

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Намаканова Ольга Александровна

**Роль TNF и IL-6 в патогенезе аллергического воспаления и
фиброзе легких у мышей**

Специальность 3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена в лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук.

Научные руководители **Друцкая Марина Сергеевна**
доктор биологических наук, профессор РАН

Губернаторова Екатерина Олеговна
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты **Ефименко Анастасия Юрьевна**
доктор медицинских наук, доцент, профессор РАН,
заведующий лабораторией репарации и регенерации
тканей Центра регенеративной медицины
Медицинского научно-образовательного института
МГУ имени М.В. Ломоносова

Линге Ирина Андреевна
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник,
заведующий лабораторией иммуногенетики
Центрального научно-исследовательского института
туберкулеза

Тухватулин Амир Ильдарович
кандидат биологических наук, заведующий лабораторией
микоплазм и Л-форм бактерий Национального
исследовательского центра эпидемиологии и
микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится 29 мая 2026 г. в 16 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.1 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3927>

Автореферат разослан « » апреля 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Д.Б. Киселевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Астма - хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, которое может быть вызвано воздействием аллергенов, респираторными инфекциями и бытовыми детергентами и усугубляться наследственной предрасположенностью, ожирением и курением. Бронхиальная астма относится к наиболее распространенным хроническим заболеваниям, в основе которых лежат процессы ремоделирования и гиперреактивности дыхательных путей. Для пациентов с астмой характерна высокая степень гетерогенности, обусловленная различиями в молекулярных механизмах патогенеза, профиле ключевых цитокинов, тяжести течения и эффективности терапии. Ключевым аспектом патологии у людей, страдающих астмой, является фиброз и ремоделирование легких, развивающиеся на фоне хронического воспаления и сопровождающиеся тяжелым течением заболевания и резистентностью к терапии. Понимание клеточно-молекулярных механизмов астмы необходимо для установления ключевых этапов патогенеза и совершенствования терапевтических подходов. Большинство пациентов чувствительны к классическим методам лечения кортикостероидами и бронходилататорами, тогда как нейтрофильная форма астмы трудно поддается стандартной терапии, что определяет актуальность разработки новых терапевтических стратегий.

Фармакологическая блокировка определенных цитокинов и их рецепторов показала эффективность при лечении хронических воспалительных заболеваний, таких как колит и ревматоидный артрит. При астме сеть цитокиновых взаимодействий играет ключевую роль в поддержании воспаления в дыхательных путях. Применение моноклональных антител к IL-4, IL-5 и IL-13, при тяжелой форме заболевания эффективно преимущественно при тяжелой эозинофильной астме, но не в отношении нейтрофильного воспаления. В связи с этим возникла потребность в поиске потенциальных

мишеней для контроля тяжелой формы астмы с нейтрофильным инфильтратом.

TNF (фактор некроза опухоли) и интерлейкин-6 (IL-6) выступают ключевыми медиаторами воспаления при астме. TNF представляет собой важный биомаркер при тяжелой астме, а полиморфизмы гена TNF связаны с повышенным риском развития этого заболевания. Несмотря на некоторые положительные эффекты анти-TNF терапии, нейтрализация только TNF оказалась недостаточной для полного контроля заболевания и приводила к ряду побочных эффектов. С другой стороны, показан существенный вклад IL-6 в воспаление легких. При этом эффективность блокировки IL-6 при тяжелой кортикостероид-резистентной астме оставалась неизученной, как и комбинированная антицитокиновая терапия с возможностью одновременной нейтрализацией TNF и IL-6. Такой подход к лечению тяжелой нейтрофильной астмы обусловлен возможностью нивелировать нежелательные эффекты, вызванные блокировкой цитокинов по отдельности.

Цель настоящей работы заключалась в изучении вклада TNF и IL-6 в развитие HDM-индуцированной астмы и LPS-опосредованного фиброза легких у мышей *in vivo*.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить эффекты от комбинированной фармакологической блокировки TNF и IL-6 на формирование Th2-ассоциированной эозинофилии и Th1-/Th17-опосредованной нейтрофилии легких в мышинной модели острой HDM-индуцированной астмы.
2. Установить последствия совместной нейтрализации TNF и IL-6 в ремоделировании легочной ткани в мышинной модели тяжелой HDM-индуцированной астмы.
3. Оптимизировать и охарактеризовать модель фиброза легких, индуцированного у мышей путем однократного ингаляционного введения LPS.

4. Определить функциональный вклад IL-6 и TNF по отдельности в механику дыхания у мышей на фоне LPS-индуцированного фиброза.
5. Установить последствия патологически высокой системной сверхпродукции IL-6 на легкие у трансгенных мышей.

Научная новизна работы

В настоящей работе впервые получены результаты, свидетельствующие об эффективности комбинированной фармакологической блокировки TNF и IL-6 как комплексного подхода в подавлении эозинофильного и нейтрофильного воспаления в модели острой аллергической астмы, индуцированной HDM (house dust mite – домашний пылевой клещ). Впервые установлено, что комбинированная блокировка TNF и IL-6 эффективна в снижении как Th2-, так и Th1-/Th17-опосредованных (Th – Т-хелпер) ответов при астме. Было подтверждено, что ингибирование TNF способствует экспансии Th17-клеток в легких. Впервые было показано, что совместное подавление TNF и IL-6 при тяжелой астме может обеспечить преимущество в подавлении ремоделировании легких по сравнению с ингибированием этих цитокинов по отдельности. Для валидации результатов использовали генетически модифицированных мышей с удалением IL-6 и TNF, в результате чего был установлен вклад каждого цитокина в развитие фиброза легких. Оказалось, в контексте фиброза легких, индуцированного LPS (липополисахарид), TNF опосредует реакции острой фазы воспаления, влияя на инфильтрацию клеток и повреждение ткани, тогда как роль IL-6 более характерна для поздней фибропролиферативной стадии заболевания. С использованием мышей со сверхэкспрессией IL-6 человека в CD4⁺ клетках экспериментально продемонстрировано, что избыточная продукция IL-6 является ключевым фактором необратимого ремоделирования легких и сопутствующего ухудшения функционального состояния дыхательной системы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Представленные результаты имеют важное значение как для фундаментальной науки, так и для клинических исследований. Идея комбинированной антицитокиновой терапии представляет собой многообещающую стратегию лечения пациентов с тяжелой формой астмы, устойчивых к стандартным методам терапии. Использование релевантной мышинной модели аллергической астмы, индуцированной наиболее распространенным аллергеном экстрактом домашнего пылевого клеща (HDM – house dust mite) позволило продемонстрировать комплексный эффект комбинированной блокировки TNF и IL-6, проявляющийся как в снижении Th2-ассоциированной эозинофилии, так и Th1-/Th17-опосредованной нейтрофилии. Данные, полученные в модели LPS-индуцированного фиброза и в условиях хронической сверхэкспрессии IL-6, указывают на ключевую роль IL-6 в поддержании персистирующего воспаления и ремоделирования легочной ткани, сопровождающегося прогрессирующим ухудшением функций дыхательной системы. Полученные результаты обосновывают целесообразность комплексного таргетирования TNF/IL-6 и свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки комбинированной стратегии антицитокиновой терапии для полного контроля тяжелых форм хронических заболеваний легких и предотвращения их долгосрочных осложнений.

Объектом исследования были мыши обоих полов в возрасте 6-9 недель дикого типа линий BALB/c и C57BL/6, мыши с полным удалением генов, кодирующих IL-6 и TNF, а также со сверхэкспрессией IL-6 человека (hIL-6) в CD4⁺ клетках, полученные на генетической основе C57BL/6.

