

Сравнительное изучение эффективности препаратов Кортексин[®], Пинеамин[®], левилимаб, адалимумаб, дексаметазон на моделях «цитокинового шторма»

А.В. Калатанова¹, Е.И. Трофимец², А.Н. Афанасьева¹,
В.Б. Сапарова¹, К.Л. Крышень², И.Е. Макаренко¹

¹Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг»,

Российская Федерация, 198515, Санкт-Петербург, Стрельна, ул. Связи, д. 34А;

²Акционерное общество «НПО «Дом Фармации»,

Российская Федерация, 188663, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, п. Кузьмолловский, 245

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Калатанова Анна Вячеславовна – научный сотрудник отдела фармакологии ЗАО «Фарм-Холдинг». Тел.: +7 (964) 368-99-18. E-mail: anna.kalatanova@gropharm.com. ORCID: 0000-0003-2623-6014

Трофимец Екатерина Игоревна – токсиколог АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». Тел.: +7 (911) 268-49-59. E-mail: trofimets.ei@doclinika.ru. ORCID ID: 0000-0003-3246-6457

Афанасьева Алина Николаевна – младший научный сотрудник лаборатории фармакологии ЗАО «Фарм-Холдинг». Тел.: +7 (911) 798-70-77. E-mail: Alina.Afanaseva@gropharm.com. ORCID: 0000-0002-1443-4294

Сапарова Валерия Бяшимовна – научный сотрудник лаборатории фармакологии ЗАО «Фарм-Холдинг» Тел.: +7 (921) 187-86-75. E-mail: Valeriya.Saparova@gropharm.com. ORCID: 0000-0002-8445-1129

Крышень Кирилл Леонидович – руководитель отдела токсикологии и микробиологии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», кандидат биологических наук. Тел.: +7 (981) 897-49-40. E-mail: kryshen.kl@doclinika.ru. ORCID: 0000-0003-1451-7716

Макаренко Игорь Евгеньевич – руководитель медицинского департамента ЗАО «Фарм-Холдинг», кандидат медицинских наук. Тел.: +7 (905) 225-62-57. E-mail: Igor.Makarenko@gropharm.com. ORCID: 0000-0003-2308-0608

РЕЗЮМЕ

Введение. В условиях пандемии коронавирусной инфекции актуальным остается поиск лекарственных препаратов, оказывающих терапевтический эффект в отношении «цитокинового шторма» как основной причины осложнений при данном заболевании у человека.

Цель исследования: Оценить эффективность введения препаратов Кортексин[®], Пинеамин[®], в отношении провоспалительных цитокинов *in vitro* и *in vivo* в сравнении с препаратами левилимаб, адалимумаб, дексаметазон.

Материал и методы. В эксперименте *in vitro* сформирована модель «цитокинового шторма», индуцированного липополисахаридом (ЛПС), на клеточной линии RAW 264.7, с последующим измерением уровня TNF α в культуральной среде. В эксперименте *in vivo* сформирована модель септического шока у мышей путем однократного внутривентрального введения ЛПС. Оценивали клиническое состояние и смертность животных, уровень провоспалительных цитокинов – ИЛ-6 и TNF α в плазме крови животных.

Результаты. По результатам исследования *in vitro* препараты Кортексин[®] и Пинеамин[®] проявили терапевтический эффект в отношении уровня TNF α в культуральной среде. В эксперименте *in vivo* препараты Кортексин[®] и Пинеамин[®] снижали выраженность клинических признаков патологии и смертность животных, оказали терапевтический эффект в отношении уровня ИЛ-6 и TNF α при «цитокиновом шторме», превосходящий таковой для препарата сравнения левилимаб.

Заключение. Препараты Кортексин[®] и Пинеамин[®] проявили сопоставимую либо превышающую таковую для препарата сравнения левилимаб терапевтическую активность на *in vitro* и *in vivo* моделях «цитокинового шторма». По результатам исследования, а также учитывая профиль безопасности и низкую стоимость органолептических препаратов, был сделан вывод, что препараты Кортексин[®] и Пинеамин[®] являются перспективными лекарственными кандидатами для дальнейшей разработки в качестве элемента комплексной терапии либо профилактики осложнений заболеваний, патогенетический механизм развития которых включает в себя гиперэкспрессию провоспалительных цитокинов (в том числе осложнений новой коронавирусной инфекции COVID-19).

Ключевые слова: цитокиновый шторм, ИЛ-6, TNF α , Кортексин[®], Пинеамин[®], левилимаб, адалимумаб.

