

# Интерлейкин-6 (IL-6)

Интерлейкин-6 (IL-6) - это белковый цитокин, который был открыт в 1980-х годах. Он также известен как В-клеточный стимулирующий фактор 2, гепатоцитстимулирующий фактор, фактор роста гибридомы или интерферон (IFN)- $\beta$ 2. IL-6 участвует в воспалении, иммунном ответе, а также в координации процессов развития, нейронной деятельности и метаболизме (1). IL-6 выступает в роли передатчика тревожных сигналов всему организму, указывая на возникновение чрезвычайной ситуации, такой как инфекция или повреждение тканей. Человеческий IL-6 состоит из 212 аминокислот, включая 28-аминокислотный сигнальный пептид, а его ген был картирован на хромосоме 7p21. Хотя основной белок составляет 20 кДа, гликозилирование обуславливает размер 21-26 кДа природного IL-6.

Интересно, что IL-6 может оказывать как про-, так и противовоспалительные сигналы в зависимости от рецепторного комплекса, с которым он взаимодействует. IL-6 взаимодействует с рецептором IL-6  $\alpha$ , и этот бинарный комплекс далее связывается с gp 130. Образовавшийся гексамерный комплекс способен передавать сигналы далее по цепочке. Рецептор IL-6  $\alpha$  может функционировать как мембраносвязанный белок, а также существовать в растворимой форме (2). В зависимости от формы рецептора IL-6, IL-6 может передавать противовоспалительные сообщения (путем связывания IL-6 с рецептором IL-6  $\alpha$  в клеточной мембране) или провоспалительные (путем связывания с растворимой формой рецептора IL-6  $\alpha$ ).

Gp130 - мембраносвязанный ко-рецептор, который экспрессируется в различных типах клеток, в то время как рецептор IL-6 существует в мембраносвязанной форме только на определенных типах клеток, таких как гепатоциты, нейтрофилы, Т-клетки или моноциты (2).

IL-6 действует в самом начале воспалительного процесса, стимулируя повышение уровня белков острой фазы, таких как С-реактивный белок (СРБ), сывороточный амилоид А, фибриноген и гаптоглобин в гепатоцитах. IL-6 также играет важную роль в приобретенном иммунном ответе, стимулируя выработку антител и развитие эффекторных Т-клеток. Баланс между взаимодействием IL-6 с растворимыми и мембраносвязанными формами рецептора IL-6 в значительной степени определяет провоспалительную и противовоспалительную активность этого цитокина (3).

## Клиническое применение IL-6

Установлено, что IL-6 участвует во многих физиологических процессах, иницировании и прогрессировании заболеваний, а плейотропная природа этого цитокина делает его ключевым игроком во многих физиологических процессах (4). IL-6 участвует в кроветворении и пролиферации клеток нейронов (5-6). Считается, что атеросклероз включает в себя процессы воспаления, поэтому IL-6 используется в качестве маркера сердечно-сосудистого риска (7). Повышенный уровень ИЛ-6 тесно коррелирует с гипертонией, дислипидемией и резистентностью к глюкозе (8).

Неудивительно, что во время недавней вспышки коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 уровень IL-6 в сыворотке крови также был повышен. По данным Gong et al., уровень IL-6 был значительно ниже в легких случаях по сравнению с тяжелыми случаями и группами тяжелобольных пациентов с SARS-CoV-2 (9). Уровень IL-6 связан с тяжестью инфекции COVID-19 (10-11). Более того, IL-6 может быть прогностическим маркером выживаемости у пациентов с COVID-19, превосходящим СРБ, Д-димер и ферритин, независимо от демографических и сопутствующих заболеваний (12). Определение уровня IL-6 в крови человека в основном осуществляется с помощью иммуноферментного анализа «сэндвич»-типа.

