

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 β (rIL-1 β , БЕТАЛЕЙКИН) НА ЦИТОХРОМ P-450-ЗАВИСИМЫЕ МОНООКСИГЕНАЗЫ ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК У КРЫС

А. Т. Ахматов¹, С. В. Сибиряк¹, А. С. Симбирцев², Д. С. Сибиряк¹

Изучено влияние однократного введения человеческого рекомбинантного IL-1 β (беталейкин) на цитохром P-450-зависимую монооксигеназную активность в печени и в почках у интактных крыс и на фоне введения индукторов цитохрома P-450. У интактных крыс беталейкин угнетал CYP1A1/2-зависимую этоксирезорифин-О-деэтилазную активность в печени и почках, CYP2C-зависимую дибензилфлюоресцеин-дебензилазную и CYP2E1-зависимую р-нитрофенол-гидроксилазную активность в печени, но индуцировал CYP3A-зависимое N-деметилирование эритромицина в печени и в почках. Беталейкин ингибировал индуцируемую β -нафтофлавоном монооксигеназную активность в печени, но мало влиял на индуцируемые монооксигеназы в почках. Беталейкин уменьшал вызванную пиридином индукцию CYP2E1-зависимого монооксигенирования в печени и CYP1A1/2-зависимого монооксигенирования в почках. Таким образом, характер и направленность влияния rIL-1 β на конститутивные и индуцированные цитохромы P-450 различных подсемейств могут быть неоднозначны и тканеспецифичны.

Ключевые слова: интерлейкин-1, цитохром P-450-зависимые монооксигеназы, β -нафтофлавоны, пиридин, печень, почки

ВВЕДЕНИЕ

Факт угнетения цитохром P-450-зависимых монооксигеназ печени и изменения биотрансформации лекарственных препаратов при бактериальных и вирусных инфекциях, развитии асептического воспаления, при вакцинации и иммунизации различными антигенами и при фармакологической стимуляции иммунитета широко освещен в литературе [1, 15]. Этот эффект реализуется опосредованно через цитокины (α -, β - и γ -интерфероны, TNF α , IL-1 α и IL-1 β , IL-6, IL-2 и др.), связан с нарушением транскрипции генов различных изоформ цитохрома P-450 и является отражением закономерной реакции организма при “иммунном стрессе” [2]. В культурах гепатоцитов и при введении экспериментальным животным очищенные рекомбинантные цитокины, как правило, снижают содержание мРНК изоформ цитохрома P-450 в гепатоцитах, уровень соответствующих белков и монооксигеназную активность. Менее изучен вопрос о влиянии цитокинов на цитохром P-450-зависимые монооксигеназы других тканей.

В последние годы интерес к использованию рекомбинантных цитокинов как иммунозаместительных, иммунореставрирующих и иммунокорректирующих препаратов значительно возрос [3]. Накапливаются наблюдения, свидетельствующие об угнетении фармако-

метаболизирующей функции печени, у пациентов в условиях цитокинотерапии [4, 5, 10]. Важно, что при проведении комплексной фармакотерапии, в том числе и в онкологической практике, рекомбинантные цитокины могут существенно изменить фармакокинетику совместно вводимых препаратов и как следствие фармакодинамику и токсичность последних.

В настоящей работе в эксперименте на крысах изучено влияние человеческого рекомбинантного IL-1 β (rIL-1 β , беталейкин) на цитохром P-450-зависимые монооксигеназы печени и почек у интактных крыс и на фоне индукции цитохром P-450-зависимых монооксигеназ β -нафтофлавоном и пиридином.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на неинбредных половозрелых крысах-самцах массой 140 – 160 г. Животных содержали в пластиковых клетках в стандартных условиях вивария с 12-часовым световым циклом “день-ночь”, они получали стандартное питание и свободный доступ к воде. При работе с крысами соблюдались Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных. Все болезненные манипуляции и умерщвление животных осуществляли под эфирным наркозом, по достижении животными “бокового положения”.

