

УДК: 616.34-002

## ЕФЕКТИВНІСТЬ НЕЙТРАЛІЗУЮЧОГО АНТИТІЛА ДО ФАКТОРА РОСТУ КРОВОНОСНИХ СУДИН ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ

Толстанова Г.М., Остапченко Л.І.

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка  
e-mail: gtolstanova@gmail.com

Поступила в редакцію 25.03.2010

Фактор росту кровеносних судин (VEGF) – потужний стимулятор ангиогенезу, який окрім участі в проліферації та міграції ендотеліальних клітин, викликає гіперпроникність кровеносних судин та збільшення адгезії лейкоцитів. Метою даної роботи було дослідити та порівняти ефективність нейтралізуючого антитіла до VEGF (VEGF антитіло) з традиційним антизапальним препаратом 5-аміносаліциловою кислотою (5-АСА) за умов експериментального виразкового коліту у щурів, викликаного 6% йодоацетамідом. Введення VEGF антитіла значно покращувало клінічні та морфологічні ознаки коліту. Ефективність VEGF антитіла не відрізнялась від такої, яка була викликана 5-АСА. Відсутність різниці в ефективності між протизапальним препаратом 5-АСА, який є першою лінією призначення при виразковому коліті, та VEGF антитілом може свідчити про тісний взаємозв'язок між запаленням та ангиогенними факторами при даній патології.

**Ключові слова:** запальні захворювання кишечника, експериментальний коліт, нейтралізуюче антитіло до VEGF, 5-аміносаліцилова кислота

### ВСТУП

Запальні захворювання кишечника (ЗЗК), до яких належать виразковий коліт (ВК) та хвороба Крона – одна з найбільш серйозних та невіршених проблем сучасної гастроентерології та колопроктології [1, 3]. В Україні показник розповсюженості ЗЗК становить 28,4 на 100 тис. населення з щорічним приростом вперше виявленої захворюваності - 3,5 рази.

На сьогоднішній день вважається, що основною причиною виникнення ЗЗК є порушення взаємодії між місцевою імунною системою кишечника та власною мікрофлорою. Підвищення проникності епітеліального шару кишечника в силу різних причин призводить до зниження функції кишкового бар'єру для мікроорганізмів та їх токсинів і, таким чином, є першою ланкою в патологічному ланцюгу мікрофлора-місцевий імунітет [11, 12]. Тому адекватне відновлення епітеліального шару є важливим етапом в попередженні рецидиву хвороби. Сучасна терапія ЗЗК спрямована на зменшення запалення (5-аміносаліцилат, стероїдна терапія), корекцію імунологічної відповіді (моноклональні IgG-антитіла до фактору некрозу пухлин  $\alpha$ , Інфліксімаб) та пригнічення можливих патогенних чинників (антибіотики) [13]. В той час, як поза увагою залишається терапевтичні заходи направлені на відновлення епітеліального шару кишечника.

Утворення нових кровеносних судин (ангіогенез) є ключовим компонентом процесу загоєння виразок та відновлення епітеліального шару, за рахунок покращення оксигенації та

формування основи для утворення грануляційної тканини [5]. Численні дослідження вказують на надмірний/патологічний ангиогенез при ЗЗК, який замість сприяння загоєнню виразок та відновленню епітеліального шару кишечника, навпаки погіршує стан. Адже, ангиогенез та хронічне запалення - є тісно взаємопов'язаними процесами. Так, гіпоксія, що виникає в місці запалення тканини, є одним з найпотужніших стимуляторів ангиогенезу через збільшення експресії ангиогенних факторів росту шляхом активації транскрипційного фактору HIF-1 $\alpha$ . По-друге, клітини запалення такі як макрофаги, лімфоцити, тучні клітини та фібробласти синтезують ангиогенні фактори росту, інтерлейкіни, та протеїнази, що беруть безпосередню участь в стимуляції ангиогенезу. В свою чергу ангиогенні фактори примножують запальний процес за рахунок рекрутування лейкоцитів, підвищення проникності судин. Більш того, збільшення поверхні судин в місці запалення створює дуже велику потужність для продукції цитокінів та молекул адгезії [9].

