**Введение**

Полвека назад были открыт интерферон (ИФН) - первое противовирусное вещество, первый и наиболее детально изученный цитокин, первый биологически активный препарат, обладающий универсально широким диапазоном эффектов.

Изучение ИФН претерпело стремительную эволюцию от простого экспериментального наблюдения до научного объяснения и последующего познания нового феномена, завершившегося созданием весьма представительного поколения медицинских препаратов, которые широко применяются сейчас при инфекционных заболеваниях, в онкологии, неврологии, офтальмологии, дерматологии и т.д.

За прошедшие 50 лет накоплена обширная информация о физико-химических и биологических свойствах ИФН, изучена локализация интерфероновых и регуляторных генов в клетках, определены нуклеотидная и белковая последовательности всех основных типов и субтипов ИФН и в основном установлены роль и место ИФН в норме и при различных видах патологии. Именно ИФН оказались первыми функционально активными белками эукариотов, созданных в середине 80-х годов с помощью генной инженерии. Это решило проблему производства интерферонов в необходимых для здравоохранения количествах и стало поворотным событием в биологии и медицине, ознаменовавшим первый этап создания нового поколения биопрепаратов.

Многообразие физиологических функций ИФН указывает на их контрольно-регулирующую роль в сохранении гомеостаза. Система ИФН относится к числу быстрореагирующих и является одной из важнейших составляющих естественного (врожденного) иммунитета.

**1. Интерфероны**

**.1 Общие сведения об интерферонах**

Интерфероны (ИФН) представляют собой наиболее изученную группу цитокинов (медиаторов иммунитета). Они закодированы в геноме клеток позвоночных и представлены семейством белков, обладающих противовирусной, иммуномодулирующей, антипролиферативной и другими видами биологической активности.

Интерфероны относятся к полифункциональным биорегуляторам и гомеостатическим агентам. Система ИФН относится к числу быстрореагирующих и их образование и действие можно рассматривать как важнейший механизм врожденного (естественного) иммунитета, играющий одну из ключевых ролей в провоспалительном и противовоспалительном каскаде цитокинов. Многообразие физиологических функций ИФН указывает на их контрольно-регулирующую роль в сохранении гомеостаза.

Функционирование системы ИФН складывается из строго следующих друг за другом этапов, представляющих своеобразную цепную реакцию организма в ответ на внедрение чужеродной информации. В настоящее время полностью расшифрована сигнальная система клеток, обеспечивающая передачу сигнала с рецепторов ИФН в клеточное ядро и геном с активацией семейства генов, необходимым для формирования клеточной защиты от вирусных и бактериальных инфекций.

**1.2 Функционирование системы интерферонов**



Схематично можно выделить четыре основных звена данной цепочки:

· Индукция или «включение» системы, приводящей к дерепрессии генов ИФН, транскрипции их информационных РНК с их последующей трансляцией. Индукция достаточно быстрый этап взаимодействия внешних сигналов с клеткой. Сигнальная система передачи организована таким образом, что уже через 30-40 мин. регистрируются признаки ответа клеточного генома.

· Продукция - синтез клетками ИФН альфа-, бета-, гамма- и других типов и секреция их в окружающую среду. Продукция ИФН наблюдается сразу после завершения стадии индукции. Уже через 2-3 часа в периферической крови наблюдается накопление функционально активных молекул ИФН. Через 6-8 час. концентрация ИФН в периферической крови достигает максимума.

· Действие - защита окружающих клеток от чужеродной информации (вирусы, бактерии и т.д.) вновь образованными ИФН. При большинстве инфекций ключевую роль играет генерализованный ответ организма на инфекционный агент. Важная функция в генерализованном ответе принадлежит дендритным клеткам. В том случае, когда дендритные клетки эффективно отвечают на соответствующий стимул, концентрация ИФН в периферической крови достигает того уровня, при котором обеспечивается высокий уровень защиты от вирусной инфекции.

· Эффекты - антивирусный, иммуномодулирующий, антитуморогенный, радиопротективный сильно дифференцированы и имеют особенности проявления. В частности, при инфекционных процессах важен быстрый ответ и противостояние механизмам подавления регуляции синтеза ИФН вирус-специфическими белками. В механизмах противоопухолевой активности ИФН принципиальное значение имеет специфическая активация цитотоксических Т-лимфоцитов. Главенствующую роль в этот играет ИНФ-γ и распознавание этими клетками опухоле-специфических антигенов.

Наряду с противовирусной активностью интерфероны проявляют антипролиферативный и иммуномодулирующий эффекты, оказывая воздействие на рост и дифференцировку клеток организма.

