

На правах рукописи

ШИТИКОВА ОЛЬГА ГЕННАДЬЕВНА

**ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ИММОБИЛИЗИРОВАННОГО
ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА-2В И МЕХАНИЗМ ЕГО ДЕЙСТВИЯ**

(экспериментальное исследование)

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга»

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Шерстобоев Евгений Юрьевич

доктор медицинских наук

Мадонов Павел Геннадьевич

Официальные оппоненты:

Смирнов Иван Владимирович, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный университет», Научно-исследовательский институт биологической медицины, директор

Лобачева Ольга Анатольевна, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт психического здоровья», лаборатория клинической психонейроиммунологии и нейробиологии, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2016 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д.001.031.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (634028, г. Томск, пр. Ленина, 3)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (www.pharmso.ru)

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Амосова Евдокия Наумовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В современном мире влияние неблагоприятных факторов внешней среды, неправильное питание, стрессы, умственное и физическое перенапряжение приводят к истощению адаптационных резервов иммунной системы человека [Лусс Л.В. и др., 2014; Herzyk D.J., 2008]. По этой причине, наблюдается неуклонный рост вирусных и инфекционных заболеваний, а широкое применение антибиотиков и химиотерапевтических препаратов в лечении инфекционно-воспалительных процессов способствует появлению новых устойчивых штаммов микроорганизмов, увеличению риска развития дисбактериоза, аллергических реакций и иммунодепрессивных состояний у пациентов [Малиновская В.В., 2000; Борзанова М.В. и др., 2012; Лусс Л.В. и др., 2014]. В связи с этим перед медицинской наукой стоит задача, заключающаяся в одновременном повышении эффективности этиотропной терапии и снижении побочных эффектов, появляющихся в ходе ее применения, увеличения функциональной активности собственной иммунной системы и ускорения восстановления ее нарушенных звеньев, предотвращения алергизации организма и развития иммунодефицита [Малиновская В.В., 2000].

В настоящее время в терапии многих инфекционных заболеваний все шире и чаще применяются препараты интерферонов (ИФН), благодаря их уникальному свойству - сочетание противовирусной, антибактериальной, противоопухолевой и иммуномодулирующей активности [Попов Ф.В., 2002; Малиновская В.В., 2002; Лусс Л.В. и др., 2014; Sen G.C. et al., 2007]. Преимущество препаратов ИФН заключается в широком спектре противовирусной и антибактериальной активности, при которой не формируются резистентные формы чужеродных агентов, минимальной токсичности и высокой безопасности [Борзанова М.В. и др., 2012; Соссо Е., 2015]. Сегодня десятки фармацевтических фирм различных стран производят около сотни препаратов ИФН основных типов: альфа, бета и гамма [Волкова Л.В., 2004; Ершов Ф.И., 2012]. Тем не менее, интерфероны альфа (ИФН- α) по степени изученности и масштабам применения занимают лидирующее положение среди используемых в клинической практике цитокинов [Борзанова М.В. и др., 2012; Лусс Л.В. и др., 2014]. Благодаря выраженным антивирусным и иммуномодулирующим эффектам ИФН- α наиболее широко используются при вирусных инфекциях, в первую очередь при различных герпетических поражениях, острых и хронических вирусных гепатитах В и С, многочисленных острых респираторных вирусных инфекциях (ОРВИ) [Попов Ф.В., 2002; Серебряная Н.Б., 2002; Ершов Ф.И. и др., 2005; Wiegand J. et al., 2008]. Установлена эффективность ИФН в лечении ВИЧ-инфекции, папилломавирусных инфекциях, а также при терапии различных бактериальных заболеваний (хламидиозы, легионеллезы, риккетсиозы) [Малиновская В.В., 2000; Наровлянский А.Н. и др., 2013; Лусс Л.В. и др., 2014; Stark G.R. et al., 1998; Goodbourn S. et al., 2000; Parker D. et al., 2011]. К настоящему времени накоплена важная информация о применении ИФН- α в онкологической практике [Воронцова А.Л. и др., 2009; Кособокова Е. и др., 2010; Брюзгин В.В. и др., 2014; Lamm D. et al., 2014]. Кроме того, ИФН- α является медиатором иммуни-

тета и способен повышать эффективность неспецифических защитных реакций, усиливать цитотоксичность Т-лимфоцитов и НК-клеток, активировать моноциты и макрофаги, а также способствовать запуску адаптивного иммунитета [Наровлянский А.Н., 2013; Brassard D.L. et al., 2002; Randall R.E. et al. 2008; Voasso A., 2013].

Тем не менее, наряду с высокой клинической эффективностью лекарственных средств на основе ИФН, при их применении возникает ряд нежелательных эффектов. Являясь белками, ИФН легко разрушаются ферментами в желудочно-кишечном тракте и протеазами крови, что снижает их биодоступность и вынуждает клиницистов увеличивать дозу и частоту введения препарата [Ahad M.A. et al., 2004; Lai L. et al., 2006; Thomas T. et al., 2007]. Парентеральное назначение высоких доз ИФН (например, при вирусных гепатитах) влечет за собой различные побочные действия [Борзанова М.В. и др., 2012; Лусс Л.В. и др., 2014; Patten S.V., 2001; Papafragkakis H. et al., 2012]. Данные обстоятельства ограничивают применение препаратов ИФН и являются стимулом к разработке новых лекарственных средств. Основная цель при создании препаратов на основе ИФН состоит в получении более безопасного и эффективно-го лекарственного средства с улучшенными физико-химическими и биологическими свойствами.

Для улучшения фармакокинетических характеристик и снижения побочных эффектов была предложена технология химической пегилизации, т.е. присоединение молекул ИФН к молекулам полиэтиленгликоля (ПЭГ) [Карабельский А.В. и др., 2007; Ahad M.A. et al., 2004]. В настоящее время зарегистрированы и применяются в клинической практике два препарата ИФН, полученные путем химического пегилирования, - это пегинтерферон альфа-2b (ПегИнtron[®], «Шеринг-Плау», США) и пегинтерферон альфа-2a (Пегасис[®], «Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд», Швейцария) [Карабельский А.В. и др., 2007; Foster G.R., 2004, 2010]. Однако химическое присоединение ИФН к ПЭГ не отменяет парентерального применения препарата и проявления побочных эффектов [Карабельский А.В. и др., 2007; Fried M.W., 2002; Slavenburg S. et al., 2010; Papafragkakis H. et al., 2012]. Кроме того, процесс химической пегилизации препаратов характеризуется многостадийностью с использованием высокотоксичных соединений, что требует многократной очистки и инактивации промежуточных соединений на каждой стадии, что в конечном итоге сильно увеличивает стоимость лекарственного средства [Дыгай А.М. и др., 2011; Мадонов П.Г., 2012; Thomas T. et al., 2007]. Вместе с тем известна технология иммобилизации белков с ПЭГ с помощью ионизирующего излучения. Физический способ связывания рекомбинантного интерферона с веществом-матрицей позволит защитить белковую молекулу интерферона от действия протеолитических ферментов и тем самым обеспечит возможность его перорального применения. Изучение механизмов влияния иммобилизованного на ПЭГ интерферона альфа-2b (имИФН- α 2b) с помощью физического способа связывания на реакции иммунной системы является важным моментом для совершенствования терапевтических подходов при интерферонотерапии.

Степень разработанности. Для клинической практики представляет интерес исследование возможности перорального применения ИФН с высокой эффективностью и низкой токсичностью. С этой целью была предложена новая технология физической иммобилизации биологически активных веществ на низкомолекулярном носителе ПЭГ с помощью электронно-лучевого синтеза. Полученные результаты уже проведенных исследований иммобилизованных белковых препаратов свидетельствуют о явном преимуществе конъюгированных аналогов по сравнению с нативными пептидами [Вышлов Е.В. и др., 2007; Вышлов Е.В., 2011; Дыгай А.М. и др., 2011; Попонина А.М., 2012; Чайковский А.В., 2012]. Применение уникальной технологии наделяет белковые соединения улучшенными фармакотерапевтическими характеристиками, которые ранее были просто невозможны. У созданного с помощью данной технологии иммобилизованного интерферона альфа-2b появилась устойчивость к факторам деградации и отсутствие иммуногенности из-за перекрытия полимером антигенных детерминант молекулы интерферона. Однако совершенно не изучено влияние иммобилизованного на ПЭГ интерферона альфа-2b на различные типы иммунного ответа и на взаимодействие иммунокомпетентных клеток в процессе иммунного реагирования. Поэтому актуальным является изучение иммуностропных свойств и механизмов действия иммобилизованного интерферона альфа-2b, созданного по новой технологии.

Цель исследования - изучить специфическую иммуностропную активность и механизм действия иммобилизованного интерферона альфа-2b.

