

УДК 615.015.23:615.21/26:577.175.14

К.Г. ЩОКІНА

*Национальный фармацевтический университет***ІМУНОТРОПНІ ВЛАСТИВОСТІ РЕКОМБІНАНТНОГО АНТАГОНІСТА РЕЦЕПТОРІВ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-1**

Наведені результати вивчення імунотропних властивостей рекомбінантного антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 (АІЛ-1) на моделі ад'ювантного артриту (АА), патогенез якого характеризується реакціями гіперчутливості уповільненого типу та автоімунними процесами.

Виражена активність АІЛ-1 при АА пояснюється тим, що даний препарат здатен блокувати водночас запальні та імунні реакції, тобто впливає на імунну, нервову та ендокринну системи. Отримані результати підтверджують ствердження щодо ключової ролі цитокінів, зокрема ІЛ-1, в патогенезі ревматичних захворювань. Результати дослідження збігаються з даними літератури про участь ІЛ-1 в усіх етапах імунної відповіді та свідчать про здатність АІЛ-1 гальмувати запуск реакцій імунітету.

Ключові слова: ІЛ-1; АІЛ-1; модель ад'ювантного артриту; імунотропна дія

ВСТУП

Міжклітинна сигналізація в імунній системі здійснюється шляхом безпосередньої взаємодії клітин або за допомогою медіаторів міжклітинних взаємодій. При вивченні механізмів міжклітинних взаємодій, які формують імунну відповідь, була відкрита велика та різноманітна група розчинних медіаторів білкової природи – цитокінів – молекул-посередників («білків зв'язку»), що беруть участь у міжклітинній передачі сигналів [4, 6]. Цитокіни продукуються багатьма клітинами та регулюють широкий спектр процесів, які відбуваються в організмі. Одним з найважливіших прозапальних цитокінів є інтерлейкін-1 (ІЛ-1).

Синтез ІЛ-1 починається у відповідь на дію патогенних мікроорганізмів або пошкодження тканин і бере участь у розвитку місцевої запальної реакції та здійснення усього комплексу захисних реакцій, які мають назву гострофазової відповіді [12]. ІЛ-1 продукують переважно фагоцитуючі мононуклеари різної тканинної локалізації: макрофаги і моноцити периферичної крові і перитонеального ексудату, купферовські клітини печінки, клітини Лангерганса, клітини мікроглії нервової тканини [7]. Також здатністю секретувати даний цитокін володіють Т- і В-лімфоцити, фібробласти, НК-клітини, кератиноцити, нейтрофіли, ендотеліоцити. Спектр клітин-мішеней ІЛ-1 надзвичайно широкий: міоцити, синовіоцити, гепатоцити, остеоцити, лімфоцити, нейроцити, оскільки на мембранах цих клітин є специфічні рецептори до ІЛ-1 [5, 13].

Системна дія ІЛ-1 виявляється наступними явищами: активація нейроендокринної системи; перебудова імунопоезу та імуностимуляція; зміна числа циркулюючих лейкоцитів і синтезу білків гострої фази в печінці; стимуляція кістково-мозкового кровотворення та ВРО (накопичення вільних радикалів) [21]. Можна стверджувати, що характерні для ранніх етапів запального захворювання симптоми (головний біль, біль у м'язах та суглобах, сонливість, лихоманка, лейкоцитоз та збільшення вмісту білків, у тому числі імуноглобулінів) пояснюються саме дією ІЛ-1 [15].

ІЛ-1 стимулює специфічну ланку імунітету, впливаючи на функціональну активність Т- та В-лімфоцитів, які інфільтрують тканини та знаходяться в регіональних лімфатичних утвореннях (мигдалинах та лімфатичних вузлах). ІЛ-1 стимулює продукцію ІЛ-2 і збільшує кількість рецепторів ІЛ-2 з одночасним збільшенням виходу з кісткового мозку нейтрофілів [9, 15]. Одним з важливих механізмів реалізації дії ІЛ-1 є його взаємодія з імунними комплексами [12].

