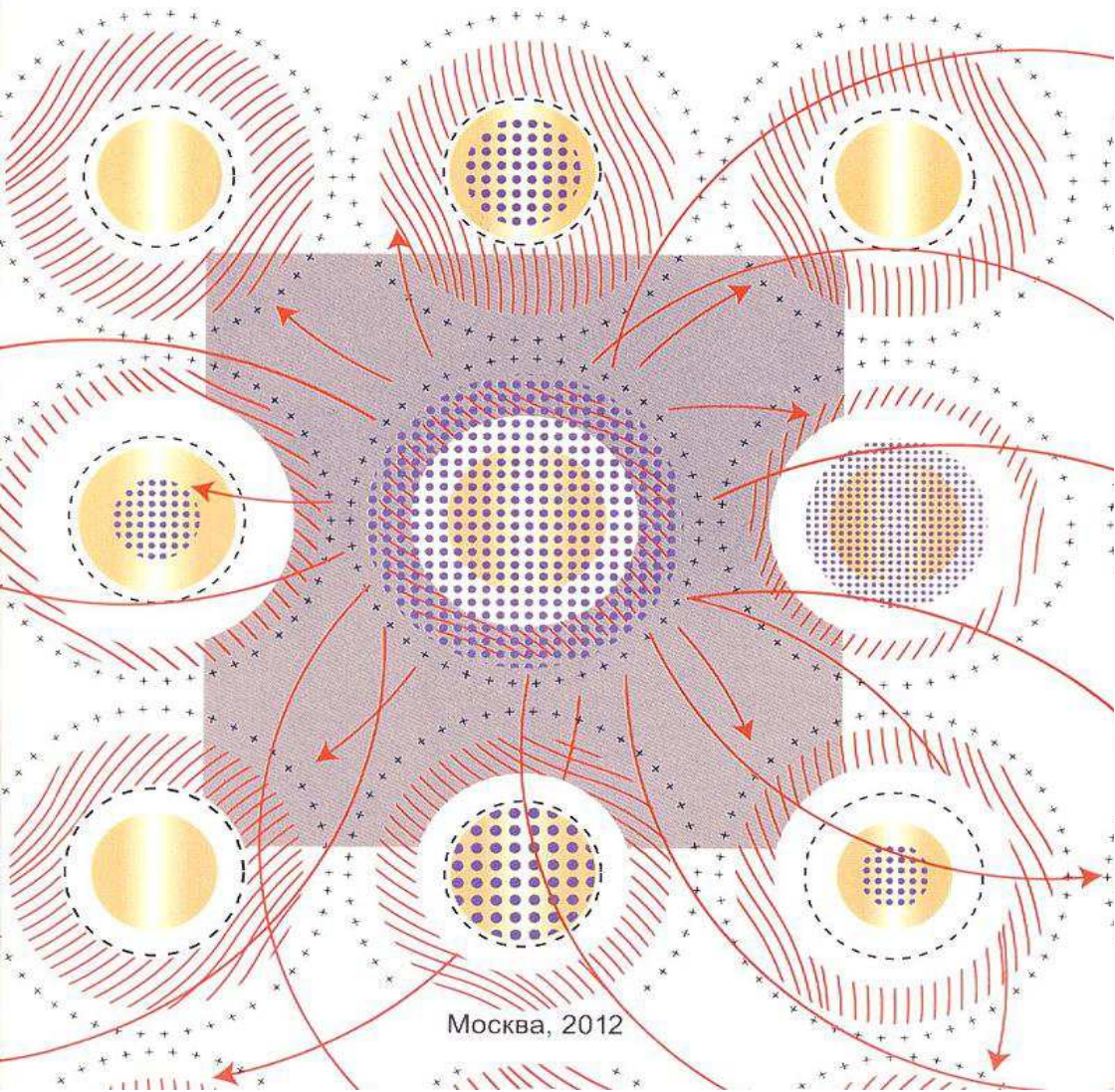


Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи»

ИНТЕРФЕРОН - 2011

Сборник научных статей



Москва, 2012

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА СТЕЛЛАНИН И ЕГО МЕТАБОЛИТА 1,3-ДИЭТИЛБЕНЗИМИДАЗОЛИЯ ЙОДИДА НА РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЦИТОКИНЫ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА

Е. И. Исаева, Б. В. Страдомский, Ю. Ю. Солодунов

ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоц-
развития России, Москва

ООО «Фармпрепарат», Ростов-на-Дону

Установлено, что многие проявления инфекции, вызванные вирусами, связаны с продукцией провоспалительных цитокинов ИФН- α , ИФН- γ , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-12, ФНО- α и др. В результате их действия в противовирусный ответ активно вовлекаются Т-лимфоциты, нейтрофилы и другие иммунокомпетентные клетки [1, 3]. Например, у больных гриппом H1N1 отмечается закономерное повышение уровня провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 с максимальным значением в период разгара заболевания. В периодах угасания клинических симптомов параллельно с положительной динамикой заболевания наблюдается постепенное снижение уровня этих цитокинов до нормальных значений. Лимфоциты, активированные цитокинами, особенно ФНО- α , играют важную роль в межклеточном взаимодействии иммунной системы организма [1, 3].

Изучение особенностей синтеза цитокинов при экспериментальных инфекциях позволяет получить информацию о воздействии вируса на синтез белков, определяющих защитные функции в условиях организма. Синтез цитокинов, как и других белков, осуществляется в несколько этапов: транскрипция, процессинг мРНК, трансляция, процессинг белка и секреция белка. Каждый этап может регулироваться, поэтому важно знать не только уровень продукции цитокина, но и на каком этапе происходит ингибирование или активация его синтеза. Одними из методов определения экспрессии генов цитокинов по уровню их мРНК являются обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР). При помощи ОТ-ПЦР возможно подробно изучить альтернативный сплайсинг цитокинов [2].

Целью настоящего исследования была разработка экспериментальной модели для оценки потенциального влияния препарата Стелланин на экспрессию генов основных регуляторных цитокинов клеточного иммунитета.

Препарат «Стелланин капли для местного применения и приема внутрь 40 мг/кг» зарегистрирован в качестве антисептического средства при инфекциях рото-глотки. В то же время, эффективность препарата превосходит имеющиеся аналоги с

подобным антисептическим действием, что позволяет предположить наличие у Стелланина дополнительных терапевтических свойств. В этой связи было изучено влияние на иммунную систему Стелланина (1,3-диэтилбензимидазолия трийодида), а также его физиологического метаболита – 1,3-диэтилбензимидазолия йодида в сравнении с современным иммуностимулирующим препаратом Глутоксим.

Материалы и методы

Оценка активности

Оценка противовирусной активности препаратов Стелланин, его метаболита 1,3-диэтилбензимидазолия йодида и препарата сравнения Глутоксим осуществлена в соответствии с требованиями Фармакологического государственного комитета РФ (2005).
Схема проведения исследования

Препараты Стелланин и 1,3-диэтилбензимидазолия йодид вводили перорально дважды в течение одного дня по 0,025 мл в дозах 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида 40 мг/кг и 1,3-диэтилбензимидазолия йодида 20 мг/кг, Глутоксим – дважды в дозе 10 мг/кг внутривентриально б/п мышам.

Кроме того, препарат Стелланин вводили в течение 8 дней, начиная курс за 24 часа до инфицирования мышей вирусом гриппа. В первый день препараты вводили двукратно. Использовали дозу Стелланина 40 мг/кг.

Мышам контрольной группы вируса вводили в тех же условиях физраствор по тем же схемам.

Для оценки в сравнительном аспекте влияния препаратов на экспрессию генов основных регуляторных цитокинов было проведено исследование транскрипции 10 генов в клетках иммунной системы: интерлейкинов ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, фактора некроза опухоли ФНО- α и интерферонов ИФН- γ и ИФН- α . Об активации экспрессии генов судили по наличию мРНК цитокинов в мононуклеарах периферической крови (МПК). Определение мРНК проводили с использованием методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Выделение РНК осуществляли согласно инструкции систем для выделения «Рибо-сорб» производства фирмы «Ампли-Сенс (Москва). Обратная транскрипция и ПЦР-амплификация были выполнены в соответствии с методикой, предложенной Gelder et al., (1995). В работе были использованы пары праймеров для исследуемых цитокинов, определяющих клеточный и гуморальный иммунные ответы: ИФН- α , ИФН- γ , ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12. В качестве положительного контроля использовали β -актин. [Lin et al., 1998].

