

## Иммунотендулирующее действие долговременной терапии оклацитиниба малеатом у собак с атопическим дерматитом

Guilherme De Caro Martins<sup>\*</sup>, Adriane Pimenta da Costa-Val<sup>†</sup>, Fernanda Morcatti Coura<sup>‡</sup>, Gabriela Matoso Lima Diamantino<sup>†</sup>, Marina Moller Nogueira<sup>†</sup>, Otoni Alves de Oliveira Melo-Junior<sup>§</sup>, Rodolfo Cordeiro Giunchetti<sup>§</sup>, Denise da Silveira-Lemos<sup>¶</sup> и Marilia Martins Melo<sup>†</sup>

<sup>\*</sup> CentroVet, Veterinary Specialties, 42 Raul Mendes St, Belo Horizonte, MG 30010-030, Бразилия

<sup>†</sup> Кафедра терапии и хирургии, ветеринарная школа, Presidente Antonio Carlos Av, 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Бразилия

<sup>‡</sup> Ветеринарный факультет, Bambuf/Medeiros Road, Km 05 Faz, Varginha, MG 38900-000, Бразилия

<sup>§</sup> Биология клеточных взаимодействий, кафедра морфологии, Институт биологических наук, Presidente Antonio Carlos Av, 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Бразилия

<sup>¶</sup> Universidade Jose Do Rosario Vellano 50 Indaia St, UNIFENAS, Belo Horizonte, MG 31270-020, Бразилия

**Для переписки:** Adriane Costa-Val, Escola de Veterinaria/Universidade Federal de Minas Gerais — Cfnica e Cirurgia Veterinarias, Av. Antonio Carlos, 6627 Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil. E-mail: adriane@vet.ufmg.br

Принято 20 июля 2021 г.

**Источники финансирования:** Научно-техническая национальная Программа развития (Национальный совет по развитию Cientifico e Tecnol ogico -CNPq), Бразилия. Конфликт интересов: о конфликте интересов заявлено не было.

**Предпосылки.** Атопический дерматит (АД) собак — хроническое заболевание, характеризующееся гиперчувствительностью к аллергенам окружающей среды. Оклацитиниба малеат избирательно ингибирует провоспалительные медиаторы, связанные с АД. Однако влияние длительного лечения оклацитинибом на иммунокомпетентность требует дальнейшего исследования.

**Цели.** Здесь мы изучили потенциальный иммуномодулирующий эффект длительного лечения оклацитинибом у собак.

**Животные.** 13 собак с АД, принадлежащих владельцам, получавшие лечение оклацитинибом в дозе 0,4–0,6 мг/кг в течение 12 месяцев.

**Методы и материалы.** Уровень зуда оценивали с помощью визуальной аналоговой шкалы (ВАШ) оценки зуда и индекса протяженности и тяжести АД собак, 4 версии (CADESI IV). Брали периферическую кровь для стандартного лабораторного анализа и анализировали подтипы лимфоцитов методом проточной цитометрии. После стимуляции *in vitro* антигенами *Dermatophagoides farinae* анализировали выработку антиген-специфических внутриклеточных цитокинов CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитами.

**Результаты.** Лечение оклацитинибом значительно снижало оценки по ВАШ и CADESI-04, на 51 и 86,70 %, соответственно. Анализ методом проточной цитометрии показал увеличение популяций CD4+ и CD14+ лимфоцитов. Состав цитокинов через 360 дней после начала лечения был сходен с таковым до лечения и не был связан с клиническим рецидивом.

**Заключение.** Оклацитиниб при применении в утвержденной в настоящее время дозе в течение одного года приводит к значительному повышению количества циркулирующих CD4+ Т-лимфоцитов, однако не изменяет образование цитокинов антиген-стимулированными Т-лимфоцитами. Описанные результаты не поддерживают данные об иммуносупрессии, опосредованной механизмами, оценивавшимися в этом исследовании.

### Введение

Атопический дерматит (АД) — хроническая воспалительная дерматопатия, поражающая примерно 10 % собак во всем мире [1]. Наиболее распространенным клиническим признаком является интенсивный зуд, значительно сказывающийся на качестве жизни как животных, так и их владельцев [2]. Диагноз клинический и основывается на анамнезе и характерных клинических симптомах при исключении других зудящих дерматопатий [3].

Тяжесть зуда и поражений кожи при АД собак можно снизить с помощью аллерген-специфической иммунотерапии, контроля дисбиоза, коррекции барьерной функции рогового слоя и контроля воспаления при помощи иммуномодулирующих препаратов [4–7]. Оклацитиниба малеат облегчает клинические симптомы АД за счет действия на сигнальные пути ферментов янус-киназы 1 (JAK1), изменяя выработку нескольких интерлейкинов (IL), включая IL-2 и IL-6 (про-воспалительные), IL-4 и IL-13 (про-аллерген-

ные) и IL-31 (способствующий зуду) [8, 9]. Показано, что оклацитиниб способен быстро и эффективно уменьшать зуд у собак, и в настоящее время он показан для контроля острых и хронических клинических симптомов АД. Тем не менее, эффекты, связанные с долговременным подавлением сигнальных путей, опосредованных IL, достаточно не изучены [7, 10].