Задачи исследования:

1. Определить оптимальные экспериментальные терапевтические схемы введения и дозы иммобилизованного интерферона альфа-2b.
2. Исследовать влияние иммобилизованного интерферона альфа-2b на неспецифическую резистентность организма (фагоцитоз нейтрофилов и макрофагов, активность естественных киллерных клеток).
3. Изучить влияние иммобилизованного интерферона альфа-2b на гуморальный и клеточный иммунный ответ.
4. Оценить участие цитокинов в механизмах иммуностропного действия иммобилизованного интерферона альфа-2b *in vivo* и *in vitro*.
5. Исследовать влияние иммобилизованного интерферона альфа-2b на пролиферативную активность лимфоидных клеток.
6. Изучить роль сигнальных молекул в механизмах иммуностропного действия иммобилизованного интерферона альфа-2b.

Научная новизна. В ходе исследований впервые были изучены иммуностропные эффекты иммобилизованного интерферона альфа-2b (имИФН- α 2b) на различных экспериментальных моделях *in vivo*, *in vitro* и вскрыты некоторые механизмы их реализации. Впервые было изучено влияние имИФН- α 2b на гуморальное и клеточное звено иммунного ответа и неспецифическую резистентность организма. Определено влияние препарата на поляризацию макрофагов, пролиферативную активность лимфоидных клеток и продукцию ключевых цитокинов Th1- и Th2-лимфоцитов. Впервые была изучена роль некоторых сиг-

нальных молекул в механизмах реализации иммуотропного действия имИФН- α 2b.

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены данные фундаментального характера о сохранении специфической иммуотропной активности имИФН- α 2b при пероральном применении. Результаты исследования имИФН- α 2b позволяют рекомендовать его в качестве основы для разработки средства в терапии вирусных, и, в частности, энтеровирусных инфекций. Прием имИФН- α 2b внутрь позволит адресно доставлять препарат непосредственно к вирусинфицированным клеткам слизистой оболочки кишечника и влиять на клетки лимфоидной ткани (макрофаги, нейтрофилы). Усовершенствование лекарственной формы ИФН- α 2b с использованием современной технологии электронно-лучевого синтеза позволит снизить побочные эффекты, характерные для парентерального введения препаратов интерферонов, что обеспечит возможность применения исследуемого средства не только для лечения взрослых, но и в педиатрической и акушерской практике.

По итогам изучения иммуотропной активности иммобилизованного интерферона альфа-2b был получен патент РФ № 2554761 «Противоэнтеровирусное и иммуностимулирующее средство».

Методология и методы исследования. Согласно поставленным задачам были выбраны современные высокоинформативные методические подходы, имеющиеся в научно-исследовательских лабораториях НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга. В качестве объектов исследования были использованы мышисамцы линии СВА и мышисамцы сток CD1. Основные методы исследования: иммунологические (определение фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов, количества антителообразующих клеток (АОК) и титра специфических гемагглютининов, пролиферативной активности лимфоидных клеток, функциональной активности естественных киллеров, интенсивности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)), биохимические (изучение продукции оксида азота, определение активности аргиназы), культуральные (культивирование перитонеальных макрофагов, спленоцитов экспериментальных животных, мононуклеаров периферической крови здоровых доноров) и иммуоферментные (оценка содержания цитокинов, иммуноглобулинов в кондционных средах мононуклеаров периферической крови здоровых доноров).

Положения, выносимые на защиту.

1. Интерферон альфа-2b иммобилизованный на ПЭГ с помощью электронно-лучевого синтеза при пероральном применении сохраняет иммуотропные свойства и комплексно влияет на клетки иммунной системы. Курсовое применение иммобилизованного интерферона альфа-2b стимулирует фагоцитоз перитонеальных макрофагов и нейтрофилов экспериментальных животных, однако, добавление исследуемого препарата *in vitro* в культуру мононуклеаров периферической крови здоровых доноров не оказывает существенного влияния на фагоцитоз нейтрофилов и подавляет функциональную активность естественных киллеров.

2. Использование иммобилизованного интерферона альфа-2b курсом повышает гуморальный иммунный ответ лабораторных мышей на фоне усиления стимулированной продукции цитокина Т-хелпер 2 типа (ИЛ-4), подавления выработки цитокина Т-хелпер 1 типа (ИФН- γ) и снижения спонтанной пролиферации спленоцитов.

3. При добавлении *in vitro* в культуру мононуклеаров периферической крови здоровых доноров иммобилизованный интерферон альфа-2b оказывает противоположный эффект на баланс цитокинов по сравнению с применением *in vivo* - не влияет на продукцию ИЛ-4, но повышает спонтанную и стимулированную выработку ИЛ-2, а также и ИФН- γ без дополнительной стимуляции митогеном.

4. Активирующее влияние на макрофаги иммобилизованный интерферон альфа-2b осуществляет совместно с ЛПС через сигнальные молекулы MAP-киназы p38 и NF- κ B.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности результатов, полученных в ходе исследования, обусловливается большим объемом экспериментального материала, применением современных методов и адекватной статистической обработкой полученных данных.

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на XVII Всероссийской конференции «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2014), VII-ой Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в XXI веке» (Казань, 2015).

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, из них 3 - в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, получен 1 патент РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста. Состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы. Библиографический указатель включает 150 источников, из них 78 отечественных и 72 зарубежных. Иллюстративный материал представлен 3 рисунками и 22 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В первой главе проведен анализ отечественной и зарубежной научной литературы по теме исследования. В первом разделе представлены сведения о роли системы интерферона для предупреждения внедрения в организм чужеродной генетической информации и сохранения иммунного гомеостаза. Далее изложены данные о биологических эффектах интерферона альфа и возможности его использования при самых различных вирусных инфекциях. Последний раздел главы «Обзор литературы» посвящен лекарственным формам интерферона альфа и способам повышения эффективности интерферонотерапии.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материала и методов исследования. В исследовании были использованы 660 мышей-самцов линии СВА и 180 аутбредных мышей-самцов CD1 6-8-недельного возраста с массой тела 18-24 г, полученные из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга. Мыши конвенциональные 1-й категории (сертификат имеется). Содержание животных и экспериментальный дизайн были одобрены Этическим комитетом НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга и соответствовали международным правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Мыши имели постоянный доступ к воде и пище. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и Приказу МЗ РФ № 708 от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

В качестве источника мононуклеаров использовалась периферическая кровь 20 здоровых доноров мужского пола в возрасте 19-36 лет.

В работе использовали иммобилизованный интерферон альфа-2b (имИФН- α 2b), полученный из ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии» (г. Новосибирск, Россия). Иммобилизация рекомбинантного интерферона альфа-2b осуществлялась на активированном с помощью пучка свободных электронов полиэтиленгликоле с молекулярной массой 1,5 кДа. Конечный иммобилизованный препарат был в виде бесцветной прозрачной жидкости. Выход готового продукта составлял 98%, активность препарата была не менее 1×10^6 МЕ/мл, молекулярная масса не менее $19,5 \pm 0,5$ кДа.

В качестве препарата сравнения использовали «Реаферон-ЕС-липидт», содержащий липосомы с интерфероном- α 2b (ЛИФН- α 2b), - для перорального введения животным и его аналог для парентерального введения – рекомбинантный интерферон- α 2b «Реаферон-ЕС» (рИФН- α 2b) (ЗАО «Вектор-Медика», г. Новосибирск, Россия).

Изучение иммуностропной активности имИФН- α 2b в сравнении с ЛИФН- α 2b проводилось согласно «Методическим рекомендациям по доклиническому изучению иммуностропной активности лекарственных средств» [Миронов А.Н. и др., 2013]. Мышам вводили имИФН- α 2b или ЛИФН- α 2b внутривентрикулярно зондом курсом в течение 5-ти суток раз в день в различных дозах, растворенных в 0,2 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ, «MP Biomedicals», США). Терапевтическую дозу (ТД) имИФН- α 2b и ЛИФН- α 2b для мышей рассчитывали, исходя из средней терапевтической дозы ИФН- α 2b для человека (1000000 МЕ). Соответственно для мышей 1 ТД составила $1,8 \times 10^5$ МЕ/кг, 5 ТД – 9×10^5 МЕ/кг, 10 ТД - $1,8 \times 10^6$ МЕ/кг, 20 ТД - $3,6 \times 10^6$ МЕ/кг и 40 ТД - $7,2 \times 10^6$ МЕ/кг. Контрольные животные получали в эквивалентном объеме растворитель.

Влияние имИФН- α 2b и ЛИФН- α 2b на неспецифическую резистентность организма мышей линии СВА оценивали через 48 часов после заражения их *Staph. aureus*, штамм АТСС 95923 по показателям выживаемости/смертности.

Фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов и нейтрофилов мышей после курсового введения имИФН- α 2b и ЛИФН- α 2b оценивали по спо-

способности этих клеток поглощать суточную культуру *Staph. aureus*, штамм 209 с определением процента фагоцитов, поглотивших микробы (фагоцитарный индекс – ФИ) и среднего числа стафилококков, поглощенное одной клеткой (фагоцитарное число – ФЧ) [Миронов А.Н. и др., 2013].

