способен ингибировать канонический путь активации транскрипционного ядерного фактора каппа В (NF- κ B), подавляя таким образом транс-

крипционную активацию NF- κ B-зависимых генов, кодирующих провоспалительные цитокины, хемокины и другие медиаторы воспаления [8, 12]. Подобная способность лейтрагина подавлять транскрипцию генов провоспалительных цитокинов, особенно интерлейкина-6 (IL-6), у животных в модели «цитокинового шторма» и фатального острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) была показана нами в одной из статей настоящего выпуска.

Цель настоящей работы — исследовать эффективность лейтрагина для снижения

гибели животных в использованной экспериментальной модели ОРДС в разных режимах введения, а именно в режиме лечения (после индукции ОРДС), режиме профилактики (после индукции ОРДС), а также в смешанном режиме профилактики и лечения, до и после индукции ОРДС.

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. 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, 2, 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 — смесью липополисахарида *E. coli* в количестве 300 мкг/мышь, 100 мкг/мышь мурамил-пептида и 10 мкл/мышь полного адьюванта Фрейнда, здесь и далее обозначаемую как «LPS», интратрахеально под общим наркозом (золетил+ксилазин).

Введение препаратов

Для оценки эффекта лейтрагина на выживаемость животных при введении в режиме лечения животные были отобраны в эксперимент методом рандомизации и разделены на 4 группы по 20 особей в каждой. В первой и второй группах животные не подвергались оперативному вмешательству. Животные в первой группе получали физ. р-р внутримышечно (группа «Saline») ежедневно однократно, а во второй группе — лейтрагин внутримышечно в дозе 10 мкг/кг и внутривенно ингаляционно в дозе 100 мкг/кг (группа «L»). Через 30 мин после индукции ОРДС и далее ежедневно животные третьей группы получали физ. р-р внутримышечно (группа «LPS»), а в четвертой группе — лейтрагин внутримышечно в дозе 10 мкг/кг и внутривенно ингаляционно в дозе 100 мкг/кг (группа «LPS+L»). Выживаемость животных наблюдали в течение 336 ч.

Для оценки эффекта лейтрагина на выживаемость животных при введении в режиме профилактики животные были отобраны в эксперимент методом рандомизации и разделены на 3 группы. Животным во всех группах индуцировали ОРДС. Животные первой группы через 30 мин после индукции ОРДС и далее ежедневно получали физ. р-р внутримышечно (группа «LPS+Saline», $n=10$). Во второй группе животные получали лейтрагин внутримы-

шечно в дозе 10 мг/кг и внутрилегочно ингаляционно в дозе 100 мг/кг до индукции ОРДС в течение 6-ти дней однократно (группа «LPS+L1», $n=20$). В третьей группе животные получали лейтрагин внутримышечно в дозе 10 мг/кг и внутрилегочно ингаляционно в дозе 100 мг/кг до индукции ОРДС в течение 6-ти дней и после индукции ОРДС ежедневно однократно (группа «LPS+L2», $n=20$). Выживаемость животных наблюдали в течение 120 ч.

Статистическая обработка

В статистическом анализе кривых выживаемости использовался метод Каплана—Мейера с оценкой коэффициентов риска (hazard ratio) по Мантелю — Ханзелу, с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Различия между группами считались статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты исследований

Введение лейтрагина в режиме лечения повышает выживаемость животных с ОРДС

Для того чтобы оценить эффекты лейтрагина на выживаемость животных с «цитокиневым штормом» и ОРДС, животным

индуцировали ОРДС и вводили физ. р-р (LPS) или лейтрагин сочетанно внутримышечно и ингаляционно (LPS+L), как описано в разделе «Материалы и методы». В двух контрольных группах без ОРДС животным вводили физ. р-р внутримышечно (Saline) или лейтрагин внутримышечно в дозе 10 мг/кг и внутрилегочно ингаляционно в дозе 100 мг/кг (L). Схема введения препаратов показана на рис. 1а. Выживаемость животных наблюдали в течение 336 ч. Результаты представлены на рис. 1б в виде кривых выживаемости Каплана — Мейера.

Анализ кривых выживаемости свидетельствует о наличии статистически значимых отличий между группами (логранговый тест Мантеля — Кокса, $p<0,0001$). Индукция ОРДС вызвала гибель 50 и 90% животных в течение 12 и 336 ч соответственно (LPS). Сочетанное ежедневное введение лейтрагина животным с ОРДС, инъекционно (внутримышечно) и ингаляционно, существенно повысило их выживаемость (LPS+L; $p<0,0001$) по сравнению с нелечеными животными с ОРДС (LPS), при этом лейтрагин снизил коэффициент риска гибели (hazard ratio) у животных

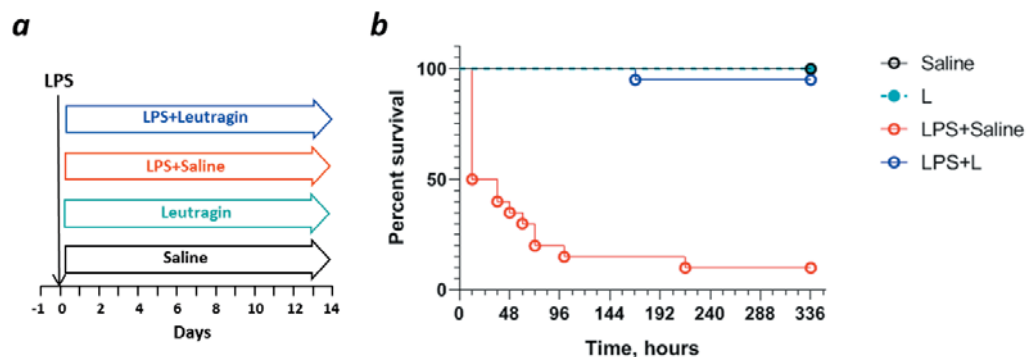


Рис. 1. Кривые выживаемости Каплана — Мейера для мышей линии C57Bl/6Y с острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС): (а) — схема введения веществ; (б) — процент выживания (percent survival) животных без ОРДС, получавших физ. р-р (Saline) или лейтрагин (L), а также животных с ОРДС, получавших физ. р-р (LPS) или лейтрагин (LPS+L).

Fig. 1. Kaplan-Meier survival curves for C57Bl/6Y mice with acute respiratory distress syndrome (ARDS): (a) — administration regimens; (b) — survival rates of animals without ARDS treated with saline (Saline) or leutragin (L), and animals with ARDS treated with saline (LPS) or leutragin (LPS+L).

с ОРДС в 30,1 раза относительно нелеченых животных с ОРДС.

Таким образом, введение лейтрагина в режиме лечения (после индукции ОРДС) эффективно повышало выживаемость животных с «цитокиновым штормом» и ОРДС.

Профилактическое введение лейтрагина повышает выживаемость животных с ОРДС

Для того чтобы оценить эффект профилактического введения лейтрагина на выживаемость животных с «цитокиновым штормом» и ОРДС, животным вводили лейтрагин в течение 6-ти дней до индукции ОРДС (рис. 2b; LPS+L1) или в течение 6-ти дней до и 6-ти дней после индукции ОРДС (рис. 2c; LPS+L2), как описано в разделе «Материалы и методы». Животным контрольной группы вводили физ. р-р после индукции ОРДС (рис. 2a; LPS+Saline). Выживаемость животных наблюдали в течение 120 ч после индукции ОРДС. Результаты представлены на рис. 2d в виде кривых выживаемости Каплана — Мейера.

Анализ кривых Каплана — Мейера показывает, что существует статистически значимое отличие между группами (логранговый тест Мантеля — Кокса, $p < 0,0001$). Попарное сравнение кривых показывает, что лейтрагин при профилактическом введении (LPS+L1) статистически значимо снизил гибель животных с ОРДС ($p = 0,0002$) по сравнению с нелечеными животными с ОРДС (LPS+Saline), а также снизил коэффициент риска гибели (hazard ratio) животных в 16,7 раза относительно нелеченых животных с ОРДС. Таким образом, лейтрагин эффективно снижал гибель животных при профилактическом введении (до индукции ОРДС).

Введение лейтрагина в смешанном режиме до и после индукции ОРДС (LPS+L2) еще более эффективно снизило гибель животных ($p < 0,0001$) и уменьшило коэффициент риска гибели (hazard ratio) животных в 49,5 раза относительно нелеченых животных с ОРДС.

Обсуждение результатов

В настоящей работе впервые показано, что лейтрагин, аналог эндогенного динорфина 1-6, статистически значимо повышал

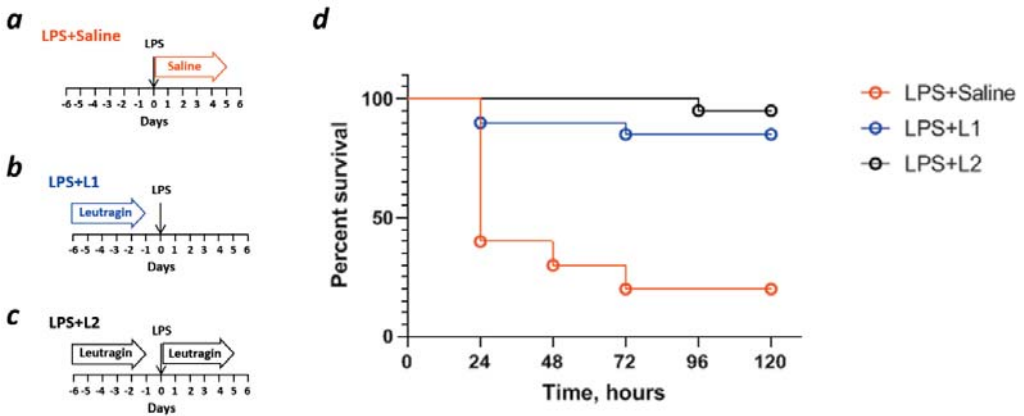


Рис. 2. Кривые выживаемости Каплана — Мейера для мышей линии C57Bl/6Y с острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС): (a), (b), (c) — схемы введения веществ; (d) — процент выживания (percent survival) животных, получавших физ. р-р после индукции ОРДС (LPS+Saline), получавших лейтрагин до индукции ОРДС (LPS+L1), или получавших лейтрагин до и после индукции ОРДС (LPS+L2).

Fig. 2. Kaplan-Meier survival curves for C57Bl/6Y mice with acute respiratory distress syndrome (ARDS): (a), (b), (c) — administration regimens; (d) — survival rates of animals treated with saline after ARDS induction (LPS+Saline), treated with leutragin before ARDS induction (LPS+L1), or treated with leutragin before and after ARDS induction (LPS+L2).

выживаемость животных в модели «цитокриновое шторма» и острого фатального дистресс-синдрома при введении в режиме лечения после индукции ОРДС, режиме профилактики до индукции ОРДС, а также в смешанном режиме — до и после ОРДС.

При введении в режиме лечения, после индукции ОРДС, лейтрагин повысил выживаемость животных с 10 до 95% (рис. 1b; 336 ч) и снизил коэффициент риска гибели (hazard ratio) животных в 30,1 раза относительно нелеченых животных с ОРДС.

В другой серии экспериментов, при профилактическом введении до индукции ОРДС, лейтрагин повысил выживаемость животных с 20 до 85% (рис. 2d; 120 ч) и снизил коэффициент риска гибели животных в 16,7 раза относительно нелеченых животных с ОРДС. В этой же серии смешанное профилактическое (до ОРДС) и лечебное введение лейтрагина (после ОРДС) повысило выживаемость животных до 95% и снизило коэффициент риска гибели животных почти в 50 раз относительно нелеченых животных с ОРДС.

