

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ С АЛЬФА-ГЛУТАМИЛ-ТРИПТОФАНОМ *IN VITRO* НА СЕКРЕЦИЮ ЦИТОКИНОВ И УРОВЕНЬ ПОВЕРХНОСТНОЙ МОЛЕКУЛЫ ICAM-1

© 2022 г. Е. Г. Головачева¹, *, Э. А. Старикова^{2, 3}, Т. А. Кудрявцева², В. А. Апрятина⁴

¹Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, 197376 Россия

²Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук, Санкт-Петербург, 197376 Россия

³Кафедра иммунологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022 Россия

⁴Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, 197110 Россия

*E-mail: okdixi@mail.ru

Поступила в редакцию 13.07.2022 г.

После доработки 20.08.2022 г.

Принята к публикации 30.08.2022 г.

Изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе действия иммуномодулирующих препаратов, актуально для обоснования их терапевтического эффекта. В настоящей работе проведен сравнительный анализ спонтанной и индуцированной TNF α секреции провоспалительных цитокинов IL-1 α и IL-8, а также уровень адгезионной молекулы ICAM-1 в культуре эндотелиальных клеток EA.hy 926 и на мононуклеарных клетках периферической крови здоровых доноров в моделях воспаления *in vitro* в присутствии альфа-глутамил-триптофана (α -Glu-Trp) и препарата Цитовир-3. Цель – изучить клеточные механизмы, опосредующие иммуномодулирующий эффект препаратов α -Glu-Trp и Цитовир-3. Показано, что α -Glu-Trp снижал индуцированную TNF α продукцию IL-1 α и усиливал стимулированный действием TNF α уровень поверхностной молекулы ICAM-1 эндотелиальных клеток. При этом препарат снижал секрецию цитокина IL-8, индуцированную TNF α , и повышал спонтанный уровень ICAM-1 мононуклеарных клеток. Препарат Цитовир-3 оказывал активирующее действие на эндотелиальные клетки EA.hy 926 и мононуклеарные лейкоциты периферической крови человека. В его присутствии происходило усиление спонтанной секреции IL-8 эндотелиальными и мононуклеарными клетками. Кроме того, Цитовир-3 повышал уровень ICAM-1, индуцированный TNF α , на эндотелиальных клетках и увеличивал спонтанный уровень этой поверхностной молекулы на мононуклеарах. Подавление стимулированной продукции провоспалительных цитокинов под действием α -Glu-Trp как монопрепарата, так и в составе Цитовира-3, может обуславливать его противовоспалительные свойства. Однако повышение уровня поверхностной молекулы ICAM-1 свидетельствует о механизмах, повышающих функциональную активность изученных клеток, что одинаково важно для реализации эффективного иммунного ответа на инфекцию и репарации поврежденных тканей при воспалительных реакциях.

Ключевые слова: альфа-глутамил-триптофан, Цитовир-3, эндотелиальные клетки EA.hy 926, мононуклеарные лейкоциты периферической крови человека, ICAM-1, секреция цитокинов, ОРВИ

DOI: 10.31857/S0041377122060049

Ввиду высокой изменчивости антигенного состава вируса гриппа, а также значительного количества возбудителей ОРВИ большую трудность представляет задача создания эффективных препаратов терапии этих инфекций (Смирнов и др., 2020; Malainou, Herold, 2019; Зинина и др., 2021). В связи с этим профилактика и лечение ОРВИ по-прежнему остается важной проблемой, требующей своего разрешения.

Принятые сокращения: ИФА – иммуноферментный анализ; СИФ – средняя интенсивность флуоресценции; α -Glu-Trp – альфа-глутамил-триптофан.

Альфа-глутамил-триптофан (α -Glu-Trp) является синтетическим пептидным иммуномодулятором, широко используется как препарат для лечения иммунодефицитных состояний. Известно, что препарат оказывает модулирующее влияние на метаболические процессы в клетках, стимулирует функциональную активность клеток иммунной системы, обладает антиоксидантным действием, стимулирует процессы регенерации тканей, ускоряет заживление ран, активизирует функции клеток соединительной ткани, эндотелиоцитов, макрофагов и лейкоцитов в очаге повреждения, ингибирует продукцию гиста-

мина и серотонина при воспалении (Смирнов и др., 2021; Хавинсон и др., 2021). На его основе фармацевтической компанией АО МБНПК Цитомед (Санкт-Петербург, Россия) создан препарат Цитовир-3 для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ у взрослых и детей. Препарат представляет собой комбинацию трех лекарственных веществ: бендазола гидрохлорид (Дибазол), α -Glu-Trp-натрия (Тимоген® натрий) и аскорбиновой кислоты.

Цитовир-3 является средством этиотропной и иммуностимулирующей терапии, обладает противовирусным действием в отношении вирусов гриппа А и В и других вирусов, вызывающих острые респираторные вирусные заболевания. Препарат может применяться и как средство экстренной профилактики, и как средство лечения, в том числе и коронавирусной инфекции COVID-19 (Шипицын и др., 2010; Хавинсон и др., 2020; Головачева и др., 2021; Смирнов и др., 2021). Терапевтический эффект препарата обусловлен сочетанным действием входящих в него веществ. В настоящее время доказано, что бендазол и его производные могут являться агонистами рецепторов TLR-3, TLR-8 и RLR, распознающих паттерны, ассоциированные с патогенными микроорганизмами (Beesu et al., 2014, 2016). Взаимодействие аналогов бензимидазола с этими молекулами приводит к ингибированию продукции провоспалительных цитокинов (Ullah et al., 2022; Eskandari et al., 2022). Аскорбиновая кислота является веществом с доказанным антиоксидантным и противовоспалительным действием (Смирнов и др., 2020; Oudemans-van Straaten et al., 2014).

