**Аллоферон-1 ослабляет острые воспалительные реакции при вызванном λ-каррагинаном отеке лапы у мышей**

**Xiangrui Zhang1, Vladimir Retyunskiy1, Shuai Qiao1, Ye Zhao1**\* **& Chi‑Meng Tzeng2,3,4**\*

Аллоферон-1 был предложен в качестве эффективного пептида для усиления противоопухолевого иммунитета, противовирусной защиты и противовоспалительной активности.

Эта работа была направлена ​​на оценку противовоспалительного действия аллоферона-1 в отношении острого воспаления и гистопатологических деформаций при λ-каррагинан-индуцированном отеке лапы у мышей. Системное предварительное введение мышам аллоферона-1 (22,0 мг/кг) внутрибрюшинно показало значительное уменьшение толщины лапы и проницаемости сосудов.

Аллоферон-1 предотвращал вызванную λ-каррагинаном экссудацию и приток нейтрофилов в плевру мыши, а также миграцию нейтрофилов в воздушные мешочки мышей, стимулированные каррагинаном, на основании гистопатологических изменений в тканях лапы. Введение аллоферона-1 также подавляло экспрессию воспалительных цитокинов в воспаленных тканях лапы, таких как фактор некроза опухоли-α (TNF-α), хемоаттрактантный белок моноцитов 1 (MCP1), интерлейкин-5 (IL-5) и др. детектируется жидким чипом Luminex. В совокупности настоящее исследование предоставляет доказательства выраженного противовоспалительного действия аллоферон-1, который может представлять новые терапевтические возможности для лечения острых воспалительных заболеваний.

Воспаление относится к защитной реакции против аллергенов, токсических веществ, инфекций или повреждений клеток, что приводит к возникновению покраснения, отека, астмы, лихорадки, боли и других симптомов в пораженном участке (1–3). Воспаление можно разделить на острое воспаление и хроническое воспаление. Острое воспаление носит временный характер и может быть восстановлено до нормального тканевого гомеостаза путем устранения провоцирующего стимула.

Однако персистенция острых воспалительных реакций обычно приводит к ревматоидному артриту, атеросклерозу, болезни Альцгеймера и заболеваниям кишечника (4).

В настоящее время для лечения воспаления обычно применяются прописываемые противовоспалительные препараты, включая стероидные противовоспалительные препараты, нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) и антибактериальные препараты. Хотя длительное применение больших доз этих препаратов часто сопровождается легкими или умеренными побочными реакциями, они коррелируют с серьезными проблемами со здоровьем, такими как желудочно-кишечные кровотечения и нефротоксичность (8).

Следовательно, важно понимать механизмы острого и хронического воспаления и, в частности, исследовать ингибирующие интервенционные препараты для снижения иммунологической реактивности.

Антимикробные пептиды (АМП), широко распространенные в биосфере, относятся к разновидности консервативных пептидных молекул, обладающих антимикробной активностью. Как группа встречающихся в природе АМП, аллофероны были предложены в качестве эффективных пептидных соединений для усиления противоопухолевого иммунитета и противовирусной защиты. Аллофероны входят в состав

семейство цитокиноподобных пептидов, которые первоначально были получены из гемолимфы зараженных бактериями личинок мясной мухи Calliphora vicina Diptera (5).

Были выделены два пептида из 13 и 12 аминокислот, которые стимулируют in vitro естественную цитотоксичность лимфоцитов селезенки мыши и мононуклеарных клеток крови человека, и их аминокислотные последовательности были идентифицированы как HIS-GLY-VAL-SER-GLY-HIS-GLY-GLN. -HIS-GLY-VAL-HIS-GLY (аллоферон-1) и GLY-VAL-SER-GLY-HIS-GLY-GLN-HIS-GLY-VAL-HIS-GLY (аллоферон-2) (5). Аллоферон-1 обнаруживает способность стимулировать активность естественных киллеров (NK) и синтез IFN на животных и человеческих моделях, тем самым проявляя противоопухолевые и противовирусные свойства (6).

Недавно также сообщалось, что аллоферон-1 эффективно снижает выработку провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин 5 (ИЛ-5), интерлейкин 6 (ИЛ-6) и интерлейкин 17 (ИЛ-17) при индуцированном овальбумином астма (7). Аналогично при воспалении кожи, вызванном УФ-В, аллоферон-1 сильно снижает выработку провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-6, интерлейкин 8 (ИЛ-8) и фактор некроза опухоли-α (ФНО-α) (8). Кроме того, аллоферон-1 ослабляет индуцированный декстрансульфатом натрия энтерита путем подавления IL-6 и TNF-α (9). Основываясь на этих иммуномодулирующих эффектах аллоферона-1, в настоящем исследовании мы исследовали противовоспалительный эффект аллоферона-1 при индуцированном λ-каррагинаном отеке лапы у мышей.

*(1 )Школа фармацевтических наук Нанкинского технического университета, Нанкин 211800, Китай. (2) Школа фармацевтических наук, Сямэньский университет, Сямэнь 361005, Китай. (3 )Исследовательский центр трансляционной медицины – Ключевая лаборатория терапии Т-клеток рака и клинического перевода, Школа фармацевтических наук, Сямэньский университет, Сямынь 361005, Китай. (4 ) Медицинский исследовательский центр больницы Сямэнь Чан Гун, Сямынь 361005, Китай.*

*\*электронная почта: zhaoye@njtech.edu.cn; zhaoyev@163.com; tzengchimeng@njtech.edu.cn*

**Материалы и методы.**

**Животные и реактивы.**

Исследование было одобрено Комитетом по этике Нанкинского технологического университета. Содержание и утилизация мышей соответствовали требованиям Институционального комитета по уходу и использованию животных.

(IACUC) Нанкинского технического университета по использованию лабораторных животных, и все методы соответствовали рекомендациям ARRIVE. Свободные от конкретных патогенов (SPF) самцы мышей BALB/c (масса тела 20–25 г) в возрасте 8–9 недель были получены от Nanjing Junke Bioengineering Corporation, Китай. Всех мышей содержали в контролируемых условиях окружающей среды (25 ± 3 °C, влажность 50–60% и 12-часовой цикл свет-темнота) и обеспечивали свободный доступ к стандартной диете и воде. За исключением питьевой воды, все мыши были лишены пищи за 12 ч до начала экспериментов. Всех подопытных животных кормили, и все операции выполнял один и тот же исследователь. В ходе экспериментов не погибло ни одно животное. В конце экспериментов мышей профессионально усыпляли методом цервикальной дислокации для сбора образцов.

Аллоферон-1 (чистота > 98,62%) был предоставлен Leon Biological Technology Co. Ltd. (Нанкин, Китай), а аспирин (чистота > 98%) был приобретен у Solarbio Science & Technology Co., Ltd. (Пекин, Китай). Краситель Evans Blue и λ-каррагинан были предоставлены компанией Sigma (США). Забуференный фосфатом физиологический раствор PBS был приобретен у Leagene Biotech Co., Ltd. (Пекин, Китай). Формамид был поставлен компанией Macleans Biochemical Technology Co., Ltd. (Шанхай, Китай).

