

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время значительно возрастает интерес к иммуотропным препаратам и к методам иммунокоррекции.. Фармакологический рынок изобилует лекарственными средствами, активирующими иммунные процессы, они активно рекламируются через средства массовой информации, что способствует повышению опасности неадекватного их применения.

Одной из серьезных проблем является отсутствие в медицинской литературе научно обоснованной информации о механизмах действия иммуотропных препаратов на активность иммунной системы в целостном организме, а также об их взаимодействии с другими лекарственными средствами.

Сложность заключается в том, что в существующей практике воздействие иммуномодулирующего препарата на организм прогнозируется по его влиянию на отдельные компоненты иммунной системы. Подбор конкретного иммуномодулирующего препарата осуществляется на основании его действия в условиях *in vitro* на клетки, выделенные из крови. Этот способ прост и доступен, но такой подход противоречит принципам функционирования больших систем, каким является иммунная система. Изолированные из крови и отмытые клетки отличаются по физиологической активности от клеток, находящихся в организме. Кроме того, иммуномодулирующий препарат, попав в организм, вступает в цикл метаболизма и находится не только в виде исходного вещества, но и в виде продуктов его разрушения, действие которых может отличаться от действия самого иммуномодулятора.

Основная проблема при применении иммуномодулирующих препаратов заключается в необходимости подбора среди большого числа средств, обладающих принципиально аналогичным действием на иммунную систему, иммуномодулятора, основываясь на параллельном его воздействии на другие системы и, учитывая индивидуальные особенности организма пациента.

В настоящее время клиничко-иммунологические лаборатории обладают возможностью определять широкий набор иммунологических показателей, многие из которых не являются необходимыми в каждом конкретном случае. Сложность заключается в том, что клиницисты испытывают трудности в интерпретации полученных данных иммунологических исследований и в определении тех параметров иммунной системы, для коррекции которых в данный момент действительно необходимо назначать те или иные иммуотропные препараты. Необходимым условием для правильного выбора стратегии и тактики иммунотерапии остается интерпретация данных иммунологических исследований с учетом принципов иммунофизиологии и сложных взаимосвязей иммунной системы с другими регулирующими системами организма.

Несмотря на перечисленные методологические проблемы иммунокоррекции разработка иммуномодулирующих лекарственных препаратов остается одной из актуальных задач молекулярной фармакологии.

## 1. АКТУАЛЬНОСТЬ ИММУНОТЕРАПИИ ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Обратимые нарушения функционирования иммунной системы сопутствуют многим заболеваниям. Нарушения нормального функционирования иммунной системы приводит к осложнениям, делает неэффективными основную терапию, иногда приводит даже к увеличению летальности. По данным отечественных и зарубежных исследований, в настоящее время до 30% больных, страдающих разными заболеваниями, нуждаются в назначении лечения их иммунной системы, так называемой иммуномодулирующей терапии. Иммуноterapia - это применение иммуностимулирующих препаратов для лечения или профилактики заболеваний, связанных с нарушениями иммунной системы.

Наблюдаемая на практике недостаточная эффективность традиционной лекарственной терапии при многих заболеваниях связана с тем, что очень часто не учитывается ее побочное отрицательное влияние на защитные силы организма, прежде всего на иммунную систему.

Особенно ярко это проявляется при лечении инфекционных заболеваний. Если иммунологическая реактивность организма снижена, то инфекционные заболевания приобретают тенденцию к переходу в хронические формы. В этом наглядно убеждают факты частых и до конца неизлечимых бронхитов, ангин, гайморитов, отитов, простудных заболеваний, кишечных вялотекущих инфекций.

Положение осложняется ещё и тем, что на фоне ослабленной иммунной системы наблюдается рост хронических инфекций, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами, которые приобретают нетипичные биологические свойства и обладают множественной устойчивостью к антибиотикам.

Одновременно с увеличением антибиотикоустойчивости микроорганизмов во всех развитых странах, в том числе в России, наблюдается снижение иммунологической реактивности практически здорового населения.

Все это обуславливает необходимость изучения проблемы побочного влияния базисной терапии на иммунную систему и разработки новых способов и средств иммунокоррекции для устранения вторичной иммунной недостаточности. В связи с этим особую актуальность приобретает создание лекарственных препаратов восстанавливающих функционирование иммунной системы.

## 2. РАЗРАБОТКА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

История создания иммуномодулирующих лекарственных препаратов тесно связана с развитием трансплантологии. В 60-е годы с развитием техники трансплантации органов и тканей актуальность приобрела диаметрально противоположная задача - поиск препаратов, подавляющих иммунологические реакции. Это было необходимо для предотвращения, отторжения трансплантатов. Поиск препаратов, подавляющих отторжение пересаженных органов и тканей оказался впоследствии чрезвычайно полезным для развития методов иммунотерапии.