Исследуемое вещество α -Glu-Trp предположительно оказывает иммуномодулирующее действие *in vivo* за счет модуляции экспрессии генов провоспалительных факторов, которые находятся под контролем транскрипционного фактора NF- κ B.

Цель настоящей работы заключалась в изучении клеточных механизмов, опосредующих иммуномодулирующий эффект α -Glu-Trp. В работе *in vitro* изучали возможные механизмы реализации фармакологического эффекта α -Glu-Trp и препарата Цитовир-3, содержащего в составе α -Glu-Trp, эндотелиальными клетками линии EA.hy 926 и мононуклеарными лейкоцитами периферической крови. Для моделирования активации клеток использовали провоспалительный цитокин TNF α с широким спектром активностей. Для оценки иммуномодулирующего влияния препаратов мы проводили изучение секреции провоспалительных цитокинов IL-1 α и IL-8, которые регулируют развитие воспаления в ходе инфекции. Дополнительно проводили анализ уровня поверхностной экспрессии индуцибельной молекулы ICAM-1.

Подбор клеточной модели исследований был связан с тем, что лейкоциты являются основными регуляторными и эффекторными элементами развития воспаления и иммунного ответа. Одна из главных функций эндотелиальных клеток состоит в ре-

гуляции эмиграции лейкоцитов из кровеносного русла в ткани, за счет секреции цитокинов и экспрессии адгезионных молекул, что способствует репарационным процессам. Лейкоциты, и эндотелиальные клетки являются мишенью действия провоспалительных факторов разной природы (цитокинов, компонентов микроорганизмов и пр.) и экспрессируют на своей поверхности рецепторы для этих факторов (Москалец, 2018; Chong et al., 2021).

Рецепторы TNFR1 присутствуют на клетках почти всех типов, а рецепторы TNFR2 – преимущественно на клетках иммунной системы. Связывание TNF α с рецепторами приводит, в частности, к активации транскрипционного фактора NF- κ B, т.е. к классическому пути индукции провоспалительных цитокинов. Экспрессия всех исследуемых факторов находится под контролем транскрипционного фактора NF- κ B, в связи с чем, полученные данные позволяют косвенно судить о возможности модуляции активации NF- κ B под действием исследуемых субстанций (Markey et al., 2015; Zhang et al., 2020).

IL-1 α и IL-1 β традиционно называют IL-1, поскольку эти цитокины взаимодействуют на клетках с одним рецептором и их эффекты неразличимы. IL-1 α продуцируют макрофаги, дендритные клетки, эндотелиальные и стромальные клетки, В-лимфоциты. Макрофаги важны для контроля протекания иммунной реакции, переключения стадий иммунного ответа, осуществления эффективного фагоцитоза. Рецепторы семейства TLR вызывают активацию классических провоспалительных сигнальных каскадов, что приводит к экспрессии основных цитокинов воспаления: интерлейкинов IL-1 β и IL-12, фактора некроза опухолей альфа (TNF α) и ряда основных хемокинов, в том числе IL-8. Активная иммунная реакция макрофагов поддерживается Т-хелперами 1-го типа (Th1) (Guo et al., 2012; Beesu et al., 2014; Kaneko et al., 2019).

Секретируемый IL-1 α подвергается процессингу внеклеточными протеазами с образованием активного цитокина. Процессинг IL-1 β происходит внутри клетки с участием каспазы-1. Активация каспазы-1 происходит в составе инфламмосомы, и для этого необходимо связывание внутриклеточных рецепторов NLR с PAMP. Рецепторы IL-1 экспрессируются спонтанно на многих типах клеток. В наибольшей степени действие этого цитокина затрагивает эндотелиальные клетки и лейкоциты, при этом происходит индукция экспрессии более 100 генов. Основные эффекты IL-1 вызывают активацию и эмиграцию лейкоцитов (Chong et al., 2021; Markey et al., 2015).

IL-8 относится к провоспалительным хемокинам, которые продуцируются клетками миелоидного ряда и эндотелиальными клетками после их активации. Стимулом к синтезу IL-8 является связывание TLR с агонистами (микробными и вирусными продуктами) или действие провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF α и др.). IL-8 относится к семей-

ству хемокинов и играет решающую роль в активации и привлечении нейтрофилов в очаг воспаления верхних дыхательных путей. Важный эффект IL-8 – его ангиогенное действие, как при развитии воспаления, так и при заживлении ран (Guo et al., 2012; Khalil et al., 2021; Matsushima et al., 2022).

ICAM-1 – адгезионная молекула, которая имеет низкий спонтанный уровень экспрессии на клетках. Уровень поверхностной молекулы увеличивается под влиянием провоспалительных цитокинов, компонентов микроорганизмов, а также под влиянием разного рода стрессорных воздействий на клетки (Москалец, 2018; Vui et al., 2020). Молекула обеспечивает межклеточные взаимодействия в условиях воспаления. На эндотелиальных клетках ICAM-1 является контрлигандом интегриновых рецепторов лейкоцитов и обеспечивает их миграцию в ткани в условиях воспаления, что является защитным фактором в борьбе с инфекционным агентом. ICAM-1, экспрессируемая на мононуклеарных фагоцитах, участвует в формировании иммунологического сигнала и презентации антигенов, что может быть использовано в конструировании новых вакцин или иммуномодулирующих препаратов (Guo, 2012; Soema et al., 2015; Хавинсон и др., 2021).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Использовали клетки эндотелиального происхождения линии EA.hy 926 (Университет Северная Каролина, США) и мононуклеарные лейкоциты периферической крови здоровых доноров, полученной из банка Отделения переливания крови Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

Культивирование. Перевиваемые эндотелиальные клетки человека EA.hy 926 культивировали в полной культуральной среде DMEM/F12, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ICN, США), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ глутамин (Flow Laboratories, Англия). Для дезинтеграции монослоя использовали 0.25%-ный раствор Версена (Биолот, Россия). Клетки пересеивали каждые 3–4 сут в разведении 1 : 3.

