

УДК 619:615.37:616.2

**ИЗУЧЕНИЕ БЕЗВРЕДНОСТИ БЫЧЬЕГО РЕКОМБИНАНТНОГО  
АЛЬФА-ИНТЕРФЕРОНА IN VITRO И IN VIVO**

П.А. Красочко<sup>1</sup>, В.А. Прокулевич<sup>2</sup>, Д.С. Борисовец<sup>1</sup>, И.В. Чуенко<sup>3</sup>,  
М.И. Потапович<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – РУП «Институт экспериментальной ветеринарии  
им. С.Н. Вышелесского»,

г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup> – Белорусский государственный университет,

г. Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup> – УО «Гродненский государственный аграрный университет»,

г. Гродно, Республика Беларусь

*(Поступила в редакцию 1.06.2012 г.)*

*Аннотация. В статье показаны его основные механизмы в формировании иммунного ответа в организме животных. Представлены данные об изучении токсичности интерферона на культуре клеток и на лабораторных животных.*

*Summary. In the article his basic mechanisms are rotined in forming of immune answer in the organism of zoons. Information is presented about the study of toxicness of interferon on a coolie round of cages and on laboratory zoons.*

**Введение.** За последнее десятилетие иммунология претерпела глубокие изменения в связи с доказательством того, что иммунная система регулируется пептидными гормонами – цитокинами, действие которых подчиняется тем же закономерностям, что и процессы с участием классических гормонов и их рецепторов. Цитокины – это небольшие белки с молекулярной массой от 8 до 80 кДа, продуцируемые рядом клеток, то есть Т-лимфоцитами, макрофагами, В-лимфоцитами, фибробластами и другими клетками. Основная биологическая функция

цитокинов – регуляция иммунного ответа на всех этапах его развития, где они играют центральную роль.

Наиболее широкое применение в клинической практике из группы цитокинов получили интерфероны, представляющие собой естественную систему противовирусной защиты организма, а также оказывающие иммуностимулирующее, противовоспалительное, противоопухолевое и антимиотическое действие.

В 1980 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) приняла классификацию, по которой интерфероны подразделяют на три класса. Согласно новой номенклатуре по антигенной специфичности, интерфероны делят на альфа, или лейкоцитарный, 1-го типа; бета, или фибробластный, 1-го типа; гамма, или иммунный, 2-го типа. [2, 6, 7]

В последние годы достигнут значительный прогресс в разработке методов лечения острых респираторных вирусных инфекций. В то же время необходимо совершенствовать тактику этиотропной и патогенетической терапии заболеваний. В связи с этим перспективным направлением совершенствования терапии острых респираторных вирусных инфекций представляется использование рекомбинантного интерферона, который обладает высоким потенциалом противовирусной терапевтической защиты.

Интерферон – низкомолекулярный белок (20–40 тыс. дальтон) глобулиновой природы. Синтезируется клетками в ответ на проникновение в них вируса, что препятствует развитию и размножению в тканях вируса.

Интерфероны и иммунная система работают в тесной связи: иммунная направлена на чужеродные белки и обеспечивает постоянство белкового состава организма, система интерферона поддерживает постоянство нуклеинового состава организма.

Кроме того, интерферон обладает высокой иммуностимулирующей активностью [1, 5, 8].

Интерферон действует через существенную систему регуляции синтеза нуклеиновых кислот, активируя ферменты и ингибиторы, блокирующие трансляцию или приводящие к деградации чужеродной (в данном случае вирусной) генетической информации. Блокирование интерфероном стадии инициации трансляции и разрушение РНК обуславливают его универсальный механизм действия при инфекциях, вызванных вирусами с разным генетическим материалом.

Кроме того, интерферон потенцирует вирусиндуцированный апоптоз, тем самым ускоряя его и не давая сформироваться многочисленному потомству. Интерфероны относятся к неспецифическим противовирусным средствам, поскольку они действуют на

вирусы, относящиеся к различным таксономическим группам. Эффективность этих соединений обусловлена чувствительностью к ним большинства возбудителей острых респираторных вирусных инфекций.

Применение препаратов интерферона – естественный фактор защиты. Кроме того, в силу своих биологических особенностей воздействия на возбудителей инфекции ИФН являются универсальным фактором неспецифической резистентности, поэтому они высокоэффективны при самых различных инфекционных заболеваниях.

