

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Янушевич О.О.¹, Духовская Н.Е.¹, Островская И.Г.¹, Вавилова Т.П.¹, Ахмедов Г.Д.¹,
Новикова Т.М.², Шашковская В.С.², Спиридонова В.А.²

ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВА ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 МЕТОДАМИ SDS-ПААГ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА В СМЕШАННОЙ СЛЮНЕ ПОСЛЕ ОПОЛАСКИВАНИЯ ПОЛОСТИ РТА РАСТВОРОМ ОЛИГОНУКЛЕОТИДА, СПЕЦИФИЧЕСКОГО К ИНТЕРЛЕЙКИНУ-6

¹ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, 127473, Москва, Россия;

²НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Россия

Были изучены селективные свойства раствора олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6 на концентрацию ИЛ-6 в смешанной слюне пациентов с воспалительными процессами в ротовой полости методами SDS-ПААГ электрофореза и иммуноферментного анализа. Применение данных методов показало, что в смешанной слюне пациентов после полоскания раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6, снижается количество ИЛ-6. Наибольшую чувствительность для определения концентрации ИЛ-6 в слюне показал метод ELISA Kit и 20% SDS-ПААГ при окрашивании серебром, что необходимо учитывать в клинической лабораторной практике.

Ключевые слова: раствор олигонуклеотида; специфический к интерлейкину-6; смешанная слюна; электрофорез; иммуноферментный анализ.

Для цитирования: Янушевич О.О., Духовская Н.Е., Островская И.Г., Вавилова Т.П., Ахмедов Г.Д., Новикова Т.М., Шашковская В.С., Спиридонова В.А. Исследование количества интерлейкина -6 методами SDS-ПААГ электрофореза и иммуноферментного анализа в смешанной слюне после ополаскивания полости рта раствором олигонуклеотида, специфического к интерлейкину -6. Клиническая лабораторная диагностика. 2019;64 (7): 413-416.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-413-416>

Yanushevish O.O.¹, Dukhovskaya N.E.¹, Ostrovskaya I.G.¹, Vavilova T.P.¹, Akhmedov G.D.¹, Novikova T.M.²,
Shashkovskaya V.S.², Spiridonova V.A.²

STUDY OF THE QUANTITY OF INTERLEUKIN-6 BY SDS-PAAG ELECTROPHORESIS AND IMMUNO-ENZYME ANALYSIS IN MIXED SALIVA AFTER RINSING THE ORAL CAVITY WITH OLIGONUCLEOTIDE SPECIFIC BY INTERLEUKIN-6

¹Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, 127473, Moscow, Russia;

²The A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992, Moscow, Russia

The selective properties of a solution of oligonucleotide specific to IL-6 on the concentration of IL-6 in mixed saliva of patients with oral inflammatory processes were studied using SDS-PAGE by electrophoresis and enzyme immunoassay. The application of these methods showed that in the mixed saliva of patients after rinsing with a solution of an oligonucleotide specific for IL-6, the amount of IL-6 decreases. The ELISA Kit and 20% SDS-PAGE showed the highest sensitivity to determine the concentration of IL-6 in saliva, which should be considered in clinical laboratory practice.

Key words: oligonucleotide solution specific to interleukin-6; mixed saliva; electrophoresis; enzyme immunoassay analysis.

For citation: Yanushevish O.O., Dukhovskaya N.E., Ostrovskaya I.G., Vavilova T.P., Akhmedov G.D., Novikova T.M., Shashkovskaya V.S., Spiridonova V.A. Study of the quantity of interleukin-6 by SDS-PAAG electrophoresis and immuno-enzyme analysis in mixed saliva after rinsing the oral cavity with oligonucleotide specific. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (7): 413-416 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-413-416>

For correspondence: Dukhovskaya N.E., Ph.D. Sci. Med., Associate Professor at the Department propaedeutics of dental diseases; e-mail: ndukhovskay@mail.ru

Information about authors:

Dukhovskaya N.E., <https://orcid.org/0000-0003-0533-7051>

Ostrovskaya I.G., <https://orcid.org/0000-0001-6788-4945>

Vavilova T.P., <https://orcid.org/0000-0002-4255-8825>

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 23.05.2019
Accepted 31.05.2019

