



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **72143** (13) **U**
(51) МПК
A61P 37/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2012 00605</p> <p>(22) Дата подання заявки: 19.01.2012</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.08.2012</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.08.2012, Бюл.№ 15</p>	<p>(72) Винахідник(и): Кайдашев Ігор Петрович (UA), Весніна Людмила Едуардівна (UA), Мамонтова Тетяна Василівна (UA), Микитюк Марина Володимирівна (UA), Куценко Лариса Олександрівна (UA), Куценко Нелля Леонідівна (UA), Беркало Любов Володимирівна (UA), Боброва Нелля Олександрівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36024 (UA)</p>
--	---

(54) СПОСІБ МОДУЛЯЦІЇ ФАГОЦИТАРНИХ КЛІТИН

(57) Реферат:

Спосіб модуляції фагоцитарних клітин включає використання модуляторів фагоцитарної активності імунокомпетентних клітин на тлі запальних процесів. Як модулятор використовують водну дисперсію фулерену FC_{60} .

UA 72143 U

Корисна модель належить до медицини та фармакології, стосується імунного захисту організму, розробки нових фармакологічних препаратів цілеспрямованої дії на клітини-мішені.

Розвиток технологій та активний науковий пошук сприяє появі нових препаратів цілеспрямованої дії на клітини-мішені. Одними з найбільш перспективних претендентів цього напрямку стали наночастинки - фулерени. На сьогодні найбільш вивчений фулерен C₆₀ (FC₆₀), який завдяки здатності до взаємодії з клітинами та біологічними молекулами проявляє антивірусну, антибактеріальну, антиоксидантну та цитпротекторну властивості, впливає на апоптоз [Freitas R.A. Basic capabilities by Robert A. Freitas / Robert A Freitas. Jr. - Austin, Texas U.S.A. Landes BiocenceAUSTIN, TEXAS U.S.A. LANDES BIOSCIENCE, 1999. - 509 p. (Nanomedicine, volume I); Saton M. Pharmacological studies on fullerene C₆₀, a novel carbon allotrope, and its derivates / Saton M., Takayanagi I. // J Pharmcol Sci. - 2006. - Vol. 100. - P. 513-518]. Тому актуальним є пошук нових ефективних препаратів, які впливають на активність клітин фагоцитарної системи.

Відомо про розробку хімічно зв'язаного імуногенного комплексу клітинних стінок та антигенів з сибіревиразкового мікроба, досліджена імуномодулююча активність арабіногалактану і сквалену, а також показані шляхи корекції функціонального стану системи мононуклеарних фагоцитів арабіногалактаном і скваленом при взаємодії з сибіревиразковим мікробом [Влияние комплексного антигенного препарата Bacillus anthracis и иммуномодуляторов на функциональную активность клеток фагоцитарной системы в эксперименте [В.И. Дубровина, А.В., Родзиковский, О.Б. Колесникова и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. 2007. - вып. 93. - С. 73-76].

В літературних джерелах представлені результати вивчення впливу антигенних комплексів Y. pestis EV на функціональну активність клітин фагоцитарної системи клітин морських свинок та білих мишей. Показано, що препарат, виготовлений на основі F-1 антигену, мембранної фракції Y. pestis EV та імуномодулятора - арабіногалактану модрина сибірської (АГ), викликає підвищення функціональної активності клітин фагоцитарної системи експериментальних тварин (морських свинок), підсилює адгезивну та поглинальну здатність перитонеальних макрофагів, інтенсивність утворення активних форм кисню і монооксиду азоту, проявляє стимулюючий ефект на активність мієлопероксидази та синтез неферментативних катіонних білків поліморфноядерних лейкоцитів. Антигенний комплекс, виготовлений на основі F-1 антигену, мембранної фракції Y. pestis EV та АГ, має стимулюючу дію на цитокініндукуючу функцію макрофагів білих мишей, що виражається в підсиленні продукції цитокінів ІЛ-1, ІЛ-6, ФНО- α [Влияние комплексного антигенного препарата YERSINIA PESTIS EV на функциональную активность клеток фагоцитарной системы в эксперименте [В.И. Дубровина, Е.П. Голубский, С.А. Витязева и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. 2008. - вып. 97. - С. 56-60].