Методология и предмет исследования

Для изучения последствий системной фармакологической блокировки TNF и IL-6 *in vivo* были использованы мыши линии BALB/c на фоне HDM-индуцированной астмы. Для системной фармакологической блокировки IL-6 и TNF использовали моноклональные антитела к IL-6 (MP5-20F3) и TNF (XT3.11), а также клинически применяемый TNF-блокатор – этанерцепт,

который активен и в мышцах. Для определения вклада TNF и IL-6 в ремоделирование легких, вызванного воспалением, были использованы мыши с полным удалением IL-6 и TNF на фоне LPS-индуцированного фиброза легких, а также мышей со сверхпродукцией hIL-6 в CD4⁺ клетках. Оценка характера иммунного ответа была проведена с помощью проточной цитофлуориметрии клеток, гистологического анализа тканей, мультипараметрического флуоресцентного и иммуноферментного анализов продукции цитокинов. Исследование функциональных нарушений дыхательной системы было проведено с помощью системы FlexiVent SCIREQ с использованием техники вынужденных колебаний.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Комбинированная фармакологическая блокировка TNF и IL-6 снижает Th2- и Th1-/Th17-опосредованные клеточные ответы, в том числе подавляет эозинофильное и нейтрофильное воспаление в легких у мышей в экспериментальной модели HDM-индуцированной острой аллергической астмы.
2. Комбинированная фармакологическая блокировка TNF и IL-6 способствует подавлению ремоделирования дыхательных путей по сравнению с монотерапией блокаторами IL-6 или TNF на фоне HDM-индуцированной тяжелой астмы.
3. В экспериментальной модели LPS-индуцированного фиброза легких TNF преимущественно выступает медиатором острой фазы воспаления, тогда как вклад IL-6 важен на фибропролиферативной стадии заболевания.
4. В модели избыточной продукции IL-6 играет ключевую роль в прогрессирующих нарушениях функционального состояния дыхательной системы.

Достоверность результатов

Результаты работы были воспроизведены в двух и более независимо поставленных экспериментах. Манипуляции с лабораторными животными, экспериментальные методы и статистический анализ соответствовали

общепризнанным международным стандартам.

Апробация результатов

Результаты диссертационной работы были представлены на международных и отечественных конференциях: Конференция молодых ученых Института молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, 21-24 октября 2025, Москва; IV Международная научная конференция "Future of Biomedicine 2025", Владивосток, 16-22 сентября, 2025; Научная школа-конференция «Молекулярные механизмы иммунитета и других физиологических процессов», Сириус, 13-15 декабря, 2024; IV Балтийский симпозиум по иммунологии, молекулярной и регенеративной медицине: «Механизмы воспаления и регенерации в норме и при патологии» с международным участием, Калининград, 14-16 мая, 2024; Конференция молодых ученых Института молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, 19-20 сентября 2023, Москва; Международная научная конференция «Молекулярные медиаторы иммунитета и других физиологических процессов», Сириус, 25-27 ноября, 2022; 6th European Congress of Immunology (ECI), online, 1-4 сентября, 2021; II Всемирный конгресс по астме, аллергии и ХОБЛ, Санкт-Петербург, 29 июня-2 июля, 2019. По теме диссертационной работы опубликованы 5 статей, все – в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

Личный вклад автора

Результаты работы получены лично автором или при его участии. Вклад автора состоял в планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе результатов, подготовке публикаций и текста диссертации.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 266 источников. Работа изложена на 105 страницах, содержит 25 рисунков и 5 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Настоящая работа посвящена определению вклада провоспалительных цитокинов, TNF и IL-6, в развитие HDM-индуцированной астмы и LPS-зависимого фиброза легких у мышей. На первом этапе работы была оценена перспективность применения комбинированной антицитокиновой терапии, направленной на одновременную блокировку TNF и IL-6, в контексте мышинной модели аллергической астмы, индуцированной HDM. Такой подход является более перспективным для терапии тяжелой, резистентной к стандартным методам лечения астмы, для которой характерно наличие смешанного типа воспаления. Второй этап работы был посвящен углублению существующего представления о роли TNF и IL-6 в поддержании воспаления и ремоделирования легких. В качестве экспериментальной модели, в контексте которой можно изучить вклад TNF и IL-6 в развитие ремоделирования и прогрессирующего нарушения функционального состояния дыхательной системы, были выбраны модели LPS-индуцированного фиброза легких и избыточной продукции IL-6.

1. Комбинированная блокировка TNF и IL-6 эффективно подавляет Th2-индуцированную эозинофилию и Th1-/Th17-опосредованное нейтрофильное воспаление дыхательных путей при HDM-индуцированной астме

Астма преимущественно с эозинофилией дыхательных путей и практически с полным отсутствием нейтрофилов эффективно поддается лечению с помощью кортикостероидов. Напротив, тяжелая неконтролируемая форма астмы, сопровождающаяся повышенной нейтрофилией или смешанной гранулацитарной инфильтрацией, характеризуется рефрактерностью к стандартным методам лечения. Антицитокиновая терапия представляет особый интерес как подход, направленный на преодоление патогенных эффектов провоспалительных цитокинов. В настоящей работе была выдвинута гипотеза об эффективности комбинированной фармакологической блокировки TNF и IL-6 в контексте аллергической астмы, индуцированной HDM. Мышам линии

BALB/c ежедневно интраназально вводили 20 мкг HDM в течение шести дней с сенсibilизирующим интраназальным введением 5 мкг HDM за неделю до основного курса. Для изучения последствий системной нейтрализации TNF и IL-6 было проведено внутрив брюшинное введение моноклонального антитела к IL-6 (MP5-20F3) в дозировке 5 мкг/г веса мыши, а также клинически применяемого TNF-блокатора этанерцепта из расчета 10 мкг/г веса мыши каждые 48 ч в течение 13 дней. Комбинированная блокировка TNF и IL-6 приводила к значительному снижению инфильтрации гранулоцитов в бронхоальвеолярной жидкости (БАЛ) (Рисунок 1).

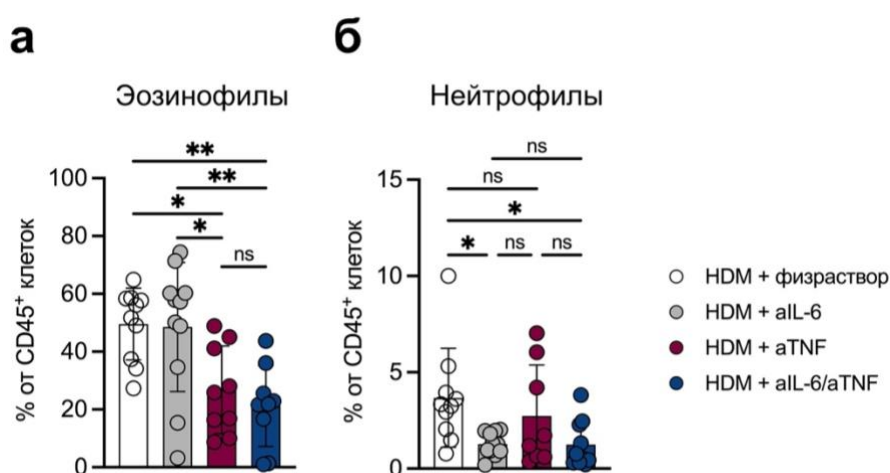


Рисунок 1. Комбинированная блокировка TNF и IL-6 у мышей с острой HDM-индуцированной астмой приводит к снижению содержания гранулоцитов в БАЛ Доля **(а)** эозинофилов (SiglecF⁺CD11c⁻) и **(б)** нейтрофилов (Ly6G⁺CD11b⁺) от CD45⁺VD⁻ клеток в БАЛ через 48 часов после последнего введения HDM. Результаты представлены как среднее значение ±SD (n=5-9) и подтверждены в трех независимых экспериментах. 1-way ANOVA. *P < 0,05; **P < 0,01; ns, non-significant (недостовверная разница).

Примечательно, что у мышей, получавших антитела к IL-6, было снижено содержание нейтрофилов, но не эозинофилов, тогда как блокировка TNF преимущественно подавляла накопление эозинофилов (Рисунок 1). В группе мышей на фоне комбинированной блокировки цитокинов происходило снижение как числа эозинофилов, так и числа нейтрофилов в БАЛ (Рисунок 1). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о более высокой эффективности комбинированной блокировки TNF и IL-6 при HDM-индуцированной астме за счет подавления как эозинофилии, так и нейтрофилии в дыхательных путях.