Фактор росту кровеносних судин (VEGF) – потужний стимулятор ангиогенезу, який окрім участі в проліферації та міграції ендотеліальних клітин [7], викликає гіперпроникність кровеносних судин і тому отримав іншу назву – фактор проникності судин (VPF) [10]. Більш того, Goebel S. та співав.[8] показали, що VEGF значно збільшує адгезію нейтрофілів і Т клітин та зменшує їх рух вздовж шару ендотеліальних клітин. Зважаючи на вищенаведене, ми передбачили, що нейтралізація активності VEGF може бути ефективною в лікуванні ЗЗК. Метою даної

роботи було дослідити та порівняти ефективність нейтралізуючого антитіла до VEGF з традиційним протизапальним препаратом 5-аміносаліциловою кислотою (5-АСА, месаламін) за умов експериментального ВК.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проведені на щурах-самках вагою 160-200 г. ВК викликали одноразовим ректальним введенням 0,1 мл 6%-го розчину йодоацетаміду (Sigma, США), розчиненим в 1%-ному розчині метилцелюлози (Sigma, США) (7 см від анального отвору, використовуючи гумовий катетер S8 (Rüsch, Німеччина).

Для оцінки ефективності впливу VEGF на клінічні та морфологічні ознаки йодоацетамід-зумовленого ВК щурам вводили нейтралізуюче моноклональне антитіло до VEGF (VEGF антитіло) (Ab-3; LabVision Co., США), яке було вироблене у мишей на рекомбінантний VEGF-A білок людини та має нейтралізуючу біоактивність до всіх VEGF-A ізоформ. Для перевірки активності цього антитіла проти VEGF щура, ми провели визначення експресії VEGF протеїну в слизовій оболонці товстої кишки щурів методом Вестерн блотинг, використовуючи це антитіло в якості первинного (1:500, LabVision Co., США). Методику Вестерн блотинг проводили як було описано раніше [2].

На третій день після введення йодоацетаміду щури були поділені на 3 групи (n=5): I група – отримувала VEGF антитіло, у вигляді внутрішньом'язової ін'єкції в дозі 50 мкг/щура, на 3 та 5 день; II група - отримувала контрольний мишачий імуноглобулін G (IgG) (LabVision Co.; США), у вигляді внутрішньом'язової ін'єкції в дозі 50 мкг/щура, на 3 та 5 день; III група – 0,1 мл/щура фізіологічний розчин, внутрішньом'язово. Щурів умертвляли на 7 день після введення йодоацетаміду. Експеримент повторили двічі.

Для порівняння ефективності VEGF антитіла, ми вводили щурам ректально 5-АСА (Sigma-Aldrich, США) в дозі 100 мг/кг, двічі на день починаючи з другого дня після введення йодоацетаміду. Щурам контрольної групи вводили ректально фізіологічний розчин. Щурів умертвляли на 7 день після введення йодоацетаміду. Експеримент повторили двічі.

Клінічні ознаки коліту, такі як маса тіла, летаргія (0-3 бали: 0 - норма, 1 – помірно піднята шерсть, 2 – тварина брудна, зменшення спонтанних рухів, 3 – тварина майже не рухається, не реагує на інших тварин), діарея (0-3 бали: 0 - норма; 1 - м'яке чи водянисте випорожнення, волога пляма навколо ануса до 1 см<sup>2</sup>; 2 - волога пляма навколо ануса більше ніж 1 см<sup>2</sup>, охоплює нижню частину живота; 3 - пляма доходить до грудей) оцінювали щоденно.

Для оцінки макроскопічних уражень, видаляли 7 см товстої кишки (від анального отвору), розрізали з антимезентерального боку, промивали в фізіологічному розчині. Вимірювали: площу ураження (мм<sup>2</sup>), поперековий переріз стінки товстої кишки (мм), площу ділянки, що втратила складки

(мм<sup>2</sup>), вагу 7 см кишки в перерахунку на 100г маси щура (мг/100г тіла).

Статистичну обробку результатів проводили за т тестом Ст'юдента. Дані представлені у вигляді M±SD, n – кількість тварин у групі. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю P<0,05.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі наших досліджень ми визначили чутливість VEGF атитіла, що було вироблено у мишей на рекомбінантний VEGF-A білок людини, до VEGF щура. Як видно на рис. 1 нейтралізуюче VEGF атитіло миші здатне зв'язуватись з VEGF щура.