В предыдущем исследовании показано, что повышенное количество CD4+ Т-клеток и повышение соотношения CD4+/CD8+ Т-клеток является отличительным признаком АД собак [11]. В другом исследовании влияния оклацитиниба на мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) собак с АД показано, что в рекомендованной в настоящее время дозе он значительно не влияет на антиген-специфическую пролиферацию Т-клеток [12]. Однако влияние длительного применения оклацитиниба на Т-клетки собак неизвестно. Таким образом, целью настоящего исследования была оценка клинической эффективности оклацитиниба в условиях хронического АД собак и оценка его иммуномодулирующего действия при долговременном применении. Мы предположили, что оклацитиниб обладает иммуномодулирующим, но не иммуносупрессивным действием и, следовательно, безопасен при долговременном применении.

## Методы и материалы

### Место проведения исследования и животные

Этот проект был одобрен Комиссией по исследованиям на животных и этике Федерального Университета Минас-Жерайс (CEUA UFMG) № протокола 57/2016. Владельцы участвующих собак подписали форму информированного согласия. В исследование включили 13 собак с диагнозом АД.

Диагноз АД ставился на основании анамнеза и характерных клинических признаков по критериям, описанным Favrot и соавт. [13], после 2 месяцев кормления коммерческим кормом на основе гидролизованного белка для исключения нежелательной кожной реакции на корм. Для зачисления был необходим 30-дневный период без применения любых препаратов с иммуномодулирующим потенциалом. Всех собак лечили оклацитиниба малеатом внутрь (Апоквель, Зоэтикс; Каламазу, Мичиган, США) в дозе 0,4–0,6 мг/кг дважды в сутки в течение 14 дней, затем 0,4–0,6 мг/кг раз в сутки в течение одного года [8]. Другие иммуномодулирующие препараты в период исследования не разрешались.

### Эффективность оклацитиниба малеата

Эффективность препарата оценивали на день (Д) 0, Д15, Д30, Д60, Д90, Д120, Д150, Д180, Д210, Д240, Д270, Д300, Д330 и Д360 путем изучения двух параметров: кожи в пораженных местах с помощью индекса протяженности и тяжести АД, 4 версия (CADESI-04),

и оценки зуда владельцами по утвержденной визуальной аналоговой шкале (ВАШ) [14, 15]. Каждую оценку по CADESI-04 выполняли три исследователя, чтобы снизить субъективность анализа. Для оценки зуда — владельцев просили нарисовать вертикальную линию на ВАШ, показывающую интенсивность зуда по их ощущениям.

### Оценка лейкоцитов после лечения оклацитиниба малеатом

Для анализа МКПК методом проточной цитометрии периферическую кровь брали в пробирки с гепарином натрия путем пункции яремной вены до лечения и каждые 2 месяца в период исследования. Лейкоциты оценивали как описано в работе Martins и соавт. [11]. Сначала собирали 50 мкл цельной периферической крови в пробирку, содержащую гепарин натрия, и переносили в три пробирки: одну содержащую антитело к собачьему CD3-FITC/ CD4+-PE/ CD8+-AlexaFluor 647 (Bio-Rad Laboratories Inc.; Геркулес, Калифорния, США), другую, содержащую 20 мкл антитела к человеческому CD14-AlexaFluor 647 (Bio-Rad) + 1,0 мкл антитела к собачьему CD21-PE (Bio-Rad), и в третью — без антител. Образцы инкубировали 30 минут при комнатной температуре (КТ) с защитой от света. Затем эритроциты лизировали осмотическим способом, пробирки центрифугировали и удаляли надосадочную жидкость. Образцы дважды промывали физиологическим раствором, забуференным фосфатным буфером (PBS) — W [PBS с 0,5 % бычьим сывороточным альбумином (БСА) и 0,1 % азидом натрия, pH 7,2] и снова центрифугировали при 240g при 18 °C в течение 7 минут. Затем к полученному осадку добавляли 100 мкл фиксирующего раствора (Facs Lysing Solution, BD Bioscience; Сан-Хосе, Калифорния, США). Для получения данных использовали проточный цитометр FACSCanthal-II-BD и программное обеспечение DIVA (BD Bioscience), всего 30000 событий, с пробирками, содержащими CD3+, CD4+, CD8+, CD21+ и CD14+, и 5000 событий на гейте CD14. Для анализа данных использовали программное обеспечение FlowJo (v7.6.1, программное обеспечение для анализа методом проточной цитометрии; Эшланд, Орегон, США).

