

Рекомендована д.ф.н., професором С.М.Дрогозов

УДК 615.015.23:615.21/26:577.175.14

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ ТА ГІПОЛІПІДЕМІЧНОЇ ДІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО АНТАГОНІСТА РЕЦЕПТОРІВ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-1

К.Г.Щокіна, С.Ю.Штриголь, Ю.В.Столетов, О.М.Іщенко

Національний фармацевтичний університет

Науково-дослідний інститут особливо чистих біопрепаратів, м. Санкт-Петербург, Росія

Гіперліпідемія та атеросклероз є поліетіологічними захворюваннями, основу яких складають два взаємопов'язаних процеси: порушення метаболізму ліпідів та запалення судинної стінки. Наведені результати експериментального вивчення впливу рекомбінантного антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 (АРІЛ-1), який має потужні протизапальні властивості, на перебіг гіперліпідемії у щурів. Встановлено, що на моделі гіперліпідемії АРІЛ-1 гальмує збільшення маси тіла тварин, сприяє нормалізації показників ліпідного обміну та знижує виразність запальних процесів. За гіполіпідемічною та антиоксидантною активністю АРІЛ-1 перевершує корвітин. Поєднання в АРІЛ-1 протизапальних, антиоксидантних та потужних гіполіпідемічних властивостей має високу цінність та обґрунтовує доцільність його застосування при атеросклерозі та дисліпідеміях як патогенетичного засобу, що одночасно впливає на всі провідні ланки патогенезу.

Атеросклероз та його клінічні прояви, зокрема, ішемічна хвороба серця та порушення мозкового кровообігу, є провідними причинами смертності та інвалідизації населення багатьох країн світу [1, 19]. Численні дослідження останніх років надали нові дані, які дозволили переглянути традиційні уявлення про механізми атерогенезу. Атеросклероз, який раніше вважали тільки результатом порушення ліпідного обміну та відкладення ліпідів у судинній стінці, являє собою патологічний процес з вираженими ознаками хронічного запалення в інтимі артерій та імунними реакціями, які супроводжують запалення, а також виділенням клітинами ендотелію та периферичної крові цитокінів та інших біологічно активних речовин — індукторів запалення [9, 14, 17, 20]. На теперішній час доведена провідна роль запалення в усіх фазах атеросклеротичного процесу. Інтерлейкін-1 (ІЛ-1) збільшує експресію генів факторів зсідання крові та інгібіторів фібринолізу, бере участь у процесі міграції клітинних елементів крізь ендотелій, збіль-

шує синтез молекул ендотеліальної адгезії, стимулює синтез оксиду азоту, простагландинів, фактора агрегації тромбоцитів, гострофазових запальних білків (перш за все С-реактивного) та сироваткового амілоїду А. ІЛ-1 має природний ендогенний антагоніст — протеїн, здатний блокувати рецептори до ІЛ-1 (ІЛ-1RA). Збільшення утворення прозапальних інтерлейкінів не супроводжується збільшенням їх антагоністів (зокрема, ІЛ-1RA) и протизапальних інтерлейкінів. Цей дисбаланс є дуже важливим для реалізації проатерогенних ефектів цитокінів [3, 12, 14, 17, 21].

Таким чином, гіперліпідемія та атеросклероз є поліетіологічними захворюваннями, основу яких складають два взаємопов'язаних процеси: порушення метаболізму ліпідів та запалення судинної стінки [11, 15]. Оскільки ІЛ-1 є індуктором запалення, збільшує число циркулюючих нейтрофілів, підсилює хемотаксис, дегрануляцію та індукцію супероксидантів, перспективно дослідити вплив специфічного антагоніста рецепторів ІЛ-1 на перебіг модельної гіперліпідемії [8, 18, 22].

Мета дослідження — експериментальне вивчення впливу рекомбінантного антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 (АРІЛ-1), який має потужні протизапальні властивості [6], на перебіг гіперліпідемії у щурів. В якості об'єкта дослідження використано антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1 (АРІЛ-1), отриманий у Санкт-Петербурзькому НДІ ОЧБП.

Матеріали та методи

Вивчення гіполіпідемічної та антиоксидантної дії АРІЛ-1 проводили на білих щурах самцях масою 190-230 г на моделі експериментальної гіперліпідемії, викликаній внутрішньошлунковим введенням холестерину в дозі 0,3 мг/кг та 5000 МЕ вітаміну D з кормом протягом 3-х тижнів [2]. Окрім холестерину тварини отримували 30%-ний свинячий жир протягом усього дослідження. Препаратом порівняння обрано корвітин, який є потужним антиоксидантом, ангіопротектором та широко застосовується в комплексній терапії атеросклерозу [4, 7, 13].