С целью подбора оптимальных препаратов для трансплантации органов было испытано огромное количество иммунодепрессантов. Это были в основном антиметаболиты пуринового, пиримидинового и белкового синтеза, а также антибиотики, стероиды и т.п. В результате в клиническую практику были внедрены такие препараты как имуран, милеран (бисульфан), аметоптерин, циклоспорин А, циклофосфамид, кортизол и др. Это в основном цитостатики, которые блокируют ключевые этапы биосинтеза нуклеиновых кислот и белков.

Применение иммунодепрессантов дало мощный стимул развития фундаментальной иммунотерапии. Так, например, огромное значение для изучения проблемы иммуномодуляции имели исследования иммунодепрессивных свойств антилимфоцитарных препаратов. Это - препараты, которые подавляют реакции трансплантационного иммунитета, реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Именно с изучением антилимфоцитарных сывороток связано развитие методов и техники культуры иммунокомпетентных клеток *in vitro*, создание моноклональных АТ (МАТ) для идентификации маркерных и рецепторных структур лимфоцитов. С помощью культуры клеток была вскрыта функциональная неоднородность лимфоцитов, их субпопуляционная гетерогенность. Самое главное, был открыт эффект кооперации Т-и В-клеток в продукции антител.

В 60-е годы был разработан метод количественной идентификации отдельных клонов антителообразующих клеток и стволовых клеток-предшественников лимфо-и гемопоэза. Эти открытия и разработки оказали сильное влияние на развитие проблемы иммуномодуляции. Прежде всего, они дали возможность количественно оценивать как влияет тот или иной иммунодепрессант на функциональную активность Т-и В-клеток, на процессы миграции и пролиферации стволовых клеток.

Это позволяло охарактеризовать создаваемые препараты по основным параметрам иммунитета. Но, к сожалению, выяснилось, что большинство изученных препаратов, применяемые в качестве иммунодепрессантов при пересадке органов и тканей (имуран, милеран, метотрексат и др.) являются цитостатиками широкого профиля и блокируют основные этапы биосинтеза нуклеиновых кислот большинства быстро пролиферирующих клеток, в том числе клеток костного мозга, лимфоидной системы, кишечного эпителия. Всё это вместе взятое предъявило новые требования к свойствам вновь создаваемых иммунодепрессантов. Разработка новых подходов к оценке иммуномодулирующей эффективности новых препаратов способствовала созданию новых методов определения состояния иммунной системы и методов контроля: за его изменением при применении иммунодепрессантов. Начиная с 70-х годов, возникло понимание необходимости создания наряду с препаратами иммунодепрессивного типа (для подавления реакций трансплантационного иммунитета) препаратов, стимулирующих реакции иммунитета. Они были необходимы для лечения иммунодефицитов, возникающих при инфекциях, хирургических вмешательствах, при действии на организм неблагоприятных факторов.

Были разработаны принципиально новые подходы к проблеме иммуномодуляции. Новизна заключалась в том, что в соответствии с новой концепцией об иммунотропных препаратах идеальными иммуномодуляторами считаются те, которые содействуют функциональной активности иммунокомпетентных клеток, при этом они либо стимулируют их активность (иммуностимуляция), либо блокируют их функции (иммунодепрессия). Особо подчёркивалось значение принципа специфичности действия иммуномодуляторов и определения точки их приложения.

Новые подходы к проблеме иммуномодуляции основывались на успехах фундаментальной иммунологии. Такие успехи наметились в изучении механизмов регуляции иммунологических реакций. Помимо указанной выше функциональной неоднородности лимфоцитов и их кооперативного взаимодействия к этому времени были изучены мембранные маркеры иммунокомпетентных клеток, которые играют важную роль в клеточных взаимодействиях. Ключевую роль в этих взаимодействиях играют растворимые продукты лимфоцитов - цитокины посредники при межклеточных взаимодействиях и носители межклеточных сигналов.

Таким образом, с одной стороны созрели условия для создания иммуномодуляторов стимулирующего и супрессирующего типов, с другой стороны возникла настоятельная необходимость в таких препаратах.

Ситуацию катализировали и другие причины, среди которых в первую очередь необходимо назвать ухудшение экологической обстановки и возрастание действия неблагоприятных факторов на организм человека. И как следствие, рост иммунозависимых заболеваний, аллергии, аутоиммунных патологий и т.п.

Постепенно пришло понимание того, что патологические состояния часто связаны с нарушением функций иммунной системы и лечение большинства заболеваний во многом зависит от успеха иммунотерапии с применением иммуномодулирующих лекарственных препаратов.

### 3. ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ

К иммуномодуляторам относятся лекарственные препараты химического или биологического происхождения, которые обладают иммулотропным действием. Иммулотропные вещества, способные подавлять или усиливать активность тех или иных групп клеток иммунной системы широко используются в научных исследованиях как инструменты для раскрытия механизмов участия отдельных популяций иммунокомпетентных клеток в иммунном ответе. Наиболее эффективные из этих иммулотропных веществ постоянно внедряются в качестве иммуномодуляторов и в практическую медицину.

