

# Индукция интерферонов 1-, 2- и 3-го типов солями акридонуксусной кислоты

С. С. ГРИГОРЯН<sup>1</sup>, А. Ю. ПЕТРОВ<sup>2</sup>, Е. И. ИСАЕВА<sup>1</sup>, М. А. МУЗЫКИН<sup>2</sup>, А. Л. КОВАЛЕНКО<sup>3</sup>, М. Г. РОМАНЦОВ<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup> ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург

<sup>3</sup> ФМБА ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

<sup>4</sup> ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова», Санкт-Петербург

## Induction of Type 1, 2 and 3 Interferons by Acridone Acetates

S. S. GRIGORYAN, A. YU. PETROV, E. I. ISAEVA, M. A. MUZYKIN, A. L. KOVALENKO, M. G. ROMANTSOV

N. F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

POLYSAN Co., St. Petersburg

Institute of Toxicology of Federal Medico-Biological Agency, St. Petersburg

I. I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg

В статье показан профиль индукции эндогенных интерферонов трёх типов под действием меглуминовой и натриевой солей акридонуксусной кислоты, отмечены особенности в кинетике аккумуляции и продолжительности циркуляции разных типов интерферонов в крови экспериментальных животных. Меглуминовая соль акридонуксусной кислоты обеспечивает сбалансированную индукцию, продукцию и циркуляцию в крови интерферонов трёх типов, в сравнении с натриевой солью в тех же условиях. Установлена оптимальная доза меглуминовой соли акридонуксусной кислоты (2,0–3,5 мг/мышь) с эффективной, последовательной, перекрывающей индукцией—продукцией интерферонов трёх типов, обеспечивая пролонгированную циркуляцию в крови интерферонов в течение 72 часов после однократного введения.

**Ключевые слова:** акридонуксусная кислота, интерферон-альфа, -гамма и -лямбда, меглуминовая соль акридонуксусной кислоты (циклоферон).

The induction profile of endogenous interferons of three types under the action of meglumine acridone acetate and sodium acridone acetate, as well as the characteristics of the kinetics of their accumulation and circulation in the blood of experimental animals are described. Meglumine acridone acetate provided balance in induction, production and circulation of the interferons in the blood vs. sodium acridone acetate under the same conditions. The optimal dose of meglumine acridone acetate (2.0–3.5 mg/mouse) with effective, consecutive and overlapping induction-production of the interferons ensured their prolonged (for 72 hours) circulation in the blood after a single administration.

**Key words:** acridone acetic acid, interferons (alpha, gamma and lambda), meglumine acridone acetate (cycloferon).

## Введение

Акридонуксусная кислота (АУК) [C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>] впервые описана как противовирусное средство в 1972 году. Изучены натриевая, аммониевая, калиевая, магниевая, метилглюкаминовая и кальциевая соли. Привлекательным свойством для использования в медицинских целях является её активность в отношении как РНК-, так и ДНК-содержащих вирусов, обусловленная индукцией эндогенного интерферона. Мощные внутри- и межмолекулярные водородные связи между гидроксильными группами и вторичным азотом обеспечивают её высокую солюбилизующую активность и растворимость в органических растворителях, позволяя использовать для создания

новых растворимых лекарственных форм или для стабилизации физико-химических свойств лекарственных препаратов [1].

Семейство интерферонов (ИФН) — ключевой компонент естественного и адаптивного иммунитета, обеспечивающий первую линию защиты организма от различных инфекционных агентов [2]. В настоящее время идентифицированы три типа ИФН: ИФН 1-го типа, включающий ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\beta$ , продуцируемые ядродержащими клетками, оказывает прямое противовирусное действие на репликацию вирусов в инфицированных клетках, предупреждает инфицирование окружающих и, активируя каскад антивирусных сигнальных путей, включает естественный иммунитет, способствуя развитию адаптивных иммунных ответов [3, 4]. ИФН 2-го типа — ИФН- $\gamma$ , который продуцируется различными субпопуляциями Т-лимфоцитов и естественных киллеров (НК),

© Коллектив авторов, 2014

Адрес для корреспонденции:  
123098 ул. Гамалеи 18. НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи

регулируя гомеостаз, обеспечивает функциональную эффективность специфического адаптивного иммунитета [5]. Недавно открытый 3-й тип ИФН, представленный ИФН- $\lambda$ 1, ИФН- $\lambda$ 2, ИФН- $\lambda$ 3 (известных также как интерлейкины IL-29, IL-28A и IL-28B), функционально тесно связан с ИФН 1-го типа, экспрессия рецепторов которых определяется на узком спектре клеток, ограничивая ответ на ИФН 3-го типа [6]. Мишенью ИФН- $\lambda$  являются, прежде всего, эпителиальные клетки верхних дыхательных путей, лёгких, желудочно-кишечного тракта, половых органов и кожи, а также гепатоциты и особенно плазмоцитарные дендритные клетки [7–9]. Являясь, также как и ИФН 1-го типа, медиаторами противовирусных эффектов, ИФН 3-го типа обеспечивают дополнительную защиту входных ворот инфекции, но не обладают характерными для ИФН 1-го типа побочными эффектами [10]. Все три типа ИФН выполняют роль первой линии защиты организма не только при вирусных, но и при бактериальных и паразитарных заболеваниях [11, 12]. Важно отметить, что ИФН продуцируются не только при различной инфекционной патологии или под действием микробов-комменсалов, но также и под действием ряда высоко- и низкомолекулярных соединений — индукторов ИФН [3, 13].