**λ-каррагинан-индуцированный острый отек лапы у мышей.**

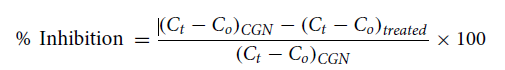
Мыши были случайным образом разделены на четыре группы: контроль (Контр), λ-каррагинан (КГН), КГН + аспирин (АСК) (250 мг/кг) и КГН + аллоферон-1 (АФ) (22 мг/кг). по 5 мышей в каждой группе. Группам контроля и ХГН вводили 1 мл 0,9% физиологического раствора субплантарно.

инъекция в левую заднюю лапу. Группы положительного контроля (CGN + ASA) предварительно обрабатывали аспирином (250 мг/кг) путем внутрибрюшинной (IP) инъекции, а через 2 часа в левую заднюю лапу вводили 30 мкл 1% λ-каррагинана. Иглу вводили из пятки и осторожно вводили под сухожилие по средней линии подошвы мышей (10).

В группах аллоферона-1 (CGN + AF) внутрибрюшинные инъекции аллоферона-1 проводили за 6 ч до лечения λ-каррагинаном.

Измерения проводили через 0, 1, 3, 5 и 7 ч после введения λ-каррагинана с помощью штангенциркуля.

Ингибирующий эффект определяли по следующей формуле:



где (Ct-CO)CGN представляет собой разницу в размере лапы через 7 часов у мышей CGN, а (Ct-Co)лечили представляет собой разницу в размере лапы через 7 часов у мышей, получавших либо аспирин, либо аллоферон-1.

**Оценка гистопатологии лапы с помощью окрашивания гематоксилином и эозином (HE).**

Мышей подвергали эвтаназии после введения λ-каррагинана в течение 7 ч, а ткани левой задней лапы фиксировали 4% параформальдегидом.

(PFA) в фосфатно-солевом буфере (Sigma-Aldrich) и залитых парафином после декальцинации 20% ЭДТА в течение 5 дней (11).

Ткани лапы разрезали на срезы толщиной пять микрометров с помощью микротома. Окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) (H-3404, Vector labs, США) проводили по стандартным протоколам. Не менее пяти срезов от пяти животных в каждой экспериментальной группе микрофотографировали с помощью инвертированного микроскопа (Nikon ECLIPSE Ts2, Япония) (12).

**Оценка подсчета клеток.**

Общее и дифференциальное количество лейкоцитов в периферической крови определяли с помощью гемоцитометра (ADVIA-2120i, Siemens, Германия). После высушивания на воздухе мазки крови окрашивали красителем Hansel Wright (Sigma) и промывали фосфатно-азидно-натриевым буфером (Sigma) и 95% этанолом. При высушивании все типы лейкоцитов, включая нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты, можно идентифицировать по их внешнему виду под световым микроскопом.

**Экстравазация синего красителя Эванса при отеке лапы, вызванном λ-каррагинаном.**

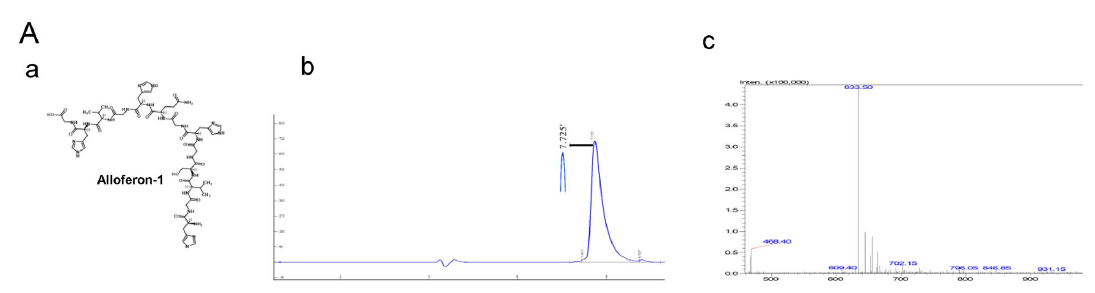
Перед инъекцией в хвостовую вену приготовленный 0,5% стерильный раствор синего Эванса PBS снова пропускали через фильтр для удаления не полностью растворенных частиц. 200 мкл 0,5% голубого красителя Эванса вводили в хвостовые вены всем мышам после 7 ч инъекции λ-каррагинана для измерения экстравазации красителя в тканях левой задней лапы. Через 30 мин после инъекции фотографировали лапы мышей.

Тем временем лапы мышей выдерживали в печи при 65℃ в течение 48 часов, чтобы устранить разницу во влажности. После взвешивания и измельчения ткани лап пропитывали 500 мкл формамида и дополнительно нагревали на водяной бане при 55°С в течение 24–48 ч для экстракции синего Эванса.

Затем смесь формамида и синего Эванса центрифугировали при 4000 g в течение 10 мин. Уровень синего Эванса в супернатантах определяли по его поглощению на длине волны 630 нм с помощью микропланшет-ридера.

**Обнаружение стружки жидкой суспензии Luminex.**

После введения λ-каррагинана в течение 7 ч образцы крови собирали из ретроорбитального сплетения, отделяли сыворотку и подвергали чип-детекции. Чип жидкой суспензии Luminex для выявления факторов воспаления был изготовлен компанией Wayen Biotechnologies (Шанхай, Китай). Набор Bio-Plex Pro Human Chemokine Panel 23-plex (Bio-Rad Laboratories) применяли в соответствии с инструкциями производителя. Каждый образец оценивали в трехкратной повторности.



|  |  |
| --- | --- |
|  |  |

Рисунок 1. Влияние аллоферона-1 на отек лапы у мышей, индуцированных каррагинаном. Мышам предварительно вводили внутривенно аллоферон-1 (22 мг/кг массы тела) в течение 6 ч или аспирин (250 мг/кг массы тела) в течение 2 ч перед субплантарным введением λ-каррагинана. Ctrl: физиологический раствор; CGN: λ-каррагинан; АФ: аллоферон-1; АСК: аспирин.

(А) а, Структура аллоферона-1; б — обнаружение синтезированного аллоферерона-1 с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ); в. масс-спектрометрический (МС) анализ синтезированного аллоферона-1.

(B) Внешний вид отека лапы в каждой группе.

(C) Измерение толщины отека лапы у мышей с помощью цифрового штангенциркуля.

Данные представлены как среднее ± SEM (n = 5). \*P < 0,05 считали значимой разницей по сравнению с контрольной группой.

**Вестерн-блот анализ.**

Белковые образцы тканей лап мышей лизировали буфером RIPA и белок разделяли электрофорезом в 12% SDS-полиакриламидном геле (PAGE). Затем блоты переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США). Мембраны инкубировали с интерлейкином-1β (ИЛ-1β) (1:1000, #511369, Zen BioScience, Китай) или β-актином (1:5000, #250132, Zen BioScience, Китай) в разведениях в TBS, содержащем 1% обезжиренного молоко. Затем блоты инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с HRP козьими антимышиными IgG (Zhongshanjinqiao Co., Китай) в соотношении 1:2000. Опыты повторяли трижды с разными образцами.