Групою науковців проведено порівняльне вивчення імуномодулюючих властивостей високомолекулярного хітозану та його похідних: низькомолекулярного хітозану, карбоксиметилхітозану, карбоксіетилхітозану, карбоксипропілхітозану. Встановлено, що хімічна модифікація хітозану впливає на його біологічну активність. Синтезовані похідні хітозану мають покращені фізико-хімічні властивості (висока розчинність в нейтральних та лужних розчинах, низька в'язкість в кислих розчинах, хороша всмоктуваність із шлунково-кишкового тракту) в порівнянні з вихідним високомолекулярним хітозаном, мають імуномодулюючі властивості та є перспективними речовинами для створення лікарських препаратів і біологічно активних домішок до їжі (БАД) [Сравнительное изучение иммуномодулирующих свойств хитозана и его производных [Л.И. Иванушко, Т.Ф. Соловьева, Т.С. Запорожец и др.] // Медицинская иммунология. - 2007. - Т. 9, № 4-5. - С. 397-404].

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб лікування захворювань, при яких доцільна активація фагоцитозу в організмі [Пат. 85922 С2 Україна, МПК А61К/27, А61Р37/04. Спосіб лікування захворювань, при яких є доцільною активація фагоцитозу в організмі / Новак В.Л., Курган Д.Н., Ординська З.В., Примак С.В., заявник и патентовласник Державна установа "Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України". - № а 200706135; заявл. 04.06.07; опубл. 10.03.09, Бюл. № 5]. Відповідно до способу стимуляція поглинаючої здатності фагоцитів для активації імунного захисту макроорганізму від агресії у внутрішнє середовище сторонніми об'єктами досягнута тим, що довенно або підшкірно вводять нефракціонований гепарин дозою 180-230 МО/кг маси тіла. Підвищення фагоцитарної активності в організмі відмічено на 8-10 хв після інфузії, далі вона зростає й визначається більше доби.

Недоліком існуючого способу є використання гепарину для стимуляції поглинаючої здатності фагоцитів для активації імунного захисту макроорганізму від агресії у внутрішнє середовище лише сторонніх об'єктів, що не дає можливості оцінити розвиток запальних процесів в клітинах-мішенях.

Тому в основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб модуляції фагоцитарних клітин при патологічних станах шляхом удосконалення відомого, використовуючи терапевтичні агенти у вигляді водної дисперсії FC_{60} в концентраціях 0,01 та 0,1 $\mu M/л$.

5 Поставлена задача вирішується шляхом створення способу модуляції фагоцитарних клітин, що включає використання модюляторів фагоцитарної активності імуннокомпетентних клітин на тлі запальних процесів, який відрізняється тим, що як модюлятор використовують водну дисперсію FC_{60} в концентраціях 0,01 та 0,1 $\mu M/л$.

10 Запропонований спосіб дозволяє високоспецифічно впливати на різні етапи та механізми фагоцитозу під час розвитку запальних процесів. Це дає можливість використовувати FC_{60} в медичній практиці, як засіб дії на вибіркові механізми імунного захисту організму, що суттєво підвищить ефективність лікувально-профілактичних заходів та покращить надання медичної допомоги при захворюваннях.

15 Технічний результат досягають шляхом використання наночастинок FC_{60} , які мають високу біологічну активність, можуть проникати крізь клітинну мембрану, викликають адгезію та міграцію нейтрофілів і макрофагів в середовище запалення з наступним знаходженням їх у фаголізосомальних клітинах [Morimoto Y. Inflammogenic effect of well-characterized fullerenes in inhalation and intratracheal instillation studies / Morimoto Y., Hirohashi M., Ogami A. // Particle Fibre Toxicology. 2010. - Vol. 7-P. 1-4].