В целях оптимизации клинического применения индукторов ИФН представлялось целесообразным впервые в рамках доклинического изучения солей акридонуксусной кислоты изучить не только возможность индукции различных типов ИФН, но и последовательность индукции, продукции, аккумуляции, а также продолжительность циркуляции в крови экспериментальных животных каждого из трёх типов ИФН; помимо этого — установить зависимость динамики их индукции и продукции от дозы каждого из исследуемых соединений.

## Материал и методы

**Соли акридонуксусной кислоты.** В исследовании использовали меглуминовую (меглумина акридонуксусная соль) и натриевую соли акридонуксусной кислоты в возрастающих концентрациях, а также плацебо в виде инертного вещества и дистиллированной воды. Перед применением соли растворяли в стерильной дистиллированной воде до дозы, необходимой для введения экспериментальным животным. Соли вводили мышам однократно, перорально (внутрижелудочно) с помощью специального дозированного зонда в дозах 0,5, 1, 2, 3,5, 5,0 и 7,0 мг/мышь в объёме 50 мкл.

**Животные.** Исследования проводились на 30 линейных мышках СВА, самках, массой 18–20 г, полученных из питомника «Андреевка» ФГБУ «НЦБМТ» РАМН. Животные подвергались 5-дневному карантину. Подбор животных в группы осуществляли методом случайной выборки. На каждый срок исследования использовали по 5 мышей СВА.

Содержание, питание и уход за животными в ходе эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н). Этические принципы обращения с лабораторными животными соблюдались в соответствии с «European

Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS No. 123».

Забор крови у животных обеих групп проводили методом декапитации в стерильных условиях, через 2, 6, 12, 24, 48 и 72 ч после введения солей акридонуксусной кислоты. Образцы крови, полученные в каждый срок исследования, состояли из пула (смеси) крови от 5 мышей в объёме 5 мл (по 1 мл от каждой особи), из которого после центрифугирования в режиме 5000 об/мин — 15 мин отбирали надосадочную сыворотку в объёме 1,5 мл в стерильные пробирки — эпипиндорфы. Сыворотки крови мышей, соответствующие каждому сроку забора, разделяли на аликвоты по 0,5 мл в три стерильные пробирки (эппиндорфы), которые хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до проведения соответствующего иммуноферментного анализа.

**Метод иммуноферментного анализа.** Количественное содержание в сыворотке крови мышей ИФН 1-го типа — ИФН альфа (ИФН- $\alpha$ ), 2-го типа — ИФН- $\gamma$  и 3-го типа ИФН- $\lambda$  определяли методом ИФА с использованием следующих тест-систем производства R&D Systems (США): набора Mouse IFN-alpha ELISA kit, 42 120-1, набора Mouse IFN-lambda 2/3 (IL — 28 A/B) DuoSet ELISA development kit, DY 1789B, набора Mouse IFN-gamma DuoSet ELISA kit, DY 485.

Расчёт оптической плотности исследуемых проб проводили на спектрофотометре — ридере Anthos Labtec с использованием вошера и шейкера (Instruments GmbH, Австрия) с последующей обработкой и преобразованием данных оптической плотности в пикограммы в 1 мл (пкг/мл) по компьютерной программе Software ADAP. Все исследования проводили в двух повторностях.

**Статистическая обработка.** Результаты подвергались статистической обработке путём расчёта среднего арифметического ( $M$ ), стандартной ошибки среднего ( $\pm m$ ). Оценка статистической значимости различий при межгрупповых сравнениях производилась методом  $v$ ANOVA (дисперсионный однофакторный анализ с повторными измерениями).

## Результаты и обсуждение

**Динамика индукции и продукции ИФН- $\alpha$  (1-го типа) при пероральном введении меглуминовой и натриевой солей акридонуксусной кислоты.** Однократное пероральное введение меглуминовой соли акридонуксусной кислоты (МГАУК) в возрастающих дозах от 0,5 (25 мг/кг) до 3,5 мг/мышь (70 мг/кг) вызывало дозозависимую индукцию продукции ИФН- $\alpha$  в сыворотке крови экспериментальных животных, количественное содержание которого в дозах 0,5 мг/мышь и 1,0 мг/мышь составляло  $208 \pm 7,0$  пкг/мл и  $155 \pm 9,0$  пкг/мл соответственно и определялось только через 24 ч после введения (рис. 1, а).

Увеличение дозы МГАУК до 2,0–3,5 мг/мышь сокращало как сроки инициации индукции ИФН- $\alpha$ , так и достижения максимальной его аккумуляции в крови. Индукция продукции ИФН- $\alpha$  в указанных дозах определялась в сыворотке крови животных уже через 2 ч после введения препарата, пик содержания которого в концентрации  $293 \pm 33$  пкг/мл при дозе 2,0 мг/мышь достигался через 12 ч после его введения, а при дозе 3,5 мг/мышь — в концентрации  $416,5 \pm 9,5$  пкг/мл — через 6 ч. Однако дальнейшее увеличение дозы МГАУК до 5,0 и 7,0 мг/мышь не только не повышало содержание ИФН- $\alpha$  в крови, но и вызывало эффект его полного отсутствия во все сроки исследований (см. рис. 1, а).