Преобладающий тип Т-клеточного ответа играет центральную роль в определении оптимальной стратегии для лечения астмы. Так, активация Th2-клеток характерна для развития легкой формы астмы, в то время как тяжелая астма связана с преобладанием Th17- и Th1-клеток. Введение антител к IL-6 мышам с HDM-индуцированной астмой способствовало уменьшению Th1-клеток и Th2-клеток в легких (Рисунок 2а, б).

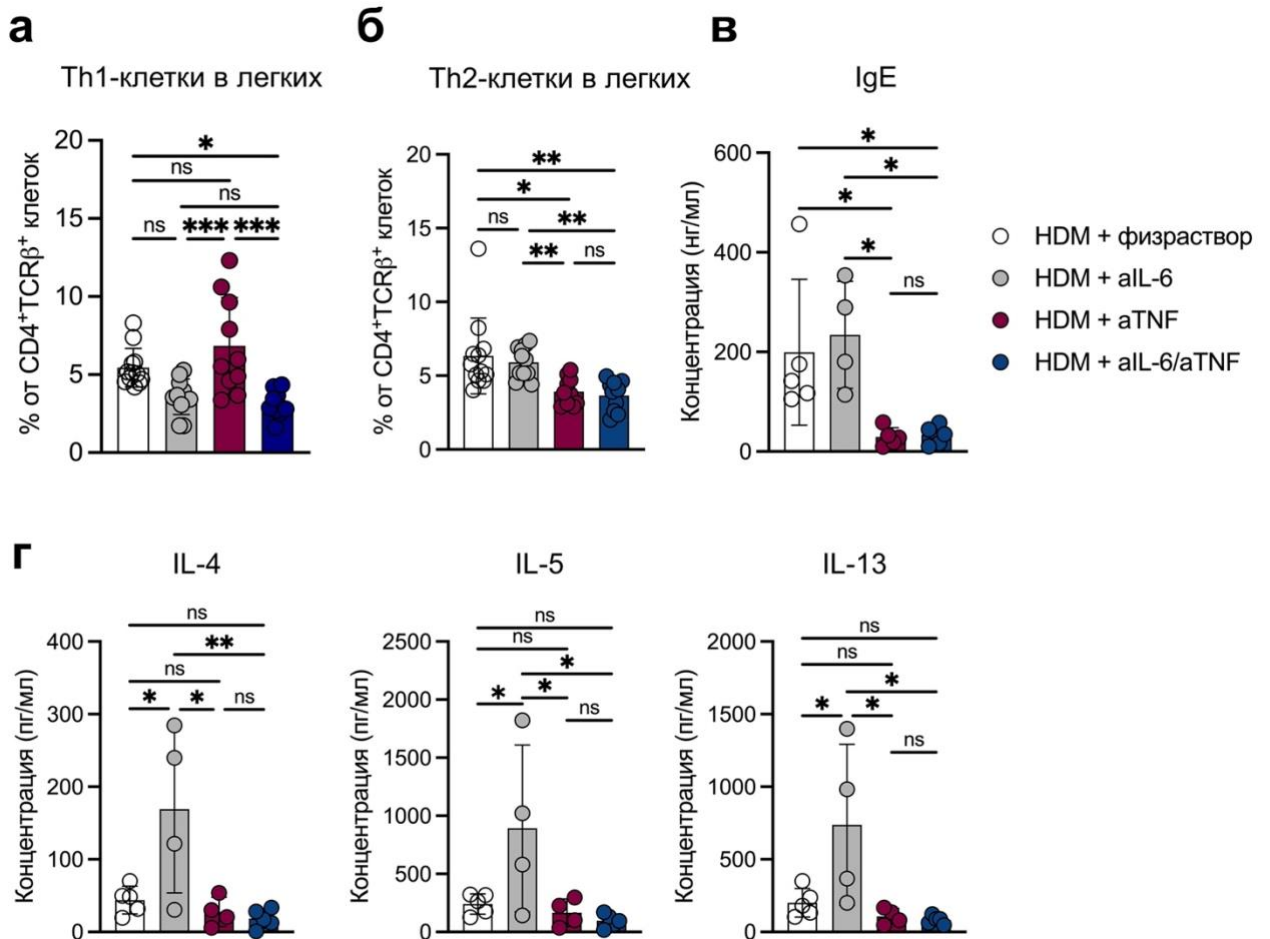


Рисунок 2. Комбинированная блокировка TNF и IL-6 предотвращает накопление Th1-клеток в легких и способствует уменьшению Th2-опосредованного клеточного ответа при HDM-индуцированной астме

Доля **(а)** Th1-клеток (TNF⁺IFNγ⁺) и **(б)** Th2-клеток (IL-13⁺) от TCRβ⁺CD4⁺VD⁻ клеток в легких через 48 часов после последнего введения HDM. Концентрации **(в)** IgE (нг/мл) и **(г)** IL-4, IL-5 и IL-13 (пг/мл) в БАЛ. Результаты представлены как среднее значение ±SD (n=4-11) и подтверждены в трех независимых экспериментах. 1-way ANOVA. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ns, non-significant (недостовверная разница).

Кроме того, ингибирование IL-6 при воспалении дыхательных путей было связано с локальным увеличением продукции IL-4, IL-5 и IL-13, которые играют решающую роль в Th2-опосредованном эозинофильном воспалении (Рисунок 2г). На фоне блокировки TNF, напротив, происходило подавление

Th2-клеток (Рисунок 2б) в легких, что согласуется со снижением эозинофилии (Рисунок 1а). Известно, что IgE является важнейшим клиническим биомаркером аллергических реакций, в частности, Th2-опосредованной атопии. Было установлено, что у мышей на фоне комбинированной фармакологической блокировки наблюдается резкое снижение продукции IgE в БАЛ (Рисунок 2в). В отличие от блокировки только IL-6, нейтрализация TNF приводила к такому же эффекту (Рисунок 2в), что указывает на эксклюзивный эффект блокировки TNF на снижение IgE. Полученные данные позволяют утверждать, что комбинированная блокировка TNF и IL-6 более эффективно снижает интенсивность воспалительного ответа в легких по сравнению с ингибированием цитокинов по отдельности у мышей с острой HDM-индуцированной астмой.

Известно, что тяжелая форма нейтрофильной астмы связана с активацией не только Th1-, но и Th17-опосредованного ответа. Как ожидалось, комбинированная блокировка TNF и IL-6 значительно снижала содержание Th17-клеток в легких по сравнению с контрольной группой (Рисунок 3а, б). Интересно, что субпопуляция Th17-клеток резко увеличивалась у группы мышей с ингибированием TNF (Рисунок 3а, б). При этом в ответ на введение антител к IL-6 наблюдалось значительное снижение Th17-клеток в легких (Рисунок 3а, б), что коррелировало со снижением количества нейтрофилов в БАЛ на фоне блокировки IL-6 (Рисунок 1б). В целом, полученные данные указывают на то, что введение анти-IL-6 антител, в первую очередь, приводит к подавлению Th17-клеточного ответа, в то время как нейтрализация TNF, по-видимому, способствует накоплению Th17-клеток в дыхательных путях. При этом комбинированная блокировка TNF и IL-6 предотвращала активацию патогенетического *Il17a* (Рисунок 3в), играющего, как известно, важную роль в формировании нейтрофильного воспаления при астме. Таким образом, полученные результаты демонстрируют преимущество комбинированной фармакологической блокировки IL-6 и TNF в подавлении Th17-опосредованного воспаления при острой аллергической астме.