Ранее мы показали, что лейтрагин ингибирует экспрессию провоспалительных цитокинов у животных в этой же модели ОРДС, которая построена как двухэтапный процесс гиперактивации системы врожденного иммунитета [4, 7, 11]. Внутривенное введение α -галактозилцерамида сенситизирует систему врожденного иммунитета, активируя инвариантные натуральные киллеры (iN-kT) [6]. Последующее интратрахеальное введение липополисахарида *E. coli*, мурамилпептида и полного адьюванта Фрейнда активирует соответствующие рецепторы распознавания патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP), а именно toll-подобный рецептор 4 (TLR4) в случае липополисахарида, и NOD2-рецептор в случае мурамилпептида и полного адьюванта Фрейнда [13]. TLR4/NOD2 рецепторы запускают канонический путь активации ядерного фактора

каппа В (NF- κ B), приводящий к транскрипции генов, кодирующих провоспалительные цитокины, хемокины и др. медиаторы воспаления. Таким образом, активация NF- κ B и экспрессия провоспалительных цитокинов лежит в основе «цитокриновое шторма» и ОРДС в указанной модели.

Ранее мы показали, что лейтрагин ингибирует экспрессию провоспалительных цитокинов, особенно интерлейкина-6, в этой модели. В контексте ключевой роли, которую играет повышенная экспрессия провоспалительных цитокинов в развитии ОРДС, повышение выживаемости животных при введении лейтрагина, вероятнее всего, связано именно с его способностью ингибировать экспрессию провоспалительных цитокинов и «цитокриновое шторм» в этой модели.

Обнаруженный нами эффект профилактического действия лейтрагина в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома заслуживает особого внимания, т. к. он позволяет предотвратить возникновение заболевания или переход легкой стадии поражения легких в тяжелую, а также уменьшить риск развития ОРДС и снизить риск летального исхода.

Актуальность поиска новых средств лечения «цитокриновое шторма» и ОРДС связана с развитием пандемии COVID-19, для которого эти факторы, особенно повышенная продукция интерлейкина-6, обуславливают тяжелое течение болезни [9, 10].

Заключение

В настоящей работе впервые показано, что лейтрагин, аналог эндогенного динорфина 1-6, повышает выживаемость животных в модели «цитокриновое шторма» и острого фатального дистресс-синдрома при введении в режиме как профилактики, так и лечения.

Обнаруженный нами эффект повышения выживаемости животных при профилактическом применении лейтрагина заслуживает особого внимания, т. к. этот эффект

позволяет предотвратить возникновение заболевания, переход легкой стадии поражения легких в тяжелую, уменьшить риск развития ОРДС, а также снизить риск летального исхода в условиях «цитокинового шторма» и ОРДС.

В целом полученные в настоящей работе результаты подтверждают выдвинутую

нами гипотезу, что опиоидергическая система иммунных клеток представляет собой фармакологическую мишень в терапии «цитокинового шторма», и воздействие на эту систему открывает перспективы лечения жизнеугрожающих состояний, в т. ч. тяжелого острого респираторного синдрома при COVID-19.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко Н.Н. *Альтернативы биомедицины. Т. 1. Основы биомедицины и фармакомоделирования*. М.: Изд-во ВПК, 2007. 320 с. [Karkischenko N.N. *Alternativy biomeditsiny. T. 1. Osnovy biomeditsiny i farmakomodirovaniya [Biomedicine alternatives. Vol. 1. Fundamentals of biomedicine and pharmaco-modeling]*. 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 zivotnym i alternativnym modelyam v biomeditsinskih 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. Aoyagi T., Yamamoto N., Hatta M., Tanno D., Miyazato A., Ishii K., et al. Activation of pulmonary invariant NKT cells leads to exacerbation of acute lung injury caused by LPS through local production of IFN- γ and TNF- α by Gr-1+ monocytes. *Int. Immunol.* 2011;23(2):97–108.
5. Corbett A.D., Paterson S.J., McKnight A.T., Magnan J., Kosterlitz H.W. Dynorphin and dynorphin are ligands for the kappa-subtype of opiate receptor. *Nature.* 1982;299(5878):79–81. DOI: 10.1038/299079a0.
6. Crosby C.M., Kronenberg M. Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2018;18(9):559–574.
7. D'Alessio F.R. Mouse Models of Acute Lung Injury and ARDS. *Methods Mol. Biol.* 2018;1809:341–350.
8. 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.
9. Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Polinova A.I., Drutsкая M.S. IL-6: Relevance for immunopathology of SARS-CoV-2. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020;53:13–24.
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.
11. Kudo D., Toyama M., Aoyagi T., Akahori Y., Yamamoto H., Ishii K., et al. Involvement of high mobility group box 1 and the therapeutic effect of recombinant thrombomodulin in a mouse model of severe acute respiratory distress syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 2013;173(2):276–287.
12. Mitchell S., Vargas J., Hoffmann A. Signaling via the NFkB system. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2016;8(3):227–241. DOI: 10.1002/wsbm.1331.
13. Ogawa C., Liu Y.J., Kobayashi K.S. Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy. *Curr. Bioact. Compd.* 2011;7(3):180–197.
14. Yarygin K.N. The interactions of opioids with enterocytes membranes: evidence for enzyme-catalysed covalent binding. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1990;55:2328–2338.

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

Гасанов Мелик Тофикович, к.м.н., доц., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: m.gasanov@scbmt.ru

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

Фокин Юрий Владимирович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: fokin@scbmt.ru

Табоякова Лидия Александровна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: lida-vet@mail.ru

Алимкина Оксана Владимировна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: alimkina@scbmt.ru

Хвостов Даниил Владиславович, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: daniil_hvostov@mail.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

Melik T. Gasanov, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: m.gasanov@scbmt.ru

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

Yuriy V. Fokin, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: fokin@scbmt.ru

Lidiya A. Taboyakova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: lida-vet@mail.ru

Oksana V. Alimkina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: alimkina@scbmt.ru

Daniil V. Khvostov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: daniil_hvostov@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



СОЧЕТАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕЙТРАГИНА И ЛЕГОЧНОГО СУРФАКТАНТА-БЛ ПОВЫШАЕТ ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЖИВОТНЫХ В МОДЕЛИ ФАТАЛЬНОГО ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА

В.Н. Каркищенко¹, И.А. Помыткин^{1*}, М.Т. Гасанов¹, О.И. Степанова¹, Р.А. Клёсов¹,
Н.С. Огнева¹, Е.С. Савченко¹, В.И. Скворцова²

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 сочетанного применения лейтрагина, стабилизированного аналога эндогенного гексапептида динорфин 1-6, и легочного сурфактанта-БЛ на выживаемость животных в экспериментальной фатальной модели «цитокинового шторма» и острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) у мышей линии C57Bl/6Y. Введение лейтрагина и легочного сурфактанта-БЛ в сочетанном режиме приводило к статистически значимому повышению выживаемости и снижению риска гибели животных с ОРДС по сравнению с контролем. Показано, что подавление продукции провоспалительных цитокинов в легких с одновременным восполнением потерь эндогенного сурфактанта за счет введения экзогенного легочного сурфактанта является многообещающим новым фармакологическим подходом к лечению ОРДС, сопровождающегося «цитокиновым штормом».

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

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Гасанов М.Т., Степанова О.И., Клёсов Р.А., Огнева Н.С., Савченко Е.С., Скворцова В.И. Сочетанное применение лейтрагина и легочного сурфактанта-БЛ повышает выживаемость животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома. *Биомедицина*. 2020;16(4):52–59. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-52-59>

Поступила 29.07.2020

Принята после доработки 08.09.2020

Опубликована 26.10.2020

THE COMBINED USE OF LEUTRAGIN AND PULMONARY SURFACTANT-BL INCREASES ANIMAL SURVIVAL IN A MODEL OF FATAL ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

Vladislav N. Karkischenko¹, Igor A. Pomytkin^{1*}, Melik T. Gasanov¹, Olga I. Stepanova¹,
Roman A. Klesov¹, Nastasya S. Ogneva¹, Elena S. Savchenko¹, Veronika I. Skvortsova²

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 leutrugin — a stabilized analogue of the endogenous hexapeptide dynorphin 1-6 — in combination with pulmonary surfactant-BL on animal survival in an experimental fatal model of “cytokine storm” and acute respiratory distress syndrome (ARDS) in C57Bl/6Y mice. Compared to the control, administration of leutrugin and pulmonary surfactant-BL in a combined regimen led to a statistically significant increase in the survival rate and a decrease in the risk of death in animals with ARDS. It was shown that the suppression of proinflammatory cytokine production in the lungs with a simultaneous replenishment of the endogenous surfactant with an exogenous pulmonary surfactant is a promising new pharmacological approach to the treatment of ARDS accompanied by a “cytokine storm”.

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

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

For citation: Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Gasanov M.T., Stepanova O.I., Klesov R.A., Ogneva N.S., Savchenko E.S., Skvortsova V.I. The Combined Use of Leutrugin and Pulmonary Surfactant-BL Increases Animal Survival in a Model of Fatal Acute Respiratory Distress Syndrome. *Journal Biomed.* 2020;16(4):52–59. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-52-59>

Submitted 29.07.2020

Revised 08.09.2020

Published 26.10.2020

Введение

Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) — это остро возникающее диффузное воспалительное поражение паренхимы легких, развивающееся как неспецифическая реакция на различные повреждающие факторы и приводящее к формированию острой дыхательной недостаточности вследствие нарушения структуры легочной ткани и уменьшения массы аэрированной легочной ткани. ОРДС может возникать как результат действия прямых повреждающих факторов, таких как лёгочная инфекция, тупая травма груди, аспирационный синдром, а также непрямых повреждающих факторов, таких

как шок, сепсис, острый панкреатит, травма и кровопотеря [2, 14]. Наиболее частыми причинами развития ОРДС являются сепсис (46,8%), пневмония (44,9%) и шок (44,4%), а смертность от ОРДС может достигать 45% [8, 10]. Новая коронавирусная инфекция COVID-19 также может приводить к развитию острого тяжелого респираторного синдрома [17]. В настоящее время отсутствуют эффективные фармакологические средства лечения ОРДС, что требует продолжения исследований в этой области.

ОРДС характеризуется нерегулируемым воспалением, сопровождающимся значительным ростом уровней провоспалительных медиаторов в легких, быстрой

миграцией нейтрофилов в альвеолярное пространство, эндотелиальным повреждением и дисфункцией, агрегацией тромбоцитов и образованием микротромбов, интерстициальным и альвеолярным отеком, гибелью альвеолярных эпителиальных клеток, активацией макрофагов и диффузным альвеолярным поражением легких [13]. Миграция нейтрофилов в легкие и их последующая дегрануляция под действием воспалительных факторов, в частности IL-6 [7], приводит к высвобождению протеаз нейтрофилов, в основном эластазы, и запускает процесс протеолитической дегенерации легочной ткани, в т. ч. легочного сурфактанта, обеспечивающего упруго-механические свойства легких.

Легочный сурфактант млекопитающих состоит примерно на 90% из липидов, в основном фосфатидилхолина, и на 10% — из белковой фракции [9]. Дегенерация четырех основных белка сурфактанта, известных как SP-A, SP-B, SP-C и SP-D, под действием эластазы нейтрофилов ведет к потере упругости легких и вносит существенный вклад в развитие ОРДС в условиях «цитокинового шторма» [11, 12, 16].