Всего же к настоящему времени описано более 100 разнообразных эффектов ИФН, которые и определяют медицинскую значимость препаратов ИФН. Основные биологические эффекты интерферонов указаны ниже:

· Подавление размножения внутриклеточных инфекционных агентов вирусной и невирусной природы (хламидии, риккетсии, бактерии, простейшие)

· Антипролиферативная активность

· Антитуморогенный эффект

· Антимутагенный эффект

· Антитоксическое действие

· Радиопротективный эффект

· Регуляция продукции антител

· Стимуляция макрофагов, усиление фагоцитоза

· Усиление цитотоксического действия сенсибилизированных лимфоцитов, направленного на клетки-мишени

· Активация естественных киллерных клеток

· Стимуляция высвобождения гистамина базофилами

· Индукция синтеза простагландинов

**1.3 Классификация интерферонов**

Интерферон - семейство белков-гликопротеидов с молекулярной массой от 15 до 70 кДа, которые синтезируются клетками иммунной системы и соединительной ткани.

По источникам выделяют 4 типа интерферонов: ИФНα (альфа) синтезируется лейкоцитами периферической крови (лейкоцитарный интерферон); ИФНβ (бета) - фибробластами (фибробластный), ИФНγ (гамма) - стимулированными T-клетками, естественными киллерами и (возможно) макрофагами (иммунный). Об ИФН (омега) информация ограниченна.

ИФН синтезируется в организме постоянно и его концентрация в крови держится на уровне 2 МЕ/мл (МЕ - международная единица = количеству ИФН, защищающему культуру клеток от 1 ЦПД50 вируса). Выработка ИФН возрастает при инфицировании вирусами, а также при воздействии индукторов ИФН, напр., РНК, ДНК, сложных полимеров.

По способу образования различают **ИФН I типа** (образуется в ответ на обработку клеток вирусами, молекулами двухцепочных РНК, полинуклеотидами и рядом низкомолекулярных природных и синтетических соединений) и **ИФН II типа** (продуцируется лимфоцитами и макрофагами, активированными различными индукторами, действует как цитокин).

ИФН - видоспецифичны. Каждый биологический вид, способный к их образованию продуцирует свои уникальные продукты, похожие по структуре и свойствам, но не способные проявлять перекрестный антивирусный эффект (т.е. действовать в условиях организма другого вида).

**2. Система интерферонов**

***Система ИФН*** состоит из генов ИФН и рецепторов, а также эффекторных молекул трех видов, относящихся к двум типам: I - ИФН- и ИФН- и II - ИФН-. Гены ИФН типов I и II расположены на разных хромосомах и имеют разные рецепторы. Радикально различаются они и механизмами индукции и продукции.

Основные эффекты действия ИФН: противовирусный, противоопухолевый (антипролиферативный) и иммуномодулирующий (стимуляция фагоцитоза, естественных киллеров, регуляция АТ-образования В-клетками, активация экспрессии ГКГС), радиопротективный.

**ИФН I**. Основной биологический эффект - подавление синтеза вирусных белков. Эти ИФН способны воздействовать на различные этапы репродукции вирусных частиц, включая отпочкование дочерних популяций. «Антивирусное состояние» клетки развивается в течение нескольких часов после введения ИФН или индукции его синтеза. Однако ИФН не влияют на ранние этапы репликативного цикла (адсорбцию, пенетрацию и «раздевание» вирусов).

ИФН не проникают в клетки, а взаимодействуют со специфическими мембранными рецепторами (ганглиозидами или аналогичными структурами, содержащими олигосахара). По связыванию ИФН с рецептором и реализации его эффектов механизм активности напоминает действие гликопептидных гормонов. ИФН активирует гены, некоторые из которых кодируют образование продуктов с прямым антивирусным действием - протеинкиназы и 2'5'-олигоаденилатсинтетазы. Связываясь с клеточными рецепторами, интерфероны индуцируют синтез двух ферментов - 2/, 5/-олигоаденилатсинтетазы и протеинкиназы, вероятно, за счет инициации транскрипции соответствующих генов. Оба образующихся фермента проявляют свою активность в присутствии двухцепочечных РНК, а именно такие РНК. являются продуктами репликации многих вирусов или содержатся в их вирионах. Первый фермент синтезирует 2', 5'-олигоаденилаты (из АТР), которые активируют клеточную рибонуклеазу I; второй фермент фосфорилирует фактор инициации трансляции IF2. Конечным результатом этих процессов является ингибирование биосинтеза белка и размножения вируса в инфицированной клетке, а затем ее лизис. Доказано, что существуют и альтернативные механизмы действия интерферонов (инактивация тРНК, вмешательство в процессы метилирования и т. п.).