Таблиця 1

Вплив АРІЛ-1 та корвітину на динаміку маси тіла щурів,
МКС, МКП в умовах гіперліпідемії (n=5)

| Група | Маса тварин (г) у динаміці досліджу | | | | МКС | МКП |
|----------------------|-------------------------------------|------------|---------------|-----------------|----------------|----------------|
| | 1 день | 8 день | 15 день | 22 день | | |
| Інтактні тварини | 198,2±9,0 | 215,0±8,2 | 250,4±10,4 | 306,8±10,4 | 0,45±0,02 | 2,73±0,23 |
| Контрольна патологія | 224,0±9,6 | 276,3±10,7 | 330,6±12,2* | 410,0±15,0* | 0,76±0,05* | 4,20±0,27* |
| АРІЛ-1, 3 мг/кг | 216,5±10,4 | 240,8±9,6 | 280,2±11,38** | 322,3±12,2**/** | 0,56±0,03**/** | 3,36±0,12**/** |
| Корвітин, 50 мг/кг | 210,8±9,6 | 266,4±12,1 | 316,0±15,3* | 390,4±17,1* | 0,74±0,06* | 3,91±0,18* |

Примітка. Достовірні відмінності ($p \leq 0,05$): * — відносно показників інтактних тварин; ** — відносно контрольної патології; *** — відносно групи корвітину.

Досліджувані препарати вводили протягом 3-х тижнів в лікувально-профілактичному режимі: АРІЛ-1 — підшкірно в дозі 3 мг/кг, препарат порівняння корвітин — внутрішньом'язово в дозі 50 мг/кг (5 мг/кг у перерахунку на кверцетин) [5, 10]. Контрольні тварини отримували відповідну кількість води для ін'єкцій.

Лабораторних тварин розподілили на 4 групи по 5 щурів у кожній: перша група — інтактний контроль, друга — група контрольної патології, третя — щури, які отримували АРІЛ-1, четверта — щури, ліковані корвітином.

Протягом дослідження тварин зважували кожні 7 діб, щоб визначити динаміку зміни маси тіла. По закінченні терміну дослідження щурів виводили з експерименту в умовах евтаназії, вилучали серце, печінку та брали кров на аналіз. Вплив препаратів на перебіг гіперліпідемії оцінювали за наступними показниками: маса тіла щурів, масові коефіцієнти серця (МКС) та печінки (МКП), рівень загальних ліпідів (ЗЛ), холестерину (ХС), тригліцеридів (ТГ), вміст ліпопротеїдів низької (ЛПНЩ) та високої (ЛПВЩ) щільності в сироватці крові, рівень аспаратамінотрансферази (АсАТ) та аланінамінотрансферази (АлАТ) в сироватці крові піддослідних тварин. Ступінь антиоксидантної активності та перекисного окиснення ліпідів оцінювали за вмістом ТБК-реактивів (ТБК-Р), стан антиоксидантної системи (АОС) тварин — за рівнем відновленого глутатіону (ВГ) в гомогенаті печінки.

Масові коефіцієнти серця та печінки визначали за формулами:

$$\text{МКС} = (\text{Мсерця} / \text{Мтварини}) \times 100\%;$$

$$\text{МКП} = (\text{Мпечінки} / \text{Мтварини}) \times 100\%.$$

Вміст показників гіперліпідемії (ЗЛ, ХС, ТГ, ЛПНЩ, ЛПВЩ) визначали за допомогою тест-наборів фірми "Лахема", використовуючи напів-автоматичний біохімічний аналізатор ФП-901. Визначення ТБК-Р проводили за реакцією з 2-тіо-барбітуровою кислотою спектрофотометрично за методом І.Д.Стальної, Т.Г.Гарішвілі, активність АсАТ, АлАТ визначали за методом Райтмана-Френкеля за допомогою тест-наборів фірми "Лахема" [6].

Результати наведені у вигляді середньої (\pm) стандартної помилки, статистична достовірність міжгрупових відмінностей розрахована за критерієм t Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Результати досліджень наведені в табл. 1-3.