Легочные сурфактанты — как выделяемые из легких крупных млекопитающих, так и получаемые синтетическим путем — успешно используются в лечении респираторного синдрома новорожденных как средства, компенсирующие временный дефицит эндогенного сурфактанта. Однако многочисленные клинические испытания коммерческих легочных сурфактантов в целом не показали достаточную эффективность в лечении ОРДС у взрослых [5]. Исключением является сурфактант-БЛ — препарат, выделенный из легких крупного рогатого скота, для которого известно, что он снижал смертность от ОРДС у больных с сепсисом, тяжелой комбинированной травмой, ингаляционными поражениями, осложнениями при операциях на грудной клетке, реторакотомии, при реперфузион-

ном синдроме, операциях на сердце и аорте, а также при тяжелой патологии в акушерско-гинекологической клинике [1, 15]. Однако эффективность сурфактанта-БЛ ранее не изучалась на моделях «цитокинового шторма».

Лейтрагин представляет собой искусственный гексапептид, имеющий аминокислотную последовательность Tug-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. Лейтрагин значительно снижает смертность от ОРДС в экспериментальной модели ОРДС и «цитокинового шторма», как уже было показано в одной из статей настоящего выпуска. Этот эффект лейтрагина связан с ингибированием экспрессии провоспалительных цитокинов и, в первую очередь, снижением уровней мРНК и белка интерлейкина-6 (IL-6) в легких животных с ОРДС.

Учитывая известную роль «цитокинового шторма» как триггера протеолитической дегенерации эндогенного легочного сурфактанта, представляется обоснованным новый фармакологический подход к лечению ОРДС, включающий подавление продукции провоспалительных цитокинов в легких с одновременным восполнением вызванных протеолизом потерь эндогенного сурфактанта за счет введения экзогенного сурфактанта.

Целью настоящей работы было исследование эффективности комбинированного введения лейтрагина и легочного сурфактанта-БЛ в снижении гибели животных на экспериментальной модели фатального ОРДС с выраженными признаками «цитокинового шторма», подобными тем, что наблюдаются у пациентов с тяжелым течением коронавирусной инфекции COVID-19.

Материалы и методы

Материалы

Реагенты были получены от Invitrogen или Sigma-Aldrich («Merck», Сент-Луис, США). Сурфактант-БЛ был предоставлен ООО «Биосурф» (Санкт-Петербург, Россия).

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. 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°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» [3, 4, 6].

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 — комбинации липополисахарида *E. coli* в количестве 300 мкг/мышь с добавлением 100 мкг/мышь мурамилпептида и 10 мкл/мышь полного адьюванта Фрейнда, здесь и далее обозначаемой как «LPS», интратрахеально под общим наркозом.

Введение препаратов

Для оценки эффекта сочетанного введения лейтрагина и сурфактанта-БЛ мыши были разделены на 5 групп по 20 особей в каждой. Животным в двух контрольных группах вводили физ. р-р ингаляционно или сурфактант-БЛ ингаляционно в дозе 25 мг/кг, один раз в день в течение 4-х дней. Животным в трех опытных группах индуцировали ОРДС. Через 30 мин после индукции ОРДС и далее ежедневно в течение последующих трех дней животные получали физ. р-р ингаляционно (группа «LPS»), лейтрагин внутримышечно в дозе 10 мкг/кг и внутрилегочно ингаляционно в дозе 100 мкг/кг (группа «LPS+L») или лейтрагин внутримышечно в дозе 10 мкг/кг и внутрилегочно ингаляционно в дозе 100 мкг/кг вместе с сурфактантом-БЛ в дозе 25 мг/кг (группа «LPS+L+Surf»).

Статистическая обработка

Для анализа кривых выживания Каплана — Мейера использовался логранговый тест Мантеля — Кокса, оценка коэффициентов риска (hazard ratio) проводилась по Мантелю — Ханзелу с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Для того чтобы оценить эффект сочетанного введения лейтрагина и сурфактанта-БЛ на выживаемость животных в условиях «цитокинового шторма» и ОРДС, животным после индукции ОРДС вводили физ. р-р (группа «LPS»), лейтрагин (группа «LPS+L») или лейтрагин вместе с сурфактантом-БЛ (группа «LPS+L+Surf»), как описано в разделе «Материалы и методы». Животные без ОРДС в двух контрольных группах получали физ. р-р или сурфактант-БЛ. Выживаемость животных отслеживалась в течение 384 ч (16 сут), начиная с момента индукции ОРДС. Ни одно животное не погибло в обеих контрольных группах за весь период наблюдений. Результаты для трех групп с ОРДС представлены на рисунке в виде кривых выживания Каплана — Мейера.

Индукция ОРДС вызвала гибель 50 и 75% животных в течение 84 и 384 ч соответственно. Однако массовая гибель животных снижалась при введении исследуемых препаратов. Анализ кривых вы-

живания с использованием логрангового теста Мантеля — Кокса показал наличие статистически значимых отличий между группами ($p < 0,0001$). Введение лейтрагина животным с ОРДС статистически значимо снизило гибель животных до 10% (LPS+L; $p < 0,0001$) по сравнению с гибелью 75% животных в группе нелеченых животных с ОРДС (LPS). Лейтрагин при этом снизил коэффициент риска гибели (hazard ratio) в 10,04 раза относительно нелеченых животных с ОРДС. Совместное введение лейтрагина и сурфактанта-БЛ полностью предотвратило гибель животных с ОРДС. Логранговый тест Мантеля — Кокса показал статистически значимое отличие между группами «LPS+L+Surf» и «LPS» ($p < 0,0001$), а также уменьшение в 15,46 раза коэффициента риска гибели (hazard ratio) в группе животных, получавших совместно лейтрагин и сурфактант-БЛ, относительно нелеченых животных с ОРДС. Кроме того, совместное введение лейтрагина и сурфактанта-БЛ снизило коэффициент риска гибели (hazard ratio) у животных с ОРДС в 7,6

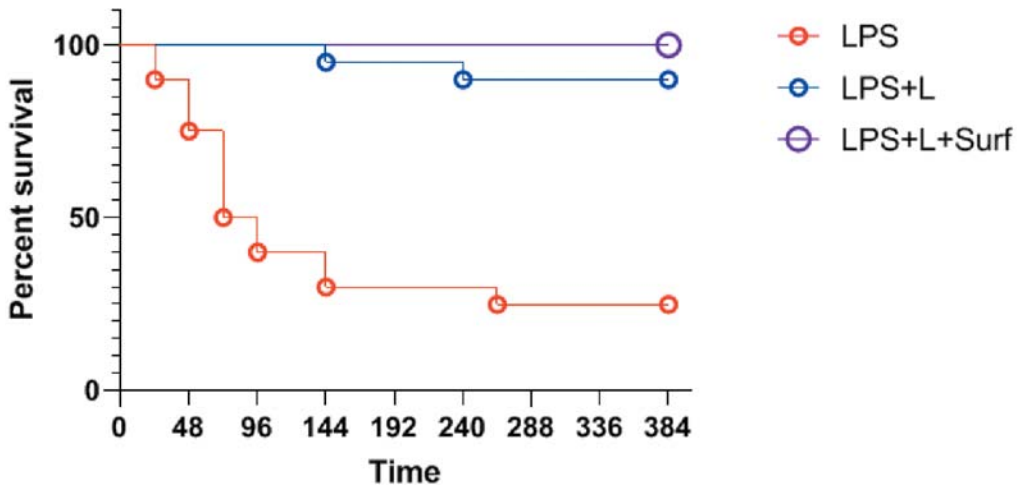


Рис. Кривые выживания Каплана — Мейера для мышей линии C57Bl/6Y с острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС). Процент выживания (percent survival) животных с ОРДС, получавших физ. р-р (LPS), лейтрагин (LPS+L) или лейтрагин вместе с сурфактантом-БЛ (LPS+L+Surf).

Fig. Kaplan — Meyer survival curves for C57Bl/6Y mice with acute respiratory distress syndrome (ARDS). Survival rates of animals with ARDS treated with saline (LPS), leutragine (LPS+L), or leutragine together with surfactant-BL (LPS+L+Surf).

раза относительно животных с ОРДС, получавших только лейтрагин, хотя не было статистически значимых отличий между этими группами животных в логранговом тесте Мантеля — Кокса ($p=0,15$).

В целом совместное введение лейтрагина и сурфактанта-БЛ было наиболее эффективной терапией для повышения выживаемости животных с «цитокиновым штормом» и ОРДС и снижения коэффициента риска гибели этих животных.

Обсуждение и выводы

В настоящей работе впервые показано, что сочетанное введение лейтрагина и легочного сурфактанта предотвращает гибель животных в модели острого фатального респираторного дистресс-синдрома. Лейтрагин, представляющий собой стабилизированный аналог эндогенного диноρφина 1-6, статистически значимо снижал гибель животных в этой модели с 75% в контроле до 10% в течение периода наблюдений, составлявшего 384 ч. Сочетанное введение лейтрагина и сурфактанта-БЛ снизило смертность животных с ОРДС до 0% на тех же сроках наблюдения.

Существенное дополнительное повышение выживаемости животных при внутривенном введении сурфактанта-БЛ свидетельствует о том, что процесс деградации эндогенного легочного сурфактанта вносит вклад в развитие ОРДС. Этот результат находится в согласии с известными данными о деградации основных белков сурфактанта — SP-A, SP-B, SP-C и SP-D — под действием эластазы нейтрофилов, активность которой в легких повышается в условиях «цитокинового шторма» [11, 12, 16]. Деградация эндогенного сурфактанта ведет к потере упруго-механических свойств легких. Соответственно, компенсация потерь эндогенного сурфактанта является обоснованной стратегией лечения ОРДС.

В целом, полученные в настоящей работе результаты показывают, что подавление продукции провоспалительных цитокинов в легких с одновременным восполнением потерь эндогенного сурфактанта за счет введения экзогенного легочного сурфактанта-БЛ является многообещающим новым фармакологическим подходом к лечению ОРДС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Баутин А.Е., Осовских В.В., Хубулава Г.Г., Гранов Д.А., Козлов И.А., Ерохин В.В. и др. Многоцентровые клинические испытания сурфактантаBL для лечения респираторного дистресс-синдрома взрослых. *Клинические исследования лекарственных средств в России*. 2002;2:18–23. [Bautin A.E., Osovskih V.V., Hubulava G.G., Granov D.A., Kozlov I.A., Erohin V.V., et al. *Mnogocentrovye klinicheskie ispytaniya surfaktantaBL dlya lecheniya respiratornogo distress-sindroma vzroslykh* [Multicenter clinical trials of surfactant BL for the treatment of adult respiratory distress syndrome]. *Klinicheskie issledovaniya lekarstvennyh sredstv v Rossii* [Clinical Trials of Medicines in Russia]. 2002;2:18–23. (In Russian)].
2. *Диагностика и интенсивная терапия острого респираторного дистресс-синдрома*: Клини. реком. Федерация анестезиологов-реаниматологов. Минздрав РФ. Утверждены 30 марта 2020 г. [Diagnostika i intensivnaya terapiya ostrogo respiratornogo distress-sindroma [Diagnostics and intensive care of acute respiratory distress syndrome]: Clinical guidelines. Federation of Anesthesiologists and Resuscitators. Ministry of Health Care of the Russian Federation. Approved March 30, 2020. (In Russian)].
3. 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 pharmacomodelling]. Moscow: Izdatel'stvo VPK, 2007. 320 p. (In Russian)].
4. Каркищенко Н.Н. *Основы биомоделирования*. М.: Межкаcadемическое изд-во ВПК, 2004. 607 с. [Karkischenko N.N. *Osnovy biomodelirovaniya* [Basics of biomodeling]. Moscow: Mezhakademicheskoye Izdatel'stvo VPK, 2004. 607 p. (In Russian)].