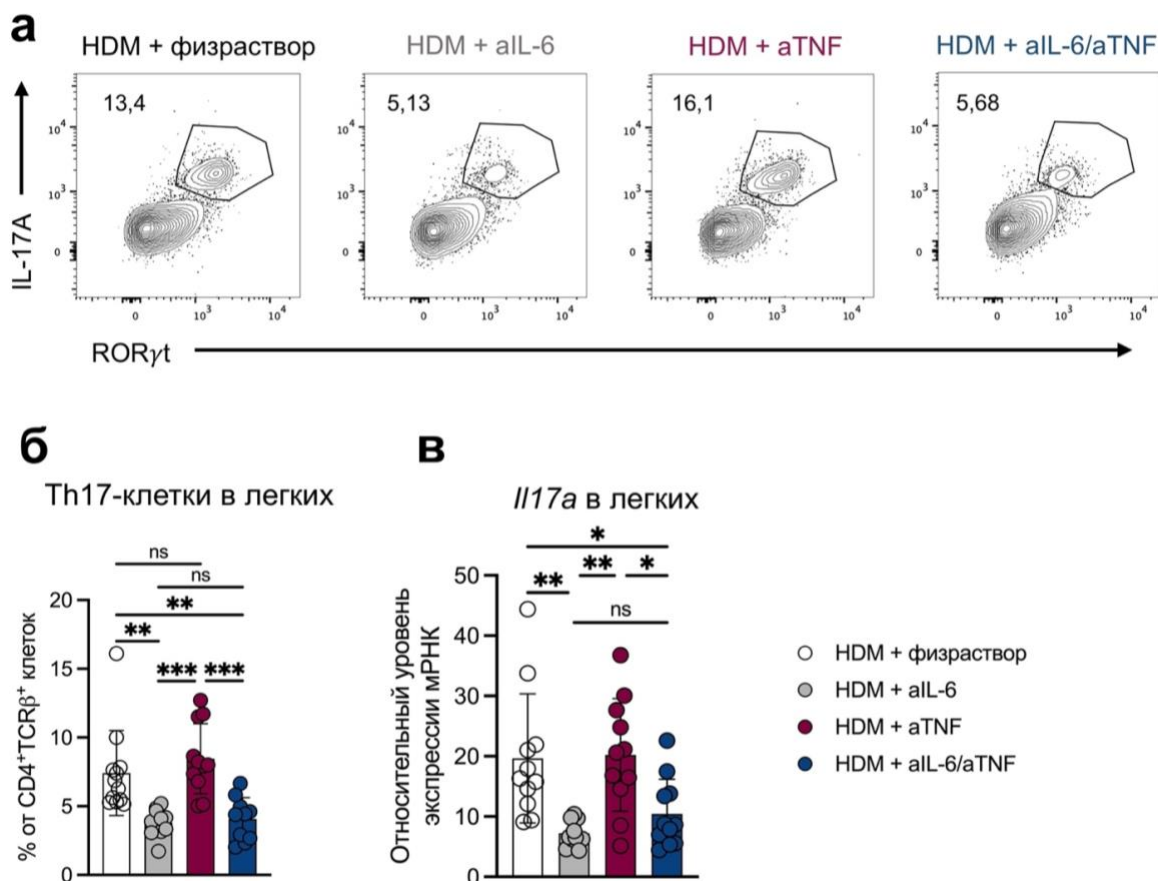


Рисунок 3. Комбинированная блокировка TNF и IL-6 предотвращает накопление Th17-клеток, вызванное ингибированием TNF

(а) Распределение субпопуляции Th17-клеток ($IL-17A^+ROR\gamma^+$) от $TCR\beta^+CD4^+VD^-$ клеток в легких у мышей с нейтрализацией цитокинов на фоне острой аллергической астмы. (б) Доля Th17-клеток ($IL-17A^+ROR\gamma^+$) от $TCR\beta^+CD4^+VD^-$ клеток в легких. (в) Уровень экспрессии гена *Il17a* относительно *Actb* в тканях легких через 48 часов после последнего введения HDM. Результаты представлены как среднее значение \pm SD (n=7-11) и подтверждены в трех независимых экспериментах. 1-way ANOVA. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns, non-significant (недостоверная разница).

2. Комбинированная блокировка TNF и IL-6 предотвращает ремоделирование легочной ткани в экспериментальной модели тяжелой астмы

Важным клиническим признаком развития гиперреактивности легких является ремоделирование дыхательных путей, которое связано с длительными изменениями структуры ткани, вносящими существенный вклад в снижение функции легких. Для исследования эффектов комбинированной блокировки цитокинов в ремоделировании дыхательных путей были использованы более высокие дозы HDM для развития более выраженного

воспалительного ответа и ремоделирования легких. Мышам линии BALB/c внутритрахеально ввели 100 мкг экстракта HDM на 0 и 4 дни сенсибилизации. Кроме того, мышам ежедневно проводили внутритрахеальное введение 100 мкг HDM на 14-17 сутки эксперимента. Введение блокаторов IL-6 (MP5-20F3) (5 мкг/г массы тела) и TNF (ХТ3.11) (10 мкг/г массы тела) или их смеси, а также физиологического раствора в качестве контроля производили внутривентриально перед иммунизацией каждые 48 часов в течение 18 дней. Гистологический анализ выявил, что у мышей с комбинированной фармакологической блокировкой TNF и IL-6 как инфильтрация воспалительных клеток, так и гиперплазия бокаловидных клеток в легких значительно уменьшались по сравнению с мышами с инактивацией одного из двух цитокинов (Рисунок 4а, б).

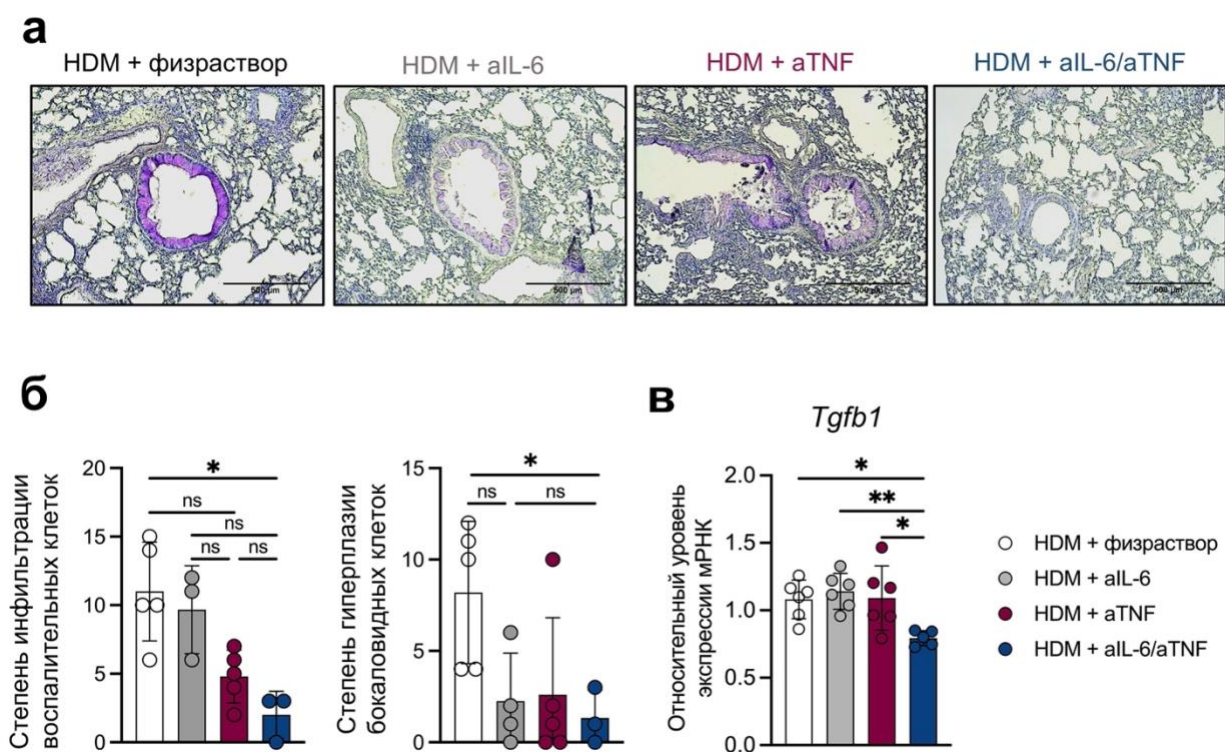


Рисунок 4. Комбинированная блокировка TNF и IL-6 предотвращает ремоделирование ткани легких у мышей при тяжелой HDM-индуцированной астме

(а) Репрезентативные фотографии гистологического окрашивания гематоксилином и PAS (реакция Шифф—йодной кислотой) срезов легких мышей через 48 часов после последнего введения аллергена. Области интенсивного фиолетового окрашивания демонстрируют толщину слоя муцинов и гликопротеинов в легочной ткани. Масштаб - 500 мкм. (б) Интенсивность инфильтрации воспалительных клеток и гиперплазии бокаловидных в легких. (в) Уровень экспрессии гена *Tgfb1* относительно *Actb* в легких мышей на фоне блокировки цитокинов при индукции тяжелой астмы. Результаты представлены как среднее значение \pm SD (n=3-6) и подтверждены в двух независимых экспериментах. 1-way ANOVA. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; ns, non-significant (недостовверная разница).