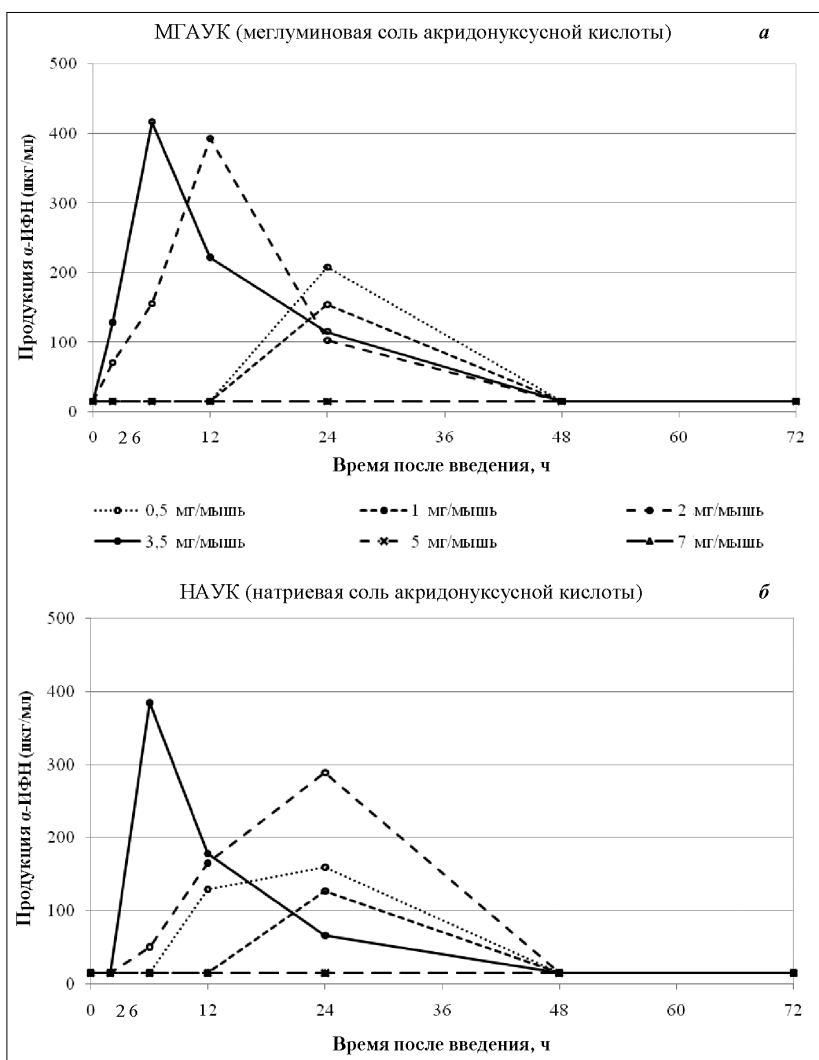


Рис. 1. Динамика продукции ИФН- $\alpha$  (1-го типа)

Сопоставимая динамика индукции и накопления ИФН- $\alpha$  в крови определялись под действием натриевой соли акридонуксусной кислоты (НАУК) (рис. 1, б) При низких дозах НАУК (0,5–1,0 мг/мышь) максимальные количества ИФН- $\alpha$  в крови мышей составляли  $159,5 \pm 6,5$  —  $127,0 \pm 3,0$  пкг/мл, которые достигались через 24 ч после его введения. Увеличение дозы НАУК до 2,0 мг/мышь повышало содержание ИФН- $\alpha$  в крови в этот же срок после введения до  $289 \pm 50,5$  пкг/мл, а в дозе 3,5 мг/мышь вызывало не только стимуляцию, но и сдвиг пика его максимальной продукции в концентрации  $385,5 \pm 60,5$  пкг/мл к 6 ч. Однако при последующем увеличении перорально вводимой НАУК до 5,0 и 7,0 мг/мышь, также как и при использовании МГАУК в таких же дозах, ИФН- $\alpha$  в сыворотке крови мышей не тестировался (рис. 1, б).

**Динамика индукции и продукции ИФН- $\gamma$  (2-го типа) при пероральном введении меглуминовой и натриевой солей акридонуксусной кислоты.** Независимо от дозы МГАУК, ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови мышей определялся через 24 ч, с тенденцией

увеличения его содержания через 48 ч и некоторого снижения к 72 ч после введения. Однако в дозе 3,5 мг/мышь отмечался сдвиг начала индукции ИФН- $\gamma$  и его появление в крови экспериментальных животных через 12 ч после введения МГАУК. Выраженный дозозависимый характер индукции ИФН- $\gamma$  определялся на пике динамики его продукции — через 48 ч после введения МГАУК, когда с увеличением его дозы от 0,5 до 7,0 мг/мышь содержание ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови мышей последовательно повышалось от  $486,5 \pm 6,5$  пкг/мл до  $776,5 \pm 16,5$  пкг/мл соответственно. Закономерность продукции ИФН- $\gamma$  на достаточном уровне его содержания — от  $185 \pm 15$  пкг/мл до  $235 \pm 55$  пкг/мл сохранялась и через 72 ч после введения возрастающих доз МГАУК (рис. 2, а). В целом, индукция ИФН- $\gamma$  в крови экспериментальных животных под действием МГАУК, хотя и начинала определяться только через 24 ч после его однократного перорального введения, носила пролонгированный характер в течение 3 суток включительно (срок наблюдения). Динамика индукции и продукции ИФН- $\gamma$  под действием НАУК имела сопоставимый с введением МГАУК дозозависимый характер (см. рис. 2, б).

Начало индукции ИФН- $\gamma$  в крови мышей, независимо от дозы введённого НАУК, определялось через 24 ч, с нарастанием его количественного содержания через 48 ч (пик продукции) и снижением через 72 ч после введения. Однако при использовании НАУК в дозе 2,0 мг/мышь и особенно в высокой дозе 7,0 мг/мышь наблюдалось сокращение срока инициации индукции ИФН- $\gamma$  и его появление в крови через 12 ч после введения (см. рис. 2, б).