Протягом дослідження у тварин усіх чотирьох груп спостерігалось збільшення маси тіла: в інтактних — в 1,1 рази за тиждень; у групі контрольної патології — в 1,2 рази, у тварин, які отримували АРІЛ-1, — в 1,1 рази; у щурів, лікованих корвітином, — в 1,2 рази (табл. 1). Наприкінці дослідження маса інтактних щурів та щурів, які отримували АРІЛ-1, зроста в 1,5 рази, в групах контрольної патології та корвітину — в 1,8 рази. Маса щурів з групи АРІЛ-1 не відрізнялась від маси інтактних тварин та була достовірно нижчою, ніж у тварин з груп контрольної патології та корвітину. Збільшення маси тварин в умовах гіперліпідемії супроводжувалось збільшенням маси

Таблиця 2

Вплив АРІЛ-1 та корвітину на біохімічні показники гіперліпідемії у щурів (n=5)

| Група | ЗЛ, г/л | ЛПНЩ, ммоль/л | ХС, ммоль/л | ЛПВЩ, ммоль/л | ТГ, ммоль/л |
|----------------------|-------------|---------------|----------------|----------------|-------------|
| Інтактні тварини | 2,56±0,13 | 0,49±0,05 | 1,10±0,10 | 0,43±0,02 | 1,25±0,18 |
| Контрольна патологія | 3,20±0,19* | 0,95±0,15* | 2,50±0,19* | 0,23±0,08* | 2,59±0,22* |
| АРІЛ-1, 3 мг/кг | 2,64±0,12** | 0,54±0,03** | 1,39±0,22**/** | 0,67±0,02**/** | 2,00±0,16** |
| Корвітин, 50 мг/кг | 2,82±0,12 | 0,62±0,04 | 2,05±0,06** | 0,48±0,04** | 2,47±0,29* |

Примітка. Достовірні відмінності ($p \leq 0,05$): * — відносно інтактних тварин; ** — відносно контрольної патології; *** — відносно групи корвітину.

Таблиця 3

Вплив АРІЛ-1 та корвітину на інтенсивність процесів ВРО, стан АОС (в гомогенаті печінки) та рівень АлАТ та АсАТ (в сироватці крові) на моделі експериментальної гіперліпідемії у щурів (n=5)

| Група тварин | ТБК-Р, мкмоль/г | ВГ, мкмоль/г | АлАТ, ммоль/л | АсАТ, ммоль/л |
|----------------------|--------------------|--------------|-----------------|---------------|
| Інтактні тварини | 104,35±14,06 | 7,64±0,83 | 0,70±0,08 | 0,58±0,05 |
| Контрольна патологія | 167,43±17,00* | 5,09±0,42* | 0,95±0,05* | 0,80±0,03* |
| АРІЛ-1, 3 мг/кг | 101,28±11,16**/*** | 6,31±0,34** | 0,69±0,04**/*** | 0,62±0,03** |
| Корвітин, 50 мг/кг | 139,69±10,64 | 6,65±0,71** | 1,02±0,03* | 0,65±0,02** |

Примітка: * — $p \leq 0,05$ достовірно до інтактних тварин; ** — $p \leq 0,05$ достовірно до контрольної патології; *** — $p \leq 0,05$ достовірно до корвітину.

серця та печінки. У щурів групи контрольної патології МКС був в 1,7 рази, МКП — в 1,5 рази вище порівняно з показниками інтактного контролю. Застосування АРІЛ-1 сприяло зниженню МКС в 1,4, МКП — в 1,3 рази порівняно з групою контрольної патології. В групі корвітину ці показники практично не відрізнялись від показників групи контрольної патології.

Позитивний вплив АРІЛ-1 на перебіг гіперліпідемії підтверджують біохімічні показники ліпідного обміну (табл. 2).

Розвиток гіперліпідемії у щурів з групи контрольної патології супроводжувався достовірним підвищенням у сироватці крові вмісту ЗГ, ЛПНЩ, ХС та ТГ та зниженням рівня ЛПВЩ (антиатерогенних). Введення АРІЛ-1 привело до достовірної нормалізації всіх показників гіперліпідемії. Так, під впливом АРІЛ-1 вміст ЗГ знизився в 1,2 рази, ЛПНЩ та ХС — в 1,8 рази, ТГ — в 1,3 рази. Слід наголосити також, що ці показники достовірно не відрізнялись від аналогічних показників інтактних тварин. Рівень ЛПВЩ збільшився в 2,9 рази, що перевищує навіть показник інтактних тварин в 1,6 рази. Введення корвітину також сприяло нормалізації показників ліпідного обміну, але за виключенням ЛПВЩ ці зміни були недостовірними. Тобто можна стверджувати лише про тенденцію гіполіпідемічної дії.