TGF- β (трансформирующий фактор роста бета) известен способностью индуцировать выработку коллагена в легочной ткани, что может приводить к фиброзу. Кроме того, пролиферация и трансдифференцировка фибробластов в миофибробласты зависят от TNF- и IL-6-индуцированной продукции TGF- β . Было установлено, что комбинированная блокировка TNF и IL-6 снижает экспрессию *Tgfb1*, чего не наблюдается у мышей с ингибированием этих цитокинов по отдельности (Рисунок 4в). Таким образом, именно комбинированная фармакологическая блокировка TNF и IL-6 в контексте тяжелой HDM-индуцированной астмы может обеспечить преимущество в подавлении ремоделирования легких по сравнению с ингибированием этих цитокинов по отдельности.

3. Однократное ингаляционное введение LPS приводит к появлению типичных признаков фиброза легких через 5 недель

Фиброз легких, являясь последствием длительного неразрешившегося воспаления, сопровождается тяжелым течением и резистентностью к терапии. Основное ограничение существующих экспериментальных моделей астмы при изучении патогенеза фиброза заключается в их остром и кратковременном характере, что препятствует воспроизведению ключевых аспектов хронического течения болезни у человека. В связи с этим актуален поиск мышинной модели для понимания механизмов, лежащих в основе перехода от острого воспалительного процесса к фибротическим изменениям легких. В настоящей работе была использована модель LPS-индуцированного воспаления легких. Мышей линии C57BL/6 подвергали однократному ингаляционному введению 10 мг LPS и наблюдали за животными в течение 5 недель, что позволило оценить как изменения, происходящие при острой фазе воспаления, так и долгосрочные последствия, присущие фибропролиферативной фазе с развитием хронического воспаления и фиброза. Так, через 5 недель после однократного воздействия LPS на дыхательные пути сохранялась повышенная локальная продукция IL-6, но не TNF в БАЛ (Рисунок 5а). При этом повышение продукции как TNF, так и IL-6 на фоне острого воспаления (через 24 часа) было

статистически достоверным (Рисунок 5а). Кроме того, показано, что однократное введение LPS в виде аэрозоля приводит к повышению продукции IL-10 в БАЛ, участвующего в развитии фиброза, через 5 недель, но не через 24 ч (Рисунок 5а).

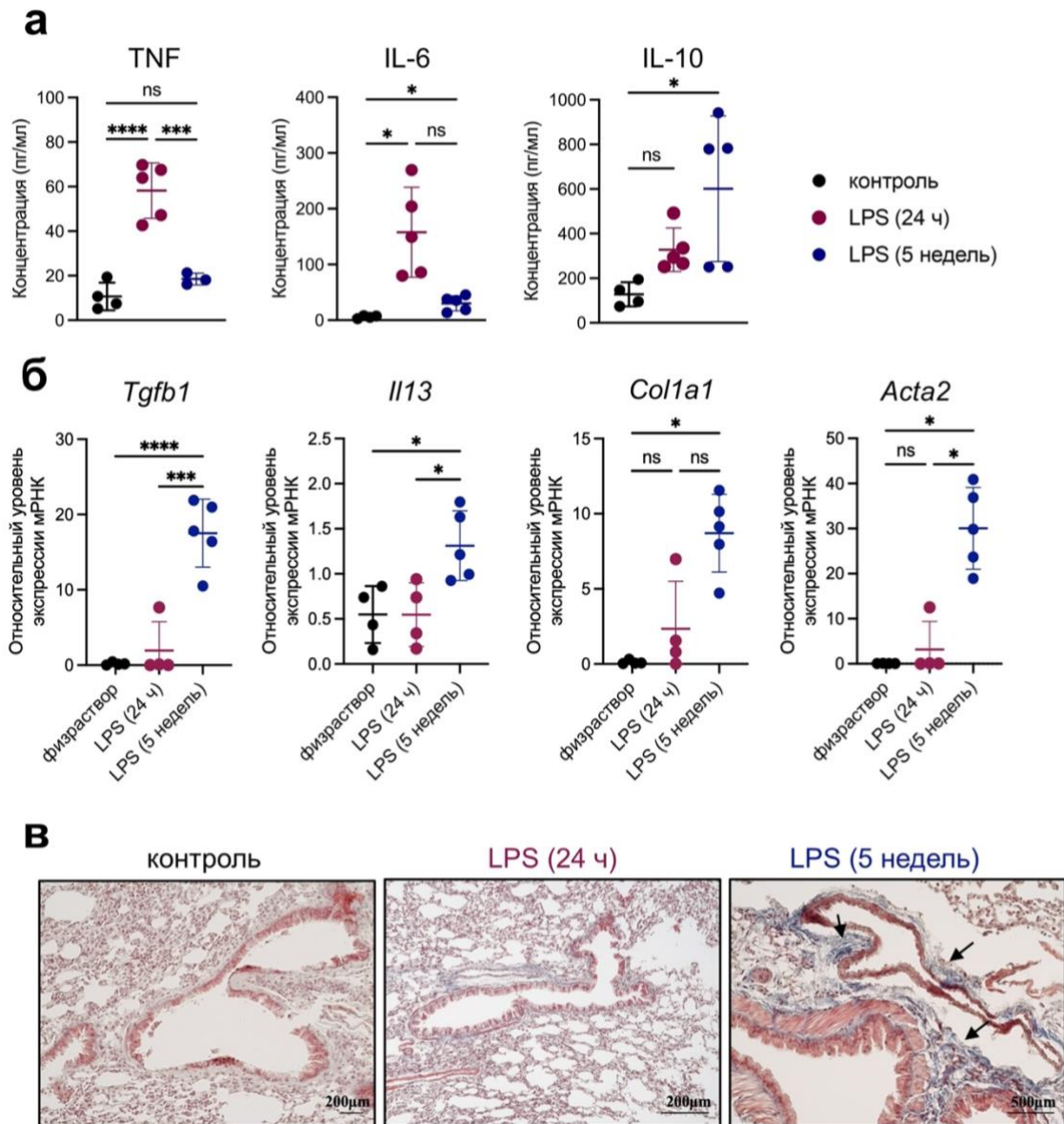


Рисунок 5. Введение LPS в виде аэрозоля через 5 недель способствует повышенной продукции IL-6 и IL-10 в БАЛ, а также приводит к увеличению экспрессии ключевых генов, ассоциированных с фиброзом

(а) Концентрации TNF, IL-6 и IL-10 (пг/мл) в БАЛ через 24 ч и 5 недель после аэрозольного введения LPS. (б) Уровень экспрессии генов *Tgfb1*, *Il13*, *Col1a1* и *Acta2*, ассоциированных с фиброзом, относительно *Actb*, в тканях легких. (в) Репрезентативные фотографии гистологического окрашивания методом Массона срезов легких мышей после воздействия LPS, а также физраствора в качестве контроля. Стрелки указывают на области интенсивного синего окрашивания и демонстрируют наличие коллагена в легочной ткани. Масштаб – 200 и 500 мкм. Результаты представлены как среднее значение \pm SD (n=4-5) и подтверждены в двух независимых экспериментах. 1-way ANOVA. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$; ns, non-significant (недостоверная разница).

TGF- β , являясь ключевым медиатором фиброза, индуцирует выработку коллагена и дифференцировку фибробластов в миофибробласты за счет индукции экспрессии α -SMA (гладкомышечного актина α), кодируемого геном *Acta2*. В модели LPS-индуцированного воспаления было показано, что однократное воздействие LPS значительно увеличивало экспрессию *Tgfb1*, *Colla1* и *Acta2* в легких у мышей через 5 недель по сравнению с контрольной группой и мышами на фоне острого воспаления (Рисунок 5б). Кроме того, через 5 недель после введения LPS регистрировалось повышение экспрессии *Il13*, непосредственно регулирующего выработку коллагена и α -SMA в фибробластах (Рисунок 5б). Наряду с этим, гистологический анализ выявил значительное отложение коллагена в тканях легких спустя 5 недель после аэрозольного введения LPS (Рисунок 5в). Таким образом, было установлено, что через 5 недель после однократного ингаляционного введения LPS у мышей развивается хроническое воспаление, а также появляются типичные признаки фиброза легких.