Известно, что исходный уровень IL-6 в крови человека составляет единицы пг/мл и может повышаться до тысяч пг/мл при тяжелом сепсисе (13). Поэтому для надежного определения IL-6 в крови необходимы анализы, характеризующиеся высокой чувствительностью и широким диагностическим окном.

## КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

- Системное воспаление
- Сепсис

## Реагенты для разработки иммуферментного анализа на ИЛ-6

Хайтест предлагает несколько моноклональных антител, способных определять как рекомбинантный человеческий ИЛ-6 (кат. № 8ИЛ6), так и нативный ИЛ-6 в сыворотке крови.

Моноклональные антитела были разработаны с использованием полноразмерного человеческого рекомбинантного ИЛ-6 в качестве иммуногена и мышей, крыс и кроликов в качестве источника иммунных клеток. Все разработанные МоАт способны работать в сэндвич-хемилюминесцентном анализе со стрептавидин-полиHRP. Рекомендуемые пары МоАт представлены в таблицах 1, 2 и 3.

Таблица 1.

**Рекомендуемые пары МоАт для использования в хемилюминесцентном сэндвич ИФА со стрептавидин-полихроматом (время анализа 15 минут).**

Покрывающее антитело	Детекторное антитело	LoD, пг/мл
L152	L137	0.7
L143	L395	0.4
L519	L395	0.7
L143	L106	0.4
L152	L395	0.5

Таблица 2.

**Рекомендуемые пары МоАт для использования в хемилюминесцентном сэндвич ИФА с акридиновым эфиром или щелочной фосфатазой.**

Покрывающее антитело	Детекторное антитело
L152	L137
L152	L106
L143	L106

Таблица 3.

**Рекомендуемые пары МоАт для использования в латеральном проточном анализе с флуоресцентной меткой.**

Покрывающее антитело	Детекторное антитело
L395	L152
L143	L395

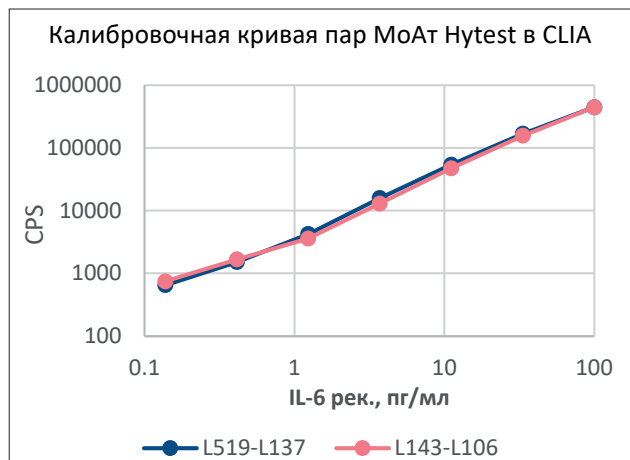


Рисунок 1.

**Калибровочная кривая пар МоАт L519-L137 и L143-L106 (захват-детекция) с рекомбинантным ИЛ-6.**

Использовался метод CLIA со стрептавидин-полихроматом. Покрывающие МоАт - 200 нг/лунокку, биотинилированные МоАт - 50 нг/лунокку для L137 и 100 нг/лунокку для L106. Время инкубации составляло 15 минут (буфер-разбавитель: PBS+7,5% BSA).

Пары МоАт производства Хайтест демонстрируют отличную чувствительность при использовании для определения концентрации рекомбинантного ИЛ-6 в диапазоне 1-100 пг/мл (см. Рисунок 1).

При тяжелых септических состояниях уровень ИЛ-6 может повышаться до 10 нг/мл (14). Поэтому для клинициста важно иметь возможность определять высокие концентрации ИЛ-6 в иммуноанализе без предварительного разведения. Пары МоАт, предлагаемые нашей компанией, обеспечивают широкий диапазон линейности и высокую чувствительность (см. Рисунок 2).