Анализ со стимуляцией антигенами проводили как описано Martins и соавт. [11]. Сначала собирали периферическую кровь от пяти животных с АД и 7 контрольных животных в пробирку, содержащую гепарин натрия. Затем к крови добавляли МКПК с добавлением 10 % инактивированной фетальной бычьей сыворотки, 2 mM L-глутамин и 100 Ед/мл пенициллина G (pH 7,2). Культуры делили на три группы: (1) без стимуляции; (2) со стимуляцией форболмиристацетатом (ФМА, 25 нг/мл) и иономицином (1 нг/мл); и (3) со стимуляцией антигенами *Dermatophagoides farinae* (25 нг/мл). Брефелдин (20 мкл) добавляли

ко всем образцам и инкубировали в течение 4 ч при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>, а затем добавляли 200 мкл этилендиаминтетраацетата (ЭДТА, Sigma; Сент-Луис, Монтана, США) и выдерживали смесь 10 минут при КТ. Затем добавляли 3 мл PBS-W и центрифугировали при 240 *g* в течение 10 минут при 18 °С. Надосадочную жидкость удаляли и повторно суспендировали осадок в PBS-W, а затем переносили 100 мкл клеточной суспензии в пробирки, содержащие специфические антитела к клеточным популяциям, представляющим интерес: (1) антитело к собачьему CD4-PE, (2) антитело к собачьему CD4-FITC, (3) антитело к собачьему CD8+PE, (4) антитело к собачьему CD8+FITC и (5) немеченые. Образцы инкубировали 30 минут при КТ с защитой от света. Далее эритроциты лизировали осмотическим способом с помощью 3 мл лизирующего раствора FACS в течение 10 минут. Клетки центрифугировали (1300 об/мин, 18 °С, 7 минут), надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в PBS-W и центрифугировали. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок суспендировали в 500 мкл PBS-W и 3 мл PBS-P (PBS-W и 0,5 % сапонин) с последующим центрифугированием и удалением надосадочной жидкости. Затем добавляли 20 мкл антитела к цитокину [IL-4-PE и интерферону (IFN) — у-FITC], инкубировали 30 минут, промывали PBS-W и центрифугировали при 300 об/мин и 18 °С 7 минут. Далее к осадку добавляли 100 мкл фиксирующего раствора. Для получения данных регистрировали 30000 событий с помощью проточного цитометра FACSCanthal-BD и программного обеспечения DIVA. ПО FlowJo v7.6.1 (программное обеспечение для анализа данных проточной цитометрии) использовали для анализа данных и определяли процент IL-4 и IFN-у, образованных CD4+ и CD8+ лимфоцитами, как описано в работе Martins и соавт. [11].

### Статистический анализ

Переменные оценивали со временем с помощью метода обобщенных оценочных уравнений (ООУ) [16] для анализа корреляции между повторными измерениями [17]. Логарифмически-линейную маргинальную регрессию с постоянной дисперсией и средней пропорциональной дисперсией корректировали для каждой переменной, с временем в качестве объясняющей переменной. Для анализов использовали программу R (в 3.3.2), значения считали статистически значимыми при  $P < 0,05$ .

### Результаты

#### Характеристики животных

Группа АД собак состояла из 13 собак с атопическим дерматитом (7 кобелей, 6 сук) в возрасте от 2 до 10 лет (медиана 4,6 лет). Среди них было 5 ши-тцу (38,4 %) и два (15,38 %) метиса. Следующие породы были представлены по одному разу: мальтийский терьер, английский бульдог, французский бульдог, пекинес, шнауцер и пудель. 5 из 13 собак с атопией были выбраны случайным образом для дополнительного обследования. Демографические и клинические параметры участников кратко представлены в табл. 1.

#### Эффективность

##### оклацитиниба малеата

Данные оценки по CADESI-04 и ВАШ зуда для каждой собаки (оценивали каждые 2 месяца) показаны в табл. 2 и 3. Лечение оказывало значимый эффект ( $P < 0,05$ ) на переменную оценки зуда по ВАШ, которая снизилась на 51 % за этот период (табл. 4). Оклацитиниб значительно влиял на переменную CADESI-04 ( $P < 0,0001$ ), которая уменьшилась на 86,7 % за этот период (табл. 4).

**Таблица 1. Демографические данные участвующих собак, в том числе тяжесть атопического заболевания**

Номер	Порода	Возраст (лет)	Пол	Вес (кг)	Тяжесть атопического заболевания
1	Ши-тцу	5	С	3,9	Умеренное
2	Пекинес	5	К	7,6	Умеренное
3	Беспородная	2	С	7,8	Умеренное
4	Ши-тцу	4	К	7,8	Тяжелое
5	Беспородная	4	С	11,5	Тяжелое
6	Английский бульдог	2	С	19,6	Умеренное
7	Ши-тцу	6	С	6,5	Умеренное
8	Ши-тцу	2	С	7,1	Тяжелое
9	Шнауцер	5	К	9,9	Легкое
10	Французский бульдог	6	К	11	Умеренное
11	Пудель	10	К	9,7	Легкое
12	Мальтийский терьер	7	К	8,6	Умеренное
13	Ши-тцу	3	К	8,9	Умеренное

Тяжесть атопического заболевания оценивали как описано Olivry и соавт. (2015) [5].