Характерным свойством иммуномодуляторов, в отличие от других иммулотропных препаратов, является их способность нормализовать патологически изменённые показатели иммунитета. Иммуномодуляторы обладают способностью повышать сниженные и понижать повышенные показатели иммунитета. Классификация иммулотропных препаратов на иммуностимуляторы и иммунодепрессанты часто носит весьма условный характер. Это объясняется тем, что функциональные компоненты иммунные системы тесно связаны с биохимическими и физиологическими процессами. Это взаимосвязь весьма сложна и изменение активности одного звена приводит к возмущению состояния всей системы.

Для того, чтобы оценить эффективность иммуномодуляторов недостаточно знать, что они усиливают или подавляют активность тех или иных популяций иммунокомпетентных клеток. Известно, что многочисленные субпопуляции Т-и В-клеток, участвующих в иммунном ответе выделяют множество различных цитокинов, которые определяют как направление иммунной реакции, так и уровень иммунного ответа.

Поэтому при коррекции функций клеток иммунной системы с помощью иммуномодуляторов необходимо учитывать внутривнутрипопуляционную

гетерогенность Т- или В-лимфоцитов, в том числе и по продуцируемым ими цитокинам.

Другими словами, для подбора иммуномодуляторов существенным является, как они влияют на активность отдельных субпопуляций внутри группы. Так известно, что регуляторное звено Т-клеток состоит из двух больших субпопуляций. Это-Т-хелперы, которые усиливают иммунный ответ и Т-супрессоры, которые напротив, подавляют его.

Но оказалось, что Т-хелперы и Т-супрессоры сами по себе тоже неоднородны и состоят из субпопуляций. Существуют две альтернативные субпопуляции Т- хелперов, отличающихся по набору выделяемых ими цитокинов. От набора этих цитокинов зависит, какой из типов иммунного ответа - клеточный или гуморальный - будет реализован в данном конкретном случае. Эти субпопуляции были обозначены как Тх1 и Тх2 .Тх1 продуцируют цитокины, способствующие развитию клеточного ответа иммунной системы, это их основная функция. Тх2 называют хелперами антителообразования, они своими цитокинами лоббируют гуморальный ответ.

Биологический смысл существования этих субпопуляций Т-хелперов заключается в том, что они, обеспечивают некоторую конкуренцию между клеточным и гуморальным механизмами иммунного ответа, что обеспечивает эффективность иммунного ответа.

#### 4.КЛАССИФИКАЦИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ

Иммуномодуляторы делятся на две большие группы: экзогенные и эндогенные. К первым относятся чужеродные для организма вещества, которые способны воздействовать на различные звенья иммунной системы, усиливая или подавляя иммунный ответ. Их получают из природного сырья или синтезируют химическим путём.

Примерами экзогенных иммуномодуляторов являются тканевые лизаты, пурины и пиримидины, различные компоненты микобактерий, липополисахариды бактерий, некоторые антибиотики и другие вещества, образующиеся в процессе жизнедеятельности микроорганизмов. Так например, липополисахаридный комплекс (продиогиозан), выделенный из *Bact prodigiosum* оказывает неспецифическое стимулирующее действие, активирует систему гипофиз - кора надпочечников. В результате повышается уровень фагоцитарной активности макрофагов, увеличивается содержание  $\gamma$ -глобулинов и лейкоцитов в сыворотке крови. Давно применяемый препарат пирогенал - липополисахарид, образующийся в процессе жизнедеятельности *Pseudomonas aeruginosa*, способствует повышению температуры тела, вызывает лейкопению, способствует увеличению проницаемости тканей для

химиотерапевтических средств. Эти экзогенные иммуномодуляторы в основном способствуют неспецифической активации иммунной системы, или её супрессии.

К экзогенным относятся и различные синтетические иммуномодуляторы. Они могут быть получены либо биосинтетическим путем, либо путем химического синтеза.

Биосинтетическим путем получают полудан, который применяется как индуктор интерферонов и представляет собой комплекс полиадениловой и полиуридилловой кислот. Биосинтетическими являются ряд пептидов, их получают в основном биотехнологическими способами.

Ярким примером синтетических иммуномодуляторов, полученных путем химического синтеза является оригинальный отечественный препарат нового поколения полиоксидоний, обладающий широким спектром действия.

Безусловно, адекватными для организма, оказывающими целенаправленное действие на конкретные иммунные механизмы являются эндогенные иммуномодуляторы,

Эндогенные иммуномодуляторы в большинстве своем представляют собой пептиды, *in vivo* вырабатываемые самими иммунокомпетентными клетками - макрофагами, различными популяциями Т – и В – лимфоцитов, клетками тимуса. В многочисленных экспериментах *in vitro* показано, что эти пептиды способны оказывать активирующее или супрессивное действие на отдельные звенья иммунной системы. В условиях целостного организма они способствуют кооперативной работе клеток иммунной системы и координируют функции всей сложной системы иммунитета.

