

Оригинальное исследование
УДК 615.275.3: 615.276: 615.324: 615.357: 615.375: 571.27.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДОЗОВОЗАВИСИМОГО ЭФФЕКТА ИНГИБИТОРОВ ЯНУС КИНАЗ IN VITRO

И.А. Волчек^{1,3}, В.Г. Новожинов², А.С. Теряев³, О.В. Гладко¹, Н.А. Балацкий¹, Н.А. Радомская⁴

¹ Медицинский институт непрерывного образования ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Москва, Россия.

² Филиал Военно-медицинской академии, Москва, Россия

³ ООО «Научно-исследовательский центр иммунологии и аллергологии», Москва, Россия.

⁴ ООО Медицинский гомеопатический «Центр здоровья и реабилитации», Москва, Россия.

АННОТАЦИЯ

Введение. Одним из самых перспективных средств таргетного воздействия на механизмы аутоиммунных процессов и гипериммунных реакций, связанных с цитокиновым дисбалансом, являются ингибиторы янус киназ. Однако данные химические вещества в используемых дозах обладают рядом нежелательных побочных эффектов. Действие малых и сверхмалых доз в отношении данной группы веществ не изучено.

Цель работы. Исследование влияния малых и сверхмалых концентраций ингибиторов янус киназ на синтез цитокинов мононуклеарными клетками человека *in vitro*.

Материалы и методы. В культуре мононуклеарных клеток здоровых доноров определяли концентрацию фактора некроза опухолей альфа (TNFα), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), интерферона альфа (IFNα), интерлейкина 2 (IL-2), интерлейкина 4 (IL-4), интерлейкина 6 (IL-6), интерлейкина 8 (IL-8) и интерлейкина 10 (IL-10) после стимуляции фитогемагглютинином, а также влияние на продукцию этих цитокинов руксолитиниба и барицитиниба в различных, в том числе сверхмалых, дозах.

Результаты. Установлено, что барицитиниб, равно, как и руксолитиниб, в обычных концентрациях достоверно снижали, а в сверхмалых достоверно повышали уровень синтеза всех исследованных в данном эксперименте цитокинов.

Выводы. Показан стимулирующий, но не подавляющий эффект сверхмалых концентраций ингибиторов янус киназ на примере руксолитиниба и барицитиниба. В отношении ингибиторов функций янус киназ такое явление обнаружено впервые, что открывает пути поиска новых средств регуляции иммунитета, в частности, продукции цитокинов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Ингибиторы янус киназ, барицитиниб, руксолитиниб, сверхмалые дозы, цитокины

КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ: Волчек Игорь Анатольевич, e-mail: igor.volchek@gmail.com

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Новожинов В.Г., Теряев А.С., Гладко О.В., Балацкий Н. А., Волчек И.А., Радомская Н.А. Исследование дозозависимого эффекта ингибиторов янус киназ *in vitro* // Вестник медицинского института непрерывного образования. — 2024. — V. 4, No. 2. — С. 96–100. — DOI 10.36107/2782-1714_2024-4-2-96-100.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ: Научно-исследовательский центр иммунологии и аллергологии, целевое финансирование.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

IN VITRO STUDY OF THE DOSE-DEPENDENT EFFECT OF JANUS KINASE INHIBITORS

I.A. Volchek^{1,3}, V.G. Novozhenov², A.S. Teryaev³, O.V. Gladko¹, N.A. Balatsky¹, N.A. Radomskaya⁴

¹ Medical Institute of Continuing Education, Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Moscow, Russia

² Branch of the Military Medical Academy, Moscow, Russia

³ Research Center for Immunology and Allergology, Moscow, Russia

⁴ Medical Homeopathic "Health and Rehabilitation Center", Moscow, Russia

ABSTRACT

Background. One of the most promising means of targeting the mechanisms of autoimmune processes and hyperimmune reactions associated with cytokine imbalance are Janus kinase inhibitors. However, these chemicals in the used doses have a number of undesirable side effects. The effect of small and ultra-low doses in relation to this group of substances has not been studied.

Purpose. To study the effect of low and ultra-low concentrations of Janus kinase inhibitors on the synthesis of cytokines by human mononuclear cells in vitro.