Для цитирования: Калатанова А.В., Трофимец Е.И., Афанасьева А.Н., Сапарова В.Б., Крышень К.Л., Макаренко И.Е. Сравнительное изучение эффективности препаратов Кортексин[®], Пинеамин[®], левилимаб, адалимумаб, дексаметазон на моделях «цитокинового шторма». Фармация, 2021; 70 (6): 42–48. <https://doi.org/10.29296/25419218-2021-06-08>

COMPARATIVE INVESTIGATION OF THE EFFICACY OF CORTEXIN[®], PINEAMINE[®], LEVILIMAB, ADALIMUMAB, AND DEXAMETHASONE ON CYTOKINE STORM MODELS

A.V. Kalatanova¹, E.I. Trofimets², A.N. Afanasieva¹, V.B. Saparova¹, K.L. Kryshen², I.E. Makarenko¹

¹ZAO «Pharm-Holding», 34A, Svyaz St., Strelna, Saint Petersburg 198515, Russian Federation;

²PHARMACY HOUSE Research and Production Association, 245, Kuzmolovsky Settlement, Vsevolozhsky District, Leningrad Region 188663, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Kalatanova Anna Vyacheslavovna – Scientific officer of the Department of Pharmacology of the «Pharm-Holding». Tel.: +7 (964) 368-99-18. E-mail: anna.kalatanova@geropharm.com. ORCID: 0000-0003-2623-6014

Trofimets Ekaterina Igorevna – toxicologist of the «RMC «HOME OF PHARMACY». Tel.: +7 (911) 268-49-59. E-mail: trofimets.ei@doclinika.ru. ORCID: 0000-0003-3246-6457

Afanasyeva Alina Nikolaevna – Junior research assistant of the Laboratory of Pharmacology of the «Pharm-Holding». Tel.: +7(911) 798-70-77. E-mail: Alina.Afanaseva@geropharm.com. ORCID: 0000-0002-1443-4294

Saparova Valeria Byashimovna – Research assistant of the Laboratory of Pharmacology of the «Pharm-Holding». Tel.: +7 (921) 187-86-75. E-mail: Valeriya.Saparova@geropharm.com. ORCID: 0000-0002-8445-1129

Kryshen Kirill Leonidovich – Head of the Department of Toxicology and Microbiology of the «RMC «HOME OF PHARMACY». Tel.: +7 (981) 897-49-40. E-mail: kryshen.kl@doclinika.ru. ORCID: 0000-0003-1451-7716

Makarenko Igor Evgenyevich – Head of the Department of Pharmacology and Early phases of clinical trials of the «Pharm-Holding». Tel.: +7 (905) 225-62-57. E-mail: Igor.Makarenko@geropharm.com. ORCID: 0000-0003-2308-0608

SUMMARY

Introduction. During the coronavirus infection pandemic, there remains relevant to search for drugs that have a therapeutic effect on the cytokine storm as the main cause of complications in this disease in humans.

Objective: to evaluate the efficiency of *in vitro* and *in vivo* administration of Cortexin® and Pineamine® versus levilimab, adalimumab, and dexamethasone against proinflammatory cytokines.

Material and methods. In an *in vitro* experiment, a model of a lipopolysaccharide (LPS)-induced cytokine storm was created using the RAW 264.7 cell line, followed by measuring the level of TNF α in the culture medium. In an *in vivo* experiment, a murine model of septic shock was formed by a single intraperitoneal injection of LPS. The clinical condition and mortality of animals and their plasma level of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF α were evaluated.

Results. The *in vitro* study showed that Cortexin® and Pineamine® had a therapeutic effect on the level of TNF α in the culture medium. In the *in vivo* experiment, Cortexin® and Pineamine® decreased the severity of clinical signs of the disease and mortality in animals, exerted a therapeutic effect on IL-6 and TNF α levels in a cytokine storm, exceeding that for the comparison drug levilimab.

Conclusion. Cortexin® and Pineamine® versus the comparison drug levilimab have shown a comparable or higher therapeutic activity in *in vitro* and *in vivo* models of cytokine storm. The results of the investigation and consideration of the safety profile and low cost of organic preparations have led to the conclusion that Cortexin® and Pineamine® are promising drug candidates for further design as an element of combination therapy or prevention of complications of diseases, the pathogenetic mechanism of which involves the overexpression of proinflammatory cytokines (including complications of the novel coronavirus infection COVID-19).

Key words: cytokine storm, IL-6, TNF α , Cortexin®, Pineamine®, levilimab, adalimumab.