К эндогенным иммуномодуляторам относятся различные цитокины, такие как интерфероны ( $\alpha, \beta, \gamma$ ), интерлейкины, фактор некроза опухоли (ФНО,  $\alpha$  и  $\beta$ ), тимические гормоны, миелопептиды, колониестимулирующие факторы (КСФ) и т.д. Раньше их выделяли из культуральной жидкости после инкубации иммунокомпетентных клеток *in vitro*. В настоящее время для многих цитокинов уже известны их гены, что открывает возможность применения новых методов для создания иммуномодулирующих цитокинов.

## 5. СОЗДАНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЦИТОКИНОВ

Большинство эндогенных иммуномодуляторов получают с помощью новейшей иммунобиотехнологии, с использованием методов генной инженерии. Такие современные иммуномодуляторы широко применяются для лечения инфекционных заболеваний, они применяются в онкологии, при вторичных и первичных иммунодефицитах. Необходимым условием для создания рекомбинантных иммуномодулирующих препаратов цитокинов

является установление первичной структуры цитокина, что дает возможность клонировать его ген и получать препарат биотехнологическим путем.

## 6. БЕТАЛЕЙКИН - ИММУНОМОДУЛЯТОР НА ОСНОВЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА - 1

К числу таких препаратов, созданных в России, принадлежит «Беталейкин» – препарат, полученный на основе клонирования гена ИЛ-1.

Клонирование гена ИЛ-1 показало, что существуют два белка с одинаковой молекулярной массой и практически одинаковой активностью - ИЛ-1а и ИЛ-1в, они отличаются лишь по изоэлектрической точке (5,0 и 7,0 соответственно). По аминокислотной последовательности они совпадают на 20 – 25 %. Имеются различия в структуре промоторов этих генов, что обуславливает значительную разницу в уровне экспрессии генов под влиянием бактериальных ЛПС, для ИЛ-1в она в 50 раз выше.

В цитоплазме продуцентов молекулы ИЛ-1 находятся в виде предшественников с молекулярной массой 30-37 кД, это - незрелые молекулы ИЛ-1, они лишены сигнальной последовательности, которая важна для секреции белка. Условием выхода ИЛ-1 в среду является протеолиз этих молекул – до молекулярной массы 12-20 кД. Экспрессия генов ИЛ-1 наблюдается уже через 1 час после активации, причем ИЛ-1а в максимальном количестве синтезируется уже через несколько часов (около 6 часов), а Ил-1в достигает максимума только через 12-16 часов. Рецепторы ИЛ-1а и ИЛ-1в отличаются по сродству, сродство рецепторов к ИЛ-1в почти на порядок выше, чем к ИЛ-1а.

ИЛ-1 – это цитокин широкого спектра действия, эти свойства ИЛ-1 легли в основу применения рекомбинантного препарата «Беталейкин». Есть предположение, что ИЛ-1в способствует стимуляции антителообразования, а ИЛ-1а возможно участвует в ограничении синтеза антител. Рассмотрим вкратце перечень биологических эффектов ИЛ-1, которые можно условно разделить на иммунологические, провоспалительные, кроветворные, межсистемные.

Известно, что ИЛ-1 вовлекает Т хелперы к иммунному ответу, которые начинают продуцировать ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5; способствует пролиферации активированных В-лимфоцитов и их дифференциации в антителообразующие клетки (АОК) – в этом большую роль играет ИЛ-1в.

Являясь провоспалительным цитокином, ИЛ-1 способствует активации клеток в очаге воспаления, повышает адгезивность сосудов для клеток крови, является для некоторых клеток хемоаттрактантом и под его действием повышается подвижность нейтрофилов.



ИЛ-1 стимулирует ранние этапы гемопоэза, направляя процесс кроветворения в сторону миелопоэза, способствует дифференциации стволовых клеток в моноциты, гранулоциты и др.

ИЛ-1 участвует в обмене сигналами между иммунной и нервной, а также эндокринной системами. Это связано с тем, что он синтезируется и клетками глии, которые окружают нейроны – функциональные единицы нервного волокна. (Само нервное волокно окружено миелиновыми оболочками). ИЛ-1 секретируется также клетками сосудистого эндотелия.

Рецепторы ИЛ-1 обнаружены и в клетках мозга. ИЛ-1 участвует в регуляции сна, влияет на выработку гормонов гипофиза. Это означает, что ИЛ-1 оказывает множество биологических эффектов, играет ключевую роль в развитии воспаления, участвует в регуляции гемопоэза, является медиатором взаимодействия иммунной и нервной систем.

Применение «Беталейкина», прежде всего, связано с его способностью стимулировать костно-мозговое кроветворение. С этой целью он применяется у онкологических больных для восстановления лейкопоэза, подавленного вследствие применения химио- и радиотерапевтических методов лечения пациентов.

