

Фрігопротекторні властивості та вплив рекомбінантного рецепторного антагоніста на рівень інтерлейкіну-1 при гострому загальному охолодженні

К.Г.Щокіна, С.Ю.Штриголь, С.М.Дрогвоз, Т.В.Горбач

Національний фармацевтичний університет, Харківський національний медичний університет
Харків, Україна

У статті наведені результати експериментального вивчення фрігопротекторної дії рекомбінантного антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1. Встановлено, що одноразове лікувальне або профілактичне застосування антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 в дозі 3 мг/кг при холодовій травмі зменшує рівень інтерлейкіну-1, що сприяє підвищенню холодової витривалості тварин, а також забезпечує відновлення пригнічених показників локомоторної, дослідницької активності та емоційності тварин, тону скелетних м'язів, координації рухів та фізичної витривалості після переохолодження. Антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1 виявляє виражену фрігопротекторну дію, що обґрунтовує можливість його застосування в якості ефективного засобу профілактики та лікування наслідків холодової травми.

Ключові слова: холодова травма, фрігопротекторна дія, рекомбінантний антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1.

ВСТУП

Підвищення холодової резистентності є одним з найменш вивчених напрямів фармакології, тому створення препаратів із фрігопротекторною дією є актуальним завданням [5, 9, 11, 13, 14, 18, 19]. Останніми роками набуває розвитку перспективний напрямок досліджень, пов'язаний із вивченням цитокінових механізмів у розвитку різних патологічних станів, зокрема вивчення цитокінового профілю при гострій

холодовій травмі [7, 8, 20]. Визначення вмісту інтерлейкіну-1 (ІЛ-1) є цінним при діагностиці кріопшкоджень [1, 10, 16]. У наших попередніх дослідженнях доведено, що антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1 (АРІЛ-1) здатний підвищувати холодову резистентність [17].

Метою дослідження було визначення можливого зв'язку між змінами вмісту ІЛ-1 та фрігопротекторною дією рекомбінантного антагоніста рецепторів ІЛ-1. Використано АРІЛ-1, отриманий у Санкт-Петербурзькому НДІ ОЧБП.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Фрігопротекторну дію АРІЛ-1 вивчали на білих мишах-самцях масою 16-21 г у співставленні з препаратом порівняння ацетилсаліциловою кислотою (АсК) [12] на моделі загального охолодження, для відтворення якої тварин вміщували до прозорої морозильної камери з постійною температурою -18°C [2, 4]. До початку дослідів мишей утримували при температурі $+21-22^{\circ}\text{C}$. Під час охолодження кожна тварина знаходилась в індивідуальному пластиковому пеналі ємністю 1 дм³, спостереження за станом мишей відбувалось постійно.

У першій серії дослідів визначали ефективність досліджуваних препаратів при введенні в профілактичному режимі (за 30 хв. до охолодження). АРІЛ-1 вводили підшкірно в дозах 3 мг/кг та 15 мг/кг, АсК антагоніста — внутрішньошлунково в дозі 25 мг/кг. Доза АРІЛ-1 3 мг/кг є умовно-терапевтичною за протизапальним ефектом, 15 мг/кг — умовно-терапевтичною за психо- та нейропротекторною дією [6, 15]. Фрігопротекторну активність оцінювали за часом виживання мишей (до агональ-

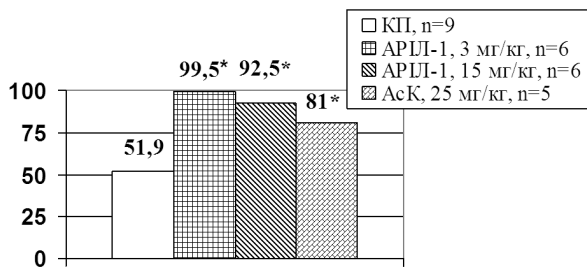


Рис. 1. Вплив АРІЛ-1 та АсК на час життя мишей при гострому загальному охолодженні (-18°C).

Примітка: * – достовірні відмінності з групою контрольної патології (p≤0,05).

ного вдиху) в умовах гострого охолодження за формулою: $A_{fr} = (T_s / T_{sc}) * 100\%$, де A_{fr} – фрігопротекторна активність, %; T_s – середня тривалість життя в групі досліджуваного препарату, хв.; T_{sc} – середня тривалість життя в групі контрольної патології, хв.