Заявлений спосіб виконується наступним чином:

20 У дослідженні використовували периферичну кров 10 практично здорових донорів обох статей віком 28-45 років, отриману з ліктьової вени в пробірки з гепарином (Vacutainer Systems, Великобританія). У пацієнтів отримували письмову згоду на обстеження, всі маніпуляції проводили з дозволу комісії з біоетики Української медичної стоматологічної академії. Водну дисперсію FC_{60} отримували шляхом перемішування FC_{60} (Sigma, США) з деіонізованою водою на магнітній мішалці протягом 2-х місяців [Dhavan A., Taurozzi J.S., Pandey A.K. et al Stable colloidal dispersion of C60 fullerenes in water: evidence for genotoxicity // Environ. Sci. Technol. - 2006. - Vol. 40. P. 7394-7401.]. Клітини цільної крові в обсязі 1 мл інкубували з водною дисперсією FC_{60} в кінцевій концентрації 0,01 $\mu M/л$ і 0,1 $\mu M/л$ протягом 10 хв. при 37 °С. Дози препарату підбирали з урахуванням відсутності критичних деструктивних впливів на вітальні параметри клітин [Fumelli C, Marconi A., Salvioli S., et al. Carboxyfullerenes protect human keratinocytes from ultraviolet-B-induced apoptosis // J. Invest. Dermatol. - 2000. - Vol. 155. - P. 835-841].

30 Експресію молекул міжклітинної адгезії CD54 (ICAM-1) визначали на клітинах цільної крові. Кров інкубували з моноклональними антитілами LT54 до молекул CD54 і з анти-F(ab)₂-антитілами, міченими флюоресцеїнізотіоціанатом (Сорбент, Росія). Для лізису еритроцитів використовували лізуючий розчин (Callag, США). Флюоресценцію реєстрували в реакції непрямой імунфлюоресценції на проточному цитофлюориметр EPIC LX-MCL (Beckman Coulter, США) за допомогою програми System IITM software [Пинегін Б.В. Проточная лазерная цитометрия в оценке иммунной системы человека /Б.В. Пинегин, А.А. Ярилин, Д.В. Мазуров и др. // Микробиол. - 2002. - № 6. - С. 105-111].

40 Фагоцитарну активність нейтрофілів оцінювали за фагоцитарним показником (відсоток фагоцитуючих клітин) в тесті з монодисперсними частинками латексу (Діам, Росія) [Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині /Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.А. і др. /Під ред. Проф... Кайдашева І.П. - Полтава: Полімет, 2003. - 320 с.].

45 Стан кисеньзалежних механізмів нейтрофілів визначали в тесті з нітросинім тетразолієм (НСТ) (Діам, Росія), Облік реакції проводили за ступенем інтенсивності специфічного забарвлення, розраховували середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК), виражали в умовних одиницях (ум. од.) [Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині /Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.А. і др.; Під ред. Проф... Кайдашева І.П. - Полтава: Полімет, 2003. - 320 с.]. Активність мієлопероксидази визначали по окисненню хромогену (бензидину) за методом Грехема-Кнолля, розраховували СЦК і результат виражали в ум. од. [Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині /Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.А. і др.; Під ред. Проф... Кайдашева І.П. - Полтава: Полімет, 2003. - 320 с.].

50 Продукцію активних форм кисню визначали за люмінолзалежною хемілюмінесценцією (ХЛ) [Митерева Д.Е., Агафонов В.Е. Модификация метода хемилюминесцентного анализа для оценки активности фагоцитов цельной крови сенсibilизированных животных //Клиническая лабораторная диагностика. - 2004. - № 3. - С. 47-50.]. Максимальну інтенсивність світіння реєстрували послідовно протягом 10 хвилин, при яких відбувалася стабілізація її інтенсивності при 37 °С (спонтанна ХЛ). Респіраторний вибух клітин активували додаванням 100 мкл 0,1 % суспензії зімозану (НВО "Біолар", Латвія) і визначали стимульовану ХЛ. Виміри проводили на біолюмінометрі БХЛ-06 (Нижній Новгород, Росія), результати представляли в імп/сек.