Рекомбинантный человеческий интерлейкин 1 β (беталейкин, ГНЦ РФ ГосНИИ особо чистых биопрепаратов, С.-Петербург) с удельной биологической активно-

¹ Отдел иммунологии и иммунофармакологии (зав. — проф. С. В. Сибиряк) Всероссийского центра глазной и пластической хирургии МЗ РФ, Уфа, 450075, ул. Р. Зорге, 67/1.

² ГНЦ РФ ГосНИИ особо чистых биопрепаратов, С.-Петербург.

Таблица 1. Влияние беталейкина на уровень цитохрома P-450 в микросомах печени и конституитивную монооксигеназную активность в S12-фракции гомогенатов печени и почек и микросомах печени крыс (M ± m)

Показатель	Группа животных (n)	Содержание цитохрома P-450, нмоль/мг белка	ЭРОД-активность, пмоль/мин/мг белка	ДФБД-активность, нмоль/мин/мг белка	ПНФГ-активность, нмоль/мин/мг белка	ЭРНД-активность, нмоль/мин/мг белка
S12- фракция гомогенатов печени	Контроль (6)		0,53 ± 0,032	0,52 ± 0,07	0,55 ± 0,07	2,97 ± 0,09
	Беталейкин (6)		0,426 ± 0,041*	0,35 ± 0,03*	0,29 ± 0,09*	3,57 ± 0,21*
Микросомы печени	Контроль (5)	0,7 ± 0,02	3,41 ± 0,31	2,85 ± 1,24	1,1 ± 0,2	9,45 ± 0,84
	Беталейкин (5)	0,64 ± 0,03	1,74 ± 0,21*	0,94 ± 0,07*	0,62 ± 0,03*	11,45 ± 0,41*
S12- фракция гомогенатов почек	Контроль (6)		0,133 ± 0,012	0,14 ± 0,03	0,19 ± 0,02	1,45 ± 0,05
	Беталейкин (6)		0,013 ± 0,007*	0,12 ± 0,01	0,23 ± 0,05	1,65 ± 0,09*

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: * — различия статистически значимы с контрольной группой ($p < 0,05$). n — число животных в группе.

стью 10^8 ед/мг белка, разводили стерильным изотоническим раствором хлорида натрия и вводили внутривенно однократно в дозе $6,5 \cdot 10^5$ ед/кг, что соответствует среднеэффективной дозе препарата (ED_{50}), обеспечивающей основной гематопозитический эффект — стимуляцию гранулоцитопоза у крыс. Контрольные группы получали эквивалентное по объему количество физиологического раствора хлорида натрия, содержащего инактивированный нагреванием (90°C , 1 ч) беталейкин. Оценка состояния монооксигеназной системы проводили через 24 ч после введения цитокина.

β -Нафтофлаван ("Fluka") разводили стерильным оливковым маслом и вводили внутривенно, трехкратно, ежедневно в дозе 50 мг/кг. Контрольная группа получала оливковое масло. Пиридин ("Sigma") в виде водного раствора вводили в дозе 200 мг/кг внутривенно, трехкратно, ежедневно. Контрольная группа получала эквивалентное количество воды. Беталейкин вводили через 3 ч после последнего введе-

ния индуктора, и тестирование животных осуществляли через 24 ч после введения цитокина.

Для оценки состояния цитохром P-450-зависимых монооксигеназ в печени использовали субмитохондриальную фракцию гомогенатов органа (12000 g или S12-фракция) или микросомы печени, а для оценки цитохром P-450-зависимой монооксигеназной системы почек — S12-фракцию гомогената. S12-фракцию гомогенатов печени и почек получали по методу, описанному [19]. Микросомы печени получали методом низкоскоростного центрифугирования [12]. Содержание белка в S12-фракции гомогенатов или микросомальной фракции оценивали методом Брэдфорда, используя коммерческий набор для определения белка ProteinAssay Kit (BioRad).