Діючи на клітини периферичної крові, ІЛ-1 збільшує число циркулюючих нейтрофілів, використовуючи нейтрофіли як клітини-мішені, підсилює адгезію, хемотаксис, фагоцитоз, дегрануляцію та індукцію супероксидантів [22]. Тому підвищення рівня ІЛ-1 супроводжується швидким виходом нейтрофільних гранулоцитів у циркуляцію з розвитком нейтрофілії. Крім того, ІЛ-1 посилює антитілоутворення [16, 22].

Впливаючи на клітини печінки, ІЛ-1 збільшує секрецію С3-компонента комплементу і фактора

© К.Г. Щокіна, 2010

В системі комплементу, сироваткового амілоїду А, фібриногену, деяких факторів зсідання крові (білків гострої фази), знижує синтез альбуміну, трансферину, ліпопротеїдліпази, цитохрому Р-450 [6, 7].

ІЛ-1 збільшує експресію генів факторів зсідання крові та інгібіторів фібринолізу, бере участь у процесі міграції клітинних елементів крізь ендотелій, збільшує синтез молекул ендотеліальної адгезії, стимулює синтез оксиду азоту, простагландинів, фактора агрегації тромбоцитів, гострофазових запальних білків (перш за все, С-реактивного) та сироваткового амілоїду А [9].

Отже, ІЛ-1 є плейотропним медіатором і одним з найважливіших ендогенних регуляторів різноманітних захисних реакцій організму як специфічних (імунологічних), так і неспецифічних, до яких належать запалення та стрес. Фактично ІЛ-1 — одна з центральних молекул при відповіді організму на будь-які пошкоджуючі впливи [19].

Таким чином, розвиток багатьох імунопатологічних процесів в організмі людини внаслідок активації імунної системи може супроводжуватись підвищенням рівня ІЛ-1. Існує цілий ряд патологічних станів, коли гіперпродукція ІЛ-1 спричиняє розвиток різних ускладнень. Одним з найвідоміших аутоімунних захворювань, у розвитку яких бере участь ІЛ-1, є ревматоїдний артрит (РА). Відомо, що при РА ІЛ-1 викликає гіперпродукцію гострофазових білків (С-реактивного, фібриногену тощо), бере участь у деструкції навколосуглобових тканин, сприяє диференціації В-лімфоцитів до плазматичних клітин та стимулює синтез ревматоїдного фактора [16].

ІЛ-1РА — природний рецепторний антагоніст ІЛ-1 володіє здатністю інгібувати дію ІЛ-1 на лімфоцити та фібробласти шляхом блокування зв'язування ІЛ-1 з клітинними рецепторами [16, 17]. Тому було цікаво дослідити імунотропні властивості рекомбінантного антагоніста рецепторів ІЛ-1 (АРІЛ-1).

Для вивчення імунотропних властивостей АРІЛ-1 обрано модель ад'ювантного артрити (АА), патогенез якої характеризується реакціями гіперчутливості уповільненого типу та аутоімунними процесами [1, 20].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В експерименті використано АРІЛ-1, отриманий в Санкт-Петербурзькому НДІ ОЧБП методом генної інженерії. Досліди виконані на 40 білих безпородних щурах самцях масою 180–220 г.

В якості референс-препарату ми обрали класичний протизапальний препарат — диклофенак натрію [3]. Для відтворення моделі АА був

використано ад'ювант Фрейнда, який одноразово вводили під шкіру в дистальну третину хвоста щурів з розрахунку 0,1 мл на тварину.

АРІЛ-1 та диклофенак натрію вводили внутрішньом'язово 1 раз на добу з першого дня введення ад'юванта протягом 22 днів, АРІЛ-1 — в умовно ефективній дозі 3 мг/кг, диклофенак натрію — в дозі ЕД₅₀ для АА 15,4 мг/кг [3, 8].