For reference: Kalatanova A.V., Trofimets E.I., Afanasyeva A.N., Saparova V.B., Kryshen K.L., Makarenko I.E. Comparative investigation of the efficacy of Cortexin®, Pineamine®, levilimab, adalimumab, and dexamethasone on cytokine storm models. *Farmatsiya*, 2021; 70 (6): 42–48. <https://doi.org/10/29296/25419218-2021-06-08>

Введение

«Цитокиновый шторм» – форма системной воспалительной реакции организма, характеризующаяся чрезмерным синтезом цитокинов в очаге воспаления посредством механизма положительной обратной связи [1]. Цитокины – белки молекулярной массой ≤ 30 кД, секретируемые иммунными клетками организма, – в нормальном количестве обладают защитным действием, связанным с ограничением поврежденной ткани при воспалении, однако при их чрезмерной секреции наблюдается активация большего числа Т-лимфоцитов и лизис иммунных клеток, что увеличивает продукцию интерферона-гамма и фактора некроза опухоли- α (TNF α). Это приводит к активации макрофагов, дендритных клеток, других иммунных клеток и эндотелиальных клеток. Все эти клетки, в свою очередь, повышают количество провоспалительных цитокинов. Важно, что макрофаги и эндотелиальные клетки продуцируют в большом количестве интерлейкин-6 (IL-6), который по механизму положительной обратной связи активизирует Т-лимфоциты и другие иммунные клетки, приводя к развитию «цитокинового шторма» [2].

Уровень цитокинов в периферической крови может повышаться при различных заболеваниях, однако в некоторых случаях наблюдается повышение их концентрации в десятки или даже сотни и тысячи раз, с развитием клинических признаков тяжелого состояния (лихорадка, энцефалопатия, ацидоз, сосудистая недостаточность), что является проявлением «цитокинового шторма». Выработка ИФН I типа, из которых наиболее хорошо охарактеризованы ИФН- α/β , является основополагающим звеном врожденного иммунного ответа на вирусные инфекции и играет ключевую роль на ранних стадиях заболевания [3]. Отсроченное же высвобождение ИФН-I на ранних стадиях инфекций SARS-CoV и MERS-CoV не способствует антивирусному ответу организма [4]. В этом случае, быстро повышающийся впоследствии уровень цитокинов и хемокинов привлекает многие воспалительные клетки, такие как нейтрофилы и моноциты, что в результате приводит к избыточной инфильтрации клеток воспаления в ткани легких, вызывая их повреждение.

В условиях пандемии коронавирусной инфекции актуальным остается поиск лекарственных препаратов, оказывающих терапевтический эф-

фekt в отношении «цитокинового шторма» как основной причины осложнений при данном заболевании у человека. На момент подготовки рукописи статьи в терапии коронавирусной инфекции использовались препараты, содержащие моноклональные антитела, характеризующиеся высокой стоимостью (табл. 1), а также глюкокортикостероиды, характеризующиеся высокой токсичностью и риском развития нежелательных явлений [5, 6].

Цель исследования – оценка эффективности введения препаратов Кортексин® и Пинеамин® в отношении провоспалительных цитокинов *in vitro* и *in vivo* в сравнении с препаратами левалимаб, адалимумаб, дексаметазон.

Материал и методы

Программа доклинических исследований включала 2 этапа: *in vitro* на модели «цитокинового шторма» на клеточной линии макрофагов мыши RAW 264.7 (профилактическая схема) и *in vivo* на модели ЛПС-индуцированного септического шока у мышей (лечебная схема).

In vitro эксперимент. В качестве тест-системы была использована клеточная линия макрофагов мыши RAW 264.7, полученная из Американской коллекции клеточных культур (ATCC) [8]. Клетки RAW 264.7 являются моноцитарно-макрофагальной линией, выделенной Рачке и коллегами из опухоли мыши линии BALB/c, индуцированной вирусом лейкемии Абельсона [9]. Данная клеточная линия является стандартным модель-

ным объектом для метаболических исследований [10]. В частности, клетки RAW 264.7, стимулированные ЛПС, широко используются при оценке клеточного ответа на микробные и противовоспалительные агенты [11]. В эксперименте были использованы клетки не старше 30-го пассажа. Клетки рассеивали в стерильные 6-луночные планшеты, обработанные для работы с адгезионными культурами, в концентрации 80 000 клеток/луночка в питательной среде DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л (Биолот, lot. ДМ-20-05-MS) и 10% фетальной бычьей сыворотки (Capricorn, lot. C320-3374) (полная питательная среда). Клетки культивировали в течение 24±4 ч в условиях CO₂-инкубатора (5% CO₂, 37°C). На 2-й день инкубации проводили стимуляцию клеток последовательно растворами объектов исследования и через 2 ч, ЛПС из *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma Aldrich, lot. 099M4029V) в концентрации 50 нг/мл.

