УЧАСТИЕ ИММОБИЛИЗИРОВАННОГО ИНТЕРФЕРОНА-АЛЬФА2В В АКТИВАЦИИ МАКРОФАГОВ

[Д.Н. Киншт¹](#), [О.В. Пилипенко¹](#), [О.Г. Шитикова²](#), [Е.Ю. Шерстобоев²](#), [С.В. Мишенина¹](#), [П.Г. Мадонов¹](#), [М.Г. Данилец²](#), [Е.С. Трофимова²](#), [А.А. Лигачева²](#)

¹ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Новосибирск)

²ФГБУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга» (г. Томск)

Оценка влияния иммобилизованного интерферона- $\alpha 2b$ на функциональную активность перитонеальных макрофагов мышей линии SWA/Calac проводилась по показателям пролиферативной активности клеток и метаболизму ими аргинина, а также выяснялась роль сигнальных молекул в активации макрофагов. Результаты исследования показали, что иммобилизованный интерферон- $\alpha 2b$ дозозависимо усиливает пролиферацию перитонеальных макрофагов, не оказывает влияния на продукцию оксида азота и умеренно снижает активность аргиназы в макрофагах. Сигнальные молекулы cAMP, MAP-киназа p38, NF- κ B и PI3K принимают участие в проведении сигнала активации макрофагов иммобилизованным интерфероном- $\alpha 2b$.

Ключевые слова: интерферона- $\alpha 2b$, пегилирование, перитонеальные макрофаги, сигнальные молекулы.

Киншт Дмитрий Николаевич — кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 236-09-02, e-mail: kinsht@scpb.ru

Пилипенко Оксана Владимировна — ассистент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 236-09-02, e-mail: oxana.b@ngs.ru

Шитикова Ольга Геннадьевна — аспирант лаборатории иммунофармакологии ФГБУ «НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга», рабочий телефон: 8 (3822) 41-77-05, e-mail: olya.lya@mail.ru

Шерстобоев Евгений Юрьевич — доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией иммунофармакологии ФГБУ «НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга», рабочий телефон: 8 (3822)41-77-05, e-mail: sherstoboev_eu@pharmso.ru

Мишенина Светлана Владимировна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 236-09-02, e-mail: m-svetlana@ngs.ru

Мадонов Павел Геннадьевич — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 236-09-02, e-mail: madonov@scpb.ru

Данилец Марина Григорьевна — доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий отделом экспериментальных биологических моделей «НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга», рабочий телефон: 8 (3822) 41-83-66, e-mail: danilets_mg@pharmso.ru

Трофимова Евгения Сергеевна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунофармакологии ФГБУ «НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга», рабочий телефон: 8 (3822) 41-83-77, e-mail: trofimova_es@pharmso.ru

Лигачева Анастасия Александровна — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории иммунофармакологии ФГБУ «НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга», рабочий телефон: 8 (3822) 41-83-77, e-mail: ligacheva_aa@pharmso.ru

Введение. Интерфероны (ИФН) зарекомендовали себя с самой лучшей стороны при лечении вирусных заболеваний, большого круга онкологических болезней, а также для профилактики гриппа и острых респираторных заболеваний (ОРЗ) [1, 2]. Тем не менее, белковая природа ИФН накладывает ряд существенных ограничений в клиническом применении. ИФН легко разрушаются ферментами желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и протеазами крови, это снижает их биодоступность и вынуждает клиницистов увеличивать дозу и частоту введения препарата. Парентеральное назначение высоких доз ИФН влечет за собой развитие побочных реакций. У больных, принимающих большие дозы рекомбинантного ИФН, также наблюдается образование антител, нейтрализующих препарат, что сопровождается развитием резистентности к интерферонотерапии [3, 4].

Совершенствование препаратов на основе ИФН предполагает получение более безопасного и эффективного лекарственного средства с улучшенными физико-химическими и биологическими свойствами. Современная технология иммобилизации белковой молекулы с полиэтиленгликолем (ПЭГ) с помощью электронно-лучевого синтеза, возможно, приведет к значительному расширению области настоящего и будущего практического применения препаратов ИФН [5]. В настоящее время ведется доклиническое изучение эффективности отечественного препарата интерферона- $\alpha 2b$ иммобилизованного (иммИФН- $\alpha 2b$) с помощью ионизирующего излучения на ПЭГ с молекулярной массой 1,5 кДа (производства ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии», г. Новосибирск). Уникальность разрабатываемого лекарственного препарата заключается в защите белковой молекулы от действия протеолитических ферментов, благодаря чему появляется возможность его перорального применения с сохраненной фармакологической активностью и терапевтической эффективностью [6].