Влияние имИФН- α 2b, либо лИФН- α 2b на гуморальный иммунный ответ оценивали путем определения общего количества спленоцитов (ОКС), числа антителообразующих клеток (АОК) в селезенке и титров антител в сыворотке крови (IgM и IgG) после иммунизации мышей эритроцитами барана (ЭБ) (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). Определение АОК осуществляли методом локального гемолиза, основанным на способности антиэритроцитарных антител, секретируемых антителообразующими клетками иммунизированных животных, лизировать в присутствии комплемента эритроциты барана (антиген) [Cunningham A.I., 1965]. Уровень специфических антител, содержащихся в сыворотке крови иммунизированных животных, определяли с помощью реакции гемагглютинации (РГА) [Линг Н.Р., Кэтти Д., 1991].

Для оценки влияния имИФН- α 2b, либо лИФН- α 2b на клеточный иммунный ответ использовали реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) с введением в качестве антигена ЭБ [Миронов А.Н. и др., 2013].

Оценку пролиферативной активности лимфоцитов и перитонеальных макрофагов определяли у мышей колориметрически [Mosmann T.R., 1983].

Спонтанную и стимулированную (Кон А, 4 мкг/мл) продукцию цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 и ИФН- γ) определяли после курсового введения изучаемых препаратов в супернатантах спленоцитов экспериментальных животных, полученных через 24 часа их культивирования *in vitro* при температуре 37⁰С в СО₂-инкубаторе с помощью иммуноферментного метода, используя соответствующие наборы («eBioscience», Австрия).

Продукция NO оценивалась по содержанию нитритов в супернатантах перитонеальных макрофагов мышей при помощи реактива Грейса [Green L.C. et al., 1982].

Активность аргиназы перитонеальных макрофагов экспериментальных животных определяли по методике [Munder M. et al., 1998] в модификации.

Для изучения роли сигнальных молекул в активации перитонеальных макрофагов были использованы ингибиторы p38 MAP киназы – SB203580, PI3 киназы – LY294002 (оба производства «InvivoGen», США), а также ингибиторы цАМФ – 2',5'-дидеоксиаденозин и NF- κ B – оридонин (оба производства «Calbiochem», США).

В опытах *in vitro* имИФН- α 2b и рИФН- α 2b добавляли в культуру клеток в дозах 15 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 1500 МЕ/мл и 5000 МЕ/мл непосредственно перед культивированием.

Пролиферативную активность мононуклеаров (МНК) периферической крови здоровых доноров оценивали в реакции бласттрансформации, которая оценивалась колориметрически [Scudiero P.A. et al., 1988]. Выделение МНК проводили центрифугированием на градиенте плотности фиколл-пака («Pharmacia», Швеция) с плотностью 1,077 [Boyum A., 1968].

Цитокины (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4 и ИФН- γ) в супернатантах культур МНК определяли с помощью иммуноферментного метода, используя соответствующие наборы (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Оценивали способность исследуемых препаратов усиливать (МНК, стимулированные ЛПС или ФГА + препарат) и индуцировать (МНК, стимулированные только препаратом) выработку цитокинов.

Количество иммуноглобулинов различных классов (IgG, IgM, IgA) в культуральной среде МНК определяли иммуноферментным методом, используя соответствующие наборы производства ЗАО «Вектор-Бест», Россия.

Для оценки влияния имИФН- α 2b или рИФН- α 2b на фагоцитоз *in vitro* выделяли нейтрофилы из цельной крови здоровых доноров, к смеси добавляли имИФН- α 2b или рИФН- α 2b в концентрациях 15 ЕД/мл, 150 ЕД/мл, 1500 ЕД/мл и взвесь стафилококка. После инкубации готовили мазки, на которых учитывали процент нейтрофилов, поглотивших микробы (фагоцитарный индекс – ФИ) и среднее число стафилококков, поглощенное одной клеткой (фагоцитарное число – ФЧ) [Миронов А.Н. и др., 2013].

Изучение влияния имИФН- α 2b или рИФН- α 2b на функциональную активность естественных киллеров (ЕК) определяли в цитотоксической реакции по их способности лизировать клетки миелобластоидной линии К-562, используя колориметрический метод [Кузовкова Н.А., 1991].

Полученные результаты обрабатывали при помощи программы «Statistica 6.0» Перед использованием методов описательной статистики определяли тип распределения количественных признаков с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для признаков с нормальным распределением рассчитывали среднее значение выборки \bar{X} и стандартную ошибку средней m . Оценку статистической значимости различий проводили при помощи критерия Стьюдента для независимых наблюдений и парного критерия Стьюдента для зависимых данных. Допустимым уровнем значимости принималось $p < 0,05$ [Боровиков В.П., 1997; Ланг Т.А., 2010].

Третья глава диссертации посвящена описанию результатов исследования иммуотропных эффектов иммобилизованного интерферона альфа-2b на различных экспериментальных моделях *in vivo*, *in vitro* и вскрыты некоторые механизмы их реализации. Полученные данные представлены в виде таблиц и рисунков.

Четвертая глава диссертационной работы посвящена обсуждению полученных результатов исследования с привлечением данных литературы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Широкое применение в медицине ИФН- α 2b нашли в лечении вирусных заболеваний, большого круга онкологических болезней, а также для профилактики гриппа и ОРЗ [Ершов Ф.И., Киселев О.И., 2005; Goodbourn S., 2000; Caraglia M., 2005]. Но, к сожалению, белковая природа ИФН- α 2b накладывает ряд существенных ограничений в клиническом применении. ИФН легко разрушаются ферментами ЖКТ и протеазами крови, это снижает их биодоступность

и вынуждает клиницистов увеличивать дозу и частоту введения препарата [Ahad M.A. et al., 2004; Lai L. et al., 2006; Thomas T. et al., 2007]. Парентеральное назначение высоких доз ИФН влечет за собой развитие побочных реакций [Борзанова М.В. и др., 2012; Лусс Л.В. и др., 2014; Patten S.B., 2001; Papafragkakis N. et al. 2012]. У больных, принимающих большие дозы рекомбинантных ИФН, также наблюдается образования антител, нейтрализующих препарат, что сопровождается развитием резистентности к интерферонотерапии [Симбирцев А.С., 2013; Thomas T. et al., 2007]. Совершенствование препаратов на основе ИФН предполагает получение более безопасного и эффективного лекарственного средства с улучшенными физико-химическими и биологическими свойствами. Современная технология иммобилизации активного белка с полиэтиленгликолем с помощью электронно-лучевого синтеза модифицирует фармакокинетические характеристики соединения, позволяя создавать лекарственные препараты с высокой терапевтической активностью и низкой токсичностью [Дыгай А.М. и др., 2011; Ершов К.И. и др., 2013; Мадонов П.Г. и др., 2013]. Результатом такой модификации является возрастание биодоступности ИФН, снижение колебаний уровня активного вещества в крови, более длительное сохранение эффективной концентрации в органах-мишенях, что и увеличивает эффективность интерферонотерапии [Никитин И.Г. и др., 2005; Карабельский А.В. и др., 2007; Ahad M.A. et al., 2004; Grace M.J. et al., 2004; Thomas T. et al., 2007; Ferreira P.R.A. et al., 2010]. Уникальность препарата ИФН- $\alpha 2b$, иммобилизованного на полиэтиленгликоле с помощью электронно-лучевого синтеза, заключается в защите белковой молекулы от действия протеолитических ферментов ЖКТ, благодаря чему появляется возможность перорального применения имИФН- $\alpha 2b$.

Исследования последних лет открывают все новые свойства ИФН, напрямую или косвенно связанные с функционированием иммунной системы [Лусс Л.В. и др., 2014; González-Navajas J.M. et al., 2012; Voasso A., 2013]. Поэтому целью диссертационной работы явилось изучение специфической иммунотропной активности и механизма действия иммобилизованного на ПЭГ интерферона- $\alpha 2b$. Однако проявление того или иного иммуномодулирующего эффекта, с одной стороны, в существенной мере зависит от дозы и времени применения препарата относительно фазы иммунного ответа [Voasso A., 2013]. С другой стороны, процесс пегилирования может нивелировать, а в некоторых случаях снижать биологическую активность цитокина [Grace M.J. et al., 2004]. Также до конца не ясны механизмы всасывания имИФН- $\alpha 2b$ в ЖКТ и распределения активного вещества по организму. Поэтому первоначально были проведены предварительные исследования по определению оптимальных терапевтических доз и схем введения имИФН- $\alpha 2b$.

Проведенные эксперименты показали, что курсовое введение имИФН- $\alpha 2b$ в дозах 1 ТД, 5 ТД, 10 ТД, 20 ТД и 40 ТД мышам линии СВА стимулирует развитие гуморального иммунитета в ответ на тимусзависимый антиген – ЭБ. Введение имИФН- $\alpha 2b$ в течение 5-ти суток в выбранных концентрациях повышало ОКС, относительное и абсолютное число АОК в селезенке и титр специфиче-

ских иммуноглобулинов в сыворотке крови относительно интактной группы. Тем не менее, дозы 1 ТД и 10 ТД были выбраны как оптимальные для дальнейшего изучения иммуотропных свойств пегилированного цитокина, потому что 1 ТД является минимальной дозой препарата из использованных, при которой наблюдается стимуляция гуморального иммунного ответа мышей относительно интактных животных, а при введении 10 ТД действие на гуморальный иммунитет мышей СВА максимально выражено.