**Динамика индукции и продукции ИФН- $\lambda 2$  и ИФН- $\lambda 3$  (3-го типа) при пероральном введении меглуминовой и натриевой солей акридонуксусной кислоты.** Индукция и продукция ИФН- $\lambda 2$  и ИФН- $\lambda 3$  под действием МГАУК имела также прямую зависимость от дозы его однократного введения (рис. 3, а). Причём в дозах 0,5–1,0 мг/мышь МГАУК вызывал индукцию ИФН- $\lambda 2$  и ИФН- $\lambda 3$  в крови мышей через 12 и 24 ч после введения, составляя  $297,5 \pm 12,5$  пкг/мл —  $314,5 \pm 6,5$  пкг/мл и  $405 \pm 4,5$  пкг/мл —  $569 \pm 45$  пкг/мл соответственно. В дозах же от 2,0 до 7,0 мг/мышь МГАУК опосредовал не только последовательное

увеличение продукции ИФН- $\lambda 2/\lambda 3$  через 12 ч и особенно через 24 ч после введения, но и пролонгированную его циркуляцию в крови до 48 ч включительно, достигая от  $234 \pm 19$  до  $580 \pm 13$  пкг/мл. Однако независимо от использованной дозы, индукция продукции ИФН- $\lambda 2/\lambda 3$  всегда тестировалась не ранее, чем через 12 ч после введения МГАУК, а пик его аккумуляции в сыворотке крови мышей — через 24 ч (см. рис. 3, а).

Несколько иная тенденция индукции — продукции ИФН- $\lambda 2/\lambda 3$  выявлялась под действием НАУК. В дозах 0,5 мг/мышь и 5,0 мг/мышь ИФН- $\lambda 2/\lambda 3$  в сыворотке крови мышей определялся через 12 и 24 ч после введения сопоставимых количеств (от  $361,5 \pm 5,5$  пкг/мл до  $630 \pm 17$  пкг/мл и от  $315,5 \pm 3,5$  пкг/мл до  $438,5 \pm 17,5$  пкг/мл соответственно) (рис. 3, б).

Дозозависимый характер индукции ИФН- $\lambda 2$  и ИФН- $\lambda 3$  более выражен через 24 ч после введения. Пролонгированная же до 48 ч после введения включительно индукция и продукция ИФН в сыворотке крови экспериментальных животных в количестве  $443,5 \pm 12,5$  пкг/мл тестировалась только при использовании НАУК в высокой дозе — 7,0 мкг/мышь (см. рис. 3, б).

**Сравнительная характеристика индукции и продукции ИФН 1-го, 2-го и 3-го типов солями акридонуксусной кислоты.** Суммарные результаты исследований индукции — продукции ИФН- $\alpha$ , - $\gamma$  и - $\lambda 2/\lambda 3$  (1-й, 2-й и 3-й типы соответственно) и её зависимости от дозы свидетельствуют о прямом дозозависимом характере индукции и аккумуляции в крови экспериментальных животных всех трёх типов ИФН при использовании МГАУК в дозах 0,5—3,5 мг/мышь. Оптимальными дозами МГАУК, обеспечивающими эффективную индукцию ИФН 1-го, 2-го и 3-го типов, были 2,0—3,5 мг/мышь. Индукция ИФН- $\alpha$  при введении МГАУК в этих дозах начиналась уже через 2 ч после введения ( $71 \pm 6,0$  —  $128,5 \pm 13,5$  пкг/мл), достигая пика максимальных значений через 6—12 ч ( $416,5 \pm 9,5$  —  $393 \pm 33,0$  пкг/мл) и снижаясь к 24 ч после введения до  $115 \pm 5,0$  —  $103 \pm 13$  пкг/мл соответственно. Индукция ИФН- $\lambda 2/\lambda 3$  (3-го типа) определялась через 12 ч после введения МГАУК в концентрации  $389,5 \pm 2,5$  пкг/мл и  $593 \pm 28$  пкг/мл при дозе 2,0 и 3,5 мг/мышь соответственно, увеличиваясь в дозе 2,0 мг/мышь до  $443 \pm 8,0$  пкг/мл к 24 ч с некото-