Опыт почти 40-летнего использования ИФН доказал их несомненную терапевтическую эффективность, что позволяет теперь объективно оценить основные достоинства и недостатки этих препаратов. При этом следует исходить из трех основных составляющих действия ИФН, которые лежат в основе их медицинского применения:

· 1 - интерфероны (особенно 1 типа) играют ведущую роль в сохранении гомеостаза, защищая организм от вирусов и других внутриклеточных паразитов, т.к. обладают уникальной способностью подавлять экспрессию чужеродной информации;

· 2 - не менее важна способность ИФН регулировать деление клеток, которая лежит в основе их антипролиферативных, в первую очередь, антитуморогенных эффектов;

· ) позволяет рассматривать их в качестве важного компонента иммунотерапии.g3 - выраженная иммуномодулирующая активность ИФН (в первую очередь ИФН-

Наиболее широко ИФН используются при вирусных инфекциях. В первую очередь это различные герпетические поражения (кератиты и кератоконъюнктивиты, герпес гениталий, опоясывающий лишай), острые и хронические вирусные гепатиты, грипп и другие ОРВИ.

Менее изучена, хотя и установлена, эффективность ИФН при ВИЧ-инфекции, папилломавирусных инфекциях (остроконечные кондиломы, ювенильный папилломатоз гортани, бородавки и др.), кори, эпидемическом паротите и бешенстве. К этому перечню следует добавить вирусные осложнения при пересадке органов с применением иммунодепрессантов, гнойно-септические заболевания новорожденных, постнатально приобретенные хронические цитомегаловирусные инфекции, псориаз, рассеянный склероз и, наконец, различные бактериальные заболевания (хламидиозы, легионеллезы, риккетсиозы).

К настоящему времени накоплена обширная информация о применении ИФН при различных онкологических заболеваниях. Достоверно установлена высокая эффективность (70% и более) при В-клеточных и Т - клеточных злокачественных новообразованиях крови (лейкемии, лимфомы, миеломы, тромбоцитопении и др.). Достаточно высокий эффект интерферонотерапии (30-70%) наблюдался при солидных опухолях (карциномы, глиомы, меланомы).

Интерфероны альфа, бета и гамма за последнее десятилетие стали препаратами, широко применяемыми в медицинской практике. В настоящее время десятки фармацевтических фирм различных стран производят около сотни лекарственных форм интерферонов трех основных типов: альфа, бета и гамма. Вместе с тем, практические врачи не всегда достаточно осведомлены о том, что представляют собой данные соединения, каково их происхождение, в чем их отличия от природных веществ и какова совместимость этих лекарственных препаратов с другими фармакологическими средствами

по степени изученности и масштабам применения занимают лидирующее положение среди всех используемых в клинической практике цитокинов. Эти препараты обладают выраженным антивирусным действием, блокируя синтез вирусных белков и подавляя другие этапы репродукции вирусов. Кроме того ИФН-α активно воздействует на иммуноциты (ЕК-клетки, Т-лимфоциты, моноциты, макрофаги и гранулоциты), а также усиливает экспрессию мембранных антигенов комплекса гистосовместимости (HLA).a 2а, 2b, 2c) близки по составу и могут рассматриваться как единая группа. Различия касаются в основном лекарственных форм (препараты для местного или парентерального применения, свечи, мази, линименты и др.), а также показаний, доз и схем использования. ИФН-aАльфафероны (ИФН-

) применяются не столь широко. Они хорошо зарекомендовали себя в терапии рассеянного склероза и онкологии (лечение меланом и глиом).bБетафероны (ИФН-

играет важнейшую роль в реакциях клеточного иммунитета.g) созданы относительно недавно и наименее изучены. Эффективность их применения показана при ревматоидных артритах, вирусных гепатитах и генитальных бородавках. Будучи мощным провоспалительным цитокином ИФН-gГаммафероны (ИФН-

Особое место среди ИФН занимают комбинированные препараты, в которых интерферон является основным, но не единственным компонентом (виферон, кипферон, генферон, гриппферон и др.). Особенно широко указанные препараты используются при таких хронически рецидивирующих инфекционных заболеваниях как герпес и заболевания, передающиеся половым путем (ЗППП).

Вместе с тем практика длительного (многомесячного) применения высокоактивных доз ИФН, когда препараты ИФН являются основной составляющей терапии, например, при хронических вирусных гепатитах В и С, неврологических заболеваниях (рассеянный склероз), в онкологии (лейкозы, саркомы) выявила ряд серьезных недостатков ИФН-терапии:

· ряд нежелательных побочных эффектов;

· появление антиинтерфероновых антител, сводящих на нет дальнейшую интерферонотерапию;

· способность ряда вирусов «избегать» действия ИФН (подробно эти эффекты разбираются в монографии Ф.И. Ершова, О.И. Киселева «Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств)» - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005 г.

· некорректная информация, которая бесконтрольно распространяется через интернет, что приводит к серьезным нарушениям в научно обоснованном медицинском использовании ИФН.