Пегилированная молекула ИФН, вводимая перорально курсом в течение 3-х, 5-ти и 7-ми суток в 1 ТД комплексно влияла на клетки иммунной системы, затрагивая все звенья иммунитета. Тем не менее, наиболее эффективно фагоцитоз нейтрофилов (относительное число фагоцитов и количество поглощенных бактерий одним фагоцитом) и гуморальный иммунный ответ (количество антителопродуцентов и их функциональная активность) усиливало курсовое введение терапевтической дозы имИФН- $\alpha 2b$ в течение 5-ти суток. Клеточный иммунный ответ (влияние на Т-эффекторы) значимо повышался после 7-ми кратного применения исследуемого препарата. Для более детального изучения влияния модифицированной формы ИФН- $\alpha 2b$ с ПЭГ на клетки иммунной системы был выбран курс в течение 5 дней.

Полученные на данном этапе результаты свидетельствовали о сохраненной иммуотропной активности модифицированной формы ИФН- $\alpha 2b$ с ПЭГ при пероральном приеме. Возможность применения иммобилизованного интерферона внутрь будет иметь принципиальное значение в клинической медицине в качестве альтернативы парентеральному введению. Немаловажен и тот факт, что около 60-70 % клеток иммунной системы находится именно в желудочно-кишечном тракте, а учитывая склонность иммуноцитов к рециркуляции эта цифра существенно возрастает, поэтому пероральный приём препарата будет оказывать более выраженный иммуномодулирующий эффект и почти не сопровождаться системными побочными эффектами [Хаитов Р.М. и др., 1998; Eberl G., 2005; Dzialo J. et al., 2010].

Проведенное нами исследование показало, что имИФН- $\alpha 2b$ оказывает стимулирующее влияние на функциональную активность перитонеальных макрофагов и нейтрофилов в большей степени, чем препарат сравнения лИФН- $\alpha 2b$. Несмотря на то, что курсовое введение имИФН- $\alpha 2b$ также как и лИФН- $\alpha 2b$ в терапевтической дозе не приводило к достоверным изменениям фагоцитарного индекса (ФИ) перитонеальных макрофагов экспериментальных животных, имИФН- $\alpha 2b$, в отличие от препарата сравнения, способствовал увеличению среднего количества поглощенных одной клеткой бактерий (ФЧ). Использование изучаемых препаратов в 10 ТД приводило к увеличению как доли активных перитонеальных макрофагов (ФИ), так и их фагоцитарной активности (ФЧ). Количество фагоцитирующих нейтрофилов было выше в группе животных, получавших имИФН- $\alpha 2b$ в 1 ТД и в дозе, на порядок ее превышающую, как по сравнению с контролем, так и с группой препарата сравнения, но без изменения показателей ФЧ (табл. 1).

Таблица 1 - Влияние курсового введения иммобилизованного интерферона- $\alpha 2b$ (имИФН- $\alpha 2b$) и липосомального интерферона- $\alpha 2b$ (ЛИФН- $\alpha 2b$) в терапевтической дозе ($1,8 \times 10^5$ МЕ/кг) и в десятикратной терапевтической дозе ($1,8 \times 10^6$ МЕ/кг) на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов и нейтрофилов мышей линии СВА ($X \pm m, P$)

Группы животных	Исследуемые показатели			
	ФИ, %		ФЧ	
	макрофаги	нейтрофилы	макрофаги	Нейтрофилы
Группа 1 Контроль	25,0 \pm 1,37	30,17 \pm 2,52	5,15 \pm 0,44	3,53 \pm 0,39
Группа 2 имИФН- $\alpha 2b$ 1 ТД	22,0 \pm 2,08	44,0 \pm 1,95 $_{1-2}P < 0,01$	8,83 \pm 1,47 $_{1-2}P < 0,05$	4,23 \pm 0,47
Группа 3 ЛИФН- $\alpha 2b$ 1 ТД	21,83 \pm 0,87	34,33 \pm 2,38 $_{2-3}P < 0,05$	4,53 \pm 0,25 $_{2-3}P < 0,05$	4,52 \pm 0,49
Группа 4 имИФН- $\alpha 2b$ 10 ТД	41,0 \pm 1,57 $_{1-4}P < 0,001$	44,33 \pm 2,98 $_{1-4}P < 0,05$	8,02 \pm 0,82 $_{1-4}P < 0,05$	3,73 \pm 0,17
Группа 5 ЛИФН- $\alpha 2b$ 10 ТД	43,50 \pm 0,96 $_{1-5}P < 0,001$	29,83 \pm 2,02 $_{4-5}P < 0,001$	10,82 \pm 1,38 $_{1-5}P < 0,01$	4,75 \pm 0,63

Примечание: здесь и в табл. 2, 4 - $_{1-2}P < 0,05$ – различия между соответствующими группами достоверны. Количество мышей в каждой группе – 10 голов.

Помимо активации неспецифических ресурсов иммунной системы, ИФН- α регулируют процессы созревания иммунокомпетентных клеток, межклеточных взаимодействий и участвуют в формировании специфического иммунного ответа [Серебряная Н.Б. и др., 2002; Наровлянский А.Н. и др., 2013; Stark G.R. et al., 1998]. Из литературы известно, что иммуномодулирующее действие рекомбинантного препарата ИФН- $\alpha 2b$ реализуется преимущественно через воздействие на клеточное звено иммунной системы [Абатуров А.Е., Юлиш Е.И., часть 1, 2007; Бекетова Г.В., 2011; Панкратов О.В., 2011]. Однако в нашем исследовании курсовое введение имИФН- $\alpha 2b$, также как ЛИФН- $\alpha 2b$ не способствовало развитию клеточного иммунного ответа в реакции ГЗТ. Исследуемые препараты не оказывали влияние на формирование клона антиген-специфических Т-лимфоцитов и на способность этих лимфоцитов при встрече с антигеном продуцировать провоспалительные цитокины.

В то же время, у животных после курсового введения имИФН- $\alpha 2b$ и препарата сравнения на 4-е и 7-е сутки после иммунизации ЭБ увеличивались показатели гуморального иммунного ответа (рис. 1). Существуют данные о способности ИФН- α в физиологических концентрациях активировать эффектор-ные механизмы гуморального иммунитета, повышая тем самым эффективность иммунного ответа. Иммуномодулирующее влияние ИФН I типа на гуморальный иммунный ответ выявлено для разных типов антигенов [Ершов Ф.И. и др., 2005; Литвицкий П.Ф., 2009]. Нами было обнаружено, что курсовое введение имИФН- $\alpha 2b$ в терапевтической дозе на 4-е и 7-е сутки после иммунизации уве-

личивало показатели гуморального иммунного ответа (ОКС, АОК). Применение имИФН- α 2b и ЛИФН- α 2b в 10 ТД также способствовало увеличению ОКС, относительного и абсолютного количества антителопродуцентов в селезенках мышей, но только на 7-й день после иммунизации. На 4-й день после введения ЭБ у мышей, получающих изучаемые препараты в 10 ТД, были обнаружены разнонаправленные эффекты. При использовании имИФН- α 2b было отмечено снижение относительного и абсолютного числа АОК в селезенках мышей при неизменной концентрации гемагглютининов в сыворотке крови, тогда как курсовое введение ЛИФН- α 2b в 10 ТД, способствовало повышению ОКС, хотя при этом количество антителопродуцентов не изменялось относительно исходных значений. Вероятно, это связано со способностью ИФН- α 2b перераспределять иммунциты для усиления специфического иммунного ответа в период первичной инфекции за счет привлечения популяции В- и Т-клеток в места воспаления для антигенной презентации [Ершов Ф.И. и др., 2004]. А противоположные эффекты препаратов, возможно, связаны с их различной биодоступностью и распределением в организме.

В зависимости от условий протекания иммунного воспаления ИФН I типа способны влиять на функциональную активность В-лимфоцитов, усиливая или тормозя процесс антителообразования, а также переключая синтез иммуноглобулинов. По имеющимся данным, ИФН стимулируют в В-клетках, в зависимости от их локализации, продукцию специфических IgG, IgM, IgA и снижают синтез IgE [Stark G.R. et al., 1998; Brassard D.L. et al., 2002]. Функциональная активность АОК в селезенках мышей, принимавших 5-ти дневным курсом имИФН- α 2b в 1 ТД и 10 ТД, судя по титрам специфических гемагглютининов в сыворотке крови, увеличивалась незначительно (рис. 1).