Для корреспонденции: Духовская Наталья Евгеньевна, канд. мед. наук, доц. каф. пропедевтики стоматологических заболеваний; e-mail: ndukhovskay@mail.ru

Введение. В стоматологической практике существует множество форм заболеваний тканей ротовой полости, сопровождающихся воспалительными процессами. Воспалительным изменениям сопутствует реакция иммунокомпетентных клеток, которые секретируют множество цитокинов и других белков, участвующих

в этом процессе. При воспалении идет последовательная секреция фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), интерлейкина (ИЛ)-1 и -6. Под действием этих цитокинов активируется продукция печенью белков острой фазы воспаления и стимулируется гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система, что способствует регуляции воспалительного процесса [1-5].

Интерлейкин-6 является плейотропным цитокином с молекулярной массой 19–24 кДа, вырабатывается не только клетками иммунной системы, но и вспомогательными клетками, обладающими иммунной функцией (моноцитами, макрофагами, лимфоцитами, эндотелиоцитами, астроцитами и клетками микроглии). Своё действие ИЛ-6 реализует через систему JAK-STAT, состоящую из янус-киназы (JAK), а также из сигнального белка-транскриптора и активатора транскрипции (STAT) [6]. Спектр биологического действия ИЛ-6 достаточно широк и реализуется в основном в обеспечении дифференцировки клеток-мишеней на поздних стадиях развития, а также он участвует в дифференцировке цитотоксических Т-лимфоцитов [7].

Терапевтические ингибиторы ИЛ-6 или его рецептора уже используются для лечения некоторых аутоиммунных заболеваний, однако имеется опасность, что системная блокировка может подавить защитные функции этого цитокина. Предполагается, что в будущем на смену системной терапии придут более специфические подходы, учитывающие особенности молекулярных сигнальных механизмов в клетках-мишенях и различия в функции ИЛ-6 в зависимости от типов клеток, его продуцирующих [8].

Сегодня одновременно ведется множество исследований, рассматривающих различные способы применения наночастиц, содержащих селективные ингибиторы, что является подходящим решением для лечения многих заболеваний. Использование наночастиц, содержащих активные вещества, может значительно повлиять на профилактику и успешное лечение воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области в целом. На основании вышеизложенного, разработка методов ингибирования ИЛ-6 с помощью специфического к нему олигонуклеотида, является актуальным и перспективным для решения задач профилактики и возможной коррекции воспалительных процессов в ротовой полости.

Цель исследования: разработать и обосновать методику применения раствора олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6, у пациентов с воспалительными изменениями в тканях ротовой полости.

Материал и методы. В исследовании участвовали 30 пациентов с психотическими расстройствами (средний возраст $55,2 \pm 1,44$ лет), находящихся на лечении в психиатрическом стационаре ГБУЗ МО ЦКПБ. В план клинического обследования были включены опрос, сбор анамнеза, осмотр полости рта. У данных пациентов в силу их психического состояния невозможно использование инструментальных методов обследования и лечения тканей полости рта. Поэтому было проведено неинвазивное исследование смешанной слюны, в которой определяли количество маркера воспаления, в частности ИЛ-6.

Для получения молекул фрагментов нуклеиновых кислот, специфических к ИЛ-6 был применен метод SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) с использованием комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот. В основе метода лежит отбор

молекул нуклеиновых кислот, которые обладают каким-либо сродством к белковой мишени. Описание методики селективного фрагментирования ДНК к ИЛ-6 приводится в статье [9].

Раствор олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6, получали растворением 0,12 мг лиофилизата в 1000 мл воды, что соответствовало $0,12 \cdot 10^{-3}\%$. Полоскание раствором объемом 2 мл проводилось однократно в течение 10 мин, через 10 мин после процедуры осуществлялся сбор смешанной слюны. Образцы слюны получали путём сплевывания без стимуляции в стерильную пластиковую градуированную пробирку в течение 5 мин до и после полоскания полости рта раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6. Для сравнения были изучены образцы смешанной слюны у 13 здоровых волонтеров (средний возраст $42,7 \pm 1,33$ лет), без воспалительных изменений в ротовой полости.