4. Генетическая инактивация *Il6*, но не *Tnf* защищает от нарушения основных параметров дыхания и функциональности легких в модели LPS-индуцированного фиброза у мышей

Для определения роли IL-6 и TNF в развитии ремоделирования легких, вызванного воспалением, были использованы мыши с полной генетической инактивацией IL-6 или TNF на фоне LPS-индуцированного фиброза легких. Поскольку к 5 неделе в модели фиброза наблюдалось лишь начальное накопление коллагена в легких, мышей подвергали ингаляционному воздействию LPS с последующим анализом через 7 недель после введения. Для анализа функциональных нарушений дыхательной системы легких на фоне индуцированного фиброза была проведена оценка механики дыхания с использованием техники вынужденных колебаний в провокационном тесте с метахолином нарастающей концентрации. Установлено, что спустя 7 недель после однократного ингаляционного введения LPS у мышей с полным удалением IL-6 наблюдалось снижение сопротивления дыхательной системы в

ответ на провокационную пробу метахолина по сравнению с мышами дикого типа (Рисунок 6а). Напротив, у TNF KO мышей не наблюдалось статистически значимых отличий ни в сопротивлении и эластичности дыхательных путей, ни в сопротивлении или эластичности легочной ткани (Рисунок 6б) и может указывать на важность роли TNF во время острой фазы воспаления, но не в фибропролиферативной фазе, что коррелирует с отсутствием повышенной локальной продукции TNF в БАЛ спустя 5 недель после индукции фиброза, когда высокий уровень IL-6 сохраняется (Рисунок 5а). Интересно, что у мышей с полным удалением IL-6, несмотря на сниженное сопротивление дыхательной системы и легочной ткани, также наблюдалось снижение эластичности (Рисунок 6а).

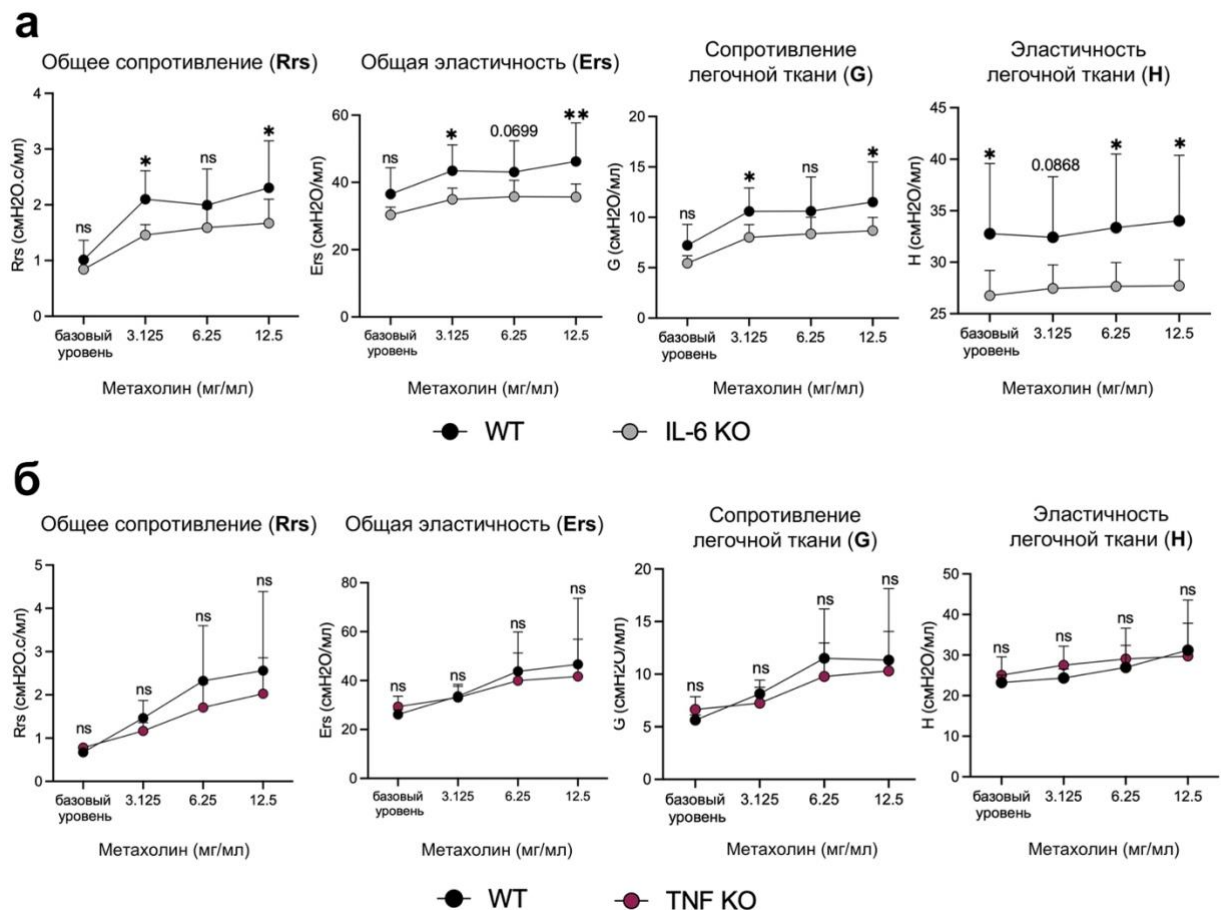


Рисунок 6. У мышей с дефицитом IL-6, но не TNF изменяются параметры дыхания при LPS-индуцированном фиброзе

Измерение параметров механики дыхания с помощью прибора flexiVent SCIREQ в провокационном тесте с метахолином у мышей с полным удалением IL-6 (а) или TNF (б) на фоне LPS-индуцированного фиброза легких на 7 неделе. Результаты представлены как среднее значение \pm SD (n=9-11) и подтверждены в двух независимых экспериментах. 2-way ANOVA. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; ns, non-significant (недостовверная разница).

Наряду с этим, гистологический анализ выявил значительное отложение коллагена у мышей с полным удалением IL-6 по сравнению с мышами дикого типа спустя 7 недель после аэрозольного введения LPS (Рисунок 7), что коррелировало со снижением общей эластичности дыхательных путей и самой легочной ткани (Рисунок 6а).