Когда рекомбинантный ИЛ-6 титруется в сэндвич ИФА вместе с нативным ИЛ-6, обе кривые титрования идут параллельно. Это указывает на то, что взаимодействие пар МоАт с рекомбинантным ИЛ-6 аналогично взаимодействию с нативным ИЛ-6 (см. Рисунок 3).

Для тестирования пар МоАт в клинических условиях мы использовали коллекцию образцов крови септических пациентов, как сыворотки, так и плазмы (N=40), и определили уровень ИЛ-6 с помощью нескольких пар МоАт (см. Рисунок 4).

Корреляционный анализ полученных данных с уровнем ИЛ-6 был проведен в том же наборе образцов с помощью анализатора Roche Cobas 6000 ИЛ-6 (коэффициент корреляции R2=0,9954). Пары МоАт производства Хайтест могут быть использованы для определения уровня ИЛ-6 как в сыворотке, так и в плазме крови человека, и демонстрируют количественные результаты, которые хорошо коррелируют с данными по ИЛ-6, полученными с помощью анализатора Roche Cobas 6000.

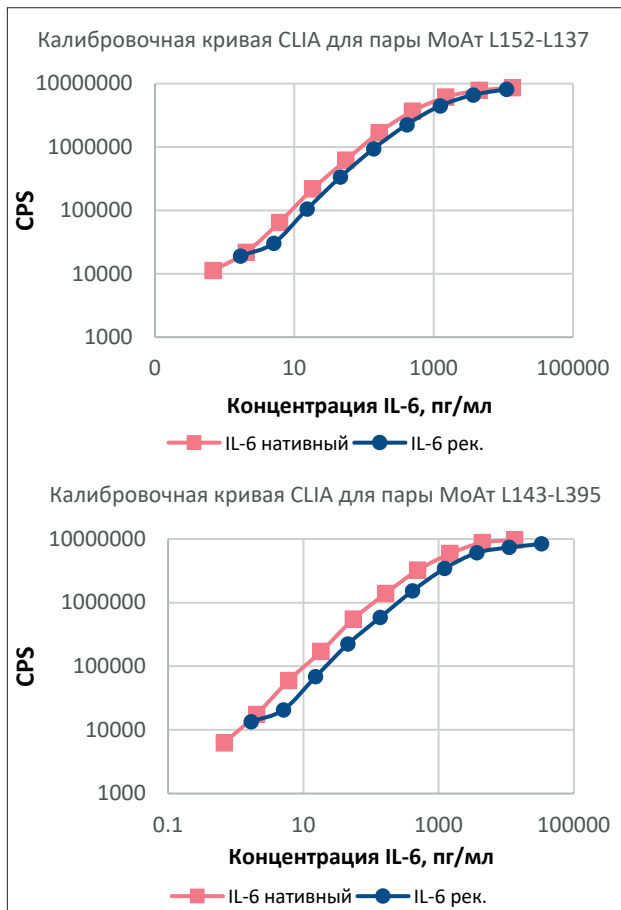


Рисунок 2.

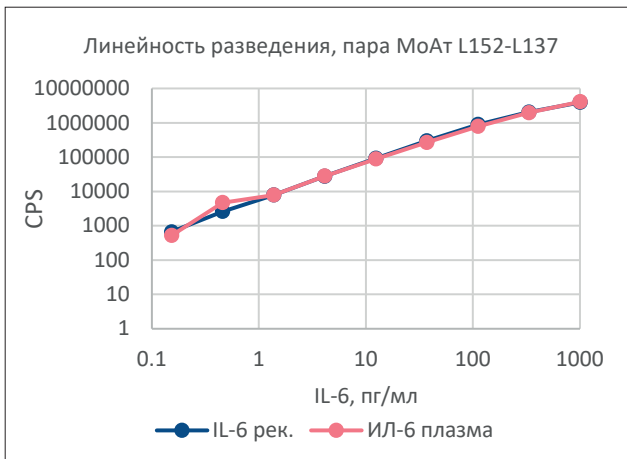
**Калибровочная кривая для пар МоАт L152-L137 и L143-L395.**