Исследования последних лет открывают все новые свойства ИФН, напрямую или косвенно связанные с функционированием иммунной системы. На сегодняшний день препараты ИФН-а все чаще рассматриваются, прежде всего, как иммуномодуляторы, влияющие на процессы дифференцировки и функциональной активности эффекторных клеток иммунной системы. Ведь роль ИФН в естественном выздоровлении человека связано не только с торможением репродукции вирусов, бактериальных агентов и опухолевых клеток, но и с формированием адекватного воспалительного процесса и иммунного ответа [7]. Выраженность иммунного ответа на антиген зависит также и от поведения антигенпрезентирующей клетки и, в частности, макрофага [8]. В связи с этим при изучении механизмов действия лекарственного средства на основе иммиИФН- $\alpha 2b$ мы особое внимание уделили влиянию исследуемого препарата на функциональное состояние макрофагов.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на 30-ти мышах-самцах линии СВА/СаLac 6—8-недельного возраста с массой тела 18–22 г, полученные из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (сертификат имеется). Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). В работе использовали иммиИФН- $\alpha 2b$ (производства ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии», г. Новосибирск). В качестве препарата сравнения применяли «Реаферон-ЕС» (РФН-ЕС), производитель ЗАО «Вектор-Медика», Новосибирск. ИммиИФН- $\alpha 2b$, растворенный в стерильном фосфатно-солевом буфере, и препарат сравнения добавляли в культуру перитонеальных макрофагов в дозах 150, 1500 и 5000 МЕ/мл (в пересчете на ИФН). В качестве контроля был использован стандартный активатор макрофагов — липополисахарид *E. coli* (ЛПС) в дозе 1 мкг/мл («Sigma», США). Для изучения сигнальных молекул были использованы ингибиторы p38 MAP-киназы — SB203580, PI3-киназы — LY294002 (оба производства «InvivoGen», США), а также ингибиторы cAMP — 2',5'-дидеоксиаденозин и NF- κ B — оридонин (оба производства «Calbiochem», США). Рабочая концентрация данных ингибиторов была определена в предварительных экспериментах и составляла: SB203580 — 10 мкМ, LY294002 — 10 мкМ, 2',5'-дидеоксиаденозин — 30 мкМ, оридонин — 5 мкМ.

Взятие перитонеального экссудата у мышей проводили по общепринятой методике [9]. Пролиферативную активность перитонеальных макрофагов экспериментальных животных оценивали колориметрически [10] после 72 часов культивирования клеток в CO₂-инкубаторе. Выяснялось влияние иммиИФН- $\alpha 2b$ и РФН-ЕС на метаболизм аргинина (продукция оксида азота (NO) и активность аргиназы). Для этого макрофаги выделяли из суспензии перитонеальных клеток методом прилипания к пластику и культивировали в стандартных условиях [9]. В надосадке оценивали продукцию NO по содержанию нитритов при помощи реактива Грейса [11]. Активность аргиназы в клетках оценивали по способности клеточного гомогената образовывать мочевины [12]. Для оценки роли сигнальных молекул cAMP, MAP-киназы p38, NF- κ B, PI3K в активации макрофагов под действием ИФН клетки культивировали 48 ч с ЛПС и исследуемыми веществами в присутствии или отсутствии ингибиторов, после чего оценивали продукцию макрофагами NO.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с применением пакета статистических программ Statistica for Windows (версия 5.0) с предварительной оценкой нормальности распределения и использованием t-критерия Стьюдента. Для выборки, подчиняющейся нормальному распределению, вычисляли среднее значение величины признака (M) и ошибку средней (m).