Materials and methods. The concentrations of tumor necrosis factor alpha (TNF α), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon alpha (IFN α), interleukin 2 (IL-2), interleukin 4 (IL-4), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8) and interleukin 10 (IL-10) after stimulation with phytohemagglutinin were determined in the culture of mononuclear cells of healthy donors. Also the effect on the production of these cytokines of ruxolitinib and baricitinib in various doses, including ultra-low ones, was determined.

Results. It was found that baricitinib, as well as ruxolitinib, at normal concentrations significantly decreased, and at ultra-low concentrations they significantly increased the level of synthesis of all cytokines studied in this experiment.

Conclusion. The stimulating, but not suppressive effect of ultra-low concentrations of Janus kinase inhibitors has been demonstrated using the example of ruxolitinib and baricitinib. In relation to inhibitors of Janus kinase functions, this phenomenon has been discovered for the first time, which opens up ways to search for new means of regulating immunity, in particular, the production of cytokines.

KEYWORDS: Janus kinase inhibitors, baricitinib, ruxolitinib, ultra-low doses, cytokines

CORRESPONDENCE: Igor A. Volchek, e-mail: igor.volchek@gmail.com

FOR CITATIONS: Novozhenov V.G., Teryaev A.S., Gladko O.V., Balatsky N.A., Volchek I.A., Radomskaya N.A. In vitro study of the dose-dependent effect of Janus kinase inhibitors // Bulletin of the Medical Institute of Continuing Education. — 2024. — V. 4, No. 2. — S. 96–100. – DOI 10.36107/2782-1714_2024-4-2-96-100.

FUNDING SOURCE: Research Center for Immunology and Allergology, targeted funding.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST: The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

ВВЕДЕНИЕ

Ингибиторы янус киназ являются важным средством для коррекции цитокинового дисбаланса, наблюдаемого при многих гипериммунных реакциях, в частности, аутоиммунитете, однако данные вещества обладают рядом серьезных побочных эффектов [1]. Это ставит вопрос об изучении эффективности малых и сверхмалых доз данных препаратов.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью работы явилось исследование влияния малых и сверхмалых концентраций ингибиторов янус киназ на синтез цитокинов мононуклеарными клетками человека in vitro.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фракция мононуклеарных клеток из периферической крови (МПК) 3-х здоровых доноров получена путем выделения на градиенте плотности фиколла (Панэко, Россия) с $\rho=1,077$ по стандартной методике, с 2-кратной отмывкой от фиколла. После второй отмывки осадок клеток каждого донора был ресуспендирован в 1 мл среды RPMI-1640 (Панэко, Россия) с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Biosera, Франция) и антибиотиками — пенициллином 50 Ед и стрептомицином 50 мкг (далее — полная среда). Также производили подсчет количества и жизнеспособности клеток в камере Горяева, с окраской 1% трипановым синим.

Выделенные клетки каждого донора развели полной средой до концентрации 2×10^6 в 1 мл и внесли по 200×105 в лунки 96-луночного планшета (Nunc, Дания).

В качестве индуктора экспрессии янус киназ и продукции цитокинов использовали фитогемагглютинин (ФГА) в конечной концентрации 10 мкг/мл полной среды.

В часть исследуемых образцов добавляли руксолитиниб и барицитиниб в концентрациях 1 мкг/мл, 200 нг/мл, 20 нг/мл и 10 пг/мл.

При определении концентраций мы руководствовались тем, что обычное применение ингибиторов янус киназ ограничено узким диапазоном концентраций, в основном от 5 мг до 1 мг в разовой дозе. То есть, в расчете на объем крови 5000 мл среднего взрослого человека — соответственно 1 мкг и 200 нг на миллилитр. Концентрации 20 нг/мл и 10 пг/мл можно считать малыми и сверхмалыми.

Препараты вносили в соответствующие лунки планшета по 10 мкл. Конечный объем среды во всех лунках — 250 мкл. Планшет помещали в условия влажной атмосферы с 5% CO $_2$ при 37°C на 48 часов.