Содержание цитохрома P-450 в микросомах печени оценивали стандартным методом [18] на спектрофотометре Specord M40.

Определение 7-этоксирезорурфин-О-деэтилазной (ЭРОД) активности осуществляли флуориметрическим методом [20]. Оценка дибензилфлуоресцеин-де-

Таблица 2. Влияние беталейкина на уровень цитохрома P-450 и монооксигеназную активность в микросомах печени и в S12-фракции гомогенатов почек крыс на фоне индукции β -нафтофлавоном (M ± m)

Показатель	Группа животных (n)	Содержание цитохрома P-450, нмоль/мг белка	ЭРОД-активность, пмоль/мин/мг белка	ДФБД-активность, нмоль/мин/мг белка	ПНФГ-активность, нмоль/мин/мг белка	ЭРНД-активность, нмоль/мин/мг белка
Микросомы печени	Контроль (6)	0,7 ± 0,02	8,63 ± 2,40	2,51 ± 0,26	1,39 ± 0,11	4,76 ± 0,38
	β -Нафтофлаван (6)	0,88 ± 0,02*	20,35 ± 1,26*	5,21 ± 0,44*	1,29 ± 0,14	6,09 ± 0,54
	β -Нафтофлаван + беталейкин (6)	0,82 ± 0,01*#	16,07 ± 0,45*#	4,33 ± 0,59*#	1,1 ± 0,11	4,81 ± 0,16#
S12- фракция гомогенатов почек	Контроль (6)		0,34 ± 0,09	1,17 ± 0,12	0,25 ± 0,05	1,9 ± 0,31
	β -Нафтофлаван (6)		0,71 ± 0,07*	1,59 ± 0,05*	0,3 ± 0,06	5,75 ± 0,60*
	β -Нафтофлаван + беталейкин (6)		0,67 ± 0,08*	1,46 ± 0,12	0,27 ± 0,05	5,30 ± 0,86*

— различия статистически значимы с группой, получавшей только β -нафтофлаван ($p < 0,05$)

Таблица 3. Влияние беталейкина на уровень цитохрома P-450 и монооксигеназную активность в микросомах печени и в S12-фракции гомогенатов почек крыс на фоне индукции пиридином ($M \pm m$)

Показатель	Группа животных (<i>n</i>)	Содержание цитохрома P-450, нмоль/мг белка	ЭРОД-активность, пмоль/мин/мг белка	ДБФД-активность, нмоль/мин/мг белка	ПНФГ-активность, нмоль/мин/мг белка	ЭРНД-активность, нмоль/мин/мг белка
Микросомы печени	Контроль (6)	0,64 ± 0,08	9,87 ± 1,5	1,31 ± 0,2	2,56 ± 0,17	1,75 ± 0,15
	Пиридин (6)	0,98 ± 0,07*	13,42 ± 0,91*	1,02 ± 0,06	8,12 ± 0,18*	2,87 ± 0,26*
	Пиридин + беталейкин (6)	0,94 ± 0,04*	13,61 ± 0,62*	1,01 ± 0,08	5,44 ± 0,40*#	3,05 ± 0,7*
S12- фракция гомогенатов почек	Контроль (6)		0,88 ± 0,26	1,28 ± 0,47	0,15 ± 0,04	2,65 ± 0,58
	Пиридин (6)		1,82 ± 0,63*	0,8 ± 0,18	0,1 ± 0,02	3,44 ± 0,49
	Пиридин + беталейкин (6)		1,17 ± 0,09#	0,55 ± 0,22	0,12 ± 0,03	2,66 ± 0,26

— различия статистически значимы с группой, получавшей только пиридин ($p < 0,05$).

бензилазной (ДБФД) активности также проводили флуорометрическим методом [21], оценку *p*-нитрофенол-гидроксилазной (ПНФГ) и эритромицин-*N*-деметилазной (ЭРНД) активности осуществляли колориметрически, используя при анализе ПНФГ активности метод [6], а при анализе ЭРНД активности метод [23]. При анализе монооксигеназной активности использовали реактивы фирмы “Sigma” (St. Louis, Mo) и дибензилфлюоресцеин фирмы GENTEST (BD). Флуорометрические исследования проведены на флуориметре VersaFluor1.3 (BioRad), колориметрические — на планшетном фотометре MultiskanPlus (Labsystems).