Результаты исследования. Полученные в ходе эксперимента данные продемонстрировали дозозависимое влияние препаратов ИФН на пролиферативную активность перитонеальных макрофагов мышей линии СВА/СaLac, в то время как культивирование клеток с ЛПС не влияло на пролиферацию. Пролиферативная активность перитонеальных макрофагов достоверно увеличивалась по сравнению с контролем при добавлении РФН-ЕС в концентрациях 150 и 1500 МЕ/мл (табл. 1) и снижалась до контрольных значений при использовании концентрации 5000 МЕ/мл. С увеличением концентрации имМИФН- α 2b в культуральных средах также увеличивалась и пролиферативная активность макрофагов. Для достижения наибольшей пролиферативной активности клеток понадобилась максимальная концентрация имМИФН- α 2b, тогда как максимальный эффект РФН-ЕС проявлялся уже при 1500 МЕ/мл.

Таблица 1

Влияние имМИФН- α 2b и реаферона-ЕС на пролиферативную активность перитонеальных макрофагов мышей линии СВА/СaLac ($X \pm m$)

Исследуемое вещество	Концентрация	Пролиферация, единицы оптической плотности
Контроль 1 (среда)	—	0,239 $\pm$ 0,23
Контроль 2 (+ ЛПС)	1 мкг/мл	0,261 $\pm$ 0,12
Реаферон-ЕС	150 МЕ/мл	0,395 $\pm$ 0,14*●
	1500 МЕ/мл	0,401 $\pm$ 0,21*●
	5000 МЕ/мл	0,228 $\pm$ 0,17
имМИФН- α 2b	150 МЕ/мл	0,280 $\pm$ 0,17□
	1500 МЕ/мл	0,314 $\pm$ 0,49
	5000 МЕ/мл	0,409 $\pm$ 0,27*●□

Примечание: * — различие с контролем 1 достоверно, $p < 0,05$; ● — различие с контролем 2 достоверно, $p < 0,05$; □ — различие имМИФН- α 2b с соответствующей дозой реаферона-ЕС достоверно, $p < 0,05$. Количество мышей в каждой группе — 10 голов

В культурах клеток инкубированных с ЛПС значительно повышалась продукция NO и снижалась активность аргиназы (табл. 2). Добавление имМИФН- α 2b, так же как РФН-ЕС, во всех используемых концентрациях не оказывало влияния на NO-стимулирующую активность макрофагов. Однако, имМИФН- α 2b снижал концентрацию NO в 1,3 раза (1500 МЕ/мл) и в 1,6 раза (5000 МЕ/мл) относительно РФН-ЕС в аналогичных концентрациях.

Активность аргиназы была достоверно выше как контрольных значений, так и показателей стимулированных ЛПС макрофагов (табл. 2) при культивировании клеток с РФН-ЕС. При добавлении РФН-ЕС в культуру макрофагов в дозе 150 МЕ/мл активность аргиназы относительно контроля увеличивались в 3,3; 1500 МЕ/мл — в 2; 5000 МЕ/мл — 2,6 раза. Культивирование макрофагов с имМИФН- α 2b (150 МЕ/мл) приводило к существенному снижению активности аргиназы: в 3,3 раза по сравнению с контрольными значениями, что не отличалось от значений показателя на фоне стимуляции ЛПС. В концентрациях 1500 и 5000 МЕ/мл имМИФН- α 2b не влиял на активность изучаемого фермента (табл. 2).

Таблица 2

Влияние имМИФН- α 2b и реаферона-ЕС на метаболизм аргинина перитонеальными макрофагами мышей линии СВА/СaLac (M $\pm$ m)

Исследуемое вещество	Концентрация вещества	Концентрация нитритов, мкМ	Активность аргиназы, ЕА
Контроль 1 (среда)	—	3,16 $\pm$ 0,19	13,2 $\pm$ 1,5
Контроль 2 (+ ЛПС)	1 мкг/мл	68,09 $\pm$ 0,82*	4,2 $\pm$ 0,3*
Реаферон-ЕС	150 МЕ/мл	2,57 $\pm$ 0,05●	44,3 $\pm$ 3,2*●
	1500 МЕ/мл	3,29 $\pm$ 0,19●	26,3 $\pm$ 1,1*●
	5000 МЕ/мл	3,88 $\pm$ 0,23●	34,1 $\pm$ 2,1*●
имМИФН- α 2b	150 МЕ/мл	2,75 $\pm$ 0,17●	4,0 $\pm$ 0,4*□
	1500 МЕ/мл	2,56 $\pm$ 0,11●□	12,6 $\pm$ 0,6●□
	5000 МЕ/мл	2,39 $\pm$ 0,30●□	8,4 $\pm$ 0,4□