После культивирования планшеты с клетками центрифугировали и в супернатанте определяли концентрацию фактора некроза опухолей альфа (TNF α), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), интерферона альфа (IFN α), интерлейкина 2 (IL-2), интерлейкина 4 (IL-4), интерлейкина 6 (IL-6), интерлейкина 8 (IL-8) и интерлейкина 10 (IL-10). Анализ проведен методом цитометрических бус Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Grp I Panel 8-plex (Bio-RAD) по протоколу производителя. Алгоритм анализа приведен на рис. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследований представлены в таблицах 1–12. Количество цитокинов выражено в пг/мл.

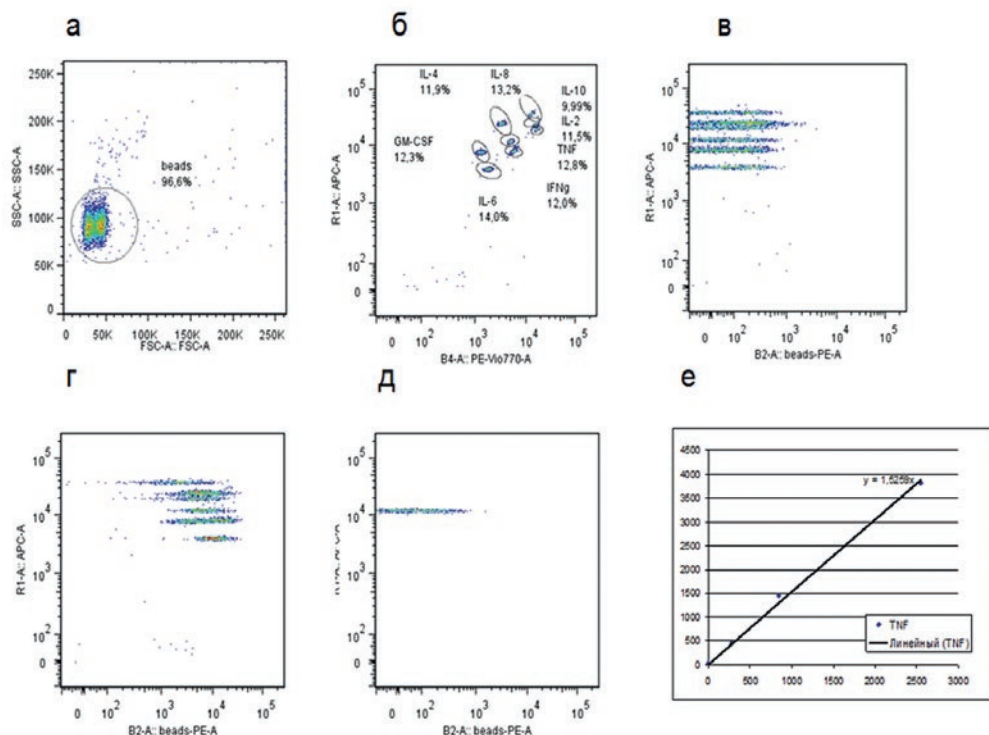


Рис. 1. Магнитные бусы с иммобилизованными антителами к цитокинам (а) включают 8 групп с антителами к ИЛ-2, 4, 6, 8, 10, интерферону гамма, фактору некроза опухоли альфа, гранулоцитарно-макрофагальному фактору роста (б). Движение бус в контроле (в) и в присутствии цитокинов (г). Анализ индивидуальных цитокинов (д). Титровочная кривая для определения концентрации цитокинов (е)

Данные по использованию разных концентраций руксолитиниба представлены в таблицах 1–6.

Как видно из таблиц, руксолитиниб в дозах, эквивалентных обычно применяемым в клинической практике, достоверно снижал синтез всех исследованных цитокинов. В малых и сверхмалых дозах, наоборот, наблюдалось достоверное повышение концентрации всех цитокинов.

В таблицах 7–12 представлены данные о влиянии различных концентраций барицитиниба.

Как видно из таблиц, барицитиниб, равно, как и руксолитиниб, в обычных концентрациях достоверно снижали, а в сверхмалых достоверно повышали уровень синтеза всех исследованных в данном эксперименте цитокинов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основным известным механизмом действия и показанием для клинического применения данных препаратов является подавление синтеза цитокинов, в частности, провоспалительных.