Разделение фракции гранулоцитов и фракции мононуклеарных лейкоцитов проводили на гепаринизированной крови с помощью осаждения клеток в градиенте плотности фиколл-верографина 1.077 г/см³ (Биолот, Россия). Цельную кровь разводили в 2 раза забуференным физиологическим раствором (рН 7.2); 8 мл разведенной крови наслаивали на 4 мл раствора фиколл-верографина и центрифугировали в горизонтальном роторе при 400 g в течение 30 мин. Мононуклеарные лейкоциты отбирали из интерфазного кольца, образовавшегося на границе смеси фиколл-верографин и разведенной крови, и отмывали 3 раза тем же ФР, рН 7.2. Жизнеспособность клеток определяли с помощью окраски 0.2%-ным раство-

ром трипанового синего, клетки считали в камере Горяева. Мононуклеары ресуспендировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ICN, США), 50 мкг/мл сульфата гентамицина (Самсон, Россия) и 2 мМ L-глутамин (ICN, США).

Препараты. Испытывали действие следующих препаратов: α -Glu-Trp-натрия и Цитовира-3 – смеси трех активных компонентов: α -Glu-Trp-натрия, гидрохлорида бендазола (МБНПК Цитомед, Россия) и аскорбиновой кислоты. Препараты разводили в полной культуральной среде DMEM/F12 (для эндотелиальных клеток) или RPMI-1640 (для мононуклеарных лейкоцитов) (Биолот, Россия).

С целью наиболее адекватной оценки действующих дозировок препаратов предварительно определяли их минимальную токсическую дозу при разведении в полной культуральной среде. Для подбора диапазона концентраций препаратов, не токсичных для клеток, использовали стандартные цитотоксические тесты. Токсичность Цитовира-3 для клеток суспензионной природы изучали с помощью точной цитометрии, используя окрашивание ДНК-связывающим красителем йодидистым пропидием (Sigma-Aldrich, США), свободно проникающим в мертвые клетки. Токсичность препарата Цитовир-3 для эндотелиальных клеток изучали колориметрическим методом, окрашивая монослой клеток кристаллическим фиолетовым. Токсичность препарата α -Glu-Trp для мононуклеарных лейкоцитов изучали с помощью МТТ-теста по активности митохондриальных дегидрогеназ (Van Meerloo et al., 2011). По результатам проведенных исследований для дальнейших экспериментов были выбраны концентрации препарата Цитовира-3 100.0, 10.0 и 1.0 мкг/мл для мононуклеарных лейкоцитов крови и концентрации 10.1 и 0.1 нг/мл – для клеток EA.hy 926.

Воздействие препаратов. Для изучения влияния исследуемых препаратов на спонтанную и индуцированную секрецию цитокинов IL-1 α , IL-8 и IFN α эндотелиальные клетки EA.hy 926 вносили в лунки 24-луночного планшета, в концентрации 1 млн кл./мл культуральной среды, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и культивировали 4 ч в присутствии или отсутствие провоспалительного цитокина TNF α (рефнолина, рекомбинантного TNF α ; Sanitas, Литва; специфическая активность препарата: 1 ЕД соответствует 0.06 нг) в концентрации 50 ЕД/мл в CO₂-инкубаторе. После этого в лунки планшета вносили культуральную среду, содержащую испытуемые препараты в трех концентрациях, нетоксичных для клеток, подобранных в предварительном эксперименте, и культивировали в течение 24 ч. Затем надосадочные жидкости собирали и хранили при –20°C для последующего ИФА.

Мононуклеарные клетки периферической крови здоровых доноров ресуспендировали в полной культуральной среде RPMI-1640 и вносили в лунки 24-

луночного планшета в концентрации 1 млн кл./мл. Далее исследование проводили, как описано выше для эндотелиальных клеток EA.hy 926.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Секретию клетками цитокинов оценивали с помощью ИФА, используя коммерческие тест-системы (Цитокин, Россия) согласно рекомендациям производителей. Оптическую плотность в лунках измеряли на спектрофотометре Bio-Rad Model 680 (Bio-Rad, США).

Проточная цитометрия. Для оценки спонтанного и индуцированного уровня поверхностной молекулы ICAM-1 суспензии эндотелиальных клеток EA.hy 926 и мононуклеаров периферической крови после проведенной стимуляции, аналогичной для исследования цитокинов, переносили в пробирки для проточного цитометрического анализа и окрашивали клетки с использованием моноклональных антител против ICAM-1, меченных FITC (Beckman Coulter, США), согласно рекомендациям производителя. Пробы анализировали на проточном цитометре NAVIOS (Beckman Coulter, США). Уровень поверхностной молекулы ICAM-1 оценивали по количественному определению средней интенсивности флуоресценции (СИФ).