**Таблица 2. Данные оценки зуда по визуальной аналоговой шкале (ВАШ) у собак до лечения оклацитинибом [день (Д) 0] и через 2, 4, 6, 8, 10 и 12 месяцев после начала лечения (Д60, Д120, Д180, Д240, Д300 и Д360, соответственно)**

Собаки	Дней после лечения						
	Д0	Д60	Д120	Д180	Д240	Д300	Д360
1	8	2	2	2	0	0	0
2	6	1	1	8	1,5	1,5	2,5
3	7	0	4	1,5	1	3	1
4	7,5	3,5	4	4	4,5	5	3
5	7	4	3,5	6,7	2	3	3,5
6	0	1,8	0	0,1	0	1,5	0
7	7,3	6					
8	5,5	3,5	3,5	5,5	5	5	5
9	6,5	5,5	5	5,5	5,5	6	7
10	6,5	5	4	4	2	2	4
11	6	2	2	2	1,5	2	5
12	8	5	4	3,5	4	3	3,5
13	6,5	3	2,7	2	2	2,5	2,5

**Таблица 3. Данные оценки индекса протяженности и тяжести атопического дерматита, 4 версия (CADESI-04) у собак до лечения оклацитинибом [день (Д) 0] и через 2, 4, 6, 8, 10 и 12 месяцев после начала лечения (Д60, Д120, Д180, Д240, Д300 и Д360, соответственно)**

Собаки	Дней после лечения						
	Д0	Д60	Д120	Д180	Д240	Д300	Д360
1	56,0	30,0	15,7	9,3	7,7	7,7	5,0
2	32,0	17,0	13,7	16,3	8,0	6,7	5,0
3	30,7	4,7	4,3	6,3	3,0	9,7	2,3
4	62,3	19,0	21,0	12,7	17,3	13,3	5,3
5	58,7	23,3	13,3	16,3	4,7	3,0	8,3
6	43,0	15,0	13,0	10,0	7,3	4,7	11,3
7	47,3	15,3					
8	60,3	19,0	12,3	8,7	11,0		7,3
9	32,3	9,0	8,3	4,3	6,3	6,3	2,0
10	21,3	3,3	2,0	0,0	2,3	3,3	1,7
11	32,3	9,7	9,3	3,7	3,3	2,3	3,7
12	41,7	15,7	10,3	9,7		12,0	6,3
13	33,7	20,0	13,7	11,7	14,3	8,0	9,0

**Таблица 4. Месячное среднее и процентное снижение зуда по визуальной аналоговой шкале (ВАШ) и индекса протяженности и тяжести атопического дерматита собак, 4 версия (CADESI-04) у собак, получавших оклацитиниб на протяжении 12 месяцев**

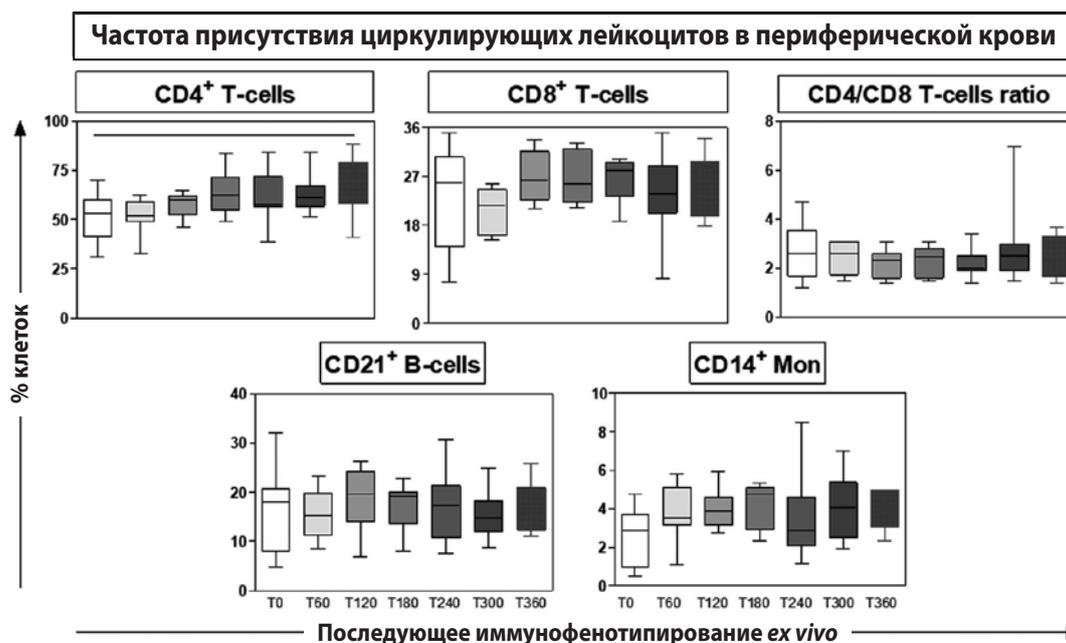
Дней после лечения	ВАШ зуда	Процентное снижение	CADESI-04	Процентное снижение
Д0	6,29		42,4	
Д14	2,45	61	26,5	37,5
Д30	3,75	40,4	19,6	53,7
Д60	3,25	48,3	15,5	63,4
Д90	3,09	50,8	12,6	70,2
Д120	2,98	52,6	11,4	73,1
Д150	3,36	46,6	10,6	75,0
Д180	3,73	40,7	9,1	78,5
Д210	2,83	55	8,8	79,2
Д240	2,42	61,5	7,8	81,6
Д270	3,00	52,3	7,0	83,4
Д300	2,88	54,2	7,0	83,4
Д330	2,80	55,5	6,2	85,3
Д360	3,08	51	5,6	86,7

