

УДК 616.2-056.43-002-08:579.861.2.063.8:57.085
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-1-23-32>

Экстракт из культуры термофильного штамма *Staphylococcus aureus* подавляет аллергическое воспаление в дыхательных путях *in vivo* и дегрануляцию тучных клеток и базофилов *in vitro*

Калюжин О.В.¹, Проскурина О.В.², Суханова С.А.², Новикова Н.В.³, Колганова Н.А.⁴

¹ Первый Московский государственный медицинский университет (Первый МГМУ) им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)
Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2

² Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ (ВНЦ БАВ)
Россия, 142450, г. Старая Купавна, ул. Кирова, 23

³ Институт аллергологии и клинической иммунологии (ИАКИ)
Россия, 123104, г. Москва, ул. Малая Бронная, 20/1

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет (РНИМУ) им. Н.И. Пирогова
Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1

РЕЗЮМЕ

Цель – изучить противоаллергическое действие рузама – экстракта из культуры термофильного штамма *Staphylococcus aureus* – на модели астмы *in vivo*, а также его влияние на дегрануляцию тучных клеток и базофилов *in vitro*.

Материалы и методы. Аллергическую астму у морских свинок воспроизводили двумя внутрибрюшинными инъекциями овальбумина с последующей серией ингаляций этого антигена в течение 1,5 мес. Рузам (6 мкг/кг) или референс-препарат (кромогликат натрия, 3 мг/кг) вводили ежедневно с помощью небулайзера в течение последних 6 сут иммунизации. Через 1 сут после завершения ингаляций овальбумина и сравниваемых препаратов оценивали изменения в дыхательных путях с помощью цитологических, морфометрических и гистологических методов. Для определения влияния рузама на IgE-независимую дегрануляцию, индуцированную соединением 48/80 *in vitro*, использовали базофилы крови кроликов и перитонеальные тучные клетки крыс. Эффект рузама сравнивали с таковым гидрокортизона гемисукцината. Базофилы крови сенсibilизированных овальбумином морских свинок использовали при оценке действия препарата на IgE-зависимую дегрануляцию, индуцированную овальбумином. Гранулы тучных клеток и базофилов для расчета индекса дегрануляции окрашивали с помощью альцианового синего.

Результаты. На модели астмы рузам снижал степень обструкции дыхательных путей, повышая объем возврата бронхоальвеолярного смыва, и подавлял нейтрофильное и эозинофильное воспаление, при этом мобилизуя другие клетки-эффекторы противинфекционного ответа (лимфоциты и макрофаги). По ряду критериев противоаллергической эффективности рузам превосходил кромогликат натрия. Рузам в концентрациях 8,4–840 мкг/мл ингибировал дегрануляцию тучных клеток и базофилов, вызванную соединением 48/80, в той же степени, что и гидрокортизона гемисукцинат (10^{-3} М). Рузам (280 и 420 мкг/мл) дозозависимо подавлял индуцированную овальбумином дегрануляцию базофилов сенсibilизированных морских свинок.

Заключение. Подтверждено противоаллергическое действие рузама в тест-системах *in vivo* и *in vitro*. Выдвинута гипотеза о TLR2-опосредованном характере биологических/фармакологических эффектов препарата.

Ключевые слова: рузам, *Staphylococcus aureus*, термофильный штамм, модель астмы, аллергическое воспаление, тучные клетки, базофилы, дегрануляция

✉ Калюжин Олег Витальевич, kalyuzhin@list.ru

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным биоэтическим комитетом ВНЦ БАВ (протокол № 12 от 28.03.2006).

Для цитирования: Калюжин О.В., Проскурина О.В., Суханова С.А., Новикова Н.В., Колганова Н.А. Экстракт из культуры термофильного штамма *Staphylococcus aureus* подавляет аллергическое воспаление в дыхательных путях *in vivo* и дегрануляцию тучных клеток и базофилов *in vitro*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2023;22(1):23–32. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-1-23-32>.

An extract from the culture of a thermophilic *Staphylococcus aureus* strain suppresses allergic inflammation in the airways *in vivo* and degranulation of mast cells and basophils *in vitro*

Kalyuzhin O.V.¹, Proskurina O.V.², Sukhanova S.A.², Novikova N.V.³, Kolganova N.A.⁴

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)
8/2, Trubetskaya Str., Moscow, 119991, Russian Federation

² All-Russian Scientific Center for the Safety of Biologically Active Substances
23, Kirova Str., Staraya Kupavna, 142450, Russian Federation

³ Institute of Allergy and Clinical Immunology
20/1, Malaya Bronnaya Str., Moscow, 123104, Russian Federation

⁴ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University
1, Ostrovityanova Str., Moscow, 117997, Russia

ABSTRACT

Aim. To study the anti-allergic effects of ruzam, an extract from the culture of a thermophilic *Staphylococcus aureus* strain, in an *in vivo* model of asthma and its influence on degranulation of mast cells and basophils *in vitro*.

Materials and methods. Allergic asthma in guinea pigs was reproduced by two intraperitoneal injections of ovalbumin followed by a series of inhalations of this antigen for 1.5 months. Ruzam (6 µg / kg) or a reference drug (sodium cromoglycate, 3 mg / kg) was administered daily via a nebulizer during the last 6 days of immunization. One day after completion of inhalations with ovalbumin and compared drugs, changes in the airways were assessed using cytological, morphometric, and histologic methods. Rabbit blood basophils and rat peritoneal mast cells were used to determine the effect of ruzam on IgE-independent degranulation induced by the compound 48 / 80 *in vitro*. The effect of ruzam was compared with that of hydrocortisone hemisuccinate. Basophils from the blood of ovalbumin-sensitized guinea pigs were used to evaluate the effect of the drug on IgE-dependent degranulation induced by ovalbumin. Granules of mast cells and basophils were detected by alcian blue staining to calculate the degranulation index.