ПЦР проводили в режиме автоматической амплификации на приборе «Терцик» (ЗАО «ДНК-Технология», Москва). Продукты ПЦР анализировали методом горизонтального электрофореза в 1,7% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, с последующей визуализацией в ультрафиолетовом спектре. Количество продукта анализировали, используя денситометрическую компьютерную программу Image J. 1.36 (NIH, США), на флуоресцентном ПЦР-анализаторе Ала1/4 (Biosan). Оценку уровня изучаемых мРНК проводили по отношению абсолютной люминесценции мРНК цитокина к люминесценции мРНК контроля фона – β -актина.

Учет результатов экспериментов проводили по показателям экспрессии цитокинов (относительного уровня соответствующей мРНК) в группах животных, получавших препарат по отношению к контрольной группе.

Рассчитывали средние значения по каждой группе животных со среднестатистическим отклонением в системе Microsoft Excel. Цифровой материал подвергался статистической обработке с использованием метода Стьюдента.

Результаты

Результаты изучения влияния однодневного двукратного применения препарата Стелланин (1,3-диэтилбензимидазолия трийодида) в дозе 40 мг/кг перорально, его метаболита 1,3-диэтилбензимидазолия йодида в дозе 20 мг/кг перорально (препараты применяли в эквимолекулярных дозах) и Глутоксима в дозе 10 мг/кг внутривентриально, а также Стелланина при курсовом 8-дневном пероральном введении в дозе 40 мг/кг на уровень экспрессии цитокинов у мышей представлены на рисунках 1 – 4.

Полученные данные однозначно свидетельствуют о существенном воздействии препарата Стелланин на концентрацию мРНК изученных цитокинов. Аналогичное воздействие оказывает и 1,3-диэтилбензимидазолия йодид. Причем динамика изменения экспрессии цитокинов при воздействии обоих препаратов идентична (рис. 1, 2). Так, на шестой день после введения оба препарата статистически значимо повышали концентрацию матричной РНК интерферона I типа – ИФН- α , а также интерферона II типа – ИФН- γ . Активация биосинтеза интерферонов свидетельствует об эффективности применения Стелланина при вирусной инфекции. На 12-е сутки после введения обоих препаратов экспрессия генов ИФН- γ и ИФН- α нормализовалась, приближаясь к контрольному уровню.

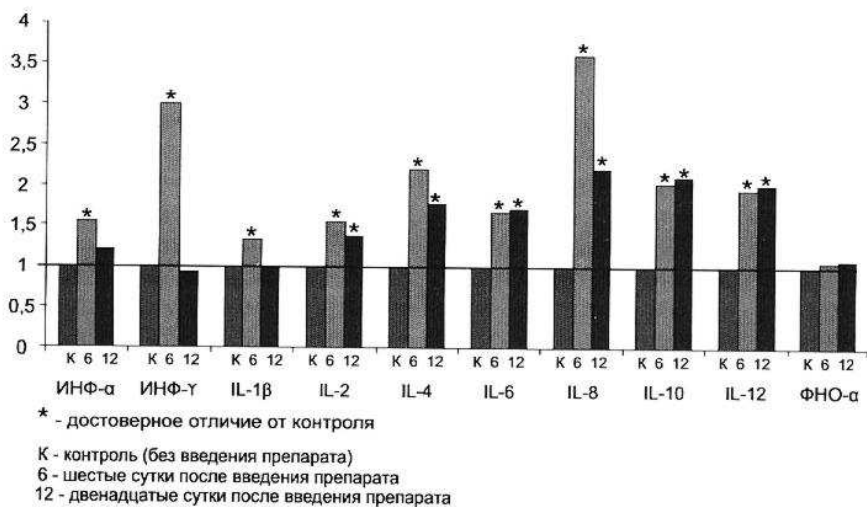


Рис. 1. Влияние Стеллатина (40 мг/кг, однократное 2-кратное применение) на экспрессию генов цитокинов.