Статистическая обработка результатов. Среднее арифметическое и стандартное отклонение из трех независимых экспериментов определяли с помощью программы Microsoft Office Excel, 2010. Для оценки достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента. За уровень статистической значимости было принято значение $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Продукция IL-8 эндотелиальными клетками EA.hy 926. Эндотелиальные клетки линии EA.hy 926 имели высокий спонтанный уровень секреции IL-8, который усиливался более чем в 5 раз в присутствии TNF α (рис. 1а). Препарат α -Glu-Trp не изменял статистически значимо спонтанную и усиленную действием TNF α секрецию IL-8 клетками EA.hy 926. Однако наблюдали тенденцию к дозозависимому снижению индуцированной продукции этого цитокина (при концентрации α -Glu-Trp 1 мкг/мл снижение составляло 26.37%, $p > 0.05$) (рис. 1а).

Продукция IL-8 мононуклеарными клетками. Мононуклеарные лейкоциты имели высокий спонтанный уровень синтеза IL-8, который под влиянием TNF α усиливался более чем в 3 раза (рис. 1б). При культивировании в присутствии Цитовира-3 в концентрации 1 нг/мл отмечали значимое увеличение спонтанной секреции IL-8 на 49.46% ($p < 0.05$), однако отмечали тенденцию к снижению содержания IL-8, индуцированного TNF α . Препарат α -Glu-Trp не оказывал самостоятельного влияния на спонтанную секрецию IL-8, однако в концентрации 1 мкг/мл статистически значимо подавлял на 36.28% ($p < 0.05$)

секрецию цитокина, индуцированную в присутствии TNF α (рис. 1б).

Продукция IL-1 α эндотелиальными клетками EA.hy 926. Спонтанный уровень секреции IL-1 α в культуре эндотелиальных клеток был низким, однако значительно усиливался под влиянием TNF α (рис. 1в). Цитовир-3 не оказывал влияния на спонтанную и индуцированную TNF α продукцию IL-1 α этими клетками. α -Glu-Trp также не оказывал действия на спонтанную секрецию этого цитокина, однако в концентрации 10 мкг/мл достоверно снижал на 22.79% ($p < 0.05$) секрецию, усиленную действием TNF α , а в концентрации 1 мкг/мл – повышал на 31.64% ($p > 0.05$), что было статистически не значимо при большом разбросе значений (рис. 1в).

Продукция IL-1 α мононуклеарными клетками. В культуре мононуклеарных лейкоцитов был зарегистрирован исходно низкий спонтанный уровень секреции IL-1 α , который изменялся незначительно в присутствии TNF α . Культивирование с препаратами Цитовир-3 и α -Glu-Trp не оказывало значимого влияния на спонтанный уровень секреции IL-1 α мононуклеарными лейкоцитами, однако отмечалась тенденция к уменьшению уровня IL-1 α , индуцированного TNF α (рис. 1з).

Определение уровня ICAM-1 на эндотелиальных клетках EA.hy 926. Эндотелиальные клетки EA.hy 926 имели низкий спонтанный уровень адгезионной молекулы ICAM-1, который повышался при культивировании клеток в присутствии TNF α (рис. 2а). Цитовир-3 не влиял на спонтанный уровень ICAM-1 эндотелиальных клеток, но в концентрации 10 нг/мл статистически значимо на 12.14% ($p < 0.05$) повышал уровень молекулы, индуцированной TNF α . Культивирование с α -Glu-Trp также не оказывало самостоятельного влияния на спонтанный уровень ICAM-1, но в концентрации 100 мкг/мл усиливал на 8.27% ($p < 0.05$) среднюю интенсивность флуоресценции этой молекулы, индуцированную TNF α (рис. 2а).

Определение уровня ICAM-1 на мононуклеарных клетках. Мононуклеарные лейкоциты также имели низкий спонтанный уровень ICAM-1. Однако индуцированный TNF α уровень этой молекулы был значительно ниже, чем у эндотелиальных клеток (рис. 2б). Цитовир-3 в концентрациях 10 и 1 нг/мл повышал спонтанный уровень ICAM-1 на клетках соответственно на 66.67 ($p < 0.05$) и 33.33% ($p < 0.01$). Препарат α -Glu-Trp во всех исследуемых концентрациях (100, 10 и 1 мкг/мл) усиливал спонтанную среднюю интенсивность флуоресценции мононуклеарных клеток на 36.67, 66.67 и 20.00% соответственно ($p < 0.05$). Ни Цитовир-3, ни α -Glu-Trp существенно не влияли на уровень поверхностной молекулы ICAM-1 после стимуляции TNF α (рис. 2б).