Results. In the asthma model, ruzam reduced the degree of airway obstruction by increasing the bronchoalveolar lavage volume returned and suppressed neutrophilic and eosinophilic inflammation, while mobilizing other effector cells of the anti-pathogen immunity (lymphocytes and macrophages). Ruzam has proven to have a stronger anti-allergic effect than sodium cromoglycate by several parameters. At concentrations of 8.4–840 µg / ml, ruzam inhibited degranulation of mast cells and basophils, induced by the compound 48 / 80, equally to hydrocortisone hemisuccinate (10⁻³ M). At concentrations of 280 and 420 µg / ml, ruzam dose-dependently inhibited ovalbumin-induced degranulation of basophils in sensitized guinea pigs.

Conclusion. The anti-allergic effect of ruzam was confirmed in test systems *in vivo* and *in vitro*. We speculate here that the TLR2 signaling pathway may be involved in biological and pharmacological effects of this drug.

Keywords: ruzam, *Staphylococcus aureus*, thermophilic strain, asthma model, allergic inflammation, mast cells, basophils, degranulation

Conflict of interests. The authors declare the absence of obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local Committee at All-Russian Scientific Center for the Safety of Biologically Active Substances (Protocol No. 12 of 28.03.2006).

For citation: Kalyuzhin O.V., Proskurina O.V., Sukhanova S.A., Novikova N.V., Kolganova N.A. An extract from the culture of a thermophilic *Staphylococcus aureus* strain suppresses allergic inflammation in the airways *in vivo* and degranulation of mast cells and basophils *in vitro*. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2023;22(1):23–32. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-1-23-32>.

ВВЕДЕНИЕ

Структурные фрагменты и продукты жизнедеятельности микроорганизмов, в первую очередь бактерий, давно являются объектами поиска биологически активных веществ с потенциально широким спектром фармакологического действия [1]. В этом плане одним из наиболее перспективных направлений, состоятельность которого доказана в клинических исследованиях и практическом здравоохранении, является создание бактериальных иммуномодуляторов [2, 3]. В России разработано, зарегистрировано и уже три десятилетия используется в терапии аллергических заболеваний лекарственное средство «Рузам», представляющее собой экстракт из культуры термофильного штамма *Staphylococcus aureus* [4, 5]. Продемонстрирована эффективность этого препарата в лечении поллиноза, бронхиальной астмы, аллергического ринита, атопического дерматита, крапивницы и ангиоотеков, латексной и пищевой аллергии, инсектной аллергии, а также в профилактике респираторных инфекций [4].

Сегодня рузам разрешен к клиническому применению в виде раствора для подкожного введения. Весьма обнадеживают положительные результаты доклинических и первых клинических исследований назальной и ингаляционной форм препарата в лечении аллергических заболеваний дыхательных путей [6].

Ранее проведены экспериментальные исследования противоаллергического действия рузама, в ходе которых, в частности, доказана его способность подавлять при ингаляционном введении овальбумин-индуцированное воспаление у сенсibilизированных животных *in vivo*, а также ингибировать IgE-зависимую и IgE-независимую дегрануляцию тучных клеток и базофилов в тест-системах *in vitro*. Материалы этой работы были представлены А.Г. Чучалиным и соавт. еще в 2003 г., но лишь в тезисном виде как фрагмент обзорной статьи [5]. Вместе с тем эти данные представляют большой интерес сегодня не только в контексте создания и внедрения новых лекарственных форм рузама, но и в плане объясне-

ния фармакологических эффектов препарата, выявленных в более поздних клинических исследованиях [4]. Вышесказанное побудило детально описать результаты ранее проведенных экспериментальных исследований и подвергнуть их дополнительной математической обработке и интерпретации в свете эволюционирующих иммунологических парадигм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рузам – комплекс липопротеинов, экстрагированный из культуры термофильного штамма *Staphylococcus aureus* С-2, – предоставлен для испытаний компанией «Рузам-М» (Россия). Аллергическое воспаление в дыхательных путях *in vivo* воспроизводили по методу Р.А. Hutson и соавт. [7] в модификации, детально описанной ранее [8]. Для этого морским свинкам обоего пола массой 300–400 г дважды с 7-дневным интервалом внутрибрюшинно вводили овальбумин (Sigma-Aldrich, США) в дозе 10 мг/кг. Затем животным с помощью компрессорного небулайзера Pari LC Plus (Pari GmbH, Германия) 1 раз в 4 сут в течение 1,5 мес ингалировали по 1 мл раствора овальбумина, постепенно увеличивая его концентрацию с 0,1 до 1%. Рузам в дозе 6 мкг/кг или кромогликат натрия, служивший референсным препаратом, в дозе 3 мг/кг вводили с помощью этого же небулайзера в виде водного раствора в объеме 1 мл ежедневно в течение 6 сут в конце иммунизации в группах животных «Овальбумин + рузам» и «Овальбумин + кромогликат» соответственно. В группе «Овальбумин» в последние дни иммунизации через небулайзер вводили стерильную воду в том же режиме и объеме. Время каждой ингаляции – 180 с.

Исследования с использованием экспериментальных животных выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

Характеристики аэрозольных частиц определяли с помощью аэродинамического измерителя APS 3300 (TSI, США) и каскадного импактора с последующим анализом отобранных проб флуориметри-

ческим методом. Средняя массовая скорость распыления составила 0,46 мл/мин, массовый медианный диаметр частиц аэрозоля – 6,2 мкм, величина респираторной фракции рузама и кромогликата натрия – 38,5 и 39,8% соответственно. Через 24 ч после ингаляции последней дозой овальбумина оценивали изменения в дыхательных путях с помощью цитологических, морфометрических и гистологических методов. Забор бронхоальвеолярного смыва проводили под внутрибрюшинным гексеналовым наркозом через эндотрахеальную канюлю путем двукратного промывания легких 10 мл стерильного 0,9%-го раствора NaCl, подогретого до 37 °С.

Определяли объем возврата эндотрахеально введенной жидкости. В бронхоальвеолярном смыве после центрифугирования при 200 g в течение 10 мин определяли абсолютное количество клеток в 1 мл (цитоз). В мазках, окрашенных по Романовскому – Гимзе, подсчитывали число нейтрофилов, эозинофилов, макрофагов и лимфоцитов [9]. Объемную плотность ассоциированных с бронхами лимфоидных фолликулов, имеющих вид беловатых бляшек диаметром 3–5 мм, выступающих над поверхностью слизистой оболочки бронхов, оценивали в макропрепаратах легких под лупой с помощью сетки Г.Г. Автандилова [8].