Блот вырезали перед гибридизацией с антителами во время блоттинга. Каждый гель для блоттинга с 12 загрузочными лунками разрезали на две равные части. Таким образом, полноразмерный блоттинг-гель включал 6 лунок для загрузки образцов.

**Статистический анализ.**

Статистический анализ проводили с помощью GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Различие между двумя группами было подтверждено с помощью t-критерия Стьюдента, а различие между несколькими группами было определено с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием критерия честно значимой разницы Тьюки (HSD Тьюки).

Все эксперименты повторяли независимо друг от друга не менее трех раз. Образцы мышей отбирали случайным образом во всех экспериментах, и различия в измерениях считали статистически значимыми при P <0,05.

**Полученные результаты.**

**Влияние аллоферона-1 на λ-каррагинан-индуцированный отек лапы.**

Перед экспериментами аллоферон-1 синтезировали химическим путем, обнаруживали с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ) и анализировали с помощью масс-спектрометрии (МС) (рис. 1А). В модели отека лапы, вызванного λ-каррагинаном, субплантарная инъекция λ-каррагинана приводила к зависящему от времени увеличению толщины лапы и степени отека, как показано на рис. 1 B и C, которое достигало максимума при 5 часов, а затем сохраняется повышенной в течение 24 часов. Предварительно аллоферон-1 вводили в течение 6 ч в концентрации 22 мг/кг массы тела, исходя из предварительных опытов. Аспирин в качестве положительного контроля предварительно обрабатывали в течение 2 часов в концентрации 250 мг/кг массы тела, как сообщалось13.

Оба препарата показали незначительное влияние на отек лапы в 0 раз. Через 1 час после индукции λ-каррагинаном аспирин вызывал значительное уменьшение отека лапы. Между тем, аллоферон-1 по-прежнему проявлял незначительный эффект через 1 ч после обработки λ-каррагинаном.

Однако после 3-часовой индукции λ-каррагинаном аллоферон-1 значительно уменьшил отек лапы, сделав ее более тонкой и менее опухшей (P <0,05). С течением времени аллоферон-1 проявлял ингибирующий эффект, зависящий от времени. Через 7 ч аллоферон-1 достиг максимального восстановительного эффекта, который был почти таким же, как эффект аспирина.

в подавлении отека лапы. Изменения припухлости лап мышей измеряли цифровым штангенциркулем. Как показано на рис. 1.C, аллоферон-1 и аспирин проявляли максимальную скорость ингибирования 23,03% и 48,82% соответственно по сравнению с мышами, получавшими нормальный физиологический раствор.

**Гистопатологическое исследование.**

Влияние аллоферона-1 на гистопатологические изменения отека лапы оценивали путем окрашивания HE. Как показано на рис. 2А, при остром воспалительном ответе, индуцированном λ-каррагинаном, лапа мышей демонстрировала интенсивный отек, характеризующийся волдырями эпителиальной и конъюнктивной ткани со значительным количеством инфильтрированных воспалительных клеток, большинство из которых были нейтрофилами.

В месте отека лапы были выбраны равные области прямоугольниками с красными точками в 40×, которые затем были увеличены в 400×. Количественную оценку числа нейтрофилов проводили путем подсчета клеток в кругах равной площади с наиболее плотными нейтрофилами. Это показано на рис. 2.Б. что воспалительная реакция с инфильтрацией нейтрофилов была значительно смягчена аллофероном-1 и аспирином по сравнению с мышами, индуцированными λ-каррагинаном. Кроме того, было замечено, что как аллоферон-1, так и аспирин предотвращали вызываемую λ-каррагинаном экссудацию и приток нейтрофилов в плевру мышей, а также миграцию нейтрофилов в стимулированные λ-каррагинаном воздушные мешочки в тканях лапы.

Было обнаружено, что аллоферон-1 влияет на общее и дифференциальное количество лейкоцитов в крови мышей с λ-каррагинаном (таблица 1, рис. 2C-E). В группах λ-каррагинана среднее общее количество лейкоцитов составило 6,68 ± 2,52 × 109/л, что было значительно выше по сравнению с контрольными группами (4,55 ± 2,13 × 109/л) (таблица 1).

Напротив, как аллоферон-1, так и аспирин продемонстрировали значительный ингибирующий эффект в отношении среднего общего количества лейкоцитов, которое составило 4,35 ± 0,95 × 109/л и 4,55 ± 1,09 × 109/л соответственно (P <0,05) (рис. 2.C).

Кроме того, в соответствии с гистопатологическими данными, количество нейтрофилов (рис. 2D, таблица 1) и процентное содержание нейтрофилов (рис. 2E, таблица 1) были значительно снижены как в группах аллоферона-1, так и в группах аспирина со значимостью (P <0,05).

**Экстравазация синего красителя Эванса в ткани лап мышей.**

Острое воспаление, вызванное λ-каррагинаном, может повышать проницаемость сосудов, о чем можно судить по экстравазации синего Эванса из тканей.

Как показано на рис. 3, вызванный λ-каррагенаном отек тканей лап резко увеличил поглощение синего Эванса при длине волны 630 нм. Между тем, лечение как аллофероном-1, так и аспирином подавляло экстравазацию синего красителя Эванса и проявляло ингибирование на 19,63% и 43,63% соответственно по сравнению с группами, получавшими λ-каррагинан, индуцированный отеком лапы.

**Влияние аллоферона‑1 на экспрессию воспалительных факторов.**

Для дальнейшего изучения потенциального механизма действия аллоферона-1 при воспалении, вызванном λ-каррагинаном, уровни цитокинов в сыворотке измеряли с помощью технологии Luminex Liquid Cytokine Chip. Тепловая карта экспрессии на рис. 4A и гистограмма количественного определения на рис. 4B показали, что IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-12 (P40) заметно снижались под действием аллоферона. 1 по сравнению с моделью отека лапы, вызванного λ-каррагинаном (P <0,05). При этом уровни ИЛ-9 и ИЛ-10 также несколько снижались под действием аллоферона-1.

Кроме того, экспрессия макрофагального воспалительного белка 1α (MIP-1α) и MIP-1β, моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1), гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и TNF-α подавлялась в λ-каррагинане. индуцированная модель, обработанная аллофероном-1, по сравнению с группой, индуцированной λ-каррагинаном. Напротив, изменения IL-1α, IL-17A, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), кератиноцитов (KC) и эотаксин не показали явных изменений после лечения аллофероном-1. IFN-γ показал небольшую активацию аллофероном-1 по сравнению с контролем, но незначительную.

Более того, экспрессия IL-6 незначительно активировалась аллофероном-1. Интересно, что аспирин показал противоположные регулирующие эффекты с аллофероном-1 в экспрессии MIP-1α, MCP-1, GM-CSF, которые были увеличены после лечения аспирином, что позволяет предположить, что противовоспалительный механизм аспирина и аллоферона-1 был другим.