### Иммунофенотипирование

Средний процент CD4+ повышался на 1,4 % каждый месяц, что представляет собой значимый эффект лечения со временем ( $P = 0,002$ ). Кроме того, после 12 месяцев лечения частота CD4+ Т-клеток была выше, чем до лечения ( $P < 0,047$ ) (рис. 1). Также отмечен значимый эффект лечения в виде изменения среднего содержания моноцитов CD14+ ( $P = 0,001$ ), которое повышалось на 3 % каждый месяц. Отмечена тенденция к повышению процента CD8+ Т-клеток, однако статистически значимого различия со временем не показано. Соотношение CD4+:CD8+ оставалось примерно постоянным. Изменений в количестве CD21+ не обнаружено (рис. 1).

### Стимуляция антигеном

На протяжении 12-месячного периода лечения оклацитинибом не наблюдали значимого влияния лечения на выработку IL-4 клетками CD4+ в культурах Т-лимфоцитов, стимулированных антигенами (рис. 2). После антигенной стимуляции культур отмечена общая картина сниженной ( $P < 0,05$ ) выработки IL-4 Т-лимфоцитами CD8+ Т после антигенной стимуляции (на Д240 и Д300 по сравнению с Д360) и сниженной ( $P < 0,05$ ) выработки IFN- $\gamma$  как CD4+ Т-лимфоцитами (на Д120, Д240 и Д300 по сравнению с Д360, и на Д240 и Д300 по сравнению с Д0), так и CD8+ Т-лимфоцитами (на Д240 и Д300 по сравнению с Д0) (рис. 2). Фактически, на Д0 медианная частота присутствия Т-клеточных цитокинов в цитоплазме в контрольных культурах (CD8+IL-4<sup>+</sup>: 2,07; CD8+IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>: 4,89; CD4+IL-4<sup>+</sup>: 1,57; CD4+IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>: 10,10) и после антигенной стимуляции (CD8+IL-4<sup>+</sup>: 1,78; CD8+IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>: 4,86; CD4+IL-4<sup>+</sup>: 2,66; CD4+IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>: 13,40) были сходны ( $P > 0,05$ ) с соответствующими состояниями культур на Д360 (контрольные культуры — CD8+IL-4<sup>+</sup>: 2,05; CD8+IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>: 4,31; CD4+IL-4<sup>+</sup>: 2,81; CD4+IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>: 10,40; стимулированные культуры — CD8+IL-4<sup>+</sup>: 4,06; CD8+IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>: 4,75; CD4+IL-4<sup>+</sup>: 3,33; CD4+IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>: 11,70)].



**Рис. 1.** Частота присутствия циркулирующих лейкоцитов в периферической крови по результатам иммунофенотипирования ex vivo.

На оси У представлена частота определенных лейкоцитов в разное время: до лечения (Д0) и на день (Д) 60, Д120, Д180, Д240, Д300 и Д360 после начала лечения. Данные представлены в виде коробчатых диаграмм, отображающих минимум, максимум и медиану. Соединительная линия представляет значимое различие ( $P < 0,05$ ) между Д0 и Д360.

## Обсуждение

В этом исследовании оценивался уровень зуда и иммуномодулирующий эффект лечения собак с АД оклацитиниба малеатом. Лечение значительно снизило оценки зуда по ВАШ и оценки по CADESI-04. Кроме того, анализ методом проточной цитометрии показал, что состав цитокинов на Д360 после лечения вернулся к уровням, сходным с наблюдаемыми до лечения, однако это не было связано с клиническим рецидивом.

Из 13 собак, зачисленных в это исследование, всего две были метисами. Известна породная предрасположенность к АД собак, в том числе у пород, представленных в нашем исследовании [1]. Ши-тцу — распространенная порода в Бразилии, у которой частота АД очень высока, поэтому неудивительно, что она составляла большую пропорцию в исследованной выборке (5 из 13).