· отсутствие объективной информации о существующих среди ИФН различиях, что для практикующих врачей делает все ИФН препаратами произвольного выбора;

· использование ИФН согласно рекомендациям научно не обоснованной рекламы, которая часто выходит за рамки утвержденных органами здравоохранения инструкций;

**3. Интерфероновая реакция лейкоцитов как диагностический тест.**

**.1 Оценка интерферонового статуса**

интерферон химический лечение

При возникновении инфекции в организме человека развиваются иммунные реакции со сложными клеточными взаимодействиями. Регуляторами этих взаимодействий являются специальные белки - цитокины. Одним из ключевых цитокинов является интерферон.

Спектр основных биологических эффектов ИФН:

• подавление размножения внутриклеточных инфекционных агентов вирусной и невирусной природы (хламидии, риккетсии, бактерии, простейшие);

• антипролиферативная активность;

• антитуморогенный эффект;

• антитоксическое действие;

• антимутагенный эффект;

• радиопротективный эффект;

• подавление или усиление продукции антител;

• стимуляция макрофагов, усиление фагоцитоза;

• усиление цитотоксического действия сенсибилизированных лимфоцитов на клетки-мишени;

• активация естественных киллерных клеток.

Существует три типа природного интерферона: альфа (ИНФ-α), бета (ИНФ-β), гамма (ИНФ-γ). Это интерфероны 1-го поколения. Диагностическую ценность имеет выявление уровня интерферона в сыворотки крови и определение способности лейкоцитов периферической крови продуцировать различные типы интерферонов в ответ на активирующий сигнал (вирусные частицы или иммуномодуляторы). Такое исследование и получило название «Интерфероновый статус».

Целью определения интерферонового статуса является:

. Исследовать способность иммунной системы к развитию адекватных иммунологических реакций в ответ на этиологический фактор.

. Выявить уровень продукции интерферона в настоящий момент (в норме или на фоне заболевания).

. Подобрать иммуномодулирующий препарат, на который развивается максимальный ответ иммунокомпетентных клеток для применения в терапевтических целях.

Исследование интерферонового статуса включает определение уровня сывороточного интерферона (ИФН), спонтанной продукции ИФН, способности лейкоцитов к стимулированной продукции ИФН-α (под воздействием вируса болезни Ньюкасла), а также способности продуцировать ИФН-γ под воздействием фитогемагглютинина.

Показатель «Циркулирующий интерферон», варьирующий в норме от 2 до 8 ед/мл, характеризует суммарное «фоновое» количество всех типов интерферонов, циркулирующих в крови, смесь интерферонов различных типов. У здоровых взрослых и детей старшего возраста в кровотоке определяется незначительная часть интерферона в результате его разведения и быстрого выведения. Процессы продукции и элиминации интерферона находятся в равновесии, и уровень сывороточного интерферона в кровотоке не выходит за пределы нормы. Уровень (циркулирующего) сывороточного интерферона служит объективным суммарным показателем количества данного белка *in situ*, повышенный уровень - показатель остроты процесса.

Анализ информативен, когда необходимо оценить общее количество интерферона: подозрение на генерализованный герпес, гепатит, рассеянный склероз (общее снижение), бронхиальная астма, крапивница (корреляция со степенью тяжести) и др.

Определение уровня продукции α- и γ- интерферонов дает важную информацию о потенциальной активности системы интерферона. Взрослые доноры способны к значительной их продукции (до 640 ед/мл для γ-интерферона).

Все интерфероны обладают противовирусным, иммуномодулирующим, противоопухолевым и антипролиферативным эффектами.

**ИНФ-α:**

• обладает выраженным противовирусным и противоопухолевым действием, в этом есть сходство с ИНФ-β;

• в меньшей степени проявляет иммуномодулирующие свойства.

Основными клетками продуцентами для ИНФ-α являются В-лимфоциты, макрофаги (для ИНФ-β - клетки эпителия, фибробласты).

Титры ИФН-α в пробах цельной крови - показатель функциональной активности В-лимфоцитов и состояния противовирусной защиты организма;

Уровень ИНФ-α в норме варьирует от 128 до 640 ед/мл.

**ИНФ-γ:**

• обладает выраженным иммуномодулирующим действием;

• вместе с интерлейкином-2 (ИЛ-2) и фактором некроза опухолей (ФНО α) относится к основным провоспалительным цитокинам;

• является индуктором клеточного звена иммунитета.

Противовирусные и противоопухолевые свойства слабее, чем у ИНФ-α и ИНФ-β. Основными клетками-продуцентами являются Т-лимфоциты, натуральные или естественные киллеры (NK-клетки).

Титры ИФН-γ - показатель функциональной активности Т-лимфоцитов и способности к активации иммунной системы (в частности, при вирусных инфекциях).