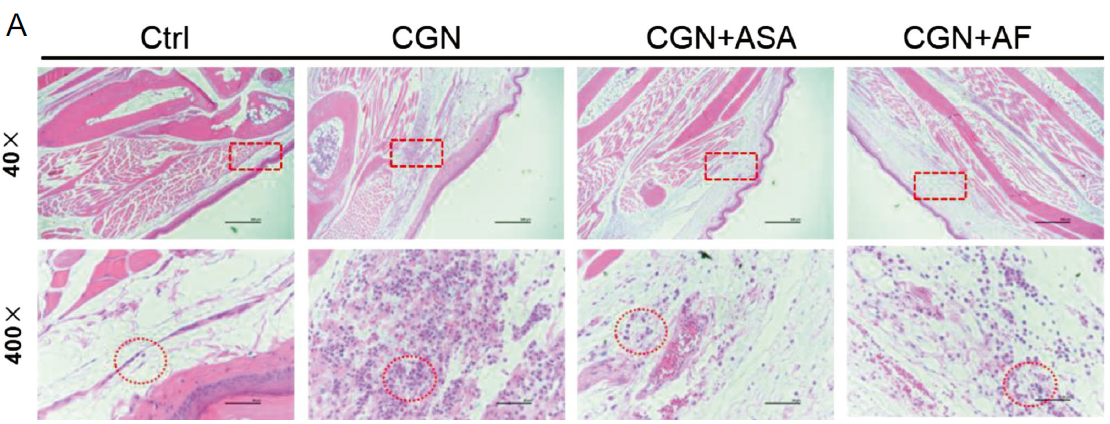
Для проверки экспрессии цитокина в сыворотке был выбран IL-1β для обнаружения с помощью вестерн-блоттинга.

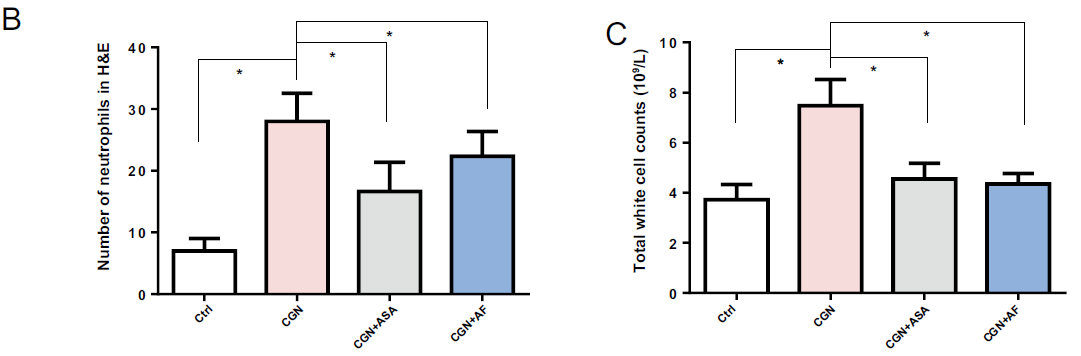
Это показано на рис. 4.C,D. что аллоферон-1 значительно снижал экспрессию провоспалительного фактора IL-1β (P <0,05). В совокупности эти данные указывают на то, что аллоферон-1 может оказывать ингибирующее действие на отек лапы, вызванный λ-каррагинаном, путем регуляции с помощью различных цитокинов.

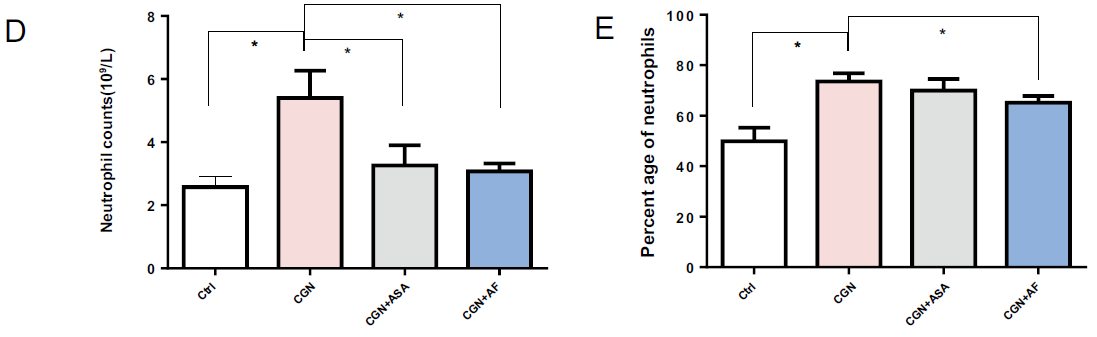
**Обсуждение.**

Согласно предыдущим исследованиям, аллофероны представляют собой полипептиды с биологической активностью, включая антивирусную, противоопухолевую, противовоспалительную, иммунорегулирующую и т. д. (13,14). В качестве иммуномодулирующего пептида аллоферон-1 получил клиническую поддержку и доказал свою эффективность у пациентов, страдающих инфекциями, вызванными вирусом простого герпеса (ВПГ) и вирусом папилломы человека (ВПЧ), а также несколькими вирусами Коксаки (14–17). Однако его противовоспалительный потенциал нуждается в дальнейшей доклинической оценке. С целью определения противовоспалительных свойств аллоферона-1 в этом исследовании была выбрана модель острого отека лапы у мышей, индуцированного λ-каррагинаном. Индуцированный λ-каррагинаном отек лапы у мышей является хорошо изученной моделью, которая была полностью охарактеризована ранее (18,19). Согласно соответствующим данным, воспаление, вызванное λ-каррагинаном, можно разделить на три стадии, причем первая и третья стадии воспаления в основном опосредованы простагландинами серии Е, гистамином и серотонином (20).

После подкожной инъекции сразу появляются отек, гипералгезия и эритема, которые обусловлены действием провоспалительных агентов - брадикинина, гистамина, тахикинина, комплемента и активных форм кислорода, а также азотистых веществ (21). Известно, что периферические отеки в основном вызываются венозной обструкцией и повышенной сосудистой проницаемостью (22). Поэтому в этом исследовании изменения толщины отека лапы после инъекции λ-каррагинана были измерены, чтобы отразить признаки воспаления. Увеличение отека лапы под действием каррагинана продолжалось всего 5–6 часов и постепенно уменьшалось в течение 24 часов после инъекции (20). В качестве иммуномодулирующего пептида аллоферон-1 обладает относительно медленным иммуномодулирующим действием (7). Поэтому в данном исследовании аллоферон-1 был предварительно обработан для обеспечения его противовоспалительного и иммуномодулирующего действия.







\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**Рисунок 2**. Гистопатологическое исследование и оценка количества клеток.