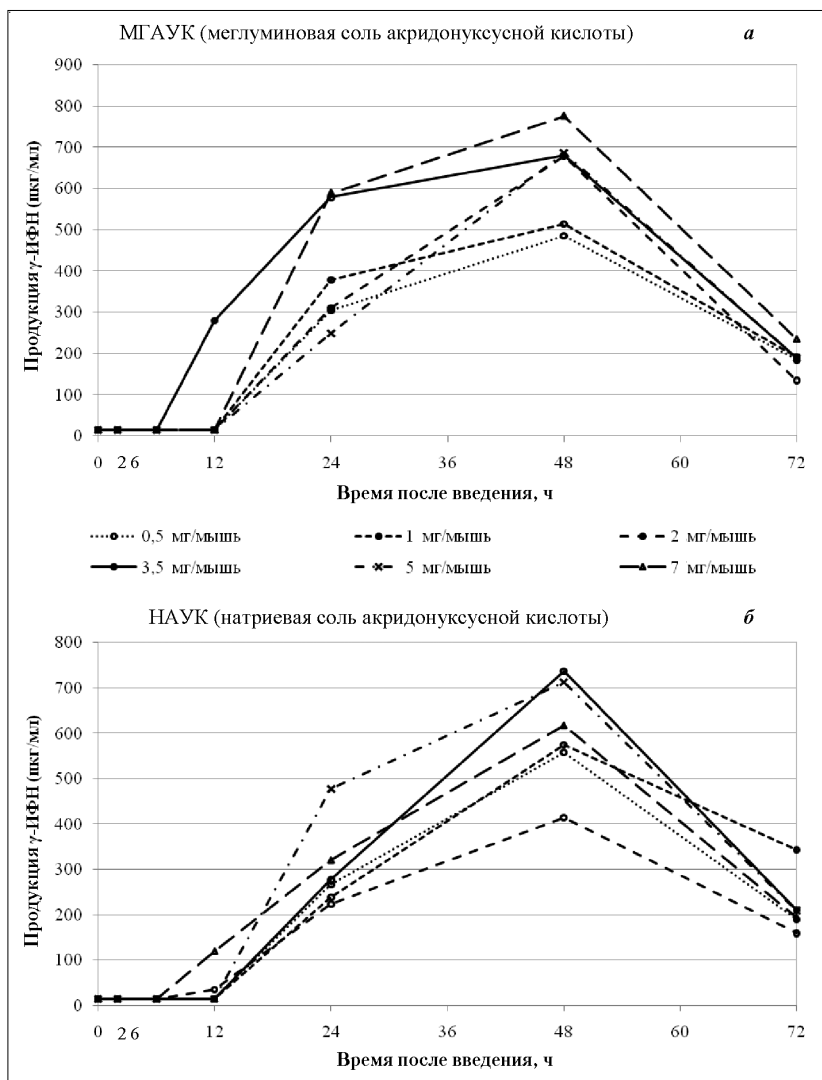


Рис. 2. Динамика продукции ИФН- $\gamma$  (2-го типа)

рым снижением до  $234 \pm 19$  пкг/мл к 48 ч после введения или сохраняясь на достигнутом уровне при дозе 3,5 мг/мышь через 24 и 48 ч после введения ( $583 \pm 16$  пкг/мл и  $475,6 \pm 37,5$  пкг/мл соответственно).

Индукция и продукция ИФН- $\gamma$  (2-го типа) в дозе 2,0 мг/мышь начинала выявляться в сыворотке крови мышей через 24 ч после введения МГАУК в концентрации  $311 \pm 1,0$  пкг/мл, достигала максимума через 48 ч ( $678 \pm 6,4$  пкг/мл), снижаясь до  $135 \pm 15$  пкг/мл к 72 ч после его введения. Использование МГАУК в дозе 3,5 мг/мышь сокращало срок индукции ИФН- $\gamma$ , который начинал определяться в крови мышей уже через 12 ч после его введения в количестве  $280 \pm 80$  пкг/мл, нарастая и сохраняясь на уровне  $580 \pm 10,0$  пкг/мл и  $681,5 \pm 31,5$  пкг/мл через 24 ч и 48 ч после введения, с тенденцией снижения к 72 ч до  $190 \pm 30$  пкг/мл.

Таким образом, МГАУК в дозах 2,0 и 3,5 мг/мышь обеспечивала эффективное раннее начало

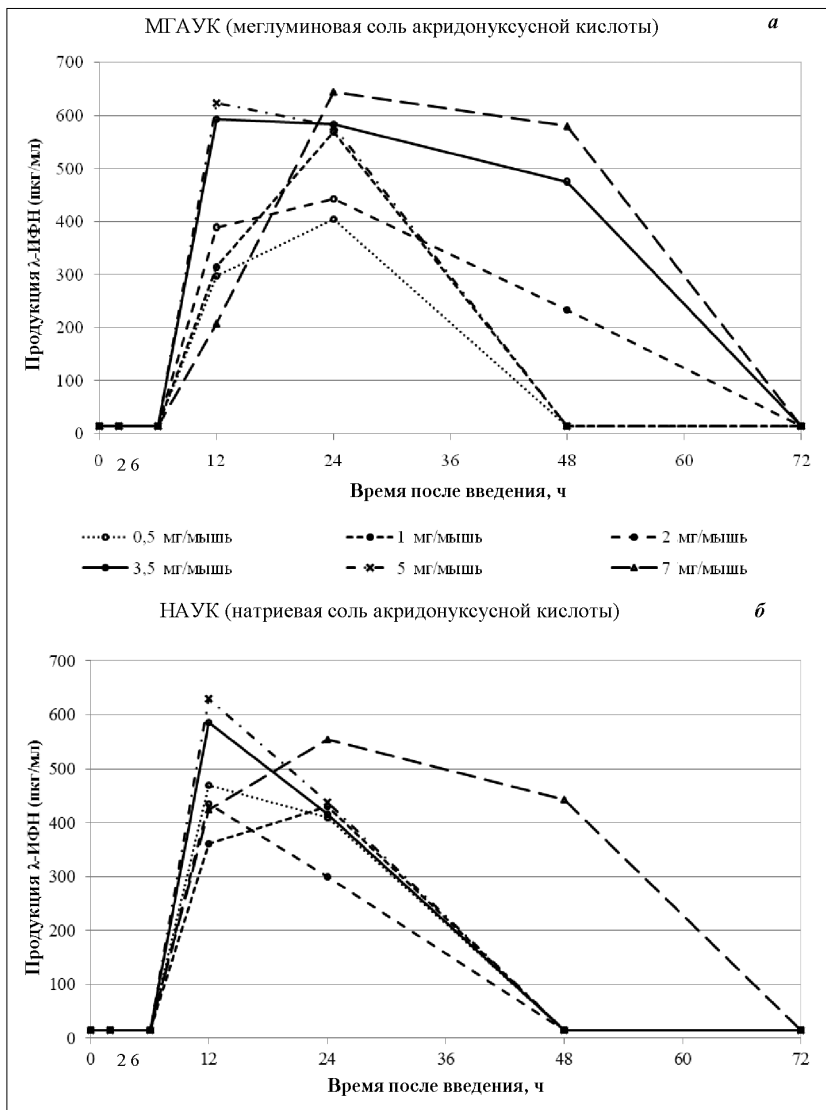


Рис. 3. Динамика продукции ИФН-λ2/λ3 (3-го типа).