Таким образом, полученный иммуностимулирующий эффект на гуморальный иммунитет мышей реализуется в основном за счет увеличения числа АОК и клеточности селезенки, а не за счет увеличения функциональной активности антителопродуцентов. Существует ряд данных, свидетельствующий о способности ИФН- α напрямую воздействовать на В-лимфоциты, усиливая их пролиферативную активность [Кузнецов В.П., 1998; Лусс Л.В. и др., 2014]. Кроме того, известно, что ИФН I типа повышают жизнеспособность и пролиферацию Т-клеток [Романцов М.Г., 2002; Ершов Ф.И. и др., 2004; Бекетова Г.В., 2011; Brassard D.L. et al., 2002]. Оценивая влияния имИФН- α 2b и ЛИФН- α 2b на пролиферативную активность спленоцитов в условиях *in vitro* после курсового введения изучаемых препаратов, были получены следующие результаты. Исследуемые препараты ИФН способствовали снижению спонтанной пролиферации клеток, при этом имИФН- α 2b в 1 ТД оказывал влияние значительнее, чем препарат сравнения ЛИФН- α 2b в аналогичной дозировке (табл. 2). Для выяснения влияния ИФН на пролиферацию Т- и В-лимфоцитов нами были использованы специфические митогены - Кон А для стимуляции Т-клеток и ЛПС - для В-клеток.

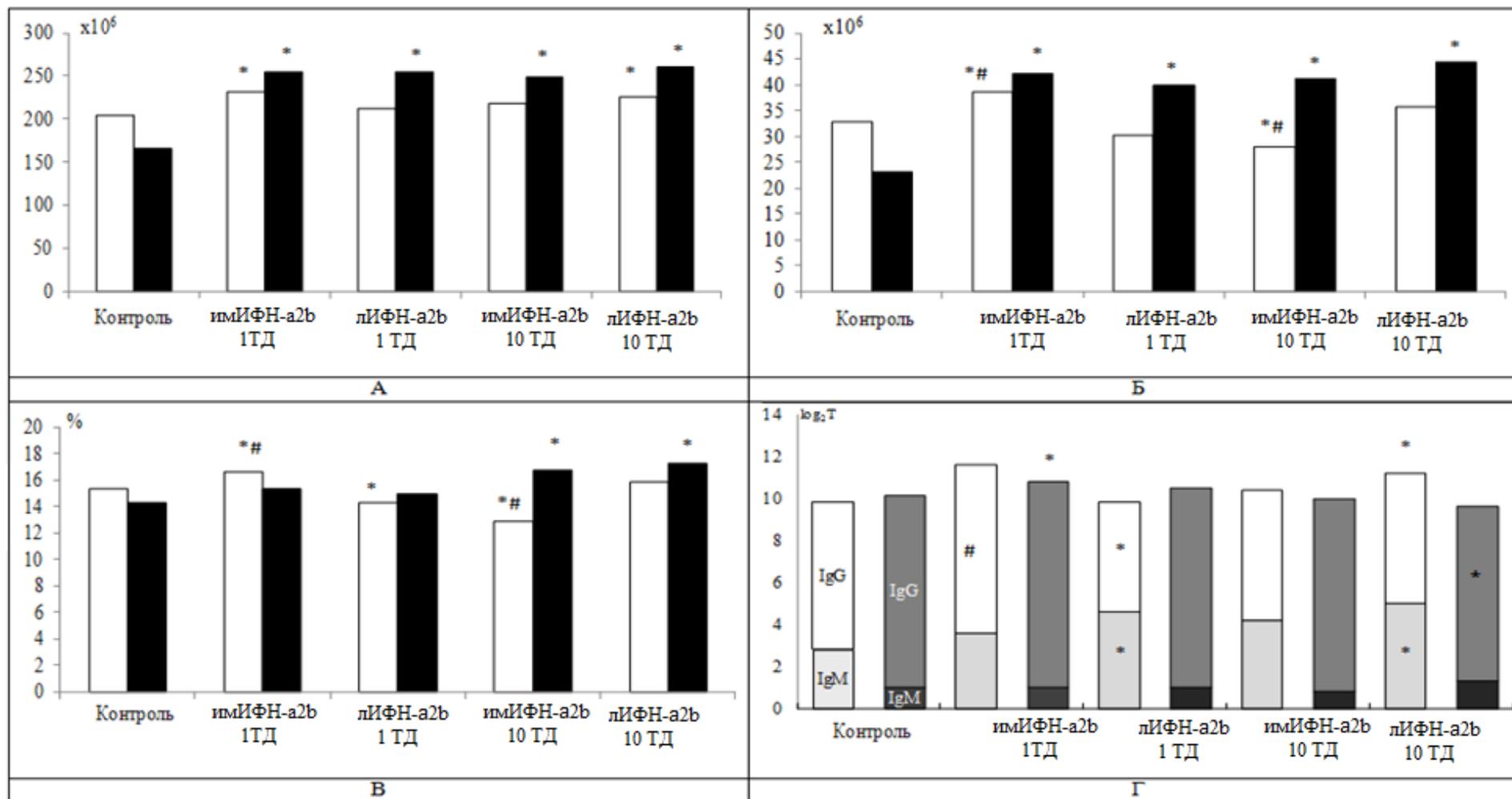


Рисунок 1 - Влияние иммобилизованного интерферона-α2b (имИФН-α2b) и липосомального интерферона-α2b (ЛИФН-α2b) на общее количество спленоцитов (А), абсолютное (Б) и относительное (В) число антителообразующих клеток в селезенке и титров антител в сыворотке крови (Г) на 4-е (светлые столбики) и 7-е (темные столбики) сутки после внутрибрюшинной иммунизации мышей линии СВА эритроцитами барана. Примечание: * - статистическая значимость различий с контролем, # - различие иммобилизованного интерферона-α2b с соответствующей дозой липосомального интерферона-α2b.

Применение курсом имИФН- α 2b не оказывало влияние на пролиферацию Т-лимфоцитов, в то время как ЛИФН- α 2b в 1 ТД стимулировал деление Т-клеток. Курсовое введение имИФН- α 2b в 10 ТД снижало, а ЛИФН- α 2b в 1 ТД, наоборот, увеличивало пролиферацию В-клеток. Полученные данные в очередной раз доказывают дозозависимый эффект ИФН- α 2b и различающиеся действия при использовании идентичных концентраций имИФН- α 2b и ЛИФН- α 2b.

Таблица 2 - Влияние курсового введения иммобилизованного интерферона- α 2b (имИФН- α 2b) и липосомального интерферона- α 2b (ЛИФН- α 2b) в терапевтической дозе ($1,8 \times 10^5$ МЕ/кг) и в десятикратной терапевтической дозе ($1,8 \times 10^6$ МЕ/кг) на пролиферацию спленоцитов мышей линии СВА ($X \pm m$, P)

Группа животных	Пролиферация (единицы оптической плотности)		
	Среда	Среда+КонА	Среда+ЛПС
Группа 1 Контроль	0,216 \pm 0,006	0,266 \pm 0,005	0,183 \pm 0,004
Группа 2 имИФН- α 2b 1 ТД	0,194 \pm 0,005 1-2P<0,05	0,276 \pm 0,011	0,170 \pm 0,006
Группа 3 ЛИФН- α 2b 1 ТД	0,219 \pm 0,006 2-3P<0,05	0,314 \pm 0,003 1-3P<0,05 2-3P<0,05	0,236 \pm 0,005 1-3P<0,05 2-3P<0,05
Группа 4 имИФН- α 2b 10 ТД	0,178 \pm 0,006 1-4P<0,05	0,286 \pm 0,005	0,159 \pm 0,005 1-4P<0,05
Группа 5 ЛИФН- α 2b 10 ТД	0,171 \pm 0,007 1-5P<0,05	0,263 \pm 0,006 4-5P<0,05	0,170 \pm 0,010 4-5P<0,05

Примечание: * - различие с инкубацией без митогена достоверны, p<0,05.

Отсутствие стимулирующего влияния имИФН- α 2b на пролиферацию лимфоцитов, склоняет нас к мысли о косвенном воздействии пегилированного цитокина на развитие гуморального иммунного ответа. Ряд ученых [Stark G.R. et al., 1998; Brassard D.L. et al., 2002, Boasso A., 2013] полагают, что роль ИФН I типа в развитии гуморального иммунного ответа очень деликатная и тонкая, и возможно обусловлена не прямой стимуляцией В-клеток, а опосредована через активацию других участников иммунного воспаления (АПК, макрофаг, Тх0). Селезенка является местом распознавания антигена и антигензависимой пролиферации и дифференцировки Т- и В- лимфоцитов, их активацией, а также продукции и секреции специфических антител [Фрейдлин И.С., 1998]. Вероятно, имИФН- α 2b координирует деятельность Т-лимфоцитов, макрофагов, ЕК, которые сосредоточены в селезенке, и уже под их контролем происходит регуляция пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов. Скорее всего, имИФН- α 2b у мышей СВА в ходе иммунной реакции на ЭБ руководит деятельностью различных иммунокомпетентных клеток через экспрессию генов цитокинов и рецепторов к ним [Ершов Ф.И., 2004; Brassard D.L. et al., 2002]. В свою очередь, цитокины оказывают наиболее выраженное влияние в ближайшем микроокружении клеток-продуцентов и контролируют силу и форму спе-

цифического иммунного ответа [Черешнев В.А., 2001]. Известно, что цитокины ИЛ-4 и ИЛ-10 стимулируют, преимущественно, гуморальное звено иммунитета. В то время как ИЛ-2 и ИФН- γ активируют, главным образом, Т-лимфоциты и макрофаги и направляют развитие клеточного иммунного ответа [Хаитов Р.М., 2010].