Механизм гемостимулирующего эффекта препарата заключается в следующем. ИЛ-1 индуцирует выработку эндогенных колониестимулирующих факторов, которые способствуют пролиферации и дифференцировке различных ростков кроветворения из стволовых клеток. Преимуществом ИЛ-1 является то, что его действие охватывает широкий круг клеток предшественников. Поэтому он восстанавливает нормальное кроветворение. Применение ИЛ-1 приводит к возрастанию не только гранулоцитов, но и тромбоцитов и лимфоцитов. Быстрое увеличение числа зрелых тромбоцитов позволяет избегать геморрагических осложнений при химиотерапии. Кроме того, ИЛ-1 обладает способностью не только увеличивать количество лейкоцитов, он усиливает и их функциональную активность: активизируется хемотаксис и фагоцитоз нейтрофилов, и т.д.

Поскольку главное биологическое действие ИЛ-1, вырабатываемого клетками иммунной системы в организме здоровых лиц, это - борьба с внедряющимися инфекционными агентами, это свойство его может быть реализовано при применении «Беталейкина» в клинической практике для лечения вирусных и бактериальных инфекций. «Беталейкин» успешно применяется для лечения больных с острыми и хроническими абсцессами путем местного введения, например, при плеврите. Местное применение не вызывает побочных системных эффектов.

Иммуностимулирующее действие «Беталейкина» делает его пригодным также для коррекции иммунодефицитных состояний, вызванных тяжелыми травмами, гнойно-септическими процессами после обширных хирургических вмешательств, хроническими септическими состояниями. Необходимо отметить, что ограничивающим фактором применения препарата является его дороговизна, что характерно для большинства препаратов, получаемых иммунобиотехнологическими способами.

## 7. ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ НА ОСНОВЕ ИНТЕРФЕРОНОВ

Существует особый класс цитокинов, которые обладают ярко выраженной противовирусной и противоопухолевой активностью. Это – интерфероны (ИФН). В настоящее время уже известны гены, ответственные за синтез интерферона, и различные типы ИФН человека получают в форме рекомбинантных препаратов, путем введения в генетический аппарат бактерий гена интерферона человека. В клинической практике они часто применяются как противовирусные препараты. В настоящее время различные типы ИФН человека привлекают внимание клиницистов и как препараты, обладающие иммунорегулирующим действием. Такими свойствами обладают виферон (ИФН $\alpha$  2в), роферон (ИФН $\alpha$  2а).

Впервые ИФН описан в 1957 г. Его обнаружили в аллантоидной жидкости эмбрионов кур, обработанных инактивированным вирусом. Его биологическая активность выражалась в том, что он вызывал устойчивость эмбрионов к действию вирусов. Устойчивость появляется не только к индуктору, то есть к тому вирусу, который предварительно обрабатывали эмбрионы при получении ИФН, но к иным вирусам. В 70-х годах выяснилось, что синтез ИФН может быть индуцирован не только вирусами, но и невирусными агентами, такими как бактериальные липополисахариды, различные митогены, полианионы и т.п.

Существуют несколько различных форм ИФН, которые отличаются клеточным происхождением. Согласно международной номенклатуре ИФН классифицируются следующим образом: макрофагальный -  $\alpha$ ИФН, фибробластный -  $\beta$ ИФН, лимфоцитарный или иммунный -  $\gamma$ ИФН.

На первый взгляд, все разновидности ИФН обладают аналогичным спектром биологического действия. Все ИФН функционируют по классической схеме. На большинстве клеток организма, в том числе и на иммунокомпетентных клетках, имеются рецепторы к ИФН. Через них ИФН модулируют экспрессию генов клеток-мишеней, что ведет к синтезу различных белков. Эти индуцированные белки могут вызывать различные эффекты: подавлять репликацию вируса, супрессию клеточной пролиферации

или экспрессии отдельных генов, например, онкогенов, изменить дифференциацию иммунокомпетентных клеток.

Тем не менее, имеются ряд особенностей интерферонов в зависимости от их происхождения. Так  $\alpha$  и  $\beta$ -интерфероны (макрофагальные и фибробластные) образуются как и ИЛ-1, ФНО $\alpha$ , ИЛ-6 в ответ на действие бактериальных продуктов и вирусов на макрофаги и стромальные клетки. Среди эффектов  $\alpha$  и  $\beta$ -ИФН преобладающими являются противовирусное и противоопухолевое действия, кроме того, они участвуют также в развитии воспаления. Механизм противовирусного действия интерферонов  $\alpha$  и  $\beta$  заключается в следующем. Они активируют фермент олигонуклеотидсинтетазу, которая катализирует образования олигоаденилатов. Поли-А - олигонуклеотиды, в свою очередь, активируют латентную РНКазу, которая оказывает разрушающее действие на вирусную РНК. Олигоаденилаты активируют протеинкиназу-фермент, который фосфорилирует (активирует) белок, ингибирующий трансляцию белков, в том числе вирусных.