5. Розенберг О.А. Препараты легочного сурфактанта и сурфактанттерапия ОРДС в условиях хирургической реанимации (обзор лит-ры). *Креативная хирургия и онкология*. 2019;9(1):50–65. [Rozenberg O.A. Preparaty legochnogo surfaktanta i surfaktantterapiya ORDS v usloviyah hirurgicheskoy reanimatsii (obzor lit-ry) [Pulmonary surfactant preparations and surfactant therapy for ARDS in surgical resuscitation (literature review)]. *Kreativnaya hirurgiya i onkologiya [Creative Surgery and Oncology]*. 2019;9(1):50–65. (In Russian)].
6. *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 zivotnym 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 p. (In Russian)].
7. Bank U., Reinhold D., Kunz D., Schulz H.U., Schneemilch C., Brandt W., et al. Effects of interleukin-6 (IL-6) and transforming growth factor-beta (TGF-beta) on neutrophil elastase release. *Inflammation*. 1995;19(1):83–99.
8. Bellani G., Laffey J.G., Pham T., et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries. *JAMA*. 2016;315:788–800.
9. Creuwels L.A., van Golde L.M., Haagsman H.P. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung*. 1997;175(1):1–39.
10. Eworuke E., Major J.M., Gilbert McClain L.I. National incidence rates for Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) and ARDS cause-specific factors in the United States (2006–2014). *J. Crit. Care*. 2018;47:192–197.
11. Hirche T.O., Crouch E.C., Espinola M., Brokelman T.J., Mechem R.P., DeSilva N., et al. Neutrophil serine proteinases inactivate surfactant protein D by cleaving within a conserved subregion of the carbohydrate recognition domain. *J. Biol. Chem*. 2004;279(26):27688–27698.
12. Pison U., Tam E.K., Caughey G.H., Hawgood S. Proteolytic inactivation of dog lung surfactant-associated proteins by neutrophil elastase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1989;992(3):251–257.
13. Potey P.M., Rossi A.G., Lucas C.D., Dorward D.A. Neutrophils in the initiation and resolution of acute pulmonary inflammation: understanding biological function and therapeutic potential. *J. Pathol*. 2019;247(5):672–685.
14. Ranieri V.M., Rubenfeld G.D., Thompson B.T., et al. ARDS Definition Task Force. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012;307(23):2526–2533.
15. Rosenberg O.A., Bautin A.E., Osovskich V.V., Tsibulkin E.K., Gavrilin S.V., Kozlov I.A., et al. When to start surfactant therapy (STtherapy) of acute lung injury? *Eur. Respir. J.* 2001;18(38):153.
16. Rubio F., Cooley J., Accurso F.J., Remold O'Donnell E. Linkage of neutrophil serine proteases and decreased surfactant protein-A (SP-A) levels in inflammatory lung disease. *Thorax*. 2004;59(4):318–323.
17. Tzotzos S.J., Fischer B., Fischer H., Zeitlinger M. Incidence of ARDS and outcomes in hospitalized patients with COVID-19: a global literature survey. *Crit. Care*. 2020;24(1):516.

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

Гасанов Мелик Тофикович, к.м.н., доц., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: m.gasanov@scbmt.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

Melik T. Gasanov, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: m.gasanov@scbmt.ru

Степанова Ольга Ивановна, к.б.н., ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентст-
ва России»;
e-mail: olgsima50@mail.ru

Клёсов Роман Алексеевич, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентст-
ва России»;
e-mail: klesrom@mail.ru

Огнева Настасья Сергеевна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентст-
ва России»;
e-mail: ognevanastya@mail.ru

Савченко Елена Сергеевна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентст-
ва России»;
e-mail: savelaine@gmail.com

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

Olga I. Stepanova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific
Center of Biomedical Technologies of the Federal
Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: olgsima50@mail.ru

Roman A. Klesov, Scientific Center of Biomedical
Technologies of the Federal Medical and Biological
Agency of Russia;
e-mail: klesrom@mail.ru

Nastasya S. Ogneva, Scientific Center of
Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
e-mail: ognevanastya@mail.ru

Elena S. Savchenko, Scientific Center of
Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
e-mail: savelaine@gmail.com

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



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 мышках 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 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
<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-GGCTCTGTGCTTTCCTGATGGTTTT-BHQ2
<i>IFNB</i>	F	5'-CACCACAGCCCTCTCCATCA-3'
	R	5'-GCATCTTCTCCGTCATCC-3'
	Z	ROX-GGCTCTGTGCTTTCCTGATGGTTTT-BHQ2

Примечание: F — прямой праймер, R — обратный праймер, Z — зонд ПЦР-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-

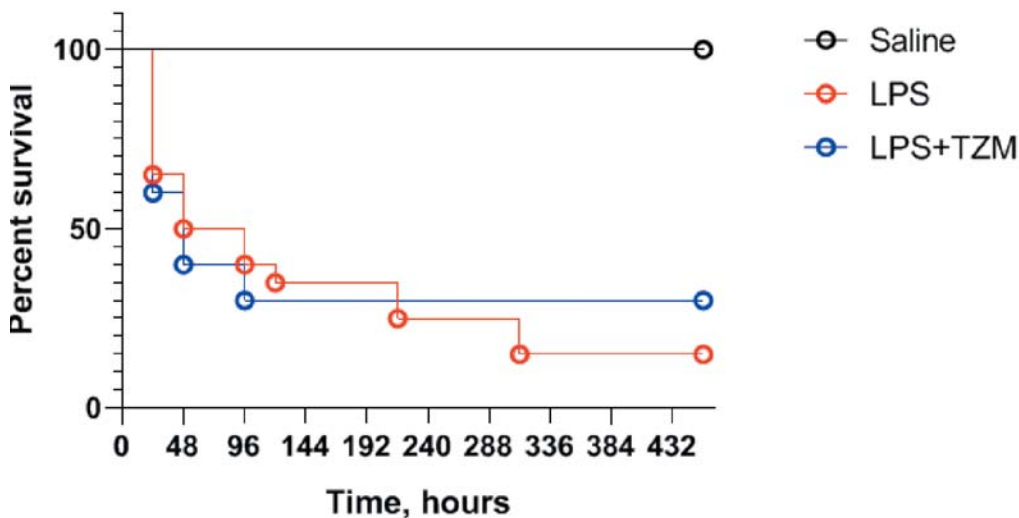


Рис. 1. Кривые выживания Каплана — Мейера для мышей с острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС). Процент выживания (percent survival) животных без ОРДС, получивших однократно подкожно физ. р-р (Saline), а также животных с ОРДС, получивших однократно подкожно физ. р-р (LPS) или тоцилизумаб (LPS+TZM).

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)

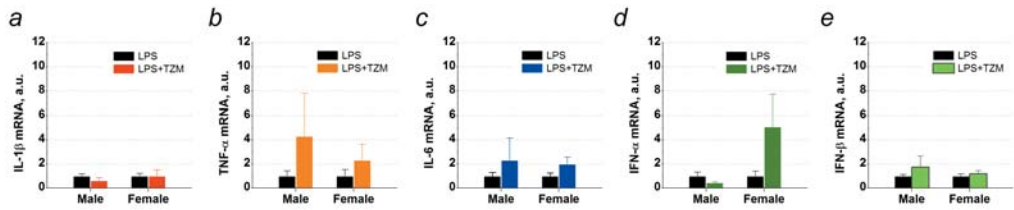


Рис. 2. Эффекты тоцилизумаба на экспрессию цитокинов в легких мышей с острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС). Кратное изменение уровней мРНК (mRNA) цитокинов (a) IL-1 β , (b) TNF- α , (c) IL-6, (d) IFN- α и (e) IFN- β в легких самцов (male) и самок (female), получивших инъекцию тоцилизумаба подкожно (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-1 β , (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-1 β , 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-1 β 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.

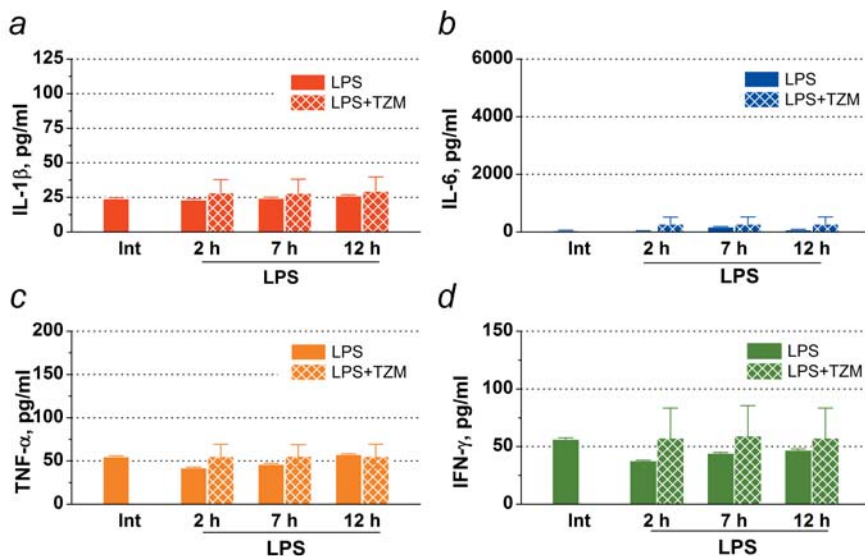


Рис. 3. Эффект однократной подкожной инъекции тоцилизумаба на уровни цитокинов (а) $IL-1\beta$, (б) $IL-6$, (с) $TNF-\alpha$ и (д) $IFN-\gamma$ в сыворотке крови мышей с ОРДС. Int — интактные животные; LPS — животные с ОРДС, получившие инъекцию физ. р-ра; LPS+TzM — животные с ОРДС, получившие инъекцию тоцилизумаба.
Fig. 3. Effect of a single subcutaneous injection of tosilizumab on the levels of (a) $IL-1\beta$, (b) $IL-6$, (c) $TNF-\alpha$ and (d) $IFN-\gamma$ 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.

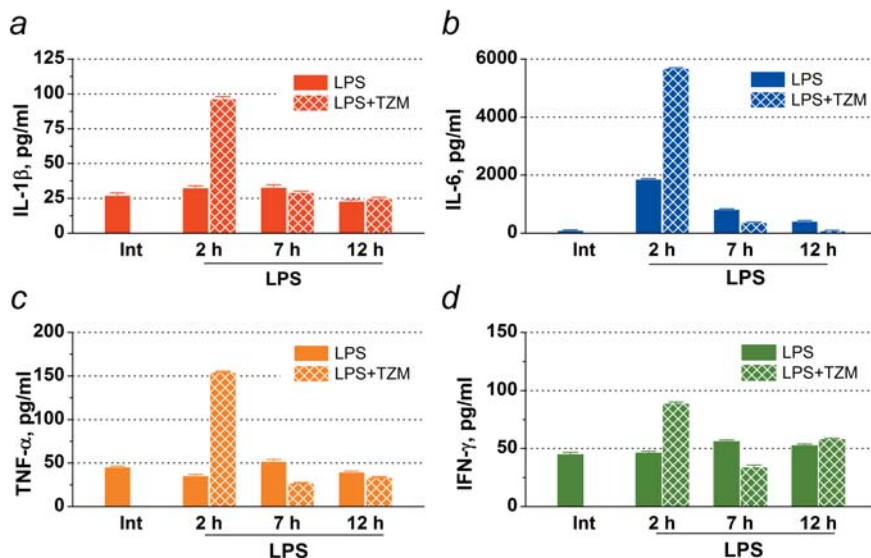


Рис. 4. Эффект однократной подкожной инъекции тоцилизумаба на уровни цитокинов (а) $IL-1\beta$, (б) $IL-6$, (с) $TNF-\alpha$ и (д) $IFN-\gamma$ в легких мышей с ОРДС. Int — интактные животные; LPS — животные с ОРДС, получившие инъекцию физ. р-ра; LPS+TzM — животные с ОРДС, получившие инъекцию тоцилизумаба.
Fig. 4. Effect of a single subcutaneous injection of tosilizumab on the levels of (a) $IL-1\beta$, (b) $IL-6$, (c) $TNF-\alpha$ and (d) $IFN-\gamma$ 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. *Alternativny 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

НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИЯ ФАРМАКО-ЭЭГ ЭФФЕКТОВ ЛЕЙТРАГИНА ПОСРЕДСТВОМ НОРМИРОВАННЫХ ЭЛЕКТРОГРАММ МОЗГА КОШЕК

Ю.В. Фокин, Н.Н. Каркищенко*, М.М. Борисова

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России»

143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1

Изучены центральные механизмы лейтрагина при ингаляционном введении посредством нормирования с помощью быстрого преобразования Фурье функций электрограмм головного мозга кошек. Фармако-электроэнцефалографический (фармако-ЭЭГ) анализ показал, что пиковое действие лейтрагина на параметры электрограмм головного мозга отмечается приблизительно через 30 мин после введения, сохраняется на протяжении около 2 ч и характеризуется преимущественной депрессией всех анализируемых ритмов по сравнению с исходными значениями. В области гиппокампа нормированные электрограммы мозга (НЭМ) несут менее выраженный характер активации, в области поясной извилины и заднего гипоталамуса — более выраженный, что может характеризовать лейцинэнкефалиновую регуляцию интрацентральных отношений головного мозга. Наиболее значимые эффекты, полученные в высокочастотных β - и γ -ритмах (около 20–25, 40 и 60 Гц), свидетельствуют о повышении γ -активности вставочных нейронов и торможении пирамидных клеток, что может указывать на противотревожное, антидепрессивное, противоэпилептическое, обезболивающее и проч. сходные действия исследуемого вещества. Обнаружены совпадения параметров нормированных электрограмм мозга при действии лейтрагина и производных гамма-аминомасляной кислоты (глутамина, габапентина, прегабалина и фенибута), преимущественно на частотах около 40 и 60 Гц, а также при действии ноотропов (семакс), выражающиеся в активации гиппокампа и заднего гипоталамуса на частотах около 60–65 Гц. Это даёт основания предполагать, что действие лейтрагина отражает механизмы ГАМК-ергической модуляции гиппокампа и префронтального неокортекса, а также оказывает позитивное влияние на умственную работоспособность, консолидацию памяти и когнитивные функции. Применение лейтрагина позволяет моделировать и изучать механизмы, оказывающие позитивное влияние при лечении заболеваний, вызванных в т. ч. новой коронавирусной инфекцией COVID-19.

Ключевые слова: лейтрагин, лейцинэнкефалин, фармакологическая модуляция, когнитивные функции, нейровизуализация, электрограммы головного мозга, нормированная ЭГМ (НЭМ), быстрое преобразование Фурье (БПФ), фармако-электроэнцефалография (фармако-ЭЭГ), кошки, гиппокамп, фронтальная кора мозга

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Фокин Ю.В., Каркищенко Н.Н., Борисова М.М. Нейровизуализация фармако-ЭЭГ эффектов лейтрагина посредством нормированных электрограмм мозга кошек. *Биомедицина*. 2020;16(4):71–82. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-71-82>

Поступила 20.04.2020

Принята после доработки 17.07.2020

Опубликована 26.10.2020

NEUROISUALIZATION OF PHARMACO-EEG EFFECTS OF LEUTRAGINE BY NORMALIZED CAT BRAIN ELECTROGRAMS

Yuriy V. Fokin, Nikolay N. Karkischenko*, Mariya M. Borisova

*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*

The central mechanisms of leutragine during inhalational administration were investigated by analyzing normalized brain cat electrograms obtained by the method of Fast Fourier Transform (FFT). According to the conducted pharmacoelectroencephalography (pharmacoe-EEG) analysis, Leutragine demonstrates a maximum effect on the parameters of brain electrograms approximately 30 minutes after administration followed by its persistence for about 2 hours. The observed effect is characterized predominantly by a depression of all analyzed rhythms compared to the initial values. Normalized brain electrograms (NBE) are less pronounced in the area of the hippocampus, although being more pronounced in the area of the cingulate gyrus and posterior hypothalamus. This may indicate the leucinecephaline regulation of intracerebral relations of the brain. The most significant effects obtained in high-frequency β - and γ -rhythms (about 20–25, 40 and 60 Hz) indicate an increase in the γ -activity of interneurons and inhibition of pyramidal cells, which may indicate an anti-anxiety, antidepressant, antiepileptic, analgesic and similar actions of the substance under study. The NBE parameters were found to be identical under the action of Leutragine and the derivatives of gamma-aminobutyric acid (glutamine, gabapentin, pregabalin, and phenibut), mainly at frequencies of about 40 and 60 Hz. Similar NBE parameters were obtained under the action of nootropics (semax), which is expressed in the activation of the hippocampus and the hypothalamus posterior at frequencies of about 60–65 Hz. This suggests that the action of Leutragine reflects the mechanisms of GABAergic modulation of the hippocampus and prefrontal neocortex, at the same time as having a positive effect on mental performance, memory consolidation and cognitive function. Leutragine can be used to model and study mechanisms exhibiting a positive effect in the treatment of diseases caused, among other things, by the new coronavirus infection COVID-19.

Keywords: leutragine, leucinecephaline, pharmacological modulation, cognitive functions, psychedelics, neuroimaging, brain electrograms, normalized brain electrograms (NBE), fast Fourier transform (FFT), pharmacoelectroencephalography (pharmacoe-EEG), cats, hippocampus, frontal cortex

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

For citation: Fokin Yu.V., Karkischenko N.N., Borisova M.M. Neuroisualization of Pharmacoe-EEG Effects of Leutragine by Normalized Cat Brain Electrograms. *Journal Biomed.* 2020;16(4):71–82. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-71-82>

Submitted 20.04.2020

Revised 17.07.2020

Published 26.10.2020

Введение

Лейцинэнкефалин — один из опиоидных пептидов (эндогенных лигандов опиатных рецепторов), относящихся к эндорфинам, полипептидным химическим соединениям, по способу действия сходным с опиатами (морфиноподобными соединениями), которые естественным путём вырабаты-

ваются в нейронах головного мозга и обладают способностью уменьшать боль, аналогично опиатам, и влиять на эмоциональное состояние.

Пептиды действуют несколькими путями: через взаимодействие со специфическими клеточными рецепторами (эндорфины, энкефалины); путем моделирующего воздей-

ствия на различные нейротрансмиттерные или ферментсинтезирующие системы; посредством взаимодействия с другими пептидами и гормонами [3]. Некоторые опиатные рецепторы локализованы на пресинаптических мембранах, что позволяет им выполнять модуляцию синаптических процессов [31], в т. ч. принимать непосредственное участие в проведении болевых импульсов [36]. Энкефалины способны индуцировать изменение потенциала постсинаптических мембран [43]. Имеется тесная связь между катехоламинергической и опиоидной системами, значительная корреляция в содержании дофамина, норадреналина и опиоидных пептидов. Опиоиды повышают выделение серотонина нервными окончаниями [29], а серотонинергическая система участвует в потенцировании активности опиоидов [8]. ГАМК-ергические ингибиторные нейроны также стимулируются опиоидами, в то же время стимуляция ГАМК-рецепторов усиливает эффекты опиатных пептидов [1]. Взаимосвязь функционирования двух систем подтверждается и тем, что антагонист опиатных рецепторов налоксон в больших дозах является антагонистом ГАМК-рецепторов [41]. Кроме вышеперечисленных механизмов воздействия опиоидов на организм, изменение концентрации того или иного регуляторного пептида, согласно концепции И.П. Ашмарина [2], может изменить на длительное время состояние всего пептидного континуума, что, в конечном счете, приведет к сложной картине процессов отставленных во времени функциональной активности различных систем органов.

В *corpus striatum* и *nucleus accumbens* опиоиды взаимодействуют с дофамином, гамма-аминомасляной кислотой (ГАМК), глутаматом и ацетилхолином и регулируют процессы локомоторной деятельности, стереотипных поведенческих реакций, нейрональных аффективных реакций. Модуляция уровня проэнкефалиновых и протахининовых мРНК опосредуется воздействи-

ем стероидных гормонов надпочечников на нигростриатальные и мезолимбические структуры мозга [35].

DPDPE, агонист 5-опиоидных рецепторов, вызывает активацию нисходящих спинальных структур, которые при участии ГАМК и ГАМК-рецепторов вовлечены в антиболевы реакции [39]. DAGO, селективный μ -антагонист, а также морфин вызывали увеличение концентрации гистамина и его рилизинг из нервных окончаний структур *striatum* [44].

Изучено участие серотонинергической системы и белков головного мозга в механизмах действия энкефалинов на процессы обучения и памяти [7, 23]. Установлено, что влияние опиоидных пептидов более выражено в условиях функционального нарушения высшей нервной деятельности. Предполагается, что опиатные пептиды участвуют в механизмах формирования устойчивости к эмоциональному стрессу. У животных, устойчивых к эмоциональному стрессу, содержание β -эндорфина и пептида δ -сна в крови и гипоталамусе выше по сравнению с предрасположенными к стрессу животными [26].

Эндорфины проявляют свойство стимуляции длительной памяти [37]. Под влиянием опиатных пептидов происходит восстановление зрительной функции при пигментивной дегенерации сетчатки [22]. Существуют данные о влиянии опиоидного пептида даларгина на регенерацию периферической нервной системы [10]. Энкефалины и их синтетические аналоги, в т. ч. и даларгин, нормализуют функциональную активность поджелудочной железы при остром панкреатите [9, 14].

Пептиды и лёгкие. Особую роль нейропептиды выполняют в регуляции дыхательных функций. Доказано, что в эффектах нейропептидов особую заинтересованность проявляют поверхностные вентролатеральные структуры продолговатого мозга. От их концентрации зависит активность нейронов дыхательного центра. С помощью

петч-клемпинга показано, что тиролиберин и, особенно, лейцинэнкефалин активируют спонтанную активность нейронов за счет блокады калиевого А-тока. Получены доказательства влияния нейропептидов на рефлекс Геринга — Брейера, лежащего в основе механизма регуляции глубины дыхания [11]. Это еще раз указывает на то, что многие интимные механизмы лейцинэнкефалина «Лейтрагин» сопряжены с регуляцией интрацентральных взаимоотношений и там их следует искать.

В условиях острой и хронической гипоксии повышается концентрация опиоидов в организме, активируется поверхность μ - и χ -опиоидных рецепторов [34]. Активация эндогенной опиоидной системы является компенсаторной и направлена на повышение резистентности организма к гипоксии [28]. Нейрофармакологический анализ с использованием в качестве анализаторов нейротропных средств медиаторного типа действия (фентоламин, пропранолол, атропин, биккуллин и др.) показал, что в осуществлении противогипоксического действия вместе с опиоидным субстратом участвуют и другие нейрохимические системы организма [4]. При этом имеются элементы сходства и различия в медиаторном действии морфина и аналогов энкефалинов.

Авторским коллективом сотрудников НЦБМТ ФМБА России в предыдущих публикациях в этом выпуске показано позитивное влияние лейтрагина на снижение проявлений острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), вызванного в т. ч. вирусными пневмониями, включая коронавирусную инфекцию нового типа COVID-19.

Эффекты опиоидов блокируются антагонистами опиоидных пептидов, что указывает на опосредованность данного эффекта через опиоидные рецепторы.

Особое значение имеют антистрессорный [6, 13, 24, 25] и четкий органопротекторный компонент в фармакологической активности опиоидных пептидов.

Целью работы явилось изучение центральных механизмов лейтрагина посредством нормирования с помощью быстрого преобразования Фурье (БПФ) функций электрограмм головного мозга.