Использовался метод CLIA со стрептавидин-полихроматом. В качестве калибратора были взяты рекомбинантный и нативный ИЛ-6. Для получения нативного ИЛ-6 мононуклеарные клетки выделяли из крови здоровых доноров человека, культивировали в культуре и стимулировали бактериальным липополисахаридом. Концентрацию нативного ИЛ-6 в кондиционированной среде определяли на анализаторе Roche Cobas 6000. Покрывающие МоАт - 200 нг/лунокку, биотинилированные МоАт - 100 нг/лунокку. Время инкубации составляло 60 минут (буфер-разбавитель: PBS+7,5% BSA).

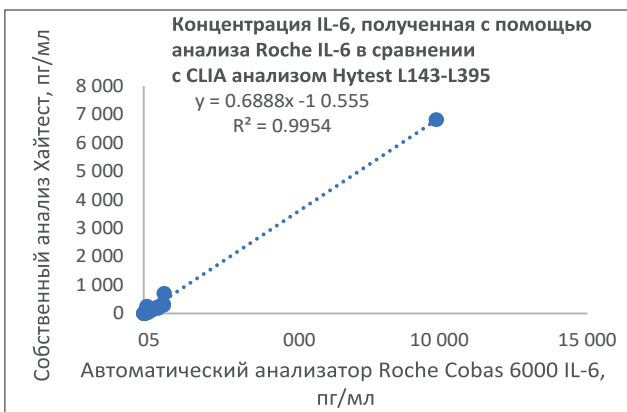
Тестирование другого набора клинических образцов (N=67) в CLIA с парами МоАт производства Hutech с использованием эфира акридиния в качестве метки показало еще более высокую корреляцию с анализом Roche IL-6 (см. Рисунок 5).

Более того, пара МоАт L152-L137 продемонстрировала хорошую корреляцию в CLIA с анализатором IL-6 Siemens IMMULITE 2000 при использовании для определения уровня IL-6 в группе пациентов (N=107) (см. Рисунок 6).

Для проверки перекрестной реактивности была использована панель когнитивных человеческих белков. IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2, IL3, IL4, IL8, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$  в концентрации 50 нг/мл были использованы для тестирования перекрестной реактивности в сэндвич-CLIA. Для всех протестированных пар МоАт уровень перекрестной реактивности не превышал 0,11%.

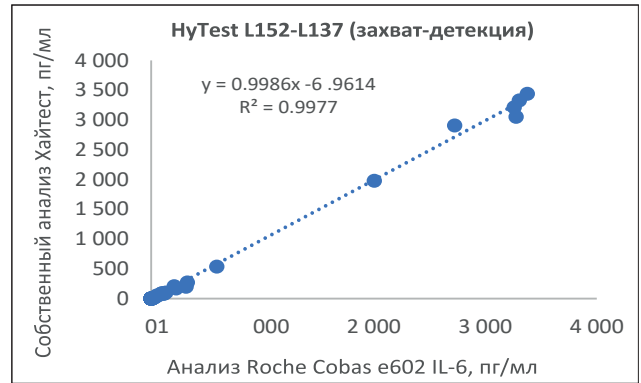


**Рисунок 3.** Линейность разведения рекомбинантного IL-6 и IL-6 из плазмы крови септических пациентов, измеренная в сэндвич-CLIA на базе пары L152-L137. Использовалась CLIA со стрептавидин-полихроматом. Разведение плазмы проводилось параллельно для реципиентного IL-6 и плазменного IL-6. Концентрацию IL-6 в плазме измеряли на анализаторе Roche Cobas 6000.