Відомо, що в патогенезі гіперліпідемії та атеросклерозу певна роль належить активації вільнорадикальних процесів, тому було цікаво визначити вплив досліджуваних препаратів на стан процесів ВРО та АОК експериментальних тварин (табл. 3).

Аналіз даних табл. 3 свідчить, що в групі контрольної патології спостерігався так званий оксидативний стрес, тобто посилення процесів ВРО та погіршення стану АОС, про що свідчить збільшення рівня ТБК-Р в 1,6 рази та зниження вмісту ВГ в 1,5 рази порівняно з аналогічними показниками інтактних тварин. Введення АРІЛ-1 привело до нормалізації вмісту ТБК-Р в печінці піддослідних тварин до рівня інтактних щурів. Обидва препарати покращували стан АОС експериментальних тварин, про що свідчить збільшення рівня

ВГ в середньому в 1,3 рази. Корвітин теж сприяв зниженню рівня ТБК-Р, але ці зміни не були достовірними.

Оскільки доведена провідна роль запального процесу на всіх етапах атерогенезу, розвиток запалення на тлі модельної гіперліпідемії оцінювали за загальноприйнятими показниками маркерів цитолізу — активністю АлАТ та АсАТ в сироватці крові піддослідних тварин. Активність цих ферментів відбиває переважно стан печінки. Розвиток патології сприяв достовірному збільшенню цих показників у середньому в 1,4 рази. АРІЛ-1 сприяв нормалізації рівня АлАТ (в 1,4 рази) та АсАТ (в 1,3 рази) порівняно з контрольною патологією: досліджувані показники достовірно не відрізнялись від рівня інтактних щурів. Корвітин також сприяв нормалізації активності АсАТ, але на відміну від АРІЛ-1 не знижував активність АлАТ, яка не відрізнялась від аналогічного показника тварин групи контрольної патології.

Отже, результати свідчать, що блокада рецепторів ІЛ-1 за допомогою рекомбінантного антагоніста в умовах модельної гіперліпідемії нормалізує динаміку маси тіла, показники обміну ліпідів та прооксидантно-антиоксидантний баланс. Це експериментально обґрунтовує доцільність клінічних випробувань АРІЛ-1 в якості антиатерогенного засобу.

ВИСНОВКИ

1. На моделі гіперліпідемії АРІЛ-1 гальмує збільшення маси тіла тварин, сприяє нормалізації показників ліпідного обміну та знижує виразність запальних процесів. За гіполіпідемічною активністю АРІЛ-1 перевершує корвітин.

2. Антиоксидантна активність АРІЛ-1 в умовах модельної гіперліпідемії вище, ніж у корвітину — препарату класичного антиоксиданта кверцетину.