Для подготовки образцов слюны к исследованию было проведено их центрифугирование при 15000 об/мин в течение 10 мин с получением надосадочной жидкости объемом от 0,1 до 0,5 мл.

При определении белков в смешанной слюне был применён метод SDS-ПААГ электрофореза. Аликвоты всех рабочих образцов были охарактеризованы электрофорезом в 8% и 20% ПААГ в присутствии SDS (додецилсульфата натрия). Вертикальный белковый электрофорез по Лэммли [Laemmli VK, 1970, Nature, 227, 680-685] в денатурирующих условиях проводили в камере Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad) по протоколу [Edited by Bollag D.M., Rozycki M.D., Edelman S.J. (1996) *Prot. Methods* (second edition), pp.107-155]. Разделяющий буфер (12 мл) – 14,6 % акриламида, 0,4 % N, N-метилен-бисакриламида; концентрирующий (4 мл) – 3,8 % акриламида, 0,2 % N, N'-метилен-бисакриламида. Для полимеризации к концентрирующему буферу добавляли 50 и 5, к разделяющему – 80 и 10 мкл 10 % персульфата аммония и TEMED'a, соответственно. В качестве контроля использовали белковые маркеры и стандартные белки: лизоцим (13кДа), химотрипсин А (24кДа). Электрофорез проводили при 15-30 мА. После электрофореза гель окрашивали кумасси по протоколу.

Для вертикального электрофореза в 8% ПААГ смешивали 7,73 г акриламида с 0,27 г N, N-метилен-бисакриламида в присутствии трис-боратного буфера (растворяли 118 г триса, 55 г борной кислоты в 1 л воды). Для полимеризации добавляли 300 мкл раствора 10% персульфата аммония и 20 мкл TEMED. Префорез проводили 45 минут при 15 мА при 4°C. Образцы наносили в растворе 15% глицерина. Электрофорез осуществляли 1,5 часа при 15 мА при 4°C. Гель фиксировали 10% раствором уксусной кислоты с добавлением 20% этанола (в течение ночи), а далее использовали окрашивание серебром с применением трех растворов: 1) тиосульфат натрия (0,3 г/л); 2) нитрат серебра (1г/л) и 37% водный р-р формальдегида (1мл/л); 3) карбонат натрия (40 г/л); тиосульфат натрия (0,003 г/л); 37% водный р-р формальдегида (1мл/л). Все полученные значения оценивали по свидетелю.

Определение активного ИЛ-6 в образцах смешанной слюны пациентов проводилось методом ИФА с использованием набора ELISA Human IL-6 ELISA Kit (Invitrogen) и ИЛ-6 (ЗАО Вектор-Бест, Россия). Полученные результаты были обработаны методами вариационной статистики с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Достоверными считались значения при $p < 0,05$.

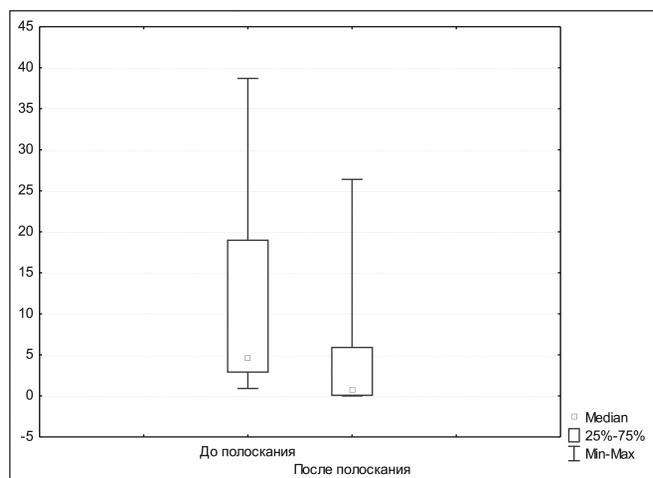


Рис.4. График изменения количества ИЛ-6 (пг/мл) в смешанной слюне пациентов ($n=16$) до и после полоскания раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6, определяемого методом ИФА чувствительностью $<2,0$ пг/мл.