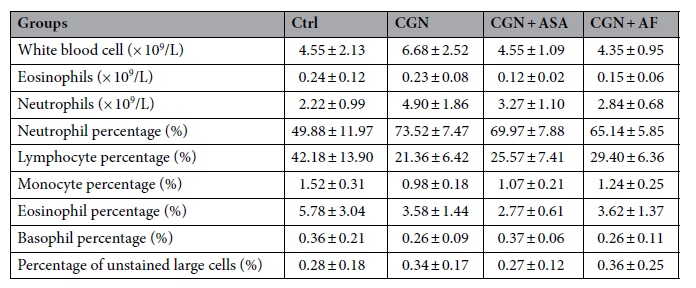
(А) Гистопатологическая микрофотография под микроскопом с увеличением 40× и 400×.

(B) Нейтрофилы в месте отека лапы были обведены красными пунктирными линиями равной площади и представляли собой среднее количество нейтрофилов, количественно определенное на изображении J при увеличении в 400 раз.

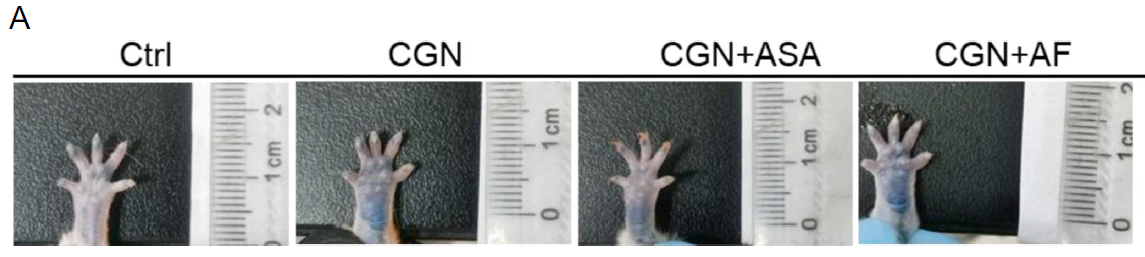
(C) Общее количество лейкоцитов в крови мышей с λ-каррагинаном, оцененное с помощью гемоцитометра.

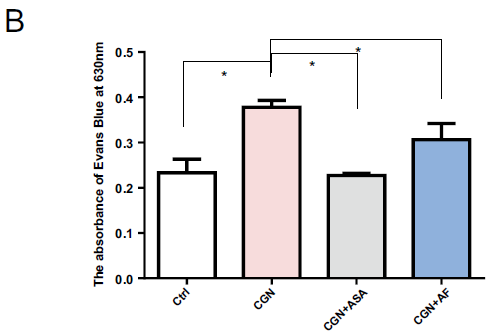
(D) Количество нейтрофилов.

(E) Процент нейтрофилов. Численные данные представлены как среднее ± SEM (n = 5). \*P < 0,05 считали значимой разницей по сравнению с контрольной группой.



**Таблица 1.** Влияние аллоферона-1 на общее и дифференциальное количество лейкоцитов и их процентное содержание. Данные выражены как среднее ± SEM. N = 5 в каждой группе.





**Рисунок 3.** Экстравазация синего Эванса в тканях.

(A) Инъекция синего Эванса и наблюдение за отеком лапы.

(B) Собирали уровень синего Эванса в отечной ткани лапы и определяли его уровень по его поглощению при длине волны 630 нм с помощью считывающего устройства для микропланшетов.

Численные данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего.

(n = 5). \*P < 0,05 считали значимой разницей по сравнению с контрольной группой.

Возникновение отека вызывает увеличение проницаемости сосудов, тем самым повышая эффективность транспорта жидкости через капилляры и позволяя богатой белком жидкости проникать в ткани (23). Медиаторы воспаления, такие как гистамин и серотонин, вызывают усиление просачивания сосудов (24). На проницаемость синего Эванса в кровеносных сосудах мышей в основном влияют два фактора: внутренние факторы в основном зависят от веса, напряжения и возраста мышей, а внешние факторы в основном зависят от температуры, влажности и воздействия стресса. мышей (24).

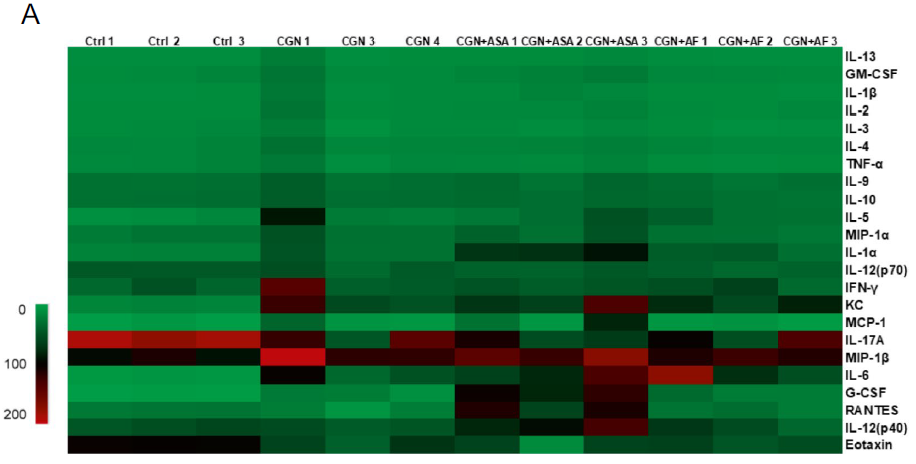
В этом исследовании инъекции синего красителя Эванса в хвостовые вены мышей использовались для оценки степени проницаемости сосудов после воспалительной реакции, вызванной λ-каррагинаном (25–27).

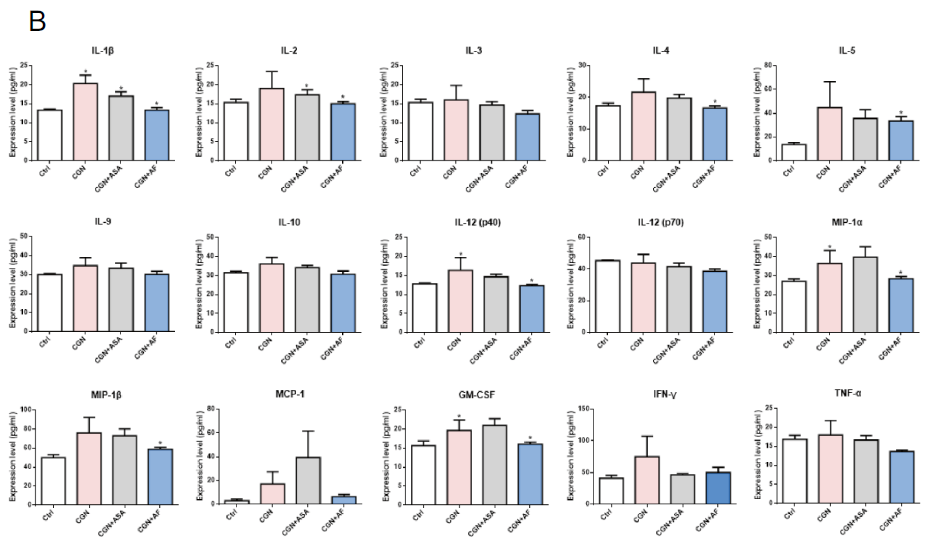
Было замечено, что как аллоферон-1, так и аспирин подавляли экстравазацию синего красителя Эванса по сравнению с вызванным λ-каррагинаном отеком лапы, что свидетельствует о том, что введение аллоферона-1 ингибировало проницаемость сосудов в очаге острого воспаления.