Спустя 24±4 ч инкубации в условиях CO₂-инкубатора собирали культуральную среду в пробирки, клетки утилизировали. В эксперименте использовали следующие концентрации (мкг/мл) объектов испытания: Кортексин®, Пинеамин® – 31, 125, 250, 500, 1000; дексаметазон – 31, 125, 250, 400 мкг/мл; левалимаб – 8, 125, 500, 2000; адалимумаб – 35, 141, 563, 2250, 9000.

Для количественного определения уровня TNFα использовали набор Mouse TNFα ELISA Kit (Invitrogen, cat.#BMS607-3TEN). Оптическую плотность измеряли спектрофотометрически при длине волны 450/620 нм (CLARIOstar, BMGLabtech Германия).

In vivo эксперимент. В качестве тест-системы использовали самцов мышей линии Balb/C, как широко применяемый вид животных при экспериментальном моделировании сепсиса [12, 13]. Эксперимент выполнен на 200 самцах мышей. Исследование рассмотрено и одобрено для проведения на биоэтической комиссии на соответствие проекта исследования принципам «Трех R» и Директиве 2010/63/EU. Для моделирования экспериментального сепсиса на мышях в данном исследовании выбрана модель ЛПС-индуцированного септического шока с однократным внутрибрюшинным введением ЛПС в дозе 30 мг/кг экспериментальным животным. Объекты испытания

Таблица 1

Обзор стоимости объектов испытания и стандартных объектов

Table 1

Overview of the cost of test and standard objects

Препарат	Характеристика	Стоимость согласно Государственному Реестру предельных отпускных цен [7], рублей
Кортексин®	Полипептиды коры головного мозга скота	1104,8
Пинеамин®	Полипептиды шишковидной железы [эпифиза] крупного рогатого скота	Не включен в реестр предельно отпускных цен
Илсира® (левалимаб)	рекомбинантное человеческое моноклональное антитело к рецептору интерлейкина-6 (ИЛ-6)	47531,1
Хумира® (адалимумаб)	рекомбинантное моноклональное антитело, пептидная последовательность которого идентична IgG1 человека	43409,4
Дексаметазон	Глюкокортикостероид	276,9

вводили непосредственно после введения ЛПС, далее – через 24 ч. Характеристика экспериментальных групп отражена в табл. 2.

У эвтаназированных через 4 ч после моделирования патологии животных посмертно отбирали кровь из сердца и получали плазму для последующего определения уровня TNF α и IL-6.

Количественное определение медиаторов воспаления (TNF α и IL-6) в культуральной среде и плазме крови мышей проводили с помощью иммуноферментного анализа в варианте неконкурентного метода «сэндвич». Для количественного определения IL-6 использовали набор Mouse IL-6 ELISA Kit (Invitrogen, cat.#BMS603-2TEN), для TNF α использовали набор Mouse TNF α ELISA Kit (Invitrogen, cat.# BMS607-3TEN). Оптическую плотность измеряли спектрофотометрически при длине волны 450/620 нм (CLARIOstar, BMGLabtech, Германия).

Для всех данных применена описательная статистика. Статистический анализ выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения GraphPadPrism 8.0 (GraphPadSoftware, США). Для оценки выживаемости животных применили процедуру Каплана-Мейера с последующей оценкой межгрупповых различий лог-ранк теста Мантела-Кокса. Для данных клинического наблюдения рассчитывали медиану и интерквартильный размах. Статистический анализ данных проводили с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением методом средних рангов. Различия определяли как статистически значимые при $p < 0,05$. Для статистической оценки медиаторов воспаления использовали программное обеспечение MARS Data Analysis Software 3.42 R3. Зависимость между единицами OD и концентрацией медиаторов воспаления оценивали при помощи калибровочного графика по значениям OD для стандартных образцов в диапазоне концентраций, обеспечивающих линейность и чувствительность методики.

Результаты и обсуждение

Результаты оценки уровня TNF α в *in vitro* эксперименте отражены на рис. 1. Показано, что внесение индуктора патологии (ЛПС в концентрации 50 нг/мл) привело к увеличению уровня TNF α в культуральной среде через 24 ч после моделирования «цитокинового шторма». Внесение препарата сравнения адалимумаб привело к дозозависимому снижению концентрации TNF α в культуральной среде, что также является подтверждением состоятельности модели, поскольку адалимумаб представляет собой рекомбинантное моноклональное антитело, пептидная последовательность которого идентична IgG1 человека, и селективно связывается с TNF. Дексаметазон стимулировал снижение уровня TNF α на 25% относительно контроля патологии, при этом признаков дозозависимости не зафиксировано. Препарат сравнения левилимаб не оказал влияния на уровень TNF α в культуральной среде.