Уровень ИНФ-γ в норме варьирует от 32 до 256 ед/мл.

Нормализация показателей уровня интерферонов является критерием эффективности терапии, и, как правило, коррелирует с положительной динамикой заболевания.

Показатели ИФН-статуса в целом позволяют судить об иммунореактивности организма:

. У здоровых лиц наблюдается определенное содержание сывороточного интерферона и значительный «запас» продукции α- и γ-интерферонов.

. Стрессы и острые вирусные инфекции, аллергические состояния характеризуются повышением уровня сывороточного интерферона и снижением уровня индуцируемой продукции α- и γ-интерферонов.

. Хронические вирусные инфекции (герпес, гепатит, рассеянный склероз) сопровождаются глубоким подавлением всех показателей интерферонового статуса.

. Аутоиммунные заболевания (системная красная волчанка, ревматоидный артрит) характеризуются подавлением индуцируемой продукции α-интерферона, наличием спонтанно вырабатываемого ИФН.

. Острый лимфолейкоз, злокачественные образования, проказа сопровождаются подавлением индуцируемой продукции γ-интерферона.

. При бронхиальной астме, крапивнице уровень сывороточного интерферона коррелирует с тяжестью заболевания.

**3.2 Интерфероновые диагностические тесты**

Система интерферона (ИФН) обеспечивает противовирусную резистентность организма и влияет на весь комплекс его специфических и неспецифических защитных реакций.

Отражением функционального состояния системы ИФН является ИФН статус (1, 4), оценка которого проводится по нескольким показателям, основные из которых:

. Количество (активность) циркулирующего в крови ИФН (общий сывороточный ИФН).

. Уровень продукции ИФН -α/β лейкоцитами (или лимфоцитами) in vitro при его индукции вирусными индукторами (интерфероновая реакция лейкоцитов - ИРЛ).

. Уровень продукции ИФН -γ при его индукции митогенами в лейкоцитах (лимфоцитах) in vitro (2).

Исследование ИФН статуса позволяет определить количественные параметры физиологического интерферонового ответа у здоровых людей (1, 3, 5) и выявить интерферонодефицитные синдромы при острых, хронических, рецидивирующих инфекционных и аутоиммунных заболеваниях, первичных и вторичных иммунодефицитах (9, 11). Определение ИФН статуса достаточно информативно и может служить надежным клиническим ориентиром при диагностике, лечении и прогнозе исхода заболевания, как вирусной, так и невирусной этиологии.

Известен способ определения активности ИФН в сыворотке и плазме крови на основе торможения роста микроорганизмов в культуре. Однако данный метод не обладает достаточной чувствительностью и воспроизводимостью, не дает возможности выражения результатов в общепринятых международных единицах (ME), а также, выбора иммуномодулирующей терапии и прогноза исхода заболевания (МКИ 5 A 61 K 37/66, AC N 1082422, 1984 г.). Известен способ определения интерферонового статуса и прогноза исхода заболевания, включающий следующие стадии: кровь доноров или больных в объеме 1-1,5 мл берут из вены, добавляют гепарин, далее в 2 центрифужные пробирки вносят по 800 мкл Среды RPMI-1640, 100 мкл цельной крови, 100 мкл вируса болезни Ньюкасла (NDV) и фитогемагглютинин (ФГА) для индукции ИФН -α/β и ИФН -γ соответственно. Конечное разведение цельной крови в объеме 1 мл - 1/10. Оставшееся количество крови использовали для получения проб сывороточного ИФН. Индукцию ИФН -α/β и ИФН -γ проводили в течение 24 часов при 37oC в атмосфере 5% CO2. После инкубации пробы центрифугировали, надосадочную жидкость отсасывали. В пробах с индукцией синтеза ИФН -α/β лейкоцитами in vitro проводили инактивацию NDV инкубацией при pH до 2.0 в течение 2-3 суток при 4oC с последующим восстановлением до рН 7.4. Пробы хранили при 4oC до титрования. При постановке титрования микрометодом использовали 96-луночные микропланшеты. Для титрования использовали клетки линии М-19 (фибробласты человека). Каждую реакцию ставили в объеме 200 мкл с двумя повторами, общий расход цельной крови при этом составлял 200 мкл. В качестве тест-вируса использовали вирус везикулярного стоматита (ВВС), штамм Индиана. За единицу активности ИФН принимали величину, обратную его разведению, задерживающую деструкцию монослоя на 50%. У здоровых доноров уровень общего сывороточного ИФН соответствовал 2-8 ед/мл, индукция ИФН -α/β в культуре лейкоцитов равняется 1280 ед, ИФН-γ - 256 ед, при острой вирусной инфекции сывороточный ИФН равнялся 128 ед/мл, продукция ИФН -α/β - 10 ед, ИФН-γ - 64 ед. При хронической вирусной инфекции эти показатели составляли: сывороточный ИФН 32-64 ед/мл, продукция ИФН -α/β - 80 ед, ИФН -γ <2 ед. (Григорян С.С. Оценка интерферонового статуса людей по пробам цельной крови. Вопросы вирусологии, 1988, т. 3, N 4, с. 433-436).