Вплив АРІЛ-1 та диклофенаку натрію на розвиток і перебіг АА оцінювали за їх здатністю нормалізувати час зсідання крові, загальною кількістю лейкоцитів та рівнем ШОЕ, вмістом С-реактивного білка (С-РБ) та показниками неспецифічної імунорезистентності — активністю фагоцитозу, загальним комплементом, рівнем циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у сироватці крові експериментальних тварин [3, 11]. Час зсідання крові, ШОЕ і загальну кількість еритроцитів протягом дослідження реєстрували три рази: вихідний стан, на 12 добу (генералізований артрит у контрольній групі) та наприкінці дослідження — на 22 добу. Імунологічні показники: вміст С-РБ, активність фагоцитозу, загальний комплемент, рівень ЦІК визначали на 22 добу дослідження.

Час зсідання крові визначали за Мас і Магро, лейкоцити підраховували в камері Горяєва, ШОЕ визначали за мікрометодом Т.П. Панченкова, рівень С-РБ — імунотурбідиметричним методом за допомогою тест-наборів фірми «Lachema» (Чехія) [3, 11]. Вивчення впливу АРІЛ-1 та препарату порівняння на стан імунітету тварин з АА проводили за загальноприйнятими методами імунологічних досліджень: рівень ЦІК визначали за методом преципітації у розчині поліетиленгліколю, вміст загального комплементу оцінювали за 50% гемолізом методом Назаренко Н.А., Зейфарт М., а активність фагоцитозу — за методом Stuart A.E. [3, 11].

Для статистичної обробки результатів, наведених у вигляді середнє ± стандартна помилка середнього показника, використовували t-критерій Стьюдента. У разі врахування результатів в альтернативній формі користувалися кутовим перетворенням Фішера.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень наведені в табл. 1–2 та на рисунку.

При запальному процесі, значну вираженість якого підтверджує високий лейкоцитоз, відбувається зміна складу білків плазми крові, зокрема збільшення рівня С-РБ, а також підвищення її коагуляційних властивостей [10]. Зростання ШОЕ також свідчить про диспротеїнемію (табл.1).

Таблиця 1

ДИНАМІКА ЛЕЙКОЦИТОЗУ, ШОЕ ТА ЧАСУ ЗСІДАННЯ КРОВІ ПІД ВПЛИВОМ АРІЛ-1 ТА ДИКЛОФЕНАКУ НАТРІЮ НА МОДЕЛІ АА У ЩУРІВ (n=10)

Групи тварин	Загальна кількість лейкоцитів, $\times 10^9/\text{л}$		
	Вихідний фон	12 день	22 день
Інтактна група	11,6 \pm 1,1	12,3 \pm 0,9	11,2 \pm 0,9
Контрольна патологія	10,7 \pm 0,8	28,1 \pm 1,3*	26,3 \pm 1,2*
АРІЛ-1	12,6 \pm 1,2	16,4 \pm 1,1**/**	14,2 \pm 1,0**/**
Диклофенак натрію	13,4 \pm 1,3	16,1 \pm 0,9**/**	15,1 \pm 1,2**/**
	ШОЕ, мм/год		
Інтактна група	4,6 \pm 0,8	5,0 \pm 0,5	5,2 \pm 0,7
Контрольна патологія	4,7 \pm 0,4	12,7 \pm 0,1*	9,1 \pm 0,9*
АРІЛ-1	4,1 \pm 0,5	10,4 \pm 0,7**/**/**	7,2 \pm 0,8***
Диклофенак натрію	4,3 \pm 0,4	6,8 \pm 0,7**	4,1 \pm 0,7**
	Час зсідання крові, с		
Інтактна група	97,6 \pm 3,1	92,1 \pm 1,8	102,4 \pm 1,1
Контрольна патологія	99,6 \pm 2,4	61,4 \pm 2,2*/#	58,0 \pm 2,4*/#
АРІЛ-1	102,8 \pm 1,3	92,3 \pm 1,1**	97,3 \pm 3,6**
Диклофенак натрію	96,2 \pm 1,8	100,4 \pm 2,6**	109,8 \pm 2,5**

Примітки:

* — достовірно по відношенню до групи інтактного контролю, $p \leq 0,05$;

** — достовірно по відношенню до групи контрольної патології, $p \leq 0,05$;

*** — достовірно по відношенню до групи тварин, яких лікували диклофенаком натрію, $p \leq 0,05$;

— достовірно по відношенню до показників вихідного фону, $p \leq 0,05$.