В ходе эксперимента было выяснено, что 5-ти дневное применение имИФН- $\alpha 2b$, также как и лИФН- $\alpha 2b$, в дозах 1 ТД и 10 ТД не влияло на спонтанный синтез цитокинов - ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 и ИФН- γ спленоцитами мышей СВА. Однако курсовое введение имИФН- $\alpha 2b$ в 10 ТД статистически значимо повышало стимулированный синтез ИЛ-4 и снижало продукцию ИФН- γ при добавлении к спленоцитам Кон А. У животных, получавших препарат сравнения лИФН- $\alpha 2b$ в 1 ТД и 10 ТД, повышалась стимулированная выработка ИЛ-4 и ИФН- γ (табл. 3). Полученные данные свидетельствуют в пользу активирующего влияния имИФН- $\alpha 2b$ на развитие гуморального иммунного ответа.

Таблица 3 - Влияние курсового введения иммобилизованного интерферона- $\alpha 2b$ (имИФН- $\alpha 2b$) и липосомального интерферона- $\alpha 2b$ (лИФН- $\alpha 2b$) на стимулированный синтез цитокинов

Исследуемые цитокины	имИФН- $\alpha 2b$ 1 ТД	лИФН- $\alpha 2b$ 1 ТД	имИФН- $\alpha 2b$ 10 ТД	лИФН- $\alpha 2b$ 10 ТД
ИЛ-2	-	-	-	-
ИЛ-4	-	↑	↑	↑
ИЛ-10	-	-	-	-
ИФН- γ	-	↑	↓	↑

Примечание: - препарат статистически значимо не влияет, ↑- статистически значимо повышает, ↓- статистически значимо снижает продукцию цитокина.

Оценку иммуотропной активности имИФН- $\alpha 2b$ и рИФН- $\alpha 2b$ проводили также в системе *in vitro* на культуре мононуклеаров периферической крови здоровых доноров. При этом проводилось изучение влияния имИФН- $\alpha 2b$ и рИФН- $\alpha 2b$ в концентрациях 15, 150 и 1500 МЕ/мл на фагоцитоз нейтрофилов, функциональную активность естественных киллеров, пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов, синтез основных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИФН- γ) и иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG).

В ходе эксперимента было установлено, что добавление имИФН- $\alpha 2b$ и рИФН- $\alpha 2b$ к нейтрофилам периферической крови здоровых доноров в различных концентрациях (15 МЕ/мл, 150 МЕ/мл и 1500 МЕ/мл) не приводило к достоверным изменениям ни в доле активных фагоцитов, ни в количестве поглощенных одной клеткой бактерий по сравнению с группой без добавления препарата. Отсутствие влияние имИФН- $\alpha 2b$ на фагоцитоз *in vitro* при стимулирующем влиянии на фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов *in vivo*, возможно, свидетельствует о важности клеток микроокружения в условиях организма в реализации иммуотропного действия ИФН- α [Фрейдлин И.С., 1996,

1998; Gosselin D., 2014; Kolattukudy P., 2015].

Одна из иммунорегулирующих функций ИФН- α связана с его ингибирующим влиянием на пролиферативную фазу иммунного ответа, что снижает воспаление и деструкцию тканей [González-Navajas J.M. et al., 2002]. Показано, что в системе *in vitro* ИФН (особенно в высоких дозах) супрессируют пролиферацию, как Т-лимфоцитов, так и В-лимфоцитов на митогены и антигены [Кузнецов В.П., 1998; Carotenuto P. et al., 2005]. В нашем исследовании при добавлении в культуру лимфоцитов имИФН- α 2b в изучаемых концентрациях (15 МЕ/мл, 150 МЕ/мл и 1500 МЕ/мл), препарат не влиял, как на спонтанную, так и на митоген-стимулированную пролиферацию клеток, выделенных из крови здоровых доноров, в то время как дозы 150 МЕ/мл и 1500 МЕ/мл рИФН- α 2b снижали пролиферацию В-клеток (табл. 4).

Таблица 4 - Влияние иммобилизованного интерферона- α 2b (имИФН- α 2b) и рекомбинантного интерферона- α 2b (рИФН- α 2b) на пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов *in vitro* ($X \pm m$, P)

Группа животных	Пролиферация		
	Среда (ед. опт. пл.)	Индекс стимуляции (ФГА)	Индекс стимуляции (МЛ)
Группа 1 Контроль	0,444 \pm 0,02	1,23 \pm 0,10	1,08 \pm 0,10
Группа 2 имИФН- α 2b 15 МЕ/мл	0,452 \pm 0,04	1,28 \pm 0,08	0,98 \pm 0,08
Группа 3 рИФН- α 2b 15 МЕ/мл	0,410 \pm 0,02	1,11 \pm 0,09	0,80 \pm 0,06 ₁₋₃ P<0,05
Группа 4 имИФН- α 2b 150 МЕ/мл	0,454 \pm 0,03	1,26 \pm 0,10	1,13 \pm 0,10
Группа 5 рИФН- α 2b 150 МЕ/мл	0,366 \pm 0,02 ₁₋₅ P<0,05 ₄₋₅ P<0,05	1,05 \pm 0,09	0,74 \pm 0,07 ₁₋₅ P<0,05 ₄₋₅ P<0,01
Группа 6 имИФН- α 2b 1500 МЕ/мл	0,398 \pm 0,02	1,06 \pm 0,10	0,86 \pm 0,08
Группа 7 рИФН- α 2b 1500 МЕ/мл	0,417 \pm 0,03	1,03 \pm 0,08	0,93 \pm 0,08

В условиях *in vitro* имИФН- α 2b угнетал активность ЕК. С возрастанием дозы вносимого имИФН- α 2b более значительно подавлялась киллерная активность клеток. При этом иммобилизованный ИФН снижал функциональную активность ЕК более значительно, чем препарат сравнения - рИФН- α 2b. Из литературы известно, что ИФН I типа способны как стимулировать, так и блокировать активность ЕК, через регуляцию продукции ИЛ-12 [Boasso A., 2013]. Тем не менее, необходимо отметить, что стимулирующее действие ИФН- α 2b проявляется при исходно низких показателях литической активности, а по-

давяющее – при исходно высокой активности ЕК [Петровская И.А. и др., 1995].

Из литературы известно, что ИФН альфа, в некоторой степени подавляют развитие гуморального иммунного ответа через снижение экспрессии рецепторов IL-4R для ИЛ-4 [Brassard D. L. et al., 2002] на поверхности В-клеток и увеличение синтеза антагонистических цитокинов – ИФН- γ и ИЛ-2 [Кузнецов В.П., 1998; González-Navajas J.M. et al., 2002], а через СТАТ-независимые пути, способствуя дифференциации В-лимфоцитов в плазмциты, которые не способны продуцировать большие количества иммуноглобулинов [Абатуров А.Э. и др., 2007]. ИмИФН- α 2b и рИФН- α 2b в выбранных концентрациях не оказывали влияние на спонтанную и стимулированную продукцию ИЛ-1 β и ИЛ-4 и синтез иммуноглобулинов класса А, М, G. ИмИФН- α 2b в концентрациях 15 МЕ/мл, 150 МЕ/мл и 1500 МЕ/мл повышал спонтанную и стимулированную выработку ИЛ-2, а в дозе 150 МЕ/мл еще и спонтанную продукцию ИФН- γ . Рекомбинантный ИФН- α 2b способствовал увеличению спонтанной продукции ИЛ-2 и ИФН- γ .

Существуют данные о снижении биологической активности пегилированных препаратов *in vitro*, объясняющееся авторами [Grace. M. et al., 2006] не как следствием нарушения вторичной или третичной конформации белка, а результатом изменения внутриклеточной передачи сигнала при взаимодействии с рецепторами. С другой стороны, для проявления иммуностропных эффектов пегилированного ИФН- α 2b, возможно, необходима биотрансформация препарата в организме и наличие микроокружения.

Тип развивающегося иммунного ответа на антиген зависит, прежде всего, от поведения антигенпрезентирующей клетки (макрофага и дендритной клетки) [Пинегин Б.В. и др., 2009; Данилец М.Г., 2011; Mosser D.M., 2003]. В связи с этим, при изучении механизмов действия имИФН- α 2b мы особое внимание уделили влиянию исследуемого препарата на функциональное состояние макрофагов. Макрофаги являются одним из звеньев, связывающих врожденный и приобретенный иммунитет, благодаря способности презентировать иммунокомпетентным клеткам чужеродные антигены, выделять хемокины, привлекающие лимфоциты к очагу воспаления, а также вырабатывать цитокины, способствующие протеканию иммунологических реакций [Пинегин Б.В. и др., 2009; Kolattukudy P., 2015]. Результаты проведенного исследования показали, что пролиферативная активность перитонеальных макрофагов достоверно увеличивалась при культивировании с рИФН- α 2b в концентрациях 150 и 1500 МЕ/мл и имИФН- α 2b в дозе 5000 МЕ/мл.

Изучение влияния имИФН- α 2b и рИФН- α 2b на продукцию NO и активность аргиназы позволяет судить о классической или альтернативной активации макрофагов. У классически активированных макрофагов L-аргинин с помощью фермента NO-синтазы преобразуется в оксид азота и цитруллин; при альтернативной активации макрофагов L-аргинин посредством аргиназы гидролизуется в орнитин и мочевины [Данилец М.Г., 2011].

В результате проведенного исследования было показано, что культивирование перитонеальных макрофагов с ЛПС *in vitro* приводило к классической активации клеток с повышением продукции оксида азота и снижением активности аргиназы. Добавление рИФН- α 2b во всех используемых концентрациях не оказывало влияния на NO-стимулирующую активность макрофагов. При этом активность аргиназы была достоверно выше, как контрольных значений, так и показателей стимулированных ЛПС макрофагов. Добавление имИФН- α 2b в культуру клеток в выбранных концентрациях также не приводило к усилению продукции оксида азота и активации аргиназы. Лишь концентрация 150 МЕ/мл снижала активность аргиназы до уровня группы клеток, стимулированных ЛПС. Полученные результаты свидетельствуют либо о снижении биологической активности имИФН- α 2b *in vitro* в результате модификации с ПЭГ [Grace M. et al., 2006]. Либо для проявления иммуотропного действия имИФН- α 2b необходимо предварительная активация макрофагов цитокинами или ЛПС [Черешнев В.А. и др., 2001].

Культивирование предварительно ЛПС-активированных клеток в присутствии имИФН- α 2b и рИФН- α 2b увеличивало продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей линии СВА. Одними из важнейших участников внутриклеточного сигналинга в макрофагах, через которые передаются сигналы с рецепторов ИФН являются молекулы p38, PI3K, NF- κ B и цАМФ [Бельский Ю.П. и др., 2008; Данилец М.Г. и др., 2008].

Известно, что ЛПС в макрофагах активирует сигнальный путь NF- κ B через взаимодействия с рецептором – TLR4 [Paludan S.R., 2000]. NF- κ B является универсальным фактором транскрипции, контролирующим экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла. Ещё одна киназа, активирующаяся через TLR – PI3K, катализирует переход фосфатидилоинозитолдифосфата в активный фосфатидилоинозитол-трифосфат. Мишенью для фосфатидилоинозитол-трифосфата является протеинкиназа Akt [Asano T. et al., 2007; Blank V.C. et al., 2013]. Активация этого пути в клетке приводит к увеличению пролиферации, транспорта глюкозы и подавлению апоптоза [Данилец М.Г., 2011; Elghazi L. et al., 2006]. Белки семейства MAP-киназ группы p38 ответственны за синтез в клетках веществ, регулирующих процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза и могут активизироваться через рецепторы для ИФН [Шурыгина И.А. и др., 2009; Kyriakis J.M. et al., 2001; Bekisz J. et al., 2010; Blank V.C. et al., 2013]. Молекула цАМФ образуется через рецепторы, ассоциированные с G-белком [Gorshkov K. et al., 2014; Paramonov V.M. et al., 2015; Rinaldi L. et al., 2015; Lezoualc'h F. et al., 2016]. Аденилатциклазная система в иммунокомпетентных клетках тормозит пролиферацию и индуцирует их дифференцировку [Романцов В.В., 2002].

Для выяснения роли сигнальных молекул цАМФ, p38, NF- κ B и PI3K в реализации влияния имИФН- α 2b и препарата сравнения рИФН- α 2b на продукцию оксида азота (NO) макрофагами использовали селективные ингибиторы сигнальных молекул. ИмИФН- α 2b обладал NO-стимулирующей активностью, которая полностью зависела от сигнальных молекул NF- κ B и p38 и, частично,

от фосфотидилинозитол-3-киназы и цАМФ. В то время как во внутриклеточный сигналинг макрофагов под влиянием рИФН- α 2b активно был вовлечен NF- κ B, p38 только в высоких концентрациях, а PI3K и цАМФ не участвовали в данном процессе (табл. 5.)

Таблица 5 - Влияние иммобилизованного интерферона- α 2b (имИФН- α 2b) и рекомбинантного интерферона- α 2b (рИФН- α 2b) на ЛПС-стимулированную продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей линии СВА в присутствии ингибиторов ($X \pm m$)

Экспериментальные группы	Концентрация нитритов, мкМ				
	Ингибиторы				
	– (контроль 2)	цАМФ	p38	NF- κ B	PI3K
ЛПС 1 мкг/мл (контроль 1)	29,84 \pm 0,80	27,68 \pm 0,69	5,58 \pm 0,37*	14,74 \pm 0,62*	8,92 \pm 1,08*
имИФН- α 2b 150 МЕ/мл+ ЛПС	33,29 \pm 0,60*	29,62 \pm 0,57*	4,28 \pm 0,18*	6,41 \pm 0,33*	9,45 \pm 2,01*
рИФН- α 2b 150 МЕ/мл+ЛПС	33,16 \pm 1,53*	30,72 \pm 0,79	4,40 \pm 0,28*	8,02 \pm 0,21*	6,11 \pm 0,46*
имИФН- α 2b 1500 МЕ/мл+ ЛПС	27,51 \pm 0,84	23,55 \pm 0,57*	2,18 \pm 0,02*	6,98 \pm 0,36*	5,14 \pm 0,17*
рИФН- α 2b 1500 МЕ/мл+ЛПС	28,72 \pm 0,64	25,45 \pm 1,22	3,51 \pm 0,14*	10,40 \pm 0,96*	8,86 \pm 0,92*

Примечания: * – различие по сравнению с инкубацией МФ без ИФН достоверно (контроль 1), $p < 0,05$; • – различие по сравнению с инкубацией МФ в присутствии ИФН без ингибитора достоверны (контроль 2), $p < 0,05$. Концентрация ингибиторов: цАМФ – 30 мкМ, MAP-киназы p38 – 10 мкМ, NF- κ B – 5 мкМ, PI3K – 10 мкМ; количество измерений на каждую точку (n) = 6. Продукция оксида азота в отсутствие ЛПС – 3,65 \pm 0,10 мкМ.

Таким образом, имИФН- α 2b и рИФН- α 2b не вызывали стимуляции продукции оксида азота перитонеальными макрофагами мышей, при этом рИФН- α 2b усиливал активность аргиназы, а имИФН- α 2b её умеренно снижал.

Иммобилизованный ИФН- α 2b при добавлении в максимальных дозах (5000 МЕ/мл) повышал пролиферативную активность макрофагов, в то время как использование рекомбинантного ИФН- α 2b в дозах 150 МЕ/мл и 1500 МЕ/мл приводило к таким же эффектам. ИмИФН- α 2b активировал макрофаги совместно с ЛПС через сигнальные молекулы MAP-киназы p38 и NF- κ B, в то время как PI3K и цАМФ не использовались при активации клеток рИФН- α 2b.

В целом, иммуностропные свойства иммобилизованного интерферона- α 2b в большей степени проявились при курсовом внутрижелудочном введении лабораторным животным, что выразилось в стимуляции фагоцитарных реакций перитонеальных нейтрофилов и макрофагов, усилении их пролиферации, повышении гуморального иммунного ответа, усилении выработки ИЛ-4, сниже-

нии продукции ИФН- γ митоген-стимулированными спленоцитами мышей на фоне уменьшения спонтанной пролиферации лимфоидных клеток (рис. 2).