Сущность изобретения состоит в том, что для анализа ИФН статуса в стерильные пробирки отбирают венозную кровь объемом от 0.5 до 5 мл. В часть пробирок предварительно вносится необходимое количество стерильного гепарина в виде концентрированного (для исключения разбавления исходного образца) раствора на среде RPMI - 1640 или на физиологическом растворе, так, чтобы конечная концентрация гепарина составила 10-15 ед/мл. Отобранная таким образом кровь может храниться 5-6 часов при 4oC без потери всех необходимых свойств.

Цельную негепаринизированную кровь центрифугируют 10-15 мин при 1000 g, после чего в стерильный эппендорф отбирают 50-200 мкл сыворотки для анализа содержания общего сывороточного ИФН. Для типирования ИФН в сыворотке крови (ИФН -α, ИФН -β, ИФН -γ) образцы инкубируются с моноклональными антителами (MAT) к различным типам ИФН в течение 1 часа при 37oC. Содержание ИФН каждого типа определяют, исходя из активности общего сывороточного ИФН и величины падения активности ИФН в каждом образце после инкубации с МАТ. Образцы хранят при -25oC.

Для определения содержания кислотолабильного ИФН -α в сыворотке крови в исследуемые образцы добавляют раствор 0.1 н. HCl до pH 2.0, образцы инкубируют в течение 1 часа при 37oC, после чего pH доводят до 7.4 добавлением 0.1 н. NaOH. Параллельно с этим, другую аликвоту исследуемого образца инкубируют с МАТ к ИФН -γ 1 час при 37oC для осаждения сывороточного ИФН -γ. Содержание кислотолабильного ИФН -α определяют как разность активностей образца, инкубированного с МАТ к ИФН -γ, и образца, инкубированного при pH 2.0. Образцы хранят до анализа при -25oC.

Для определения уровня продукции различных типов ИФН лейкоцитами крови in vitro в стерильные эппендорфы вносят среду RPMI-1640 с добавлением глутамина, антибиотиков (пенициллин, стрептомицин до 100 ед/мл), 2% сыворотки КРС, растворы индукторов ИФН (5-7 lg ЭИД50 NDV для ИФН -α/β) и энтеротоксин St. aureus (СЭА, 10 мг/мл) для ИФН - и цельную гепаринизированную кровь в соотношении 8/1/1 (например, 100 мкл PRMI-1640, 12.5 мкл раствора индуктора ИФН и 12.5 мкл цельной крови). Для определения уровня спонтанной продукции ИФН вместо раствора индуктора вносят эквивалентный объем питательной среды. Полученную индукционную смесь инкубируют 24 часа при 37oC, затем в эппендорфы, в которых производится индукция ИФН -α/β, добавляют 0.1 н. раствор HCl до pH 2.0, пробы инкубируют 1 час при 37oC, после чего в них вносят 0.1 н. раствор NaOH до pH 7.4. Таким же образом обрабатывают пробы спонтанно продуцированного ИФН, в которых определяют содержание ИФН -γ по падению активности ИФН в закисленной / восстановленной пробе (ее активность соответствует активности спонтанно-продуцируемого ИФН -α/β) по сравнению с обычной. Обработанные таким образом пробы с индуцированным и спонтанно продуцированным ИФН хранятся до анализа при -25oC. Непосредственно перед анализом пробы, подвергшиеся закислению / восстановлению (индуцированный и спонтанный ИФН ИФН -α/β, центрифугируют 10-20 мин при 3000-4000 g для осаждения коагулированных макромолекул.

При определении индуцированной продукции кислотолабильного ИФН-γ, индукцию его синтеза проводят в тех же условиях и параллельно индукции общего ИФН -α/β с той разницей, что вместо закисления / восстановления после инкубации и NDV образцы инкубируют с поликлональной сывороткой к NDV 1 час при 37oC. Обработанные таким образом пробы центрифугируют при 4000-7000 g для осаждения NDV и хранят до анализа при -25oC.

Определение активности ингибиторов / активаторов действия ИФН в физиологических жидкостях производят совместным титрованием исследуемого образца на фоне постоянной концентрации референс - препарата ИФН при прочих условиях, соответствующих обычному титрованию (см. ниже). Активность ингибиторов / активаторов действия ИФН определяют по отношению активности стандартного препарата ИФН к активности стандартного препарата той же концентрации в присутствии исследуемой сыворотки крови и выражают как коэффициент стимуляции. Образцы физиологических жидкостей (сыворотка крови, цереброспинальная, синовиальная и пр. жидкости) аликвотируют и хранят до анализа при -25oC.