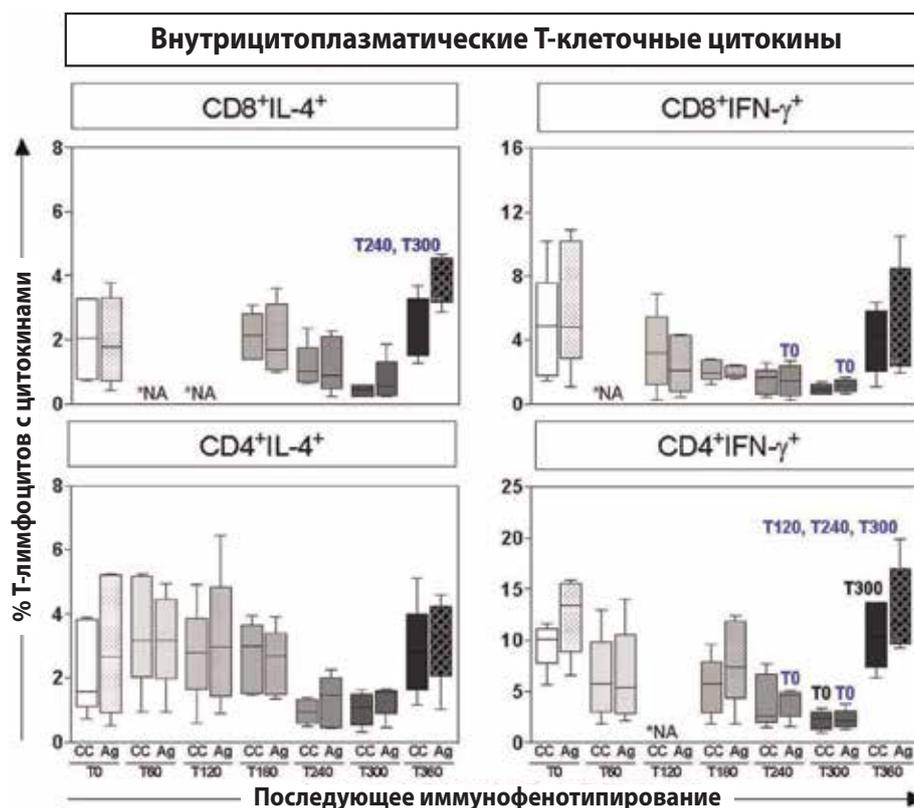
Оклацитиниб неизменно снижал зуд, что согласуется с предыдущими публикациями [7, 10, 18]. После Д180 мы наблюдали снижение зуда по ВАШ на 40,7%; после Д360 снижение на 51% говорит об эффективности контроля зуда, связанного с АД собак, на протяжении длительного времени. В случаях оценки поражений кожи с помощью CADESI-04 результаты также соответствовали предыдущим публикациям [7, 10, 18]. После Д180 наблюдали уменьшение средней оценки по CADESI-04 на 78,5%, а после Д360 — на 86,7%. Это указывало на постепенное восстановление кожи после прекращения действия

раздражителя в форме зуда. Таким образом, необходимо дать коже достаточно времени на восстановление без раздражителей, таких как самотравмирование, которые способствуют появлению таких поражений [7].

Согласно производителю [19], оклацитиниб может модулировать иммунную систему и повышать восприимчивость к инфекциям, а также усугублять неопластические состояния.

Недавние исследования не показали значимого различия в количестве опухолей, диагностированных у животных с АД, получавших лечение с оклацитинибом или без [20]. Это было основной мотивацией для проведения этого исследования, так как оклацитиниб часто применяется для долговременного контроля клинических признаков АД.

Исследования нормальных субпопуляций лимфоцитов у здоровых собак показывают, что диапазоны могут варьировать в соответствии с несколькими факторами, включая породу, возраст и использование разных протоколов иммунофенотипирования, включая источник и клоны моноклональных антител [21, 22]. Тем не менее, данные об иммунофенотипическом профиле циркулирующих лейкоцитов, в частности, отличающие субпопуляции лимфоцитов у собак, получавших оклацитиниб, оставались недоступными. Анализ субпопуляций лимфоцитов имеет решающее значение для оценки иммунокомпетентности, влияния лекарств на иммунную систему и прогрессирования инфекционных болезней [23].



**Рис. 2.** Состав цитокинов в Т-лимфоцитах по результатам иммунофенотипирования.

На оси Y представлена частота определенных внутрицитоплазматических цитокинов [интерлейкина (IL) — 4 или интерферона (IFN) —  $\gamma$ ] в CD4+ или CD8+ Т-лимфоцитах в разное время: до лечения (D0) и на день (D) 60, D120, D180, D240, D300 и D360 после начала лечения. Внутрицитоплазматические цитокины оценивали путем анализа *in vitro* в контрольных культурах (CC; без антигенной стимуляции) или после стимуляции антигенами *Dermatophagoides farinae* (Ag). Данные представлены в виде коробчатых диаграмм, отображающих минимум, максимум и медиану. Значимые различия ( $P < 0,05$ ) показаны синим цветом (для стимулированных культур) или черным (для контрольных культур) как: D0, D120, D240, D300 по отношению к времени до лечения (D0) или D120, D240, D300 после лечения, учитывая сравнение тех же условий *in vitro* (с антигенной стимуляцией или без). \*NA — не анализировали.

Одна из слабостей этого исследования заключается в ограниченном размере выборки и породном распределении.