Результаты и обсуждение. На электрофореграмме (рис.1, см.обложку) были четко отмечены различия между рабочими образцами ($n=6$), полученными у пациентов до и после полоскания раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6. Это позволило сделать первичный вывод, что полоскание раствором вносит изменение в белковый состав слюны. Все контрольные образцы волонтеров имели близкий белковый состав, мало отличающийся между собой.

Так как SDS-ПААГ электрофорез имеет порог чувствительности при определении белков - $0,5$ мкг/в пробе было принято решение провести характеристику рабочих образцов ($n=8$) в ПААГ в неденатурирующих условиях с использованием для окрашивания белковых полос ионами серебра (рис.2, 3, см.обложку).

Во всех образцах присутствует ИЛ-6 в разных количествах. Было проведено сравнение с рекомбинантным образцом ИЛ-6, который получают в лабораторных условиях. На рис. 2 и 3 показано, что образцы «до» и «после полоскания» раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6 резко отличаются количеством белка: наблюдается снижение белковой составляющей в образце «после полоскания».

Таким образом, визуальное сравнение электрофореграмм подтверждает, что полоскание раствором, олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6 снижает содержание белка в смешанной слюне у пациентов и не влияет на его количество в смешанной слюне здоровых волонтеров.

Было проведено изучение количества ИЛ-6 в смешанной слюне пациентов ($n=24$) до и после полоскания раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6. В первом случае был применен метод ИФА с использованием реактива, содержащего антитела к ИЛ-6 (ЗАО Вектор-Бест, Россия) с чувствительностью $<2,0$ пг/мл.

Полученные результаты выявили достоверные значения ($p<0,001$) в изменении концентрации ИЛ-6 в слюне пациентов до и после полоскания (рис. 4). После по-

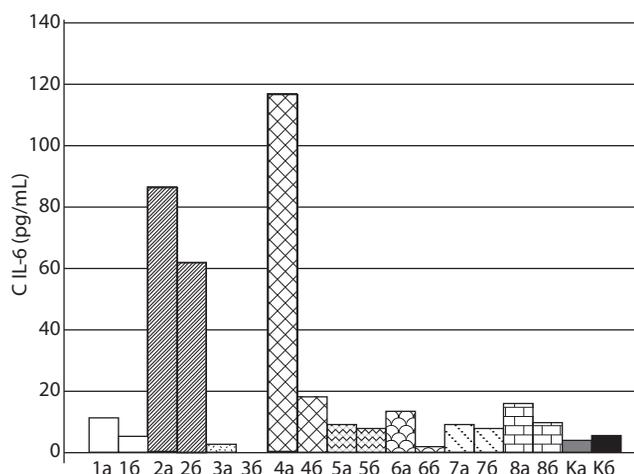


Рис. 5. График изменения количества ИЛ-6 (пг/мл) в индивидуальных образцах смешанной слюны пациентов ($n=8$) до и после полоскания раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6. Примечание: 1-8 – пациенты с воспалительными изменениями в ротовой полости; К – контроль (здоровые волонтеры); «а» – до полоскания, «б» – после полоскания.

лоскания раствором из 16 пациентов у 5 человек в смешанной слюне не определялся ИЛ-6, чем и объясняется большая ошибка полученных значений. В слюне здоровых волонтеров этим методом не определялась концентрация ИЛ-6.

В связи с этим, была предпринята попытка использовать другой метод определения ИЛ-6. Диагностическая панель ELISA Human IL-6 определяет количество ИЛ-6 в образце с чувствительностью $<1,0$ пг/мл. Данным методом определяется как естественный, так и специфический ИЛ-6. Результаты исследования представлены на рисунке 5.

Анализ индивидуальных образцов ($n=9$) смешанной слюны как пациентов, так и здоровых волонтеров с применением метода ELISA показал присутствие ИЛ-6. После полоскания полости рта раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6, наблюдалось снижение уровня ИЛ-6 в слюне.