У другій серії дослідів АРІЛ-1 та АсК вводили у профілактичному режимі в дозах 3 мг/кг та 25 мг/кг. Через 30 хв. після введення препаратів тварин вміщували, як зазначено вище, до морозильної камери при -18°C на 30 хв. Цей термін холодового впливу, за даними попередніх дослідів, є сублетальним: не спричиняє смертельних наслідків, але суттєво погіршує загальний стан мишей. Через 20 хв. після завершення загального охолодження тварин декапітували та визначали ІЛ-1β у крові методом імуноферментного аналізу з використанням набору виробництва «Біоконтур» (Санкт-Петербург, Росія) на аналізаторі STATE FAX (США).

У третій серії дослідів визначали вплив АРІЛ-1 при введенні в профілактичному та лікувальному режимах на перебіг початкового відновлювального періоду після загального гострого охолодження. Для цього тварин вміщували, як зазначено вище, до морозильної камери при -18°C на 30 хв. Після завершення холодової експозиції миші знаходились при температурі +21-22°C, подальші дослідження починали через 20 хв. Спочатку визначали локомоторну, дослідницьку активність і вегетативний супровід емоційних реакцій у тесті відкритого поля, м'язовий тонус і координацію рухів – за кількістю мишей, що за певні проміжки часу впали зі стрижня діаметром 2 см, який обертається зі швидкістю 10 об./хв. [3].

На заключному етапі дослідження оцінювали фізичну витривалість за тестом примусового плавання з навантаженням. Мишей із вантажем (15% від маси тіла на корені хвоста) вміщували в басейн з водою кімнатної темпера-

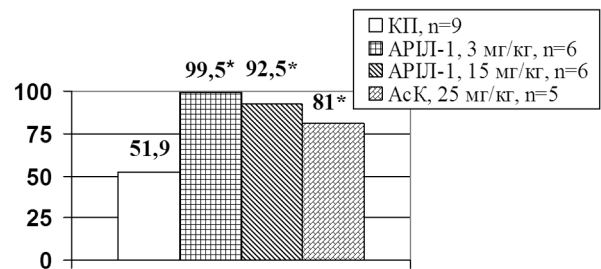


Рис. 2. Фрігопротекторна активність АРІЛ-1 та АсК на моделі гострого загального охолодження.

тури (+21-22°C) та реєстрували час плавання. Критерієм виснаження було знаходження тварини під водою з неспроможністю спливати на поверхню протягом 10 с.

Достовірність відмінностей у разі обліку результатів як «середня±стандартна помилка» розраховували за t-критерієм Стьюдента, при їх реєстрації в альтернативній формі – за кутовим перетворенням Фішера.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати наведені на рис. 1-2, табл. 1-4.

Аналіз даних рис. 1-2 свідчить, що АРІЛ-1 в обох дозах сприяв достовірному збільшенню часу життя експериментальних тварин порівняно з групою контрольної патології. Фрігопротекторна активність АРІЛ-1 склала 91,7% для дози 3 мг/кг та 78,2% для дози 15 мг/кг, що перевищує фрігопротекторну активність АсК в 1,6 разу та 1,4 разу відповідно. Для подальших досліджень обрано дозу 3 мг/кг.

Після гострого загального охолодження вміст ІЛ-1β в крові тварин групи контрольної патології збільшився на 66,3% порівняно з показником у інтактних тварин (табл. 1). На тлі АРІЛ-1 вміст ІЛ-1β нормалізувався і перевищував рівень інтактних тварин лише на 9,4%. АсК, на відміну від АРІЛ-1, майже не впливала

ТАБЛИЦЯ 1

Вплив АРІЛ-1 на вміст ІЛ-1β у крові мишей після загального охолодження

Групи тварин	Вміст інтерлейкіну-1β, пкг/мл
Інтактний контроль, n=6	88,33±10,51
Контрольна патологія, n=6	146,92±12,13*
АРІЛ-1, 3 мг/кг, n=6	96,64±11,95#
АсК, 25 мг/кг, n=7	124,91±18,10

Примітки: * – достовірні відмінності з групою інтактного контролю (p≤0,05), # – достовірні відмінності з групою контрольної патології (p≤0,05).