Активность ингибиторов / активаторов синтеза ИФН в физиологических жидкостях определяют следующим образом: в индукционную систему контрольных проб, аналогичную таковой для оценки индуцированной продукции ИФН, вносят стандартные индукторы ИФН -α/β и ИФН -γ (NDV и СЭА соответственно) и, вместо цельной крови, клетки линии Namalva (до концентрации 106 кл/мл) в эквивалентном объеме. Опытные пробы, кроме этого, содержат раститрованные образцы исследуемых физиологических жидкостей. Индукцию синтеза ИФН проводят при тех же условиях и количественных соотношениях компонентов, как при определении индукции ИФН -α/β и ИФН -γлейкоцитами in vitro. По соотношению активностей ИФН в опытных и контрольных пробах определяют активность ингибиторов / активаторов синтеза ИФН в исследуемых образцах как коэффициент стимуляции / ингибирования синтеза ИФН in vitro. После индукции пробы замораживаются и хранятся до анализа при -25oC.

Определение чувствительности естественных потенциальных продуцентов ИФН (лейкоциты крови) к применяемым в медицинской практике и экспериментальным лекарственным препаратам проводится при тех же условиях, как и определение индуцированной продукции ИФН лейкоцитами in vitro. При этом, вместо стандартных индукторов ИФН (NDV и СЭА) используют препараты, чувствительность к которым определяют. Оценивают влияние интересующего препарата на процессы продукции ИФН клетками донора in vitro. Чувствительность к препарату считают положительной, если активность ИФН в пробе на чувствительность в 1.5 и более раза выше общей активности спонтанно-продуцируемого лейкоцитами ИФН. Методически данный тест повторяет тест на индуцированную продукцию ИФН -α/β и ИФН -γ лейкоцитами in vitro с соблюдением всех соответствующих условий. Подготовленные таким образом пробы хранят до анализа при -25oC.

Анализ активности ИФН в подготовленных вышеописанными методами пробах проводят с помощью титрования исследуемых проб в 96 - луночных микропланшетах над монослоем клеток перевиваемых культур (L-41, Нер-2, A-549, MG-63, L-929), инкубации 24 часа при 37oC в атмосфере 5% CO2, последующей инкубации в тех же условиях в присутствии 100 ЦПД50 вируса везикулярного стоматита (ВВС), штамм Индиана. После этого, для стандартизации и автоматизации учета результатов анализа микропланшеты окрашивают 5-10 мин 0.1% раствором кристаллического фиолетового на 30% этаноле, отмывают и высушивают на воздухе. Дальнейший учет результатов проводят либо визуально, либо автоматически с помощью ридера для иммуноферментного анализа, растворением окрашенного монослоя клеток 2% раствором додецилсульфата натрия на 5% глицерине (или экстракцией 30% этанолом 1 час при 37oC) и измерением оптической плотности полученных растворов при длине волны 570-590 нм.

Активность ИФН в анализируемом образце определяется с помощью калибровочной кривой зависимости (% сохранившихся клеток)/(активность стандартного препарата ИФН) для визуального учета или (оптическая плотность)/(активность стандартного препарата ИФН). Это дает возможность выражать результаты анализа в стандартных (международных) единицах (ME), а также значительно повысить точность получаемых результатов до 0.5 ME. Учет проводится по той титровочной точке, в которой сохранилось 30-50% клеток от исходного числа (при визуальном учете) или по точке, оптическая плотность которой лежит в интервале 0.2-0.7 ед оптич. плотности (при автоматическом учете).

Приведенный комплекс показателей представляет собой полный вариант анализа ИФН статуса. На практике бывает достаточно использовать три основных показателя: задержание общего ИФН сыворотки крови (sИФН), продукция ИФН -α/β и ИФН -γ лейкоцитами крови при индукции in vitro.

В норме, содержание в крови sИФН соответствует диапазону 0-10 МЕ/мл, продукция ИФН -α/β 250-520 ME, ИФН -γ110-250 ME. Низкое содержание ИФН в сыворотке крови сочетается с высокой потенциальной способностью к продукции различных типов ИФН.