Примечание: * — различие с контролем 1 достоверно, $p < 0,05$; ● — различие с контролем 2 достоверно, $p < 0,05$; □ — различие имМИФН- α 2b с соответствующей дозой реаферона-ЕС достоверно, $p < 0,05$. Количество мышей в каждой группе — 10 голов

Для более детального изучения механизмов, по которым имМИФН- α 2b проявляет свое действие, были выбраны блокаторы сигнальных молекул сАМР 2',5'-дидеоксиаденозин, р38 MAP-киназы — SB203580, NF- κ B — оридонин и PI3K — LY294002. Ингибиторы молекул добавлялись в культуральные среды, затем оценивали активность NO-синтазы по продукции макрофагами NO.

Инкубация перитонеальных макрофагов с ЛПС приводила к значительному усилению продукции NO с фонового значения $3,65 \pm 0,10$ до $29,84 \pm 0,80$ мкМ (табл. 3). Культивирование ЛПС-стимулированных клеток в присутствии имМИФН- α 2b и РФН-ЕС в концентрации 150 МЕ/мл NO-активирующее действие ЛПС усиливали, а в концентрации 1500 МЕ/мл не изменяли. Ингибитор сАМР не влиял на продукцию NO макрофагами в контроле, тогда как ингибиторы MAP-киназы р38 (в 5,3 раза), NF- κ B (в 2 раза), PI3K (в 3,3 раза) снижали концентрацию NO, что подтверждает роль этих молекул в проведении сигнала активации макрофагов. Присутствие в средах имМИФН- α 2b в дозе 1500 МЕ/мл и ингибитора сАМР снижало уровень нитритов относительно групп ЛПС-контроля и имМИФН- α 2b без ингибитора. ИмМИФН- α 2b в дозе 150 МЕ/мл снижал концентрацию NO только относительно группы имМИФН- α 2b без ингибитора. Инкубация с РФН-ЕС в концентрации 1500 МЕ/мл приводила к снижению синтеза нитритов относительно культуры клеток без ингибитора, однако не отличалась от соответствующих контрольных значений. Снижение концентрации NO при инкубации макрофагов с имМИФН- α 2b в дозе 1500 МЕ/мл и ингибитором сАМР по сравнению с показателем ЛПС-стимулированных макрофагов позволяет говорить об участии молекулы в передаче сАМР-сигнала. При добавлении имМИФН- α 2b и РФН-ЕС в культуры ЛПС-стимулированных макрофагов вместе с ингибиторами MAP-киназы р38 NF- κ B PI3K наблюдалось еще большее снижение содержания NO по сравнению с группами ЛПС-контролем с ингибиторами. Полученные данные свидетельствуют об участии молекул MAP-киназы р38, NF- κ B, PI3K в передаче сигнала от рецептора ИФН внутрь клетки для активации генов NO-синтазы.

Таблица 3

Влияние имМИФН- α 2b и реаферона-ЕС на ЛПС-стимулированную продукцию NO

перитонеальными макрофагами мышей линии СВА/СаLас в присутствии ингибиторов ($X \pm m$)

Группа	Концентрация	Концентрация нитритов, мкМ				
		— ингибитор	+ ингибитор сАМР	+ ингибитор р38	+ ингибитор NF-кВ	+ ингибитор РІЗК
Фон (среда+ макрофаги)	—	3,65 ± 0,10*	—	—	—	—
Контроль (макрофаги + ЛПС)	1 мкг/мл	29,84 ± 0,80	27,68 ± 0,69	5,58 ± 0,37●	14,74 ± 0,62●	8,92 ± 1,08●
Реаферон-ЕС+ ЛПС	150 МЕ/мл	33,16 ± 1,53*	30,72 ± 0,79	4,40 ± 0,28●	8,02 ± 0,21*●	6,11 ± 0,46●
	1500 МЕ/мл	28,72 ± 0,64	25,45 ± 1,22●	3,51 ± 0,14*●	10,40 ± 0,96*●	8,86 ± 0,92●
иммИФН-α2b + ЛПС	150 МЕ/мл	33,29 ± 0,60*	29,62 ± 0,57●	4,28 ± 0,18*●	6,41 ± 0,33*●	9,45 ± 2,01●
	1500 МЕ/мл	27,51 ± 0,84	23,55 ± 0,57*●	2,18 ± 0,02*●	6,98 ± 0,36*●	5,14 ± 0,17*●