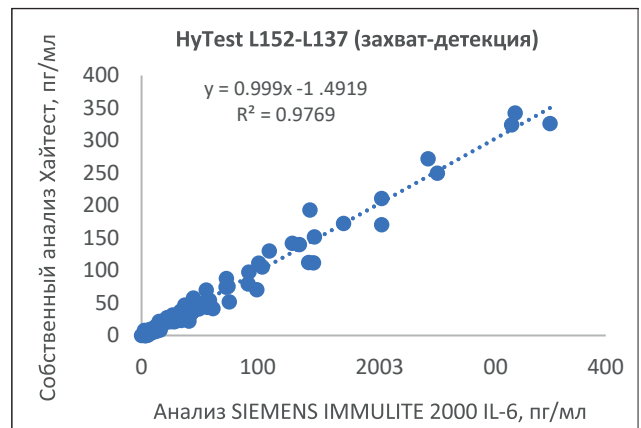


**Рисунок 4.** Тестирование образцов крови септических пациентов с парой МоАт L143-L395 и сравнение с массовой концентрацией IL-6, определенной в том же наборе образцов с помощью анализатора Roche Cobas 6000 IL-6. Использовалась CLIA со стрептавидин-полихроматом. Для анализа использовали неразбавленную (все образцы, кроме одного) сыворотку или плазму. Рекомбинантный IL-6 использовался в качестве калибратора в анализе на базе пар L143-L395. Покрывающие МоАт 200 нг/мл, биотинилированные МоАт нг/мл (буфер-разбавитель: PBS+7,5% BSA). Время инкубации составляло 1 час для пары Hutech MAb. Тест Roche Cobas 6000 IL-6 использовался в соответствии с инструкциями производителя.

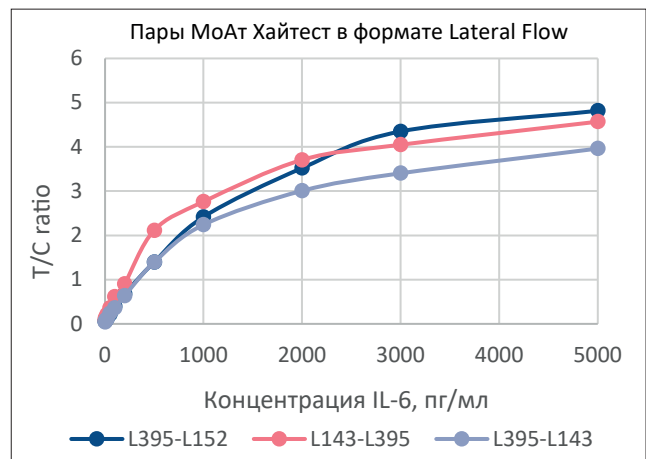
МоАт нашей компании могут быть использованы для создания анализов Lateral Flow для количественного определения IL-6 (см. Рисунок 7).



**Рисунок 5.** Определение IL-6 в клинических образцах пациентов с парой МоАт L152-L137 и корреляция с данными Roche IL-6. Для пары МоАт компании Хайтест использовалась CLIA с акридиновым эфиром в качестве метки.



**Рисунок 6.** Определение IL-6 в клинических образцах пациентов с помощью пары МоАт L152-L137 и корреляция с данными Siemens IMMULITE 2000 IL-6. Для пары МоАт компании Хайтест использовалась CLIA с акридиновым эфиром в качестве метки.