индукции—продукции сывороточного ИФН в виде ИФН 1-го типа с последующим присоединением индукции—продукции ИФН 3-го типа через 12 ч после введения и ИФН 2-го типа через 24 ч или даже через 12 ч после введения. Такая характерная для цитокинов последовательная и перекрывающаяся индукция—продукция ИФН различных типов обеспечивала пролонгированную циркуляцию в крови ИФН 1-го, 2-го и 3-го типов в течение 72 ч после однократного перорального введения МГАУК в дозах 2,0—3,5 мг/мышь (рис. 4, а).

Совокупность результатов по индукции ИФН-α, -γ, -λ2 и -λ3 возрастающими дозами НАУК показала, что в диапазоне низких доз (0,5—1,0 мг/мышь) инициация индукции ИФН-α (1-го тип) в сыворотке крови определяется через 12 ч после его введения, а через 24 ч в дозах от 0,5 до 2,0 мг/мышь прослеживается дозозависимый характер индукции ИФН-α, количественное содержание которого в этот срок колеблется от 159±6,5 до

289,5±50,5 пкг/мл соответственно. Но динамика индукции—продукции сывороточного ИФН-α под действием НАУК в дозах 2,0 и 3,5 мг/мышь различаются. В дозе 2,0 мг/мышь происходит сдвиг начала индукции ИФН-α к 6 ч в виде незначительной продукции ИФН-α в количестве 50,5±1,5 пкг/мл, а максимальный уровень его продукции определяется через 24 ч после введения НАУК. Увеличение же дозы НАУК до 3,5 мг/мышь вызывает не только смещение инициации индукции ИФН-α, но и пика его продукции к 6 ч, который достигает 385±60,5 пкг/мл.

Однако, несмотря на указанные отличия, наиболее эффективными дозами НАУК, обеспечивающими оптимальную индукцию и аккумуляцию ИФН-α в крови экспериментальных животных, являлись 2,0 и 3,5 мг/мышь, при которых инициация индукции ИФН-α под действием НАУК определялась через 6 часов после его введения, причём в дозе 2,0 мг/мышь наблюдалось постепенное увеличение количества ИФН-α в крови через 12 и 24 ч до 166±9,0 и 289,5±50,5 пкг/мл соответственно, а в дозе 3,5 мг/мышь изначально синтезированный и аккумулированный в крови через 6 ч после введения высокий уровень ИФН-α в количестве 385±60,5 пкг/мл через 12 и 24 ч постепенно снижался и составлял 178±10,0 и 66±4,0

пкг/мл соответственно. Индукция ИФН-λ2 и -λ3 (3-го типа) в дозах 2,0 и 3,5 мг/мышь под действием НАУК, оптимальных для индукции ИФН-α, определялась в количестве 435±3,0 и 585,5±39,5 пкг/мл соответственно через 12 ч и 315±3,5—425,5±9,5 пкг/мл через 24 ч после введения. Более продолжительная индукция и аккумуляция ИФН-λ2 и -λ3 до 48 ч включительно в количестве 443,5±12,5 пкг/мл отмечалась только в высокой дозе — 7,0 мг/мышь, что сопоставимо с содержанием ИФН-λ2 и -λ3 в крови мышей при использовании в 2 раза меньшей дозы МГАУК — 3,5 мг/мышь.

Таким образом, дозозависимый характер индукции ИФН-λ2 и -λ3 под действием НАУК определялся только через 12 ч после его введения в возрастающих дозах от 0,5 до 7,0 мг/мышь.

Динамика индукции—продукции ИФН-γ (2-го типа) под действием возрастающих доз НАУК

была аналогична таковой МГАУК. Как правило, независимо от использованной дозы продукция сывороточного ИФН- $\gamma$  в пределах  $225 \pm 35$  —  $478 \pm 1,5$  пкг/мл начиналась через 24 ч после введения НАУК и продолжалась до 72 ч включительно. Пик максимального содержания ИФН- $\gamma$  в крови мышей на уровне от  $558 \pm 2,0$  до  $738 \pm 1,5$  пкг/мл определялся через 48 ч после введения НАУК. В дозе 7,0 мг/мышь, однако, наблюдался сдвиг инициации индукции ИФН- $\gamma$  к 12 ч после его введения, подобно тому, как это происходило под действием МГАУК в 2 раза меньшей дозе — 3,5 мг/мышь.

Таким образом, в дозах 2,0—3,5 мг/мышь НАУК обеспечивал оптимальную индукцию ИФН 1-го и 2-го типов, которая начиналась через 6 часов и продолжалась до 24 часов после его введения включительно в виде продукции ИФН- $\alpha$  и перекрывалась началом индукции и пролонгированной продукцией ИФН- $\gamma$  от 24 до 72 ч, включительно (рис. 4, б). Эти же дозы НАУК от 12 до 24 ч после введения включительно индуцировали продукцию ИФН- $\lambda 2$  и - $\lambda 3$  на уровне  $435 \pm 3,0$  —  $585,5 \pm 39,5$  и  $315 \pm 3,5$  —  $425,5 \pm 9,5$  пкг/мл соответственно. Более оптимальным относительно продолжительности нахождения в крови мышей ИФН 3-го типа с 12 до 48 часов являлась НАУК в дозе 7,0 мг/мышь.

## Заключение

В работе идентифицированы типы ИФН и исследован профиль их индукции под действием меглуминовой и натриевой солей акридонуксусной кислоты — индукторов ИФН. Изученные производные акридонуксусной кислоты (МГАУК и НАУК) при однократном пероральном введении в различных дозах вызывали индукцию известных трёх типов ИФН, динамика продукции и циркуляции которых в сыворотке крови мышей обусловлена проявлением фармакологической активности самой акридонуксусной кислоты. Вместе с тем в кинетике аккумуляции и продолжительности циркуляции различных типов ИФН в крови экспериментальных животных отмечались некоторые различия.