Наступним завданням було дослідити ефективність нейтралізації VEGF при йодоацетамід-зумовленому коліті у щурів. Введення VEGF антитіла значно покращувало клінічні ознаки коліту. А саме, 77% щурів III групи, що отримували фізіологічний розчин та 70% тварин II групи, що отримували IgG на день автопсії мали діарею 1,1 та 0,9 балів відповідно. Тоді як, лише 50% тварини I групи, що отримували VEGF антитіло мали діарею з середнім показником 0,6 балів. Рівень летаргії був також значно зменшений у I групі тварин у порівнянні з II та III групами. Так в I групі цей показник складав 0,6 балів, в II групі – 1,1 балів, а в III групі – 0,7 балів.

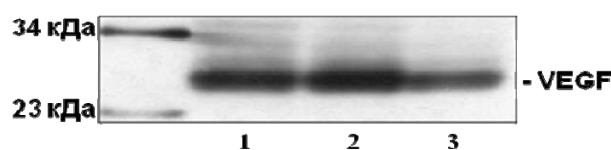


Рис. 1. Визначення рівня експресії VEGF протеїну в слизовій оболонці товстої кишки різних щурів (1, 2, 3) за допомогою нейтралізуючого VEGF атитіла миші. Вестерн блотинг, n=3.

Введення VEGF антитіла значно покращувало морфологічні ознаки коліту. Так площа уражень в I та II контрольних групах дорівнювала відповідно 347,16±141,51 мм<sup>2</sup> та 260,15±111,77 мм<sup>2</sup>, тоді як після введення VEGF антитіла цей показник становив 143,35±49,95 мм<sup>2</sup> (p<0,001 та p<0,01, відповідно). Введення VEGF антитіла зменшувало показник поперекового перерізу стінки товстої кишки (розширення кишки) і становило 17±3,33мм, проти 22,5±3,88 мм та 22,1±5,17 мм в контрольних групах I і II (p<0,01 та p<0,05, відповідно). Площа ділянки товстої кишки без складок дорівнювала 457,44±202,56 мм<sup>2</sup> та 331,00±139,54 мм<sup>2</sup>, відповідно в I і II групах. Після введення VEGF антитіла цей показник становив 179,9±79,27 мм<sup>2</sup> (p<0,001 та p<0,01, відповідно). Маса кишки на 100г тіла щура, також значно зменшувалась під дією VEGF антитіла і дорівнювала 0,82±0,14 мг/100 г тіла проти 1,26±0,33 та 1,14±0,35 мг/100 г тіла в контрольних групах I і II (p<0,001 та p<0,05, відповідно).

Як ми передбачали, щоденне введення 5-АСА вірогідно покращувало клінічні та морфологічні

ознаки йодоацетамід-зумовленого ВК. Рівень діареї за шкалою 1-3 бали на день автопсії в контрольній групі становив 1,4 бали, а 5-АСА зменшувала цей показник до 0,8 бала. Летаргія в контрольній групі дорівнювала 1,2 бали, в групі, що отримувала 5-АСА – 0,7 бала. Площа уражень товстої кишки в контрольній групі становила  $199,31 \pm 49,3 \text{ мм}^2$ , тоді як після введення 5-АСА –  $110,35 \pm 25,05 \text{ мм}^2$  ( $p < 0,01$ ). Введення 5-АСА зменшувало показник поперекового перерізу стінки товстої кишки (розширення кишки) і становило  $16,81 \pm 2,60 \text{ мм}$ , проти  $20,12 \pm 3,50 \text{ мм}$  в контрольній групі ( $p < 0,05$ ). Площа ділянки товстої кишки без складок дорівнювала  $250,55 \pm 35,63 \text{ мм}^2$ , після введення 5-АСА цей показник становив  $180,21 \pm 49,39 \text{ мм}^2$  ( $p < 0,05$ ). Маса кишки на 100г тіла щура, також значно зменшувалась під дією 5-АСА і дорівнювала

$0,90 \pm 0,08 \text{ мг/100 г тіла}$  проти  $1,50 \pm 0,10 \text{ мг/100 г тіла}$  в контрольній групі ( $p < 0,05$ ).