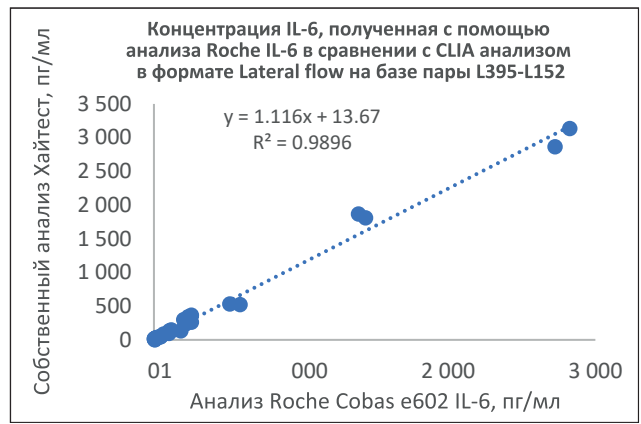


**Рисунок 7.** Калибровочная кривая для пар МоАт Хайтест в анализе Lateral Flow.

Концентрация IL-6 в сыворотке крови пациентов, определенная с помощью пар МоАт производства Хайтест, хорошо коррелирует с результатами анализа Roche, когда анализ проводится в формате Lateral Flow (см. Рисунок 8).

Рисунок 8.

**Определение IL-6 в клинических образцах пациентов с парой МоАт L395-L152 и корреляция с данными Roche IL-6. Для пары МоАт Хайтест использовался латеральный поток (LF).**



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Tanaka et al.** IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. Cold Spring Harb Perspect Biol 2014; 6: a016295.
- Reeh, H., Rudolph, N., Billing, U. et al.** Response to IL-6 trans- and IL-6 classic signaling is determined by the ratio of the IL-6 receptor  $\alpha$  to gp130 expression: fusing experimental insights and dynamic modelling. 2019, Cell Commun Signal 17, 46.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK.** Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. 2006, Nature 441: 235–238.
- Del Giudice M and Gangestad SW.** Rethinking IL 6 and CRP: Why they are more than inflammatory biomarkers, and why it matters. 2018, Brain Behav Immun 70: 61–75.
- Audet J, Miller CL, Rose-John S, et al.** Distinct role of gp130 activation in promoting self-renewal divisions by mitogenically stimulated murine hematopoietic stem cells. 2001, Proc Natl Acad Sci U S A. 98(4): 1757–62.
- März P, Otten U, Rose-John S.** Neural activities of IL-6-type cytokines often depend on soluble cytokine receptors. 1999, Eur J Neurosci. 11(9): 2995–3004.
- Swerdlow DI, Holmes MV, Kuchenbaecker KB, Engmann JE, Shah T, Sofat R, Guo Y, Chung C, Peasey A, et al.** The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: A mendelian randomisation analysis. 2012, Lancet 379: 1214–1224,
- Eder K, Baffy N, Falus A and Fulop AK.** The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. 2009, Inflamm Res 58: 727–736,
- Gong J, Dong H, Xia SQ, et al.** Correlation analysis between disease severity and inflammation-related parameters in patients with COVID-19 pneumonia [published online February 27, 2020]. medRxiv. doi:10.1101/2020.02.25.20025643.
- Ulhaq, Z.S., Soraya, G.V.** Interleukin-6 as a potential biomarker of COVID-19 progression. 2020, Med. Mal. Infect. 50, 382–383.
- Mojtabavi H, Saghazadeh A, Rezaei N.** Interleukin-6 and severe COVID-19: a systematic review and meta-analysis. 2020, Eur.Cytokine Netw. 31(2): 44–49.
- Diane Marie Del Valle et al.** An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. 2020, Nature Medicine 26, 1636–1643.
- Song, M., and Kellum, J.A.** Interleukin-6. 2005, Crit Care Med 33, 12, S463–S465.
- Huang, L., Zhao, X., Qi, Y. et al.** Sepsis-associated severe interleukin-6 storm in critical coronavirus disease 2019. 2020. Cell Mol Immunol 17, 1092–1094.

## ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

### МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Подкласс	Примечания
Интерлейкин 6 (IL-6)	4IL6	L106	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, LF
		L137	IgG2a	<i>In vitro</i> , ИФА, LF
		L143	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, LF
		L152	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, LF
		L395	IgG	ИФА, LF, рекомбинантное кроличье антитело
		L519	IgG1	ИФА, рекомбинантное химерное антитело

### АНТИГЕНЫ

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
Интерлейкин 6 (IL-6), рекомбинантный	8IL6	>90%	Рекомбинантный