

ВЛИЯНИЕ АЛЬФА-ГЛУТАМИЛ-ТРИПТОФАНА НА ФОНОВУЮ И ИНДУЦИРОВАННУЮ АКТИВНОСТЬ ФАКТОРОВ ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОМ ПРИМЕНЕНИИ

Рулева А.А.¹,
Краснов А.А.²,
Петленко С.В.³,
Заплутанов В.А.⁴,
Апрятин В.А.⁵

¹ ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России (197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 9, Россия)

² ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена» (191186, г. Санкт-Петербург, набережная реки Мойки, 48, Россия)

³ ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» (192019, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1, Россия)

⁴ АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» (197110, г. Санкт-Петербург, просп. Динамо, 3, Россия)

⁵ Институт трансляционной биомедицины, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» (199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Рулева Анна Александровна,
e-mail: Ruleanna@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

В период продолжающейся пандемии COVID-19 и в сезон подъёма заболеваемости другими респираторными инфекциями остаётся актуальным использование неспецифической профилактики. В этой связи в качестве инструмента широко применяются синтетические пептиды. Представителем этой группы является синтетический аналог регуляторных пептидов вилочковой железы Тимоген, который применяется в России уже более 20 лет для лечения острых и хронических инфекционных заболеваний.

Цель исследования. Оценить действие препарата Тимоген спрей на индуцированные показатели иммунной системы при профилактическом применении у здоровых добровольцев.

Материалы и методы. 20 здоровых добровольцев получали препарат Тимоген спрей (АО «МБНПК «Цитомед», Россия) в дозе 25 мкг 2 раза в сутки в течение 10 дней. Иммунологические показатели оценивали в динамике: до начала терапии, на 6-й и 11-й дни приёма и через 14 дней после окончания курса. Клиническое наблюдение осуществляли с 1-го по 11-й дни, регистрацию нежелательных явлений – в течение всего периода исследования (24 дня).

Результаты исследования. Выявлено статистически значимое увеличение вирус-индуцированной продукции α -интерферона культурой клеток крови к 11-му дню приёма Тимогена. Этот эффект сохранялся ещё в течение 14 дней после окончания курса. Статистически значимых различий в динамике бактерицидной и фагоцитарной активности нейтрофилов, сывороточного α - и γ -интерферона не получено.

Заключение. Использование препарата Тимоген спрей в дозе 25 мкг в течение 10 дней было безопасным, не влияло на морфофункциональное состояние иммунной системы, но способствовало статистически значимому увеличению продукции α -интерферона в ответ на индуцирующее воздействие вирусного патогена *in vitro*. Это позволяет рекомендовать препарат для профилактического применения в период подъёма заболеваемости острыми респираторными инфекциями.

Ключевые слова: альфа-глутамил-триптофан, альфа-интерферон, вирусные инфекции, здоровые добровольцы, неспецифическая профилактика, факторы врожденного иммунитета

Статья поступила: 02.02.2023

Статья принята: 15.11.2023

Статья опубликована: 29.12.2023

Для цитирования: Рулева А.А., Краснов А.А., Петленко С.В., Заплутанов В.А., Априятин В.А. Влияние альфа-глутамил-триптофана на фоновую и индуцированную активность факторов врождённого иммунитета при профилактическом применении. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(6): 31-40. doi: 10.29413/ABS.2023-8.6.4

INFLUENCE OF ALPHA-GLUTAMIL-TRYPTOPHAN ON THE BACKGROUND AND INDUCED ACTIVITY OF FACTORS OF ADAPTIVE IMMUNITY FOR PREVENTION

Ruleva A.A.¹,
Krasnov A.A.²,
Petlenko S.V.³,
Zaplutanov V.A.⁴,
Apyratina V.A.⁵

¹ Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Federal Medical Biological Agency (Professora Popova str. 9, Saint Petersburg 197022, Russian Federation)

² Herzen State Pedagogical University (Embankment of the Moika River 48, Saint Petersburg 191186, Russian Federation)

³ Golikov Research Center of Toxicology (Bekhtereva str. 1, Saint-Petersburg 192019, Russian Federation)

⁴ St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology (Dinamo Ave. 3, Saint Petersburg 197110, Russian Federation)

⁵ Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University (Universitetskaya emb. 7–9, Saint Petersburg 199034, Russian Federation)

Corresponding author:

Anna A. Ruleva,
e-mail: Ruleanna@yandex.ru

ABSTRACT

Background. During the ongoing COVID-19 pandemic and in the season of rising incidence of other respiratory infections, it is relevant to use preventive measures of non-specific prophylaxis. Synthetic peptides are widely considered as a tool. The representative of this group is the synthetic analogue of thymus regulatory peptides Thymogen, which has been used in Russia for more than 20 years in the treatment of acute and chronic infection diseases.

The aim of the study. To evaluate the effect of Thymogen, a dosed nasal spray, on induced parameters of the immune system during prophylactic use in healthy volunteers.

Materials and methods. Twenty healthy volunteers received Thymogen nasal dosed spray (JSC "Cytomed", Russia) at a dose of 25 µg twice a day for 10 days. A comparative assessment of immunological parameters was carried out in dynamics: before the start of therapy, on days 6 and 11 of taking the drug and 14 days after the end of the course. Clinical observation was carried out from day 1 to day 11, registration of adverse events – the entire period of the study for 24 days. The first day was considered the day the drug was started.

Results. In the course of the work, according to the data of immunological examination, a statistically significant increase in the virus-induced production of interferon alpha (INF-α) by a culture of peripheral blood cells was revealed. The growth rate was recorded on day 11 of taking Thymogen and persisted for 14 days after the end of the course. Significant differences in the dynamics of bactericidal and phagocytic activity of neutrophils, serum α- and γ-interferon were not obtained.