Так как оклацитиниб специфически ингибирует фермент, взаимодействующий со специфическими рецепторами цитокинов [8], в отличие от менее селективных препаратов, таких как глюкокортикоиды, снижение субпопуляции лимфоцитов со временем не ожидается [24]. Неподтвержденные данные говорят о более высокой распространенности демодекоза у животных, получающих оклацитиниб длительное время. Эти данные можно приписать снижению количеству CD4+ клеток, так как описано, что у животных, у которых обнаружены клещи, вызывающие демодекоз, снижено количество CD4+ [25]. Однако в нашей исследованной выборке обнаружено увеличение количества CD4+ Т-лимфоцитов без изменений в соотношении CD4+:CD8+, которое оставалось примерно постоянным.

Подобным образом, увеличение количеств CD4+ Т-клеток в коже можно объяснить течением самого аллергического заболевания, провоцируемого

воздействием аллергенов на кожу [26]. Экспрессия цитокинового рецептора CCR4 в циркулирующих и кожных Т-лимфоцитах связана с миграцией Т-лимфоцитов в кожу при АД [26]. Фактически, АД собак сопровождался повышением количества CD4+ Т-лимфоцитов по сравнению со здоровыми собаками [11]. Подобным образом, оклацитиниб не показывал какого-либо пролиферативного действия *in vitro* на обработанные собачьи Т-лимфоциты [12]. Кроме того, в еще одном исследовании *in vitro* сообщается, что оклацитиниб ингибирует JAK1-зависимые цитокины, важный механизм индукции выработки IL-2 [12] и критически важный цитокин, вызывающий лимфопролиферативный эффект [27].

Состав цитокинов считается важным биомаркером для определения про-воспалительного и/или иммуносупрессивного эффекта в иммунной системе собак [28], и может помочь анализу характера иммунного ответа при АД собак [11, 29]. В циркулирующей крови концентрации свободных цитокинов обычно низки, и описанные значения сильно варьируют [30–32]. Кроме того, твердофазный иммуноферментный ана-

лиз (ИФА), применявшийся для этого анализа, не выявил клеточного источника, образующего цитокины. В этом исследовании для быстрой и одновременной оценки выработки клеточных цитокинов применялась проточная цитометрия [33]. В настоящей работе впервые описана выработка IL-4 и IFN- $\gamma$  в качестве внутрицитоплазматических цитокинов Т-лимфоцитами во время лечения АД собак олацитинибом.

На данный момент в литературе нет данных о влиянии олацитиниба на выработку IL-4 и IFN- $\gamma$  CD4+ и LT CD8+ Т-лимфоцитами. В предыдущем исследовании изучалось воздействие олацитиниба на Т-лимфоциты, культивируемые в культуре моноклеарных клеток периферической крови собак, и рекомендованная терапевтическая доза олацитиниба не влияла на пролиферацию ConA-стимулированных Т-лимфоцитов или выработку цитокинов (IL-2, IL-10, IL-15, IL-18, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ ) [12]. В настоящем исследовании снижение частоты обнаружения CD8+IL-4+ и CD8+IFN- $\gamma$ +, в дополнение к CD4+IFN- $\gamma$ + Т-лимфоцитам, наблюдалось на Д240 и Д300 после начала лечения олацитинибом, при этом частота восстановилась на Д360 после начала лечения. Интересно, что анализ *in vitro* с использованием собачьих Т-лимфоцитов, обработанных олацитинибом в дозе 1 мкМ (соответствует традиционной лечебной дозе для собак), не показал выработки иммуномодулирующих (IL-10) или воспалительных (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) цитокинов [12]. В противоположность этому, наши данные показали выраженное снижение выработки воспалительного цитокина (IFN- $\gamma$ ) CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитами, в дополнение к снижению выработки IL-4 (CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитами) до Д300 после начала лечения. Состав цитокинов на Д360 после начала лечения был сходен с описанным до лечения и не был связан с клиническим рецидивом. Возможно, что наши данные указывают на адаптацию иммунной системы собак к долговременному воздействию олацитиниба с восстановлением выработки цитокинов до уровней, наблюдавшихся до начала лечения.

## Выводы

В настоящем исследовании длительное применение олацитиниба малеата до 12 месяцев в рекомендованных дозах во время лечения АД собак не оказывало негативного воздействия на субпопуляции лимфоцитов. Таким образом, при условиях, изученных в этой группе собак, олацитиниба малеат можно рассматривать в качестве безопасной альтернативы для контроля клинических симптомов, связанных с АД собак.

### Литература

- Miller WH, Griffin CE, Campbell KL. Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, 7th edition. St Louis, MO: Elsevier Mosby, 2013; 61–65, 365–366.
- Noli C. Assessing quality of life for pets with dermatologic disease and their owners. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2019; 49: 83–93.