Для порівняння ефективності VEGF антитіла з дією 5-АСА отримані фактичні дані були представлені у відсотках відносно контрольної групи (100%). В експерименті з VEGF антитілом ми мали дві контрольні групи (I - фіз. розчин та II - IgG). Ми спостерігали незначний позитивний вплив на показники ВК після введення IgG у порівнянні з групою щурів, що отримувала фіз. розчин (I група). Зважаючи на це, ми прийняли за 100% контрольну групу, що отримувала IgG (II група) для перерахунку фактичних показників VEGF-групи. Як видно з рис. 2, ефективність VEGF антитіла не відрізняється від такої, що було відзначено для 5-АСА.

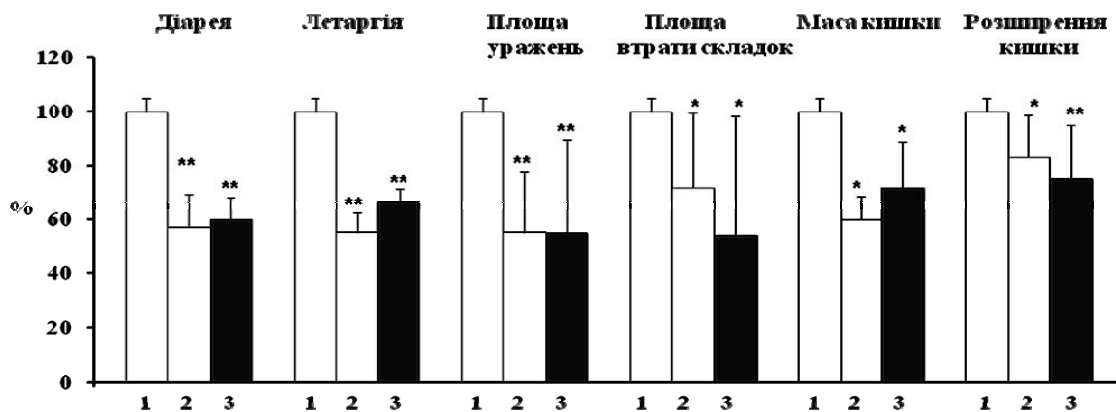


Рис. 2. Ефективність дії VEGF антитіла (3) з 5-АСА (2) на клінічні прояви та морфологічні показники йодоацетамід-зумовленого виразкового коліту у щурів.  $M \pm SD$ ,  $n=10$ . \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ , відносно показників у контрольній групі (1).

Відсутність різниці в ефективності між протизапальним препаратом 5-АСА, який є першою лінією призначення при ВК, та VEGF антитілом може свідчити про тісний взаємозв'язок між запаленням та ангіогенними факторами в патогенезі ВК. На користь цього твердження є данні, отримані на експериментальній моделі синовіта (запалення синовіальної оболонки суглоба). У тварин з синовітом блокатори ангіогенезу, такі як TNF470,  $\alpha\beta$  антагоністи, 2-метоксіестрадіол зменшували запалення [9]. Лікування пацієнтів з хворобою Крона потужним анти-ангіогенним препаратом талідамідом було асоційоване зі зниженням рівня про-запальних медіаторів: фактора некрозу пухлин (TNF- $\alpha$ ) та інтерлейкіну-12 [4]. Пацієнти з хворобою Крона, які отримували терапію з нейтралізуючим антитілом до TNF- $\alpha$  (Інфліксімаб), показали швидке та стійке зниження рівня VEGF [6].

## ВИСНОВКИ

1. Пригнічення активності про-ангіогенного фактора VEGF справляє позитивний вплив на клінічні та морфологічні ознаки експериментального ВК.

2. За силою ефекту VEGF антитіло не відрізняється від протизапального препарату 5-АСА, який є першою лінією призначення при ВК.