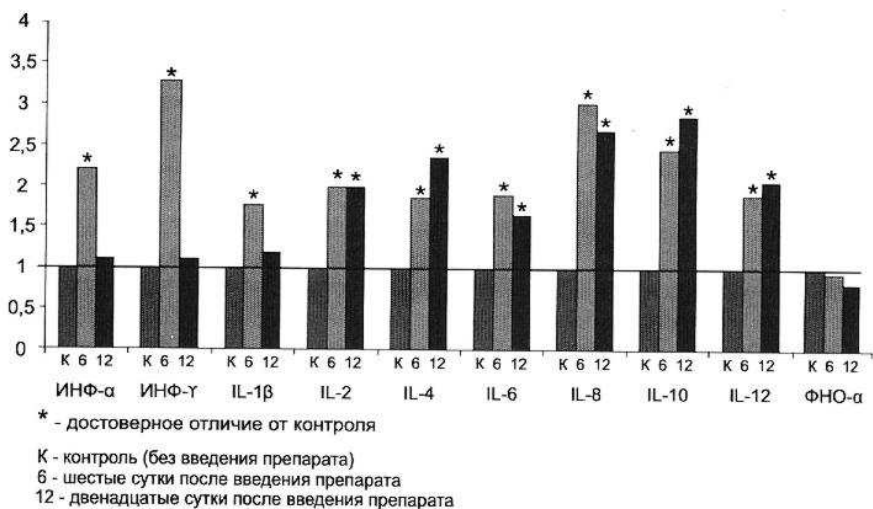


Рис. 2. Влияние 1,3-дистилбензимидазолия йодида (20 мг/кг, однократное 2-кратное применение) на экспрессию генов цитокинов.

Сходное, но менее выраженное воздействие препараты оказывали и на интерлейкин IL-1 β . Известно, что этот цитокин способствует активации фагоцитов, высвобождению медиаторов воспаления — простагландина E2, тромбоксанов и фактора активации тромбоцитов, а также запускает биосинтез интерлейкинов IL-6 и IL-8.

В то же время, Стелланин и 1,3-диэтилбензимидазолия йодид не влияли на экспрессию ФНО- α ни в один из сроков наблюдения.

При анализе результатов исследования было отмечено, что оба препарата повышали транскрипцию генов интерлейкинов IL-2 и IL-12 на 6-й и 12-й дни наблюдения. Интерлейкин IL-2 (вырабатывается Th1-хелперами) индуцирует пролиферацию Т-клеток и созревание цитотоксических Т-лимфоцитов, усиливает функцию моноцитов, стимулирует выработку гамма-интерферона — ИФН- γ .

Интерлейкин IL-12 также относится к провоспалительным цитокинам и принимает, как и IL-2, участие в развитии Th1-типа иммунного ответа. Продуцируется моноцитами, макрофагами и другими иммунокомпетентными клетками. IL-12 является ключевым цитокином инициации эффективной иммунной защиты, активирует дифференцировку и пролиферацию Т-лимфоцитов, а также продукцию других цитокинов, стимулирует синтез интерферона- γ .

Анализируя влияние Стелланина и его метаболита 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на экспрессию цитокинов, необходимо отметить, что оба препарата способны активировать трансляцию генов интерлейкинов IL-2 и IL-12, а также гамма-интерферона, т.е. цитокинов, обуславливающих Th1-тип иммунного ответа (клеточный иммунитет).

Кроме того, Стелланин и его метаболит стимулируют биосинтез интерлейкинов IL-4, IL-6 и IL-10 — цитокинов, принимающих участие в формировании Th2-типа иммунного ответа (гуморальный иммунитет).

В то же время, введение препарата сравнения Глутоксима оказывало значительно менее выраженный эффект на экспрессию цитокинов (рис. 3).

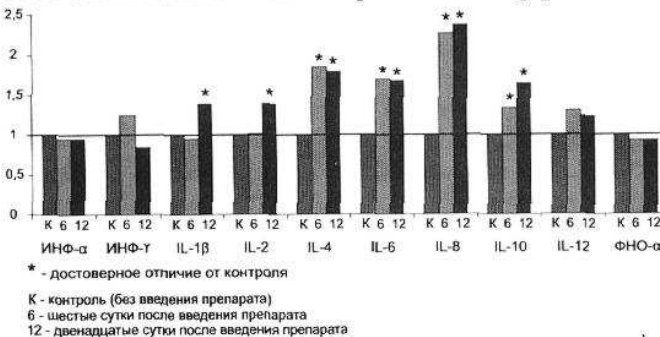


Рис.3. Влияние Глутоксима (10 мг/кг, однократное 2-кратное применение) на экспрессию генов цитокинов.

Глутоксим не влияет на содержание мРНК интерферонов (α и γ) ни на 6-й, ни на 12-й дни после введения. Не изменяет препарат и уровень экспрессии интерлейкина IL-12 в эти же сроки наблюдения. На концентрацию мРНК интерлейкина IL-2 Глутоксим оказывал стимулирующее воздействие только на 12-е сутки эксперимента. Таким образом, необходимо отметить, что препарат Глутоксим фактически не оказывал в эксперименте влияния на молекулярные факторы, ответственные за формирование Th1-типа иммунного ответа (клеточного иммунитета).