Исследуемые препараты Кортексин® и Пинеамин® проявили тенденцию к дозозависимости терапевтического эффекта в отношении уровня TNF α в культуральной среде. Максимальный терапевтический эффект препарата Кортексин®

Таблица 2

Характеристика исследуемых групп

Table 2

Characteristics of the examined groups

№	Количество самцов	Характеристика исследуемых групп	Объект исследования	Доза, мг/кг	Эвтаназия	
					через 4 ч после введения ЛПС	через 72 ч после введения ЛПС
1	20	Интактная	-	-	По 8 животных из каждой группы	Оставшиеся животные
2	20	Формирование патологии без терапии	Носитель	0		
3	20	Формирование патологии + терапия	Дексаметазон	3,6		
4	20		Левелимаб	57		
5	20		Кортексин®	0,17 (1/10 ТД*)		
6	20			1,7 (ТД)		
7	20		Пинеамин®	17 (10ТД)		
8	20			0,17 (1/10 ТД)		
9	20			1,7 (ТД)		
10	20			17 (10ТД)		

Примечание. * – ТД – терапевтическая доза для животного, рассчитанная исходя из терапевтической дозы для человека с применением коэффициента пересчета доз [14].
 Note. * TD – the animal therapeutic dose calculated based on the human therapeutic dose using a dose conversion factor [14].

был зафиксирован в наименьшей концентрации 31 мкг/кг. Для препарата Пинеамин® максимальный терапевтический эффект, сопоставимый с таковым для препарата сравнения дексаметазон, наблюдался в концентрации 1000 мкг/кг.

При исследовании *in vivo* первые клинические признаки развития острого воспаления в виде угнетения и взъерошенности шерсти отмечали среди животных всех групп с ЛПС-индуцированным септическим шоком в течение первых 4 ч после введения индуктора патологии. По мере развития патологического процесса клиническое состояние животных усугублялось, что проявлялось в снижении тургора кожи и мышечного тонуса, снижении реакции на внешние раздражители, бледности слизистых оболочек и атаксии. Пик развития септического шока с максимальным количеством летальных исходов наблюдали в группе негативного контроля на 2-й день после индукции патологии. Яркими клиническими проявлениями септического шока у выживших животных были одышка, принятие вынужденного положения тела (лежание на боку), истощение и тремор.

На пике развития септического шока в группе животных, получавших в качестве позитивного контроля дексаметазон в дозе 3,6 мг/кг, выраженность клинических симптомов была значительно ниже по сравнению с группой негативного контроля. На 2-й день после введения ЛПС в группе животных, получавших левелимаб в дозе 57 мг/кг, отмечали терапевтический эффект в виде снижения клинического проявления развития септического шока по сравнению с группой негативного контроля.

Применение тестируемого препарата Кортексин® в максимальной исследуемой дозе 17 мг/кг и тестируемого препарата Пинеамин® в дозе 1,7 мг/кг не оказало терапевтического влияния на развитие септического шока. У животных, выживших после пика развития септического шока, применение

препарата Кортексин® в дозах 0,17 и 1,7 мг/кг оказало нормализующее действие. Так, начиная со 2-го дня после индукции септического шока, среди животных данных групп отмечалось полное отсутствие клинических симптомов до окончания эксперимента (по 5 самцов мышей в группе). При применении препарата Пинеамин® в дозе 0,17 мг/кг регистрировали снижение выраженности клинических признаков септического шока на 2-й день после введения ЛПС, в некоторых случаях отмечали полное исчезновение клинических симптомов. Обнаруженные терапевтические эффекты были сопоставимы с таковыми препарата позитивного контроля дексаметазон в дозе 3,6 мг/кг. Пинеамин® в дозе 17 мг/кг на пике развития патологии снижал выраженность клинических признаков септического шока по сравнению с группой негативного контроля вплоть до исчезновения клинических признаков. Данные по выживаемости животных на 3-е сутки исследования приведены на рис. 2.