Вміст лізосомальних катіонних білків (ЛКБ) визначали в еозинофілах, розраховували СЦК і виражали в ум. од. [Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині //Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.А. і др.; Під ред. Проф. Кайдашева І.П. - Полтава: Полімет, 2003. - 320 с].

5 Вивчено зміну рівня експресії молекул CD54 на моноцитах, лімфоцитах і нейтрофілах під впливом FC₆₀. На моноцитах експресія CD54 достовірно знижувалася під впливом FC₆₀ в дозі 0,1 μM/л, на лімфоцитах - при використанні FC₆₀ в обох дозах. На нейтрофілах достовірних змін рівня експресії CD54 не спостерігалось.

10 Фагоцитарна активність нейтрофілів достовірно не змінювалася при використанні FC₆₀ в обох дозах (табл.). Використання FC₆₀ в дозі 0,01 μM/л сприяло достовірному підвищенню показників кисень-стимулюючої активності нейтрофілів в НСТ-тесті і достовірного зниження активності мієлопероксидази в нейтрофілах (табл.). Не відзначено достовірного впливу дози 0,1 μM/л.

15 При оцінці здатності клітин генерувати, активні форми кисню під впливом FC₆₀ спостерігали зниження рівня індукованої ХЛ порівняно з контролем в 2,6 разу (p<0,05) і в 1,3 разу (p<0,05) під впливом FC₆₀ в дозах 0,01 μM/л і 0,1 μM/л відповідно (табл.). Достовірних змін продукції ЛКБ в еозинофілах під впливом FC₆₀ не виявлено (табл.).

20 Кореляційний аналіз показав наявність прямої залежності між рівнем активності мієлопероксидази і індукованої ХЛ на тлі дії FC₆₀ в дозі 0,1 μM/л (r=0,708, p<0,05); рівнем експресії CD54 на контрольних лімфоцитах і рівнем експресії CD54 на лімфоцитах на тлі дії FC₆₀ в дозі 0,01 μM/л (r=0,878, p<0,05) і 0,1 μM/л (r=0,910, p<0,05). Зворотна залежність встановлена між показниками рівня експресії CD54 на лімфоцитах і рівнем індукованої ХЛ під дією FC₆₀, в дозі 0,01 μM/л (r=0,684, p<0,05).

25 Реакції неспецифічного імунітету відіграють ключову роль в реалізації запальної реакції. Фагоцити, зокрема, гранулоцити і макрофаги, у відповідь на хемотаксичні фактори здатні надзвичайно швидко мігрувати через судинну стінку і накопичуватися у запальному вогнищі. Початком фагоцитозу є розпізнавання і зв'язування фагоцитом молекули або клітини, оточення її псевдоподіями. Надалі йде внутрішньоклітинне перетворення в рецикуючій ендосомі ранній та пізній ендосомі та остаточна деградація в лізосомі. Ми оцінювали вплив фулерену C₆₀ на певні моменти цього багатостадійного процесу.