ТАБЛИЦЯ 2

**Вплив АРІЛ-1 на поведінку мишей у тесті відкритого поля через 20-30 хв.
після гострого загального охолодження**

Показники	Інтактний контроль (n=15)	Контрольна патологія (n=11)	АРІЛ-1, 3 мг/кг	
			профілактичний режим (n=7)	лікувальний режим (n=7)
Рухова активність:				
– перетнуто квадратів	31,3±6,1	4,0±1,2*	18,4±2,9*#	20,7±6,0#
– вертикальних стійок	7,6±1,5	0,4±0,3*	1,7±0,7*	2,6±1,7*
Дослідницька активність (обстежено отворів)	30,1±2,7	5,4±1,8*	9,8±1,7*	10,3±2,7*
Емоційні та вегетативні реакції:				
– грумінг	1,1±0,5	0,2±0,2	0,9±0,3#	0,7±0,3
– фекальні полюси	0,1±0,1	0	0	0
– уринації	0	0	0	0
– сума показників	1,3±0,9	0,2±0,2	0,9±0,3	0,7±0,3
Сума всіх активностей	70,0±7,8	10,0±2,6*	30,0±4,7*#	34,3±9,2*#

Примітки: * – достовірні відмінності з групою інтактного контролю ($p \leq 0,05$), # – з групою контрольної патології ($p \leq 0,05$).

на вміст ІЛ-1 β , рівень якого залишався збільшеним на 41,4%. Це дозволяє оцінити роль ІЛ-1 у розвитку кріопорушень та визначити механізм фрігопротекторної дії АРІЛ-1.

За тестом відкритого поля в ранньому відновлювальному періоді після гострого охолодження у мишей групи контрольної патології достовірно пригнічувалась рухова активність, дослідницька поведінка та вегетативний супровід емоційних реакцій: сума всіх активностей зменшилась у 7 разів відносно інтактного контролю (табл. 2). АРІЛ-1 за обох режимів введення достовірно стимулював рухову активність і дослідницьку поведінку, відновлював показники емоційного стану тварин після охолодження. Сума всіх активностей достовірно зростала в 3 рази за профілактичного введення та в 3,4 разу – за лікувального.

Дані табл. 3 свідчать, що охолодження спричинило достовірне зниження тонузу скелетних м'язів та погіршення координації рухів тварин групи контрольної патології порівняно з інтактними (не втрималися на стрижні до 30 с відповідно 90,9% та 46,7% мишей, понад 30 с – 9,1%

та 53,3%). АРІЛ-1 за обох режимів введення сприяв збільшенню часу втримання тварин на стрижні (до 30 с – 71,4% мишей при профілактичному та 85,7% при лікувальному введенні, понад 30 с – 28,6% при профілактичному та 14,3% при лікувальному режимі). Це свідчить про тенденцію до відновлення м'язового тонузу та координації рухів після холодової травми під дією АРІЛ-1, особливо при профілактичному введенні, коли відсутні достовірні відмінності з інтактними тваринами.

Отримані дані збігаються з результатами вивчення фізичної витривалості мишей у тесті плавання з навантаженням через 2,5 год. після холодової травми. Як видно з табл. 4, після охолодження час плавання мишей достовірно знизився в 1,4 разу порівняно з показником інтактних тварин (до 1 хв. на поверхні води втрималось 72,8% мишей із групи контрольної патології та 30% інтактних).

АРІЛ-1 за обох режимів введення сприяв достовірному збільшенню фізичної витривалості в 2,1-2,7 разу. Результати свідчать не тільки про повне відновлення м'язового тонузу та

ТАБЛИЦЯ 3

**Вплив АРІЛ-1 на м'язовий тонус і координацію рухів у мишей
у ранньому відновлювальному періоді після гострого загального охолодження
в тесті стрижня, що обертається, за критерієм падіння (абс./%)**

Час падіння зі стрижня	Інтактний контроль (n=15)	Контрольна патологія (n=11)	АРІЛ-1, 3 мг/кг	
			профілактичний режим (n=7)	лікувальний режим (n=7)
До 30 с	7 (46,7%)	10 (90,9%)*	5 (71,4%)	6 (85,7%)*
Понад 30 с	8 (53,3%)	1 (9,1%)*	2 (28,6%)	1 (14,3%)*

Примітка: * – достовірні відмінності з групою інтактного контролю ($p \leq 0,05$).