Таблиця 2

ВПЛИВ АРІЛ-1 НА ПОКАЗНИКИ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ ІМУНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ТА РІВЕНЬ ЦІК ПРИ АА У ЩУРІВ НА 22-У ДОБУ ДОСЛІДУ (n=10)

Групи тварин	Активність фагоцитозу, %		Загальний комплемент, ум. гемоліт. ОД	ЦІК, ОД	
	за 30 хв	за 90 хв		низько-молекулярні	високо-молекулярні
Інтактні тварини	61,3 \pm 1,1	66,8 \pm 1,3	41,8 \pm 2,0	0,063 \pm 0,002	0,048 \pm 0,003
Контрольна патологія	112,4 \pm 3,2*	119,2 \pm 3,0*	96,7 \pm 5,2*	0,291 \pm 0,037*	0,212 \pm 0,044*
АРІЛ-1	101,2 \pm 3,9*	109,8 \pm 2,9**/**	59,2 \pm 2,2**/**	0,150 \pm 0,048**/**	0,120 \pm 0,013**/**
Диклофенак натрію	107,3 \pm 2,1*	124,2 \pm 2,6*	76,5 \pm 5,1**/**	0,243 \pm 0,041*	0,262 \pm 0,025*

Примітки:

* — $p \leq 0,05$ — достовірно по відношенню до інтактних тварин;

** — $p \leq 0,05$ — достовірно по відношенню до контрольної патології;

*** — $p \leq 0,05$ — достовірно по відношенню до тварин, яких лікували диклофенаком натрію.

Під впливом АРІЛ-1 та диклофенаку натрію загальна кількість лейкоцитів протягом досліджу зменшилась у середньому в 1,7–1,9 рази, ШОЕ — в 1,2–2,2 рази порівняно з тваринами контрольної патології. На тлі застосування АРІЛ-1 та диклофенаку натрію відзначали також статистично значущу протягом всього дослідження нормалізацію часу зсідання крові, який достовірно не відрізнявся від показника інтактних тварин (табл. 1).

Класичним маркером запалення та імунного статусу є рівень С-РБ в сироватці крові. На 22-й день експерименту в групі контрольної патології цей показник збільшився на 121%. Застосування АРІЛ-1 сприяло достовірному зменшенню рівня С-РБ на 67% (рис.). У групі щурів, що отримували диклофенак натрію, також спостерігали значуще зменшення рівня С-РБ на 52%, але рівень С-РБ переважав аналогічний показник тварин, що отримували АРІЛ-1. Зниження вмісту С-РБ, ШОЕ та лейкоцитозу свідчить про зменшення вираженості запальної реакції.

Як відомо, у патогенезі РА провідним компонентом ушкодження є імунний фактор [1]. Тому доцільно було провести дослідження основних імунологічних показників крові при АА на тлі використання АРІЛ-1 та референс-препарату (табл. 2).

Як показали результати дослідження, при АА у щурів постраждали усі ланки імунітету, що підтвердилось збільшенням у групі контрольної патології рівня низькомолекулярних ЦІК — у 4,4, високомолекулярних — у 4,3, активності фагоцитозу в середньому — в 1,7 рази, рівня загального комплементу — у 2,2 рази в сироватці крові. При введенні АРІЛ-1 спостерігалась достовірна нормалізація показників імунітету. Так, при застосуванні АРІЛ-1 рівень низькомолекулярних ЦІК зменшився на 38%, високомолекулярних — на 55,5% порівняно з групою контрольної пато-

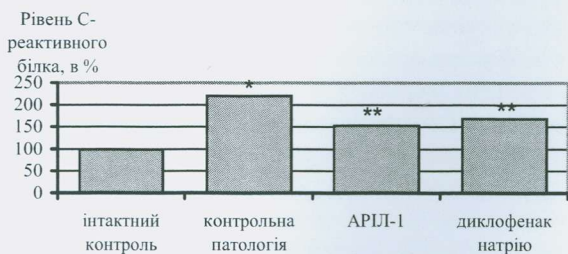


Рис. Вплив АРІЛ-1 та диклофенаку натрію на рівень С-РБ на моделі АА у щурів

Примітки:

* — достовірно по відношенню до групи інтактного контролю, $p \leq 0,05$;

** — достовірно по відношенню до групи контрольної патології, $p \leq 0,05$.

логії. Рівень загального комплементу знизився на 68%. На активність фагоцитозу за 30 та 90 хв достовірного впливу АРІЛ-1 не виявив, лише спостерігалась тенденція до зниження цього показника.