Примечания: * — различие с контролем достоверно, $p < 0,05$; ● — различия с инкубацией без ингибитора достоверны, $p < 0,05$. Концентрация ЛПС — 1 мкг/мл; концентрации ингибиторов: сАМР (2',5'-дидеоксиаденозина) — 30 мкМ, МАР-киназы р38 (SB203580) — 10 мкМ, NF-кВ (оридонина), — 5 мкМ, РІЗК(LY294002) — 10 мкМ. Количество мышей в каждой группе — 10 голов

Обсуждение результатов. При проникновении чужеродного агента в организм именно продукция ИФН является наиболее быстрой ответной реакцией на заражение. Помимо прямой противовирусной, антибактериальной и противоопухолевой защиты, ИФН I типа ответственны за координацию деятельности иммунокомпетентных клеток [13]. По всей видимости, на ранних стадиях развития воспаления одной из главных клеток-мишеней ИФН-α является макрофаг. Известно, что ИФН-α активирует цитотоксическую функцию макрофагов через усиление продукции в них свободных форм кислорода и NO, а также облегчает процессы распознавания антигена и презентации его другим клеткам за счет повышения экспрессии молекул МНС I, II классов, Fc- и TLR-рецепторов на цитоплазматической мембране клеток [13–15]. Именно эти события в первую фазу воспаления определяют направление и силу иммунного ответа. Поэтому мы особое внимание уделили влиянию ИФН на функциональное состояние макрофагов.

Один из механизмов иммуномодулирующего действия ИФН заключается в рекрутировании эффекторных клеток путем модулирования процессов их дифференцировки, созревания и пролиферации [7]. Однако проявление этого эффекта ИФН в существенной мере зависит от дозы и времени применения препарата относительно фазы иммунного ответа. В наших наблюдениях было выявлено дозозависимое влияние иммИФН-α2b и РФН-ЕС на пролиферативную активность перитонеальных макрофагов (табл. 1). Однако для достижения наибольшей пролиферативной активности клеток понадобилась максимальная концентрация (5000 МЕ/мл) иммИФН-α2b, тогда как максимальный эффект РФН-ЕС проявлялся уже при 1500 МЕ/мл.

Изучение влияния иммИФН-α2b и РФН-ЕС 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 преобразуют в NO и цитруллин; при альтернативной активации макрофагов L-аргинин посредством аргиназы гидролизует в орнитин и мочевины [8]. В результате проведенного исследования было показано, что культивирование перитонеальных макрофагов с ЛПС приводило к классической активации клеток, т. е. в культурах клеток, инкубированных с ЛПС, значительно повышалась продукция NO и снижалась активность аргиназы (табл. 2). Добавление РФН-ЕС 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 (табл. 2).

Эти результаты свидетельствуют в пользу альтернативной активации макрофагов. Добавление имМИФН- $\alpha 2b$ в культуру клеток в выбранных концентрациях также не приводило к усилению продукции NO. Культивирование макрофагов с имМИФН- $\alpha 2b$ в концентрации 150 МЕ/мл приводило к существенному снижению активности аргиназы, а концентрациях 1500 и 5000 МЕ/мл не влияло на активность изучаемого фермента. Отсутствие влияния имМИФН- $\alpha 2b$ на метаболизм аргинина в макрофагах свидетельствуют о снижении биологической активности имМИФН- $\alpha 2b$ *in vitro* в результате модификации с ПЭГ. Однако необходимо отметить, что эти изменения, вероятно, не являются следствием нарушения структуры белка, а связаны в первую очередь с изменением передачи внутриклеточных сигналов при взаимодействии пегилированного ИФН с рецептором [16]. Либо для реализации биологических эффектов имМИФН- $\alpha 2b$ необходимы предварительно активированные клетки. Данное явление можно объяснить ограниченным количеством рецепторов к ИФН на мембране превентивно неактивных клеток, а рецепция макрофагов к цитокину будет, вероятно, определяться характером активации клетки [17]. Доказательством этому предположению явилось увеличение синтеза NO при добавлении имМИФН- $\alpha 2b$ и РФН-ЕС в концентрации 150 МЕ/мл к ЛПС-стимулированным макрофагам (табл. 3).