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики в рамках программного обеспечения Statistica для Windows, версия 5.5. Для отвержения “нулевой” гипотезы использовали *t*-критерий Стьюдента для независимых признаков. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние беталейкина на конститутивную монооксигеназную активность в печени и почках крыс иллюстрирует табл. 1. Через 24 ч после однократного введения цитокина как в S12- фракции гомогенатов, так и в микросомах печени наблюдалось статистически значимое угнетение *O*-деэтилирования 7-этоксирезорфина, реализуемое изоформами CYP1A1/2, значимое угнетение дебензилирования дибензилфлюоресцеина, реализуемое у крыс изоформами подсемейства CYP2C (у крыс-самцов — CYP2C11, CYP2C6), угнетение CYP2E1-зависимого гидроксилирования *p*-нитрофенола, но индукция *N*-деметилирования эритромицина, селективно реализуемого изоформами подсемейства CYP3A (у крыс — CYP3A2/3). Индукция изоформ этого подсемейства связана с способностью IL-1 активизировать гипофизарно-адреналовую систему и повышать уровень кортикостероидов [22], которые, в свою очередь подвергаются “терминальной” биотрансформации (6β- гидроксилирование) стероид-индуци-

руемыми изоформами подсемейства CYP3A [7]. Уровень суммарного белка цитохрома P-450 в микросомах после введения беталейкина имел тенденцию к снижению, но значимых отличий не было, что объясняется разнонаправленным влиянием на изоформы. В почках была выявлена конститутивная экспрессия всех изучаемых видов монооксигеназной активности, что согласуется с данными других исследователей [14]. Беталейкин вызывал значимую депрессию CYP1A1/2-зависимой ЭРОД активности, практически не влиял на CYP2C- и CYP2E1-зависимые ДБФД и ПНФГ активности и, как и в печени, вызывал индукцию ЭРНД активности.

Агонист арилуглеводородного рецептора β-нафтофлавон существенно увеличивал содержание суммарного белка цитохрома P-450 в микросомах и, как следовало ожидать, вызывал выраженную индукцию CYP1A1/2-зависимой ЭРОД активности в печени (табл. 2). Эффект не был селективен — наблюдалась значимая индукция ДБФД активности и отчетливая тенденция к нарастанию ЭРНД активности. Реализуемое изоформой CYP2E1 гидроксилирование *p*-нитрофенола оставалось неизменным. Беталейкин статистически значимо уменьшал вызванную β-нафтофлавоном индукцию цитохромов в печени. Спектр индуцируемых β-нафтофлавоном изоформ цитохрома P-450 в почках был аналогичен таковому в печени, однако преимущественно индуцировалась ЭРНД активность. Беталейкин несколько снижал индуцирующий эффект β-нафтофлавона, но, в отличие от печени, статистически значимых различий по сравнению с группами животных, получавших только индуктор, не было.

Пиридин в используемой дозе наряду с индукцией изоформы CYP2E1 (более чем на 200 %) в печени обеспечивал индукцию цитохромов P-450 и других подсемейств — наблюдалось значимое нарастание ЭРОД активности и ЭРНД активности, в то время как ДБФД активность оставалась неизменной (табл. 3). Аналогичный “спектр” индуцируемых изоформ на-

блюдали и другие авторы [8]. Беталейкин уменьшал индуцирующий эффект пиридина на ПНФГ активность, но практически не изменял величин индуцированных ЭРОД и ЭРНД активностей. В ткани почек пиридин вызывал почти селективную индукцию ЭРОД активности, величина которой снижалась на фоне введения беталейкина. Статистически значимых изменений ДБФД активности, ПНФГ и ЭРНД активности ни в группе животных, получавших один пиридин, ни в группе крыс, получавших пиридин совместно с беталейкином, не было.