Conclusion. The use of Thymogen spray at a dose of 25 µg for 10 days was safe and contributed to a significant induction of interferon-alpha in response to exposure to a viral pathogen, which allows us to recommend the drug for prophylactic use during the period of rising incidence of acute respiratory diseases.

Key words: alfa-glutamyl-tryptophan, interferon-alpha, viral infections, healthy volunteers, non-specific prophylaxis, factors of innate immunity

Received: 02.02.2023

Accepted: 15.11.2023

Published: 29.12.2023

For citation: Ruleva A.A., Krasnov A.A., Petlenko S.V., Zaplutanov V.A., Apyratina V.A. Influence of alpha-glutamyl-tryptophan on the background and induced activity of factors of adaptive immunity for prevention. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(6): 31-40. doi: 10.29413/ABS.2023-8.6.4

ВВЕДЕНИЕ

Врождённый иммунитет является одним из важнейших факторов, определяющих исход инфекции. Практически все клетки могут участвовать в его реализации. Основными структурами, ответственными за врождённый иммунитет, являются моноциты, макрофаги, дендритные клетки (ДК), нейтрофилы и натуральные киллеры (NK (natural killers) клетки) [1–4]. Клетки врождённого иммунитета несут на себе рецепторы (PRR, pattern recognition receptors), такие как Toll-подобные рецепторы (TLR, Toll-like receptors), RIG-I-подобные рецепторы (RLR, RIG-I like receptors), NOD-подобные рецепторы (NLR, NOD-like receptors), C-типа лектиновое суперсемейство рецепторов (CLSF, C-type lectin superfamily), распознающие неспецифические структуры микроорганизмов (PAMP, pathogen-associated molecular patterns) [2, 3, 5]. После связывания PRR с лигандом запускаются внутриклеточные биохимические каскады, приводящие к клеточной активации. Активированные клетки инициируют фагоцитоз, секрецию активных форм кислорода и ряда цитокинов (фактор некроза опухоли α (TNF- α , tumor necrosis factor α), интерлейкин (ИЛ) 1β , ИЛ-6, IFN (интерферон) типа I), которые в свою очередь вызывают воспаление и другие противовирусные реакции [2–4]. Фагоцитоз – многоэтапный процесс, инициируемый распознаванием патогена, который приводит к поглощению патогена, созреванию фагосомы для устранения патогена и затем к распаду фаголизосомы и инактивации патогена [6].

Ответ NK-клеток включает цитотоксичность и высвобождение цитокинов (TNF- α и IFN- γ), что тесно связано с активацией рецепторов, активирующих NK-клетки, и блокированием ингибирующих рецепторов на их поверхности [5]. Баланс вовлечения этих рецепторов защищает нормальные клетки от вредного воздействия NK-клеток, одновременно активируя их для уничтожения инфицированных вирусом клеток-мишеней [1, 5].

Ключевым механизмом врождённого иммунитета является выработка IFN типа I. Он представляет собой высокооптимизированный системный ответ, который обеспечивает первую линию защиты от широкого спектра вирусных инфекций. Неспособность создать эффективный ответ IFN против вируса приводит к хронической инфекции, в то время как избыточная продукция IFN приводит к аутоагрессии [7]. Природные и рекомбинантные интерфероны являются одними из наиболее распространённых биологических терапевтических иммуностропных средств в мире [8].

В настоящее время известны три основных семейства IFN – I, II и III типов. IFN типа I (IFN- α/β) и III (IFN- λ) в первую очередь продуцируются в качестве первой линии защиты и могут вырабатываться большинством типов клеток, в то время как IFN типа II (IFN- γ) в основном вырабатываются вторично специализированными иммунными субпопуляциями (например, NK-клетками или Т-клетками) [2, 9]. Следовательно, генетическая детерминация синтеза IFN типов I и III имеет решающее значение для контроля восприимчивости и течения вирусных инфекций. Эти IFN ин-

дуцируются разнообразными системами, включая десятки рецепторов распознавания, например, RIG-1, MDA-5 (melanoma differentiation-associated protein 5), TLR, RLR, STING (stimulator of interferon genes) [9]. Также известно, что продукция IFN типа I индуцируется при взаимодействии с бактериальными лигандами рецепторов клеток врождённого иммунитета. Кроме того, интерфероны активируют процессы более высокого порядка (клеточная активность, размножение, дифференцировка и функция Т-клеток), которые имеют решающее значение для контроля вирусных инфекций. Дефицит продукции или передачи сигналов IFN-I или IFN-III или противовирусных белков, которые они индуцируют, тесно связаны с тяжёлым течением заболевания [9].

Действительно, у людей с тяжёлой формой COVID-19 были выявлены генетические дефициты, связанные с индукцией IFN- α , а также аутоантител, нейтрализующих IFN [10]. Эти корреляции имеют эпидемиологическое значение. Например, 1,5 % тяжёлых случаев COVID-19 можно отнести к специфическому дефициту TLR, в то время как около 10 % людей с тяжёлым течением COVID-19 имеют аутоантитела против одного или нескольких IFN типа I или типа III. Кроме того, аллельные варианты ISG OAS1 также позволяют прогнозировать тяжесть COVID-19. Эти данные окончательно показывают, что интерфероны незаменимы для контроля SARS-CoV-2 и предотвращения тяжёлой формы COVID-19, а также других респираторных вирусных инфекций (в частности гриппа), где в силу особенностей возбудителей возможны нарушения в системе регуляции иммунного ответа [11].