У  $\gamma$ -ИФН несколько иной механизм реализации биологической активности. Он в большей степени причастен к регуляции иммунного ответа и гемопоэза и способствует дифференциации Т-эффекторов НК, лоббирует дифференциацию  $T_0$  в направлении  $T_{H1}$ .  $\gamma$ ИФН подавляет секрецию цитокинов  $T_{H2}$  и в этом отношении является антагонистом ИЛ-4, который продуцируется  $T_{H2}$ . Таким образом,  $\gamma$ ИФН оказывает ингибирующее действие на гуморальный иммунитет и стимулирует клеточный иммунный ответ. Его действие на гемопоэз выражается в усилении дифференциации и ингибиции пролиферации.

Соответственно, они могут рассматриваться в качестве активных иммуномодуляторов. Интерфероны, обладая различными биологическими эффектами, являются активными регуляторами клеточного гомеостаза в организме и широко применяются для лечения целого ряда заболеваний, при которых развитие болезни усугубляется снижением иммунного статуса, и, соответственно, недостаточной выработкой интерферона.

## 8. ИНДУКТОРЫ СИНТЕЗА ИНТЕРФЕРОНОВ

Рекомбинантные интерфероны давно используются для усиления иммунологической защиты организма, но их применение как чужеродных белков имеет определенные ограничения из-за возможности развития к ним аллергических реакций. Сейчас получены иммуномодулирующие препараты, которые способны индуцировать синтез собственных ИФН организма.

Одним из индукторов синтеза интерферонов, применяемых в практике, является биосинтетический препарат с коммерческим названием полудан. Полудан представляет собой двуцепочечный полирибонуклеотид, состоящий из комплементарных полирибоадениловой (поли-А-рибо) и полирибоуридиловой (поли-У-рибо) кислот. Его получают смешиванием растворов поли-А и поли-У-рибонуклеотидов в эквимольных соотношениях. Полудан является эффективным индуктором  $\alpha$ -ИНФ и в меньшей степени -  $\beta$  и  $\chi$ -ИНФ. Полудан используется в виде глазных капель и для инъекций под конъюнктиву при вирусных заболеваниях глаз, в том числе аденовирусных и герпетических конъюнктивитах.

Примером синтетического индуктора эндогенного интерферона является амиксин – низкомолекулярное соединение ароматического ряда, относящийся к классу флуоренонов. Амиксин стимулирует образование в организме интерферонов -  $\alpha$ , -  $\beta$ , -  $\chi$ . Основными структурами, продуцирующими интерферон в ответ на введение амиксина являются клетки эпителия кишечника, гепатоциты, Т-лимфоциты, гранулоциты. После приема амиксина внутрь максимум интерферона у человека определяется в следующей последовательности в кишечнике, в печени, в крови через 4-24 ч. В лейкоцитах человека амиксин индуцирует образование интерферона. Амиксин оказывает иммуномодулирующее действие, стимулирует стволовые клетки костного мозга в зависимости от дозы, усиливает антителообразование, повышает соотношение высокоavidные/низкоavidные антител, уменьшает степень иммунодепрессии, восстанавливает соотношение Т-хелперы/Т-супрессоры.

Амиксин корригирует вторичные иммунодефицитные синдромы при острых и хронических рецидивирующих вирусных инфекциях, в том числе вызванных вирусами гепатита, вирусами Herpes simplex типов 1 и 2, Varicella zoster, миксовирусами.

Однако не все так просто и однозначно с применением индукторов интерферонов.

Во-первых, чтобы проводить интерферонотерапию необходимо установить, как обстоит дело в организме больных с уровнем интерферонов, способен ли организм больного сам справиться, то есть синтезировать интерфероны в ответ на вирусную инфекцию и т.п.

Поскольку выработка интерферона индуцируется бактериальной или вирусной инфекциями, то повышенное содержание ИФН является неким диагностическим критерием. И наличие ОРВИ (острая респираторная вирусная инфекция), ПРГ (простой рецидивирующий герпес), УГИП (урогенитальная инфекционная патология) можно выявить по повышению

уровня ИФН в сыворотке крови по сравнению со здоровыми донорами. По этим результатам, казалось бы, можно наметить стратегию иммуномодулирующей терапии. Что оказалось на практике последних лет?

Обследование здоровых доноров показало, что у большинства из них уровень ИФН $\alpha$  и ИФН $\chi$  значительно выше физиологических норм, а у 10% обследованных доноров уровень ИФН выходит за пределы верхней границы нормы.

Эти данные свидетельствуют о том, что оценка ИФН-статуса организма является сегодня недостаточной для объективной оценки неспецифической устойчивости организма к инфекциям. В связи с этим, в настоящее время разрабатываются новые подходы к ИФН-терапии. Новизна заключается в индивидуальном подходе.

ИФН интерферирует во взаимоотношения иммунокомпетентных клеток, например, интерферон может усиливать ответ Т-киллеров на вирусы. ИФН действует на различные популяции клеток иммунной системы, индуцируя у них синтез собственных ИФН. Чтобы действие вводимого индуктора интерферона или ИФН было эффективным, клетки, на которые он действует должны быть чувствительными к нему. Лишь тогда будет реализована эффекторная функция ИФН, если под действием небольшого количества ИФН лейкоциты крови начнут вырабатывать собственные интерфероны. Это означает, что ИФН сам тоже является индуктором. Этот эффект называют феномен прайминга продукции ИФН.