Диклофенак натрію за дією на імунологічні показники поступався АРІЛ-1: рівень загального комплементу зменшився на 36%, а під впливом АРІЛ-1 — на 68%. Вміст ЦІК та показники активності фагоцитозу достовірно не відрізнялись від показників у групі контрольної патології.

ВИСНОВКИ

За впливом на рівень лейкоцитів та час зсідання крові АРІЛ-1 наближається до дії диклофенаку натрію. Референс-препарат достовірно переважає АРІЛ-1 за впливом на ШОЕ, але поступається йому за впливом на імунологічні показники, а саме, загальний комплемент та рівень ЦІК як низькомолекулярних, так і високомолекулярних.

Виражена активність АРІЛ-1 при АА пояснюється тим, що даний препарат здатен блокувати водночас запальні та імунні реакції, тобто впливає на імунну, нервову та ендокринну системи [19].

Отримані результати підтверджують ключову роль цитокінів, зокрема ІЛ-1, у патогенезі ревматичних захворювань [18, 20].

Результати дослідження збігаються з даними літератури про участь ІЛ-1 в усіх етапах імунної відповіді та свідчать про здатність АРІЛ-1 гальмувати запуск реакцій імунітету [2].

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Бабаева А.Р. Доказательная база антицитокриновой терапии ревматоидного артрита / А.Р. Бабаева, К.С. Солоденкова, С.А. Сергеева // Вестник ВолГМУ. — 2006. — № 4. — С. 15–22.
2. Батян Г.М. Влияние рецепторного антагониста интерлейкина-1 на пролиферацию лимфоцитов при ревматических заболеваниях / Г.М. Батян, М.М. Зафранская // Мед. иммунол. — 2003. — Т. 5, № 3-4. — С. 432.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації] / За ред. член-кор. АМН України О.В. Стефанова. — К.: Авіценна, 2001. — С. 352–360.
4. Игнатьева Г.А. Современные представления об иммунитете (контуры общей теории) / Г.А. Игнатьева // Патол. физиол. и эксперимент. терапия. — 2003. — № 2. — С. 2–8.
5. Изучение механизмов местного иммуностимулирующего действия ИЛ-1b. Усиление

- функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов человека / [Е.А. Варюшина, А.Ю. Котов, А.С. Симбирцев и др.] // Иммунол. — 2000. — № 3. — С. 18–22.
6. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. — С.Пб: ООО «Изд-во Фолиант», 2008. — 552 с.
 7. Кетлинский С.С. Эндогенные иммуномодуляторы / С.С. Кетлинский, А.С. Симбирцев, А.А. Воробьев. — С.Пб.: Гиппократ, 1992. — 256 с.
 8. Коваленко Є.М. Фармакологічне вивчення протизапальної активності антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 (АІЛ-1): дис... канд. фармацевт. наук. — Х., 2009. — 160 с.
 9. Ованесян И.Г. Современные представления о роли цитокинов в гомеостазе / И.Г. Ованесян // Научно-мед. журн. — 2006. — № 4. — С. 8–17.
 10. Проблема изменения реологических свойств крови при ревматических заболеваниях / [Е.Л. Насонов, Н.Н. Фирсов, Т.В. Коротаев и др.] // Гемореол. и микроциркуляция: тез. междунар. конф. — Ярославль, 2003. — С. 27–29.
 11. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М., 2009. — 398 с.
 12. Симбирцев А.С. Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. — 2002. — № 1. — С. 4–6.
 13. Фрейдлин И.С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции / И.С. Фрейдлин // Иммунол. — 2001. — № 5. — С. 4–7.
 14. Черешнев В.А. Иммунология воспаления: роль цитокинов / В.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев // Мед. иммунол. — 2001. — Т.3, № 3. — С. 361–368.
 15. Arend W.P. Physiologic role of interleukin-1 receptor / W.P. Arend, C. Gabay // Arthritis Res. — 2000. — Vol.2, № 4. — P. 245–248.
 16. Dinarello C.A. Blocking IL-1 in systemic inflammation / C.A. Dinarello // JEM. — 2005. — Vol. 201, № 9. — P. 1355–1359.
 17. Ikonomidis I. Inhibition of interleukin-1 by anakinra improves vascular and left ventricular function in patients with rheumatoid arthritis / [I. Ikonomidis, J.P. Lekakis, M. Nikolaou et al.] // Circulation. — 2008. — Vol.117. — P. 2662–2669.
 18. Lovell D. Biologic agents for the treatment of juvenile rheumatoid arthritis: Current status / D. Lovell // Paediatr. Drugs. — 2004. — № 6(3). — P. 137–146.
 19. McColl B.W. Systemic inflammatory stimulus potentiates the acute phase and CXC chemokine responses to experimental stroke and exacerbates brain damage via interleukin-1 and neutrophil-dependent mechanisms / B.W. McColl, N.J. Rothwell, S.M. Allan // J. Neurosci. — 2007. — Vol. 27. — P. 4403–4412.
 20. O'Dell J.R. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis / J.R. O'Dell // N. Engl. J. Med. — 2004. — Vol. 350, № 25. — P. 2591–2602.
 21. Production of interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes / [G. Palmer, P.-A. Guerne, F. Mezin et al.] // Arthritis Res. — 2002. — Vol. 4, № 3. — P. 226–231.
 22. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration in vivo by indirect mechanisms / [L.H. Faccioly, E.P. Souza, F.Q. Cunha et al.] // J. Agents Actions. — 1990. — Vol. 30, № 3–4. — P. 344–349.

УДК 615.015.23:615.21/26:577.175.14

К.Г. Щекіна

**ИММУНОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО
АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1**

Приведены результаты изучения иммуностропных свойств рекомбинантного антагониста рецепторов ИЛ-1 (АРИЛ-1) на модели адьювантного артрита (АА), патогенез которого характеризуется реакциями гиперчувствительности замедленного типа и аутоиммунными процессами.

Выраженная активность АРИЛ-1 при АА объясняется тем, что данный препарат способен блокировать одновременно воспалительные и иммунные реакции, то есть влияет на иммунную, нервную и эндокринную системы. Полученные результаты подтверждают мысль относительно ключевой роли цитокинов, в частности ИЛ-1, в патогенезе ревматических заболеваний. Результаты исследования совпадают с данными литературы об участии ИЛ-1 во всех этапах иммунного ответа и свидетельствуют о способности АРИЛ-1 тормозить запуск реакций иммунитета.

Ключевые слова: ИЛ-1; АРИЛ-1; модель адьювантного артрита; иммуностропное действие

UDC 615.015.23:615.21/26:577.175.14

K.G. Shchokina

**IMMUNOTROPIC PROPERTIES OF RECOMBINANT ANTAGONIST
OF RECEPTORS OF INTERLEUKIN-1**

This article shows the results of the study of immunotropic properties of recombinant antagonist of receptors IL-1 (ARIL-1) on the model of adjuvant arthritis (AA), the pathogenesis of which is characterized by hypersensitivity reactions in slow-type and by autoimmune processes.

Pronounced activity of ARIL-1 with AA is due to the fact that this drug can block simultaneously inflammatory and immune responses, it means it affects the immune, nervous and endocrine systems. Got results confirm the assertion about the key role of cytokines, particularly IL-1 in the pathogenesis of rheumatic diseases. The results of the study coincide with facts of literature about the participation of IL-1 in all stages of the immune response and suggest about the ability of ARIL-1 to inhibit immune reactions start.

Key words: IL-1; ARIL-1; model of adjuvant arthritis; immunotropic effect

Адреса для листування:

м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

Кафедра фармакології НФаУ.

Тел: (057) 706-30-69.

Надійшла до редакції: 17.05.10