ТАБЛИЦЯ 4

Вплив АРІЛ-1 на фізичну витривалість мишей у тесті примусового плавання з навантаженням через 2,5 год. після гострого загального охолодження

Час утримання на воді	Інтактний контроль (n=15)	Контрольна патологія (n=11)	АРІЛ-1, 3 мг/кг	
			профілактичний режим (n=7)	лікувальний режим (n=7)
Кількість мишей, що втримались на поверхні води (абс./%)				
До 30 с	0	3 (27,3%)*	1 (14,3%)	0
0,5-1 хв.	3 (30%)	5 (45,5%)	2 (28,6%)	3 (42,9%)
1-2 хв.	7 (70%)	3 (27,3%)*	2 (28,6%)*	2 (28,6%)*
Понад 2 хв.	0	0	2 (28,6%)*#	2 (28,6%)*#
Тривалість плавання, М±m				
Абсолютний час, с	62,7±4,4	44,1±4,8*	118,4±34,2#	90,7±25,8

Примітки: * – достовірні відмінності з групою інтактного контролю ($p \leq 0,05$), # – з групою контрольної патології ($p \leq 0,05$).

фізичної витривалості мишей після загального охолодження, але й про достовірне збільшення (в 1,9 разу) часу плавання порівняно з інтактними при профілактичному введенні АРІЛ-1 та тенденцію до збільшення (в 1,4 разу) витривалості – за лікувального режиму введення.

Результати свідчать, що при загальному гострому охолодженні рівень ІЛ-1 у сироватці крові експериментальних тварин зростає на відміну від локальної кріотравми, де вміст ІЛ-1 знижувався [8]. На моделі загального охолодження АРІЛ-1 зменшує рівень ІЛ-1, що сприяє підвищенню холодової витривалості тварин, а також забезпечує відновлення пригнічених показників локомоторної, дослідницької активності та емоційності тварин, тонуусу скелетних м'язів, координації рухів та фізичної витривалості після холодової травми.

ВИСНОВКИ

1. На моделі гострого загального охолодження АРІЛ-1 в дозах 3 мг/кг та 15 мг/кг достовірно збільшує час виживання мишей порівняно з відомим фрігопротектором ацетилсаліциловою кислотою.

2. Одноразове лікувальне або профілактичне застосування АРІЛ-1 в дозі 3 мг/кг при холодовій травмі нормалізує пригнічені показники локомоторної, дослідницької активності та емоційності тварин, покращує тонус скелетних м'язів, координацію рухів та фізичну витривалість у відновлювальному періоді.

3. АРІЛ-1 виявляє виражену фрігопротекторну дію, що обґрунтовує можливість його застосування в якості ефективного засобу профілактики та лікування наслідків холодової травми.

4. До механізмів фрігопротекторної дії можуть залучатися як протизапальні, так і ней-

ропротекторні властивості АРІЛ-1. Значне місце у цих механізмах належить зниженню концентрації ІЛ-1, який є одним з медіаторів розвитку кріопшкоджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бабийчук Г.А., Шифман М.И. Нейрохимические процессы в центральной нервной системе при гипотермии. – Киев: Наукова думка, 1989. – С. 150.
2. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. – М.: Медицина, 1974. – С. 22-23.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації / За ред. член-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – С. 352-360.
4. Дрозд С.Ю., Бондаренко С.В., Яснецов В.В. и соавт. Увеличение продолжительности жизни мышей при острых охлаждениях под воздействием препарата, выделенного из *Laminaria Saccharina* // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1991. – №4. – С. 383-384.
5. Киселева Т.Л., Фролова Л.Н., Алиева А.А. и соавт. Изучение анатомо-диагностических признаков сбора №1 для профилактики и лечения отморожений // Традиционная медицина. – 2009. – №2 (17). – С. 42-47.
6. Коваленко Є.М. Фармакологічне вивчення проти-запальної активності антагоніста рецепторів інтерлейкіна-1 (АРІЛ-1): Автореф. ... дис. канд. фарм. наук. – Харків, 2009 – 19 с.
7. Коптяева Р.Г. Цитокиновый профиль при превентивной терапии отморожений целекоксибом // Аллергология и иммунология. – 2008. – Т.8. – №1. – С. 296.
8. Коптяева Р.Г., Сидоров П.И. Цитокиновый профиль при острой алкогольно-холодовой травме // Аллергология и иммунология. – 2007. – Т.8. – №1. – С. 297.
9. Котельников В.П. Отморожения. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.
10. Котельников В.П., Морозов В.Е. Нейрогуморальные механизмы адаптации к кріотравме / Вест. Рос. АМН. – 1992. – №11-12. – С. 51-57.