Неодинаковый характер и направленность влияния рекомбинантного IL-1 на различные изоформы цитохрома P-450 у интактных животных и в условиях индукции монооксигеназ не удивительны, равно как и тканеспецифичность эффекта этого цитокина. Изоформы цитохромов P-450 различных подсемейств имеют индивидуальные механизмы регуляции транскрипции генов. Эти механизмы могут быть различны в разных тканях, равно как и субстратная специфичность экспрессированных цитохромов P-450 и их индуцибельность. В свою очередь, механизмы влияния IL-1 и других провоспалительных цитокинов на цитохром P-450-зависимые монооксигеназы множественны и включают нарушение цитоплазматической экспрессии лиганд-активируемых транскрипционных факторов ("orphan"-рецепторов) [13]; индукцию образования церамида, блокирующего транскрипцию генов некоторых изоформ [17] и белков, конкурирующих с трансактиваторами генов цитохрома P-450 [11]; прямое связывание с промоторными участками генов ряда изоформ [9]. Кроме прямого влияния на экспрессирующие цитохром P-450 клетки, IL-1 может оказывать опосредованное воздействие, связанное с нейро-эндокринным эффектом цитокина и изменением уровня глюкокортикоидов, тиреоидных гормонов, соматотропина, которые, в свою очередь, способны модулировать активность цитохром P-450-зависимых монооксигеназ в печени и других тканях [1, 2, 15].

Полученные в настоящем исследовании результаты в известной мере можно экстраполировать в реальные клинические условия поскольку субстратная специфичность цитохромов P-450 человека и крыс схожа [16]. Эти результаты свидетельствуют, что рекомбинантный IL-1 (беталейкин) способен существенно изменять функцию цитохром P-450-зависимой монооксигеназной системы и биотрансформацию совместно вводимых лекарственных препаратов как в печени, так и в почках, что может привести как к желаемому, так и нежелательному изменению фармакодинамики и токсичности лекарств.

ВЫВОДЫ

1. Беталейкин при однократном введении крысам нарушает фармакометаболизующую функцию печени и почек, изменяя активность цитохром P-450-зависимой монооксигеназной системы, как у интактных

крыс (конституитивная монооксигеназная активность), так и на фоне индукторов цитохром P-450-зависимых монооксигеназ.

2. Характер и направленность влияния беталейкина на конституитивные и индуцированные цитохромы P-450 различных подсемейств могут быть неоднозначны и тканеспецифичны в печени и почках: беталейкин угнетает CYP1A-, CYP2C-, CYP2E1-зависимую конституитивную монооксигеназную активность в печени, угнетает CYP1A-зависимое и не изменяет CYP2C-, CYP2E1-зависимое монооксигенирование в почках, но индуцирует CYP3A-зависимую монооксигеназную активность в печени и почках.

3. Беталейкин ингибирует индуцируемые β-нафтофлавоном CYP1A-, CYP2C- и CYP3A-зависимую монооксигеназную активность в печени, но мало влияет на индукцию цитохром P-450-зависимых монооксигеназ в почках.

4. Беталейкин ингибирует вызванную пиридином индукцию CYP2E1-зависимого монооксигенирования, не изменяя индуцированную CYP1A1/2- и CYP3A-зависимую монооксигеназную активность в печени, а в почках снижает индукцию CYP1A1/2-зависимого монооксигенирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. В. Сибиряк, В. А. Вахитов, Н. Н. Курчатова, *Цитохром P-450 и иммунная система: факты, гипотезы, перспективы*, ГИЛЕМ, Уфа (2003).
2. С. В. Сибиряк, *Цитокины и воспаление*, **2**, 12 – 21 (2003).
3. А. С. Симбирцев, *Цитокины и воспаление*, **1**, 9 – 16 (2003).
4. P. Craig, M. Tapner, and G. Farrell, *Hepatology*, **17**, 230 – 235 (1993).
5. J. Elkahwaji, M. Robin, and A. Berson, *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 951 – 954 (1999).
6. P.-G. Forkert, S. Boyd, and N. Ulreich, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **297**, 1193 – 1200 (2001).
7. F. Guengerich, *Ann. Rev. Pharmacol.*, **39**, 1 – 17 (1999).
8. K. Hyesook, D. Putt, R. Zangar, et al., *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 353 – 360 (2001).
9. H. Iber, Q. Chen, and E. Morgan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **377**, 187 – 194 (2000).
10. B. Israel, R. Blouin, W. McIntyre, and S. Shedlofsky, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **36**, 226 – 235 (1993).
11. R. Jover, R. Bort, M. Gomez-Lachon, and J. Castel, *FASEB J.*, **16**, 1799 – 1801 (2002).
12. S. Kamath and E. Rubin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 52 – 59 (1972).
13. S. Kim, J. Shigenaga, and A. Moser, *J. Biol. Chem.*, **278**, 8988 – 8995 (2003).
14. J. Lohr, G. Willsky, and M. Acara, *Pharmacol. Rev.*, **50**, 107 – 141 (1998).
15. E. Morgan, *Drug. Metab. Dispos.*, **29**, 207 – 212 (2001).
16. V. Nedelcheva and I. Gut, *Xenobiotica*, **24**, 1151 – 1175 (1994).
17. M. Nikolova-Karalashian, E. Morgan, C. Alexander, et al., *J. Biol. Chem.*, **272**, 18718 – 18724 (1997).
18. T. Omura and R. Sato, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370 – 2378 (1964).
19. O. Pelkonen, M. Eero, M. Kaltiala, et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **14**, 840 – 846 (1974).

20. R. Pohl and J. Fouts, *Anal. Biochem.*, **107**, 150 – 155 (1980).
21. D. Stresser, A. Blanchard, S. Turner, et al., *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 1440 – 1448 (2000).
22. A. Turnbull and C. Rivier, *Physiol. Rev.*, **79**, 1 – 71 (1999).
23. J. Werringloer, *Methods Enzymol.*, **52**, 297 – 302 (1978).

Поступила 10.11.03

THE EFFECT OF RECOMBINANT INTERLEUKIN 1 β ON CYTOCHROME P-450 DEPENDENT MONOOXYGENASES IN RAT LIVER AND KIDNEY

A. T. Akhmatov¹, S. V. Sibiryak¹, A. S. Simbirtsev², and D. S. Sibiryak¹

¹ Clinical Immunology and Immunopharmacology Department, All-Russia Center for Ophthalmic and Plastic Surgery, ul. R. Zorge 67/1, Ufa, Bashkortostan, 450075 Russia;

² Institute of Special Purity Biopreparations, State Scientific Center, ul. Pudozhskaya 7, St. Petersburg, 197220 Russia

Effects of a single administration of the human recombinant interleukin 1 β (rIL-1 β , betaleukin) on the cytochrome P-450 dependent monooxygenase activity in rat liver and kidney were evaluated in intact rats and on the background of cytochrome P-450 inducers. It was found that betaleukin suppressed the CYP1A1/2-dependent ethoxyresorufin-*o*-deethylase activity in both liver and kidney, as well as the CYP2C-dependent dibenzylfluorescein-debenzylase and CYP2E1-dependent nitrophenol-hydroxylase activity in liver, but induced CYP3A-dependent N-demethylation of erythromycin in liver and kidney. Betaleukin also inhibited the β -naphthoflavone-induced monooxygenase activity in liver, while only insignificantly acted upon the induced monooxygenases in kidney. Betaleukin decreased the pyridine-induced CYP2E1-dependent monooxygenation in liver and CYP1A1/2-dependent monooxygenation in kidney. Therefore, the character and direction of the influence of rIL-1 β on cytochrome P450 belonging to various subfamilies are variable and tissue-specific.