Таким образом, врождённый иммунный ответ включает согласованную цепь индуцированных генных продуктов, предварительно сформированных иммунных эффекторов, биохимических сигнальных каскадов и специализированных клеток [2, 12]. Важным механизмом в цепи противовирусной защиты является регуляция продукции интерферона, и степень этой индукции позволяет прогнозировать течение и исход инфекционных заболеваний, прежде всего вирусной природы. Избыточная активация защитных механизмов может вызвать развитие патологических процессов. При этом важно соблюдение равновесия между защитой от патогенов и патофизиологическими проявлениями [13]. Действительно, наличие длительной гиперинтерферонемии при профилактическом использовании индукторов интерферонов (а некоторые из данной группы препаратов могут применяться до 4 недель и более) в отсутствие патогена может способствовать исключительно развитию побочных эффектов, которых у данной группы цитокинов (IFN) огромное количество (от нарушения функции кишечника и «гриппоподобного состояния» до развития «синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции» и слабоумия) [14, 15]. В этой связи, на наш взгляд, значительно более разумным и эффективным, патогенетически обоснованным и безопасным с целью профилактики инфекционных заболеваний следует считать применение препаратов, не индуцирующих, а регулирующих синтез эндогенного интерферона, в соответствии с потребностями и состоянием организма.

В качестве инструмента регуляции и активации системы интерферонов ряд исследований рассматривают синтетические пептиды. Ключевые транскрипционные пептидные факторы, участвующие в регуляции иммунного ответа, такие как NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), JAK-STAT (Janus kinase – signal transducer and activator of transcription) и IRFs (interferon regulatory factors), были изначально обнаружены у костистых рыб. Критическими регуляторами IFN типа I являются IRF3 и IRF7, а IRF1, IRF5 и IRF8 запускают IFN-ответы клеточно-специфическим образом [16]. В работе R. Pandey и соавт. [17], посвящённой разработке методов иммунопрофилактики висцерального лейшманиоза, было показано, что отдельные синтетические пептиды или их смеси значительно активировали секрецию IFN- γ . Подтверждением тому было увеличение содержания внутриклеточных цитокинов со значительным повышением уровня IFN- γ , продуцируемого CD4⁺ Т-клетками.

С 2003 г. в России зарегистрирован и применяется синтетический дипептид, идентичный природному соединению, выделенному хроматографическим методом из экстракта тимуса, – лекарственный препарат Тимоген [18]. Одним из главных моментов, лежащих в основе настоящего исследования, явилось изучение иммунологических механизмов, лежащих в основе профилактического действия препарата в отношении острых и хронических вирусных и бактериальных заболеваний верхних дыхательных путей у здоровых добровольцев.

В данной научно-исследовательской работе (НИР) ключевой являлась оценка воздействия препарата Тимоген в отношении фоновых и индуцированных показателей иммунной системы при профилактическом применении у здоровых добровольцев. Были изучены бактерицидная и фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов, спонтанная и вирус-индуцированная продукция IFN- α клетками периферической крови, содержание IFN- α и IFN- γ в сыворотке крови. Также проанализированы безопасность и переносимость исследуемого препарата, у здоровых добровольцев при его профилактическом применении в течение 10 дней. Сроки проведения НИР – с 04.06.2021 по 05.07.2021.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 20 здоровых добровольцев мужского пола в возрасте от 18 до 40 лет. Критериями отбора являлись: отсутствие острых и обострения хронических заболеваний как минимум за 1 месяц до включения в исследование; любая вакцинация не менее чем за 6 месяцев до начала исследования.

Исследуемым препаратом являлся Тимоген, спрей назальный дозированный (производитель АО «МБНПК «Цитомед», Россия). Активное вещество – альфа-глутамил-триптофан (Тимоген натрий в пересчёте на Тимоген) 25 мкг/доза. Вспомогательные вещества: натрия хлорид 900 мкг; бензалкония хлорид 10 мкг; вода, очищенная до 0,1 мл. Исследование было одобрено независи-

мым этическим комитетом «БиоЭтика» (протокол № 156 от 27.05.2021) г. Санкт-Петербург.

Субъекты, включённые в исследование, получали препарат Тимоген спрей по единой схеме в дозе 25 мкг (по 1 впрыскиванию) в каждый носовой ход 2 раза в сутки утром и вечером в течение 10 дней. После окончания курса введения препарата наблюдали за состоянием добровольцев ещё в течение 14 дней. Перед началом приёма препарата, а также во время каждого посещения проводился сбор жалоб, анамнеза жизни и медицинского анамнеза, данных о применении лекарственных препаратов, а также физикальное обследование.

Физикальное обследование включало измерение жизненно важных показателей: систолического (САД) и диастолического (ДАД) артериального давления, частоты сердечных сокращений (ЧСС), частоты дыхательных движений (ЧДД), температуры тела (ТТ). Для измерения показателей витальных функций использовали поверенные сертифицированные приборы (ASG, Япония; Армед УХ200, Россия), предназначенные для использования в клинических исследованиях. Всего период приёма препарата и наблюдения для каждого добровольца составил 24 дня и включал в себя 4 посещения (день 1 – до приёма препарата; день 6, день 11; день 24), во время которых проводились полное физикальное обследование и забор крови для лабораторной диагностики.

Иммунологическое обследование включало: определение бактерицидной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови (по данным НСТ-теста (тест восстановления нитросинего тетразолия) спонтанного и индуцированного зимозаном) методом спектрометрии на спектрофотометре (Infinite F50; Tecan, Австрия); оценку фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови (% нейтрофилов, поглотивших дрожжи; фагоцитарный индекс; завершённость фагоцитоза) методом микроскопии на световом микроскопе (Leica DM LS2; Leica, США); оценку спонтанной и индуцированной продукции IFN- α и содержания IFN- α и IFN- γ в сыворотке крови иммуноферментным методом (коммерческие наборы АО «Вектор Бест», Россия). Спонтанную и индуцированную вирусом болезни Ньюкасла продукцию IFN- α определяли в супернатантах суточной культуры цельной крови. Индекс стимуляции бактерицидности рассчитывали как отношение индуцированной бактерицидности к спонтанной; индекс фагоцитоза – как среднее количество дрожжей, поглощённых одним фагоцитом. Завершённость фагоцитоза рассчитывали как отношение фагоцитарных индексов в образцах с добавлением эмбриональной сыворотки и без неё.

Безопасность и переносимость препарата Тимоген оценивалась по частоте нежелательных явлений (НЯ) и серьёзных нежелательных явлений (СНЯ) по градации переносимости: «хорошая» – отсутствие НЯ; «удовлетворительная» – наличие НЯ лёгкой выраженности, не требующего(-их) медикаментозной коррекции состояния; «неудовлетворительная» – наличие нескольких НЯ, требующих медикаментозного лечения. Также в рамках оценки безопасности исследовали динамику жизненно

важных показателей: САД и ДАД, ЧСС, ЧДД, ТТ. Переносимость оценивали на основании субъективной оценки добровольцев и по сохранению приверженности схеме исследуемого применения препарата (комплаентности).

Статистический анализ

Статистическая обработка данных проведена с применением специализированного программного обеспечения Statgraphics Centurion 18, версия 18.1.12 (Statgraphics Technologies, Inc., США) и RStudio, версия 1.1.442 (RStudio PBC, США), пакеты Rmisc (версия 1.5), psych (версия 2.1.6), nortest (версия 1.0-4). Для проверки нормальности сравниваемых выборок применяли тест Лиллиефорса с критическим значением $p = 0,2$. Сравнение показателей в связанных группах проводили при помощи дисперсионного анализа с повторными измерениями (one-way ANOVA with repeated measures). Сферичность данных проанализирована с использованием теста Моучли с уровнем статистической значимости 95%. В случае отклонения распределения параметра в группе от нормального применяли непараметрический критерий Фридмана. Полученные данные представлены в виде: средних значений (M), стандартного отклонения (σ), стандартной ошибки среднего (SE) или медианы (Me), квартильных отклонений (Q25%; Q75%) или диапазона квартильных отклонений (IQR, interquartile range) (Q25%–Q75%), минимального (min) и максимального (max) значений. Критическим значением p было принято 0,05.

В случае выявления различий между группами (в разных временных точках) для их определения использовали апостериорные (post-hoc) тесты для попарного сравнения: после дисперсионного анализа – метод Фишера, после теста Фридмана – критерий Бонферрони с поправками на множественные сравнения (с мощностью 95%).

Объект исследования

Средний возраст добровольцев, включённых в исследование, составил $28,25 \pm 6,69$ года, минимальный – 18 лет, максимальный – 40 лет. Группа была однородна по демографическим и антропометрическим показателям. Полный курс препарата получили 17 добровольцев, неполный курс – 3. В анализ были включены все субъекты исследования – 20 человек.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка спонтанной и индуцированной продукции IFN- α под действием препарата

При изучении спонтанной продукции IFN- α суточной культуры клеток, выделенных из периферической крови добровольцев, в день 1 (Me = 5 пг/мл; IQR = 2,75 пг/мл) до приёма препарата по сравнению с показателями в день 6 (Me = 5 пг/мл; IQR = 0 пг/мл) ($p = 0,026$) были обнаружены статистически значимые различия, однако эти показатели были сходными, и такие различия не являются клинически значимыми (табл. 1).

При оценке продукции IFN- α , индуцированной вирусом болезни Ньюкасла, клетками цельной крови наблюдались статистически значимые различия этого параметра в дни 1 и 11, в дни 1 и 24, а также между днями 6 и 24 ($F = 31,7; p = 0,000000604317$) (рис. 1).

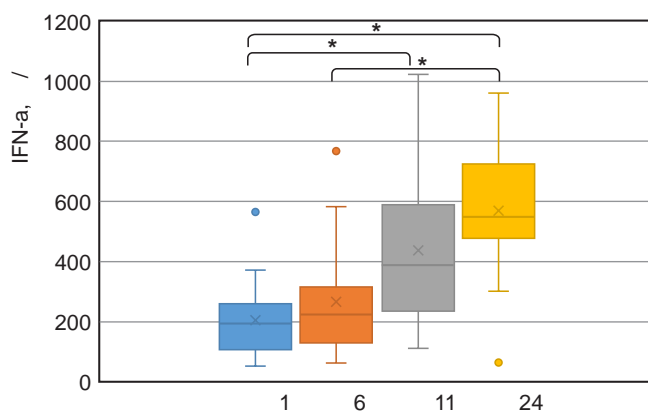


РИС. 1. Вирус-индуцированная продукция IFN- α суточной культурой цельной крови добровольцев в динамике при 10-дневном приёме Тимоген спрей ($n = 20$): * – статистически значимые различия ($p < 0,001$), непараметрический тест Фридмана; день 1, 6, 11 и 24 – контрольные точки исследования

FIG. 1. Virus-induced production of IFN- α by whole blood daily culture of volunteers in dynamics during a 10-day intake of Thymogen spray ($n = 20$): * – statistically significant differences ($p < 0.001$), nonparametric Friedman test; days 1, 6, 11 and 24 – study milestones

ТАБЛИЦА 1
СПОНТАННАЯ ПРОДУКЦИЯ IFN- α СУТОЧНОЙ КУЛЬТУРОЙ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

Параметры	Референтные значения	Контрольные точки	Me	Q25%	Q75%	min	max
IFN- α спонтанный, пг/мл	3–30	День 1	5	5	7,75	5	19
		День 6	5*	5	5	5	5
		День 11	5	5	5	5	15
		День 24	5	5	5	5	13

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с исходным значением ($p < 0,05$); Me – медиана; Q25%, Q75% – 25-й и 75-й квартили соответственно; min – минимум; max – максимум.

TABLE 1
SPONTANEOUS PRODUCTION OF IFN- α BY WHOLE BLOOD DAILY CULTURE

В ходе анализа результатов исследования было зафиксировано статистически значимое увеличение индуцированной продукции IFN-α клетками крови во время профилактического применения препарата Тимоген курсом 10 дней к дню 11 наблюдения (день 11: Me = 390,5 пг/мл, IQR = 290,75 пг/мл; день 1: Me = 194,5 пг/мл, IQR = 149,25 пг/мл; $p < 0,001$). Кроме того, показано статистически значимое ($p < 0,001$) повышение этого показателя через 14 дней после окончания курса (день 24: Me = 550,5 пг/мл; IQR = 190,25 пг/мл) в сравнении с днём 1 (Me = 194,5 пг/мл; IQR = 149,25 пг/мл) и днём 6 (Me = 223,5 пг/мл; IQR = 164,5 пг/мл) (рис. 1).

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что вирус-индуцированная продукция IFN-α, отражающая один из механизмов повышения невосприимчивости организма к возбудителям вирусных инфекций, статистически значимо увеличивается к концу применения препарата (через 10 дней) и продолжает нарастать ещё в течение 2 недель наблюдения. Следовательно, профилактическое использование препарата Тимоген в лекарственной форме спрея позволяет активизировать способность клеток периферической крови вырабатывать IFN-α в ответ на воздействие вирусного патогена, и этот эффект сохраняется как минимум в течение 14 дней после окончания курса применения исследуемого препарата.

Результаты оценки сывороточных IFN-α и IFN-γ

Сравнение уровня IFN-α в сыворотке крови здоровых добровольцев при профилактическом применении препарата Тимоген выявило статистически значимые различия этого параметра в дни 6, 11 и 24, несмотря на то, что уровень IFN-α в сыворотке был по абсолютным значениям одинаковым (Me = 5 пг/мл; IQR = 0 пг/мл) в сравнении с показателями в день 1 (Me = 5 пг/мл; IQR = 2,25 пг/мл; $p = 0,0004$), однако это изменение не являлось клинически значимым (табл. 1).

При изучении IFN-γ в сыворотке крови не выявлено статистически значимых различий во всех контрольных

точках ($p > 0,05$). Показатель не менялся на протяжении всего исследования (Me = 2 пг/мл; IQR = 0 пг/мл) (табл. 2).

Результаты оценки фагоцитарной и бактерицидной активности

Согласно полученным результатам, в настоящем исследовании статистически значимых различий в динамике такого параметра, как бактерицидная активность нейтрофилов, включая спонтанную и индуцированную, не выявлено. Показатели не имели статистически значимых колебаний в контрольных точках исследования (табл. 3).

Сходные результаты получены при изучении параметров фагоцитарной активности нейтрофилов (табл. 4), включая фагоцитоз нейтрофилов, завершённость фагоцитоза и индекс фагоцитоза.

В настоящей работе показано, что у здоровых добровольцев без нарушений со стороны иммунной системы и в отсутствие острых заболеваний/состояний профилактическое применение препарата Тимоген спрей 2 раза в сутки курсом 10 дней не влияет на параметры бактерицидной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови, определяемой с помощью НСТ-теста, и не приводит к изменению показателей фагоцитарной активности нейтрофилов.

Анализ безопасности и переносимости

В рамках анализа безопасности и переносимости оценивались в динамике жизненно важные показатели: САД, ДАД, ЧСС, ЧДД и ТТ, – которые не выявили статистически значимых различий ($p > 0,05$) у здоровых добровольцев на протяжении всего периода наблюдения (т. е. в контрольные точки исследования – дни 1, 6, 11 и 24) (табл. 5).

У 11 (55 %) добровольцев в разных контрольных точках исследования наблюдались эпизоды подъёма артериального давления, при этом во всех случаях увеличение САД и/или ДАД не превышало 10 мм рт. ст. по сравнению со значениями, принятыми за референтные. Зафиксированные отклонения классифицировались исследователями как клинически не значимые, не требующие

ТАБЛИЦА 2
УРОВНИ IFN-α И IFN-γ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Параметры	Референтные значения	Контрольные точки	Me	Q25%	Q75%	min	max
IFN-α сыворотка, пг/мл	0–5	День 1	5	2,75	5	1	5
		День 6	5*	5	5	5	5
		День 11	5*	5	5	5	5
		День 24	5*	5	5	5	5
IFN-γ сыворотка, пг/мл	0–5	День 1	2	2	2	2	2
		День 6	2	2	2	2	22
		День 11	2	2	2	2	2
		День 24	2	2	2	2	2

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с исходным значением ($p < 0,05$); Me – медиана; Q25%, Q75% – 25-й и 75-й квартили соответственно; min – минимум; max – максимум.

TABLE 2
IFN-α AND IFN-γ LEVELS IN BLOOD SERUM

ТАБЛИЦА 3
РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ
НЕЙТРОФИЛОВ В ДИНАМИКЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 3
THE RESULTS OF THE EVALUATION OF THE NEUTROPHILS
BACTERICIDAL ACTIVITY IN THE DYNAMICS

Параметры	Референтные значения	Контрольные точки	Me	Q25%	Q75%	min	max
Бактерицидность нейтрофилов спонтанная, ед./млн кл.	70–120	День 1	98	74,25	112,5	68	116
		День 6	93	85	104	62	124
		День 11	92	87,25	102	71	124
		День 24	88	82	98	68	116
Бактерицидность нейтрофилов индуцированная, ед./млн кл.	150–200	День 1	140	116	177,2	94	202
		День 6	152	138	169,8	84	198
		День 11	145	131,5	170,8	88	198
		День 24	156,5	139,8	167,5	102	195
Индекс стимуляции	1,2–2	День 1	1,55	1,3	1,725	1,2	1,8
		День 6	1,6	1,4	1,8	1,3	1,9
		День 11	1,6	1,5	1,725	1,2	1,9
		День 24	1,8	1,575	1,8	1,4	1,9

Примечание. Me – медиана; Q25%, Q75% – 25-й и 75-й квартили соответственно; min – минимум; max – максимум.

ТАБЛИЦА 4
РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ
НЕЙТРОФИЛОВ В ДИНАМИКЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 4
THE RESULTS OF THE ASSESSMENT OF THE NEUTROPHILS
PHAGOCYtic ACTIVITY IN THE DYNAMICS

Параметры	Референтные значения	Контрольные точки	Me	Q25%	Q75%	min	max
Фагоцитоз нейтрофилов, %	65–88	День 1	68	66	68	65	69
		День 6	67,5	66	68	65	69
		День 11	68	66	68	65	69
		День 24	68	67	68	65	69
Завершённость фагоцитоза, коэффициент	1–1,2	День 1	1	1	1	0,9	1
		День 6	1	1	1	0,9	1
		День 11	1	1	1	0,9	1
		День 24	1	1	1	1	1
Индекс фагоцитоза	2,3–3	День 1	2,3	2,3	2,4	2,2	2,8
		День 6	2,3	2,3	2,4	2,2	2,7
		День 11	2,3	2,3	2,4	2,2	2,6
		День 24	2,3	2,3	2,4	2,2	2,5

Примечание. Me – медиана; Q25%, Q75% – 25-й и 75-й квартили соответственно; min – минимум; max – максимум.

терапевтических мероприятий и не имеющие связи с применением препарата Тимоген.

В ходе проведённого исследования не было зарегистрировано ни одного СНЯ. Среди зафиксированных НЯ отмечали слизистые выделения из носа ($n = 1$) и заложен-

ность носа ($n = 1$) с 1-го по 10-й дни исследования, которые купировались самостоятельно. Слизистые выделения наблюдались по утрам в течение 1 часа после применения Тимогена, а заложенность носа – через 20 мин после приёма препарата в течение 3–4 ч, что было расце-

ТАБЛИЦА 5
ДИНАМИКА ЖИЗНЕННО ВАЖНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
В ХОДЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 5
DYNAMICS OF VITAL SIGNS DURING THE STUDY

Параметры	Референтные значения	Контрольные точки	M	σ	min	max
САД, мм рт. ст.	110-135	День 1	128,2	7,47	115	145
		День 6	126,45	7,24	110	139
		День 11	125,3	8,09	104	138
		День 24	126,0	7,28	115	139
ДАД, мм рт. ст.	60-85	День 1	79,15	5,58	70	90
		День 6	78,8	7,61	65	94
		День 11	77,6	7,88	64	94
		День 24	77,1	6,82	64	93
ЧСС, уд/мин	60-90	День 1	75,6	11,55	64	89
		День 6	73,05	8,15	49	102
		День 11	73,95	8,89	56	90
		День 24	74,3	8,93	55	92
ЧДД, дыхательных движений/мин	до 22	День 1	16,05	0,94	14	18
		День 6	16,2	1,06	14	18
		День 11	15,9	0,85	14	18
		День 24	16,4	1,05	14	18
ТТ, °С	35,5-36,9	День 1	36,19	0,24	35,8	36,7
		День 6	36,26	0,33	35,7	36,8
		День 11	36,26	0,36	35,5	36,8
		День 24	36,16	0,42	35,0	36,7

Примечание. M – среднее значение; σ – стандартное отклонение; min – минимум; max – максимум.

нено исследователями как состояния, связанные с применением препарата. Ня имели лёгкую степень тяжести. Клинических проявлений аллергических реакций, таких как крапивница, сыпь, анафилактические реакции, при применении препарата зафиксировано не было.

Таким образом, полученные данные о профилактическом применении Тимогена спрей 2 раза в сутки в течение 10 дней свидетельствуют об удовлетворительной переносимости препарата, его безопасности и отсутствии негативного влияния на основные жизненно важные показатели.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам, полученным в ходе выполнения научно-исследовательской работы, выявлено статистически значимое увеличение вирус-индуцированной продукции IFN- α суточной культурой клеток периферической крови после 10 дней приёма Тимогена и продолжа-

ющийся рост этого показателя ещё в течение 14 дней после окончания курса. Следовательно, профилактическое использование препарата Тимоген спрей позволяет увеличить способность клеток периферической крови вырабатывать IFN- α в ответ на воздействие вирусного патогена непосредственно в период приёма препарата, а также ещё как минимум в течение 2 недель после. Этот механизм биологической активности следует считать эффективным при профилактике и лечении респираторных вирусных инфекций любой этиологии и особенно тех, иммунопатогенез которых сопровождается угнетением синтеза эндогенного интерферона, в частности COVID-19.

В исследовании показано, что сывороточные уровни IFN- α и IFN- γ в течение всего периода исследования оставались на фоновом уровне.

Полученные результаты на здоровых добровольцах согласуются с результатами проведённых ранее исследований, в которых показано, что Тимоген не обладает способностью к стимуляции значительного количества эндогенного интерферона, что связано с его меха-

низмом действия, и является, скорее, регулятором данного процесса, причём в большей степени на фоне первичной антигенной индукции [18].

Другие авторы отмечают, что Тимоген является индуктором выработки эндогенного интерферона, преимущественно альфа- и бета-фракций. Так, в исследовании *in vivo* Тимоген вводили подкожно белым мышам и оценивали уровень интерферона в сыворотке крови, лёгких и мозге [19]. Согласно полученным результатам, уже через 2 часа концентрация IFN в сыворотке достигала 10–20 МЕ/мл, сохранялась до 4 ч и снижалась до нуля через сутки после введения препарата.

Вероятнее всего, различные выводы связаны с разницей во времени оценки выработки эндогенного интерферона – в первые сутки и в отдалённый период, – которые при нормальном течении инфекционного процесса подвержены значительным изменениям, а также с типом изучаемого объекта – животные или человек. В ряде наблюдений при изучении лекарственных препаратов эффекты у животных нередко не повторяют эффекты у человека.

Статистически значимых изменений бактерицидной активности нейтрофильных гранулоцитов, а также фагоцитарной активности нейтрофилов у здоровых добровольцев в ходе исследования не отмечено, что говорит о том, что при отсутствии инфекционного агента препарат не меняет фоновые значения, не вызывает гиперактивацию защитных факторов иммунитета, активируясь только в присутствии патогена.

Следует отметить, что есть научные работы, подтверждающие высокую местную противовирусную активность Тимогена спрея за счёт антисептического действия при подавлении инфекционности вируса SARS-CoV-2 [20] у больных коронавирусной инфекцией. Также в ранее проведённых исследовательских работах, посвящённых изучению динамики иммунологических параметров, у пациентов было выявлено, что на фоне острых инфекционных заболеваний, то есть в условиях преформированного воздействия патогена, или других острых состояний применение Тимогена способствовало более быстрому восстановлению сниженной бактерицидной активности нейтрофилов, определяемой с помощью НСТ-теста. Это было показано для пациентов с тяжёлой механической травмой в сравнении с больными, получавшими традиционное лечение [21], а также для больных хроническими пиодермиями [22]. В отношении фагоцитоза в предшествующих работах были получены данные о стимулирующем действии Тимогена у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом [23].

В ходе работы также показано, что профилактическое применение препарата Тимоген в форме спрея 2 раза в сутки в течение 10 дней не оказывало значимого влияния на основные жизненно важные показатели организма. Выявленные НЯ имели лёгкую степень тяжести и разрешались самостоятельно. Аллергических реакций на применение препарата зафиксировано не было. Также не было эпизодов отмены препарата по инициативе исследователей и субъектов исследования. Полученные данные подтверждают хорошую переносимость и безопасность Тимогена при его профилактическом применении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования было выявлено статистически значимое увеличение вирус-индуцированной продукции INF-α суточной культурой клеток периферической крови у здоровых добровольцев. Зафиксированный эффект от применения препарата Тимоген, спрей назальный дозированный сохранялся в течение всего периода его приёма – 10 дней – и спустя 14 дней после окончания курса. В ходе исследования не было зарегистрировано статистически значимых изменений бактерицидной активности нейтрофильных гранулоцитов (включая спонтанную и индуцированную бактерицидность), а также фагоцитарной активности нейтрофилов (в том числе фагоцитоза нейтрофилов, завершённости фагоцитоза и индекса фагоцитоза). Полученные данные о способности препарата Тимоген активировать реакции врождённого иммунитета, задействуя систему IFN, заслуживают внимания и продолжения изучения механизмов его действия.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Biron CA. Innate immunity. In: Katze MG, Korth MJ, Law GL, Nathanson N (eds). *Viral pathogenesis – From basics to systems biology*. London: Academic Press; 2016: 41–55.
2. Bourdon M, Manet K, Montagutelli X. Host genetic susceptibility to viral infections: The role of type I interferon induction. *Genes Immun*. 2020; 21: 365–379. doi: 10.1038/s41435-020-00116-2
3. Sun L, Wang X, Saredy J, Yuan Z, Yang X, Wang H. Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. *Redox Biol*. 2020; 37: 101759. doi: 10.1016/j.redox.2020.101759
4. Rungelrath V, Kobayashi SD, DeLeo FR. Neutrophils in innate immunity and systems biology-level approaches. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2020; 12(1): e1458. doi: 10.1002/wsbm.1458
5. Chen Y, Lu D, Churov A, Fu R. Research progress on NK cell receptors and their signaling pathways. *Mediators Inflamm*. 2020; 2020: 6437057. doi: 10.1155/2020/6437057
6. Bojang E, Ghuman H, Kumwenda P, Hall RA. Immune sensing of *Candida albicans*. *J Fungi (Basel)*. 2021; 7(2): 119. doi: 10.3390/jof7020119
7. Huang Y, Huai D, Ke R. Principles of effective and robust innate immune response to viral infections: A multiplex network analysis. *Front Immunol*. 2019; 10: 1736. doi: 10.3389/fimmu.2019.01736
8. Silin DS, Lyubomska OV, Ershov FI, Frolov VM, Kutsyna GA. Synthetic and natural immunomodulators acting as interferon inducers. *Curr Pharmaceut Design*. 2009; 15(11): 1238–1247. doi: 10.2174/138161209787846847
9. Gonzalez-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12: 125–135. doi: 10.1038/nri3133

10. Chiale C, Greene TT, Zuniga EI. Interferon induction, evasion, and paradoxical roles during SARS-CoV-2. *Immunol Rev.* 2022; 309(1): 12-24. doi: 10.1111/imr.13113
11. Made CI, Simons A, Schuurs-Hoeijmakers J. Presence of genetic variants among young men with severe COVID-19. *JAMA.* 2020; 324: 663-673. doi: 10.1001/jama.2020.13719
12. Rebl A, Goldammer T. Under control: The innate immunity of fish from the inhibitors' perspective. *Fish Shellfish Immunol.* 2018; 77: 328-349. doi: 10.1016/j.fsi.2018.04.016
13. Mifsud EJ, Kuba M, Barr IG. Innate immune responses to influenza virus infections in the upper respiratory tract. *Viruses.* 2021; 13: 2009. doi: 10.3390/v13102090
14. Цыган В.Н., Новик А.А., Дулатова Н.Х., Жоголев К.Д., Козлов В.К., Зубов Н.Н. *Синдром хронической усталости и иммунной дисфункции*. СПб.: Издательство ВМА; 2001. [Tsygan VN, Novik AA, Dulatova NK, Zhogolev KD, Kozlov VK, Zubov NN. *Chronic fatigue syndrome and immune dysfunction*. Saint Petersburg: Izdatelstvo VMA; 2001. (In Russ.)].
15. Арцимович Н.Г., Глушина Т.С. *Синдром хронической усталости*. М.: Научный мир; 2002. [Artsimovich NG, Glushina TS. *Chronic fatigue syndrome*. Moscow: Nauchny mir; 2002. (In Russ.)].
16. Chen X, Shen Y, Wu M, Zhao J. IRF3 from mandarin fish thymus initiates interferon transcription. *Fish Physiol Biochem.* 2019; 45: 133-144. doi: 10.1007/s10695-018-0543-8
17. Pandey R, Dikhit MR, Kumar A, Dehury B, Pandey K, Topno RK, et al. Evaluating the immunomodulatory responses of LdODC-derived MHC Class-II restricted peptides against VL. *Parasite Immunol.* 2020; 42(4): e12699. doi: 10.1007/s10695-018-0543-8
18. Смирнов В.С., Селиванов А.А. *Биорегуляторы в профилактике и лечении гриппа*. СПб.: Наука; 1996. [Smirnov VS, Selivanov AA. *Bioregulators in the prevention and treatment of influenza*. Saint Petersburg: Nauka; 1996. (In Russ.)].
19. Шульдяков А.А., Ляпина Е.П., Соболева Л.А., Романцов М.Г., Перминова Т.А., Кузнецов В.И., и др. Использование индукторов интерферона в клинике инфекционных болезней. *Антибиотики и химиопрофилактика*. 2016; 63: 3-4. [Shuldyakov AA, Lyapina EP, Soboleva LA, Romantsov MG, Perminova TA, Kuznetsov VI, et al. The use of interferon inducers in an infectious disease clinic. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2018; 63(3-4): 28-36. (In Russ.)].
20. Ленева И.А., Смирнов В.С., Кудрявцева Т.А., Файзулов Е.Б., Грачева А.В., Карташова Н.П., и др. Местная противовирусная активность препарата «Тимоген®», спрей назальный дозированный, в отношении коронавируса SARS-CoV-2 *in vitro*. *Антибиотики и Химиотерапия*. 2021; 66(5-6): 11-16. [Leneva IA, Smirnov VS, Kudryavtseva TA, Fayzuloev EB, Gracheva AV, Kartashova NP, et al. Local antiviral activity of the drug «Tymogen®», nasal dosed spray, against SARS-CoV-2 coronavirus *in vitro*. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2021; 66(5-6): 11-16. (In Russ.)]. doi: 10.37489/0235-2990-2021-66-5-6-11-16
21. Смирнов В.С., Зарубаев В.В., Петленко С.В. *Биология возбудителей и контроль гриппа и ОРВИ*. СПб.: Гиппократ; 2020. [Smirnov VS, Zarubaev VV, Petlenko SV. *Biology of pathogens and control of influenza and acute respiratory viral infection*. Saint Petersburg: Gippokrat; 2020. (In Russ.)].
22. Родионов А.Н., Хавинсон В.Х., Барбинов В.В. Иммунокорректирующая терапия пиодермий, обусловленных стафилококками, полирезистентными к антибиотикам. *Вестник дерматологии и венерологии*. 1990; 1: 42-45. [Rodionov AN, Khavinson VKh, Barbinov VV. Immunocorrective therapy for pyoderma caused by staphylococci multiresistant to antibiotics. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 1990; 1: 42-45. (In Russ.)].
23. Пинелис И.С., Кузник Б.И., Пинелис Ю.И. Особенности биорегулирующей терапии стоматологических заболеваний. *Забайкальский медицинский вестник*. 2019; 1: 173-186. [Pinelis IS, Kuznik BI, Pinelis Yul. Features of bioregulatory therapy of dental diseases. *The Transbaikalian Medical Bulletin*. 2019; 1: 173-186. (In Russ.)].

Сведения об авторах

Рулёва Анна Александровна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела вакцинопрофилактики и поствакцинальной патологии, ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России, e-mail: ruleanna@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5888-6313>

Краснов Алексей Александрович – доктор медицинских наук, доцент кафедры медико-валеологических дисциплин, ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена», e-mail: dr.krasnov_28@mai.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8732-6390>

Петленко Сергей Викторович – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства», e-mail: petlenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2752-4598>

Заплутанов Василий Андреевич – научный сотрудник лаборатории химии пептидов отдела биogerонтологии, АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», e-mail: vasily@zaplutanov.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5294-6533>

Апратина Вера Анатольевна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии, Институт трансляционной биомедицины, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», e-mail: vera1577@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9819-6835>

Information about the authors

Anna A. Ruleva – Cand. Sc. (Med.), Research Officer at the Department of Vaccinal Prevention and Postvaccinal Pathology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Federal Medical Biological Agency, e-mail: ruleanna@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5888-6313>

Alexey A. Krasnov – Dr. Sc. (Med.), Associate Professor at the Department of the Medical Valeological Subjects, Herzen State Pedagogical University, e-mail: dr.krasnov_28@mai.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8732-6390>

Sergey V. Petlenko – Dr. Sc. (Med.), Leading Research Officer, Golikov Research Center of Toxicology, e-mail: petlenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2752-4598>

Vasily A. Zaplutanov – Research Officer at the Laboratory of Peptide Chemistry of the Department of Biological Gerontology, St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, e-mail: vasily@zaplutanov.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5294-6533>

Vera A. Apryatina – Cand. Sc. (Med.), Senior Research Officer at the Laboratory of Neurobiology and Molecular Pharmacology, Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, e-mail: vera1577@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9819-6835>