Инициация индукции ИФН- $\alpha$  (1-го типа) при введении оптимальных доз МГАУК определялась

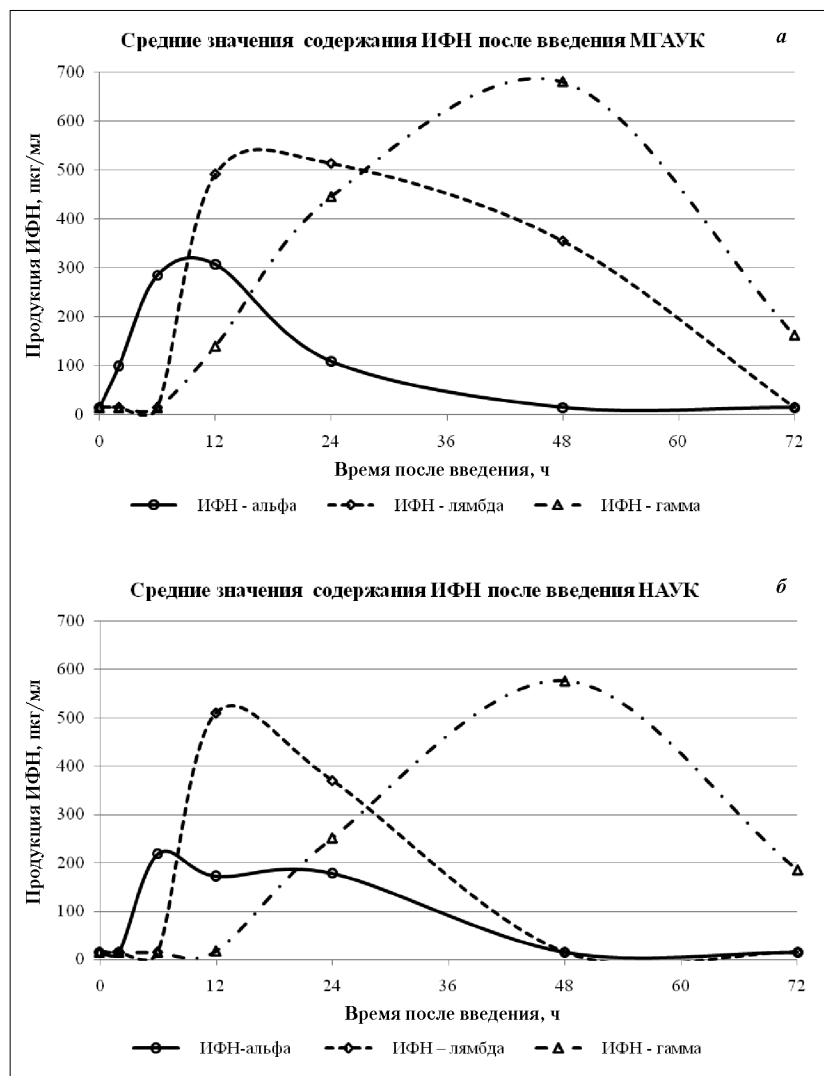


Рис. 4. Средние значения содержания ИФН 1-го, 2-го и 3-го типов (при дозах МГАУК и НАУК — 2,0—3,5 мг/мышь).

уже через 2 ч после его введения и, продолжаясь до 24 ч включительно, всегда количественно тестировалась на более высоком уровне. Под действием оптимальных доз НАУК таковая определялась через 6 ч после введения, постепенно снижаясь к 24 ч. Различия в сроках начала индукции и регистрации продукции ИФН- $\alpha$  между исследуемыми солями связаны, возможно, с большей аффинностью соответствующих рецепторов к МГАУК, о чем свидетельствует также более продолжительная (48 ч), чем под действием НАУК (24 ч), циркуляция в крови индуцированного им в оптимальных дозах ИФН- $\lambda 2$  и - $\lambda 3$  (3-го типа). Особенно обращает внимание тот факт, что как МГАУК, так и НАУК в высоких дозах 5,0—7,0 мг/мышь вызывают синдром отмены индукции — продукции и циркуляции в крови мышей ИФН- $\alpha$ , хотя продукция и циркуляция ИФН 2-го и 3-го типов с повышением доз солей продолжает нарастать. Подавление индукции ИФН- $\alpha$  тесно связано с ингибирующим действием белков SOCS

(suppressors of cytokine signaling), которые в физиологических условиях продуцируются параллельно с ИФН или другими цитокинами и негативно влияют на сигнальные пути провоспалительных цитокинов. Связывая и разрушая рецепторы провоспалительных цитокинов, в том числе и ИФН 1-го типа, они предупреждают их избыточную продукцию и опосредованные ими возможные избыточные воспалительные реакции [14, 15]. Поскольку рецепторы ИФН 1-го типа, в отличие от рецепторов ИФН 2-го и 3-го типов, представлены практически на всех клетках организма, увеличение доз МГАУК или НАУК до 5,0–7,0 мг/мышь приводит к их более ранней гиперстимуляции, которая вызывает SOCS-опосредованную ингибицию сигнальных путей ИФН 1-го типа, предупреждающую его гиперпродукцию. Ввиду ограниченного спектра клеток, экспрессирующих рецепторы ИФН- $\gamma$  и ИФН- $\lambda$ , их гиперстимуляция и последующая гиперпродукция ИФН- $\gamma$  и ИФН- $\lambda$  под действием солей акридонуксусной кислоты в дозах 5,0–7,0 мг/мышь не происходит. Подавление и прекращение индукции — продукции ИФН- $\gamma$  и ИФН- $\lambda$  произойдет, вероятно, при использовании солей акридонуксусной кислоты в дозах больше, чем 7,0 мг/мышь.