Поскольку эти препараты, хотя и относящиеся к одной группе, во многом различаются и имеют различные показания к клиническому применению, полученный практически аналогичный эффект свидетельствует об общем принципе действия сверхмалых концентраций для всех веществ данной группы — селективных ингибиторов JAK-киназ (Janus Associated Kinases — JAKs) и тирозинкиназ.

Таким образом, сверхнизкие дозы ингибиторов янус киназ, на примере барицитиниба и руксолитиниба действуют, относительно стандартно рекомендуемых,

Таблица 1. Влияние разных концентраций руксолитиниба на уровень TNFα

контроль	1 мкг/мл	200 нг/мл	20 нг/мл	10 пг/мл
225,7±12	76,5±9,4*	114,3±10*	327,4±6,7*	454,3±7,7*

Таблица 2. Влияние разных концентраций руксолитиниба на уровень GM-CSF

контроль	1 мкг/мл	200 нг/мл	20 нг/мл	10 пг/мл
125,3±14,2	45,3±5,4*	64,3±10,1*	197,3±5,5*	231,4±9,3*

Таблица 3. Влияние разных концентраций руксолитиниба на уровень IFNα

контроль	1 мкг/мл	200 нг/мл	20 нг/мл	10 пг/мл
57,3±12,4	26,4±6,4*	35,5±7,5*	72,9±8,7*	84,2±2,7*

Таблица 4. Влияние разных концентраций руксолитиниба на уровень IL-2

контроль	1 мкг/мл	200 нг/мл	20 нг/мл	10 пг/мл
78,4±13,2	32,1±3,7*	43,3±2,2*	96,3±2,7*	112,4±3,2*

Таблица 5. Влияние разных концентраций руксолитиниба на уровень IL-4

контроль	1 мкг/мл	200 нг/мл	20 нг/мл	10 пг/мл
45,0±6,4	28,2±2,5*	34,3±6,6*	56,7±3,1*	72,4±5,3*

Таблица 6. Влияние разных концентраций руксолитиниба на уровень IL-6

контроль	1 мкг/мл	200 нг/мл	20 нг/мл	10 пг/мл
98,9±10,2	45,3±7,8*	67,3±14,1*	123,8±7,6*	132,9±8,7*

Примечание: * – статистически достоверно ($P \leq 0,01$) по сравнению с контролем

Таблица 7. Влияние разных концентраций барицитиниба на уровень TNF α

контроль	1 мкг/мл	200 нг/мл	20 нг/мл	10 пг/мл
225,7 $\pm$ 12	76,4 $\pm$ 12,1*	165,2 $\pm$ 10,2*	277,7 $\pm$ 7,4*	312,3 $\pm$ 5,7*

Таблица 8. Влияние разных концентраций барицитиниба на уровень GM-CSF

контроль	1 мкг/мл	200 нг/мл	20 нг/мл	10 пг/мл
125,3 $\pm$ 14,2	45,8 $\pm$ 6,6*	72,3 $\pm$ 9,3*	187,3 $\pm$ 4,8*	212,7 $\pm$ 9,9*

Таблица 9. Влияние разных концентраций барицитиниба на уровень IFN α

контроль	1 мкг/мл	200 нг/мл	20 нг/мл	10 пг/мл
57,3 $\pm$ 12,4	28,4 $\pm$ 5,3*	44,5 $\pm$ 4,3*	74,2 $\pm$ 7,7*	89,7 $\pm$ 4,8*

Таблица 10. Влияние разных концентраций барицитиниба на уровень IL-2

контроль	1 мкг/мл	200 нг/мл	20 нг/мл	10 пг/мл
78,4 $\pm$ 13,2	32,1 $\pm$ 3,7*	43,3 $\pm$ 2,2*	96,4 $\pm$ 5,5*	102,7 $\pm$ 8,6*

Таблица 11. Влияние разных концентраций барицитиниба на уровень IL-4

контроль	1 мкг/мл	200 нг/мл	20 нг/мл	10 пг/мл
45,0 $\pm$ 6,4	26,2 $\pm$ 3,9*	35,3 $\pm$ 4,5*	66,7 $\pm$ 7,4*	74,2 $\pm$ 5,6*