Заключение. Нами получены данные о содержании ИЛ-6 в образцах смешанной слюны пациентов с воспалительными процессами в тканях полости рта до и после полоскания полости рта раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6. Использовались разные методы в исследовании уровня ИЛ-6 в образцах смешанной слюны. Несмотря на то, что оба метода позволили выявить тенденцию к снижению количества ИЛ-6 в образцах смешанной слюны после полоскания полости рта раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6. Однако, более чувствительным для определения концентрации ИЛ-6 в слюне оказался метод ELISA Kit. Метод электрофореза в 20% ПААГ в неденатурирующих условиях с использованием ионов серебра повышает чувствительность метода, характеризуется простотой исследования и может быть использован в клинической лабораторной практике. Предлагаемая нами методика ополаскивания полости рта раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6, может влиять на регуляцию действия ИЛ-6 в ротовой полости.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-7 см. REFERENCES)

8. Друзкая М.С., Носенко М.А., К-СН Атретханы, Ефимов Г.А., Недоспасов С.А. Интерлейкин-6 - от молекулярных механизмов передачи сигнала к физиологическим функциям и терапевтическим мишеням. *Молекулярная биология*. 2015; 49 (6); 937–43.
9. Спиридонова В.А., Новикова Т.М., Снигирев О.В. Получение ДНК-аптамеров к интерлейкину-6 человека для создания наносенсорной биомангнитной системы безразделительного иммунного анализа. *Вестник Московского Университета. Серия 3. ФИЗИКА. АСТРОНОМИЯ*. 2016; 1: 113-6.

REFERENCES

1. Hesse D.G., Tracey K.J., Fong Y., Manogue K.R., Palladino M.A. Jr., Cerami A., et al. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1988; 166(2): 147-53.
2. Van Deventer S.J., Buller H.R., ten Gate J.W., Aarden L.A., Hack C.E., Sturk A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood*. 1990; 76(12): 2520-6.

3. Schindler R., Mancilla J., Endres S., Ghorbani R., Clark S.C., Dinarello C.A. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*. 1990; 75(1): 40-7.
4. Heinrich P.C., Castell J.V., Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem.* 1990; 265(3): 621-36.
5. Lyson K., McCann S.M. The effect of interleukin-6 on pituitary hormone release in vivo and in vitro *Neuroendocrinology*. 1991; 54(3): 262-6.
6. Kishimoto T., Akira S., Narazaki M., Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp 130. *Blood*. 1995; 86(4): 1243-54.
7. Baumann H., Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today*. 1994; 15(2): 74-80.
8. Drutskaya M.S., Nosenko M. And., K-CH. Atratkhany, Efimov G.A., Nedospasov S.A. Interleukin-6 - from molecular mechanisms of signal transmission to physiological functions and therapeutic targets. *Molekulyarnaya biologiya*. 2015; 49(6): 937–43. (in Russian)
9. Spiridonova V.A., Novikova T.M., Snigirev O.V. Receiving DNK-aptamerov to interleukin-6 of the person for creation of a nanosensor biomagnetic system of the bezrazdelitely immune analysis. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Series 3. PHYSICA. ASTRONOMIA*. 2016; 1: 113-6. (in Russian)