Возбуждение рецепторов IFNAR на мембране клеток под действием ИФН I типа влечет за собой цепь ферментативных реакций, приводящих к активации транскрипции ИФН-индуцируемых генов и экспрессию ИФН-стимулированных факторов. К настоящему времени во многом расшифрованы сигнальные пути, обеспечивающие передачу сигналов ИФН с рецепторов в клеточное ядро для реализации биологических эффектов [18]. Тем не менее, роль молекул cAMP, MAP-киназы p38, NF- κ B, PI3K в проведении сигнала от IFNAR до конца не определена и вызывает особый интерес исследователей. Полученные нами данные доказали участие сигнальных молекул cAMP, MAP-киназа p38, NF- κ B, PI3K в проведении сигнала активации макрофагов имМИФН- $\alpha 2b$, в то время как cAMP не используется при активации клеток РФН-ЕС.

Выводы. Таким образом, в исследовании было показано, что имМИФН- $\alpha 2b$ дозозависимо усиливает пролиферацию перитонеальных макрофагов, не оказывает влияние на продукцию NO и в дозе 150 МЕ/мл умеренно снижает активность аргиназы в интактных макрофагах. Добавление имМИФН- $\alpha 2b$ (150 МЕ/мл) в культуры ЛПС-стимулированных макрофагов увеличивает синтез NO. Сигнальные молекулы MAP-киназа p38, NF- κ B и PI3K принимают участие в проведении сигнала активации макрофагов имМИФН- $\alpha 2b$. ИмМИФН- $\alpha 2b$ в концентрации 1500 МЕ/мл также задействует молекулу cAMP.

Список литературы

1. Ершов Ф. И. Открытие биологического феномена и его последующее научное познание : обзор / Ф. И. Ершов // *Вопр. вирусологии.* — 2012. — № 4. — С. 4-8.
2. Симбирцев А. С. Достижения и перспективы использования рекомбинантных цитокинов в клинической практике / А. С. Симбирцев // *Мед. академический журн.* — 2013. — № 1 (13). — С. 7-22.
3. Thomas T. Nanomedicines in The Treatment of Chronic Hepatitis C-Focus on Pegylated Interferon alpha-2a / T. Thomas, G. Foster // *Int. J. Nanomedicine.* — 2007. — N 1 (2). — P. 19-24.
4. Лусс Л. В. Интерфероны в комплексной терапии и профилактике гриппа и респираторных инфекций [Электронный ресурс] / Л. В. Лусс, В. В. Малиновская, Е. Н. Выжлова // *Эффективная фармакотерапия. Аллергология и иммунология.* — Режим доступа : (http://umedp.ru/articles/interferony_v_kompleksnoy_terapii_i_profilaktike_grippa_i_respiratornykh_infektsiy.html). — Дата обращения : 10.09.2015.
5. Нанотехнологии в фармакологии / А. М. Дыгай [и др.]. — М. : Изд-во РАМН, 2011. — 135 с.
6. Разработка оптимальных экспериментальных терапевтических схем введения иммобилизованного интерферона α -2b / О. Г. Шитикова [и др.] // *Бюл. сиб. медицины.* — 2014. — № 5 (13). — С. 114-121.
7. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств) : монография / Ф. И. Ершов, О. И. Киселев. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2005. — 356 с.
8. Данилец М. Г. Фармакологическая регуляция функционального состояния макрофагов при иммунном ответе : дис. ... д-ра биол. наук / М. Г. Данилец. — Томск, 2011. — 281 с.
9. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев. — М. : Медицина, 2005. — 832 с.
10. Mosmann T. R. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. R. Mosmann // *J. Immunol. Methods.* — 1983. — N 5. — P. 55-63.
11. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrite in biological fluids / L. C. Green [et al.] // *Anal. Biochem.* — 1982. — N 126. — P. 131-143.
12. Munder M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance : competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype / M. Munder, K. Eichmann, M. Modolell // *J. Immunol.* — 1998. — N 11 (160). — P. 5347-5354.
13. Brassard D. L. Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein / D. L. Brassard, M. J. Grace, R. W. Bordens // *J. Leukoc. Biol.* — 2002. — N 71. — P. 565-581.
14. Ершов Ф. И. Ранние цитокиновые реакции при вирусных инфекциях / Ф. И. Ершов, А. Н. Наровлянский, М. В. Мезенцева // *Цитокины и воспаление.* — 2004. — Т. 3, № 1. — С. 3-6.
15. Горячева Л. Г. Применение циклоферона в педиатрии : пособие для врачей / Л. Г. Горячева, В. В. Ботвиньева, М. Г. Романцов. — М. ; СПб., 2004. — 108 с.
16. Grace C. M. Пегилированные интерфероны при хроническом гепатите / C. M. Grace, D. Cutler, R. Bordens // *Рецепт.* — Минск. — 2006. — № 6. — С. 118-128.
17. Черешнев В. А. Иммунология воспаления : роль цитокинов / В. А. Черешнев, Е. И. Гусев // *Мед. иммунология.* — 2001. — № 3 (3). — С. 361-368.
18. Randall R. E Interferons and viruses : an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures / R. E. Randall, S. Goodbourn // *J. Gen. Virol.* — 2008. — N 89. — P. 1-47.