Таким образом, пероральное введение меглуминовой или натриевой соли акридонуксусной кислоты вызывает прямую дозозависимую индукцию—продукцию сывороточных ИФН трёх типов: в дозах 0,5–3,5 мг/мышь — ИФН 1-го типа, в дозах 0,5–7,0 мг/мышь — ИФН 2-го и 3-го типов. После однократного перорального введения меглуминовой и натриевой соли акридонуксусной кислоты в оптимальных дозах 2,0–3,5 мг/мышь обеспечивают последовательную, перекрывающую индукцию—продукцию и пролонгированную циркуля-

цию в крови ИФН 1-го, 2-го и 3-го типов в течение 72 ч включительно. Меглуминовая соль акридонуксусной кислоты в оптимальных дозах 2,0–3,5 мг/мышь опосредует индукцию и циркуляцию в крови ИФН 1-го типа в течение 46 ч после введения (с 2 ч по 48 ч включительно); натриевая соль — в течение 18 ч после введения (с 6 по 24 часа включительно). Оптимальные дозы меглуминовой соли акридонуксусной кислоты — 2,0–3,5 мг/мышь, вызывают индукцию — продукцию сывороточного ИФН 3-го типа в течение 36 ч после введения (с 12 по 48 ч включительно); натриевая соль — в течение 12 ч после введения (с 12 по 24 ч включительно). Индукция — продукция и циркуляция в крови ИФН 2-го типа под действием оптимальных доз меглуминовой соли акридонуксусной кислоты (2,0–3,5 мг/мышь) определялась в течение 60 ч после однократного введения (с 12 по 72 ч включительно); под действием натриевой соли акридонуксусной кислоты — в течение 48 ч (с 24 по 72 ч включительно). Однократное пероральное введение меглуминовой соли акридонуксусной кислоты в оптимальных дозах обеспечивает более сбалансированную индукцию, продукцию и циркуляцию в крови ИФН 1-го, 2-го и 3-го типов до 72 часов после введения включительно, чем использование натриевой соли акридонуксусной кислоты в тех же условиях.

Для уточнения механизмов индукции ИФН производными акридонуксусной кислоты целесообразно провести исследования, которые позволили бы рассматривать их агонистами противовирусных Toll-like рецепторов (TLR 3, 7, 8 или 9), опосредующих включение естественного и активацию адаптивного иммунных ответов так, как это показано для производных имидазохинолинов, отнесённых к агонистам TLR 7 и TLR 7/8 соответственно [16–18].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Коваленко А. Л. Фармакологическая активность оригинальных лекарственных препаратов на основе 1-дезоксид-1-(N-метиламино)-D-глюцитолола. Автореф. дисс. ... д.б.н. СПб.: 2005; 48.
2. Shapira S. D., Hacohen N. Systems biology approaches to dissect mammalian innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2011; 23: 2373–2377.
3. Hertzog P. J. Type 1 interferons as primers, activators and inhibitors of innate and adaptive immune responses. *Immunol Cell Biol* 2012; 90: 471–473.
4. Hervas-Stubs S., Perez-Garcia J. L. et al. Direct effects of type 1 interferons on cells of immune system. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 2619–2627.
5. Choubey D., Moudgi K. D. Interferons in autoimmune and inflammatory diseases: regulation and roles. *J Interferon & Cytokine Research* 2011; 12: 857–865.
6. Hillyer Ph., Mane V. P. et al. Expression profiles of human interferon-alpha and interferon-lambda subtypes are ligand- and cell-dependent. *Immunol Cell Biol* 2012; 90: 774–783.
7. Mordstein M., Neugebauer E. et al. Lambda interferon renders epithelial cells of respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections. *Virology* 2010; 11: 5670–5677.
8. Jewell N. A., Cline T. et al. Lambda interferon is the predominant interferon induced by influenza A virus infection *in vivo*. *Virology* 2010; 11515–1122.
9. Donnelly R. P., Kotenko S. V. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J. Interferon & Cytokine Res* 2010; 8: 555–564.
10. Kotenko S. V. IFN- $\lambda$ s. *Curr Opin Immunol* 2011; 23: 1–8.
11. Levy D. E., Marie I. J. Induction of type 1 and 3 interferon in response to viral infection. *Curr Opin Virol* 2011; 1: 476–486.
12. Wang B. X., Fish E. N. The yin and yang of viruses and interferons. *Trend Immunol* 2012; 33: 190–197.
13. Интерферон — 2011. Сборник научных статей. М.: 2012.
14. Nowoslawski L., Benveniste E. N. Viral exploitation of host SOCS protein functions. *Virology* 2011; 1912–1921.
15. Forsbach A., Muller Ch. et al. Negative regulation of type 1 interferon signaling pathway. *J Interferon & Cytokine Res* 2012; 6: 254–268.
16. Miller R. L., Meng T. C., Tomai M. A. The antiviral activity of Toll-like receptor 7 and 7/8 agonists. *Drug News Perspect* 2008; 21: 2: 69–87.
17. Ahn M. Y., Kwon S. M. et al. Toll-like receptor 7 agonist, imiquimod, inhibits oral squamous carcinoma cells through apoptosis and necrosis. *J Oral Pathol Med* 2012; 41: 7: 540–546.
18. Puig M., Tosh K. W. et al. CpG ODN and imiquimod induce distinct type interferon responses in humans and non-human primates. *J Leukoc Biol* 2012; 91: 147–158.