Феномен прайминга продукции ИФН – это способность лейкоцитов периферической крови человека (индивидуально!) к выработке собственного ИФН после обработки их низкими дозами экзогенных ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\chi$ . Это по существу дерепрессия генов синтеза ИФН в результате индуцирующего сигнала ИФН.

Такой подход позволяет дифференцировать пациентов по чувствительности их лейкоцитов к действию ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\chi$ .

Анализ результатов чувствительности клеток крови к праймированной выработке ИФН под действием  $\alpha$ - и  $\chi$ -ИФН показал, что среди здоровых доноров только 50% оказались чувствительными к праймингу клеток ИФН $\alpha$  и ИФН $\chi$ , 30% - только к ИФН $\alpha$ , 10% - только к ИФН $\chi$ , 10% - ни к  $\alpha$  ни к  $\chi$ .

Среди пациентов с простым рецидивирующим герпесом часто выявляется, тенденция – к снижению чувствительности к праймингу ИФН $\alpha$  и к возрастанию чувствительности к праймингу ИФН $\chi$ .

При урогенитальных инфекциях чувствительность к праймингу обоими типами ИФН выше, чем у здоровых. При ОРВИ несколько снижена чувствительность к праймингу ИФН $\chi$ .

Представленные результаты свидетельствуют о том, что простое определение уровня содержания ИФН в сыворотке крови у больных с вирусными инфекциями не является достаточным основанием для назначения адекватной иммунотерапии с применением ИФН.

Только определение в периферической крови *in vitro* индивидуальной чувствительности больных к интерферонам и их индукторам позволяет прогнозировать эффективность иммуномодулирующей терапии и создает научно-обоснованную возможность подбора наиболее эффективного конкретного типа ИФН для каждого пациента.

Иммунная терапия ИФН как и любая иммунотерапия является весьма тонким инструментом и в конкретных ситуациях она может быть опасным для здоровья пациента, т. к. речь идет о вмешательстве в регуляцию функционирования иммунной системы

## 9. ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ДНК

Внимание исследователей к ДНК приковано с момента открытия ее основной функции как универсального генетического кода. Кроме основных функций в последние годы нуклеиновые кислоты исследуются как биологически активные вещества.

Еще в 70-е годы было обнаружено, что препараты ДНК обладают радиопротекторными свойствами. Они способствуют усилению восстановительных процессов в облученных организмах. Было экспериментально показано, что ДНК способна проникать в клетку и активировать процессы репарации клеточной ДНК, поврежденной при облучении. При этом было выявлено, что препараты ДНК проявляют иммуностимулирующие эффекты.

Исследователи неожиданно выяснили, что иммуностимулирующие эффекты проявлялись только при использовании бактериальной ДНК, но не ДНК, выделенной из тканей позвоночных. Бактериальная ДНК, в отличие от ДНК позвоночных обладала способностью индуцировать синтез интерферона, активацию натуральных киллеров и ингибировала рост опухолей. Это было действительно неожиданностью, поскольку свидетельствовало об отсутствии универсальности в действии молекул ДНК различного происхождения. Естественно возникал вопрос о том, какие же отличия бактериальной ДНК от ДНК животных являются определяющими в проявлении иммуностимулирующего свойства препаратов ДНК.

Впоследствии выяснилось, что существенным для иммуномодулирующего свойства ДНК является присутствие в его составе динуклеотидной последовательности CpG. В составе бактериальных геномов динуклеотиды, CpG встречаются частотой 1\16, что равно теоретически

ожидаемой частоте встречаемости. Причем эти динуклетиды присутствуют у бактерий в неметилированной форме.

В геномах позвоночных CpG динуклеотиды встречаются в 4 раза реже, то есть с частотой, составляющей  $1/4$  от ожидаемой случайной частоты. Кроме того, они, в отличие от бактериальной ДНК являются метилированными. Для выяснения вопроса о роли метилированности ДНК для проявления ее иммуностимулирующей активности был проделан следующий эксперимент. Из ткани позвоночных путем ингибирования фермента ДНК-метилтрансферазы, была получена ДНК, не имеющая метилированных групп. Но такая ДНК позвоночных тоже не обладала иммуностимулирующей способностью.

Исследования показали, что для проявления иммуностимулирующей активности препаратов ДНК важно, чтобы CpG последовательности в ДНК находились в специфическом окружении, а именно в контексте 5'-Pu-Pu-CpG-Pu-Pu-3'.

Позднее было установлено присутствие в геноме позвоночных так называемых иммунонейтрализующих последовательностей, которые отменяют иммуностимулирующий эффект ДНК. С использованием синтетических олигонуклеотидов было показано, что иммунонейтрализующими в составе ДНК являются CpG динуклеотиды, которым предшествует цитозин: 5'-CpCpG-3'. или (и) за которыми следует гуанин: 5'-CpCpG-3'.