- Hensel P, Santoro D, Favrot C et al. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Vet Res* 2015; 11: 196.
- Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C et al. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Vet Dermatol* 2010; 21: 233–248.
- Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C et al. Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *BMC Vet Res* 2015; 11: 210.
- Shaw S. A therapeutic approach to allergic pruritus in the dog. *In Pract* 2013; 35(S1): 24–29.
- Cosgrove SB, Cleaver DM, King VL et al. Long-term compassionate use of oclacitinib in dogs with atopic and allergic skin disease: safety, efficacy and quality of life. *Vet Dermatol* 2015; 26: 171–179.
- Gonzales AJ, Bowman JW, Fici GJ et al. Oclacitinib (APOQUEL) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. *J Vet Pharmacol Ther* 2014; 37: 317–324.
- Yamaoka K, Saharinen P, Pesu Met et al. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol* 2004; 5: 253.
- Cosgrove SB, Wren JA, Cleaver DM et al. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the efficacy and safety of the Janus kinase inhibitor oclacitinib (Apoquel) in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2013; 24: 587–597.
- De Caro MG, de Oliveira Melo Junior OA, Botoni LS et al. Clinical-pathological and immunological biomarkers in dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2018; 205: 58–64.
- Banovic F, Tarigo J, Gordon H, et al. Immunomodulatory *in vitro* effects of oclacitinib on canine T-cell proliferation and cytokine production. *Vet Dermatol* 2019; 30: 17–e6.
- Favrot C, Steffan J, Seewald W et al. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol* 2010; 21: 23–31.
- Rybnycek J, Lau-Gillard PJ, Harvey R et al. Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. *Vet Dermatol* 2009; 20: 115–122.
- Olivry T, Saridomichelakis M, Nuttall T et al. Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Vet Dermatol* 2014; 25: 77–86.
- Liang K-Y, Zeger SL. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 1986; 73: 13–22.
- McCullagh P, Nelder JA. *Generalized Linear Models*. London: Chapman & Hall, 1989; p. 193–225.
- Little PR, King VL, Davis KR et al. A blinded, randomized clinical trial comparing the efficacy and safety of oclacitinib and ciclosporin for the control of atopic dermatitis in client-owned dogs. *Vet Dermatol* 2015; 26: 23–30, e7–8.
- Zoetis. APOQUEL (oclacitinib tablet): Fast-acting and safe itch relief for dogs [Internet]. Available at: [https://www.zoetis.com/products/dogs/apoquel/assets/downloadable-resources/1413113\\_m03r\\_apl\\_infosheet\\_fda\\_labelupdate\\_1\\_new2019.pdf](https://www.zoetis.com/products/dogs/apoquel/assets/downloadable-resources/1413113_m03r_apl_infosheet_fda_labelupdate_1_new2019.pdf). Accessed Mar 20, 2021.
- Lancellotti BA, Angus JC, Edginton HD et al. Age- and breed-matched retrospective cohort study of malignancies and benign skin masses in 660 dogs with allergic dermatitis treated long-term with versus without oclacitinib. *J Am Vet Med Assoc* 2020; 257: 507–516.
- Faldyna M, Leva L, Knežotigova P et al. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs - A flow cytometric study. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 82: 23–37.
- Reis AB, Carneiro CM, da Gracas CM et al. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 103: 173–185.
- Tarrant JM. The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. *Vet J* 2005; 170: 278–288.
- Rinkardt NE, Kruth SA, Kaushik A. The effects of prednisone and azathioprine on circulating immunoglobulin levels and lymphocyte subpopulations in normal dogs. *Can J Vet Res* 1999; 63: 18–24.
- Oliveira CD, Larsson CE, de Camargo MM. Longitudinal assessment of T-lymphocyte subpopulations during generalized demodicosis in dogs and their relationship with remission. *Vet Dermatol* 2015; 26: 18–22, e5–6.
- Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Marsella R et al. Review: lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1-T-helper 2 balance in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2015; 26: 124–e32.
- Lee G-W, Lee S-W, Kim J et al. Supraphysiological levels of IL-2 in Jak3-deficient mice promote strong proliferative responses of adoptively transferred naive CD8+ T cells. *Front Immunol* 2021; 11: 616, 898.
- Giunchetti RC, Silveira P, Apericida Resende A et al. Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. *Vet Parasitol* 2019; 271: 87–97.
- Moya R, Ramio-Lluch L, Parody N et al. Specific *Dermatophagoides farinae* extract for canine immunotherapy. *Vet Dermatol* 2021; 32: 131–e29.
- Majewska A, Gajewska M, Dembele K et al. Lymphocytic, cytokine and transcriptomic profiles in peripheral blood of dogs with atopic dermatitis. *BMC Vet Res* 2016; 12: 174.
- Shida M, Kadoya M, Park S-J et al. Allergen-specific immunotherapy induces Th1 shift in dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102: 19–31.
- McCandless EE, Rugg CA, Fici GJ et al. Allergen-induced production of IL-31 by canine Th2 cells and identification of immune, skin, and neuronal target cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2014; 157: 42–48.
- Farrell AM, Antrobus P, Simpson D et al. A rapid flow cytometric assay to detect CD4+ and CD8+ T-helper (Th)0, Th1 and Th2 cells in whole blood and its application to study cytokine levels in atopic dermatitis before and after cyclosporin therapy. *Br J Dermatol* 2001; 144: 24–33.