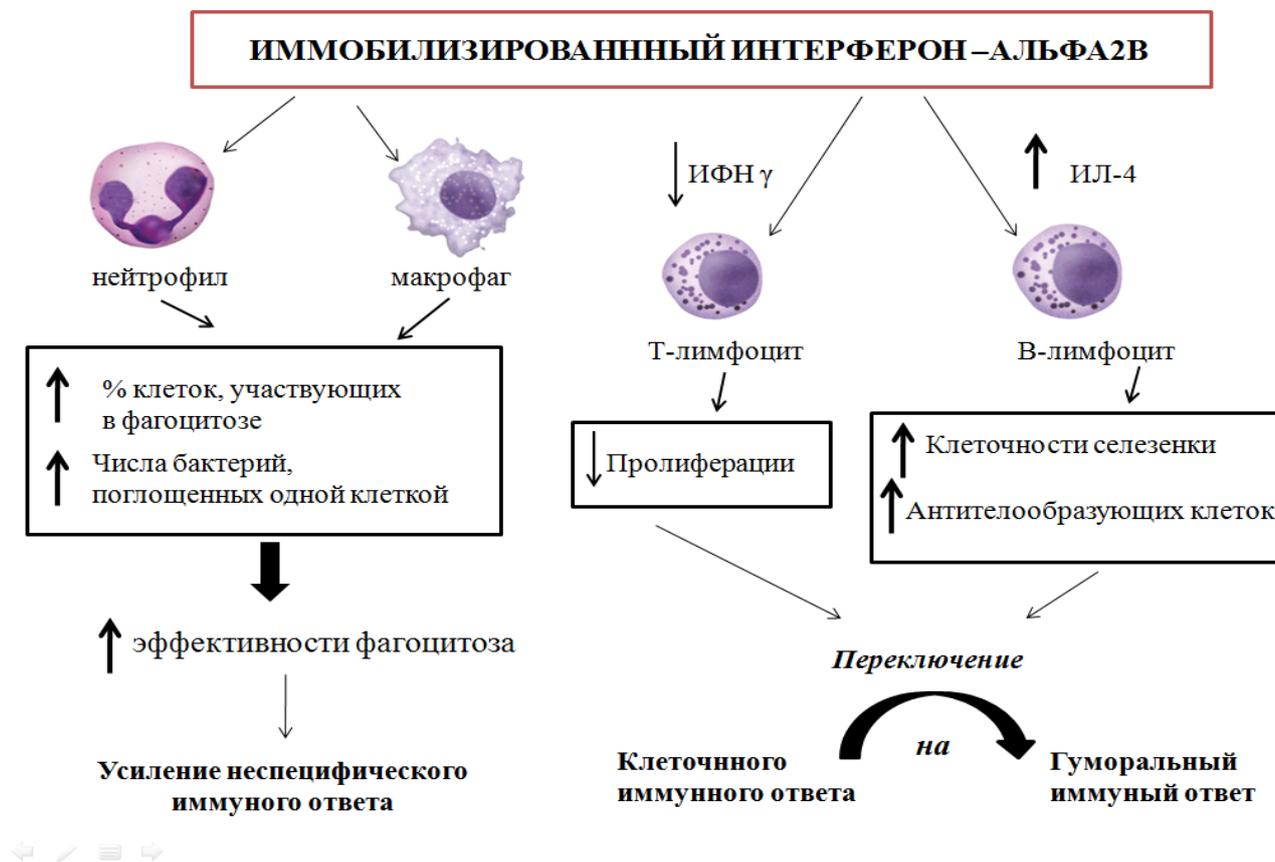


Рисунок 2 – Иммуотропные эффекты иммобилизованного интерферона- $\alpha 2b$ in vivo.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены данные фундаментального и прикладного характера о сохранении специфической иммуотропной активности интерферона- $\alpha 2b$ иммобилизованного на ПЭГ с помощью электронно-лучевого синтеза при пероральном применении. Курсовое применение иммобилизованного интерферона альфа-2b стимулирует фагоцитоз перитонеальных макрофагов и нейтрофилов экспериментальных животных, повышает гуморальный иммунный ответ лабораторных мышей на фоне усиления стимулированной продукции ИЛ-4, подавления выработки ИФН- γ и снижения спонтанной пролиферации спленоцитов.

При добавлении in vitro в культуру мононуклеаров периферической крови здоровых доноров иммобилизованный интерферон альфа-2b не влияет на продукцию ИЛ-4, но повышает спонтанную и стимулированную выработку ИЛ-2, а также и ИФН- γ без дополнительной стимуляции митогеном.

Активирующее влияние на макрофаги иммобилизованный интерферон альфа-2b осуществляет совместно с ЛПС через сигнальные молекулы МАР-киназы p38 и NF- κ B.

Результаты исследования имИФН- α 2b позволяют рекомендовать его в качестве основы для разработки средства в терапии вирусных, и, в частности, энтеровирусных инфекций. Прием имИФН- α 2b внутрь позволит адресно доставлять препарат непосредственно к вирусинфицированным клеткам слизистой оболочки кишечника и влиять на клетки лимфоидной ткани (макрофаги, нейтрофилы).

ВЫВОДЫ

1. Для изучения иммуностропной активности иммобилизованного интерферона- α 2b было выбрано курсовое пероральное введение препарата в течение 5 суток в терапевтической дозе ($1,8 \times 10^5$ МЕ/кг), при использовании которой наблюдается стимуляция гуморального иммунного ответа мышей, и в дозе, на порядок ее превышающую ($1,8 \times 10^6$ МЕ/кг), применение которой вызывает максимально выраженный эффект на гуморальный иммунитет.
2. Курсовое введение иммобилизованного интерферона- α 2b усиливает фагоцитоз перитонеальных нейтрофилов и макрофагов, даже более эффективно, чем при использовании препарата сравнения – липосомального интерферона- α 2b. В условиях *in vitro* имИФН- α 2b не оказывает влияния на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови здоровых доноров и снижает функциональную активность естественных киллеров более значительно, чем рекомбинантный интерферон- α 2b.
3. Курсовое применение иммобилизованного интерферона- α 2b стимулирует гуморальный иммунный ответ за счет увеличения клеточности селезенки и числа антителопродуцентов, однако введение имИФН- α 2b *in vivo* и *in vitro* не способствует синтезу антител. При этом на 4-е сутки после иммунизации имИФН- α 2b оказывается более сильным стимулятором гуморального иммунного ответа, чем липосомальный интерферон- α 2b.
4. Использование курсом иммобилизованного интерферона- α 2b в высокой дозе усиливает митоген-стимулированный синтез ИЛ-4 и снижает продукцию ИФН- γ более значительно, чем липосомальный интерферон- α 2b. *In vitro* имИФН- α 2b усиливает выработку ИЛ-2 и спонтанную продукцию ИФН- γ в дозе 150 МЕ/мл.
5. При курсовом введении мышам иммобилизованный интерферон- α 2b проявляет антипролиферативные свойства, снижая спонтанную пролиферацию спленоцитов мышей, а при использовании *in vitro* пролиферация лимфоцитов не изменяется.
6. Добавление иммобилизованного интерферона- α 2b *in vitro* к перитонеальным макрофагам не влияет на поляризацию макрофагов по классическому или альтернативному пути. Активация макрофагов имИФН- α 2b совместно с ЛПС происходит через сигнальные молекулы MAP-киназы p38 и NF- κ B, и, частично, через фосфотидилинозитол-3-киназу и цАМФ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Шитикова, О.Г.** Влияние иммобилизованного интерферона альфа-2b на гуморальный иммунный ответ / О.Г. Шитикова // Тезисы XVII Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей (с международным участием) «Фундаментальная наука и клиническая медицина — Человек и его здоровье» 19 апреля 2014 года:— СПб.: Изд-во СПбГУ, 2014. - С. 526.
2. **Шитикова, О.Г.** Влияние иммобилизованного интерферона альфа-2b на функциональную активность перитонеальных макрофагов / О.Г. Шитикова, Е.Ю. Шерстобоев, Н.В. Масная и др. // Российский иммунологический журнал. - 2014. - Т. 8 (17). - № 3. - С. 752-755.
3. **Шитикова, О.Г.** Разработка оптимальных экспериментальных терапевтических схем введения иммобилизованного интерферона α -2b / О.Г. Шитикова, Е.Ю. Шерстобоев, Н.В. Масная и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. - Т.13, № 5. - С. 114-121.
4. **Шитикова, О.Г.** Иммунотропная активность иммобилизованного интерферона альфа-2b in vitro / О.Г. Шитикова // Сборник научных статей VII-ой Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в XXI веке». Казань, 3-4 апреля 2015 г. /Под общей редакцией профессора Ксембаева С.С. – Казань, 2015. - С. 815-820.
5. Киншт, Д.Н. Участие иммобилизованного интерферона-альфа2b в активации макрофагов / Д.Н. Киншт, О.В. Пилипенко, **О.Г. Шитикова** и др. // Медицина и образование в Сибири. – 2015. - № 6. – Режим доступа: http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1992.
6. Противозентеровирусное и иммуностимулирующее средство: пат. 2554761 Рос. Федерация / А.В. Артамонов, А.А. Бекарев, Н.В. Балданов, Д.Н. Киншт, П.Г. Мадонов, П.Н. Мирошников, А.М. Дыгай, М.Г. Данилец, А.А. Лигачева, Н.В. Масная, Е.С. Трофимова, Е.Ю. Шерстобоев, **О.Г. Шитикова** // № 2014119335/15; заявл. 13.05.2014; опубл. 27.06.2015. Бюл. № 18.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АОК – антителообразующая клетка
АПК – антигенпредставляющая клетка
ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа
ДК – дендритная клетка
ЕК – естественный киллер
ИЛ – интерлейкин
имИФН- α 2b – иммобилизованный интерферон альфа-2b
ИФН – интерфероны
Кон А – конканавалин А
ЛИФН- α 2b – липосомальный интерферон альфа-2b

МЛ – митоген лаконоса
МФ - макрофаги
ОАС – олигоденилатсинтетаза
ПКР – протеинкиназа R
ПЭГ – полиэтиленгликоль
рИФН- α 2b – рекомбинантный интерферон альфа-2b
ФГА – фитогемагглютинин
ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты
IFNR – рецептор интерферона
ISF – интерферон-стимулированные факторы
ISG – интерферон-стимулированные гены
МНС – главный комплекс гистосовместимости
TLR – толл-подобные рецепторы