При содержании sИФН 25 МЕ/мл, продукции ИФН -α/β 110, ИФН -γ 55 прогнозируют благоприятный исход при остром течении заболевания, поскольку система ИФН адекватно реагирует на патологию выбросом достаточного количества ИФН. Действию естественных механизмов защиты не препятствует этиотропная терапия (антибиотики, химиопрепараты), с которой целесообразно сочетать препараты ИФН (виферон и др.) для предотвращения развития ИФН- и иммунодефицитов и усиления эффективности лечения. Применение индукторов ИФН малоэффективно (система ИФН не в состоянии ответить на дополнительную стимуляцию синтеза ИФН). Назначение препаратов ИНФ позволит компенсировать возможный дефицит активности систем защиты, что приведет к повышению способности к продукции ИФН -α/β и ИФН -γ, и, в дальнейшем, позволит эффективно применять индукторы ИФН и иммуномодуляторы микробного происхождения.

При содержании sИФН >35, продукции ИФН -α/β 60, ИФН -γ<30 прогнозируют тяжелое острое протекание заболевания, требующего срочного терапевтического вмешательства. От применения иммуномодулирующей терапии лучше воздержаться до стабилизации состояния пациента.

При содержании sИФН 12-25 МЕ/мл, продукции ИФН -α/β 85-250 ME, ИФН -γ 45-110 ME прогнозируют подострый характер протекания заболевания и высокую вероятность хронизации, поскольку реакция системы ИФН недостаточна для обеспечения защиты организма. Назначают иммуностимулирующие препараты (индукторы ИФН, препараты микробного происхождения, полимерные препараты: циклоферон, неовир, пирогенал, ликопид, полирем и др.). Для усиления их эффекта их комбинируют с препаратами ИФН (виферон) по схемам: 1-й день виферон (2 приема по одной свече 150000 - 1000000 ME), 2-й день индуктор ИФН (циклоферон, неовир - 1 инъекция, 2 мл 12.5% р - р) и т.д. в течение 20-30 дней; 1-2 10-дневных курса виферона (2 раза в день через 10-12 часов по 1 свече 150000 - 1000000 ME, перерыв между курсами 5-7 дней) и через 5-7 дней 1-2 курса индукторов ИФН (циклоферон, неовир, по 1 инъекции 2 мл 12.5% р-ра на 1, 2, 4, 6, 8 дни, перерыв между курсами 5-7 дней). Чем выше sИФН и ниже продукция ИФН -α/β и ИФН -γ (острее протекание заболевания), тем более показаны препараты интерферона (виферон). Наибольшая эффективность достигается при 1-2 курсах виферона и, затем, сочетании виферона и индукторов ИФН по вышеприведенной схеме.

При содержании sИФН 0-10 ME, продукции ИФН -α/β <40 ME, ИФН-γ <20 ME делают неблагоприятный прогноз исхода заболевания. Для компенсации ИФН- и иммунодефицита назначают иммунозаместительную терапию: препараты ИФН (виферон), гамма-глобулина, интерлейкинов (ронколейкин) и других препаратов, содержащих экзогенные защитные факторы. Использование препаратов этой группы может предварять назначение антибиотиков и химиопрепаратов или они могут применяться совместно. При повышении резервов системы (повышение способности к продукции ИФН -α/β и ИФН -γ) продолжают этиотропное лечение в сочетании с иммуномодулирующим (при этом в лечебные схемы уже можно включать и препараты иммуностимулирующего ряда - индукторы ИФН, полимеры микробного происхождения и др.). Также возможно и комбинирование различных видов иммунокорригирующих воздействий. При дальнейшей стабилизации состояния продолжают этиотропное и патогенетическое лечение.

При содержании sИФН 12-40 МЕ/мл, продукции ИФН -α/β 60-400 МЕ и значительно повышенной продукции лейкоцитами ИФН-γ (свыше 250 ME) прогнозируют развитие нейроиммунной патологии (рассеянный склероз и др.), назначают препараты ИФН -β (бетаферон) в комплексе с традиционными методами лечения.

**Заключение**

В целом, учитывая все «за» и «против» интерферонов, можно утверждать, что эта группа белков вступила в пору зрелости, разумного и взвешенного к ним отношения. Нет сомнения, что интерфероны еще долго будет служить прекрасной моделью для биологических исследований и одновременно широко использоваться как высокоэффективные лекарственные средства при разных формах патологии.

**Список использованных источников**

1. Галактионов, В.Г. - Иммунологический словарь: учеб. пособие для вузов по спец. 012000 «Физиология» и другим биол. спец. рек. УМО РФ / В.Г. Галактионов. - М.: Академия, 2005.

. Внутриклеточные цитокины: проблемы детекции и клиническое значение / Л.В. Пичугина, Б.В. Пинегин // Иммунология. - 2008.

. кисленко В.Н. Иммунологические методы диагностики, новосибирск-2010. 2010

. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. Пер. с англ. - М.: Мир, 2000.

. http://immuninfo.ru/immunologiya/citokiny/

6. *Ярилин А.А.* Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и патологии // Иммунология. 1997. - № 5. - С. 7-14.