Для гистологических исследований легкие фиксировали в жидкости Карнуа, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 4–5 мкм, которые окрашивали либо гематоксилином и эозином для выявления эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов и гистиоцитов, либо толуидиновым синим (рН 2,0) для определения числа тучных клеток. В обоих случаях клетки считали в поле зрения микроскопа при 400-кратном увеличении. Дегрануляцию тучных клеток оценивали в баллах: 1 балл – вся цитоплазма заполнена плотно расположенными темно-фиолетовыми гранулами, 2 – отмечаются отдельные участки просветления в цитоплазме, иногда отдельные гранулы расположены рядом с клеткой, 3 – участки просветления занимают 50–70% цитоплазмы, ядро оголено, гранулы расположены очень рыхло; 4 – просветленные участки составляют более 70% цитоплазмы (гранулолизис). Индекс дегрануляции (ИД) рассчитывали по формуле

$$\text{ИД} = \sum (i \times n_i) / \sum n_i,$$

где i – степень дегрануляции в баллах, n_i – количество клеток с степенью i (%) [10].

Перитониальные тучные клетки крыс Вистар получали, как описано ранее [11]. Базофилы выделяли в составе лейкоцитарной взвеси из крови, забранной под эфирным наркозом из сердца кроликов или морских свинок, путем двухступенчатого осаждения: на

первом этапе разбавляя кровь этилендиаминтетрауксусной кислотой (Sigma-Aldrich, США), на втором – цитрат-содержащей осаждающей жидкостью [12].

Влияние рузама на IgE-независимую дегрануляцию тучных клеток и базофилов *in vitro* оценивали в конечных концентрациях 8,4; 84 и 840 мкг/мл. В качестве референс-препарата использовали натриевую соль гемисукцината гидрокортизона (Sigma-Aldrich, США) в концентрациях 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М. Дегрануляцию индуцировали соединением 48/80 (Sigma-Aldrich, США) 1 мкг/мл – полимером, обладающим свойствами дегранулятора тучных клеток и базофилов и гистамин-либератора [13].

Оценку влияния рузама на IgE-зависимую дегрануляцию базофилов *in vitro* проводили, как описано ранее [12]. Для этого выделяли лейкоцитарную взвесь из крови сердца морских свинок, которых за 1 мес до этого сенсибилизировали внутрибрюшинным введением 10 мкг овальбумина (Sigma-Aldrich, США) с гидроокисью алюминия (100 мг геля) в качестве адьюванта по методу [14]. Суспензию лейкоцитов (10^4 клеток/мл) инкубировали в среде с добавлением рузама в концентрациях 280 и 420 мкг/мл или без такового (контроль) течение 15 мин при 37 °С в атмосфере с 5%-м CO_2 . Затем в культуру на 10 мин вносили раствор овальбумина в конечной концентрации 0,35% для индукции дегрануляции базофилов. Реакцию останавливали добавлением охлажденного солевого раствора. Суспензию клеток центрифугировали 7 мин при 100 g. Из осадка готовили препараты для микроскопирования. Фиксацию и окраску препаратов проводили по методу [15]. Для выявления гранул базофилов использовали 0,5%-й альциановый синий (рН 1,0), ядра докрашивали сафранином (0,1%-й раствор в 1%-й уксусной кислоте). Индекс дегрануляции рассчитывали тем же способом, который использовали при гистологических исследованиях [10].

Экспериментальные и контрольная группы морских свинок в исследованиях *in vivo* включали по пять особей. В экспериментах *in vitro* для каждой концентрации рузама и референс-препарата, а также в качестве контроля использовали триплеты культур клеток от каждого из трех отдельно взятых животных.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Statistica 18 (StatSoft Inc., США). Парные сравнения независимых и зависимых выборок по количественным характеристикам проводили, используя критерии Манна – Уитни и Вилкоксона соответственно. Количественные данные в таблицах и на рисунках представлены как среднее и стандартное отклонение $M \pm SE$. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$, при $0,05 \leq p < 0,1$ констатировали тенденцию.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Противоаллергические эффекты рузама на модели воспаления дыхательных путей, индуцированного овальбумином, у морских свинок

Последовательные две внутрибрюшинные инъекции овальбумина, а затем серия ингаляций этого антигена морским свинкам воспроизводили хроническое аллергическое воспаление дыхательных путей, которое, помимо морфологических расстройств, характеризовалось снижением объема возврата бронхоальвеолярного смыва и увеличением более чем в 1,5 раза числа клеток в смыве, главным образом за счет эозинофилов, в меньшей степени – нейтрофилов (табл. 1). Число и доля лимфоцитов при этом существенно не изменялись, а абсолютное и относительное количество макрофагов

снижалось в сравнении с показателями интактных животных.

Ежедневные ингаляции рузама в течение 6 сут на завершающем этапе моделирования аллергического воспаления увеличивали объем возврата бронхоальвеолярного смыва, в результате чего этот показатель не отличался от такового у интактных морских свинок (см. табл. 1). Референс-препарат – кромогликат натрия – не изменял объем возврата.

В группах животных с овальбумин-индуцированным воспалением дыхательных путей, получавших рузам или кромогликат натрия, выявлена тенденция к снижению цитоза бронхоальвеолярного смыва. При этом под влиянием рузама статистически значимо уменьшалось число эозинофилов и нейтрофилов, а референс-препарат существенно не изменял количество этих клеток в смыве.