Наиболее выраженное влияние на экспрессию изученных цитокинов оказывает препарат Стелланин при курсовом 8-дневном применении (рис. 4).

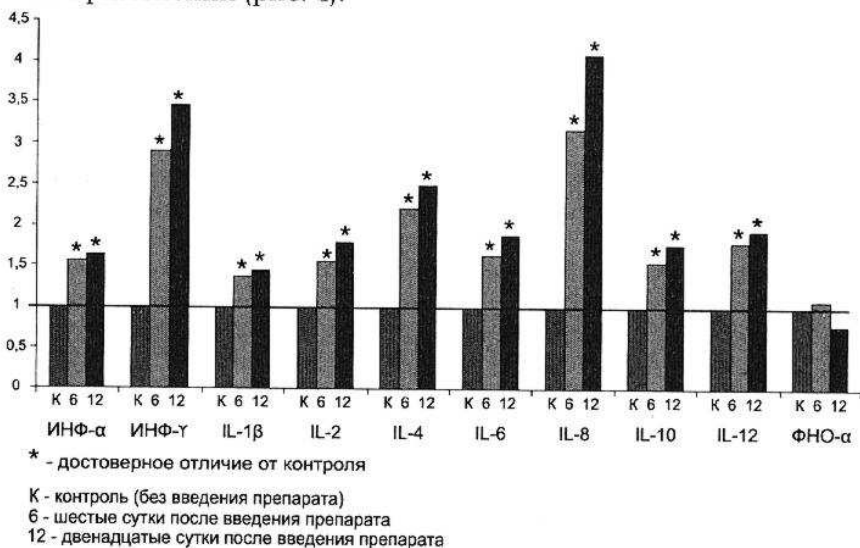


Рис. 4. Влияние Стелланина (40 мг/кг, курсовое 8-дневное применение) на экспрессию генов цитокинов.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что препарат 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида в значительной степени и статистически достоверно активировал экспрессию интерлейкинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 и интерферонов ИФН- α , ИФН- γ , не влияя при этом на экспрессию ФНО- α .

Таким образом, необходимо заключить, что препарат Стелланин и его метаболит — 1,3-диэтилбензимидазолия йодид значительно и однонаправленно активируют экспрессию таких важнейших сигнальных молекул организма, как цитокины (интерлейкины, интерфероны), регулирующих межклеточные и межсистемные взаимодействия, определяющих выживаемость клеток, стимуляцию или подавление их роста, дифференциацию, функцию

нальную активность и апоптоз. Надо отметить, что препараты обладают весьма пролонгированным действием (эффект длится до 12 суток после введения препаратов). Причем активации подвергается экспрессия факторов, участвующих в развитии как Th1-типа иммунного ответа (клеточный иммунитет), так и Th2-типа иммунного ответа (гуморальный иммунитет). Необходимо также заключить, что свое влияние на иммунную систему препарат Стелланин реализует, по-видимому, за счет биологической активности своего естественного метаболита — катиона 1,3-диэтилбензимидазолия. При курсовом применении эффект Стелланина на экспрессию цитокинов усиливается и пролонгируется. В то же время, препарат сравнения — Глутоксим значительно уступает Стелланину по влиянию на экспрессию цитокинов, фактически не затрагивая факторы, ответственные за формирование Th1-типа иммунного ответа.

Полученные результаты позволяют судить о препарате Стелланин как о высокоэффективном иммуностимуляторе, значительно превосходящем по специфической фармакологической активности препарат Глутоксим. Причем иммуностропное действие Стелланина опосредуется эффектами его физиологического метаболита — 1,3-диэтилбензимидазолия йодида.

Рекомендуемая литература

1. Кетлинский С. А., Калинин Н. И. *Иммунология*. 1995. № 3, с. 30—44.
2. Сенников С. В., Сулков А. Н. *Цитокины и воспаление*. 2005. Т. 4, № 1, с. 22—27.
3. Prasad A. S., Fitzgerald J. T., Bin Bao et al. *Annals of Internal Medicine*. 2000. v. 133, N. 4, p. 245—252.
4. Gelder C. M., Thomas P. S., Yates D. H. et al. *Thorax*. 1995. 50: 1033—1037.
5. Lin Y., Zhang M., Barnes P. F. *Infection and Immunity* 1998. 66: 1121—1126.
6. Yamamura M., Uyemura K., Deans R. J. et al. *Science* 1991. 254, 11: 277—279.