Одним из самых интересных моментов исследования иммуностимулирующего действия препаратов ДНК является выяснение молекулярных механизмов данного эффекта ДНК. Ясно, что для проявления иммуностимулирующей активности ДНК должна связываться с поверхностью иммунокомпетентных клеток либо интернализироваться клетками.

Полученные в настоящее время данные свидетельствуют о том, что молекулы ДНК эффективно связываются с белками p29 и p68, содержащихся в составе поверхностных рецепторов клеток. Известно, что эти белки присутствуют в составе рецепторов антигенпрезентирующих дендритных клеток, макрофагов и др. Связывание с CpG-ДНК активирует передачу сигналов, сходных с сигналами, возникающими при связывании с клеточной поверхностью липополисахаридов бактерий. Это приводит к активации в клетках иммунной системы генов, ответственных за синтез соответствующих их специализации цитокинов. Так известно, что CpG-ДНК является чрезвычайно мощным стимулом для макрофагов – продуцентов интерлейкина

-12, который лоббирует клеточный тип иммунного ответа, усиливает иммунологическую защиту от внутриклеточных патогенов.

Каковы возможности использования препаратов ДНК для иммунотерапии? Сомнения и опасения возникали в связи с тем, что несбалансированная активация иммунной системы может быть чревата развитием аутоиммунных патологий, типа СКВ, для которой характерна продукция анти-ДНК аутоантител. Исследованиями на мышах, предрасположенных к аутоиммунным заболеваниям показано, что CpG-ДНК не стимулирует заболевание, напротив уменьшает тяжесть его протекания.

Повидимому еще рано считать полностью доказанной безопасностью CpG-ДНК для иммунотерапии, однако весьма привлекательной является противоопухолевая активность препаратов ДНК.

Особого внимания заслуживают исследования иммуностимулирующих свойств ДНК молоки осетровых и лососевых рыб. На основе ДНК из молоки получают препарат натриевой соли ДНК, который получил название деринат. Начиная с 90-х годов проводились клинические испытания, которые подтвердили его радиопротекторную и иммуномодулирующую активность, отсутствие токсичности. С 1999 года деринат разрешен Фармкомитетом к применению в качестве иммуностимулятора. Его применяют при лечении язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, связанной с инфекцией *Helicobacter pylori*. Он рекомендован для лечения урогенитального хламидиоза, его применение способствует сокращению сроков лечения при хирургических сепсисах.

Однако существует определенная настороженность с применением деривата в связи с тем, что он усиливает продукцию провоспалительных цитокинов. При инфекционных процессах, когда без того наблюдается гиперпродукция провоспалительных цитокинов, дополнительная активация их синтеза может привести к нежелательным последствиям, вплоть до септического шока. Тем не менее является бесспорно перспективной разработка усовершенствованных эффективных и безопасных иммуномодулирующих препаратов на основе ДНК.

## ДНК – ВАКЦИНЫ И ПЕРСПЕКТИВА ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

При создании живых поливалентных вирусных вакцин одной из проблем является возможность возникновения побочных эффектов вакцинации. Одним из новейших подходов для преодоления таких препятствий является использование для иммунопрофилактики инфекционных заболеваний так называемых ДНК-вакцин. В 1993 году одновременно несколько групп ученых опубликовали результаты своих работ, которые открывают перспективу



использования гибридных ДНК для вакцинации против многих вирусных заболеваний.

Основной принцип метода заключается в следующем. С помощью методов генетической инженерии в бактериальную плазмиду встраивают ген (или несколько генов) вирусного белка. Гибридную плазмиду размножают, вставив его в бактериальный геном. Затем гибридную плазмиду, т. е. по существу гибридную плазмидную ДНК выделяют и вводят ее как вакцину в организм млекопитающих. Показано, что при разных способах введения (внутрикожно, внутримышечно, внутривенно) гибридная плазида может проникать в клетки млекопитающих и достаточно долго сохраняться в организме. Вирусный белок, кодируемый гибридной плазмидой, продуцируется в клетках, имитируя процесс биосинтеза соответствующего белка при вирусной инфекции. Это приводит к образованию в организме защитных антител к вирусу, т. е. к формированию сбалансированного иммунного ответа против данного вируса. На лабораторных животных (мыши, цыплята) доказано, что такая вакцинация препаратами гибридных плазмид обеспечивала эффективную иммунную защиту от вирусов гриппа, гепатита В, гепатита С и др

Безусловно потребуется еще некоторое время, прежде чем можно будет определенно сказать, применима ли ДНК- вакцинация для человека. Во всяком случае уже сейчас ясно, что в последнее десятилетие генетическая инженерия внесла огромный вклад в развитие новых подходов к иммунопрофилактике инфекционных заболеваний. Имеются все основания ожидать, что последующие исследования позволят получать все более надежные и безопасные варианты ДНК- вакцин.