Таблица 1

Влияние рузама и кромогликата натрия на показатели бронхоальвеолярного смыва морских свинок с овальбумин-индуцированным аллергическим воспалением дыхательных путей, $M \pm SE$

Показатель	Интактные животные	Аллергическое воспаление дыхательных путей			
		Овальбумин	Овальбумин + рузам	Овальбумин + кромогликат	
Объем возврата, %	65,6 ± 6,3	50,0 ± 5,8*	62,9 ± 1,0#	50,7 ± 7,4	
Цитоз, клеток/мл	42,0 ± 9,0	68,0 ± 16,0*	58,0 ± 7,0	55,0 ± 19,0	
Макрофаги	клеток/мл	32,0 ± 2,9	22,2 ± 2,4*	29,6 ± 2,4†	12,6 ± 3,0*
	%	76,6 ± 5,9	32,7 ± 3,5*	51,1 ± 5,2†	22,9 ± 5,5*
Лимфоциты	клеток/мл	3,3 ± 0,4	4,3 ± 1,4	6,0 ± 1,3*†	2,7 ± 0,6
	%	7,8 ± 1,0	6,4 ± 1,7	10,4 ± 2,2*†	4,9 ± 1,1
Нейтрофилы	клеток/мл	0,30 ± 0,05	1,8 ± 0,9*	0,6 ± 0,3#†	1,5 ± 0,5
	%	0,64 ± 0,13	2,7 ± 1,4*	1,0 ± 0,5#†	2,7 ± 0,1
Эозинофилы	клеток/мл	6,2 ± 2,0	39,5 ± 3,3*	21,6 ± 2,9*#†	38,4 ± 3,6*
	%	14,9 ± 5,0	58,1 ± 4,8*	37,7 ± 5,1*#†	69,8 ± 6,6*

* $p < 0,05$ в сравнении с интактными животными; # $p < 0,05$ в сравнении с группой «Овальбумин»; † $p < 0,05$ в сравнении с группой «Овальбумин + кромогликат»

Кромогликат натрия в условиях аллергического воспаления способствовал еще большему снижению числа макрофагов в смыве, тогда как на фоне ингаляций рузама наблюдали, наоборот, восходящий тренд количества этих клеток. В результате этот показатель в группе «Овальбумин + рузам» не отличался от такового у интактных животных и более чем в 2 раза превышал значения в группе «Овальбумин + кромогликат» (см. табл. 1).

Сравниваемые фармакологические вещества вызвали противоположные тенденции изменения числа лимфоцитов в бронхоальвеолярном смыве: рузам – к увеличению, а кромогликат натрия – к снижению. В итоге абсолютное и относительное количество лимфоцитов в смывах от животных, получавших рузам, было примерно вдвое выше, чем у морских свинок после ингаляций референс-препарата.

Иммунизация морских свинок овальбумином приводила к существенным морфологическим изме-

нениям дыхательных путей, совокупность которых можно охарактеризовать как бронхит и обструктивная эмфизема. Выявляли дистрофические изменения эпителия и обширные участки десквамации. В просветах бронхов, помимо десквамированных эпителиоцитов, присутствовали в большом количестве эозинофилы и нейтрофилы, а также единичные макрофаги. В межальвеолярных перегородках отмечали диффузно-очаговую инфильтрацию полиморфно-ядерными лейкоцитами (эозинофилами и нейтрофилами), лимфоцитами и гистиоцитами. Количество полиморфно-ядерных лейкоцитов в поле зрения увеличивалось более чем в 2 раза в сравнении с интактными животными (рис. 1). Выявлена математически неподтвержденная тенденция к снижению числа тучных клеток в поле зрения; показатели дегрануляции этих клеток статистически значимо не изменялись. Примерно в 2 раза возрастала объемная плотность лимфоидной ткани в стенках бронхов (рис. 2).

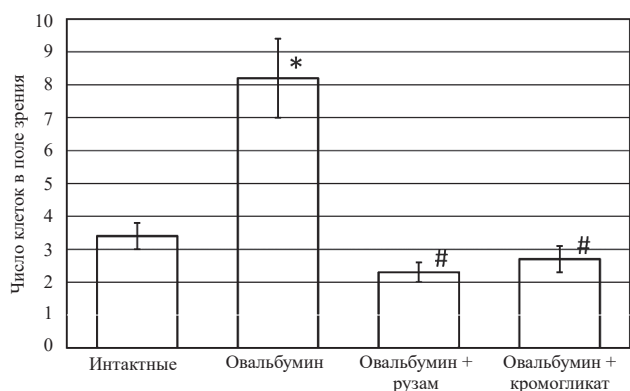


Рис. 1. Влияние рузама и кромогликата натрия на количество полиморфно-ядерных лейкоцитов в межальвеолярных перегородках легких морских свинок с овальбумин-индуцированным аллергическим воспалением дыхательных путей, $M \pm SE$: * $p < 0,05$ в сравнении с интактными животными; # $p < 0,05$ в сравнении с группой «Овальбумин»

Тестируемый и референсный препараты на модели аллергического воспаления примерно в равной степени снижали инфильтрацию легких эозинофилами и нейтрофилами: в результате ингаляций рузама количество полиморфно-ядерных лейкоцитов в межальвеолярных перегородках уменьшалось в 3,6 раза, и под влиянием кромогликата натрия – в 3 раза (см. рис. 1). Математически подтвержденных различий между группами морских свинок, получавших сравниваемые препараты, по этому показателю не выявлено: в обоих случаях число полиморфно-ядерных лейкоцитов снижалось до уровня, не отличающегося от такового у интактных животных.

Ингаляции рузама и кромогликата натрия статистически значимо не изменяли число тучных клеток в поле зрения и показатели их дегрануляции в легких морских свинок с альбумин-индуцированным воспалением дыхательных путей. Оба препарата также не оказывали влияния на объемную плотность лимфоидных фолликулов в стенках бронхов иммунизированных животных (рис. 2).

идных фолликулов в стенках бронхов иммунизированных животных (рис. 2).