Материалы и методы

Объектами исследований явились взрослые кошки обоего пола в возрасте более 3 лет, не имеющие признаков чистопородности, массой тела 4–6 кг.

Кормление, содержание, карантин и обращение с животными соответствовали правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986). Исследования выполнялись согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя, санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [17, 27] и подробно описаны в наших предыдущих работах по данной тематике [20, 21].

Вживление электродов в головной мозг животных производилось стереотаксическим путем в виде разработанных электродных конструкций.

Анализ эффектов нейротропных средств

Лейтрагин вводился ингаляционным способом в малых, субтерапевтических дозах, эквивалентных массе тела кошек, однократно, что позволяет выявить деликатные изменения в мозговых структурах-мишенях и их влияние на интрацентральные отношения головного мозга с помощью

фармако-электроэнцефалографического (фармако-ЭЭГ) анализа. В сравнительном анализе исследуемый препарат был введен ректальным способом в тех же дозах.

Регистрация и анализ параметров электрограмм осуществлялись с помощью разработанных в НЦБМТ ФМБА России инновационных технических средств и программного обеспечения [20, 21].

Выбор квазистационарных участков ЭГМ, алгоритмы нормирования данных ЭГМ и блок-схема используемого технического устройства представлены в работе [19].

Графическое представление результатов

На графиках представлены наиболее характерные результаты по обозначенным реперным точкам.

Получаемые данные показаны на трёх графиках, нанесённых на круговую векторную диаграмму и отражающих средние значения:

- 1) фоновых измерений — синие линии;
- 2) воздействия (экспериментальных данных) — красные линии;
- 3) НЭМ нормированных данных (десятичный логарифм) — жёлтые линии.

На диаграмме отмечены:

- цифровое кодирование — частоты ЭГ (1–64 Гц);
- спектральные характеристики ЭГ (круговые сектора) — от 0 (внутренний сектор) до $\lg 10^n$ (внешний сектор);
- базисная линия нормирования — нами принята за единицу. Расположение кривой НЭМ внутри (ближе к внутреннему сектору диаграммы) свидетельствует о снижении мощности частот ЭГ при воздействии по сравнению с фоновыми данными, расположение снаружи (ближе к внешнему сектору) — о повышении мощности частот ЭГ по сравнению с фоном.

На диаграммах указаны все частоты ЭГ анализируемого диапазона, и для удобства восприятия материала специалистами,

привычными к традиционной форме интерпретации ЭГ, мы разграничили частоты согласно принятой классификации на дельта- — δ - (1–4 Гц), тета- — θ - (5–8 Гц), альфа- — α - (9–12 Гц), сигма- — σ - (13–16 Гц), бета- — β - (17–30 Гц) и гамма- — γ - (31–64 Гц) диапазоны, хотя имеются и др. представления о границах диапазонов.

Выявление когнитивных функций

Когнитивные функции, которые по нашим собственным данным и сведениям зарубежной литературы [15, 16, 19, 38, 40] связаны с активностью высокочастотного γ -диапазона электрограмм мозга [30, 32, 33, 42], оценивались субъективно, визуально (путём фото- и видеорегистрации), с помощью инструментальных методов измерения элементарных проявлений и перцептивных циклов сложных поведенческих эквивалентов психомоторных реакций человека, а также аналитических БПФ-параметров электрограмм локальных зон головного мозга кошек.

Результаты и их обсуждение

Результаты фармакокинетических исследований пептида Туг-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg показали, что он не проникает через гематоэнцефалический барьер при внутривенном введении в дозе 150 мкг/кг [12]. По видимому, центральные эффекты этого пептида связаны с его воздействием на периферические рецепторы.

Посредством регистрации и фармако-ЭЭГ анализа определены информативные параметры, свидетельствующие об изменении биоэлектрической активности мозга при действии лейтрагина, результаты его влияния на параметры ЭГМ и НЭМ представлены на рис. 1–7.

Действие исследуемого вещества на параметры электрограмм головного мозга отмечается сразу после введения и достигает наибольшего эффекта приблизительно через 30 мин. Регистрируется преимуще-

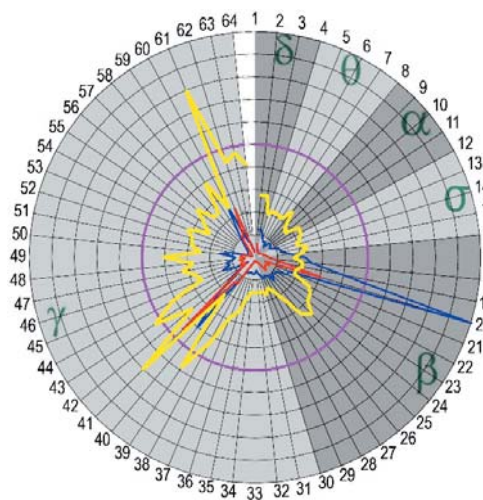


Рис. 1. Параметры ЭГМ и НЭМ в области Pr (Gyrus proreus — прореальная извилина) через 30 мин после введения лейтрагина. Синяя кривая — фоновые измерения, красная кривая — воздействие, желтая кривая — НЭМ. Розовый контур — базисная линия нормирования. Цифровое кодирование — частоты, Гц. Круговые сектора — спектральные характеристики ЭГМ.

Fig. 1. BE and NBE parameters in the Pr brain area (pro-real gyrus) 30 min after administration of levetiracetam. The blue curve is background measurements, the red curve is impact, the yellow curve is NBE. The pink contour is the basic line of valuation. Digital coding is the frequency, Hz. Circular sectors are the spectral characteristics of BE.

ственная депримация всех анализируемых ритмов по сравнению с исходными значениями.

На фоне угнетения в области прореальной извилины, передней супрасильвиевой извилины и хвостатого ядра отмечаются эпизоды активации на частотах около 40 и 60 Гц, традиционно относящихся к высокочастотным β - и γ -диапазонам. Разница обнаруженных эффектов с фоновыми данными достигает 20–70%.

В области ретикулярной формации (NRT, по [5]) отмечается также всплеск на частоте около 3 Гц (δ -диапазон) на 40% по сравнению с фоном. При этом во всех описанных областях мозга обнаруживается близкая к фоновым значениям активность в β -диапазоне (23–26 Гц).

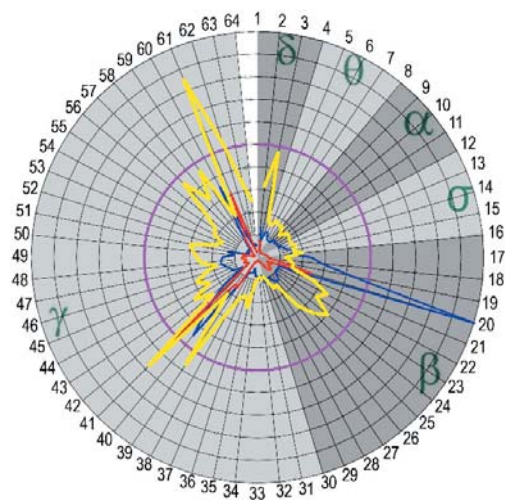


Рис. 2. Параметры ЭГМ и НЭМ в области GSSA (Gyrus suprasylvius anterior — передняя супрасильвиева извилина) через 30 мин после введения лейтрагина. Все обозначения — как на рис. 1.

Fig. 2. BE and NBE parameters in the GSSA brain area (Gyrus suprasylvius anterior — front suprasylvius gyrus) 30 min after administration of levetiracetam. For all designations, refer to Fig. 1.

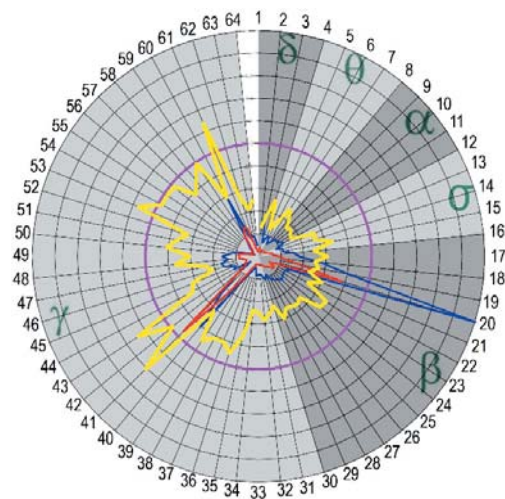


Рис. 3. Параметры ЭГМ и НЭМ в области HIP (Hipposampus, гиппокамп) через 30 мин после введения лейтрагина. Все обозначения — как на рис. 1.

Fig. 3. BE and NBE parameters in the HIP brain area (Hippocampus) 30 min after administration of levetiracetam. For all designations, refer to Fig. 1.

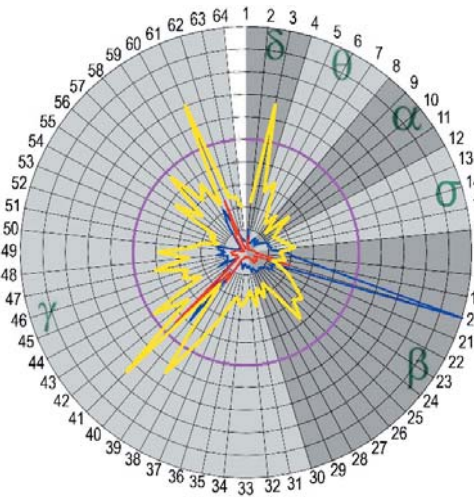


Рис. 4. Параметры ЭГМ и НЭМ в области NRT (Nucleus reticularis tegmenti — ретикулярная формация) через 30 мин после введения лейтрагина. Все обозначения — как на рис. 1.

Fig. 4. BE and NBE parameters in the NRT brain area (Nucleus reticularis tegmenti — reticular formation) 30 min after administration of letragine. For all designations, refer to Fig. 1.

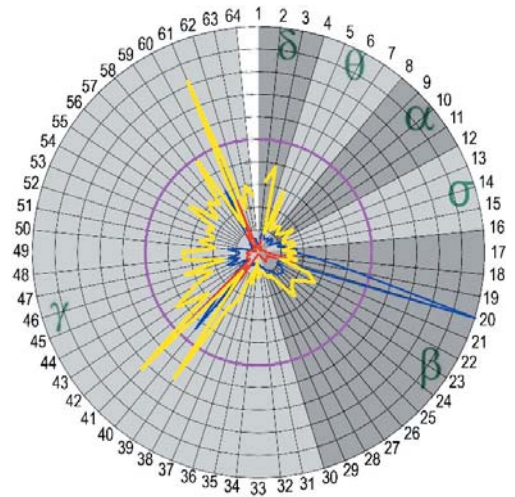


Рис. 5. Параметры ЭГМ и НЭМ в области CD (Nucleus caudatus — хвостатое ядро) через 30 мин после введения лейтрагина. Все обозначения — как на рис. 1.

Fig. 5. BE and NBE parameters in the CD brain area (Nucleus caudatus) 30 min after administration of letragine. For all designations, refer to Fig. 1.

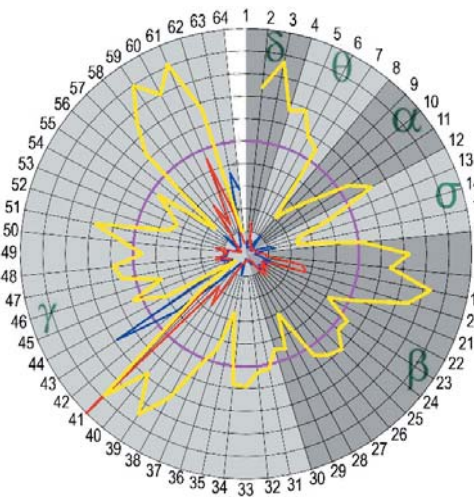


Рис. 6. Параметры ЭГМ и НЭМ в области GC (Gyrus cingule — поясная извилина) через 30 мин после введения лейтрагина. Все обозначения — как на рис. 1.

Fig. 6. BE and NBE parameters in the GC brain area (Gyrus cingule) 30 min after administration of letragine. For all designations, refer to Fig. 1.

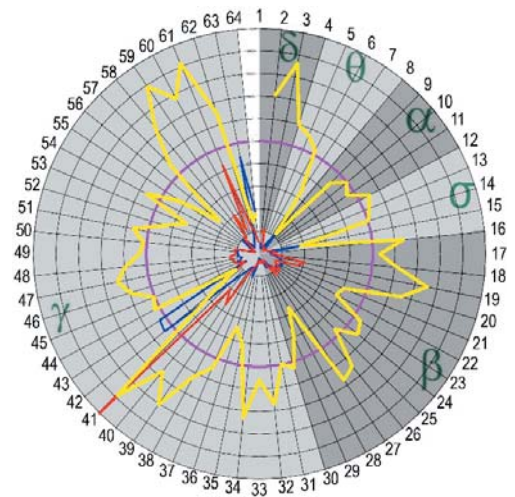


Рис. 7. Параметры ЭГМ и НЭМ в области NHP (Nucleus hypothalamus posterior — задний гипоталамус) через 30 мин после введения лейтрагина. Все обозначения — как на рис. 1.

Fig. 7. BE and NBE parameters in the NHP brain area (Nucleus hypothalamus posterior) 30 min after administration of letragine. For all designations, refer to Fig. 1.

Наименее выраженные признаки активации отмечаются в области гиппокампа. Здесь регистрируются незначительные (не более 20% от исходного уровня) эпизоды активации на высоких частотах γ -диапазона — около 41–43, 52 и 61 Гц.

Существенные различия наблюдаются в области поясной извилины с чередующимися эффектами депримации и активации. Одновременно с преимущественным угнетением частот 10–15 Гц в области 3, 20, 40 и 60 Гц отмечается активация ритмов. Разница обнаруженных эффектов с фоновыми данными достигает 100%. Практически аналогичные эффекты отмечаются в области заднего гипоталамуса.

Описываемые изменения сохраняются на протяжении около 1,5–2 ч после введения, и на протяжении до 24 ч регистрируемая НЭМ анализируемых областей мозга близка к фоновым значениям до эксперимента. Спустя сутки отмечаются единичные эпизоды активации около 40 и 60 Гц, составляющие в среднем около 50% от исходного уровня.

Наиболее значимые эффекты, полученные в высокочастотных β - и γ -ритмах, свидетельствуют о повышении γ -активности вставочных нейронов и торможении пирамидных клеток, что может указывать на противотревожное, антидепрессивное, противоэпилептическое, обезболивающее и проч. сходные действия исследуемого вещества, а также улучшение консолидации памяти и когнитивных функций.

Эффекты ингаляционного введения исследуемого препарата сходны с таковыми при ректальном введении. Общая депримация и эпизоды активации в области проректальной извилины, передней супрасильвиевой извилины и ретикулярной формации на частотах около 40 и 60 Гц при ингаляционном введении лейтрагина на 20–30% менее выражены, чем при ректальном введении действующего вещества (лейцинэнкефалина).

Сопоставляя описанные результаты с полученными нами ранее при анализе эффектов производных ГАМК на активность мозга кошек [18], можно проследить и совпадения параметров НЭМ при действии глутамин, габапентина, прегабалина и фенибуты, преимущественно на частотах около 40 и 60 Гц. Обнаруживается сходство полученных данных с эффектами некоторых исследованных нами ноотропных препаратов: при фармакодинамически и фармакокинетически близком действии семакса также наблюдаются элементы активации гиппокампа и заднего гипоталамуса на частотах около 60–65 Гц. Это даёт основания предполагать, что действие лейтрагина отражает механизмы ГАМК-ергической модуляции гиппокампа и префронтального неокортекса, а также оказывает позитивное влияние на умственную работоспособность и когнитивные процессы.

Выводы

1. Пиковое действие лейтрагина на параметры электрограмм головного мозга отмечается приблизительно через 30 мин после введения, сохраняется на протяжении около 2 ч и характеризуется преимущественной депримацией всех анализируемых ритмов по сравнению с исходными значениями.

2. Наименее выраженные признаки активации отмечаются в области гиппокампа, наиболее выраженные — в области поясной извилины и заднего гипоталамуса, что может характеризовать лейцинэнкефалиновую регуляцию интрацентральных отношений головного мозга.

3. Нейровизуализация эффектов лейтрагина, применяемого в ингаляционной форме, наиболее ярко отражается в высокочастотных β - и γ -ритмах (около 20–25, 40 и 60 Гц), связанных с активностью вставочных нейронов и пирамидных клеток, модулирующих противотревожное, антидепрессивное, обезболивающее и проч. сходные действия исследуемого вещества, а также

улучшение консолидации памяти и когнитивных функций.

4. Применение лейтрагина, отражающего ГАМК-ерическую активность и повышающего умственную работоспособность,

позволяет моделировать и изучать механизмы, оказывающие позитивное влияние при лечении заболеваний, вызванных в т. ч. новой коронавирусной инфекцией COVID-19.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Андреев Б.В. Нейрофармакологический и биохимический анализ роли системы ГАМК в регуляции болевой чувствительности. В кн.: *Фармакологические аспекты обезболивания*. Л., 1983. С. 43–44. [Andreev B.V. Neirofarmakologicheskij i biohimicheskij analiz roli sistemy GAMK v reguljacii bolevoj chuvstvitel'nosti [Neuropharmacological and biochemical analysis of the role of the GABA system in the regulation of pain sensitivity]. In: *Farmakologicheskie aspekty obezbolivaniya* [Pharmacological aspects of pain relief]. Leningrad, 1983. P. 43–44. (In Russian)].
2. Ашмарин И.П. Гипотеза о существовании новой высшей категории в иерархии регуляторных пептидов. *Нейрохимия*. 1987;1:23–27. [Ashmarin I.P. Gipoteza o sushchestvovanii novej vysshej kategorii v ierarhii reguljatornyh peptidov [Hypothesis about the existence of a new higher category in the hierarchy of regulatory peptides]. *Neurochemistry*. 1987;1:23–27. (In Russian)].
3. Бадиков В.И. и др. Система эндогенных опиоидных пептидов. *Физиологический журнал*. 1985;7:840–843. [Badikov V.I., et al. Sistema endogennyh opioidnyh peptidov [System of endogenous opioid peptides]. *Physiological Journal*. 1985;7:840–843. (In Russian)].
4. Брагин Е.О., Яснецов В.В. Опиоидные и моноаминовые механизмы регуляции функций организма в экстремальных условиях. *Итоги науки и техники*. М., 1991. Т. 41. С. 181. [Bragin E.O., Yasnecov V.V. Opioidnye i monoaminovye mekhanizmy reguljaccii funkcij organizma v ekstremal'nyh usloviyah [Opioid and monoamine mechanisms of regulation of body functions in extreme conditions]. *Results of science and technology* Moscow, 1991. Vol. 41. P. 181. (In Russian)].
5. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П. *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*. М.: Высшая школа, 1991. С. 399. [Buresh Ya., Bureshova O., Houston J.P. *Metodiki i osnovnye eksperimenty po izucheniju mozga i povedeniya* [Methods and basic experiments in the study of the brain and behavior]. М.: Vysshaya shkola Publ., 1991. P. 399. (In Russian)].
6. Виноградов В.А., Полонский В.М. Защитные действия опиоидных пептидов различного происхождения. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1985;5:548–551. [Vinogradov V.A., Polonskij V.M. Zashchitnye dejstvija opioidnyh peptidov razlichnogo proiskhozhdeniya [Protective actions of opioid peptides of various origins]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1985;5:548–551. (In Russian)].
7. Виноградов В.А., Смагин В.Г., Титов В.И. *Проблемы нейрогуморальной регуляции деятельности висцеральных систем*. Л., 1987. 187 с. [Vinogradov V.A., Smagin V.G., Titov V.I. *Problemy nejrogumoral'noj reguljaccii deyatel'nosti visceral'nyh sistem* [Problems of neurohumoral regulation of the activity of visceral systems]. Leningrad, 1987. 187 p. (In Russian)].
8. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Захарова О.Ю. *Роль опиоидных пептидов в регуляции гемопоэза*. Томск, 1990. 135 с. [Gol'dberg E.D., Dygaj A.M., Zaharova O.Yu. *Rol' opioidnyh peptidov v reguljaccii gemopoieza* [The role of opioid peptides in the regulation of hematopoiesis]. Tomsk, 1990. 135 p. (In Russian)].
9. Емельянов С.И., Джикья А.А. Влияние аналога эндогенных опиоидов даларгина на структуру и функцию экзокринной ткани при экспериментальном остром панкреатите. *Фармакология и токсикология*. 1985:101–104. [Emel'yanov S.I., Dzhikiya A.A. Vliyanie analoga endogennyh opioidov dalargina na strukturu i funkciu ekzokrinnoj tkani pri eksperimental'nom ostrom pankreatite [The effect of the endogenous opioid analogue dalargin on the structure and function of exocrine tissue in experimental acute pancreatitis]. *Pharmacology and Toxicology*. 1985:101–104. (In Russian)].
10. Ильинский О.Б., Козлова В.А. Влияние аналога лей-энкефалина на симпатическую реинервацию сердечной и скелетной мышц у крыс. *Физиологический журнал*. 1989;1:33–36. [Il'inskij O.B., Kozlova V.A. Vliyanie analoga lej-enkefalina na simpaticeskuyu reinervaciju serdechnoj i skeletnoj myshc u kryс [The effect of the leu-enkephalin analog on sympathetic reinnervation of the cardiac and skeletal muscles in rats]. *Physiological Journal*. 1989;1:33–36. (In Russian)].
11. Иношкин А.Н. *Роль нейропептидов в бульбарных механизмах регуляции дыхания*: автореф. дис. ... д.б.н. М., МГУ, 1998. 44 с. [Inyushkin A.N. *Rol' neuropeptidov v bul'barnyh mehanizmah reguljaccii dyhaniya* [Role of neuropeptides in bulbar mechanisms of respiration regulation]: avtoref. dis. ... d.b.n.]. Moscow: Moscow State University Publ., 1998. 44 p. (In Russian)].