PARTICIPATION OF IMMOBILIZED INTERFERON-ALFA2B AT ACTIVATION OF MACROPHAGES

[D.N. Kinsht¹](#), [O.V. Pilipenko¹](#), [O.G. Shitikova²](#), [E.Y. Sherstoboyev²](#), [S.V. Mishenina¹](#), [P.G. Madonov¹](#), [M.G. Danilets²](#), [E.S. Trofimova²](#), [A.A. Ligacheva²](#)

¹SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health» (Novosibirsk)

²FSBHE «Scientific Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine n. a. E. D. Goldberg» (Tomsk)

The assessment of the influence of immobilized interferon- α 2b on functional activity of peritoneal macrophages of CBA/Calac mice was carried out on indicators of proliferative activity of cells and arginine metabolism by them, and also the role of signaling molecules in activation of macrophages is emerged. Results of research showed that immobilized interferon- α 2b dose-dependently strengthens a proliferation of peritoneal macrophages, has no impact on production of nitrogen oxide and moderately reduces activity of arginase in macrophages. Signaling molecules of cAMP, a MAR-kinase r38, NF- κ B and PI3K take part in carrying out a signal of activation of macrophages immobilized by interferon- α 2b.

Keywords: interferon- α 2b, pegylation, peritoneal macrophages, signaling molecules.

About authors:

Kinsht Dmitry Nikolaevich — candidate of medical science, assistant professor of pharmacology, clinical pharmacology and evidential medicine chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 236-09-02, e-mail: kinsht@scpb.ru

Pilipenko Oksana Vladimirovna — assistant of pharmacology, clinical pharmacology and evidential medicine chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 236-09-02, e-mail: oxana.b@ngs.ru

Shitikova Olga Gennadyevna — post-graduate student of immunopharmacology laboratory at FSBHE «Scientific Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine n. a. E. D. Goldberg», office phone: 8 (3822) 41-77-05, e-mail: olya.lya@mail.ru

Sherstoboyev Evgeny Yuryevich — doctor of medical science, professor, head of immunopharmacology laboratory at FSBHE «Scientific Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine n. a. E. D. Goldberg», office phone: 8 (3822) 41-77-05, e-mail: sherstoboev_eu@pharmso.ru

Mishenina Svetlana Vladimirovna — candidate of medical science, assistant professor of pharmacology, clinical pharmacology and evidential medicine chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 236-09-02, e-mail: m-svetlana@ngs.ru

Madonov Pavel Gennadevich — doctor of medical science, professor, head of pharmacology, clinical pharmacology and evidential medicine chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical

University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 236-09-02, e-mail: madonov@scpb.ru

Danilets Marina Grigoryevna— doctor of biological science, chief researcher, head of department of experimental biological models at FSBHE «Scientific Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine n. a. E. D. Goldberg», office phone: 8 (3822) 41-83-66, e-mail: danilets_mg@pharmso.ru