Таблица 12. Влияние разных концентраций барицитиниба на уровень IL-6

контроль	1 мкг/мл	200 нг/мл	20 нг/мл	10 пг/мл
98,9 $\pm$ 10,2	45,8 $\pm$ 8,6*	54,3 $\pm$ 9,6*	131,3 $\pm$ 6,5*	144,2 $\pm$ 7,8*

Примечание: * - статистически достоверно ($P \leq 0,01$) по сравнению с контролем

прямо противоположно, то есть, не подавляют синтез цитокинов, а стимулируют его, что дает неизвестный ранее для этой группы веществ эффект стимуляции выработки цитокинов.

Сам по себе феномен инверсии эффекта биологически активных веществ в сверхмалых концентрациях известен давно и серьезно изучается многими специалистами фундаментальных наук [2; 3].

Например, показана высокая эффективность сверхмалых концентраций ингибитора НАДФН-оксидазы дифенилениодина в лечении экспериментального колоректального рака, ассоциированного с колитом. Механизм действия был связан с ингибированием фосфорилирования фактора трансдукции и активации транскрипции (STAT3), митоген активируемой протеинкиназы (МАРК), и нуклеарного фактора каппа би (NF- κ B) [4].

С помощью использования сверхмалых доз провоспалительных цитокинов TNF α и IL-1 β уровень продукции этих цитокинов в культуре клеток моноцитов снижался на 20%, что свидетельствует о противовоспалительном эффекте [5].

На основе этого явления инверсии действия сверхмалых доз рекомендованы и уже используются ряд препаратов и фармацевтических композиций, в частности, низкодозовая фармацевтическая композиция изотретионина [6] или цитокинов для лечения ревматоидного артрита [7].

Механизм действия сверхмалых доз в настоящее время еще далек от изученности. Существует несколько предположений, в большей или меньшей степени объясняющих данное явление (концентрирование действующего вещества; наличие исключительно высокоэффективных систем усиления сигнала; форсирование эффекта в условиях неравновесного связывания лиганда с рецептором; адаптационная гипотеза; гипотеза, основанная на представлениях о «памяти воды») [8; 9].

По мнению Е.Б. Бурлаковой, в основе данного явления лежат физико-химические механизмы взаимодействия регуляторных процессов клетки, изменения структуры мембран, взаимодействия и средства рецепторов и лигандов [2; 10].

Л.Б. Болдырева изучая свойства сверхтекучих спиновых токов в сверхтекучем $^3\text{He-B}$ показала аналогию между особенностями действия сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов на биологические объекты. То есть, механизмы действия сверхмалых доз могут проявляться на квантовом уровне [11; 12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, механизмы влияния сверхмалых доз биологически активных веществ весьма сложны и принадлежат области фундаментальных физико-химических исследований.

Тем не менее, конкретный эффект известен, что дает возможность практического использования в различных областях биологии и медицины.

В результате проведенного нами исследования показан стимулирующий, но не подавляющий эффект сверхмалых концентраций ингибиторов янус киназ на примере руксолитиниба и барицитиниба. В отношении ингибиторов функций янус киназ, такое явление обнаружено впервые, что открывает пути поиска новых средств регуляции иммунитета, в частности, продукции цитокинов.

ЛИТЕРАТУРА

- Новиков П.И. и др. Ингибиторы янус-киназ: фармакологические свойства и сравнительные клиническая эффективность и безопасность // Клиническая фармакология и терапия. — 2021. — Т. 30. — № 1. — С. 51–60.
- Эпштейн О. и др. Сверхмалые дозы (история одного исследования) // Издательство Российской академии медицинских наук. — 2008. — С. 336–336.
- Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов // Химическая физика. — 2003. — Т. 22. — № 2. — С. 21–40.