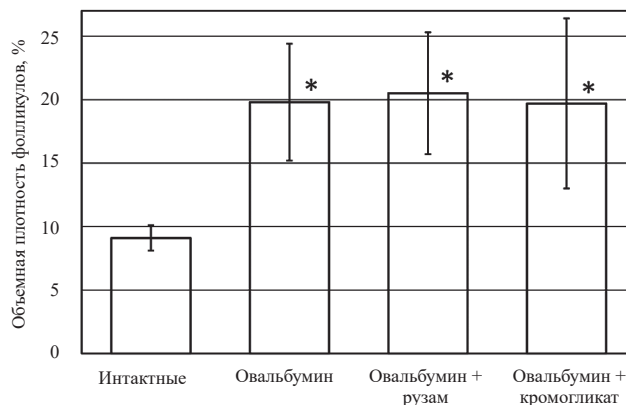


Рис. 2. Влияние рузама и кромогликата натрия на объемную плотность лимфоидных фолликулов в стенках бронхов морских свинок с овальбумин-индуцированным аллергическим воспалением дыхательных путей, $M \pm SE$: * $p < 0,05$ в сравнении с интактными животными

Влияние рузама на дегрануляцию тучных клеток и базофилов in vitro

Соединение 48/80 в тест-системах *in vitro* вполне ожидаемо повышало индекс дегрануляции перитонеальных тучных клеток крыс в 6 раз и базофилов периферической крови кроликов в 2 раза в сравнении с показателями интактных клеток (табл. 2).

Рузам в широком диапазоне концентраций (8,4–840 мкг/мл) более чем в 2 раза снижал индекс дегрануляции тучных клеток крыс, индуцированной соединением 48/80 (см. табл. 2). При этом зависимости указанного эффекта от дозы рузама не установлено.

Гидрокортизона гемисукцинат, служивший в условиях этой модели референс-препаратом, в той же степени угнетал дегрануляцию только в самой высокой из использованных концентраций (10^{-3} М), а в более низких дозах вызывал лишь тенденцию к снижению индекса дегрануляции.

Таблица 2

Влияние рузама и гидрокортизона гемисукцината на индуцированную соединением 48/80 дегрануляцию тучных клеток и базофилов <i>in vitro</i> , $M \pm SE$				
Вариант воздействия на культивируемые клетки			Индекс дегрануляции, усл. ед.	
			Перитонеальные тучные клетки крыс линии Вистар	Базофилы крови кроликов
Интактные клетки			-0,40 ± 0,05	0,70 ± 0,05
Клетки, стимулированные соединением 48/80	Без дополнительных воздействий		2,40 ± 0,10*	1,40 ± 0,10*
	Рузам	840 мкг/мл	1,10 ± 0,10*#	0,90 ± 0,05#
		84 мкг/мл	1,10 ± 0,10*#	1,00 ± 0,05
		8,4 мкг/мл	1,12 ± 0,10*#	0,95 ± 0,05
	Гидрокортизона гемисукцинат	10^{-3} М	1,10 ± 0,05*#	0,80 ± 0,05#
		10^{-4} М	1,28 ± 0,05*	1,25 ± 0,05*
		10^{-5} М	1,50 ± 0,05*	1,65 ± 0,05*

* $p < 0,01$ в сравнении с интактными клетками; # $p < 0,01$ в сравнении с клетками, стимулированными соединением 48/80 без дополнительных воздействий

Сходные закономерности выявлены при оценке влияния рузама и референс-препарата на дегрануляцию базофилов крови кроликов, вызванную либератором гистамина (см. табл. 2). Рузам во всех использованных концентрациях примерно в 1,5 снижал индекс дегрануляции, тогда как гидрокортизона гемисукцинат оказывал такой же эффект только в концентрации 10^{-3} М.

Внесение овальбумина в культуру базофилов крови морских свинок, предварительно иммунизированных этим антигеном, повышало индекс дегрануляции этих клеток вдвое в сравнении с показателями нестимулированных культур базофилов, служивших в этой тест-системе контролем (рис. 3). Рузам дозозависимо подавлял индуцированную овальбумином дегрануляцию базофилов сенсibilизированных животных. При этом в обеих использованных концентрациях (280 и 420 мкг/мл) препарат снижал индекс дегрануляции до уровня, статистически значимо не отличающегося от контрольных значений.

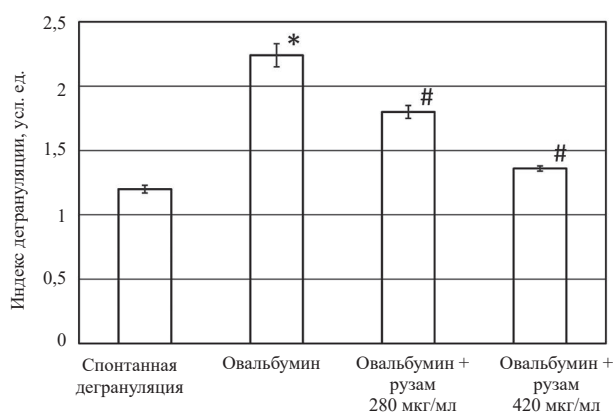


Рис. 3. Влияние рузама на индуцированную овальбумином дегрануляцию базофилов морских свинок, иммунизированных овальбумином, *in vitro*, $M \pm SE$: * $p < 0,01$ в сравнении со спонтанной дегрануляцией; # $p < 0,01$ в сравнении с дегрануляцией, индуцированной овальбумином без дополнительных воздействий

ОБСУЖДЕНИЕ

Установленные в настоящей работе морфологические и цитологические сдвиги в условиях экспериментального аллергического воспаления дыхательных путей *in vivo* в целом согласуются с результатами других исследований, в которых воспроизводили модель овальбумин-индуцированной астмы [16, 17]. Вместе с тем при определении числа тучных клеток в легочной ткани и индекса их дегрануляции мы не выявили существенных отличий от показателей интактных животных. Обнаружена даже незначительная тенденция к снижению количества этих клеток, что отчасти противоречит ранее опубликованным данным об экспансии тучных клеток в перибронхи-

альной ткани у больных астмой [18] и животных с хроническим аллергическим воспалением дыхательных путей, индуцированным овальбумином [16].

Несмотря на то, что зрелые тучные клетки живут в тканях достаточно долго и способны выдержать повторные циклы дегрануляции [19], некоторые авторы указывают на возможность временного истощения популяции этих клеток в результате интенсивной дегрануляции [20, 21]. Мы проводили гистологическое изучение легких через 24 ч после ингаляции последней разрешающей дозы овальбумина, которая *a priori* должна вызывать массовую и быструю дегрануляцию тучных клеток в дыхательных путях. А это в свою очередь могло приводить к кратковременному снижению числа этих клеток в легочной ткани, маскирующему или нивелирующему их экспансию в другие более продолжительные периоды.