30 У процесі міграції та адгезії на поверхні моноцитів, лімфоцитів та ендотеліальних клітин з'являються молекули міжклітинної адгезії CD54, які відіграють важливу роль в ендотеліальній міграції лейкоцитів в місце запалення, забезпечують взаємодію антигенпрезентуючих клітин з Т-лімфоцитами. Нами встановлено, що FC₆₀ викликає односпрямоване зниження експресії CD54 на лімфоцитах і моноцитах, що обмежує їхню можливу участь у вищеперелічених реакціях, не надаючи достовірного впливу на рівень експресії CD54 на нейтрофілах. Відомо, що подібно до моноцитів, нейтрофіли за допомогою молекули CD54 можуть зв'язуватися з лігандом на клітинах судинного ендотелію і залишати кровотік. У Morimoto Y. зі співавторами (2010) показано, що інгаляція FC₆₀ викликає незначну міграцію нейтрофілів з периферичної крові в легені, де більша частина фулерену фагоцитується макрофагами згідно з іншими даними, наночастки здатні впливати на рівень готовності нейтрофілів до хемотаксису і подальшої адгезії, зокрема, збільшуючи експресію молекул цитокін-індукованого нейтрофільного хемоатрактанту CINC на нейтрофілах легенів [Morimoto Y., Hirohashi M., Ogami A., et al. Inflammogenic effect of well-characterized fullerenes in inhalation and intratracheal instillation studies //Particle Fibre Toxicology. - 2010. - Vol. 7. - P. 4-18]. В цілому наші дані свідчать про негативний вплив FC₆₀ на експресію молекул адгезії лімфоцитів і моноцитів.

45 Дослідження активності самого етапу фагоцитозу показало відсутність достовірного впливу FC₆₀, що узгоджується з результатами роботи Tsao N. і співавторів (2001). Автори показали, що водна, дисперсія похідних FC₆₀ в нейтрофілах стимулює бактерицидну активність, підвищує виживання, але не впливає на фагоцитоз.

50 На нашу думку, причина такого негативного впливу фулерену на процес фагоцитозу лежить в механізмах його взаємодії з клітинною мембраною. Використання методу молекулярної динаміки показало, що проникнення FC₆₀ в мембрану відбувається протягом кількох наносекунд. За даними авторів, FC₆₀ здатний залишатися всередині мембрани тривалий час, впливаючи на її властивості: дифузію ліпідів, товщину, форму. Так, при молярній концентрації фулерену 11,1 % коефіцієнт дифузії ліпідів знижується на 40 %, модуль стиснення мембрани на 10 % і модуль вигину знижується на 20 %, що в цілому свідчить про загальне пом'якшення мембрани, але без видимих ушкоджень. Напевне, в подальшому такі зміни ліпідного бішару призводять і до порушення функцій клітини. Цікаві дані отримані на макрофагах Moller W. і співавторами (2005), коли ультрадисперсні частинки сажі сприяли порушенню фагосомного

транспорту і приводили до дисфункцій цитоскелета з транзиторним підвищенням рівня внутрішньоклітинного кальцію. За припущенням авторів, важливу роль в цьому впливі грає питома площа поверхні частинок. Moss C), і Wong V. (2006), враховуючи сукупну площу поглинених макрофагами частинок, припустили, що наночастинки перетинають клітинну мембрану неендоцитозним механізмом. Субклітинне представництво для різних типів частинок може бути різним - ендолізосомальне, цитоплазматичне, ядерне, мітохондріальне, що безумовно може зачіпати і функції клітини. Поглинання мікроорганізмів шляхом фагоцитозу викликає протягом декількох секунд стимуляцію дихальних процесів і появу реактивних оксидантів - токсичних кисневих сполук і окислених галогенів. Відновлення НСТ у фагоциті безпосередньо залежить від ефективності метаболічних шляхів, в яких виробляється супероксид і його похідні з вираженими антимікробними властивостями. Згідно з результатами, FC₆₀ в дозі 0,01 μM/л стимулював показники НСТ-тесту в нейтрофілах, що свідчить про його здатність здійснювати бактерицидну дію на клітини шляхом активації продукції активних метаболітів кисню і узгоджується з даними Isakovic A. і співавторів (2006) про стимуляцію продукції активних форм кисню під впливом поглиненого фулерену через 10 хвилин після початку дії. У нейтрофілах процес кислородзалежного фагоцитозу супроводжується активною секрецією ферменту мієлопероксидази, яка каталізує розвиток токсичного впливу перекису водню на різні мікроорганізми. Нами встановлено, що FC₆₀ в дозі 0,01 μM/л інгібував активність мієлопероксидази в нейтрофілах.