Однократное внутривентральное введение животным ЛПС привело к развитию септического шока, при котором через 48 ч после введения индуктора патологии смертность достигла 100% в группе негативного контроля (патология без лечения). В группе животных, получавших в качестве позитивного контроля дексаметазон в дозе 3,6 мг/кг, гибель отсутствовала на протяжении всего эксперимента. В группе введения левелимаба была зафиксирована гибель животных на уровне 50%. Кортексин® в дозах 0,17 и 1,7 мг/кг и Пинеамин® в дозах 0,17 и 17 мг/кг проявили фармакологическую активность на модели ЛПС-индуцированного септического шока у самцов-мышей, и их применение привело к статистически значимому увеличению выживаемости животных на фоне развития септического шока. Результаты оценки уровня ИЛ-6 в плазме крови мышей, эвтаназированных через 4 ч после моделирования патологии, отражены на рис. 3.

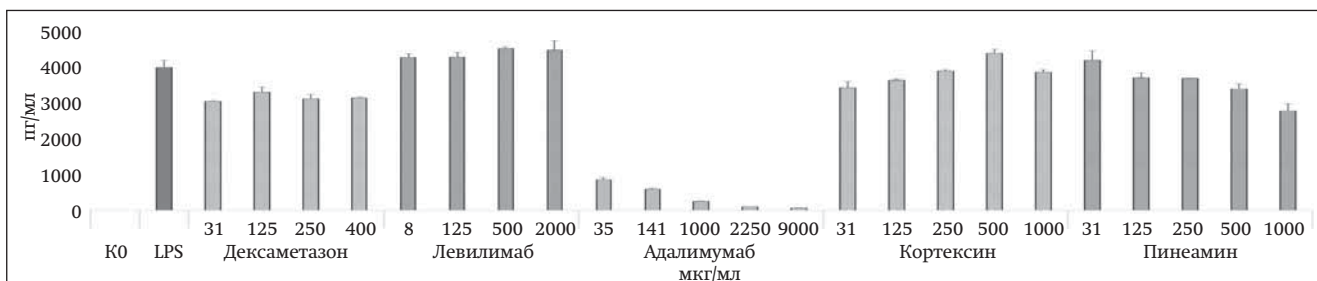


Рис. 1. Уровень TNFα в культуральной среде после моделирования «цитокинового шторма»
 Fig. 1. TNFα level in the culture medium after cytokine storm simulation

Показано, что введение индуктора патологии привело к увеличению уровня IL-6 в плазме крови мышей, перенесших септический шок, по сравнению с интактной группой через 4 ч после моделирования «цитокинового шторма». Препарат сравнения дексаметазон стимулировал снижение уровня IL-6 в плазме крови мышей на 86% относительно группы контроля патологии. Введение левилимаба привело к снижению уровня IL-6 в плазме крови мышей на 29% относительно контроля патологии. Кортексин® в дозах 1,7 и 17 мг/кг снизил концентрацию IL-6 в плазме крови мышей по сравнению с левилимабом на 21 и 40% соответственно. Пинеамин® в дозах 0,17, 1,7 и 17 мг/кг снизил концентрацию IL-6 по сравнению с левилимабом на 40, 35 и 55% соответственно. Результаты оценки уровня TNFα в плазме крови мышей, эвтаназированных через 4 ч после моделирования патологии, отражены на рис. 4.

Показано, что введение индуктора патологии (ЛПС в дозе 30 мг/кг) привело к увеличению уровня TNFα в плазме крови мышей, перенесших септический шок, по сравнению с интактной группой через 4 ч после моделирования патологии. Препарат сравнения дексаметазон стимулировал снижение уровня TNFα в плазме крови мышей на 88% относительно группы контроля патологии. Введение препарата сравнения «левилимаб» привело к снижению уровня TNFα в плазме крови мышей на 33% относительно группы контроля патологии. Кортексин® в дозе 0,17 мг/кг не оказал эффекта в отношении снижения уровня TNFα в плазме крови животных. Кортексин® в дозах 1,7 и 17 мг/кг снизил концентрацию TNFα в плазме крови мышей по сравнению с левилимабом на 22 и 37%, соответственно. На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что эффективность препарата Кортексин® в дозах 1,7 и 17 мг/кг превосходит таковую для препарата сравнения левилимаб. Пинеамин® в дозе 0,17 мг/кг снизил концентрацию TNFα в плазме крови мы-

шей на 34% относительно группы животных, получавших препарат сравнения левилимаб. При введении препарата Пинеамин® в дозах 1,7 и 17 мг/кг уровень TNFα в плазме крови мышей был не менее чем на 4% ниже, чем в группе препарата левилимаб. На основании полученных результатов был сделан вывод о сопоставимости препаратов Пинеамин® и левилимаб по рассматриваемому показателю.

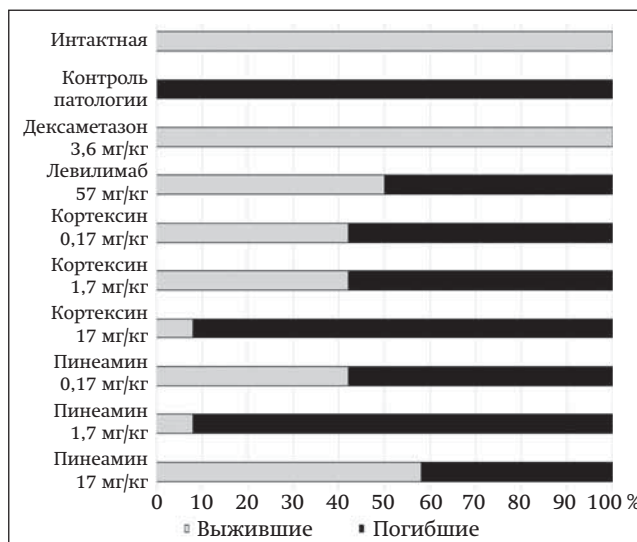


Рис. 2. Соотношение погибших и выживших животных
Fig. 2. The ratio of dead to surviving animals

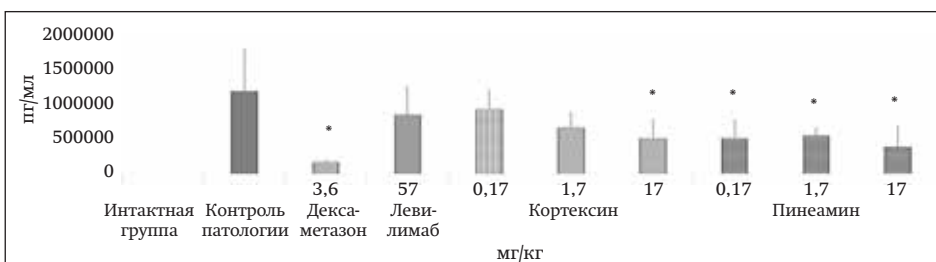


Рис. 3. Уровень IL-6 в плазме крови мышей через 4 ч после моделирования патологии
Примечание. * – Отличие от группы контроля патологии, p<0,05 (t-тест).

Fig. 3. Plasma IL-6 level in mice 4 hours after disease simulation

Note. * – the difference from the pathology control group, p<0.05 (t-test).

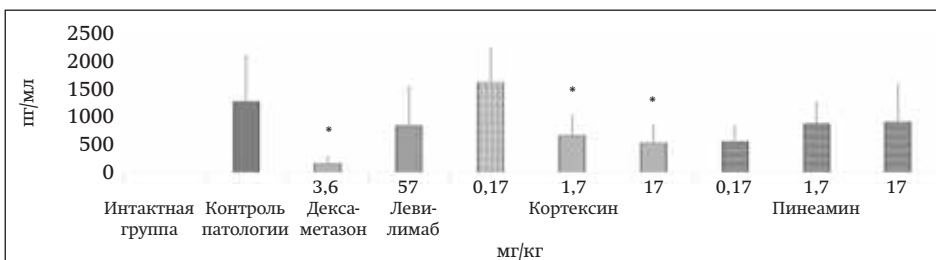


Рис. 4. Уровень TNFα в плазме крови мышей через 4 ч после моделирования патологии
Примечание. * – отличие от группы контроля патологии, p<0,05 (t-тест).

Fig. 4. Plasma TNFα level in mice 4 hours after disease simulation

Note. * – the difference from the pathology control group, p<0.05 (t-test).

Заключение

По результатам *in vitro* исследования показано, что исследуемые препараты Кортексин® и Пинеамин® проявили тенденцию к дозозависимости терапевтического эффекта в отношении уровня TNF α в культуральной среде. В *in vivo* исследовании препарат Кортексин® при введении в дозах 0,17 и 1,7 мг/кг и препарат Пинеамин® в дозах 0,17 и 17 мг/кг проявили терапевтический эффект в отношении ЛПС-индуцированного септического шока. Отмечено снижение выраженности клинических признаков патологии и смертности животных, а в некоторых случаях регистрировали нормализацию клинического состояния животных вплоть до полного исчезновения клинических проявлений острого воспалительного процесса. Препараты Кортексин® (за исключением дозы 0,17 мг/кг) и Пинеамин® (во всех дозах) оказали терапевтический эффект в отношении уровня IL-6 и TNF α в плазме крови мышей на модели «цитокинового шторма», сопоставимый либо превосходящий таковой для препарата сравнения левилимаб. Показано, что терапевтический эффект препарата Пинеамин® сопоставим с таковым для препарата сравнения левилимаб. Эффективность препарата Кортексин® в дозах 1,7 и 17 мг/кг превосходит таковую для препарата сравнения левилимаб. Таким образом, по результатам исследования, а также учитывая профиль безопасности и низкую стоимость органолептических препаратов, сделан вывод, что препараты Кортексин® и Пинеамин® являются перспективными лекарственными кандидатами для дальнейшей разработки в качестве элемента терапии либо профилактики осложненной коронавирусной инфекции. Действие исследуемых препаратов в отношении «цитокинового шторма», предположительно, развивается за счет ингибирования внутриклеточных каскадов основных провоспалительных цитокинов – TNF α и IL-6. При этом, поскольку уровень цитокинов снижался не полностью, как это было на фоне применения дексаметазона – ингибитора ядерных факторов воспаления, вероятно, что точками приложения действия препаратов являются внутриклеточные сигнальные белки.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература/References

1. Lee D.W., Gardner R., Porter D.L. et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*. 2014; 124 (2): 188–95. DOI: 10.1182/blood-2014-05-552729
2. Шипилов М. В. Молекулярные механизмы «цитокинового шторма» при острых инфекционных заболеваниях. *Лечебное дело*. 2013; 1: 81–5. [Shipilov M.V. Molecular mechanisms of the «cytokine storm» in acute infectious diseases. *Lechebnoye delo*. 2013; 1: 81–5 (In Russian)]
3. García-Sastre A., Biron C.A. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science*. 2006; 312 (5775): 879–82. DOI: 10.1126/science.1125676
4. Channappanavar R., Fehr A.R., Zheng J. et al. IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. *J. Clin. Invest.* 2019; 129 (9): 3625–39. DOI: 10.1172/JCI126363
5. Борисова Е.О. Побочные эффекты системной глюкокортикоидной терапии. *Практическая пульмонология*. 2004; 3: 14–8. [Borisova E.O. Side effects of systemic glucocorticosteroid therapy. *Prakticheskaya pul'monologiya*. 2004; 3: 14–8 (In Russian)]
6. Комердус И. В., Будул Н.А., Чеканова А.В. Системное действие глюкокортикоидных препаратов: в помощь врачу общей практики. *РМЖ*. 2017; 25 (1): 45–8. [Komerdus I.V., Budul N.A., Chekanova A.V. Systemic action of glucocorticoid drugs: to help the general practitioner. *RMZH*. 2017; 25 (1): 45–8 (In Russian)]
7. Государственный Реестр предельных отпускных цен. [Электронное издание]. Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/PriceLims.aspx> [State Register of maximum selling prices. [Electronic resource]. Access mode: <http://grls.rosminzdrav.ru/PriceLims.aspx> (in Russian)]
8. RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™). [Electronic resource]. Access mode: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/TIB-71.aspx?geo_country=ru#generalinformation
9. Raschke W.C., Baird S., Ralph P., Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*. 1978; 15 (1): 261–7. DOI: 10.1016/0092-8674(78)90101-0
10. Merly L., Smith S.L.. Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something? *Immunotoxicol.* 2017; 39 (2): 55–8. DOI: 10.1080/08923973.2017.1282511
11. Shigemori S., Namai F., Yamamoto Y. et al. Genetically modified *Lactococcus lactis* producing a green fluorescent protein-bovine lactoferrin fusion protein suppresses proinflammatory cytokine expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J. Dairy Sci.* 2017; 100 (9): 7007–15. DOI: 10.3168/jds.2017-12872
12. Sardari M., Skuljec J., Yin D. et al. Lipopolysaccharide-induced sepsis-like state compromises post-ischemic neurological recovery, brain tissue survival and remodeling via mechanisms involving microvascular thrombosis and brain T cell infiltration. *Brain. Behav. Immun.* 2021; 91: 627–38. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.10.015
13. Alsharif K.F., Almalki A.A., Al-Amer O. et al. Oleuropein protects against lipopolysaccharide-induced sepsis and alleviates inflammatory responses in mice. *IUBMB Life*. 2020; 72 (10): 2121–32. DOI: 10.1002/iub.2347
14. Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Guidance for Industry. Rockville: Food and Drug Administration. 2005.

Поступила 15 мая 2021 г.

Received 15 May 2021

Принята к публикации 12 июля 2021 г.

Accepted 12 July 2021