11. Липатов К.В., Фархат Ф.А., Бородин А.В. и др. Глубокие отморожения конечностей: комплексный подход к диагностике и лечению // Врач. — 2005. — №9. — С. 39-41.
12. Назаренко Н.А. Эффективность нестероидных противовоспалительных средств для профилактики и лечения холодовой травмы (экспериментальное исследование): Автореф. ... дис. д.мед.н. — Архангельск, 2001. — 38 с.
13. Сбор лекарственных растений «Фитоморозко», обладающий фригопротекторным действием / Н.А.Назаренко, Т.Л.Киселева, А.А.Алиева, М.Ю.Назаренко, А.А.Карпеев (РФ). — №2336896; заявл. 30.11.06; опубл. 27.10.08.
14. Средство из растительного сырья для профилактики и лечения отморожений / Н.А.Назаренко, Т.Л.Киселева, А.А.Алиева, М.Ю.Назаренко (РФ). — №23426684; заявл. 26.10.06; опубл. 20.06.08.
15. Супрун Е.В., Штриголь С.Ю., Іщенко О.М. Цереброта кардіопротекторна дія антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 на моделі церебральної ішемії у щурів // Клінічна фармація. — 2009. — Т.13. — №1. — С. 59-63.
16. Термическая травма: [рекоменд. для практ. врачей] / Под ред. С.В.Слесаренко, Г.П.Козинец, Е.Н.Клигуленко и соавт. — Днепропетровск, 2002. — 60 с.
17. Щокіна К.Г., Штриголь С.Ю., Іщенко О.М. Експериментальне вивчення фригопротекторної дії рекомбінантного антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 (APLI-1) // Фармаком. — 2010. — №3. — С. 74-79.
18. Anguera I., Vailis V., Giant. Wales in hypothermia // Circulation. — 2000. — Vol. 101. — P. 1627.
19. Hanania N., Zimmerman J. Environmental emergencies: accidental hypothermia // Crit. Care Clin. — 1999. — Vol. 15. — №2. — P. 235-249.
20. Mallet M.L. Pathophysiology of accidental hypothermia // Q. J. Med. — 2002. — Vol. 95. — P. 775-785.

Е.Г.Щекина, С.Ю.Штриголь, С.М.Дроговоз, Т.В.Горбач. Фригопротекторные свойства и влияние рекомбинантного рецепторного антагониста на уровень интерлейкина-1 при остром общем охлаждении. Харьков, Украина.

Ключевые слова: холодовая травма, фригопротекторное действие, рекомбинантный антагонист рецепторов интерлейкина-1.

В статье приведены результаты экспериментального изучения фригопротекторного действия рекомбинантного антагониста рецепторов интерлейкина-1. Установлено, что одноразовое лечебное или профилактическое введение антагониста рецепторов интерлейкина-1 в дозе 3 мг/кг при холодовой травме снижает уровень интерлейкина-1, что способствует повышению холодовой устойчивости животных, а также обеспечивает восстановление угнетенных показателей локомоторной, исследовательской активности и эмоциональности животных, тонуса скелетных мышц, координации движений и физической выносливости после переохлаждения. Антагонист рецепторов интерлейкина-1 проявляет выраженное фригопротекторное действие, что обеспечивает возможность его использования в качестве эффективного средства профилактики и лечения последствий холодовой травмы.

E.G.Shchekina, S.Y.Shtrygol, S.M.Drogovoz, T.V.Gorbach. Frigoprotective properties and influence of recombinant receptor antagonist on the level of interleukin-1 in acute general cooling. Kharkiv, Ukraine.

Key words: cold injury, frigoprotective action of recombinant receptor antagonist of interleukin-1.

There are the results of experimental study of frigoprotective action of recombinant receptor antagonist of interleukin-1. It was established that one-time treatment or prophylactic of receptor antagonist of interleukin-1 in dose of 3 mg/kg during the cold injury reduces the level of interleukin-1, that promotes the increase of cold resistance of animals, as well as providing exists restoration of the oppressed indicators of locomotor, exploratory activity and emotionality of animals, the tone of skeletal muscles, coordinate the movements and physical endurance after hypothermia. Receptor antagonist of interleukin-1 showed pronounced frigoprotective action that provides the possibility of its using as effective remedy of prevention and treatment of the consequences of cold injury.

Надійшла до редакції 12.01.2011 р.