Указанное ограничение воспроизведенной модели не позволило оценить эффективность рузама и референс-препарата (кромогликата натрия) по изменению числа тучных клеток в легочной ткани и индекса их дегрануляции *in vivo*, но не снизило информативность оценки противоаллергической активности сравниваемых фармакологических веществ по другим важным критериям.

Рузам снижал степень бронхообструкции дыхательных путей, вызванной аллергическим воспалением, что отражалось повышением объема возврата бронхоальвеолярного смыва. Кромогликат натрия по этому показателю был неэффективен.

Выявлен принципиально разный характер влияния рузама и референс-препарата на клеточный состав бронхоальвеолярного смыва в условиях овальбумин-индуцированного воспаления дыхательных путей. Совокупность цитологических сдвигов, вызванных применением рузама, можно оценить как подавление эозинофильного и нейтрофильного воспаления с одновременной мобилизацией клеток-эффекторов противоинфекционного ответа: лимфоцитов и макрофагов. Референс-препарат, наоборот, не изменял количество полиморфно-ядерных лейкоцитов в смыве, но вызывал тенденцию к снижению числа лимфоцитов и макрофагов.

Вместе с тем непосредственно в образцах легочной ткани на фоне применения обоих препаратов наблюдали сходное по амплитуде подавление инфильтрации межальвеолярных перегородок эозинофилами и нейтрофилами.

Развитие аллергического воспаления в дыхательных путях сопровождалось гиперплазией бронхо-ассоциированной лимфоидной ткани, состоящей из множества индуцируемых лимфоидных фолликулов. Эти временные эктопические лимфоидные

образования, в настоящее время классифицируемые как третичные лимфоидные ткани, представляют собой скопления иммунных клеток, по фолликулярной структуре напоминающие вторичные лимфоидные органы. Индуцируемые лимфоидные фолликулы формируются в периферических нелимфоидных тканях в ответ на воздействие разных триггеров, в том числе антигенов [22].

В условиях воспроизведенной нами модели аллергического воспаления развитие третичных лимфоидных органов в бронхах вызвано повторными ингаляциями овальбумина сенсibilизированным животным. То, что 6-дневный курс введений рузама или кромогликата натрия на завершающем этапе ингаляций разрешающих доз аллергена не изменял объемную плотность лимфоидных фолликулов в стенках бронхов морских свинок, вполне объяснимо. Известно, что даже однократное антигенное воздействие на дыхательные пути индуцирует развитие бронхо-ассоциированных лимфоидных структур, которые существуют как минимум 4 нед после клиренса причинно-значимого антигена, при этом достигают пика своего развития на 8–12-е сут [22]. Очевидно, короткий курс ингаляций рузама или референс-препарата не успевал вызвать заметную регрессию лимфоидных фолликулов, которые уже сформировались ранее под влиянием череды аллергенных воздействий и не закончили естественных ход своей эволюции и обратного развития. Предположительно, более длительное и (или) раннее применение рузама на такой модели *in vivo* могло бы подтвердить противоаллергическую эффективность препарата и по этому критерию.

Перекрестное связывание высокоаффинных рецепторов IgE (FcεRI) на тучных клетках аллергенами вызывает быстрое высвобождение провоспалительных медиаторов, стимулирующих не только сокращение гладкой мускулатуры и секрецию слизи [23, 24], но и пролиферацию фибробластов и синтез коллагена, что ведет к ремоделированию дыхательных путей при астме и фиброзу других тканей, подверженных аллергическому воспалению [25–27].

Помимо тучных клеток существенную роль в IgE-зависимых аллергических реакциях играют базофилы [28, 29]. При дегрануляции последних также высвобождается большое число флоготенных медиаторов, провоцирующих развитие астмы, аллергического ринита, крапивницы и многих других, причем не только аллергических, заболеваний [30].

Учитывая вышесказанное, а также ограничения, с которыми мы столкнулись при оценке числа и функционального состояния тучных клеток на модели *in vivo*, очень ценными представляются данные, полученные в тест-системах *in vitro*, о выраженной спо-

собности рузама в широком диапазоне концентраций подавлять дегрануляцию тучных клеток и базофилов, вызванную либератором гистамина, а также индуцированную овальбумином дегрануляцию базофилов животных, сенсibilизированных этим антигеном. Таким образом, исследуемый препарат напрямую блокировал как IgE-зависимые, так и IgE-независимые механизмы дегрануляции тучных клеток и базофилов. Обращает на себя внимание, что рузам был эффективен в подавлении дегрануляции клеток трех видов млекопитающих, один из которых (кролики) не относится к грызунам. Это вселяет оптимизм в плане экстраполяции полученных результатов на человека.

Описанные в настоящей работе экспериментальные данные хорошо согласуются с результатами клинических исследований рузама в лечении и профилактике аллергических заболеваний, освещенные в недавнем обзоре [4], и увеличивают их убедительность. При этом биологические эффекты препарата на моделях *in vivo* и *in vitro* в целом подтверждают способность рузама подавлять иммунные реакции 2-го типа (T₂), лежащие в основе патогенеза большинства аллергических болезней.

Учитывая химическую природу рузама (комплекс бактериальных липопротеинов), полагаем, что препарат реализует биологические (фармакологические) эффекты через Toll-подобные рецепторы врожденного иммунитета (TLR). Наиболее вероятными молекулярными мишенями рузама при этом представляются TLR2 и его гетеродимеры TLR1/TLR2 и TLR/TLR6. TLR2-опосредованные сигналы могут как активировать, так и регулировать иммунные реакции в зависимости от характера и дозы лигандов (липепептидов, липотейхоевых кислот, протеогликанов), варианта гомо- или гетеродимеризации этого рецептора, исходного состояния организма и целого ряда других факторов [31].

В контексте интерпретации полученных нами данных примечательна выявленная ранее способность липепептидов подавлять аллергическое воспаление по TLR2-зависимому пути на моделях овальбумин-индуцированной астмы *in vivo* за счет поляризации преобладающего типа иммунного ответа в направлении T₂→T₁ и потенцирования иммунорегуляторных механизмов [32, 33]. Генетический дефект TLR2, наоборот, усугублял ультраструктурные, цитологические и молекулярные признаки T₂-воспаления, вызванного овальбумином, в дыхательных путях сенсibilизированных животных [34]. В тест-системах *in vitro* лиганды TLR2 подавляли IgE-зависимую [35, 36] и IgE-независимую дегрануляцию тучных клеток [37]. Считаем проверку гипотезы о ключевой роли TLR2 и его гетеродимеров в реализации фарма-

кологических эффектов рузама перспективной темой дальнейших научных исследований не только для уточнения молекулярных механизмов действия препарата, но и для расширения и оптимизации сферы и способов его клинического применения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подтверждено противоаллергическое действие экстракта из культуры термофильного штамма *S. aureus* C-2 – рузама – в тест-системах *in vivo* и *in vitro*. В частности, на модели овальбумин-индуцированной аллергической астмы у морских свинок препарат снижал степень обструкции дыхательных путей и выраженность нейтрофильного и эозинофильного воспаления, при этом мобилизуя клетки-эффекторы противоинфекционного ответа (лимфоциты и макрофаги). А на моделях *in vitro* рузам подавлял как IgE-независимую дегрануляцию тучных клеток и базофилов, вызванную либератором гистамина, так и IgE-зависимую дегрануляцию базофилов sensibilized животных. Выдвинута гипотеза о TLR2-опосредованном характере основных биологических (фармакологических) эффектов препарата, выявленных в данном исследовании и описанных в других научных работах.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Chedid L., Audibert F. Chemically defined bacterial products with immunopotentiating activity. *J Infect Dis*. 1977;136(Suppl.):S246–S251. DOI: 10.1093/infdis/136.supplement.s246.
- Le Garrec Y. Immunomodifiers of bacterial origin. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*. 1986;9(2–3):137–141. DOI: 10.1016/0147-9571(86)90005-6.
- Пронин А.В., Санин А.В., Гинцбург А.Л. Бактериальные иммуномодуляторы и их место в иммуномодулирующей терапии. В кн.: Иммуноterapia. Руководство для врачей; под ред. Р.М. Хаитова, Р.И. Атауллаханова, А.Е. Шульженко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000:191–212.
- Терехова Е.П., Терехов Д.В., Себекина О.В. Применение препарата Рузам® в лечении и профилактике аллергических заболеваний. *Практическая аллергология*. 2021;1:54–64. DOI: 10.46393/2712-9667_2021_1_54-64.
- Чучалин А.Г., Ковалева В., Колганова Н.А. Рузам – новый подход в лечении и профилактике аллергических заболеваний (экспериментальные и клинические данные). *Русский медицинский журнал*. 2003;11(22):1248–1252.
- Ненашева Н.М., Терехова Е.П., Терехов Д.В. Эффективность ингаляционной иммунотерапии Рузамом у больных atopической бронхиальной астмой: влияние на частоту респираторных инфекций и обострений. *Пульмонология*. 2014;1:52–58. DOI: 10.18093/0869-0189-2014-0-1-52-58.
- Hutson P.A., Church M.K., Clay T.P., Miller P., Holgate S.T. Early and late-phase bronchoconstriction after allergen challenge of nonanesthetized guinea pigs. I. The association of disordered airway physiology to leukocyte infiltration. *Am. Rev. Respir. Dis*. 1988;137(3):548–557. DOI: 10.1164/ajrccm/137.3.548.
- Ковалева В.Л. Методические указания по изучению фармакологических веществ, предназначенных для терапии бронхиальной астмы и других обструктивных заболеваний дыхательных путей. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: 2-е изд.; под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005:483–500.
- Nagai H., Tsuji F., Goto S., Koda A. Pharmacological modulation of antigen-induced airway hyperresponsiveness by thromboxane A2 inhibitors in guinea pigs. *Biol. Pharm. Bull*. 1993;16(11):1099–1103. DOI: 10.1248/bpb.16.1099.
- Линднер Д.П., Поберий И.А., Родкин М.Я., Ефимов В.С. Морфометрический анализ популяции тучных клеток. *Архив патологии*. 1980;6:60–64.
- Иммунологические методы; пер. с нем. А.П. Тарасова; под ред. Г. Фримеля. М.: Медицина, 1987:472.
- Носейкина Е.М., Хвостова А.Е., Ларина Т.И., Митрохин Н.М. Базофилы крови морской свинки как тестовая система для оценки противоаллергической активности химических соединений *in vitro*. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2011;6(129):96–100.
- Rothschild A.M. Mechanisms of histamine release by compound 48-80. *Br. J. Pharmacol*. 1970;38(1):253–262. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1970.tb10354.x.
- Andersson P. Antigen-induced bronchial anaphylaxis in actively sensitized guinea-pigs. *Allergy*. 1980;35(1):65–71. DOI: 10.1111/j.1398-9995.1980.tb01718.x.
- Seder R.A., Paul W.E., Dvorak A.M., Sharkis S.J., Kagey-Sobotka A., Niv Y. et al. Mouse splenic and bone marrow cell populations that express high-affinity Fc epsilon receptors and produce interleukin 4 are highly enriched in basophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991;88(7):2835–2839. DOI: 10.1073/pnas.88.7.2835.
- Ikeda R.K., Miller M., Nayar J., Walker L., Cho J.Y., McElwain K. et al. Accumulation of peribronchial mast cells in a mouse model of ovalbumin allergen induced chronic airway inflammation: modulation by immunostimulatory DNA sequences. *J. Immunol*. 2003;171(9):4860–4867. DOI: 10.4049/jimmunol.171.9.4860.
- Schramm C.M., Puddington L., Wu C., Guernsey L., Gharraee-Kermani M., Phan S.H. et al. Chronic inhaled ovalbumin exposure induces antigen-dependent but not antigen-specific inhalational tolerance in a murine model of allergic airway disease. *Am. J. Pathol*. 2004;164(1):295–304. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63119-7.
- Brightling C.E., Bradding P., Symon F.A., Holgate S.T., Wardlaw A.J., Pavord I.D. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N. Engl. J. Med*. 2002;346(22):1699–1705. DOI: 10.1056/NEJMoa012705.
- Krystal-Whittemore M., Dileepan K.N., Wood J.G. Mast cell: A multi-functional master cell. *Front. Immunol*. 2016;6:620. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00620.
- Дзодзикова М.Э. Особенности дегрануляции и апоптоз тучных клеток. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2005;1(29):102–107.
- Raveendran V.V., Smith D.D., Tan X., Sweeney M.E., Reed G.A., Flynn C.A. et al. Chronic ingestion of H1-antihistamines increase progression of atherosclerosis in apolipoprotein

- tein E-/- mice. *PLoS One*. 2014;9(7):e102165. DOI: 10.1371/journal.pone.0102165.
22. Bery A.I., Shepherd H.M., Li W., Krupnick A.S., Gelman A.E., Kreisel D. Role of tertiary lymphoid organs in the regulation of immune responses in the periphery. *Cell Mol. Life Sci*. 2022;79(7):359. DOI: 10.1007/s00018-022-04388-x.
23. Halle S., Dujardin H.C., Bakocevic N., Fleige H., Danzer H., Willenzon S. et al. Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. *J. Exp. Med*. 2009;206(12):2593–2601. DOI: 10.1084/jem.20091472.
24. Bradding P., Walls A.F., Holgate S.T. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2006;117(6):1277–1284. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.02.039.
25. Williams C.M., Galli S.J. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2000;105(5):847–859. DOI: 10.1067/mai.2000.106485.
26. Cairns J.A., Walls A.F. Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts. *J. Clin. Invest*. 1997;99(6):1313–1321. DOI: 10.1172/JCI119290.
27. Gruber B.L., Kew R.R., Jelaska A., Marchese M.J., Garlick J., Ren S., Schwartz L.B. et al. Human mast cells activate fibroblasts: tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis. *J. Immunol*. 1997;158(5):2310–2317.
28. Garbuzenko E., Nagler A., Pickholtz D., Gillery P., Reich R., Maquart F.X. et al. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. *Clin. Exp. Allergy*. 2002;32(2):237–246. DOI: 10.1046/j.1365-2222.2002.01293.x.
29. Nabe T., Matsuya K., Akamizu K., Fujita M., Nakagawa T., Shioe M. et al. Roles of basophils and mast cells infiltrating the lung by multiple antigen challenges in asthmatic responses of mice. *Br. J. Pharmacol*. 2013;169(2):462–476. DOI: 10.1111/bph.12154.
30. Miyake K., Ito J., Karasuyama H. Role of basophils in a broad spectrum of disorders. *Front. Immunol*. 2022;13:902494. DOI: 10.3389/fimmu.2022.902494.
31. Chandler C.E., Ernst R.K. Bacterial lipids: powerful modifiers of the innate immune response. *F1000Res*. 2017;6:F1000 Faculty Rev-1334. DOI: 10.12688/f1000research.11388.1.
32. Krishnaswamy J.K., Jirno A.C., Baru A.M., Ebensen T., Guzmán C.A., Sparwasser T. et al. Toll-like receptor-2 agonist-allergen coupling efficiently redirects Th2 cell responses and inhibits allergic airway eosinophilia. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol*. 2012;47(6):852–863. DOI: 10.1165/rcmb.2011-0414OC.
33. Velasco G., Campo M., Manrique O.J., Bellou A., He H., Arestides R.S. et al. Toll-like receptor 4 or 2 agonists decrease allergic inflammation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol*. 2005;32(3):218–224. DOI: 10.1165/rcmb.2003-0435OC.
34. Ma S.Q., Wei H.L., Zhang X. TLR2 regulates allergic airway inflammation through NF- κ B and MAPK signaling pathways in asthmatic mice. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. 2018;22(10):3138–3146. DOI: 10.26355/eurrev_201805_15073.
35. Kasakura K., Takahashi K., Aizawa T., Hosono A., Kaminogawa S. A TLR2 ligand suppresses allergic inflammatory reactions by acting directly on mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol*. 2009;150(4):359–369. DOI: 10.1159/000226237.
36. Yu Y., Yip K.H., Tam I.Y., Sam S.W., Ng C.W., Zhang W. et al. Differential effects of the Toll-like receptor 2 agonists, PGN and Pam3CSK4 on anti-IgE induced human mast cell activation. *PLoS One*. 2014;9(11):e112989. DOI: 10.1371/journal.pone.0112989.
37. Zhang Y.Y., Yu Y.Y., Zhang Y.R., Zhang W., Yu B. The modulatory effect of TLR2 on LL-37-induced human mast cells activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2016;470(2):368–374. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.037.

Вклад авторов

Проскурина О.В., Суханова С.А. – разработка концепции и дизайна, проведение экспериментов, сбор и математическая обработка первичных данных. Калюжин О.В. – анализ и интерпретация данных, подготовка статьи. Новикова Н.В., Колганова Н.А. – проверка критически важного интеллектуального содержания.

Информация об авторах

Калюжин Олег Витальевич – д-р мед. наук, профессор, кафедра клинической иммунологии и аллергологии, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), г. Москва, kalyuzhin@list.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3628-2436>

Проскурина Оксана Владимировна – канд. мед. наук, ВНИЦ БАВ, г. Старая Купавна, proskurina_ov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5718-3301>

Суханова Светлана Алексеевна – канд. биол. наук, ВНИЦ БАВ, г. Старая Купавна, ssuhanova46@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0548-4249>

Новикова Наталья Викторовна – врач высшей категории, аллерголог-иммунолог, ИАКИ, г. Москва, doctor.novikova@gmail.com

Колганова Нина Алексеевна – д-р мед. наук, профессор, кафедра госпитальной терапии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, nina3580@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6891-3250>

✉ Калюжин Олег Витальевич, kalyuzhin@list.ru

Поступила в редакцию 10.10.2022;
одобрена после рецензирования 28.10.2022;
принята к публикации 10.11.2022