3. Поєднання в АРІЛ-1 протизапальних, антиоксидантних та потужних гіполіпідемічних властивостей має високу цінність та обґрунтовує доцільність його застосування при атеросклерозі та дисліпідеміях як патогенетичного засобу, що одночасно впливає на всі провідні ланки патогенезу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бриттов А.Н. // *Трудный пациент*. — 2005. — №6. — С. 87-92.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації. / За ред. член-кор. АМН України О.В. Стефанова. — К.: Авіценна, 2001. — С. 263-261.
3. Кетлинский С.С. Цитокины / С.С.Кетлинский, А.С.Симбирцев. — М.: Фолиант, 2008. — 552 с.
4. Клинико-экспериментальное обоснование применения супероксиддисмутазы в медицине / А.В. Стефанов, Л.В. Деримедведь, С.М. Дрогвоз. — Х.: Изд-во НФаУ; Золотые страницы, 2004. — 288 с.
5. Коваленко Є.М. Фармакологічне вивчення протизапальної активності антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 (АРИЛ-1): Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. — Х., 2009. — 19 с.
6. Колб В.Г. Справочник по клинической химии / В.Г. Колб, В.С. Камышиников. — 2-е изд., перераб. и доп. — Мн: Беларусь, 1982. — 366 с.
7. Компендіум 2007 — лікарські препарати / За ред. В.М. Коваленка, О.П. Вікторова. — К.: МОРІОН, 2007. — Т. 1. — С. Л-697.
8. Нагорнев В.А., Зота Е.Г. // *Успехи современной биол.* — 1996. — Т. 6, №3. — С. 320-331.
9. Овчинникова О.А. Механизмы нарушения структуры коллагена при дестабилизации атеросклеротической бляшки в клинике и эксперименте: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — С.Пб., 2008. — 23 с.
10. Сахарова Т.С. Экспериментальне вивчення фармакодинаміки та механізму дії нової групи природних антиоксидантів на основі елаготанінів: Автореф. дис. ... докт. фарм. наук. — Х., 2008. — 36 с.
11. Середавкина Н.В., Решетняк Т.М., Буренчев Д.В. и др. // *Научно-практич. ревматол.* — 2008. — №3. — С. 95-101.
12. Титов В.Н. // *Рос. кардиол. журн.* — 1999. — №5. — С. 24-29.
13. Туманов В.А., Горчакова Н.О., Горбань Є.М. та ін. // *Фітотерапія. Часопис.* — 2002. — №3-4. — С. 3-11.
14. Шальнев В.И. // *Росс. семейный врач.* — 2005. — Т. 9, №3. — С. 4-11.
15. Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M. et al. // *Circulation.* — 1995. — Vol. 91. — P. 2488-2496.
16. Hansson G.K., Libby P. // *Nat. Rev. Immunol.* — 2006. — Vol. 6. — P. 508-519.
17. Lee K.W.J., Hill J.S., Walley K.R. et al. // *CMAJ.* — 2005. — Vol. 174. — P. 461-466.
18. Martins T.B., Anderson J.L., Muhlestein J.B. et al. // *Am. J. Clin. Pathol.* — 2006. — Vol. 125. — P. 906-913.
19. Nilsson J., Ares M.P.S., Lindholm M. et al. // *Eur. Heart J.* — 2001. — Vol. 4 (Suppl. A). — P. 18-25.
20. Ross R. // *New Engl. J. Med.* — 1999. — Vol. 340. — P. 115-126.
21. Szodoray P., Timar O. // *Scand. J. Immunol.* — 2006. — Vol. 64. — P. 336-344.
22. Waehre T., Yndestad A., Smith C., Haug T. et al. // *Circulation.* — 2004. — Vol. 109. — P. 1966-1972.

УДК 615.015.23:615.21/26:577.175.14

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОГО И ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1

Е.Г.Щекина, С.Ю.Штрыголь, Ю.В.Столетов, А.М.Ищенко
Гиперлипидемия и атеросклероз являются полиэтиологическими заболеваниями, основу которых составляют два взаимосвязанных процесса: нарушение метаболизма липидов и воспаление сосудистой стенки. Приведены результаты экспериментального изучения влияния рекомбинантного антагониста рецепторов интерлейкина-1 (АРИЛ-1), обладающего мощным противовоспалительным действием, на течение модельной гиперлипидемии у крыс. Установлено, что на модели гиперлипидемии АРИЛ-1 тормозит увеличение массы тела животных, способствует нормализации показателей липидного обмена и снижает выраженность воспалительных процессов. По гиполлипидемической и антиоксидантной активности АРИЛ-1 превышает классический антиоксидант и ангиопротектор корвитин. Сочетание у АРИЛ-1 противовоспалительных, антиоксидантных и выраженных гиполлипидемических свойств очень ценно и обосновывает целесообразность его применения при атеросклерозе и дислипидемиях в качестве патогенетического препарата, проявляющего одновременное влияние на все основные звенья патогенеза.

UDC 615.015.23:615.21 / 26:577.175.14

THE EXPERIMENTAL STUDY OF THE ANTIOXIDANT AND HYPOLIPIDEMIC EFFECTS OF RECOMBINANT RECEPTOR ANTAGONISTS OF INTERLEUKIN-1

K.G.Shchokina, S.Yu.Shtrygol, Yu.V.Stoletov, O.M.Ishchenko
Hyperlipidemia and atherosclerosis are polyetiologic diseases, which are based on two interrelated processes: the lipid metabolism disorder and inflammation of the vascular wall. The results of the experimental study of the influence of a recombinant human receptor antagonist of interleukin-1 (ARIL-1) possessing a potent anti-inflammatory effect on the course of the model of hyperlipidemia in rats are given in the article. ARIL-1 has been found to inhibit the increase in body weight of animals, contributes to the normalization of lipid metabolism and reduces the severity of inflammatory processes on the model of hyperlipidemia. By its hypolipidemic and antioxidant activity ARIL-1 exceeds the classic antioxidant and angioprotector — corvutin. The combination of anti-inflammatory, antioxidant and hypolipidemic properties in ARIL-1 is very valuable and stipulates the expediency of its application in atherosclerosis and dyslipidaemia as a pathogenetic medicine that reveals simultaneous effect on the main links of pathogenesis.