## Література

1. Белоусова Е.А. Язвенный колит и болезнь Крона. - М.:Триада, 2002 - 127с.
2. Толстонова Г.М., Берегова Т.В., Остапченко Л.І. Зміни експресії васкулярного ендотеліального фактору росту (VEGF) та VEGFR-2 рецептора при експериментальних запальних захворюваннях кишечника // Фізика живого. - 2009.- Т.17, №1. - С.150-154.
3. Халиф И.Г. Воспалительные заболевания кишечника (неспецифический язвенный колит и болезнь Крона): клиника, диагностика и лечение.- Миклош, 2004 - 88с.
4. Bauditz J., Wedel S., Lochs H. Thalidomide reduces TNF $\alpha$  and interleukin 12 productions in patients with chronic active Crohn's disease // Gut. - 2002. - Vol.2. - P.196-200.
5. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease // Nat Med. - 2003. - Vol. 9, N 6. - P. 653-660.
6. Di Sabatino A., Ciccocioppo R., Benazzato L., Sturmiolo G.C., Corazza G.R. Infliximab downregulates basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in Crohn's disease patients // Aliment Pharmacol Ther. -2004.- Vol.19.- P.1019-1024.
7. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors // Nat Med. - 2003. - Vol. 9. - P. 669-676.
8. Goebel S., Huang M., Davis W.C., Jennings M., Siahhan T.J., Alexander J.S., Kevil C.G. VEGF-Astimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications

- forinflammatory boweldisease // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2006. – Vol. 290. – P.648–654.
9. Peacock D.J., Banquerigo M.L., Brahn E. A novel angiogenesis inhibitor suppresses rat adjuvant arthritis // Cell Immunol.-1995.-Vol.160.-P.178-184.
  10. Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S., Dvorak H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid // Science.- 1983. - Vol.219, N4587. - P.983-985.
  11. Strober W., Fuss I., Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease // J Clin Invest. – 2007. –Vol. 117, N 3. – P. 514-521.
  12. Xavier R.J., Podolsky D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease // Nature. – 2007.- Vol. 448.- P. 427-34.
  13. Yamamoto-Furusho J.K. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease // World J Gastroenterol. – 2007. – Vol. 13, N 13. – P. 1893-1896.

---

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕЙТРАЛИЗИРУЮЩЕГО АНТИТЕЛА К ФАКТОРУ РОСТА КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ

Толстанова А.Н., Остапченко Л.И.

Фактор роста кровеносных сосудов (VEGF) – мощный стимулятор ангиогенеза, который кроме участия в пролиферации, миграции эндотелиальных сосудов, вызывает гиперпроницаемость кровеносных сосудов и увеличение адгезии лейкоцитов. Целью данной работы: изучить и сравнить эффективность нейтрализующего антитела к VEGF (VEGF антитело) с традиционным противовоспалительным препаратом 5-аминосалициловой кислотой (5-АСА) при экспериментальном язвенном колите у крыс, вызванном 6% йодоацетамидом. Введение VEGF антитела значительно улучшало клинические и морфологические характеристики колита. Эффективность VEGF антитела не отличалась от такой 5-АСА. Отсутствие разницы в эффективности противовоспалительного препарата 5-АСА, который является первой линией назначения при язвенном колите, и VEGF антителом указывает на тесную взаимосвязь между воспалением и ангиогенными факторами в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника.

**Ключові слова:** воспалительные заболевания кишечника, экспериментальный колит, нейтрализующее VEGF антитело, 5-аминосалициловая кислота.

## THE EFFICACY OF NEUTRALIZING ANTIBODY AGAINST VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR DURING EXPERIMENTAL ULCERATIVE COLITIS

Tolstanova G.M., Ostapchenko L.I.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent stimulator of angiogenesis. It stimulates proliferation and migration of endothelial cells as well as increases vascular permeability and leucocytes adhesion. The aim of the present study was to investigate and compare efficacy of neutralizing VEGF antibody with traditional anti-inflammatory drug 5-aminosalicylic acid (5-ASA) during 6% iodoacetamide-induced ulcerative colitis in rats. Treatment with VEGF antibody significantly improved clinical and morphologic signs of ulcerative colitis. The efficacy of VEGF antibody and anti-inflammatory 5-ASA was the same. Similar effectiveness of anti-inflammatory drug 5-ASA, which is the first line of therapy during ulcerative colitis, and VEGF antibody may indicate interaction between inflammation and angiogenic factors in the pathogenesis of inflammatory bowel disease.

**Key words:** inflammatory bowel disease, experimental colitis, neutralizing VEGF antibody, 5-aminosalicylic acid.

---