Trofimova Evgenia Sergeevna — candidate of medical science, senior research associate of immunopharmacology laboratory at FSBHE «Scientific Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine n. a. E. D. Goldberg», office phone: 8 (3822) 41-83-77, e-mail: trofimova_es@pharmso.ru

Ligacheva Anastasia Aleksandrovna — candidate of biological science, research associate of immunopharmacology laboratory at FSBHE «Scientific Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine n. a. E. D. Goldberg», office phone: 8 (3822) 41-83-77, e-mail: ligacheva_aa@pharmso.ru

List of the Literature:

1. Yershov F. I. Opening of biological phenomenon and its subsequent scientific knowledge : review / F. I. Yershov // Issues of virology. — 2012. — N 4. — P. 4-8.
2. Simbirtsev A. S. Achievements and prospects of usage of recombinant cytokines in clinical practice / A. S. Simbirtsev // Medical academic journal. — 2013. — N 1 (13). — P. 7-22.
3. Thomas T. Nanomedicines in The Treatment of Chronic Hepatitis C-Focus on Pegylated Interferon alpha-2a / T. Thomas, G. Foster // Int. J. Nanomedicine. — 2007. — N 1 (2). — P. 19-24.
4. Luz L. V. Interferons in complex therapy and prophylaxis of flu and respiratory infections [electron resource] / L. V. Luz, V. V. Malinovskaya, E. N. Vyzhlova // Effective pharmacotherapy. Allergology and immunology. — Access mode : (http://umedp.ru/articles/interferony_v_kompleksnoy_terapii_i_profilaktike_grippa_i_respiratornykh_infektsiy.html). — Access date : 10.09.2015.
5. Nanotechnologies in pharmacology / A. M. Dygay [et al.]. — M. : Publishing house of the Russian Academy of Medical Science, 2011. — 135 p.
6. Development of optimum experimental therapeutic schemes of introduction of the immobilized interferon α -2b / O. G. Shitikova [et al.] // Bulletin of Sib. medicine. — 2014. — N 5 (13). — P. 114-121.
7. Interferons and their inductors (from molecules to drugs) : monograph / F. I. Yershov, O. I. Kiselyov. — M. : GEOTAR-media, 2005. — 356 p.
8. Danilets M. G. Pharmacologic regulation of a functional condition of macrophages at the immune answer : theses. ... doctor of biol. science / M. G. Danilets. — Tomsk, 2011. — 281 p.
9. Khabriyev of R. U. Guidance on experimental (preclinical) studying of new pharmacological substances / R. U. Khabriyev. — M. : Medicine, 2005. — 832 P.
10. Mosmann T. R. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. R. Mosmann // J. Immunol. Methods. — 1983. — N 5. — P. 55-63.
11. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrite in biological fluids / L. C. Green [et al.] // Anal. Biochem. — 1982. — N 126. — P. 131-143.
12. Munder M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance : competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype / M. Munder, K. Eichmann, M. Modolell // J. Immunol. — 1998. — N 11

(160). — P. 5347-5354.

13. Brassard D. L. Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein / D. L. Brassard, M. J. Grace, R. W. Bordens // *J. Leukoc. Biol.* — 2002. — N 71. — P. 565-581.
14. Yershov F. I. Early cytokine reactions at viral infections / F. I. Yershov, A. N. Narovlyansky, M. V. Mezentseva // *Cytokines and inflammation.* — 2004. — Vol. 3, N 1. — P. 3-6.
15. Goryacheva L. G. Application of a cycloferon in pediatrics : guidance for doctors / L. G. Goryacheva, V. V. Botvinyeva, M. G. Romantsov. — M. ; SPb., 2004. — 108 p.
16. Grace C. M. Pegylated interferons at chronic hepatitis / C. M. Grace, D. Cutler, R. Bordens // *Prescription.* — Minsk. — 2006. — N 6. — P. 118-128.
17. Chereshnev of V. A. Immunology of inflammation : role of cytokines / V. A. Chereshnev, E. I. Gusev // *Medical immunology.* — 2001. — N 3 (3). — P. 361-368.
18. Randall R. E Interferons and viruses : an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures / R. E. Randall, S. Goodbourn // *J. Gen. Virol.* — 2008. — N 89. — P. 1-47.