Одним з важливих моментів фагоцитозу є продукція високоокисневих метаболітів та активація гексозомонофосфатного шляху окислення. Оцінка даних параметрів методом ХЛ показала інгібування показників індукованої ХЛ під впливом FC₆₀. Виявлений позитивний кореляційний взаємозв'язок між рівнем активності мієлопероксидази і рівнем індукованої ХЛ при використанні FC₆₀ в дозі 0,1 μM/л підтверджується даними, що індукція ХЛ пов'язана з взаємодією з високореактивними метаболітами кисню (синглетний кисень або перекис водню) під впливом мієлопероксидази. Це вказує на можливу здатність FC₆₀ послаблювати кисеньзалежні механізми в нейтрофілах і моноцитах.

Кисеньнезалежні механізми реалізації фагоцитозу супроводжуються виробленням клітинами гідролітичних ферментів - протеїназ катіонних білків і лізоциму. Виділені еозинофілами продукти сприяють фагоцитозу, лізису і знищенню поглинених агентів, пригнічують запальну реакцію, зокрема міграцію гранулоцитів у вогнище інвазії. Згідно з нашими даними достовірного впливу FC₆₀ на показники ЛКБ в еозинофілах не виявлено.

Таким чином, результати роботи свідчать про вплив FC₆₀ на різні етапи і механізми реакції фагоцитозу. В цілому, FC₆₀ здебільшого негативно впливає на активність клітин неспецифічної ланки імунітету, що можна пояснити особливостями взаємодії досліджуваної речовини з клітинною мембраною і її подальшим перебуванням всередині клітини, що призводить у кінцевому підсумку до зміни її функцій. Результати роботи показують необхідність подальших більш детальних досліджень у цьому напрямку і потенційну можливість застосування FC₆₀ в медичній практиці як засобу впливу на певні механізми імунного захисту.

Позитивний результат від заявленого способу модуляції фагоцитарних клітин при патологічних станах з використанням FC₆₀ в дозі 0,01 μM/л полягає в зниженні експресії CD54 на лімфоцитах і моноцитах, пригніченні ферментативної активності мієлопероксидази, зниженні рівня індукованої ХЛ, підвищенні показників НСТ-тесту в нейтрофілах.

Таблиця

Вплив фулерену C₆₀ на показники функціональної активності нейтрофілів та еозинофілів

Показники	Контроль (n=10)	Доза фулерену C ₆₀ , μM/л		
		0,01 (n=10)	0,1 (n=10)	
Фагоцитоз в нейтрофілах, %	35,6±2,61	34,6±1,8	33,8±2,67	
Мієлопероксидаза нейтрофілах, ум. од.	1,55±0,12	1,27±0,1*	1,31±0,13	
НСТ-тест в нейтрофілах, ум. од.	1,64±0,12	1,87±0,9*	1,67±0,11	
Хемілюмінісценція, імп/сек.	Спонтанна	17062,6±4464,9	15845,4±947,9	13222,9±2969,1
	Індукована	44020,5±4698,7	17004,5±2641,6*	34371,2±3124,5*#
Лізосомальні катіонні білки еозинофілах, ум. од.	2,19±0,06	2,17±0,07	2,18±0,06	

Примітка: * - p<0,05 у порівнянні з контрольною серією,

- p<0,05 у порівнянні з серією впливу фулерену в дозі 0,01 μM/л.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб модуляції фагоцитарних клітин, що включає використання модуляторів фагоцитарної активності імунокомпетентних клітин на тлі запальних процесів, який **відрізняється** тим, що як модулятор використовують водну дисперсію фулерену FC_{60} в концентраціях 0,01 та 0,1 $\mu\text{M}/\text{л}$.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601