12. Каленикова Е.И., Дмитриева О.Ф., Коробов Н.В., Жуковский С.В., Тищенко В.А., Виноградов В.А. Фармакокинетика даларгина. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 1988;34(1):75-83. [Kalenikova E.I., Dmitrieva O.F., Korobov N.V., Zhukovskij S.V., Tishchenko V.A., Vinogradov V.A. Farmakokinetika dalargina [Dalargin pharmacokinetics]. *Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 1988;34(1):75-83. (In Russian)].
13. Калинин В.Ю. Влияние даларгина на функциональное состояние печени в условиях острой гипоксии: дис. ... к.б.н. Ульяновск, 2000. 135 с. [Kalinin V.Yu. Vliyaniye dalargina na funktsional'noe sostoyaniye pecheni v usloviyakh ostroj gipoksii [The effect of dalargin on the functional state of the liver in acute hypoxia: dis. ... k.b.n.]. Ul'yanovsk, 2000. 135 p. (In Russian)].
14. Канаян А.С., Пермаков Н.К., Титова Г.П. и др. Влияние синтетических аналогов лей-энкефалина на жизнеспособные отделы поджелудочной железы при экспериментальном панкреатите. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1988;4:447-450. [Kanayan A.S., Permakov N.K., Titova G.P., et al. Vliyaniye sinteticheskikh analogov lej-enkefalina na zhiznesposobnyye otdely podzheludochnoj zhelezy pri eksperimental'nom pankreatite [Effect of synthetic analogs of leuencephalin on viable pancreas in experimental pancreatitis]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1988;4:447-450. (In Russian)].
15. Каркищенко Н.Н. *Психоунитропизм лекарственных средств*. М.: Медицина, 1993. 208 с. [Karkischenko N.N. *Psihounitropizm lekarstvennykh sredstv [Psychunitropism of medicines]*. Moscow: Medicina Publ., 1993. 208 p. (In Russian)].
16. Каркищенко Н.Н. *Фармакология системной деятельности мозга*. Ростов: Ростиздат, 1975. 152 с. [Karkischenko N.N. *Farmakologiya sistemnoj deyatelnosti mozga [Pharmacology of systemic activity of the brain]*. Rostov: Rostizdat Publ., 1975. 152 p. (In Russian)].
17. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В. О механизмах фармакологической модуляции обсессивно-компульсивных и когнитивных расстройств кошек, распознаваемых методом нормирования БПФ-преобразуемых функций электрограмм фронтальной коры головного мозга и гиппокампа. *Биомедицина*. 2020;16(1):12-27. [Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V. O mekhanizmah farmakologicheskoy modulyatsii obsessivno-kompul'sivnykh i kognitivnykh rasstrojstv koshek, raspoznaemykh metodom normirovaniya BPF-preobrazuemykh funktsij elektrogramm frontal'noj kory golovnogo mozga i gippokampa [Mechanisms of the Pharmacological Modulation of Obsessive-Compulsive and Cognitive Disorders in Cats Recognized by the Method of Normalizing FFT-Convertible Functions of Electrograms of the Frontal Cortex and Hippocampus]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2020;16(1):12-27. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-1-12-27.
18. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Табоякова Л.А., Алимкина О.В., Борисова М.М. Между когнитивностью и нейропатиями: нейровизуализация эффектов ГАМК-ергической модуляции гиппокампа и префронтального неокортекса по нормированным электрограммам мозга. *Биомедицина*. 2020;16(2):12-38. [Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Taboyakova L.A., Alimkina O.V., Borisova M.M. Mezhdru kognitivnost'yu i nejropatiyami: nejrovizualizatsiya effektov GAMK-ergicheskoy modulyatsii gippokampa i prefrontal'nogo neokorteksa po normirovannym elektrogrammam mozga [Between cognitivity and neuropathies: neuroisualization of effects of GABA-ergic modulation of the hippocampus and prefrontal neocortex on normed brain electrograms]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2020;16(2):12-38. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-2-12-38.
19. 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. Nejrovizualizatsiya effektov psichoaktivnykh sredstv posredstvom normalizatsii 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.
20. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н., Табоякова Л.А., Мокроусов М.И., Алимкина О.В. Конвергентная валидация интрацентральных отношений головного мозга животных. *Биомедицина*. 2017;3:16-39. [Karkischenko N.N., Fokin Yu.V., Karkischenko V.N., Taboyakova L.A., Mokrousov M.I., Alimkina O.V. Konvergentnaya validatsiya intracentral'nykh otnoshenij golovnogo mozga zhivotnykh [Convergent validation of intracentral relationships of the brain of animals]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2017;3:16-39. (In Russian)].
21. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н., Табоякова Л.А., Харитонов С.Ю., Алимкина О.В. Новые подходы к оценке интрацентральных отношений по показателям оперантного поведения и электрограмм мозга кошек. *Биомедицина*. 2018;4:4-17. [Karkischenko N.N., Fokin Yu.V., Karkischenko V.N., Taboyakova L.A., Kharitonov S.Yu., Alimkina O.V. Noveye podhody k otenke intracentral'nykh otnoshenij po pokazatelyam operantnogo povedeniya i elektrogramm mozga koshek [New approaches to the assessment of intracentral relations in terms of operant behavior and electrograms of the cats brain]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2018;4:4-17. (In Russian)].

22. Костелянец Н.Б., Ильинский О.Б., Шевелев И.А. Восстановление зрительных функций при пигментной дегенерации сетчатки под влиянием регуляторных пептидов. *Физиологический журнал*. 1988;1:43–47. [Kostelyanc N.B., Il'inskiy O.B., Shevelev I.A. Vosstanovlenie zritel'nyh funktsij pri pigmentnoj degeneracii setchatki pod vliyaniem regulyatornyh peptidov [The restoration of visual function during retinal pigment degeneration under the influence of regulatory peptides]. *Physiological Journal*. 1988;1:43–47. (In Russian)].
23. Кругликов Р.И., Чиппенс Г.И., Гецова Е.А. О некоторых механизмах действия энкефалина на процессы обучения и памяти. *Биологические науки*. 1984;12:45–51. [Kruglikov R.I., Chippens G.I., Gecova E.A. O nekotoryh mekhanizmah dejstviya enkefalina na processy obucheniya i pamyati [On some mechanisms of enkephalin action on learning and memory processes]. *Biological Sciences*. 1984;12:45–51. (In Russian)].
24. Лишманов Ю.Б., Бранцев Н.В., Маслов Л.Н. Об участии лей-энкефалина в регуляции адаптации коры надпочечников. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1991;12:106–109. [Lishmanov Yu.B., Brancev N.V., Maslov L.N. Ob uchastii lej-enkefalina v regulyacii adaptacii kory nadpocheknikov [On the participation of leuencephalin in the regulation of adaptation of the adrenal cortex]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1991;12:106–109. (In Russian)].
25. Лишманов Ю.Б., Травков Ю.А., Реброва Т.Ю., Федотова Т.В. Влияние опиоидных нейропептидов на систему простагландинов и процессы ПОЛ в миокарде при его стрессорном повреждении. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1991;6:619–622. [Lishmanov Yu.B., Travkov Yu.A., Rebrova T.Yu., Fedotova T.V. Vliyanie opioidnyh neuropeptidov na sistemu prostaglandinov i processy POL v miokarde pri ego stressornom povrezhdenii [Influence of opioid neuropeptides on the prostaglandin system and LPO processes in the myocardium during stress damage]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1991;6:619–622. (In Russian)].
26. Пшенникова М.Г. Роль опиоидных пептидов в реакции организма на стресс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1987;3:85–88. [Pshennikova M.G. Rol' opioidnyh peptidov v reakcii organizma na stress [The role of opioid peptides in the body's response to stress]. *Pathological Physiology and Experimental Therapy*. 1987;3:85–88. (In Russian)].
27. *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 zhyvotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskih 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)].
28. Слепушкин В.Д., Золоев Т.К., Виноградов В.А., Титов М.И. *Нейропептиды, их роль в физиологии и патологии*. Томск, 1988. 143 с. [Slepushkin V.D., Zoloev T.K., Vinogradov V.A., Titov M.I. *Neuropeptidy, ih rol' v fiziologii i patologii* [Neuropeptides, their role in physiology and pathology]. Tomsk, 1988. 143 p. (In Russian)].
29. Узбеков М.Г. Активность триптофан-5-гидролазы в синапсоммах мозга кролика после однократного введения опиоидного пептида Tur D - Ala - Gly - Phe - NH₂. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1986;2:159–160. [Uzbekov M.G. Aktivnost' triptofan-5-gidrolazy v sinaptosomah mozga krolika posle odnokratnogo vvedeniya opioidnogo peptida Tur D - Ala - Gly - Phe - NH₂ [Tryptophan-5-hydrolase activity in rabbit brain synaptosomes after a single administration of the Tur D - Ala - Gly - Phe - NH₂ opioid peptide]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1986;2:159–160. (In Russian)].
30. Bragin A., Jandó G., Nádasdy Z., Hetke J., Wise K., Buzsáki G. Gamma (40–100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J. Neurosci*. 1995;15(1, Pt 1):47–60.
31. Costa L.E. Hepatic cytochrom p-450 in rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. *Am. J. Physiol*. 1987;259(4):654–659.
32. Kann O. The interneuron energy hypothesis: Implications for brain disease. *Neurobiol. Dis*. 2016;90:75–85. DOI: 10.1016/j.nbd.2015.08.005.
33. Kann O., Huchzermeyer C., Kovács R., Wirtz S., Schuelke M. Gamma oscillations in the hippocampus require high complex I gene expression and strong functional performance of mitochondria. *Brain*. 2011;134(Pt 2):345–358. DOI: 10.1093/brain/awq333.
34. Mayfield K.P., D'Alecy L.G. Role of endogenous opioid receptor ligand in the acute adaptation to hypoxia. *Brain. Res*. 1992;582:226–231.
35. Medowel J., Kitcher J. Development of opioid system, peptides, receptors and pharmacology. *Brain Res. Reviewer*. 1987;12:397.
36. Me Givem R.F., Mousa S., Couri D., Bemtston G.G. Prolonged in the mittent footshock stress decreases met and leu enkephalin in brain with concominant decreases in pain the eshold. *Life Sci*. 1983;33(1):47–54.
37. Mueller E., Cenazzani A. Central and Peripheral Endorphins. *Basic and Clinical Aspects*. Raven New York Press, 1984. 178 p.
38. Nilsson L.-G., Markowitsch H.J. *Cognitive Neuroscience of Memory*. Seattle: Hogrefe & Huber Publ., 1999. 57 p.
39. Patel A. Inhibitors of enkephalin-degrading enzymes as potential therapeutic agents. *Prag. Med. Chem*. 1993;30:327.

40. Polunina A.G., Davydov D.M. EEG correlates of Wechsler Adult Intelligence Scale. *Int. J. Neurosc.* 2006;116(10):1231–1248.
41. Sawynok J., Pinsky C., Labella F. Minireview of the specificity of naloxone as the opiate antagonist. *Life Sci.* 1979;25:1621–1632.
42. Tort A.B., Kramer M.A., Thorn C., Gibson D.J., Kubota Y., Graybiel A.M., et al. Dynamic crossfrequency couplings of local field potential oscillations in rat striatum and hippocampus during performance of a T-maze task. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008;105(51):20517–20522. DOI: 10.1073/pnas.0810524105.
43. Watson S.J., Akil H., Richard C.W., Barchas J.P. Evigena for the separat opiate peptide neuronal systems. *Nature.* 1978;275:226–228.
44. Yamada K., Nabeshima T. Stress-induced behavioral responses and multiple opioid system in the brain. *Behav. Brain Res.* 1995;67:133.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Фокин Юрий Владимирович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: fokin@scbmt.ru

Каркищенко Николай Николаевич*, д.м.н., проф., acad. РАН, чл.-корр. РАН, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: niknik2808@yandex.ru

Борисова Мария Михайловна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: borisova_mm@mail.ru

Yuriy V. Fokin, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: fokin@scbmt.ru

Nikolay N. Karkischenko*, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: niknik2808@yandex.ru

Mariya M. Borisova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: borisova_mm@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Лабораторкорм

Более десяти лет коллектив нашей организации обеспечивает высококачественным комбикормом для лабораторных животных научные медицинские и учебные учреждения России.

Реализуем:

- ✓ Оборудование для вивариев (клетки-стеллажи и др.);
- ✓ Подстилочный материал из древесной стружки;
- ✓ Зерно: пшеница, овес, ячмень,
- ✓ Премиксы.



НАШИ КОРМА
полнорационные,
сбалансированные по
аминокислотному составу,
минералам и витаминам

Доставка в любой регион России

Наш адрес: Москва, 2-й Вязовский проезд, д. 16, стр. 10

ООО «Лабораторкорм»

Телефоны: (495) 972-99-72, 972-16-87, 220-01-23

www.laboratorkorm.ru



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ