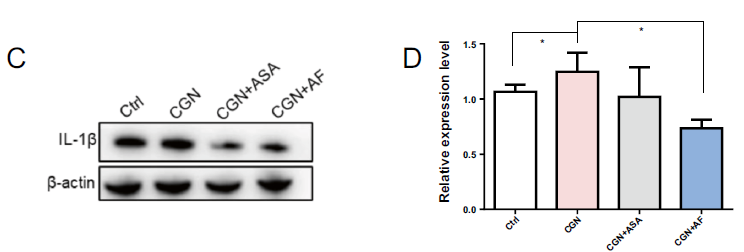
Кроме того, экстравазация жидкости, включая белки плазмы, вызывает агрегацию и адгезию лейкоцитов, что является важным признаком острого воспаления (22,28,29).

Джейн Чон и др. обнаружили, что комбинированное применение аллоферона-1 и преднизолона для лечения астмы значительно снижает количество эозинофилов, макрофагов и нейтрофилов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) мышей с астмой, индуцированной овальбумином (OVA) (7). В текущем исследовании через 7 часов после индукции λ-каррагинаном аллоферон-1 значительно ингибировал агрегацию и инфильтрацию нейтрофилов в месте отека.

Кроме того, снижение среднего общего количества лейкоцитов, количества и процентного содержания нейтрофилов под действием аллоферона-1 дополнительно подтвердило его противовоспалительное действие на агрегацию нейтрофилов.







**Рисунок 4.** Влияние аллоферона-1 на экспрессию воспалительных цитокинов.

**(A)** Анализ тепловой карты воспалительных цитокинов в сыворотке, обнаруженной чипами жидких цитокинов Luminex (n = 3). Тепловая карта была сгенерирована с помощью Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Редмонд, Вашингтон).

**(B)** Уровень экспрессии цитокинов в сыворотке.

**(C)** Вестерн-блот анализ экспрессии IL-1β у мышей в сыворотке (n = 3). Исходные блоты дополняются исходными изображениями рис. 4.С. Перед гибридизацией с антителом во время блоттинга гель для блоттинга с 12 загрузочными лунками разрезали на две равные части. Таким образом, полная длина геля для блоттинга составляла в общей сложности 6 загрузочных лунок.

**(D)** Количественная оценка сигналов вестерн-блоттинга с изображением J. Значения выражены как среднее ± SEM. \*P < 0,05 считали значимой разницей по сравнению с контрольной группой.

Сокращения: пг/мл, пикограмм/мл; ИЛ, интерлейкин; GM-CSF, Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; TNF-α, фактор некроза опухоли-α; ИФН-интерферон-γ; MCP-1, хемоаттрактантный белок-1 моноцитов; MIP-1, макрофагальный воспалительный белок-1; G-CSF, Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор.

Как известно, NK-клетки участвуют в развитии адаптивного иммунного ответа за счет способности продукции цитокинов. При активации NK-клетки выделяют IFN-γ и TNF-α, которые, в свою очередь, обращают вспять подавление иммунной системы (30). IFN-γ и TNF-α являются биологическими факторами, которые убивают большое количество опухолевых клеток и активируют лимфоциты (такие как Т- и В-лимфоциты) (8,31–36).

NK-клетки были идентифицированы как пептидная фармакологическая мишень, отвечающая на аллоферон-1 немедленным ростом цитотоксической активности (37). Аллоферон-1 увеличивал уровни IFN-γ, TNF-α и гранулярного экзоцитоза, продуцируемого NK-клетками, таким образом противодействуя раковым клеткам (5,7–9,37–39). Кроме того, предыдущие исследования также показали, что активация NF-κB участвует в синтезе IFN (16), а аллоферон-1 ингибирует деградацию и фосфорилирование ингибитора κB (IκB), индуцированное TNF-α, в клетках рака толстой кишки Colo205 (7). ), которые дают представление о способности аллоферона стимулировать синтез IFN. В настоящем исследовании экспрессия IFN-γ и TNF-α повышалась после индукции λ-каррагинаном, что может быть связано с тем, что оба фактора были вовлечены в воспалительную реакцию.

После лечения аллофероном-1 было обнаружено снижение IFN-γ и TNF-α, но незначительное, что указывает на сложный механизм аллоферона-1 на регуляцию IFN-γ и TNF-α, который требует дальнейшего изучения.

Цитокины IL-2, -12, -15, -18 и -21 обычно активируются для увеличения клеточной цитотоксичности NK-клеток (40,41). В этом исследовании уровень IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-12 (P40) значительно снижался при лечении аллофероном-1, что позволяет предположить, что аллоферон-1 ингибирует опосредованную NK-клетками острую воспалительную реакцию. Было продемонстрировано, что аллоферон-1 предотвращает инфильтрацию воспалительных клеток за счет подавления IL-5 и IL-17 и снижает IgG1 и IgE за счет ингибирования вспомогательного иммунного ответа Т-хелперов 2 типа (7). IL-5 индуцирует хемотаксис и активацию интегрина CD11b на молекулярном уровне во время воспаления и продлевает выживание эозинофилов путем ингибирования апоптоза (42). В этом исследовании было обнаружено, что ИЛ-5 снижается под действием аллоферона-1, что подтверждает предыдущие выводы о воспалении, вызванном λ-каррагинаном.

Сообщалось, что аллоферон-1 играет положительную роль в лечении воспаления кожи, вызванного УФ-В, и астмы, вызванной овальбумином (6, 43).

Нанесение аллоферона-1 на кожу безволосых мышей, подвергшихся воздействию УФ-В, показало, что значительно снизилось увеличение толщины эпителия кожи у мышей, подвергшихся хроническому облучению УФ-В (8).

Провоспалительные цитокины, включая IL-1α, IL-1β, IL-6 и IL-18, индуцированные УФ-В, снижались под действием аллоферона-18.

Недавно сообщалось, что аллоферон-1 может улучшать модель колита у мышей, индуцированного декстрансульфатом натрия (DSS) (9). По сравнению с контрольными группами симптомы отека, эпителиальной эрозии и инфильтрации иммунных клеток в экспериментальной группе при лечении аллофероном-1 были облегчены, а уровень ИЛ-6 в плазме мышей снизился (7).

В этом исследовании экспрессия IL-1β, IL-9 и IL-10 также подавлялась аллофероном-1 при воспалительном ответе, индуцированном λ-каррагинаном. Кроме того, мы предоставили экспериментальные доказательства того, что экспрессия MIP-1α и MIP-1β, MCP-1 и GM-CSF снижалась под действием аллоферона-1 в модели, обработанной λ-каррагеном. MIP-1α, MIP-1β и MCP-1 являются индуцируемыми хемокинами в ответ на различные провоспалительные стимулы и проявляют различные активности, включая хемотаксис лейкоцитов (44). Было установлено, что GM-CSF способствует опосредованному MCP-1 воспалению (45). Мы впервые продемонстрировали, что аллоферон-1 подавляет MIP-1α, MCP-1, GM-CSF в иммунном ответе, что дает некоторое представление о противовоспалительных механизмах аллоферона-1.

Аспирин оказывает противовоспалительное действие главным образом за счет нарушения биосинтеза циклических простагландинов (таких как тромбоксан А2, простациклин и др.) (46). Ингибирование простагландина приводит к изменению нормальной защитной функции простагландина, что приводит к потенциально серьезным побочным эффектам, таким как язва желудка, почечная недостаточность, нарушение функции тромбоцитов и геморрагические осложнения (47).

Кортикостероиды считаются предпочтительными терапевтическими препаратами для лечения астмы, однако они вызывают множество побочных эффектов, включая угнетение гипоталамо-гипофизарной оси, остеопороз и оппортунистические инфекции (48).

Первоначально выделенный из бактериальной гемолимфы5, аллоферон-1 не считается цитотоксическим, иммуногенным, мутагенным или канцерогенным, эмбриотоксичным или токсичным для репродуктивной системы, что означает, что он действительно имеет особый приоритет перед другими химическими веществами (17).

**Получено: 17 декабря 2021 г.; Принято: 16 сентября 2022 г.**

**Опубликовано онлайн 06 октября 2022 года.**

**Использованная литература.**

1. Choi, J. H., Cha, D. S. & Jeon, H. Anti-inflammatory and anti-nociceptive properties of *Prunus padus*. *J. Ethnopharmacol.* **144**,

379–386. https:// doi. org/ 10. 1016/j. jep. 2012. 09. 023 (2012).

2. Huang, G. J. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory properties of longan (*Dimocarpus longan* Lour*.*) pericarp. *Evid. Based*

*Complement Altern. Med.* **2012**, 709483. https:// doi. org/ 10. 1155/ 2012/ 709483 (2012).

3. Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature* **420**, 846–852. https:// doi. org/ 10. 1038/ natur e01320 (2002).

4. Smolen, J. S. & Steiner, G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 473–488. https:// doi. org/ 10.

1038/ nrd11 09 (2003).

5. Chernysh, S. *et al.* Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12628–12632 (2002).

6. Chernysh, S. *et al.* Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12628–12632. https:// doi. org/

10. 1073/ pnas. 19230 1899 (2002).

7. Jeon, J., Kim, Y., Kim, H., Kang, J. S. & Lee, W. J. Anti-inflammatory effect of alloferon on ovalbumin-induced asthma. *Immune*

*Netw.* **15**, 304–312. https:// doi. org/ 10. 4110/ in. 2015. 15.6. 304 (2015).

8. Kim, Y. *et al.* The anti-inflammatory effect of alloferon on UVB-induced skin inflammation through the down-regulation of proinflammatory

cytokines. *Immunol. Lett.* **149**, 110–118. https:// doi. org/ 10. 1016/j. imlet. 2012. 09. 005 (2013).

9. Kim, H., Im, J. P., Kim, J. S., Kang, J. S. & Lee, W. J. Alloferon alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis. *Immune Netw.* **15**,

135–141. https:// doi. org/ 10. 4110/ in. 2015. 15.3. 135 (2015).

10. Oliveira, F. A. *et al.* Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. *Pharmacol.*

*Res.* **49**, 105–111 (2004).

11. Kaneko, M. *et al.* Rapid decalcification using microwaves for in situ hybridization in skeletal tissues. *Biotech. Histochem.* **74**, 49–54

(1999).

12. Zhou, L. *et al.* Sexual dimorphism in *Odontobutis sinensis* brain-pituitary-gonad axis and liver highlighted by histological and

transcriptomic approach. *Gene* **819**, 146264 (2022).

13. Pan, Z. Y. & Wang, H. Synergistic interaction between choline and aspirin against acute inflammation induced by carrageenan

and lipopolysaccharide. *Int. Immunopharmacol.* **20**, 229–237. https:// doi. org/ 10. 1016/j. intimp. 2014. 03. 004 (2014).

14. Majewska, A., Lasek, W., Kuczer, M. & Młynarczyk, G. Inhibitory effect of alloferons in combination with human lymphocytes on

human herpesvirus 1 (HHV-1) replication in vitro. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **22**, 255–261 (2016).

15. Lee, N. E. *et al.* Federation of American societies for experimental biology. (2008).

16. Ryu, M. J. *et al.* Activation of NF-kappaB by alloferon through down-regulation of antioxidant proteins and IkappaBalpha. *Mol.*

*Cell. Biochem.* **313**, 91–102. https:// doi. org/ 10. 1007/ s11010- 008- 9746-0 (2008).

17. Czarniewska, E., Urbański, A., Chowański, S. & Kuczer, M. The long-term immunological effects of alloferon and its analogues in

the mealworm tenebrio molitor. *Insect Sci.* **25**, 429–438 (2016).

18. Bucci, M. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase activation is critical for vascular leakage during acute inflammation in vivo. *Proc.*

*Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 904–908. https:// doi. org/ 10. 1073/ pnas. 04089 06102 (2005).

19. Nantel, F. *et al.* Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **128**,

853–859. https:// doi. org/ 10. 1038/ sj. bjp. 07028 66 (1999).

20. Di Rosa, M., Giroud, J. P. & Willoughby, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in

different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* **104**, 15–29. https:// doi. org/ 10. 1002/ path. 17110 40103 (1971).

21. Morris, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol. Biol.* **225**, 115–121. https:// doi. org/ 10. 1385/1-

59259- 374-7: 115 (2003).

22. Kim, K. H. *et al.* Low-intensity ultrasound attenuates paw edema formation and decreases vascular permeability induced by carrageenan

injection in rats. *J. Inflamm. (Lond.)* **17**, 7. https:// doi. org/ 10. 1186/ s12950- 020- 0235-x (2020).

23. Gupta, A. K. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory properties of gelsolin in acetic acid induced writhing, tail immersion and

carrageenan induced paw edema in mice. *PLoS ONE* **10**, e0135558. https:// doi. org/ 10. 1371/ journ al. pone. 01355 58 (2015).

24. Radu, M. & Chernoff, J. An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J. Vis. Exp.* https:// doi. org/ 10. 3791/ 50062 (2013).

25. Mahmoodi, M., Hadad, M. K., Shamsizadeh, A., Azarang, A. & Rayeni, R. A. Effect of trifluoperazine on carrageenan-induced

acute inflammation in intact and adrenalectomized rats. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* **1**, 150–153 (2009).

26. Han, E. D., MacFarlane, R. C., Mulligan, A. N., Scafidi, J. & Davis, A. E. 3rd. Increased vascular permeability in C1 inhibitordeficient

mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J. Clin. Invest.* **109**, 1057–1063. https:// doi. org/ 10. 1172/ JCI14 211 (2002).

27. Emanueli, C. *et al.* Acute ACE inhibition causes plasma extravasation in mice that is mediated by bradykinin and substance P.

*Hypertension* **31**, 1299–1304. https:// doi. org/ 10. 1161/ 01. hyp. 31.6. 1299 (1998).

28. Cui, L. *et al.* Evidence of anti-inflammatory activity of Schizandrin A in animal models of acute inflammation. *Naunyn-Schmiedebergs*

*Arch Pharmacol.* **393**, 2221–2229. https:// doi. org/ 10. 1007/ s00210- 020- 01837-x (2020).

29. Sebia-Amrane, F. & Laraba-Djebari, F. Pharmaco-modulations of induced edema and vascular permeability changes by Vipera

lebetina venom: inflammatory mechanisms. *Inflammation* **36**, 434–443. https:// doi. org/ 10. 1007/ s10753- 012- 9563-1 (2013).

30. Lin, Q. *et al.* IFN-γ-dependent NK cell activation is essential to metastasis suppression by engineered Salmonella. *Nat. Commun.*

**12**, 1–15 (2021).

31. Kowalik-Jankowska, T., Jezierska, J. & Kuczer, M. Mono- and polynuclear copper(ii) complexes with fragment of alloferons 1 and

2; combined potentiometric and spectroscopic studies. *Dalton Trans.* **39**, 4117. https:// doi. org/ 10. 1039/ b9234 91h (2010).

32. Kuczer, M., Majewska, A. & Zahorska, R. New alloferon analogues: Synthesis and antiviral properties. *Chem. Biol. Drug Des.* **81**,

302–309. https:// doi. org/ 10. 1111/ cbdd. 12020 (2013).

33. Kuczer, M. *et al.* Studies of insect peptides alloferon, Any-GS and their analogues. Synthesis and antiherpes activity. *J. Pept. Sci.*

https:// doi. org/ 10. 1002/ psc. 1219 (2010).

34. Huang, Y. *et al.* Enzyme responsiveness enhances the specificity and effectiveness of nanoparticles for the treatment of B16F10

melanoma. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **316**, 208–222. https:// doi. org/ 10. 1016/j. jconr el. 2019. 10. 052 (2019).

35. Ma, F. *et al.* The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting

interferon-γ. *Nat. Immunol.* **12**, 861–869. https:// doi. org/ 10. 1038/ ni. 2073 (2011).

36. Selmaj, K. W. & Raine, C. S. Experimental autoimmune encephalomyelitis: immunotherapy with anti-tumor necrosis factor

antibodies and soluble tumor necrosis factor receptors. *Neurology* **45**, S44–S49 (1995).

37. Bae, S. *et al.* The effect of alloferon on the enhancement of NK cell cytotoxicity against cancer via the up-regulation of perforin/

granzyme B secretion. *Immunobiology* **218**, 1026–1033. https:// doi. org/ 10. 1016/j. imbio. 2012. 12. 002 (2013).

38. Rykaczewska-Czerwińska, M. *et al.* Effect of alloferon 1 on plasma levels of VEGF, IL-2, TNF-alpha and IFN-gamma in rats.

*Pharmacol. Rep.* **63**, 587–588 (2011).

39. Ryu, M.-J. *et al.* Activation of NF-κB by alloferon through down-regulation of antioxidant proteins and IκBα. *Mol. Cell. Biochem.*

**313**, 91–102 (2008).

40. Fehniger, T. A. *et al.* Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or

IL-15 in combination with IL-12: Implications for the innate immune response. *J. Immunol.* **162**, 4511–4520 (1999).

41. Lauwerys, B., Van Snick, J. & Houssiau, F. Serum IL-12 in systemic lupus erythematosus: Absence of p70 heterodimers but presence

of p40 monomers correlating with disease activity. *Lupus* **11**, 384–387 (2002).

42. Dougan, M., Dranoff, G. & Dougan, S. K. GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of cytokines: Regulators of inflammation. *Immunity* **50**,

796–811. https:// doi. org/ 10. 1016/j. immuni. 2019. 03. 022 (2019).

43. Moncada, S., Palmer, R. M. & Higgs, E. A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**,

109–142 (1991).

44. Ren, M. *et al.* Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *EMBO*

*J.* **29**, 3952–3966 (2010).

45. Tamayo, E. *et al.* Pro-and anti-inflammatory responses are regulated simultaneously from the first moments of septic shock. *Eur.*

*Cytokine Netw.* **22**, 82–87 (2011).

46. Smith, W. L. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **263**, F181–F191 (1992).

47. Awtry, E. H. & Loscalzo, J. Aspirin. *Circulation* **101**, 1206–1218 (2000).

48. Belvisi, M. G., Brown, T. J., Wicks, S. & Foster, M. L. New glucocorticosteroids with an improved therapeutic ratio?. *Pulm. Pharmacol.*

*Ther.* **14**, 221–227 (2001).

**Благодарности.**

Работа выполнена при поддержке грантов Национального фонда естественных наук Китая (№ 31701279) и Муниципальное научно-техническое бюро Сямыня-Городской отдел проекта управления финансированием Сямыня (№ 3502Z20203016).

**Вклад авторов.**

Ю.З., К.Т. задумал и спроектировал эксперименты; X.Z., S.Q. и Ю.З. выполнил все эксперименты; Х.З., Ю.З. и К.Т. проанализированные данные; Х.З., В.Р. и Ю.З. написал и рецензировал рукопись.

**Конкурирующие интересы.**

Авторы заявляют об отсутствии конкурирующих интересов.

**Дополнительная информация.**

Дополнительная информация Онлайн-версия содержит дополнительные материалы, доступные по адресу https://doi. орг/10. 1038/с41598-022-20648-з

Корреспонденцию и запросы о материалах следует направлять Ю.З. или С.-М.Т.

Информация о переизданиях и разрешениях доступна на сайте [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

Примечание издателя Springer Nature сохраняет нейтралитет в отношении юрисдикционных претензий в опубликованных картах и институциональной принадлежности.

**Открытый доступ** Эта статья находится под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 International License, которая разрешает использование, совместное использование, адаптацию, распространение и воспроизведение на любом носителе или в любом формате при условии, что вы укажете первоначальных авторов и источник, предоставить ссылку на лицензию Creative Commons и указать, были ли внесены изменения. Изображения или другие сторонние материалы в этой статье включены в лицензию Creative Commons на статью, если иное не указано в кредитной строке материала. Если материал не включен в лицензию Creative Commons статьи, а ваше предполагаемое использование не разрешено законом или выходит за рамки разрешенного использования, вам необходимо получить разрешение непосредственно от правообладателя. Чтобы просмотреть копию этой лицензии, посетите http://creativecommons. org/licenses/by/4. 0/.