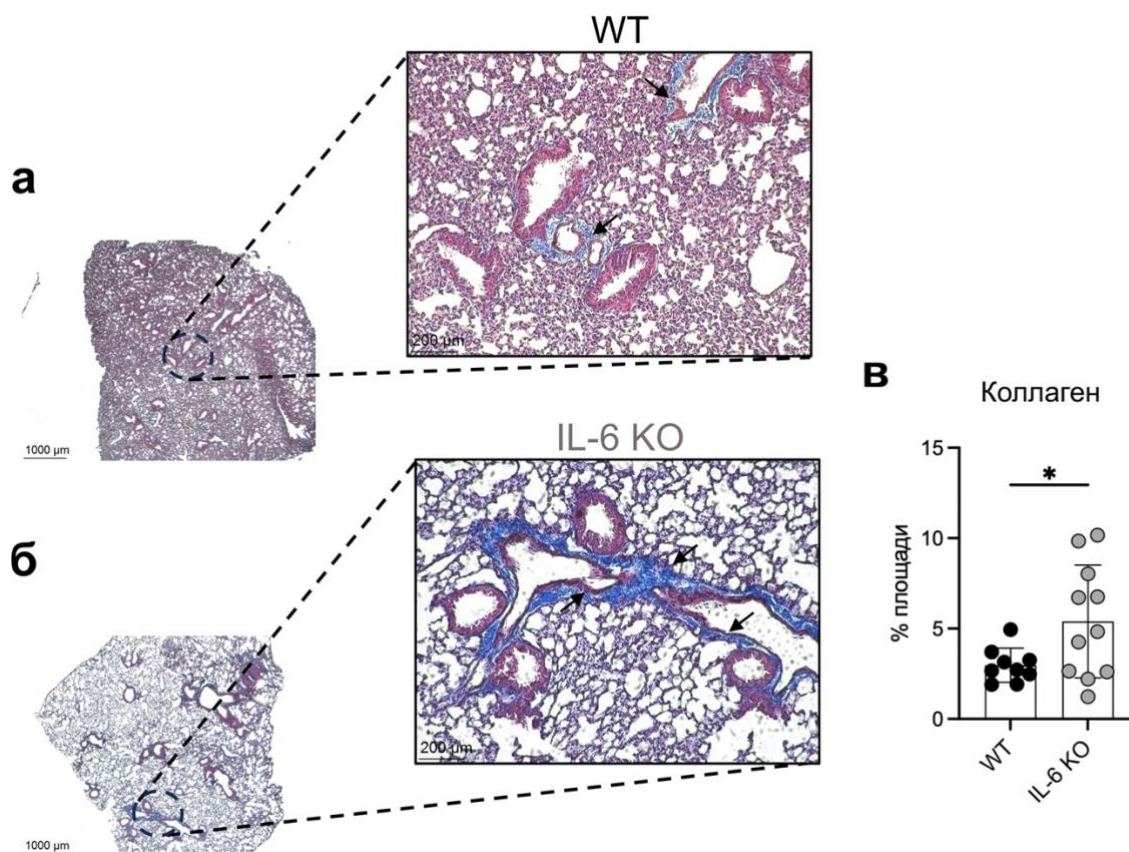


Рисунок 7. На фоне LPS-индуцированного фиброза у мышей с дефицитом IL-6 накапливается коллаген

Репрезентативные фотографии гистологического окрашивания методом Массона срезов легких мышей дикого типа (а) и мышей с полным удалением IL-6 (б) через 7 недель после воздействия LPS. Стрелки, указывающие на области интенсивного синего окрашивания, демонстрируют наличие коллагена в легочной ткани. Масштаб – 200 и 1000 мкм. (в) Процентная площадь коллагеновых структур в легких, оцененная на гистологических срезах. Результаты представлены как среднее значение \pm SD (n=9-11) и подтверждены в двух независимых экспериментах. t-критерий Стьюдента. * $P < 0,05$; ns, non-significant (недостовверная разница).

Наблюдаемая разнонаправленность показателей механики дыхания может отражать комплексное и тканеспецифичное влияние IL-6 на воспалительные каскады, репаративные процессы и функциональные характеристики дыхательной системы. Вероятно, в контексте LPS-индуцированного фиброза, снижение сопротивления и накопление коллагена не являются

взаимоисключающими процессами, поскольку могут отражать поражение различных анатомических компартментов дыхательной системы. Дефицит IL-6, с одной стороны, ограничивает воспаление и отек легочной ткани (Рисунок 7б), способствуя сохранению просвета и снижению сопротивления дыхательных путей (Рисунок 6а). С другой стороны, коллаген может накапливаться в интерстиции легких (Рисунок 7б, в), что в меньшей степени влияет на сопротивление, но существенно меняет эластические свойства ткани. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о комплексной роли IL-6 не только как провоспалительного медиатора, но и как фактора, участвующего в регуляции ремоделирования легочной ткани и синтеза внеклеточного матрикса.

5. Повышенная экспрессия IL-6 вызывает системное и локальное воспаление и способствует патологическому ремоделированию легочной ткани

Повышенная продукция IL-6 при сепсисе, а также во время цитокинового шторма, связанного с COVID-19, сопровождается патологическими последствиями, что подтверждено в мышинных моделях сверхэкспрессии IL-6. При этом воздействие сверхэкспрессии IL-6 на легочную ткань не исследовалось. В настоящей работе была использована мышинная модель со сверхэкспрессией hIL-6 в CD4⁺ клетках (hIL-6 tg CD4-Cre), характеризующаяся системной сверхпродукцией hIL-6, но с сохранением нормальной жизнеспособности (Рисунок 8а). Ключевой особенностью полученной линии мышей hIL-6 tg CD4-Cre является развитие системного воспаления у hIL-6 tg CD4-Cre мышей на фоне хронически повышенной системной и локальной продукции hIL-6 в сыворотке крови и легких (Рисунок 8б). При этом у hIL-6 tg CD4-Cre мышей по сравнению с мышами дикого типа и с полным удалением IL-6 в наивном состоянии развивались структурные изменения легочной ткани с инфильтрацией воспалительных клеток вблизи крупных дыхательных путей (Рисунок 8в). Полученные данные свидетельствуют о том, что продукция hIL-6 вызывает системное воспаление, приводящее к ремоделированию легочной ткани.

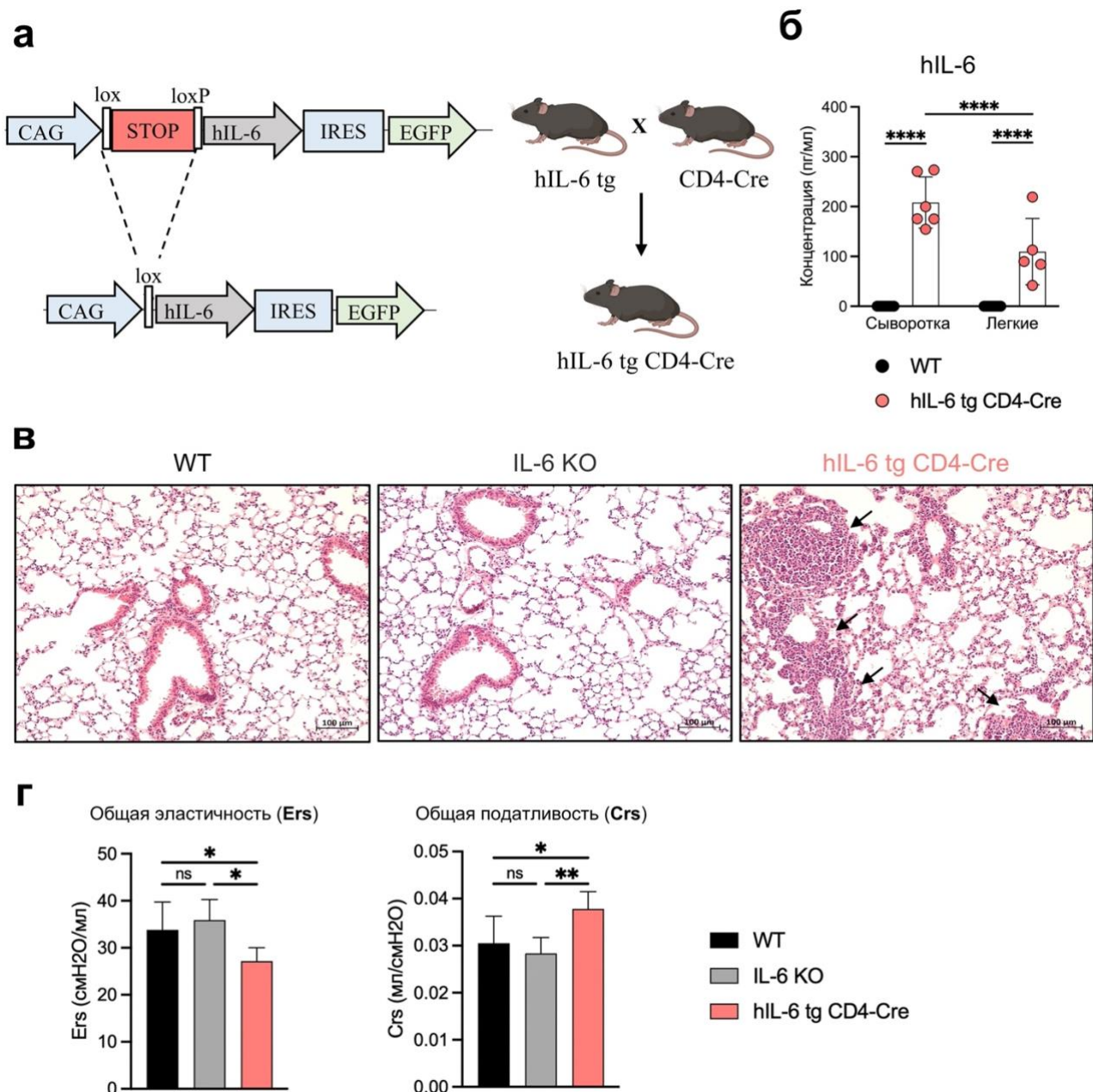


Рисунок 8. Избыточная продукция hIL-6 приводит к ремоделированию легких и нарушению функциональных параметров дыхательной системы