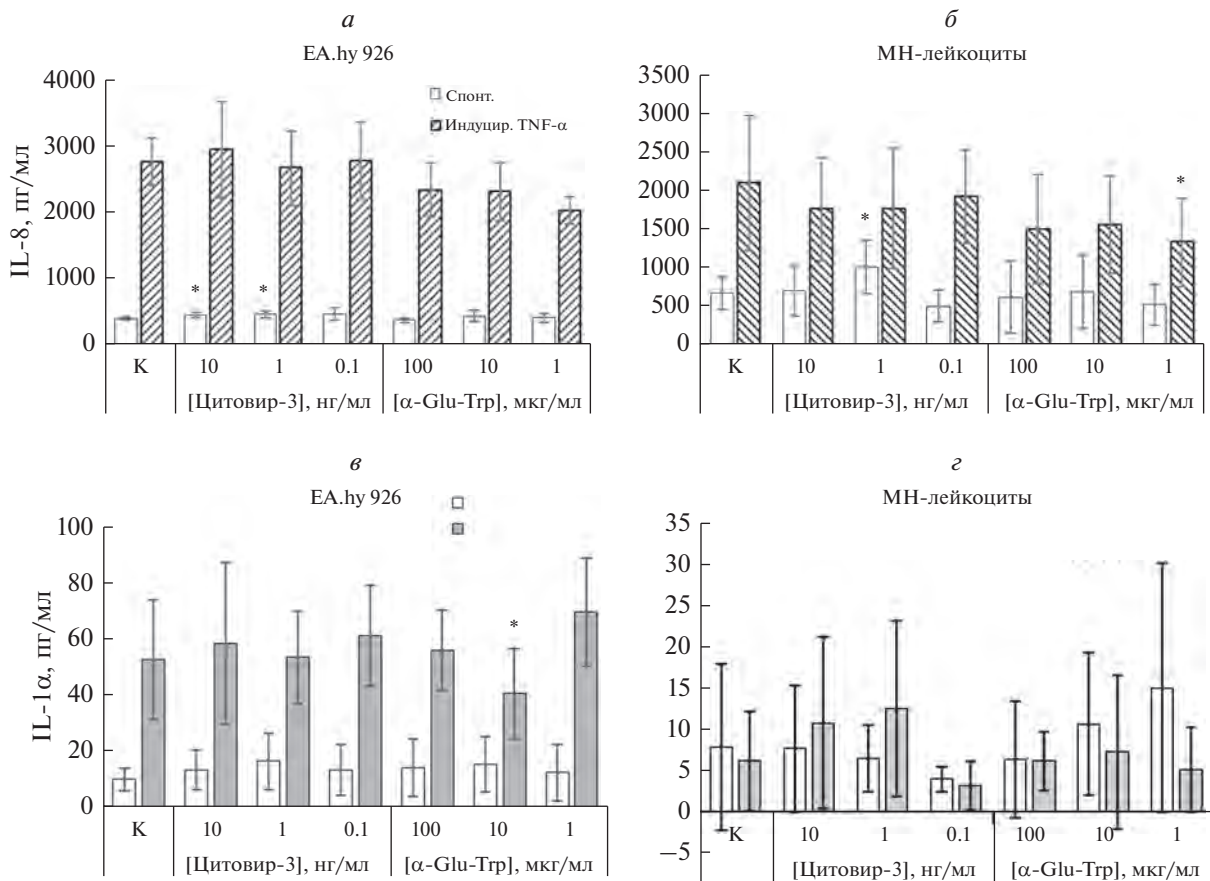


Рис. 1. Влияние препаратов Цитовир-3 и α-Glu-Trp на секрецию IL-8 (а, б) и IL-1α (в, г) эндотелиальными клетками EA.hy 926 (а, в) и мононуклеарными (МН) лейкоцитами периферической крови доноров (б, г). Клетки культивировали 4 ч в присутствии или отсутствии провоспалительного цитокина TNFα, затем – с препаратами Цитовир-3 и α-Glu-Trp в различных концентрациях или без препарата (К – контроль) в полной культуральной среде RPMI-1640 в течение 24 ч. Оценивали концентрацию IL-8 и IL-1α методом ИФА в спонтанных (спонт.) и индуцированных TNFα (индуцир. TNFα) супернатантах образцов клеток. Данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений. * – различия достоверны по сравнению с группой контроля при $p < 0.05$.

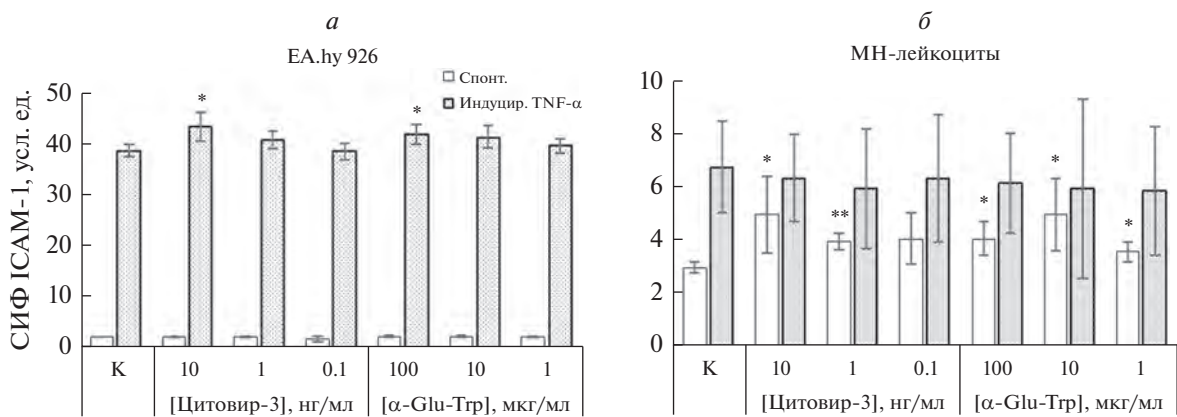


Рис. 2. Влияние препаратов Цитовир-3 и α-Glu-Trp на уровень поверхностной молекулы ICAM-1 эндотелиальных клеток EA.hy 926 (а) и мононуклеарных (МН) лейкоцитов периферической крови доноров (б). Клетки культивировали 4 ч в присутствии или отсутствие провоспалительного цитокина TNFα, затем с препаратами Цитовир-3 и α-Glu-Trp в различных концентрациях или без препарата (К – контроль) в полной культуральной среде RPMI-1640 в течение 24 ч. Оценивали среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) FITC-меченных ICAM-1 методом проточной цитометрии в спонтанных (спонт.) и индуцированных TNFα (индуцир. TNFα) образцах клеток; показаны средние значения и их стандартные отклонения. * – различия достоверны по сравнению с группой контроля при $p < 0.05$, ** – различия достоверны по сравнению с группой контроля при $p < 0.01$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, полученные данные на модели эндотелиальных клеток линии EA.hy 926 и мононуклеарных лейкоцитах свидетельствуют о схожих разнонаправленных эффектах изученных препаратов в отношении клеток различного происхождения.

При культивировании эндотелиальных клеток в присутствии α -Glu-T γ r в концентрации 10 мкг/мл происходило снижение продукции IL-1 α , индуцированной TNF α , тогда как в концентрации 100 мкг/мл отмечали усиление уровня поверхностной молекулы ICAM-1, стимулированного действием этого провоспалительного цитокина.

Действие α -Glu-T γ r на мононуклеарные лейкоциты также было разнонаправленным. В его присутствии в концентрации 1 мкг/мл было зарегистрировано значимое снижение продукции IL-8, индуцированной TNF α . Во всех трех исследуемых концентрациях (100, 10 и 1 мкг/мл) препарат усиливал спонтанный уровень поверхностной молекулы ICAM-1, повышая среднюю интенсивность флуоресценции на 1–2 усл. ед. Подавление продукции провоспалительных цитокинов под действием α -Glu-T γ r может обуславливать его противовоспалительные свойства, однако его способность повышать уровень молекулы ICAM-1 свидетельствует о способности α -Glu-T γ r активировать клетки (Vui et al., 2020; Moser et al., 2021). Учитывая, что действие препарата α -Glu-T γ r на изученные функции клеток носило разнонаправленный характер, представляется маловероятным возможность прямого влияния препарата на уровень фосфорилирования фактора NF- κ B (Chong et al., 2021).

Исследования показали, что Цитовир-3 оказывал сходное активирующее действие на эндотелиальные клетки EA.hy 926 и мононуклеарные лейкоциты периферической крови человека в различных концентрациях. Обнаруженное стимулирующее действие препарата Цитовир-3 может быть связано и с эффектом бендазола в составе препарата. Показано, что само вещество и его производные могут являться агонистами рецепторов, распознающих консервативные структуры микроорганизмов TLR и RLR. Обусловленная такими взаимодействиями активация внутриклеточных MAP-киназ (митоген-активируемых протеинкиназ) и сигнальных путей NF- κ B приводит к усилению экспрессии клетками активационных маркеров, таких как ICAM-1, но при этом уменьшается продукция провоспалительных цитокинов, индуцированной различными факторами (Chong et al., 2021; Eskandari et al., 2022).

Таким образом, выявленные эффекты препарата α -Glu-T γ r и Цитовира-3 свидетельствуют об их противовоспалительном действии за счет подавления стимулированной продукции провоспалительных цитокинов, а способность активировать клетки за счет повышения уровня поверхностной молекулы ICAM-1 позволяет реализовать защитные механизмы в борьбе с инфекцией разной этиологии, а также

способствует улучшению репарации тканей, поврежденных воспалительным процессом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках научно-исследовательской работы в Научно-исследовательском институте экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН по заказу и финансовой поддержке АО МБНПК “Цитомед”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах животные и люди не участвовали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Э.А. Старикова, Т.А. Кудрявцева: постановка цели и задач, планирование экспериментов; Э.А. Старикова: постановка экспериментов; Т.А. Кудрявцева, Э.А. Старикова, Е.Г. Головачева, В.А. Апрятина: анализ результатов; Е.Г. Головачева, В.А. Апрятина: написание статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Головачева Е.Г., Афанасьева О.И., Гончарова Е.С., Быковская А.Г., Давлетгареева Д.В., Апрятина В.А. 2021. Возможности терапевтической коррекции патологии носоглотки, ассоциированной с COVID-19, у детей в амбулаторных условиях. Вестник оториноларингологии. Т. 86. № 6. С. 69. (Golovacheva E.G., Afanasyeva O.I., Goncharova E.S., Bykovskaya A.G., Davletgareeva D.V., Apryatina V.A. 2021. Possibilities of therapeutic correction of ENT pathology associated with COVID-19 in children on an outpatient basis. Vestn. Otorinolaringol. V. 86. № 6. P. 69.) <https://doi.org/10.17116/otorino20218606169>
- Зинина Е.П., Царенко С.В., Логунов Д.Ю., Тухватуллин А.И., Бабаянц А.В., Аврамов А.А. 2021. Роль провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при бактериальной пневмонии. Обзор литературы. Вестник интенсивной терапии им. А.И. Салтанова. Т. 1. С. 77. (Zinina E.P., Tsarenko S.V., Logunov D.Yu., Tukhvatullin A.I., Babayants A.V., Abramov A.A. 2021. The role of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in bacterial pneumonia. Literature review. Bulletin of Intensive Therapy named after A.I. Saltanov. V. 1. P. 77.) <https://doi.org/10.21320/1818-474X-2021-1-77-89>
- Москалец О.В. 2018. Молекулы клеточной адгезии ICAM-1 и VCAM-1 при инфекционной патологии. Тихоокеанский мед. журн. Т. 2. С.21. (Moskalets O.V. 2018. Molecules of cellular adhesion ICAM-1 and VCAM-1 in infectious pathology. Pacific Med. J. T. 2. P. 21.) <https://doi.org/10.17238/PmJ1609-1175.2018.2.21-25>
- Смирнов В.С., Зарубаев В.В., Петленко В.С. 2020. Биология возбудителей и контроль гриппа и ОРВИ. Санкт-Петербург: Гиппократ. 336 с. (Smirnov V.S., Zarubaev V.V., Petlenko S.V. 2020. Biology of pathogens and control of influenza and ARV. St. Petersburg: Hippocrates. 336 p.)

- Смирнов В.С., Ленева И.А., Кудрявцева Т.А., Файзулов Е.Б., Заплутанов В.А., Петленко С.В., Карташова Н.П., Грачева А.В., Корчевая Е.Р. 2021. Возможности подавления цитопатогенного действия коронавируса SARS-CoV-2 по результатам изучения противовирусной активности препарата Цитовир®-3 *in vitro*. Антибиотики и химиотерапия. Т. 66. № 5–6. С. 4. (Smirnov V.S., Leneva I.A., Kudryavtseva T.A., Fayzuloev E.B., Zaplutanov V.A., Petlenko S.V., Kartashova N.P., Gracheva A.V., Korchevaya E.R. 2021. Possibilities of suppressing the cytopathogenic effect of SARS-CoV-2 coronavirus according to the results of the antiviral activity of Cytovir®-3 *in vitro* study. Antibiotics and Chemother. V. 66. № 5–6. P. 4.) <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-5-6-4-10>
- Хавинсон В.Х., Корнеев А.А., Попович И.Г., Дудков А.В., Кузник Б.И. 2020. Мета-анализ иммуномодулирующей активности лекарственного пептидного препарата тималина. Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. № 4. С.108. (Khavinson V.H., Korneenkov A.A., Popovich I.G., Gudkov A.V., Kuznik B.I. 2020. Meta-analysis of the immunomodulatory activity of the medicinal peptide drug timalin. Current problems of healthcare and medical statistics. № 4. P.108.) <https://doi.org/10.24411/2312-2935-2020-00100>
- Хавинсон В.Х., Линькова Н., Чалисова Н.И., Ивко О.М. 2021. Тималин: применение для иммунокоррекции и молекулярные аспекты биологической активности. Успехи совр. биол. Т. 141. № 1. С. 25. (Khavinson V.H., Linkova N., Chalisova N.I., Ivko O.M. 2021. Timalin: application for immunocorrection and molecular aspects of biological activity. Successes Modern Biol. T. 141. № 1. P. 25.) <https://doi.org/10.31857/S0042132420060046>
- Шипицын К.С., Огарков П.И., Смирнов В.С., Жоголев С.Д., Жоголев К.Д. 2010. Профилактика острых респираторных вирусных инфекций и пневмоний в организованном коллективе. Эпидемиология и инфекционные болезни. № 1. С. 57. (Shipitsyn K.S., Ogarkov P.I., Smirnov V.S., Zhogolev S.D., Zhogolev K.D. 2010. Prevention of acute respiratory viral infections and pneumonia in an organized team. Epidemiol. Infect. Diseases. № 1. P. 57.) <https://doi.org/10.17816/EID40479>
- Beesu M., Caruso G., Salyer A.C., Shukla N.M., Khetani K.K., Smith L.J., Fox L.M., Tanji H., Ohto U., Shimizu T., David S.A. 2016. Identification of a human toll-like receptor (TLR) 8-specific agonist and a functional pan-tlr inhibitor in 2-aminoimidazoles. J. Med. Chem. V. 59. P. 3311. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00023>
- Beesu M., Malladi S.S., Fox L.M., Jones C.D., Dixit A., David S.A. 2014. Human toll-like receptor 8-selective agonistic activities in 1-alkyl-1H-benzimidazol-2-amines. J. Med. Chem. V. 57. P. 7325. <https://doi.org/10.1021/jm500701q>
- Bui T.M., Wiesolek H.L., Sumagin R. 2020. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. J. Leukoc. Biol. V. 108. № 3. P. 787–799. <https://doi.org/10.1002/JLB.2MR0220-549R>
- Chong D.L.W., Rebeyrol C., José R.J., Williams A.E., Brown J.S., Scotton C.J., Porter J.C. 2021. ICAM-1 and ICAM-2 are differentially expressed and up-regulated on inflamed pulmonary epithelium, but neither ICAM-2 nor LFA-1: ICAM-1 are required for neutrophil migration into the airways in vivo. Front. Immunol. V. 12. P. 691. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.691957>
- Eskandari M., Asgharzadeh F., Askarnia-Faal M.M., Naimi H., Avan A., Ahadi M., Vossoughinia H., Gharib M., Soleimani A., Naghibzadeh N., Ferns G., Ryzhikov M., Khazaei M., Hasanian S.M. 2022. Mebendazole, an anti-helminth drug, suppresses inflammation, oxidative stress and injury in a mouse model of ulcerative colitis. Sci. Rep. V. 12. P. 10249. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14420-6>
- Fiore-Gartland A., Panoskaltis-Mortari A., Agan A.A., Mistry A.J., Thomas P.G., Mathay M.A., PALISI PICFlu Investigators: Hertz T., Randolph A.G. 2017. Cytokine profiles of severe influenza virus-related complications in children. Front. Immunol. V. 8. P. 1423. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01423>
- Guo F., Mead J., Aliya N., Wang L., Cuconati A., Wei L., Li K., M. Block T., Guo J.-T., Chang J. 2012. RO 90-7501 enhances TLR3 and RLR agonist induced antiviral response. PLoS One. V. 7. P. e42583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042583>
- Matsushima K., Yang D., Oppenheim J.J. 2022. Interleukin-8: an evolving chemokine. Cytokine. V. 153. P. 155828. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155828>
- Moser T., Hoepner L., Schwenker K., Seiberl M., Feige J., Akgün K., Haschke-Becher E., Ziemssen T., Sellner J. 2021. Cladribine alters immune cell surface molecules for adhesion and costimulation: further insights to the mode of action in multiple sclerosis. Cells. V. 10. № 11. P. 3116. <https://doi.org/10.3390/cells10113116>
- Kaneko N., Kurata M., Yamamoto T., Morikawa S., Masumoto J. 2019. The role of interleukin-1 in general pathology. Inflamm. Regener. V.3 9. P. 12. <https://doi.org/10.1186/s41232-019-0101-5>
- Khalil B.A., Elemam N.M., Maghazachi A.A. 2021. Chemokines and chemokine receptors during COVID-19 infection. Computational and Structural Biotechnol. J. V. 19. P. 976. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.034>
- Malainou C., Herold S. 2019. [Influenza]. Internist (Berl.). V. 60. P. 1127. <https://doi.org/10.1007/s00108-019-00670-6>
- Markey K.A., Gartlan K.H., Kuns R.D., MacDonald K.P., Hill G.R. 2015. Imaging the immunological synapse between dendritic cells and T cells. J. Immunol. Methods. V. 423. P. 40. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.029>
- Oudemans-van Straaten H.M., Spoelstra-de Man A. ME and de Waard M.C. 2014. Vitamin C revisited. Critical Care. V. 18. P. 460. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0460-x>
- Soema P.C., Kompier R., Amorij J.P., Kersten G.F. 2015. Current and next generation influenza vaccines: formulation and production strategies. Eur. J. Pharm. Biopharm. V. 94. P. 251. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.023>
- Ullah A., Al Kury L.T., Althobaiti Y.S., Ali T., Shah F.A. 2022. Benzimidazole derivatives as new potential NLRP3 inflammasome inhibitors that provide neuroprotection in a rodent model of neurodegeneration and memory impairment. J. Inflamm. Res. V. 15. P. 3873. <https://doi.org/10.2147/JIR.S351913>
- Van Meerloo J., Kaspers G.J.L., Cloos J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods Mol. Biol. V. 731. P. 237. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
- Zhang Y., Liu H., Tang W., Qiu Q., Peng J. 2020. Resveratrol prevents TNF- α -induced VCAM-1 and ICAM-1 upregulation in endothelial progenitor cells via reduction of NF- κ B activation. J. Int. Med. Res. V.48. P. 300060520945131. <https://doi.org/10.1177/0300060520945131>