4. Kuai Y. et al. An ultralow dose of the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium (DPI) is an economical and effective therapeutic agent for the treatment of colitis-associated colorectal cancer // *Theranostics*. — 2020. — Т. 10. — № 15. — С. 6743. doi: 10.7150/thno.43938
5. Floris I. et al. Pro-inflammatory cytokines at ultra-low dose exert anti-inflammatory effect in vitro: a possible mode of action involving sub-micron particles? // *Dose-Response*. — 2020. — Т. 18. — № 4. — С. 1559325820961723. doi: 10.1177/1559325820961723
6. Патент RU 2707753 — Низкодозовая фармацевтическая композиция изотретионина для перорального введения, опубликовано 29.11.2019
7. Jacques C., Floris I., Lejeune B. Ultra-low dose cytokines in rheumatoid arthritis, three birds with one stone as the rationale of the 2LARTH® micro-immunotherapy treatment // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2021. — Т. 22. — № 13. — С. 6717. <https://doi.org/10.3390/ijms22136717>
8. Генераленко Н.Ю., Крюкова Л.Ю., Пушкин И.А. Эффекты малых и сверхмалых доз биологически активных веществ // *Научные и образовательные проблемы гражданской защиты*. — 2010. — № 3. — С. 6–7.
9. Булатов В.В. и др. Проблема малых и сверхмалых доз в токсикологии. Фундаментальные и прикладные аспекты // *Российский химический журнал*. — 2002. — Т. 46. — № 6. — С. 58–62.
10. Бурлакова Е.Б. Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности // *Российский химический журнал*. — 1999. — № 5. — С. 3–11.
11. Болдырева Л.Б. Аналогия между особенностями действия сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов на биологические объекты и свойствами сверхтекучих спиновых токов в сверхтекучем $^3\text{He-B}$ // *Сложные системы*. — 2013. — № 1. — С. 70–89.
12. Boldyreva L.B. Kvantovo-mekhanicheskaya model' deystviya sverkhmalykh lekarstvennykh doz [A quantum-mechanical model of action of ultra low dose medicine]. *Tezisy dokladov IV Mezhdunarodnogo simpoziuma «Mekhanizmy deystviya sverkhmalykh doz»*, Rossiyskaya akademiya nauk, Moscow. — 2008. — С. 14–15

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Волчек Игорь Анатольевич — д.м.н., профессор кафедры кожных и венерических болезней с курсом косметологии медицинского института непрерывного образования федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)». Главный научный сотрудник научно-исследовательского центра иммунологии и аллергологии. Москва, Россия. ORCID 0009-0000-1451-6145; SPIN-код: 6743-2105; AuthorID: 740245

Новоженков Владислав Григорьевич — д.м.н., профессор, преподаватель кафедры терапии неотложных состояний Филлиала федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации в г. Москве. ORCID 0009-0002-8037-3263; SPIN-код 5724-678; AuthorID 193286

Теряев Андрей Сергеевич — генеральный директор научно-исследовательского центра иммунологии и аллергологии. Москва, Россия. ORCID 0009-0005-8393-2093; SPIN-код: 6743-2105; AuthorID: 740245

Гладько Олег Викторович — к.м.н., доцент, доцент кафедры кожных и венерических болезней с курсом косметологии Медицинского института непрерывного образования ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ». Москва, Россия. ORCID 0009-0001-1798-7919.

Балацкий Никита Андреевич — ординатор кафедры медицинской реабилитации и физических методов лечения с курсами остеопатии и паллиативной медицины Медицинского института непрерывного образования ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ», Москва, Россия. ORCID 0009-0008-6952-7966.

Радомская Наталия Анатольевна — к.б.н., генеральный директор сети клиник ООО Медицинский гомеопатический «Центр здоровья и реабилитации», Москва, Россия. ORCID 0009-0001-1131-0325

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Волчек Игорь Анатольевич — теоретическое обоснование, практическое осуществление лабораторных исследований.

Новоженков Владислав Григорьевич — разработка методик тестирования и определения режима дозирования продуктов.

Теряев Андрей Сергеевич — разработка и практическое осуществление получения тестируемых фармацевтических субстанций.

Гладько Олег Викторович — теоретическое обоснование и разработка методик тестирования и определения режима дозирования продуктов.

Балацкий Никита Андреевич — непосредственное участие в проведении эксперимента.

Радомская Наталия Анатольевна — разработка методик и непосредственное участие в проведении эксперимента

ПОСТУПИЛА: 17.04.2024

ПРИНЯТА: 08.05.2024

ОПУБЛИКОВАНА: 25.06.2024