Поступила 23.05.19
Принята к печати 31.05.19

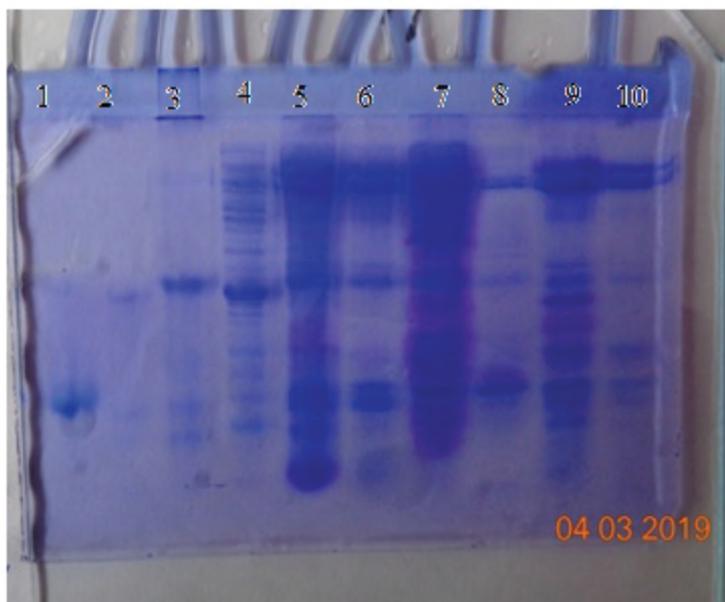


Рис.1. Электрофореграмма образцов смешанной слюны в 20% ПААГ: 1 – маркер лизоцим м.в. 14 kDa, 2, 3 – химотрипсин (маркер) м.в. 24 kDa, 4 – ИЛ-6 рекомбинантный м.в. 22 kDa, 5-10 рабочие образцы слюны: 5,7,9 – «до полоскания»; 6, 8, 10 – «после полоскания». Объем нанесения 20 мкл.

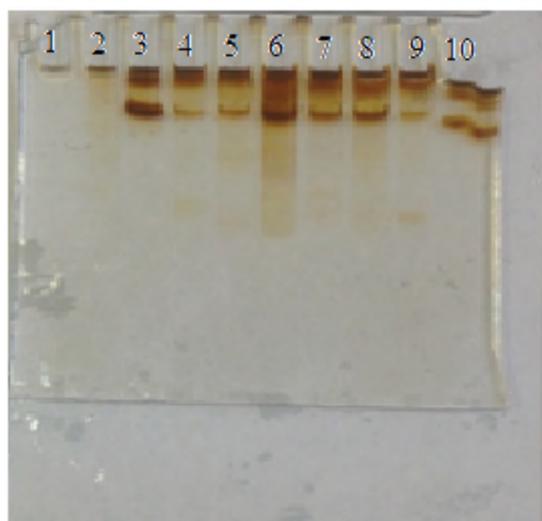


Рис.2. Электрофореграммы образцов смешанной слюны в 20% ПААГ в неденатурирующих условиях, окраска серебром. 1 - пустая дорожка; 2 - ИЛ-6 рекомбинантный, 5 мкл; 3 – ИЛ-6 коммерческий, 1мкл; 4-9 рабочие образцы слюны: 4 – волонтер «до полоскания»; 5 – волонтер «после полоскания»; 6, 8 – пациенты «до полоскания»; 7, 9 – пациенты «после полоскания»; 10 – ИЛ - 6 коммерческий, 1мкл.

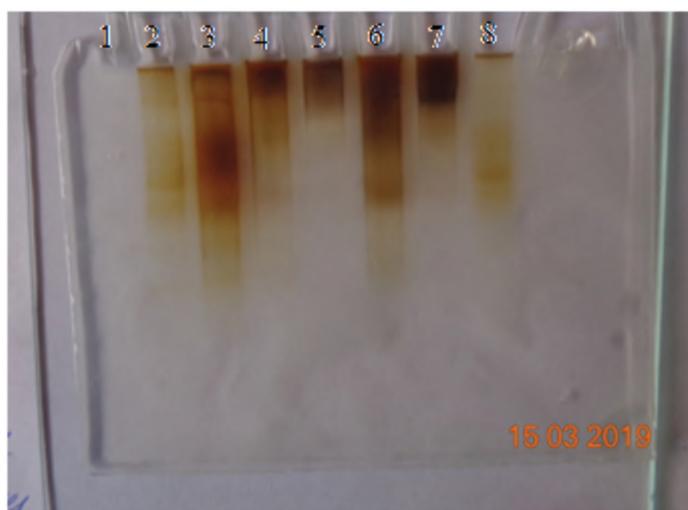


Рис. 3. Электрофореграмма образца смешанной слюны в 8% ПААГ в неденатурирующих условиях, окраска серебром: 1 - пустая дорожка; 2 – ИЛ-6 рекомбинантный 2 мкл; 3 – ИЛ-6 рекомбинантный 6 мкл; 4-7 - рабочие образцы слюны: 4 –до полоскания», 10 мкл; 5 - «после полоскания», 10 мкл; 6 - «до полоскания», 20 мкл; 7 - «после полоскания», 20 мкл; 8 – ИЛ-6 рекомбинантный 1 мкл.