Противовирусный эффект интерферонов заключается в подавлении синтеза вирусной РНК, подавление синтеза белков оболочки вируса. Механизмом этого эффекта является активация внутриклеточных ферментов, таких, например, как протсинкиназа или аденилатсинтетаза. Протеинкиназа разрушает фактор инициации синтеза белка с матричной РНК, что подавляет белковый синтез. Аденилатсинтетаза – вызывает синтез веществ, разрушающих вирусную РНК. Наряду с этим отмечен и иммуномодулирующий эффект интерферонов – способность регулировать взаимодействие клеток участвующих в иммунном ответе. Эту функцию интерфероны выполняют, регулируя чувствительность клеток к цитокинам и экспрессию на мембранах клеток молекул главного комплекса гистосовместимости I типа (ГКГ1). Усиление экспрессии ГКГ1 на вирус-инфицированных клетках значительно повышает вероятность того, что они будут распознаны иммунокомпетентными клетками и элиминированы из организма. Наиболее выраженными иммуномодулирующими свойствами обладает ИНФ- $\gamma$ , являясь продуктом Т-лимфоцитов-хелперов I типа, он вместе с другими провоспалительными цитокинами активирует макрофаги, Т-цитотоксические лимфоциты, клетки-естественные киллеры (NK-клетки), подавляет активность В-лимфоцитов, активизирует простагландиную и кортикостероидную системы. Все эти факторы усиливают фагоцитарные и цитотоксические реакции в зоне воспалительного очага и способствуют эффективной элиминации инфекционного агента [1, 7].

Система интерферона является обязательным компонентом иммунного ответа на инфекцию и во многом определяет исход и характер течения заболевания. Система интерферона включает несколько составляющих: сами интерфероны, гены, кодирующие как их синтез, так и их репрессоры; специфические клеточные рецепторы; ферменты активизирующиеся при взаимодействии интерферонов с последними.

Кроме своего основного противовирусного действия, интерфероны модулируют практически все реакции иммунной защиты (в том числе цитохимические, гиперчувствительности замедленного и немедленного типов), участвуют в фагоцитозе, антителообразовании и т.д.

Все это подтверждает прямую связь системы интерферонов со всей иммунной системой организма. Кроме того, интерферон, регулируя процессы перекисного окисления липидов в клеточных мембранах, способствует восстановлению нарушенного гомеостаза и ускорению лизиса инфицированных клеток.

Назначение препаратов интерферонов в случае сниженной естественной продукции этого цитокина играет роль заместительной терапии, что может быть использовано как для профилактики, так и для лечения сезонных эпидемий ОРВИ вне зависимости от штамма вируса, вызвавшего эпидемию, что выгодно отличает препараты интерферонов от вакцин, которые эффективны только против конкретных штаммов [3, 4].

В связи с вышеизложенным становится актуальным применение интерферонсодержащих препаратов, обладающих свойствами иммуномодуляторов, проявляющих противовирусное и антибактериальное действие непосредственно или опосредованно за счет стимуляции иммунной системы, а также средств, повышающих иммуногенность существующих вакцин.

В Белорусском государственном университете разработана технология получения бычьего рекомбинантного альфа-интерферона, предназначенного для терапии вирусных инфекций.

Исходя из этого целью настоящего исследования явилось определить безвредность бычьего рекомбинантного альфа-интерферона на культуре клеток линии MDBK и на лабораторных животных.

**Материал и методика проведения исследований.** На первом этапе для исследования использовали бычий рекомбинантный альфа-интерферон, полученный путем микробиологического синтеза на кафедре микробиологии БГУ в виде прозрачного маслянистого желтоватого слегка опалесцирующего раствора, хорошо смешивающегося с водой. В 1 см<sup>3</sup> препарата содержится не менее  $10,0 \times 10^3$  МЕ/см<sup>3</sup> антивирусной активности интерферона бычьего рекомбинантного. Действующие вещества растворены в неионогенном растворителе с добавлением стабилизаторов.

Также для исследования применяли высокочувствительную к внешним воздействиям перевиваемую культуру клеток линии «MDBK» («ATCC № CCL 22; ECACC № 90050801) крупного рогатого скота. Для культивирования клеток использовали смесь среды Игла MEM с глутамином и среды 199 в равных пропорциях, которую обогащали 5% сыворотки крови эмбрионов коров с добавлением 4% раствора гентамицина сульфата.

При проведении исследования изучалась предельно допустимая доза препарата для культуры линии клеток «MDBK». Для этого на ос-

нове поддерживающей среды, состоящей из равных объемов среды Игла МЕМ и среды 199, были приготовлены растворы препарата концентрацией 1000, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, МЕ/мл. трижды промытую поддерживающей средой культуру линии «МДВК» вносили указанные растворы препарата в объеме 0,1 см<sup>3</sup> и инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 24-48-72-96-120 часов (срок наблюдения). Ежедневно проводили визуальный учет изменений клеточного монослоя при помощи светового микроскопа.

На втором этапе исследований цель опыта заключалась в определении безвредности антивирусного интерферонсодержащего препарата на лабораторных животных. Для исследования использовали антивирусный интерферонсодержащий препарат, который представляет собой белок бычьего интерферона рекомбинантного полученного путем микробиологического синтеза на кафедре микробиологии БГУ в виде прозрачного маслянистого желтоватого слегка опалесцирующего раствора, также использовали лабораторных мышей в количестве 10 голов.

Безвредность опытного образца препарата определяли путем подкожного введения белым мышам массой 18-20 г в дозе по 0,2 мл каждого компонента.

Результаты исследования и их обсуждение. По результатам первого этапа исследований данный препарат не вызывал дегенеративных изменений в клеточном монослое культуры линии клеток «МДВК» на всем протяжении исследования в широком диапазоне концентраций, в том числе в концентрации в 50 раз превышающей предполагаемую терапевтическую. Данные результатов исследования по изучению безвредности препарата на культуре клеток линии «МДВК» представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние различных концентраций интерферонсодержащего препарата на культуру клеток линии «МДВК»

Концентрация препарата, МЕ/мл	Учет изменений в культуре клеток, часы				
	24	48	72	96	120
500000	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
100000	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
50000	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
10000	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
5000	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
1000	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Контроль	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

В таблице 2 приведены результаты второго этапа исследований лабораторных животных по определению безвредности препарата рекомбинантного интерферона.

Таблица 2 – Изучение безвредности препарата рекомбинантного интерферона на мышах

Дни наблюдения	Состояние мышей	
	Опыт	Контроль
До обработок	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы
Через 1 сутки	Мыши клинически здоровы, активны, на месте введения препарата припухлости и болезненности не установлено, активны, физиологические функции в норме, гибели не отмечено	Мыши клинически здоровы, активны, на месте введения препарата припухлости и болезненности не установлено, активны, физиологические функции в норме, гибели не отмечено
Через 2 суток	То же	То же
Через 3 суток	То же	То же
Через 4 суток	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы, гибели не отмечено	То же
Через 5 суток	То же	То же
Через 6 суток	То же	То же
Через 7 суток	То же	То же
Через 8 суток	То же	То же
Через 9 суток	То же	То же
Через 10 суток	То же	То же

Из таблицы видно, что препарат интерферона является безвредным для лабораторных животных

**Заключение.** В результате проведения исследований можно сделать вывод, что интерферонсодержащий препарат не оказывает отрицательного воздействия на культуру клеток линии «МДВК» и в пределах использованных доз может быть отнесен к безвредным препаратам, а при его испытании на животных изменений в клиническом состоянии и гибели не отмечено.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова, Л.В. Природные альфа-интерферон и антибактериальный пептидный комплекс: технология получения, новые лекарственные формы, оценки эффективности: автореф. ... док. мед. наук: 14.00.36; 03.00.07/Л.В. Волкова; Ин-т эколог. и генет. микророрг. УрО РАН. – Пермь, 2004. – 43 с.
2. Градобоева, А.Е. Экспрессия нативного и модифицированного генов иммунного интерферона быка в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*: автореф. канд. биол. наук: 03.03.04/ А.Е. Градобоева; Ин-т цитол. РАН. – Санкт-Петербург, 2010. – 17 с.
3. Гуревич, Г. Профилактика сезонных острых респираторных вирусных инфекций // Г. Гуревич // Биомедицинский журнал. -2001. -№ 10. – С. 42.

4. Захарова, И.Н. Значение системы интерферонов в формировании иммунного ответа у детей с острыми респираторными вирусными инфекциями/ И.Н. Захарова, А.В. Чебуркин и др. //Вопросы практической педиатрии. – 2009. - №5. – С. 38-45.
5. Попов В.Ф. Лекарственные формы интерферонов/ В.Ф. Попов // Справочник врача. М: Триада-х, 2002.-7-12 с.
6. Противовирусное действие интерферона: метод. пособие/ РАСХН Сиб. Отд-ние ИЭВ. СиДВ; авт.-сост. Т.И. Глотова. – Новосибирск, 2005.-24 с.
7. Чуенко, И.В. Интерферон: его структура, организация и роль в формировании иммунитета у животных/И.В. Чуенко, П.А. Красочко// Сб. науч. тр. / Гродн. гос. аграрн. ун-т. - Гродно, 2011.- Сельское хозяйство – проблемы и перспективы.- С 426-436.
8. Чуенко, И.В. Использование интерферона при респираторных болезнях телят вирусной этиологии /И.В. Чуенко, П.А. Красочко// Современные технологии сельскохозяйственного производства : материалы Междунар. научно-практ. конф. - Гродно, 2011. - С. 259-260