The Effect of Drugs with Alpha-Glutamyl-Tryptophan *in vitro* on Cytokine Secretion and Level of Surface Molecule ICAM-1

E. G. Golovacheva^{a, *}, E. A. Starikova^{b, c}, T. A. Kudryavtseva^b, and V. A. Apryatina^d

^aSmorodintsev Influenza Research Institute of the Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, 197376 Russia

^bResearch Institute of Experimental Medicine of the North-Western Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, 197376 Russia

^cDepartment of Immunology of Pavlov First State St. Petersburg Medical University, Saint Petersburg, 197022 Russia

^dSaint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, St. Petersburg, 197110 Russia

*e-mail: okdixi@mail.ru

The study of the molecular mechanisms underlying the action of immunomodulatory drugs is relevant to substantiate their therapeutic effect. In this work, a comparative analysis of spontaneous and TNF α -induced secretion of proinflammatory cytokines IL-1 α and IL-8, as well as the level of the adhesion molecule ICAM-1 in the culture of endothelial cells EA.hy 926 and on peripheral blood mononuclear cells of healthy donors *in vitro* in the model of inflammation when cultivated in the presence of alpha-glutamyl-tryptophan (α -Glu-Trp) and the drug Cytovir-3 is shown. The aim was to study the cellular mechanisms mediating the immunomodulatory effect of the drugs α -Glu-Trp and Cytovir-3. It was shown that α -Glu-Trp reduced TNF α -induced IL-1 α production and enhanced the TNF α -stimulated level of the ICAM-1 surface molecule of endothelial cells. At the same time, the drug reduced the secretion of TNF α -induced cytokine IL-8 and increased the spontaneous level of ICAM-1 on mononuclear cells. The drug Cytovir-3 had an activating effect on endothelial cells EA.hy 926 and mononuclear leukocytes of human peripheral blood. In his presence, there was an increase in spontaneous secretion of IL-8 by endothelial and mononuclear cells. The drug also increased the level of TNF α -induced ICAM-1 on endothelial cells and increased the spontaneous level of this surface molecule on mononuclears. Suppression of stimulated production of proinflammatory cytokines under the action of α -Glu-Trp independently and as part of Cytovir-3 may cause its anti-inflammatory properties. However, an increase in the level of the ICAM-1 surface molecule indicates mechanisms that increase the functional activity of the studied cells, which is equally important for the implementation of an effective immune response to infection and repair of damaged tissues during inflammatory reactions.

Keywords: alpha-glutamyl-tryptophan, Cytovir-3, EA.hy 926 endothelial cells, human peripheral blood mononuclear leukocytes, ICAM-1, cytokine secretion, ARVI