(а) Для получения мышей, экспрессирующих человеческий IL-6 (hIL-6) в CD4⁺ клетках, было проведено скрещивание между мышами трансгенной линии и мышами вспомогательной линии, несущими вставку гена рекомбиназы Cre в локусе гена *Cd4* (CD4-Cre). (б) Уровень продукции hIL-6 (пг/мл) в сыворотке и в гомогенате легких hIL-6 tg CD4-Cre и мышей дикого типа. (в) Репрезентативные фотографии гистологического окрашивания гематоксилин-эозином срезов легких мышей дикого типа, hIL-6 tg CD4-Cre и мышей с дефицитом IL-6. Стрелки указывают на области инфильтрации воспалительных клеток вблизи крупных дыхательных путей. Масштаб – 100 мкл. (г) Измерение параметров механики дыхания с помощью прибора flexiVent SCIREQ. Результаты представлены как среднее значение ±SD (n=5-9) и подтверждены в двух независимых экспериментах. t-критерий Стьюдента и 1-way ANOVA. **P* < 0,05; ***P* < 0,01; *****P* < 0,0001; ns, non-significant (недостовверная разница).

Кроме того, у мышей с дефицитом IL-6 в наивном состоянии функциональность легких не отличалась от таковой у дикого типа (Рисунок 8г). В то же время, мыши с повышенной продукцией hIL-6 демонстрировали значительное снижение общей эластичности дыхательных путей (Рисунок 8г). Интересно, что у hIL-6 tg CD4-Cre заметно повышалась податливость дыхательной системы по сравнению с мышами дикого типа (Рисунок 8г), что может объясняться потерей эластических волокон в стенках альвеол. Так, снижение эластичности непосредственно приводит к потере способности ткани возвращаться в исходное состояние после растяжения. Вследствие этого легкие становятся более растяжимыми, легко расширяясь при вдохе, но плохо сокращаясь при выдохе, что затрудняет выведение воздуха из легких и вызывая его задержку в альвеолах.

Таким образом, повышенная продукция hIL-6 приводит к системному воспалению и ремоделированию легочной ткани, что проявляется в образовании скоплений лимфоидных клеток, структурных изменениях и, как следствие, в значительном снижении общей эластичности дыхательной системы, увеличении её растяжимости и затруднении выдоха, что согласуется с концепцией обструктивного характера дыхательной недостаточности. Результаты, полученные на моделях с избыточной продукцией IL-6 и LPS-индуцированного фиброза легких, определяют IL-6, как ключевой фактор ремоделирования легких и прогрессирующего нарушения функционального состояния дыхательной системы, представляя IL-6 центральным звеном, связывающим фазу острого воспаления с долгосрочными нарушениями функций легких.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящей работы вносят вклад в фундаментальные представления об иммунопатологии легких и являются актуальными для разработки новых подходов терапии хронических респираторных заболеваний. Основным итогом работы является экспериментальное обоснование перспективности комбинированной антицитокиновой терапии, направленной на одновременную блокировку TNF и IL-6. На релевантной модели HDM-индуцированной аллергической астмы впервые был продемонстрирован комплексный эффект комбинированной блокировки в подавлении как Th2-ассоциированного эозинофильного воспаления, так и Th1-/Th17-опосредованной нейтрофилии, что представляет особую значимость для терапии пациентов с тяжелой формой астмы со смешанным типом воспаления, устойчивого к стандартному лечению. Кроме того, результаты работы позволили углубить существующее представление о роли TNF и IL-6 в поддержании воспаления и ремоделирования легких. С использованием модели LPS-индуцированного фиброза легких показано, что TNF играет ключевую роль преимущественно в острой фазе воспаления, тогда как вклад IL-6 оказался важен для поддержания хронического воспалительного ответа и инициации ремоделирования легочной ткани. Выявленная взаимосвязь между избыточной продукцией IL-6 и прогрессирующим ухудшением функции дыхательной системы доказывает, что IL-6 является не просто маркером воспаления, но и активным фактором ремоделирования.

По результатам работы были сделаны следующие **выводы**:

1. Комбинированная фармакологическая блокировка TNF и IL-6 при HDM-индуцированной астме эффективно подавляет Th2- и Th1-/Th17-опосредованные ответы, в том числе, снижает инфильтрацию гранулоцитов в легкие. Введение блокатора IL-6 преимущественно подавляет Th17-клеточный ответ и снижает нейтрофильный инфильтрат в

легких, в то время как нейтрализация TNF способствует экспансии Th17-клеток и подавляет эозинофильное воспаление.

2. Комбинированная фармакологическая блокировка TNF и IL-6 обеспечивает более эффективное подавление ремоделирования дыхательных путей по сравнению с монотерапией блокаторами этих цитокинов.
3. Однократное ингаляционное введение LPS приводит к повышенной экспрессии IL-6 в БАЛ и появлению фибrotических изменений в легких у мышей.
4. Дефицит TNF не влияет на функциональное состояние легких при LPS-индуцированном фиброзе. У мышей с генетической инактивацией IL-6 наблюдается снижение сопротивления дыхательных путей и легочной ткани, а также потеря эластичности легких в сравнении с диким типом, что свидетельствует о значимом вкладе IL-6 в регуляцию механики дыхания на фоне воспаления.
5. У мышей с избыточной системной продукцией hIL-6 наблюдается системное воспаление и ремоделирование легочной ткани, что проявляется в структурных изменениях в легких и в значительном снижении эластичности дыхательных путей.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук:

1. **Namakanova O.A.**, Yakovleva A.S., Gubernatorova E.O., Pukhalskaia T.V., Nedospasov S.A., Drutskaya M.S. Immunometabolic properties of tissue-resident alveolar macrophages depend on *ex vivo* culturing conditions // Biochemistry (Moscow). 2026. – Vol. 91. – P. 358-368. doi: [10.1134/S0006297925603867](https://doi.org/10.1134/S0006297925603867). Импакт-фактор 2,2 (JIF) (1,27/0,5)ⁱ
2. **Намаканова О.А.**, Губернаторова Е.О., Чичерина Н.Р., Зварцев Р.В., Друцкая М.С. Экспериментальная модель легочного фиброза у мышей, индуцированная посредством аэрозольной доставки LPS // Российский иммунологический журнал. 2024. – Т. 27, №2. – С. 145-150. EDN: TUGFGT. Импакт-фактор 0,439 (РИИЦ) (0,69/0,3)
3. **Namakanova O.A.**, Gorshkova E.A., Zvartsev R.V., Nedospasov S.A., Drutskaya M.S., Gubernatorova E.O. Therapeutic potential of combining IL-6 and TNF blockade in a mouse model of allergic asthma // International Journal of Molecular Sciences. 2022. – Vol. 23. – P. 3521. EDN: GUHCLL. Импакт-фактор 4,9 (JIF) (1,96/0,7)
4. Gubernatorova E.O., **Namakanova O.A.**, Gorshkova E.A., Medvedovskaya A.D., Nedospasov S.A., Drutskaya M.S. Novel anti-cytokine strategies for prevention and treatment of respiratory allergic diseases // Frontiers in Immunology. 2021. – Vol. 12. – P. 601842. EDN: BOUVWF. Импакт-фактор 5,9 (JIF) (1,04/0,1)
5. Gubernatorova E.O., **Namakanova O.A.**, Tumanov A.V., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A. Mouse models of severe asthma for evaluation of therapeutic cytokine targeting // Immunology Letters. 2019. – Vol. 207. – P. 73-83. EDN: RGRCZJ. Импакт-фактор 2,8 (JIF) (1,27/0,1)

ⁱ В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах