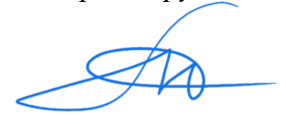


На правах рукописи



Оспельникова Татьяна Петровна

**Система интерферонов при
респираторно-вирусной, аллергической и аутоиммунной патологии и пути коррекции
нарушений**

3.2.7. Иммунология

1.5.10. Вирусология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»

Научные консультанты:

академик РАН, доктор медицинских наук, профессор РАН
академик РАН, доктор медицинских наук, профессор

Свитич Оксана Анатольевна
Ершов Феликс Иванович

Официальные оппоненты:

Тоголян Арег Артемович - академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, директор, лаборатория молекулярной иммунологии, заведующий лабораторией

Пинегин Борис Владимирович - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, отдел иммунодиагностики и иммунокоррекции, заведующий отделом

Афанасьева Ольга Ивановна - доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отделение респираторных вирусных инфекций у детей, заведующая отделением

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «16» декабря 2025 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ208.001.34 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной научной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации <https://www.sechenov.ru>.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор  **Калужин Олег Витальевич**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время растет число иммунозависимых заболеваний (ИЗЗ) инфекционной, аллергической и аутоиммунной природы, в патогенезе которых ведущую роль играют нарушения иммунной системы [Симбирцев А.С., Тотолян А.А. 2015; Галушко Е.А. 2018; Земсков А.М. 2018, 2022]. Так, согласно базе исследований GBD (Global Burden of Disease - глобальное бремя болезней), проведенных в период с 1990 по 2019 гг., в мире показан рост таких заболеваний, как астма, воспалительные заболевания кишечника, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, псориаз, атопический дерматит и др. [EClinicalMedicine. 2023]. Среди этиологических факторов ИЗЗ отмечаются не только нарушения врожденного иммунитета, но и вирусные инфекции, которые могут служить триггерами аллергических и аутоиммунных заболеваний и, несомненно, представляют медицинский, экономический, научный, фармацевтический интересы [Херападаки Р. 2007; Tantilipikorn Р. 2014; Iwata S., 2022; Sundaresan В. 2023]. Респираторные вирусные инфекции, среди которых выделяют грипп, новую коронавирусную инфекцию COVID-19, аденовирусную инфекцию и другие, могут вызывать хроническое воспаление, нарушения врожденного иммунитета и обострения хронических заболеваний [Kikkert М. 2020; Cable J. 2023, Yamaya М. 2023]. По данным ВОЗ за 2019 г. выявлено число респираторных инфекций верхних (0.02%) и нижних дыхательных путей (4.41%), отмечено, что респираторные вирусные заболевания прямо и опосредованно являются причиной 23% всех смертей на планете [<https://vizhub.healthdata.org/gbd-results>]. Ежегодно в течение сезона заболеваемость гриппом составляет примерно 1 миллиард случаев заражения, из которых у 3–5 миллионов развивается тяжелая форма заболевания [<https://www.who.int/publications/i/item/9789241515320>]. По оценкам Global Seasonal Influenza-associated Mortality Collaborator Network, ежегодно в мире регистрируется от 290 000 до 650 000 случаев смерти от респираторных заболеваний, связанных с гриппом [Iuliano A.D. 2018]. По данным Института Джонса Хопкинса, на март 2023 г. зарегистрировано более 676 млн заболевших COVID-19, среди них летальность составила 6,8 млн человек [<https://coronavirus.jhu.edu/map.html> (date of access October 01, 2023)]. Респираторные вирусные заболевания составляют 1,7% от всех смертей в Российской Федерации по данным Роспотребнадзора [Здравоохранение в России. 2023]. Среди населения, обслуживаемого ФМБА России, за 2021 год зарегистрирован 475 851 случай инфекционных заболеваний (учитывая ОРВИ, грипп и COVID-19) с показателем общей заболеваемости 24 086,6 на 100 тысяч населения, что на 15,6 % больше, чем в 2020 году (411 506 случаев с показателем общей

заболеваемости 20 829,63 на 100 тысяч населения). На детское население приходится 52 % случаев заболеваний (247 845 случаев) [Государственный доклад. 2024]. По данным Росстата только за 2022 г. по COVID-19 процент умерших составил 7,3% [Здравоохранение в России. 2023].

В число наиболее часто встречающихся, по данным ВОЗ, входят аллергические заболевания. Аллергические заболевания (АЗ) по своей распространенности идут после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, всех респираторных инфекций вместе взятых, а в некоторых экологически неблагоприятных регионах выходят на первое место. АЗ диагностируют среди 20% населения мира [Fiocchi A. 2015; Global atlas. 2015]. Среди основных АЗ следует отметить бронхиальную астму, аллергический ринит, атопический дерматит [Wang Y. 2024]. В России АЗ распространены от 15 до 35% в зависимости от климато-географической зоны и антропогенного фактора; причем, рост АЗ продолжается [Seité S, 2020].

Помимо аллергизации может быть и нарушение иммунологической толерантности, которое присутствует в ряде заболеваний [Кравченко П.Н. 2015; Kleimann P. 2024]. Аутоиммунные заболевания (АИЗ) определены у 5-10% мирового населения, в Российской Федерации - у 20-25% [Войко А. 2020]. В настоящее время рост заболеваемости АИЗ рассматривают как свидетельство нарушений иммунной системы [Hartmann F. 2020; Miller F.W. 2023]. Описано более 150 АИЗ человека, как системных, так и органоспецифических [Небесная Л.В. 2019; Angum F. 2020; Трошина Е.А. 2023, Song Y. 2024]. Отсутствие этиотропной терапии АИЗ обуславливает поиск молекулярных маркеров аутоиммунных заболеваний и способов их специфической коррекции.

При ИЗЗ ключевую роль играют нарушения цитокинового баланса [Иванов В.В. 2012; Goraya M.U. 2015; Acosta P.L. 2020]. Изменения интерферонов, как быстро реагирующей системы, вызывает научный интерес. Следует отметить, что интерфероны (interferon, IFN) были открыты одними из первых цитокинов [Isaacs A., Lindenmann J. 1957]. IFN видоспецифичны, обладают противовирусными, иммунорегуляторными и другими свойствами посредством регуляции экспрессии IFN-стимулируемых генов (interferon-stimulating genes (ISG)) [Donnelly R.P. 2010; Koritar-Jerala N. 2017]. Разнообразие функций и взаимное влияние IFN трех типов определяют существование системы IFN, состоящей из IFN, белков, кодируемых ISG, и факторов регуляции [Nallar S.C. 2014]. ИЗЗ связаны с нарушениями в иммунной системе, в частности, IFN всех типов, что даёт предпосылки для изучения дисбаланса в системе IFN и возможной дальнейшей коррекции IFN. Одними из подходов к иммунокорректирующей терапии рассматривается применение иммуноактивных препаратов, таких как интерфероны, индукторы интерферонов, иммуномодуляторы, бактериальные лиганды/лизаты [Ершов Ф.И. 2005, 2006. 2021; Лусс Л.В. 2015; Пинегин Б.В. 2019; Егорова Н.Б. 2019; Сизякина Л.П. 2019]. Среди

примеров: использование для коррекции препаратов IFN α в терапии и профилактике респираторных вирусных инфекций [Афанасьев С.С. 2005; Ершов Ф.И. 2006; Новиков Д.К. 2017; Ющук Н.Д. 2018]. В качестве средства профилактики вирусных инфекций, в том числе и COVID-19, у взрослых рассматривают назальный IFN γ [Талызин П.А. 2022]. Для коррекции вторичного иммунодефицита при аллергии показан препарат липосомального IFN - Реаферон-ЕС-Липинт, при применении которого снижалась заболеваемость ОРВИ и гриппом [Стагниева И.В. 2015]. Препараты IFN β применяют как базисные в терапии рассеянного склероза (РС), они снижают частоту клинических обострений заболевания примерно на 35% и задерживают прогрессирование расстройств [Rudick R.A. 2011; Хабиров Ф.А. 2017]. Однако, как любая терапия, длительная интерферонотерапия может иметь свои недостатки. Известно, что часть больных РС (30-50%) не отвечает на IFN β терапию [Rio J. 2006; Гусев Е.И. 2011; Creeke P. 2013]. Это можно связать или с нарушением в сигнальном механизме IFN [Rani M,R. 2009; Vosslamber S. 2011; Forster S. 2012], или с появлением нейтрализующих антител (НАТ) к IFN β в ходе лечения [Hesse D. 2007; Creeke P. 2013]. При длительной терапии РС препаратами IFN β развивается резистентность к лечению, возможно, связанная с образованием нейтрализующих антител (НАТ) против IFN β [Hartung H. 2007; Sorensen P. 2012; Zare N. 2013; Creeke P. 2013; Hegen H. 2014; Dunn N. 2020], своевременное количественное определение которых может способствовать переходу на альтернативное лечение.

Комплексное междисциплинарное изучение системы IFN в патогенезе острых респираторных вирусных инфекций, аллергических и аутоиммунных заболеваний является актуальным направлением современных иммунологических исследований. Несомненно, актуальным является комплексное исследование интерферонов на уровнях экспрессии генов, продукции белков, противовирусной активности и изучение роли IFN при заболеваниях, связанных с нарушением иммунитета, и конечно же, поиски путей коррекции этих нарушений в виде иммунокорректирующей терапии.

Степень разработанности темы исследования

Значимость системы IFN в противовирусной защите организма была установлена в середине XX века и доказана с использованием инсерционной инактивации генов IFN *in vitro* и *in vivo*. При инактивации генов рецепторов к IFN α/β и IFN γ значительно возростала восприимчивость мышей к вирусной инфекции [Van den Brock et al. 1995; Nunez R. 1999; Wang S. 2017; Clementi N. 2021]. Респираторные вирусы (респираторно-синтициальный вирус, риновирус, вирус гриппа, аденовирус, SARS-CoV-2 и др.) способствуют развитию бронхиальной астмы (БА) и аллергических заболеваний верхних дыхательных путей с

развитием хронического воспаления [Novak N. 2020; Work Group Report of the Microbes in Allergy Committee. 2020]. Так, респираторные вирусные инфекции вызывают обострения БА и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) [Seemungal T. 2001; Jonston S. 2003; Mallia P. 2012; Novak N. 2020; Vocsan I.C. 2023]. При возникающей резистентности к лечению IFN β при рассеянном склерозе возникает необходимость создания тест-системы на количественное выявление нейтрализующих антител (НАТ) против IFN β [Sorensen P.S, 2012; Creeke P.I. 2013; Zare N. 2013; Dunn N. 2020; Оспельникова Т.П. и др. 2021].

Таким образом, необходимость анализа нарушений экспрессии генов, белков и противовирусной активности IFN у человека при исследовании пациентов с воспалительными заболеваниями бронхо-легочной системы (грипп, новая коронавирусная инфекция COVID-19, астма, БА ассоциированная с ХОБЛ), а также с хроническим аутоиммунным демиелинизирующим и нейродегенеративным заболеванием центральной нервной системы – рассеянный склероз (РС), и других, может служить основой персонализации оптимальных схем лечения и иммунореабилитации.

Цель и задачи исследования

Изучить особенности системы интерферонов (IFN) на уровне экспрессии генов, продукции белков и противовирусной активности в норме, при острых респираторных вирусных инфекциях, аллергических, аутоиммунных заболеваниях людей и при использовании иммуноактивных препаратов.

Для реализации поставленной цели сформулированы следующие задачи:

1. Разработать методы определения экспрессии генов IFN, количественного анализа индукции антител против IFN и оптимизировать метод определения активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови;
2. Оценить референтные интервалы с определением экспрессии генов IFN α , β , γ и λ , белков и противовирусной активности IFN у здоровых взрослых людей;
3. Исследовать систему IFN при респираторных инфекциях, вызванных вирусами гриппа А и В; и в результате клинического применения индукторов IFN, иммуномодуляторов;
4. Оценить систему IFN при респираторной инфекции COVID-19, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2; и при использовании вакцины ВП-4;
5. Изучить особенности системы IFN при аллергических заболеваниях (бронхиальная астма, аллергический ринит, атопический дерматит); оценить целесообразность применения сублингвального препарата IFN α -2b, индуктора IFN циклоферона и вакцины ВП-4;

6. Провести сравнительный анализ экспрессии генов, продукции и активности IFN при аутоиммунных заболеваниях (рассеянный склероз, ревматоидный артрит, системная красная волчанка и псориаз) в динамике лечения;
7. Предложить разработанный комплексный подход исследования системы IFN при иммунозависимых заболеваниях.

Научная новизна

Впервые при COVID-19 был выявлен дефицит ($p < 0,05$) биологической активности интерферонов (IFN) I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, в фазе ремиссии постковидного периода и особенно при обострении заболевания.

При аллергопатологии дыхательной системы (бронхиальная астма, аллергический ринит) и поражений кожи (атопический дерматит, хроническая крапивница) проведен сравнительный анализ противовирусной активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, и показана достоверно сниженная в среднем в 5 раз активность IFN I и II типов по сравнению с показателями физиологической нормы.

Впервые проведенный сравнительный анализ активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, при аутоиммунной патологии (рассеянный склероз, ревматические заболевания, псориаз) показал достоверно сниженную в среднем в 3 раза активность IFN I и II типов по сравнению с показателями физиологической нормы.

Впервые проведен комплексный подход исследования в динамике экспрессии генов, продукции белков и определения активности IFN у больных рассеянным склерозом на фоне терапии препаратом IFN β -1a и выявления его корригирующей роли. В ходе лечения показано снижение повышенной в лейкоцитах крови экспрессии генов IFN α и IFN β до значений показателей у здоровых добровольцев, а также увеличение активности IFN.

Благодаря разработанной биологической методике определения нейтрализующих антител, появилась возможность количественного определения антител к препарату IFN β с возможностью оптимизации эффективности лечения пациентов с рассеянным склерозом. Вероятность образования НАТ определена выше у пациентов с IFN β -1b терапией.

Впервые получены данные по клинической эффективности применения препаратов IFN, индукторов IFN, иммуномодуляторов при аллергических заболеваниях. Клиническая эффективность у пациентов, принимающих сублингвально препарат IFN α -2b, составила 95%; из них в 25% случаев наблюдалось полное устранение симптомов поллиноза. Выявлена эффективность применения препарата индуктора IFN Циклоферон при астме в ремиссии и в фазе обострения заболевания на фоне респираторных инфекций, подтвержденная

лабораторными исследованиями. При БА в фазе ремиссии выявлена клиническая эффективность иммуномодулирующего препарата бактериальных лигандов Иммуновак-ВП-4. Снижение заболеваемости ОРВИ и частоты обострений в течение года у пациентов, получавших Циклоферон и Иммуновак-ВП-4, было большим, чем в группе сравнения на базисной терапии ($p < 0,05$).

Впервые показана клиническая эффективность применения иммуноактивных препаратов при ОРВИ, в частности, препаратов индукторов IFN (Кагоцел, Циклоферон) и иммуномодулятора (Ингавирин) при гриппе и иммуностимулирующего препарата Иммуновак-ВП-4 при COVID-19 в фазе обострения и ремиссии ($p < 0,05$).

Теоретическая и практическая значимость работы

Научно-практическое значение работы вытекает из результатов исследований. В результате проведённых исследований решена научная проблема, имеющая существенное социально-экономическое значение – разработаны, оптимизированы и апробированы методики, показатели которых могут считаться характеристиками биомаркеров иммунопатологии человека. Разработана мультиплексная система для определения экспрессии генов IFN α , β , γ и λ при помощи метода обратной транскрипции с последующей ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в реальном времени. Разработан и апробирован метод количественного определения нейтрализующих антител к препаратам IFN, который позволяет предложить практикующим неврологам способ перевода пациентов рассеянным склерозом, резистентных к терапии препаратом IFN β -1b или IFN β -1a, на альтернативное лечение моноклональными антителами. Усовершенствован и апробирован метод определения биологической активности IFN «IFN статус» с возможностью культивирования клеточной культуры Vero в бессывороточной среде Гибрис-1-П, и снижения себестоимости метода. Метод определения биологической активности IFN является важным критерием состояния организма в норме и при различных иммунозависимых заболеваниях инфекционной (вирусной, бактериальной, грибковой) и неинфекционной (аллергической, аутоиммунной, онкологической) этиологии; дает возможность использования в оказании медико-лабораторных услуг населению, сокращает сроки исследования. Открыты общие закономерности снижения активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, при иммунозависимых заболеваниях и применение иммуноактивных препаратов приводит к коррекции дефицита биологической активности IFN I и II типов. Усовершенствованный метод исследования биологической активности IFN в комплексе с другими лабораторными и клиничко-анамнестическими данными поможет оценить правильность тактики лечения и прогнозировать

исход иммунозависимого заболевания. К тому же, основа метода может быть использована для контроля биологической активности и качества выпускаемых лекарственных препаратов IFN, а также при скрининговых исследованиях индукторов образования IFN различной химической природы.

Получены новые данные участия системы IFN в мукозальном и системном иммунитете при респираторных инфекциях (грипп, коронавирус, аденовирус), аллергических (атопический дерматит, аллергический ринит, бронхиальная астма, крапивница); системном иммунитете при аутоиммунных (рассеянный склероз, ревматические заболевания, псориаз) заболеваниях, а также у практически здоровых людей. Показатели удельной активности свидетельствуют о дефиците противовирусной защиты при астме и особенно ОРВИ, однако при рассеянном склерозе отмечено компенсаторное перераспределение с преобладанием IFN α . Отличия системы IFN при аллергических заболеваниях от острых вирусных инфекций включают: отсутствие экспрессии гена IFN β , выявление РНК IFN α в 58,3% образцах и РНК IFN λ - в 42,9% образцах и низкий уровень РНК IFN-стимулированного противовирусного белка МхА в индуцированной мокроте пациентов с астмой. Концентрации IFN γ ($p < 0,001$) в сыворотке крови при БА значительно превышали значения у здоровых добровольцев. Выявлено, что бронхолегочные и кожные аллергические заболевания сопровождаются однонаправленным снижением активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови.

При респираторных вирусных инфекциях показаны отличия системы IFN в мазках носоглотки и в крови. У всех пациентов при гриппе показана экспрессия генов IFN β и IFN λ , РНК IFN γ присутствовала в 50% мазков при отсутствии РНК IFN α . При инфекции коронавирусом SARS-CoV-2 обнаружена сниженная экспрессия IFN λ в мазках по сравнению со здоровыми добровольцами. При острой инфекции ДНК-содержащим аденовирусом выявлено присутствие в 80% случаев экспрессии IFN β и IFN λ в мазках, при отсутствии экспрессии IFN α и IFN γ во всех образцах мазков.

В лейкоцитах крови при инфекциях РНК-содержащими вирусами гриппа А и В показана экспрессия IFN α в лейкоцитах крови при повышенных концентрациях белка IFN α в сыворотке крови ($p < 0,05$) и повышенных значений активности суммарного IFN в сыворотке крови. Экспрессия IFN γ и IFN β отсутствовали в крови. Экспрессия IFN λ при гриппе обнаружена в лейкоцитах крови всех пациентов. При инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, обнаружено угнетение активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, наряду с увеличением концентраций белков IFN α , IFN γ и IFN λ в сыворотке крови. При острой инфекции ДНК-содержащим аденовирусом выявлена экспрессия IFN α с присутствием РНК IFN β и IFN λ в крови при отсутствии РНК IFN γ во всех образцах крови, что обуславливало возможное снижение противовирусной активности IFN.

Выявлена сниженная активность IFN, продуцируемых лейкоцитами крови, повышенная экспрессия генов IFN (IFN α ($p < 0,001$), IFN β ($p < 0,01$), IFN λ ($p < 0,001$) и IFN γ) в лейкоцитах крови пациентов с рассеянным склерозом, по сравнению со здоровыми добровольцами, которая может усугублять текущую аутоиммунную патологию. Применение препаратов IFN β с многофакторным механизмом действия способствует коррекции системы IFN.

В данной работе показана клиническая эффективность препаратов IFN I типа при АЗ (аллергический ринит), АИЗ (рассеянный склероз), индукторов IFN при гриппе и АЗ (бронхиальная астма, атопический дерматит), иммуномодуляторов при гриппе, COVID-19 и АЗ (бронхиальная астма) ($p < 0,05$).

В процессе выполнения работы были предложены и запатентованы 3 изобретения Российской Федерации в области клинической лабораторной диагностики, иммунологии. Следует отметить, что проблема нарушений системы IFN при иммунозависимых заболеваниях и их коррекция входит в Приоритетные направления Стратегии НТР РФ (п.20): *Персонализированная медицина, нанотехнологичное здравоохранение и технологии здоровьесбережения.

Методология и методы исследования

Разработан дизайн комплексного подхода изучения, включающий исследования на основе молекулярно-генетических, культуральных, вирусологических, иммунологических методов и статистического анализа данных. Собраны клинические образцы от больных с респираторными вирусными инфекциями (грипп, аденовирусная и коронавирусная инфекция), аллергическими заболеваниями дыхательной системы (бронхиальная астма (БА), аллергический ринит (АР), сочетанные БА с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), и БА с АР), аллергическими заболеваниями кожи (атопический дерматит (АтД), хроническая крапивница (ХК)), аутоиммунной патологией (рассеянный склероз (РС), ревматические заболевания (ревматоидный артрит (РА), системная красная волчанка (СКВ), болезнь Шегрена (БШ), болезнь Бехчета (ББ)), псориаз), а также группы контроля (условно здоровые лица). Предложены пути коррекции нарушений интерферогенеза иммуноактивными препаратами, которые нормализуют исходный дефицит биологической активности интерферонов I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан комплексный подход для анализа системы интерферонов, который включает количественное определение РНК и белков интерферонов α , β , γ и λ , а также определение противовирусной активности и количественное определение индукции нейтрализующих антител против препаратов интерферонов. Определены референтные интервалы интерферонов у практически здоровых людей.
2. Показаны качественные и количественные особенности интерферонов на локальном и системном уровнях при острых респираторных вирусных инфекциях. С применением иммуноактивных препаратов при респираторных вирусных заболеваниях отмечена нормализация показателей интерферонового статуса.
3. При аллергопатологиях дыхательной системы и кожи выявлены повышенные концентрации белков IFN α и IFN γ в сыворотке крови, сниженная биологическая активность интерферонов, продуцируемых лейкоцитами крови, с нормализацией показателей системы интерферонов после коррекции иммуноактивными препаратами (препараты интерферона, индукторы интерферона, иммуномодуляторы).
4. Комплексный анализ системы IFN при аутоиммунных заболеваниях показал значительно повышенные уровни экспрессии генов IFN I типа (α/β) и III (λ) типа у больных рассеянным склерозом в лейкоцитах крови по сравнению с контрольной группой практически здоровых людей, высокие концентрации белков IFN β и IFN γ в сыворотке крови больных на фоне сниженной активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови. Выявлена сниженная активность IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, при ревматических заболеваниях, псориазе и показана иммунокоррекция нарушений активности IFN.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Общая концепция диссертационного исследования обсуждалась совместно с научными консультантами – академиком РАН, д.м.н., профессором РАН Оксаной Анатольевной Свитич и академиком РАН, д.м.н., профессором Феликсом Ивановичем Ершовым. Клинический материал (подбор пациентов для включения в исследование в соответствии с критериями, их анамнез, биопробы) любезно предоставлен от медицинских сотрудников соответствующих клиник, анализ полученных результатов которых отражен в совместных публикациях. Соискатель внес определяющий вклад в проведение исследований *in vitro*: разработке тест-системы ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной

детекцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) для одновременной детекции мРНК генов IFN I, II, III типов, оценке экспрессии IFN I, II, III типов, оценке концентрации белков IFN, оптимизации метода по оценке биологической активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, разработке метода количественного определения нейтрализующих антител против препарата IFN β . Анализ современной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой теме диссертации, статистическая обработка, интерпретация и обобщение полученного фактического материала, оформление рукописи диссертации, представление результатов работы в научных публикациях и докладах на конференциях осуществлялись лично автором.

Степень достоверности и апробация результатов

Изложенные в диссертации результаты опубликованы в открытой печати. Достоверность представленных в диссертации данных обусловлена объемом экспериментального материала и подтверждается использованием современных методов исследования, соответствующим цели работы и поставленным задачам. Научные положения, выводы и практические рекомендации основаны на фактических данных, показанных в таблицах и рисунках. Интерпретация полученных результатов проведена с использованием методов обработки информации и статистического анализа.

Материалы диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях и конгрессах: II конгрессе РОКИРС с международным участием в Ярославле (10-12 сентября, 2015); Научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая иммунология» (иммунодиагностика, иммунопрофилактика и иммунотерапия), Крым (27 сентября - 3 октября, 2015); I Калининградском научном иммунологическом форуме (27 - 30 июня, 2016); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика» в Москве (18-20 апреля, 2017); Всероссийской научно-практической конференции «Демиелинизирующие заболевания центральной и периферической нервной системы. Редкие и атипичные формы» в Ярославле (24-25 мая, 2017); XXVII Национальном конгрессе по болезням органов дыхания в СПб (17-20 октября, 2017); IV Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием в Сочи (1-4 ноября, 2017); Всероссийских научных Форумах «Дни иммунологии» в СПб (2017, 2023); IX Сибирской межрегиональной научно-практической конференции «Аутоиммунные заболевания нервной системы – от диагноза к терапии» в Новосибирске (14-16 февраля, 2019); 15-м Международном междисциплинарном конгрессе по аллергологии и иммунологии в Москве (22-24 мая, 2019); Конференциях Европейского респираторного

общества “Метаболические альтерации в развитии респираторных заболеваний” в Эшторил, Португалия (7-10 марта, 2020; 10-13 марта, 2022); 10-й Юбилейной международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2020» в Москве (14-16 апреля, 2020); Всероссийском конгрессе лабораторной медицины в Москве (19-21 октября, 2021); III Междисциплинарной онлайн-конференции по инфектологии Приволжского района в Казани (30 ноября 2022); Конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность-2023» в Москве (27-28 апреля, 2023); Юбилейной конференции по медицинской микологии и микробиологии в Москве (17-18 мая, 2023); IX Конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням в СПб (23-25 мая, 2023); X Российской научной конференции с международным участием, посвященной 300-летию Российской академии наук, Десятилетию науки и технологий в Оренбурге (20-22 сентября, 2023); Российском диагностическом саммите - 9 Российском конгрессе лабораторной медицины в Москве (04-06 октября, 2023); Всероссийской конференции «COVID-19 – экспертный опыт работы в условиях пандемии и межковидный период. Все о диагностике, лечении, реабилитации пациентов. Коморбидный пациент — междисциплинарный подход». 10 октября 2023, онлайн; Научно-практической конференции «Современная иммунопрофилактика 2023» в Москве (12-13 октября, 2023) и других (Приложение А).

Апробация работы проведена на заседании Ученого совета ФГБНУ НИИВС им.И.И.Мечникова (протокол № 3 от 10.07.2024).

Внедрение результатов работы в практику

Разработан ряд методических рекомендаций: «Определение нейтрализующей активности антител к препаратам интерферонов в сыворотке крови человека». ФГБНУ НИИВС им.И.И.Мечникова. Москва, 2017, 19 с.; «Интерфероновый статус - показатель неспецифической резистентности организма человека». ФГБНУ НИИВС им.И.И.Мечникова. Москва, 2017, 16 с.; «Методические рекомендации по доклиническому изучению специфической противовирусной активности лекарственных веществ» в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Глава 32: 527-551. Москва. 2012.

Результаты проведенной работы нашли отражение в Методических рекомендациях, утвержденных Департаментом здравоохранения города Москвы: №5 «Применение циклоферона (меглумина акридоацетат) в комплексной терапии больных бронхиальной астмой при острых респираторных инфекциях»; №38 «Применение препарата Кагоцел для лечения и профилактики острых респираторных вирусных инфекций у взрослых и детей».

*Практические рекомендации. «Определение интерферонового статуса как показателя неспецифической резистентности организма человека». М., 2018. 26 с.

В настоящей работе при указанных заболеваниях доказана важно-ключевая роль нарушений в системе IFN и научно-обоснованное применение корригирующей терапии с иммуноактивными препаратами. Препарат Кагоцел был разрешён МЗ РФ для медицинского применения в качестве лечебного средства при гриппе, других ОРВИ на основании полученных при проведении клинических исследований результатов (Регистрационное удостоверение Р № 002027/01-2003 от 09.01.03). Препараты Кагоцел и Ингавирин применяют в клинической практике при гриппе, осложнённом и неосложнённом бактериальной инфекцией (Акт о внедрении ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ»). Материалы исследования включены в курс лекций врачам-инфекционистам. Препарат Циклоферон рекомендован больным БА для профилактики обострений астмы; вакцина Иммуновак-ВП-4 зарекомендовала себя как препарат, способствующий более длительной ремиссии при БА; показан стойкий профилактический эффект сублингвального применения препарата IFN α -2b при поллинозе с увеличением периода ремиссии. Материалы исследования включены в курс лекций врачам-аллергологам. Имеется Акт о внедрении возможности применения иммуноактивных препаратов в ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России. На базе неврологического отделения МОНИКИ больным с РС внедрена практика выявления и количественного определения НАТ для коррекции лечения препаратами IFN β . Имеется Акт о внедрении методики определения НАТ в МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Описано поддерживающее лечение индуктором IFN Циклоферон пациентов в дебюте заболевания с низким индексом инвалидизации. Результаты диссертационной работы включены в курс лекций врачам-вирусологам, повышающим квалификацию, на базе кафедры «Инфектология и вирусология» Первого МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ России.

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Диссертация соответствует паспортам научных специальностей: 3.2.7. Иммунология (медицинские науки) и 1.5.10. Вирусология (медицинские науки). Соответствие диссертации паспорту научной специальности 3.2.7. Иммунология: п.5. изучение патогенеза иммуноопосредованных (аллергии, первичные и вторичные иммунодефициты, аутоиммунные болезни) и других заболеваний; п.6. разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов; 1.5.10. Вирусология: п.9. возбудители вирусных инфекций человека; п.10. разработка мер предупреждения, диагностики и лечения вирусных заболеваний, совершенствование лабораторной диагностики, терапии, и иммунопрофилактики вирусных

инфекций; п.11. противовирусные препараты. Интерфероны и индукторы интерферона: изучение механизма действия, получение и применение.

Публикации

По результатам диссертационного исследования автором опубликовано 36 научных работ, в том числе 2 статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора наук, 10 статей в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, Chemical Abstracts, Springer, 12 иных публикаций по результатам исследования, 1 монография, 3 патента РФ, а также 8 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 259 страницах компьютерного текста и состоит из введения и 3 глав, включающих обзор литературы (глава 1), методы исследования (глава 2), и основная часть работы, которая состоит из главы результатов собственных исследований и обсуждения (глава 3), а также заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. В текст диссертации включены 40 рисунков, 38 таблиц, 3 приложения. Список литературы содержит 676 источников, в том числе 198 отечественных публикаций и 478 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Характеристика пациентов с их подтвержденными диагнозами и базы предоставленных биоматериалов для научной работы отражены в Таблице 1. Клинические образцы получены от здоровых добровольцев и пациентов с иммунозависимыми заболеваниями при наличии информированного согласия. Клинико-лабораторные исследования выполнены в период с 1998 по 2022 годы с соблюдением требований Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации, в соответствии с Федеральным законом «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 г. № 323-ФЗ (ред. от 02.07.2021).

Клинические образцы для анализа (лейкоциты крови, сыворотка крови, носоглоточные мазки, индуцированная мокрота) получены при одобрении медицинских исследований локальными Этическими Комитетами и наличии информированного согласия от пациентов: респираторные вирусные инфекции (n=414), аллергические патологии (n=274), аутоиммунные заболевания (n=464); здоровых добровольцев (n=164), что отражено в общем протоколе № 2 Локального Совета по Этике ФГБНУ НИИВС им.И.И.Мечникова от 23.03.2022 г. Группа здоровых добровольцев не имела указанных патологий респираторно-вирусного, аллергического и аутоиммунного генеза.

Таблица 1 – Заболевания и базы предоставленных биоматериалов для научной работы

Заболевание (кол-во человек)	Организация	Образцы любезно предоставлены:
Респираторные вирусные инфекции (n=414): Грипп (n=250); Аденовирусная инфекция (n=7); COVID-19 (n=157).	ГБУЗ «ИКБ №1 ДЗМ»; ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России, ГКБ №57; ФГКУЗ «Главный военный клинический госпиталь войск национальной гвардии РФ»	д.м.н., проф. Л.В.Колобухина; д.м.н. Г.Л.Осипова; заслуженный врач РФ В.И. Губань
Аллергические заболевания (n=274): Бронхиальная астма (БА, n=95); БА ассоциированная с ХОБЛ (n=49); ХОБЛ (n=11); Аллергический ринит (АР, n=26); АР совместно с БА, n=34); Атопический дерматит (n=28); Хроническая крапивница (n=31).	ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России, ГКБ №57; ГКБ №14 им. В.Г.Короленко; Центр семейной медицины; КДЦ ФГБНУ НИИВС им.И.И.Мечникова	академик РАН А.Г.Чучалин; д.м.н. Г.Л.Осипова; д.м.н. Н.А.Черевко; Ш.М. Гайнулин; к.м.н. С.Ю.Конаныхина
Аутоиммунные заболевания (n=464): Рассеянный склероз (n=217); Ревматоидный артрит (n=68); Системная красная волчанка (n=75); Болезнь Шегрена (n=34); Болезнь Бехчета (n=10); Псориаз (n=60).	НИИ ревматологии, ГКБ №52 кафедры кожных и венерически болезней РУДН, МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского, Центры по Рассеянному склерозу (МОНИКИ, Москва; РКДЦ ДЗ МЗ РТ, Казань)	д.м.н. проф. С.В.Котов; д.м.н. проф. Ф.А. Хабиров; д.м.н. Т.И. Хайбуллин; д.м.н. проф. Л.Д. Тищенко; д.м.н. проф. Р.М.Балабанова
Условно здоровые добровольцы (n=164)	ФГБНУ НИИВС им.И.И.Мечникова, ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» МЗ РФ, Центр семейной медицины, РКДЦ ДЗ МЗ РТ	академик РАН, д.м.н. проф. Ф.И.Ершов; академик РАН, д.м.н. проф. РАН О.А.Свитич; д.м.н. Н.А.Черевко; д.м.н. Т.И. Хайбуллин

Материалы

Культуры клеток. Фибробласты легких эмбриона человека (ФЛЭЧ) любезно предоставлены и взяты из Государственной коллекции клеточных культур Национального

исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Почетного академика Н.Ф.Гамалеи Минздрава РФ. Клетки почки Африканской зеленой мартышки (Vero) любезно предоставлены и взяты из Государственной коллекции клеточных культур Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Почетного академика Н.Ф.Гамалеи Минздрава РФ и коллекции клеточных культур Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ЦКП "Биобанк" Медико-генетического научного центра имени академика Н.П.Бочкова; культивируются до конфлюэнтного монослоя.

Вирусы. Вирус болезни Ньюкасла (Newcastle Disease Virus (NDV) (номер депонирования 384) с активностью используемого вируса не менее 10^8 ЦПД₅₀; вирус энцефаломиокардита мышей (encephalomyocarditis virus (EMC)) (номер депонирования 787); вирус везикулярного стоматита (vesicular stomatitis virus (VSV), (штамм Индиана) с титром не менее 10^5 ТЦД₅₀/0,1 мл. Вирусы любезно предоставлены и взяты из Государственной Коллекции Вирусов Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Почетного академика Н.Ф.Гамалеи Минздрава РФ и коллекции вирусов Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова.

Использованные фармакологические препараты применялись пациентами в клиниках или амбулаторно по назначению и под наблюдением лечащих их докторов на фоне базисной терапии, биопробы пациентов исследованы нами в реакции *in vitro* в лаборатории в динамике лечения. Сами препараты использованы в лаборатории в *in vitro* реакциях для определения чувствительности к препаратам, определения нейтрализующих антител.

1) Препараты интерферонов (IFN): Препарат IFN α -2b РЕАФЕРОН-ЕС (IFN α -2b) - регистрационный номер: №000642/01, 30.12.2003, 2000 МЕ («Вектор-Медика», г. Новосибирск). РЕАФЕРОН-ЕС - рекомбинантный α 2-IFN, продуцируемый бактериальными клетками штамма *Escherichia coli*; препарат использован для профилактической схемы пациентам при поллинозе (АР) сублингвально (под язык) в разовой дозе 2000 МЕ 1 раз утром, натощак, в течение 30 дней за 30 мин до еды. Препараты IFN β : Препараты IFN β -1a: Генфаксон(Genfaxon), Ребиф(Rebif). Лечение больных РС проводили препаратом IFN β -1a «Генфаксон» (Лаборатория «Тьютор С.А.С.И.Ф.И.А.», Аргентина), «Ребиф» (Мерк Сероно, Италия), который представляет рекомбинантный IFN β человека, выделенный из трансфицированной культуры клеток яичника китайского хомячка, по стандартной схеме 22 или 44 мкг/мл подкожно, 3 раза в неделю. Белковая структура препаратов (интерферон бета-1a рекомбинантный человеческий) представляет собой природную аминокислотную последовательность интерферона бета человека, полученную методом геной инженерии с использованием культуры клеток яичника китайского хомячка. Препараты IFN β -1b: (Интерферон бета-1b (ЗАО «БИОКАД», Россия), Инфибета (Генериум, Россия), Ронбетал (ЗАО «БИОКАД», Россия). Рекомбинантный IFN β -1b

выделяют из клеток *Escherichia coli*, в геном которых клонирован ген человеческого IFN β , кодирующий аминокислотный остаток серина в 17-й позиции. IFN β -1b представляет собой негликозилированный белок с молекулярной массой 18500 Да, состоящий из 165 аминокислотных остатков.

2) Препараты индукторов IFN. Амиксин (тилорон) – 2,7-бис-[2-(диэтиламино)этокси] флуоренон-9дигидрохлорид (ОАО «Фармстандарт», Россия). Фармакотерапевтическая группа: противовирусное иммуностимулирующее средство - индуктор образования интерферонов. Кагоцел – натриевая соль сополимера (1 →4) – 6 – 0 - карбоксиметил - β - D - глюкозы, (1 →4) -) β - D - глюкозы, (21 →24) -2,3,14,15,21,24,29,32 – октагидрокси – 23 - (карбоксии -метоксиметил) - 7,10 - диметил - 4,13 – ди (2 - пропил) - 19, 22, 26, 30, 31 – пентаокса-гептацикло [23, 3, 2, 2¹⁶, 0^{5,28}, 0^{8,27}, 0^{9,18}, 0^{12,17}] дотриаконта – 1, 3, 5(28), 6, 8(27), 9(18), 10, 12(17), 13, 15 – декаена («Ниармедик Фарма», Россия). Препарат оригинальный, в ведущих фармакопеех мира не описан (Патент РФ № 2002755 от 15.11.93, заявка на патент РФ № 2000119630 от 21.07.2000). Препарат относится к индукторам IFN, представляет собой высокомолекулярное соединение, карбоксии-метилцеллюлозы, ковалентно связанной с госсиполом (содержание модифицированных молекул госсипола в составе препарата Кагоцел не превышает 3%). Фармакотерапевтическая группа: противовирусное средство. Неовир® - Оксодигидроакридинацетат натрия («Фармсинтез», Россия). Фармакотерапевтическая группа: иммуностимулирующее средство. Циклоферон (меглумина акридонацетат) – низкомолекулярный индуктор IFN. Разработчик и производитель препарата: НТФФ «Полисан» (Санкт-Петербург, Россия). Фармакотерапевтическая группа: иммуностимуляторы; другие иммуностимуляторы.

3) Препарат бактериальных лигандов Иммуновак-ВП-4. Иммунотропный препарат из бактериальных лигандов: поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4, представляющая собой комплекс из 4-х антигенов условно-патогенных микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*). Разработчики препарата профессор Н.Б.Егорова с коллегами НИИВС им.И.И.Мечникова. Препарат не содержит консерванта и выпускается в сухом лиофилизированном виде; разрешен к применению для подкожного введения (ЛСР-001294/10 от 24.02.2010) и назально-перорального введения (ЛСР-001293/10 от 24.02.2010), (ФГУП «НПО «Микроген» (Уфа, Россия). Фармакотерапевтическая группа: вакцина.

4) Ингавирин - Имидазолилэтанамид пентандиовой кислоты (Imidazolyl ethanamide pentandioic acid) (АО «Валента Фарм», Россия). Фармакотерапевтическая группа: противовирусное средство. Противовоспалительное средство.

Методы

Для решения поставленных задач были использованы методы молекулярной биологии, иммунологии, вирусологии и статистический анализ результатов.

Культивирование клеток. Клетки ФЛЭЧ культивировали в условиях $(37\pm 2)^\circ\text{C}$ в атмосфере CO_2 $(5,0\pm 0,5)\%$ и $(90\pm 5)\%$ влажности в среде DMEM, содержащей 40 мкг/мл гентамицина и 300 мкг/мл L-глутамина, 10% ЭТС в течение 1-2 суток в лунках плоскодонного 96-луночного планшета в количестве $2\cdot 10^4$ клеток/лунку. Клетки Vero сывороточного ведения выращивали в среде DMEM/F12 при тех же условиях культивирования. Поддержание адаптированной бессывороточной линии клеток Vero-SF и все манипуляции при исследовании проводили в специальной бессывороточной среде для прикрепляемых клеток «Гибрис-1-П» (ООО НПП «ПанЭко») [Табак В.Ю. 2013].

Метод обратной транскрипции с последующей ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) применяли для: 1) изучения экспрессии генов IFN. Выделение нуклеиновых кислот из лейкоцитов крови или из материалов респираторного тракта (носоглоточные мазки, мокрота) с применением набора "Проба-НК" производства "ДНК-технология" (Москва), РНК IFN I ($\text{IFN}\alpha/\beta$), II ($\text{IFN}\gamma$) и III ($\text{IFN}\lambda$) типов детектировали посредством обратной транскрипции с использованием набора "Reverta-L" ("АмплиСенс", Москва) с последующей ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) со специфическими праймерами и флуоресцентными зондами, выбранными на основании множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей мРНК IFN I (α/β), IFN II (γ), IFN III (λ), MxA из базы GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 2) определения респираторных вирусов с использованием тест-систем, разрешенных приказами Росздравнадзора. Выделение суммарных нуклеиновых кислот проводили посредством лизиса клинических образцов в растворе гуанидинизотиоцианата с последующим спиртовым осаждением с использованием комплекта реагентов «Проба-НК» («ДНК-технология», Москва). Для обратной транскрипции со случайным гексамерным олигодезоксирибонуклеотидом применяли комплект реагентов «Реверта- L» производства «АмплиСенс» (Москва). Для определения РНК респираторно-синцитиального вируса (hRSv), метапневмовируса (hMPv), вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов (hPiv), коронавирусов (hCoV), риновирусов (hRv), ДНК аденовирусов групп В, С и Е (hAdv), бокавируса (hBoV) применяли набор «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL», РНК вирусов гриппа А и В (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора РФ) – набор «Амплисенс® Influenza virus A/B-FL» и РНК коронавируса SARS-CoV-2 – набор «РеалБест РНК SARS-CoV-2» («ВекторБест», Россия).

Метод иммуноферментного анализа (ИФА).

1) определение концентраций цитокинов $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ с применением наборов (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), для $IFN\beta$ («BioSource», Япония and «pbl interferon source», США), $IFN\lambda$ (Bender MedSystem, Австрия) в соответствии с инструкциями производителей. Методом ИФА в сыворотке крови, индуцированной и спонтанной продукции клеток крови («Цитокин-Стимул-Бест», ЗАО «Вектор-Бест», Россия), индуцированной мокроте измеряли количества IFN и других ключевых цитокинов. Для измерения оптической плотности при длине волны 450 нм использовали планшетный спектрофотометр Anthos 2010 («Biochrom LTD», Англия). Концентрации IFN в пг/мл определяли по калибровочным графикам с использованием программы ADAP+ (ЗАО «БиоХимМак», Россия).

2) определение в парных сыворотках уровней IgG к вирусам гриппа А (H1N1, H3N2) и В, аденовирусу, РС-вирусу, вирусам парагриппа 1 и 3 типа и IgM к РС-вирусу (ООО «Предприятия по производству диагностических препаратов», С-Петербург). Увеличение ОП на 0,3 единицы в сыворотке реконвалесцента по сравнению с сывороткой, полученной в острой фазе заболевания и взятой в том же разведении, расценивалось как диагностически достоверное.

3) определение количества связывающих антител к $IFN\beta$ (CAT) с помощью тест-системы «BÜHLMANN anti- $IFN\beta$ BAV ELISA» (BÜHLMANN Laboratories AG, Швейцария) в соответствии с инструкциями производителей. Набор предназначен для прямого и количественного определения антител IgG в сыворотке крови человека к терапевтически применяемому $IFN\beta$. По инструкции производителя, образцы сывороток крови больных РС, получающих терапию $IFN\beta$, калибраторы и контроли инкубировали в лунках микропланшет, покрытых смесью различных молекул $IFN\beta$ (нативный человеческий $IFN\beta$, $IFN\beta$ -1a и $IFN\beta$ -1b). По протоколу CAT в сыворотке крови выражали в единицах Bühlmann Titer Units (BTU). Разведение референсного образца из набора, при котором результаты ИФА меньше отрицательного контроля, принимается за титр референсного образца, выраженный в Bühlmann Titer Units (BTU). Образцы сывороток крови здоровых добровольцев также были протестированы данным методом, уровни BTU которых использовали для уточнения результатов ИФА сывороток больных РС.

Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с использованием магнитных микросфер (Unknown (X) Multi Analyte Profiling (xMAP)) для определения 37 биомаркеров воспаления и 12 регуляторных цитокинов проводили в соответствии с инструкцией к наборам «Bio-Plex ProTM Human Inflammation Panel 37-plex» (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) и «Bio-Plex ProTM Human Treg Cytokine Panel 12-plex» (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) с использованием анализатора «MAGPIX» ("BioRad", США).

Определение биологической активности IFN (IFN статус), продуцируемых лейкоцитами крови, оценивали методом титрования интерферонов с применением жизнеспособного вируса. Определение активности IFN проводили микрометодом, используя диплоидную культуру клеток фибробластов человека (ФЛЭЧ) и клетки почки Африканской зеленой мартышки Vero. На этапе пробоподготовки (питательная среда RPMI-1640, ООО НПП «ПанЭко», Россия) индуцировали *in vitro* цельную кровь вирусом болезни Ньюкасла и фитогемагглютинином (ООО НПП «ПанЭко», Россия). Далее после этапов титрования, заражения индикаторным вирусом (EMC/VSV), выявляли биологическую активность: циркулирующего (сывороточного) IFN; спонтанного IFN; индуцированных IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, в реакции *in vitro*. За титр биологической активности (ТБА) IFN принимали величину обратного разведения, которая обеспечивала защиту 100-50% монослоя клеток от цитопатического действия (ЦПД) вируса. За показатели физиологической нормы IFN α/β принимались значения от 640 ТБА, IFN γ - от 64 ТБА, сывороточного IFN < 2-8 ТБА, спонтанно продуцируемого IFN < 2 ТБА, которые были получены в образцах от здоровых добровольцев [Ершов Ф.И. 1996, Оспельникова Т.П. 2021]. Индивидуальное тестирование к иммуномодулирующим препаратам оценивали по возрастанию титров активности IFN γ после воздействия указанных препаратов на лейкоциты периферической крови (ЛПК) *in vitro* [Патент RU2657808, 2018].

Количественное определение нейтрализующих антител (НАТ) к IFN β проводили культурально-вирусологическим методом с использованием культуры клеток Vero и индикаторного вируса VSV. Сыворотки от пациентов с диагнозом рассеянный склероз были исследованы на наличие НАТ. Количество антител в сыворотке, нейтрализующих активность IFN β , отражено в способности сыворотки нейтрализовать активность препарата в количественном значении, определяемому по ЦПД тест-вируса VSV на клетки Vero, в сравнении с сывороткой крови человека, не принимающего препарат IFN β , и оцениваемое в предложенных нами единицах измерения - нейтрализующих единицах (НЕ) [Патент RU2626832, 2017].

Статистический анализ результатов. При обработке данных использовали общепринятые методы вариационной статистики (программные пакеты BioStat, Statistica и Microsoft Excel), с вычислением средней арифметической и средней геометрической величин со стандартными отклонениями, вычислением частоты встречаемости в процентах и ошибки процентов, медианы Me с интерквартильным размахом (25%, 75%), доверительного интервала для среднего значения случайной величины [Реброва О.Ю. 2002]. При нормальном распределении экспериментальных значений различия между группами оценивали с помощью параметрического t-критерия Стьюдента. Статистическая обработка результатов также проводилась с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни для независимых

выборок. Различия считались достоверными, если уровень значимости не превышал 5% ($p < 0,05$). Для выявления корреляций между различными признаками использовали коэффициент корреляции Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нарушения иммунной системы играют основную роль в иммунозависимых заболеваниях (ИЗЗ) инфекционной, аллергической и аутоиммунной природы. Для выявления возможных нарушений врожденного иммунитета, оценки рисков вирусных, аллергических или аутоиммунных осложнений продолжаются биомедицинские исследования системы IFN и разработки подходов для терапии иммунозависимых заболеваний.

Разработка и оптимизация мультиплексной системы определения экспрессии генов IFN трех типов и активности IFN I и II типов

Для всестороннего изучения системы интерферонов применяли комплекс методов, позволяющих исследовать экспрессию генов, продукцию белков, противовирусную активность IFN, продуцируемых лейкоцитами крови. Была разработана мультиплексная система для определения экспрессии генов IFN α , β , γ и λ при помощи метода обратной транскрипции с последующей ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов в реальном времени. Количественные оценки уровней экспрессии генов IFN проводили с использованием калибровочных зависимостей пороговых циклов флуоресценции (Ct) от количеств геном-эквивалентов исследуемых РНК-мишеней в реакционной смеси и с помощью уравнения Лукьянова-Матца.

Исторически исследование многофункциональных белков IFN началось с открытия IFN Isaacs A. и Lindenmann J. в 1957 году. Первоначально тестирование активности IFN проводили «макрометодом» на выделенных лимфоцитах, что требовало больших количеств крови и не позволяло использовать этот метод в клинической практике [Соловьев В.Д. 1981, Doldi K. 1985]. В 70-80-х годах прошлого столетия был предложен микрометод оценки функциональной активности IFN, преимуществом которого стало использование цельной крови пациента в минимальном количестве без выделения лимфоцитов [Campbell J. 1979, Richmond J.Y. 1980, Kirchner H. 1982; Grossberg, S.E. 1984], что позволило сократить время исследования, материалы и реактивы. Также была показана возможность использования в реакции крови, взятой днём ранее и при сохранении её в холодильнике. Микрометод оказался применим для массовых исследований и особенно важен в педиатрии [Tilles J.G. 1968].

Однако, существовал ряд недостатков, связанных как с ведением культуры клеток, так и с дозами индикаторных вирусов. В уже существующих методах оценки противовирусной активности IFN использовались дорогостоящие, чувствительные к IFN, диплоидные клеточные культуры (ФЛЭЧ, ЛЭЧ, ФЭЧ, М-19, М-22 и т.п.). Пригодный рабочий потенциал культуры клеток фибробластов эмбриона человека составляет ограниченное (6-14) число пассажей. Для ведения этих культур требуются питательные среды с добавлением ЭТС, качество которой варьирует от партии к партии и существует потенциальная возможность контаминации вирусами, микоплазмами и бактериями. Для изучения активности интерферонов проведено сравнение разных культур клеток, которое показало, что при титровании активность IFN, продуцируемых лейкоцитами крови, была одинаковой как в культуре клеток ФЛЭЧ, так и с использованием трансформированных клеток почки африканской зеленой мартышки Vero, культивируемых с применением сывороточных и бессывороточных питательных сред. Преимущество использования клеточной культуры Vero-SF, адаптированной к бессывороточной питательной среде Гибрис-1-П производства «ПанЭко», содержащей факторы роста, состоит в возможности стандартизировать метод; снижает себестоимость; не требует замены ростовой среды с 10 % ЭТС на поддерживающую среду с 2 % ЭТС. При этом чувствительность клеток Vero, культивируемых на бессывороточных средах, к IFN I и II типов сохраняется при неограниченной способности к пассированию. Предложена единица измерения функциональной активности IFN - титр биологической активности IFN (ТБА) – это величина обратного разведения, при котором задерживается деградация монослоя клеток от внесенного тест-вируса VSV, т.е. то максимальное разведение, при котором наблюдается 100 % защита монослоя клеток от вируса. Учет результатов проводится по последней лунке 100% защиты монослоя клеток, но, если в следующей лунке титрования имеется 50% защита монослоя, то берется их среднее значение. Для определения активности IFN установлена рабочая доза индикаторного вируса, содержащая 10 доз ТЦД₅₀/0,1 мл (при титре вируса 10⁵ ТЦД₅₀/0,1 мл). Для количественного определения нейтрализующих антител к препарату IFNβ в сыворотке крови больных с рассеянным склерозом, принимающих препараты IFNβ, установлена рабочая доза индикаторного вируса, содержащая 100 доз ТЦД₅₀/0,1 мл (при титре вируса 10⁵ ТЦД₅₀/0,1 мл).

Таким образом, разработаны, апробированы и оптимизированы методы для изучения экспрессии генов и биологической активности интерферонов. Мультиплексное количественное определение экспрессии генов IFN трех типов осуществляли при помощи метода обратной транскрипции с последующей ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов в реальном времени, использованием калибровочных зависимостей пороговых циклов флуоресценции (Ct) от количеств геном-эквивалентов исследуемых РНК-мишеней в

реакционной смеси и с помощью уравнения Лукьянова-Матца. Для определения биологической активности IFN использовали подобранную систему «клетка-вирус», с установлением рабочей дозы индикаторного вируса. В результате проведенных исследований выявлена экспрессия генов и активность IFN у практически здоровых людей, показатели которых дают возможность сравнительного анализа с экспрессией генов IFN и активностью IFN при ИЗЗ.

Определение показателей экспрессии генов IFN трех типов и активности IFN I и II типов у практически здоровых людей

Разработанные методы были применены для определения экспрессии генов IFN трех типов и активности IFN I и II типов у практически здоровых добровольцев, а также у пациентов с ИЗЗ. Методом ОТ-ПЦР-РВ определяли экспрессию генов IFN в лейкоцитах крови и мазках носоглотки здоровых людей. На основании количественного ИФА с калибровочными зависимостями оптической плотности для стандартных концентраций IFN каждого типа определены диапазоны варьирования концентраций белков IFN и их средние значения, с последующим вычислением значений каждого IFN в 1 мл крови. Показаны диапазоны противовирусной активности IFN, выраженные в обратных титрах, их средние значения и определена удельная активность IFN I и II типов. Активность IFN в сыворотке крови определена как 0÷8,0 ТБА при отсутствии спонтанного IFN *in vitro*.

Комплекс методов позволил определить референтные интервалы и референсные значения экспрессии генов IFN, противовирусную и удельную активность IFN у здоровых добровольцев, которые могут служить показателями сравнения при ИЗЗ. Полученные результаты показали, что референтные интервалы по количеству копий мРНК IFN α и IFN β в крови были очень малы, а для IFN λ представляли значительный разброс (Таблица 2).

Обнаружены качественные и количественные отличия экспрессии генов IFN в клетках крови и носоглотки: РНК IFN α определена в 25% образцов лейкоцитов крови здоровых взрослых и не обнаружена в мазках носоглотки; РНК IFN β и РНК IFN λ детектировали в 80-100% образцов лейкоцитов крови, а также мазках здоровых взрослых; РНК IFN γ обнаружены только в единичных образцах лейкоцитов крови здоровых взрослых; но в 40% образцов мазков. Количество молекул белков IFN α , IFN β , IFN λ превышало количества геном-эквивалентов РНК в 10(3)-10(5) раз в соответствии с каскадным усилением сигналов при трансляции РНК на рибосомах. Для IFN γ соотношение количества белок/мРНК было минимальным. Охарактеризована активность IFN I и II типов (510,7±85,1; 54±11,7), а также их удельная активность (170,3; 25,6), соответственно.

Таблица 2 – Референтные интервалы (РИ) и референсные значения (РЗ) интерферонов IFN I, II и III типов у здоровых взрослых добровольцев в крови

РИ и РЗ	IFN α	IFN β	IFN γ	IFN λ
Частота детекции РНК	25,1 \pm 11,6	76,1 \pm 11,4	11,1 \pm 8,4	90,0 \pm 8,0
Диапазоны пороговых циклов (Ct)	35,7-36,8	29,1-33,9	22,6	20,2-32,7
Средний Ct	36,2	31,5	22,6	26,5
РЗ геном-эквивалентов в 1 мл крови	8,40*10(2)	2,17*10(4)	1,04*10(7)	6,96*10(5)
Диапазоны концентраций белка (пг/мл) (ИФА)	1,4-4,6	2,6-21,9	0,1-4,12	3,2-7
Средняя концентрация белка (пг/мл) (ИФА)	3,0	12,2	2,11	5,1
Количество молекул белка (ИФА) в 1 мл крови	9,3*10(7)	3,9*10(8)	6,1*10(7)	1,8*10(8)
Средняя концентрация белка (пг/мл) (xMAP)	4,79	76	2,33	8,1
Количество молекул белка (xMAP) в 1 мл крови	1,5*10(8)	2,5*10(9)	6,7*10(7)	2,9*10(8)
Диапазоны активности (ТБА)	320-960	320-960	32-96	-
Средние значения активности (ТБА)	510,7 \pm 85,1	510,7 \pm 85,1	54 \pm 11,7	-
Удельная активность на 1 пг белка (ИФА)	170,3	41,9	25,6	-
Удельная активность на 1 пг белка (xMAP)	106,7	6,7	23,2	-
Примечание: удельная активность на 1 пг белка определяется как отношение средней величины активности к средней концентрации белка.				

В мазках носоглотки здоровых взрослых (Таблица 3): отрицательные результаты ОТ-ПЦР-РВ свидетельствовали об отсутствии экспрессии IFN α , однако РНК IFN β и IFN λ выявлены с высокими частотами и количествами геном-эквивалентов в реакционной смеси; мРНК IFN γ обнаружена в мазках 40% здоровых добровольцев.

Таблица 3 – Референсные значения интерферонов IFN I, II и III типов у здоровых добровольцев в клетках крови и эпителиальных клетках носоглотки

Клинические образцы		IFN α	IFN β	IFN γ	IFN λ
Кровь	Частота детекции РНК, %	25,1 \pm 11,6	76,1 \pm 11,4	11,1 \pm 8,4	90,0 \pm 8,0
	Средний пороговый цикл (Ct)	36,2	31,5	22,6	26,5
	Содержание геном-эквивалентов в р.смеси	14	362	172951	11585
Мазки носоглотки	Частота детекции РНК, %	0	86,7 \pm 9,1	40,0 \pm 13,1	80,0 \pm 10,7
	Средний пороговый цикл (Ct)	0	30,6	36,5	26,0
	Содержание геном-эквивалентов в р.смеси	0	676	11	16384
Примечание: содержание геном-эквивалентов в реакционной смеси (р.смеси) рассчитывается по формуле Лукьянова-Матца и по калибровочной зависимости пороговых циклов.					

Таким образом, полученные результаты показателей системы IFN у здоровых добровольцев позволили в дальнейшей работе охарактеризовать врожденный противовирусный иммунитет пациентов с респираторно-вирусной, аллергической, аутоиммунной патологией апробированными методами *in vitro* с образцами для определения экспрессии генов IFN трех типов, биологической активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови.

Исследования интерферонов при острых респираторных вирусных инфекциях на локальном и системном уровнях

При респираторных вирусных инфекциях, таких как грипп, COVID-19 и аденовирусная инфекция, проводили комплексное изучение системы IFN (Таблица 4).

Таблица 4 – Частоты детекции (%) РНК и средние пороговые циклы флуоресценции (Ct) IFN и МхА в лимфоцитах крови и носоглоточных мазках у пациентов с гриппозной и аденовирусной инфекциями

		Грипп		Аденовирусная инфекция		Здоровые	
		Лимфоциты	Мазки	Лимфоциты	Мазки	Лимфоциты	Мазки
IFNα	доля (%)	20 \pm 13,3	0	62,5 \pm 15,7*	0	26,7 \pm 11,8	0
	Ct	34,8 \pm 0,1	0	39,9 \pm 4,6	0	36,8 \pm 1,3	0
	Копии в 1 мл крови	1,14*10 ² * **		1-10 ¹ *		2,76*10 ¹	
IFNβ	%	0 * **	100	100	83,3 \pm 16,7	93,3 \pm 6,7	86,7 \pm 9,1
	Ct	-	28,5 \pm 3,7	27,0 \pm 1,5	46,0 \pm 8,1	29,1 \pm 1,7	30,6 \pm 8,5
	Копии в 1 мл крови	0 * **		2,56*10 ⁴		5,73*10 ³	
IFNγ	%	0	50 \pm 16,7	0	0 * **	0	40 \pm 13,1
	Ct		34,1 \pm 2,6		0		36,5 \pm 1,1
IFNλ	%	100	100	100	83,3 \pm 16,7	93,3 \pm 6,7	80 \pm 10,7
	Ct	23,7 \pm 1,7	25,6 \pm 4,9	20,2 \pm 1,6	29,5 \pm 4,7	20,2 \pm 1,6	26 \pm 4,8
	Копии в 1 мл крови	2,42*10 ⁵		2,74*10 ⁶		2,74*10 ⁶	
МхА	%	100	90	100	100	100	80
	Ct	30,1 \pm 3,6	33,29 \pm 7,2	29,5 \pm 2,8	31,90 \pm 8,2	32,7 \pm 2,4	34,20 \pm 6,3
	Копии в 1 мл крови	2,87*10 ³		4,34*10 ³		4,74*10 ²	

Примечание: Ct - средние значения пороговых циклов флуоресценции для образцов крови, положительных в ОТ-ПЦР-РВ; * – статистически значимые отличия показателей здоровых добровольцев и пациентов (p<0,05); ** – статистически значимые отличия показателей между пациентами (p< 0,05)

При инфекциях, вызванных РНК-содержащими вирусами гриппа А и В, показана экспрессия генов IFN α в лейкоцитах крови и IFN β в мазках носоглотки при повышенных концентрациях белка IFN α в сыворотках крови и повышенной активности суммарного IFN в

сыворотке крови. РНК IFN γ присутствовала в 50% мазков носоглотки при отсутствии в крови. Экспрессия IFN λ при гриппе обнаружена как в лейкоцитах крови, так и в мазках носоглотки (Таблица 4).

При инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, определена сниженная экспрессия IFN λ в мукозальном иммунитете ($p < 0,05$) (Таблица 5) по сравнению с практически здоровыми добровольцами, увеличенные концентрации белков IFN α , IFN γ и IFN λ , сниженная концентрация IFN β в сыворотке крови и значительное угнетение активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови ($p < 0,05$).

При COVID-19 отмечен сниженный в $10 \cdot 10^4$ раз мукозальный противовирусный иммунитет ($p < 0,05$) по показателю экспрессии гена IFN $\lambda 3$ по сравнению с группой условно здоровых добровольцев (Таблица 5).

Таблица 5 – Значения экспрессии IFN $\lambda 3$ III типа (IL28B) у пациентов с COVID-19 до лечения в эпителиальных клетках

		1	2	3
Здоровые	Средний пороговый цикл (Ct)	22,3 \pm 1,0	20,9 \pm 2,6	17,1 \pm 2,6
	Содержание геном-эквивалентов в реакционной смеси	2,13*10 ⁵	5,62*10 ⁵	7,83*10 ⁶
Тяжелое течение COVID-19	Средний пороговый цикл (Ct)	21,9 \pm 4,3	21,6 \pm 2,6	22,0 \pm 3,0
	Содержание геном-эквивалентов в реакционной смеси	2,81*10 ⁵	5,24*10 ⁵	2,62*10⁵*
Реабилитация	Средний пороговый цикл (Ct)	32,5 \pm 1,1	32,7 \pm 1,3	31,3 \pm 1,9
	Содержание геном-эквивалентов в реакционной смеси	1,81*10²*	1,58*10²*	4,26*10²*
Примечание: эпителиальные клетки мазков из носоглотки (1), ротоглотки (2) и слюны (3). * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия по сравнению с практически здоровыми				

Достоверное увеличение экспрессии IFN $\lambda 3$ в лейкоцитах крови на фоне лечения с бактериальными лигандами выявлено в группе лиц с тяжелым течением COVID-19 и в группе реабилитации сразу после лечения относительно дебюта заболевания. Отмечено, что при COVID-19 развивается дисбаланс иммунного ответа на вирус с недостаточным синтезом IFN в начале заболевания (Таблица 5) и последующей гиперпродукцией провоспалительных цитокинов (глава 3.2.2), что служит причиной активного воспаления в легочной ткани [Busnadiego I. 2020; Felgenhauer U. 2020; Lei X. 2020; Galani I.E. 2021].

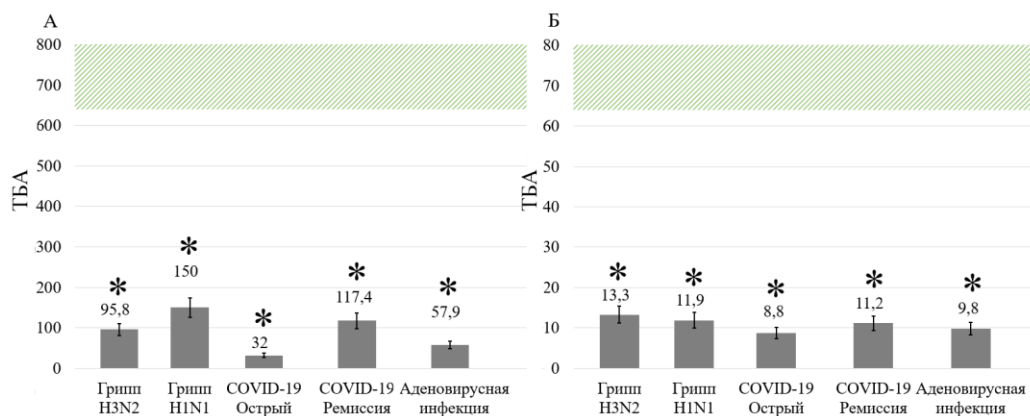
В Таблице 6 показаны уровни экспрессии гена IFN $\lambda 3$ III типа (IL28B), полученные на клиническом материале крови больных COVID-19 в динамике лечения.

Таблица 6 – Значения экспрессии гена IFN λ 3 на уровне системного иммунитета при COVID-19 в динамике лечения

	Кровь	COVID-19	COVID-19	постCOVID-19
		Базисная терапия	Базисная терапия+ВП-4	Терапия ВП-4
До лечения (исходно)	Сt	25,86±0,46	25,98±0,38	25,2±0,37
	Содержание геном-эквивалентов в реакционной смеси	1,81*10 ⁴	1,66*10 ⁴	2,85*10 ⁴
После лечения (15 день)	Сt	23,68±0,35	22,26±0,5	24,68±0,35
	Содержание геном-эквивалентов в реакционной смеси	8,18*10 ⁴	2,19*10⁵ *	4,09*10 ⁴
После лечения (30 дней)	Сt	22,87±0,52	26,63±0,48	18,73±0,32
	Содержание геном-эквивалентов в реакционной смеси	1,43*10⁵ *	1,03*10 ⁴	2,53*10⁶ *

Примечание: Средний пороговый цикл - (Сt). У здоровых: Сt=26,5 и содержание геном-эквивалентов в реакционной смеси = 1,16*10⁴. *p<0,05 – статистически значимые отличия по сравнению с исходными данными в динамике лечения.

На Рисунке 1 отражены показатели биологической активности IFN при респираторно-вирусных инфекциях.



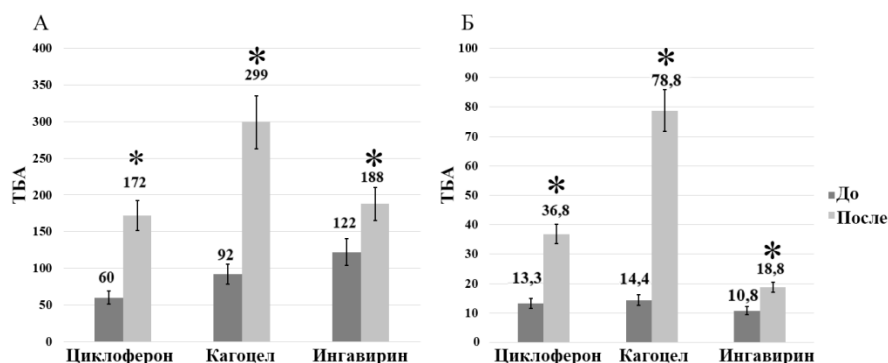
Примечание: *p<0,05 – статистически значимые отличия по сравнению с показателями физиологической нормы (интервал зеленого цвета). По оси абсцисс- респираторно-вирусные заболевания. По оси ординат-показатели активности IFN в титрах биологической активности (ТБА)

Рисунок 1 – Показатели активности IFN I (А) и II (Б) типов, продуцируемых лейкоцитами крови, при гриппе, COVID-19 (в острой стадии и в постковидном периоде), аденовирусной инфекции.

Был выявлен дефицит активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, сниженный при гриппе в 6,7 раз и 4,8 раз; при аденовирусной инфекции в 11,1 раз и 6,5 раз; при

острой коронавирусной инфекции в 20 раз и 7,3 раз; в постковидном периоде в 5,5 раз и 5,7 раз; соответственно ($p < 0,05$), по сравнению с показателями физиологической нормы.

Выявленные нарушения при респираторных вирусных инфекциях в виде угнетения активности IFN, продуцируемых лейкоцитами крови, показывают необходимость применения иммунокорректирующей терапии.

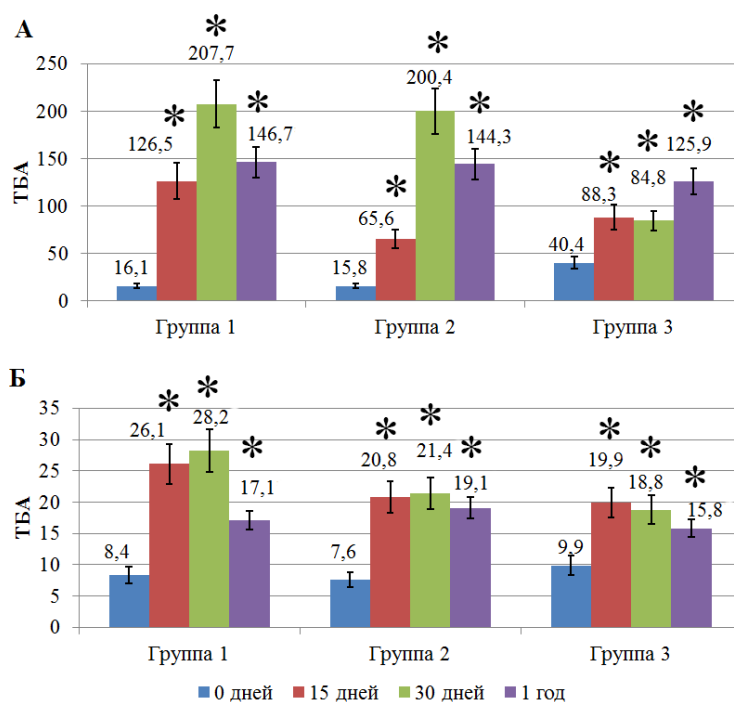


Примечание: * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия после лечения

Рисунок 2 – Изменение показателей биологической активности (ТБА) IFN I типа (А) и IFN II типа (Б) при лечении сезонного гриппа H3N2 препаратами Циклоферон, Кагоцел, Ингавирин

Следует отметить тенденцию к нормализации показателей активности IFN при применении препаратов ($p < 0,05$) индукторов IFN Кагоцел, Циклоферон, иммуномодулятора Ингавирин (Рисунок 2) при гриппе, бактериальных лигандов Иммуновак-ВП-4 (Рисунок 3, 4) при COVID-19.

При среднетяжелом течении COVID-19 в остром периоде заболевания были применены 2 схемы лечения с использованием в комплексной базисной терапии бактериальных лигандов Иммуновак-ВП-4: интраназально-подкожное введение ВП-4 (группа 1, $n=30$); интраназально-пероральный прием ВП-4 (группа 2, $n=30$). Группой контроля служили пациенты, также поступившие на лечение в стационар и получавшие только базисную терапию (группа контроля 3, $n=50$) (Рисунок 3).



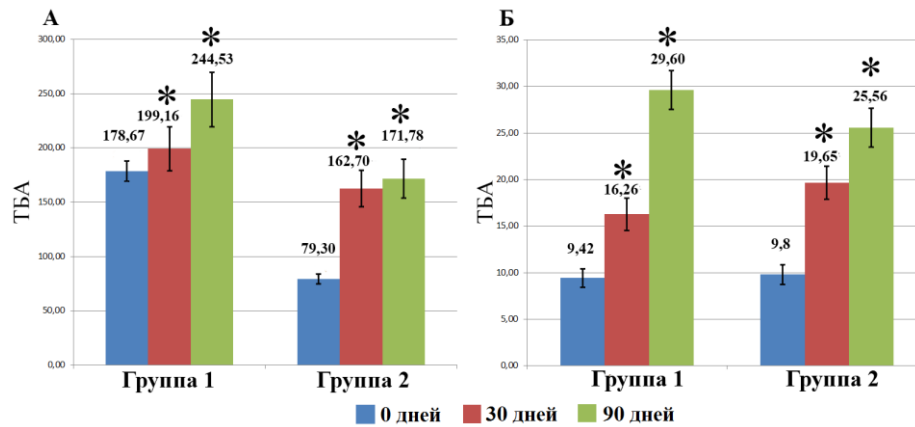
Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с исходными показателями до лечения

Рисунок 3 – Изменение показателей противовирусной активности IFN I типа (А) и IFN II типа (Б) в процессе лечения пациентов в острой фазе COVID-19 (группы 1,2,3)

На представленных Рисунках 3 и 4 наглядно отражены изменения биологической активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, на этапах лечения (Рисунок 3) или профилактики (Рисунок 4) в исследуемых группах. Следует отметить исходно низкие значения показателей биологической активности в исследуемых группах, особенно в группах с острой инфекцией (Рисунок 3 - группы 1,2,3).

Мониторинг показателей активности IFN I и IFN II типа в процессе лечения показал значительное увеличение ($p < 0,05$) активности IFN в группах (1 и 2) с добавлением в базисную терапию ВП-4 сразу после проведенного курса лечения (15 дней) и дальнейшее увеличение активности IFN через месяц после заболевания (30 дней) в сравнении с группой контроля (3), пациенты которой получали только базисную терапию (Рисунок 3). Следует отметить и неплохой отдаленный эффект по истечении 12 мес. после начала заболевания (1 год). Полученные данные по увеличению функциональной биологической активности IFN сочетались с улучшением других лабораторных характеристик, а также с клинической эффективностью.

В группе реабилитации (добровольцы. $n=47$), биоматериал которых исследовали через 1-9 мес. после заболевания COVID-19, для профилактики использовали ВП-4 в виде удобной комбинированной назально-оральной схемы применения (Рисунок 4).



Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с показателями до лечения

Рисунок 4 – Изменение показателей биологической активности IFN I типа (А) и IFN II типа (Б) в процессе профилактики добровольцев в период реабилитации после COVID-19

На Рисунке 4 отмечены показатели активности IFN в двух сопоставимых (по длительности от начала инфекционного процесса и тяжести течения заболевания) группах реабилитации 1 и 2 после перенесенного ранее COVID-19 добровольцами. В группе 1, добровольцы которой принимали профилактически комплекс бактериальных лигандов Иммуновак-ВП-4, длительность периода от начала заболевания составила в среднем 6 мес. у 83% обследуемых, в группе 2, где переболевшие медицинские сотрудники не принимали ВП-4, сроки от начала заболевания - от 1-го до 6 мес. у 95% обследуемых, причем, заболевание легкой степени тяжести перенесли 75% и 70% добровольцев, соответственно. В ходе профилактического приема выявлено не только улучшение лабораторных показателей, но и клиническая эффективность ВП-4, которая сопровождалась снижением количества ОРВИ у добровольцев группы 1, по сравнению с группой 2 [Крюкова Н.О. 2022]. Возможно, эффективность лечения с ВП-4 связана с феноменом тренированного иммунитета [Калужный О.В. 2015; Kleimann P. 2024].

Таким образом, выявлены нарушения системы IFN различной степени выраженности при гриппе и COVID-19. Изученные особенности экспрессии генов IFN показали отсутствие экспрессии генов IFN β и IFN γ в клетках крови. При гриппе и острой стадии COVID-19 выявлено увеличение концентраций белков IFN, провоспалительных цитокинов и других маркеров воспаления, вплоть до цитокинового шторма; дефицит активности IFN, продуцируемых лейкоцитами крови; снижение удельной активности по сравнению с показателями здоровых добровольцев ($p < 0,05$) (по IFN α в 26.6 раз (6,4 и 170,3), IFN β в 5.6 раз (1,2 и 6,7), IFN γ в 15 раз (1,7 и 25,6), соответственно). Введение иммуноактивных препаратов при респираторных вирусных инфекциях (грипп, COVID-19) приводит к положительному клиническому эффекту, связанному с их противовирусными, противовоспалительными и

иммуномодулирующими свойствами. Следует отметить иммунологическую целесообразность и клиническую перспективность использования иммунокорректирующих препаратов (индукторы IFN, иммуномодуляторы, бактериальные лиганды) в комплексном лечении и профилактике гриппа и новой коронавирусной инфекции COVID-19.

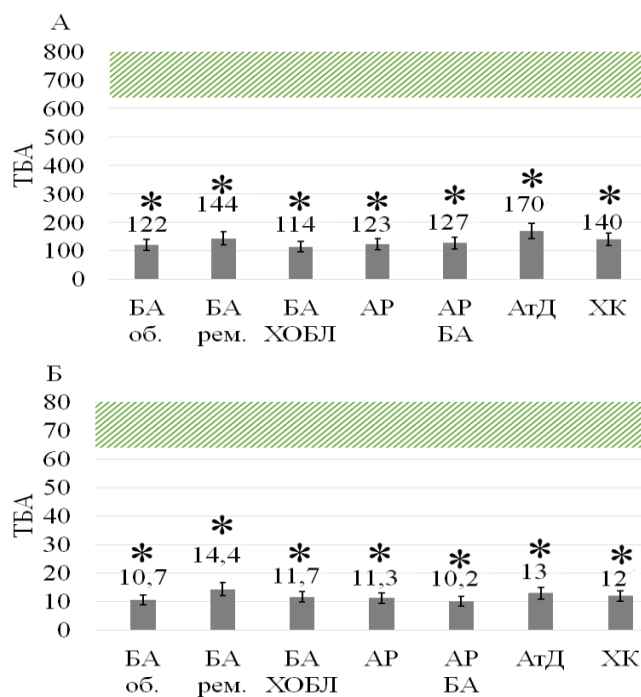
Особенности системы IFN при аллергических заболеваниях

Частые ОРВИ у пациентов с астмой свидетельствуют о нарушениях врожденного и адаптивного иммунитета [Azoulay E. 2020]. Респираторные вирусы могут вызывать хроническое воспаление, множественные нарушения врожденного иммунитета и обострения хронических заболеваний, являются индукторами обострений астмы, приводят к утяжелению бронхообструктивных процессов у человека [Kikkert M. 2020; Cable J. 2023; Yamaya M. 2023]. Дисбаланс цитокинов может вызывать аллергические заболевания [Wakashin H. 2009; Long A. 2023; Wang Y. 2024]. Подавление Th2 иммунного ответа и секреции ими IL4 опосредуется Th1 цитокинами, главным образом, IFN γ и IL12 [Морозова О.В. 2022; Wang Y. 2024]. Взаимоингибирующее действие IFN γ и IL4 приводит к иммуносупрессии пролиферации Th2 клеток, что вызывает восстановление фонового баланса. В исследование включены пациенты с аллергическими заболеваниями: БА, аллергический ринит (АР), атопический дерматит (АтД), хроническая крапивница (ХК).

В образцах мокроты пациентов с фенотипом (БА-ХОБЛ) в ремиссии обнаружена экспрессия IFN α в 58,3% и IFN λ в 42,9% при отсутствии экспрессии IFN β ; выявлены повышенные концентрации белков IFN α и IFN γ в сыворотке крови; при обострениях БА определена повышенная концентрация белка IFN γ ($p < 0,05$). В 100% образцов индуцированной мокроты пациентов БА-ХОБЛ выявлены IFN γ , у 41% \pm 7,9% больных выявлена продукция IFN α . При увеличении концентрации IFN γ в мокроте наблюдается достоверное ($p < 0,05$) снижение объема форсированного выдоха (ОФВ1) ($r=0,97$). Показана корреляция связи БА и выявления риновируса человека ($r=0,4$) и респираторно-синтициального вируса ($r=0,6$). Обострение БА на фоне ОРВИ протекает с нарушением цитокинового баланса с существенным увеличением продукции IFN γ , TNF α и IL6, что может быть связано с вирусными респираторными инфекциями и косвенным доказательством этого служит значительное уменьшение их концентрации в сыворотке крови после проведенной терапии в сочетании с Циклофероном по сравнению с группой контроля на базисной терапии. При БА зарегистрировано снижение активности IFN α/β и IFN γ , продуцируемых лейкоцитами крови.

Во всех исследованных образцах аллергических заболеваний, таких как БА в обострении и ремиссии, АР, АтД, ХК, была выявлена сниженная биологическая активность ($p < 0,05$) IFN I и

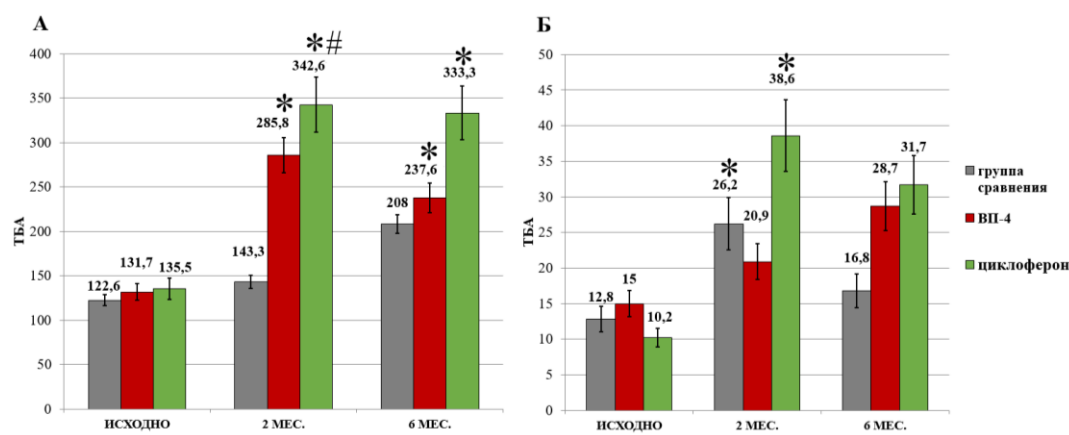
II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, (2-3)-й степени недостаточности (Рисунок 5). С утяжелением воспалительного процесса при БА, ассоциированной с ХОБЛ, отмечена прямая зависимость низких значений ОФВ1 в основном с низкими значениями активности IFN α от 40 до 120 ТБА ($r=0,95$).



Примечание: * $p<0,05$ – статистически значимые отличия по сравнению с показателями физиологической нормы (интервалы зеленого цвета). По оси абсцисс- аллергические заболевания. По оси ординат- показатели активности IFN в титрах биологической активности (ТБА)

Рисунок 5 – Показатели активности IFN I (А) и II (Б) типов, продуцируемых лейкоцитами крови, при аллергических заболеваниях

При различных АЗ выявлены аналогичные показатели сниженной активности IFN, продуцируемых лейкоцитами крови (Рисунок 5), для коррекции которой при астме были применены иммуномодулятор Иммуновак-ВП-4 и индуктор IFN Циклоферон (Рисунок 6) с увеличением показателей активности IFN при их применении ($p<0,05$). Следует отметить, что снижение заболеваемости ОРВИ и частоты обострений в течение года у пациентов, получавших Циклоферон, Иммуновак-ВП-4 было большим, чем в группе сравнения на базисной терапии ($p<0,05$).



Примечание: * $p < 0,05$ - статистически значимые различия показателей по сравнению с исходными данными внутри группы.

Рисунок 6 – Динамика продукции активности IFN α (А) и IFN γ (Б), продуцируемых лейкоцитами крови, у пациентов на иммуномодулирующей терапии и пациентов группы сравнения на базисной терапии

Таким образом, сравнительный анализ показал, что при аллергопатологиях выявлено снижение биологической активности ($p < 0,05$) IFN α/β в 4,9 раз (от 3,8 до 5,6) и IFN γ в 5,5 раз (от 4,4 до 6,3) по сравнению с физиологической нормой (Рисунок 5). Отмечено и снижение ($p < 0,05$) удельной активности по сравнению с показателями здоровых добровольцев (по IFN α в 1,7 раз (98,6 и 170,3), по IFN γ в 128 раз (0,2 и 25,6), соответственно). Ряду пациентов проведена иммунокоррекция и отмечена эффективная нормализация показателей активности IFN I и II типов ($p < 0,05$) (Рисунок 6), подтвержденная клинически в виде снижения заболеваемости ОРВИ и частоты обострений астмы.

Исследование экспрессии генов и активности IFN при аутоиммунных заболеваниях

При рассеянном склерозе развиваются два патологических процесса: очаговое аутоиммунное воспаление с разрушением миелина и образованием в основном периваскулярных воспалительных инфильтратов в головном и спинном мозге, а также нейродегенерация, проявляющаяся локальным диффузным повреждением аксонов и апоптозом нейронов.

Показана повышенная экспрессия генов IFN α , β , λ в лейкоцитах крови, высокие концентрации белков IFN β и γ в сыворотке крови больных рассеянным склерозом (РС). Проведен мониторинг показателей IFN α , β , γ , λ у больных РС до и в процессе терапии

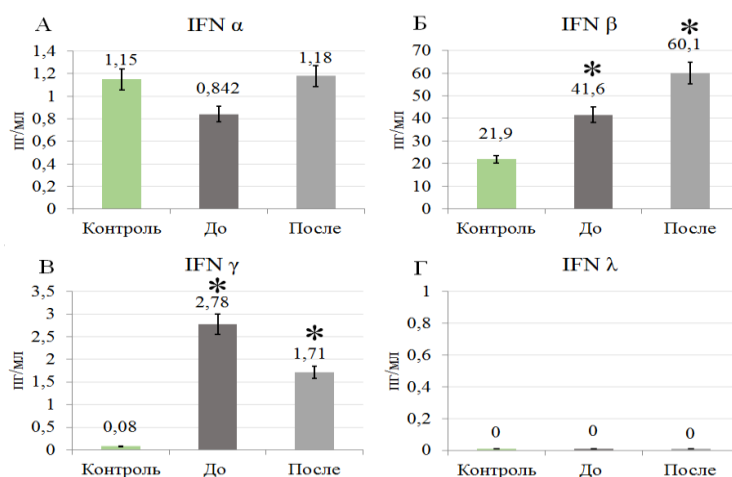
препаратом IFN β -1a посредством ОТ-ПЦР-РВ (Таблица 7), ИФА (Рисунок 7) и определения биологической активности IFN α/β и IFN γ (Рисунок 8).

Следует отметить достоверно повышенные в 10 и более раз уровни экспрессии генов IFN I типа (α/β) и III (λ) типа у больных РС в лимфоцитах крови до лечения по сравнению с контрольной группой здоровых людей (Таблица 7).

Таблица 7 – Сравнение частот детекции РНК и средних значений копий мРНК в 1 мл крови для IFN I, II, III типов у больных РС и здоровых людей

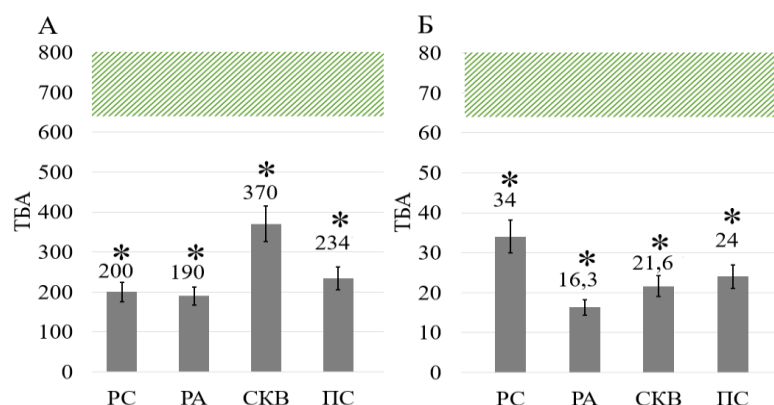
	IFN α	IFN β	IFN γ	IFN λ
Доля (%) образцов, содержащих мРНК IFN, IL23, MxA				
Контроль	23,5 \pm 10,6	58,8 \pm 12,3	11,8 \pm 8,1	35,3 \pm 11,9
РС до лечения	81,8 \pm 12,2**	90,9 \pm 9,1*	18,2 \pm 12,2	81,8 \pm 12,2*
РС после лечения				
3 мес	80,0 \pm 20,0	60,0 \pm 24,5	20,0 \pm 20,0	100
6 мес	60,0 \pm 24,5**	80,0 \pm 20,0	20,0 \pm 20,0	60,0 \pm 24,5
12 мес	54,5 \pm 15,7	72,7 \pm 14,1	45,5 \pm 15,7	90,9 \pm 9,1
>1 года	20,0 \pm 13,3**	30,0 \pm 15,3**	90,0 \pm 10,0***	90,0 \pm 10,0
>2 лет	12,5 \pm 12,5	100%	12,5 \pm 12,5	100%
Количество геном-эквивалентов в 1 мл крови (среди положительных в ОТ-ПЦР-РВ образцов)				
Контроль	3*10 ¹	2,7 *10 ²	7,2*10 ⁵	6,2*10 ²
РС до лечения	2,0*10 ³ ***	2,2*10 ³ **	2,0*10 ⁶	4,4*10 ³ ***
РС после лечения				
3 мес	3,0*10 ²	6,3*10 ²	4***	3,6*10 ³
6 мес	1,0*10 ³	4,8*10 ²	9,8*10 ⁵	2,2*10 ³
12 мес	8,3*10 ²	7,2*10 ¹ **	4***	2,7*10 ³
>1 года	1,9*10 ⁴ **	3,6*10 ²	3,9*10 ⁶	9,4*10 ³
Примечание: *- достоверность значений P<0,05; ** - достоверность значений P<0,01; *** - достоверность значений P<0,001. Контроль- практически здоровые люди.				

На Рисунке 7 представлены концентрации белков IFN 3-х типов у пациентов с РС и здоровых добровольцев: выявлены повышенные в 2 раза концентрации IFN β и IFN γ у больных РС по сравнению с группой практически здоровых (p<0,05) (Рисунок 7; Б, В).



Примечание: По оси абсцисс: группы контроля (практически здоровые люди) и РС - до и после лечения препаратом IFN β -1a. По оси ординат- продукция белков IFN в пг/мл.

Рисунок 7 – Определение продукции IFN I (А, Б), II (В) и III (Г) типов у больных РС до и после лечения по сравнению с группой здоровых добровольцев в сыворотке крови

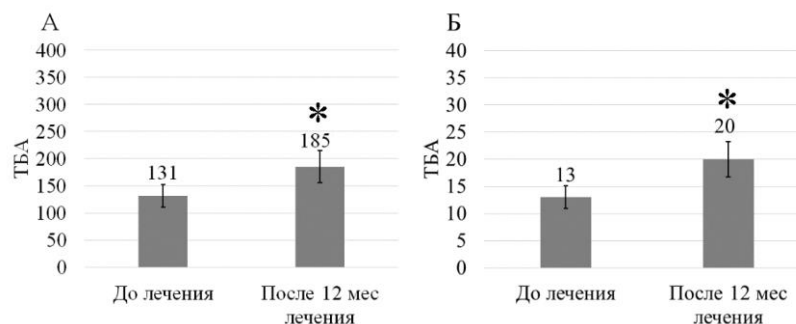


Примечание: * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия по сравнению с физиологической нормой (интервалы зеленого цвета). По оси абсцисс- аутоиммунные заболевания. По оси ординат- показатели активности IFN в титрах биологической активности (ТБА)

Рисунок 8 – Показатели активности IFN I (А) и II (Б) типов, продуцируемых лейкоцитами крови, при аутоиммунных заболеваниях

Была определена и выявлена сниженная биологическая активность IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, при РС, ревматических заболеваниях (ревматоидный артрит (РА), системная красная волчанка (СКВ)) и псориазе (ПС) по сравнению с показателями активности при физиологической норме ($p < 0,05$) (Рисунок 8).

Лечение пациентов РС препаратом IFN β -1a способствует увеличению активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови (Рисунок 9).



Примечание: * $p < 0,05$ – статистически значимые различия показателей активности IFN после лечения по сравнению с исходными данными.

Рисунок 9 – Изменение показателей IFN статуса у больных РС при лечении препаратом IFN β -1a

Таким образом, при аутоиммунной патологии выявлено снижение активности IFN α/β , продуцируемых лейкоцитами крови, в 3,2 раза (от 1,7 до 4,9) и IFN γ в 3.3 раза (от 1,9 до 4,9) по сравнению с физиологической нормой ($p < 0,05$). Выявлен дисбаланс значений удельной активности при РС по сравнению с показателями здоровых добровольцев: увеличением по IFN α в 1,6 раз (267,9 и 170,3), снижением по IFN β в 7,9 раз (5,4 и 41,9) и по IFN γ в 21,3 раза (1,2 и 25,6), соответственно) ($p < 0,05$). Показана повышенная экспрессия генов IFN α , β , λ в лейкоцитах крови, высокие концентрации белков IFN β и γ в сыворотке крови больных РС. Проведенный мониторинг показателей IFN у больных РС в процессе терапии препаратом IFN β -1a показал корригирующую тенденцию к показателям здоровых добровольцев: снижение экспрессии генов IFN α , β , белка IFN γ , увеличение активности IFN α/β и IFN γ , продуцируемых лейкоцитами крови ($p < 0,05$).

Однако длительное применение препаратов IFN β может приводить к резистентности терапии. Были выявлены IFN-связывающие антитела (САТ) у всех пациентов с РС при лечении препаратом IFN β -1b, при лечении IFN β -1a – только в 6-11 %. Отмечено, что в результате лечения пациентов с РС высокими дозами препарата IFN β -1b через 4 месяца у 55% пациентов были зарегистрированы антитела, способные нейтрализовать терапевтическое действие IFN β и приводить, таким образом, к резистентности получаемой терапии.

Определение уровней связывающих антител (САТ) и нейтрализующих антител (НАТ) позволило выявить в группе здоровых добровольцев «фоновые» значения САТ ($22,4 \pm 2,5$ ВТУ); НАТ не обнаружены (Таблица 8).

Таблица 8 – Показатели САТ и НАТ при терапии препаратами IFN β -1a и IFN β -1b

Антитела		Препарат	
		Генфаксон (IFN β -1a)	Ронбетал (IFN β -1b)
САТ	до лечения	36,7 \pm 8,89	74,2 \pm 38,2
САТ	через 4 мес терапии	61,6 \pm 19,6	3972 \pm 575 *
САТ	через 36 мес терапии	31,8 \pm 9,8	7168 \pm 2226 *
НАТ	до лечения	26 \pm 4,8	0
НАТ	через 4 мес терапии	52,4 \pm 7,9 *	350 \pm 78 *
НАТ	через 36 мес терапии	52 \pm 13,5	3354 \pm 1671 *

Примечание: Контроль 20 практически здоровых человек: САТ=22,4 ВТУ; НАТ=0 НЕ.
*p <0,05 – статистически значимые отличия по сравнению с исходными значениями

Связывающие белки имелись у пациентов РС еще до начала исследуемой нами терапии препаратами IFN β , их значения отмечены как больше фоновых, т.к. выяснилось, что пациенты уже принимали препараты IFN β , с нарастанием количества в динамике длительности лечения, особенно препаратами IFN β -1b (p<0,05), или же снижением (IFN β -1a), но не ниже фоновых значений (Таблица 8). В отношении НАТ следует отметить схожую картину, более выраженную при лечении IFN β -1b (Ронбетал) (p<0,05). Наличие НАТ до лечения препаратом IFN β -1a (Генфаксон) в исходной точке объясняется тем, что не все пациенты были в дебюте заболевания и уже применяли IFN β -1a (Ребиф). Отмечена прямая зависимость повышения уровня НАТ в сыворотке крови у пациентов с резистентностью к терапии [Лиждвой В.Ю. 2016]. Данные нашего исследования показывают, что вероятность образования НАТ оказалась выше у пациентов с IFN β -1b терапией, ввиду иммуногенности препаратов, чем у пациентов с IFN β -1a терапией, а также увеличивается в течение более длительного применения IFN β препаратов [Creeke P. 2013; Dunn N. 2020].

Таким образом, тестирование НАТ является одним из важнейших компонентов помощи больным РС, поскольку оно обеспечивает информацию об одном из наиболее важных факторов, определяющих клиническое реагирование на IFN β терапию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Со времени открытия интерферонов проведен детальный анализ структуры кодирующих генов, их регуляторных областей и непосредственно белков (полипептидов), определены разнообразные функции IFN 3-х типов с анализом молекулярных механизмов трансдукции сигналов от IFN к экспрессии IFN-стимулируемых генов (ISG), изучена продукция IFN разными клетками в динамике. Накоплен практический опыт применения рекомбинантных IFN, индукторов IFN и иммуномодуляторов в клинической практике в терапии иммунозависимых

заболеваний. Для определения IFN 3-х типов разработаны молекулярно-генетические и иммунологические методы, а также определение их функциональной активности с использованием культур клеток и лабораторных животных. Однако с учетом транзientной экспрессии генов IFN непосредственно после контактов рецепторов с экзогенными и эндогенными стимулами определение референсных интервалов не универсально и зависит от времени индукции экспрессии и последующего подавления (ингибирования). Необходимы дальнейшие исследования с комбинированием разработанных подходов ОТ-ПЦР-РВ, ИФА, определения биологической активности и различных функций IFN. Изменения интерферонового статуса при разных иммунозависимых заболеваниях разнонаправлены. При вирусных инфекциях, воспалении, аллергических патологиях и аутоиммунных заболеваниях выявлен дисбаланс экспрессии генов IFN, возрастание продукции IFN, уменьшение активности IFN. Необходим анализ не только системного врожденного иммунитета с анализом IFN в клетках и сыворотке крови, но и мукозального иммунного ответа с определением IFN на слизистых оболочках. Развитие мультиплексных технологий позволяет проводить одновременный анализ не только IFN 3-х типов, но и ISG для анализа всей системы IFN.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методы определения мультиплексной экспрессии генов IFN α , IFN β , IFN γ и IFN λ с помощью ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в реальном времени; метод определения антител, нейтрализующих IFN; оптимизирован метод определения противовирусной активности IFN.
2. Установлены референтные интервалы для каждого типа IFN. У здоровых добровольцев в 25% образцов лейкоцитов крови выявлена экспрессия IFN α , в 76% - IFN β , в 11% - IFN γ и в 90% - IFN λ . В большинстве мазков носоглотки определена экспрессия генов IFN β (87%), IFN γ (40%) и IFN λ (80%) при отсутствии РНК IFN α . В сыворотке крови методом ИФА выявлены IFN α (1,4÷4,6 пг/мл), IFN β (2,6÷21,9 пг/мл), IFN γ (0,1÷4,12 пг/мл) и IFN λ (3,2÷7,0 пг/мл). Противовирусная активность IFN здоровых добровольцев для IFN I типа варьировала в диапазоне 320÷960 ТБА, для IFN II типа - 32÷96 ТБА.
3. При инфекциях, вызванными вирусами гриппа А и В, определена экспрессия гена IFN α в 20 % образцов лейкоцитах крови, РНК IFN λ – в 100%, РНК IFN β и IFN γ не выявлена. Распределение РНК IFN в мазках носоглотки качественно и количественно отличалось от соответствующих профилей для крови: РНК IFN β - в 100%, РНК IFN γ - в 50% мазков

носоглотки. Определены повышенные в 3-10 раз концентрации белка IFN α в сыворотке крови. Выявлена пониженная противовирусная активность IFN I и II типов в среднем в 5 раз по сравнению с нормой. Препараты кагоцел, циклоферон, ингавирин при гриппе показали позитивную динамику активности IFN и сокращение сроков выздоровления.

4. При инфекции, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, выявлено ингибирование экспрессии гена IFN λ в $10\text{-}10^4$ раз в мазках по сравнению со здоровыми добровольцами, наряду с увеличением концентраций белков IFN α , IFN γ и IFN λ более чем в 10 раз в сыворотке крови и угнетением активности IFN I типа (в 20 раз при остром COVID-19 и в 5,5 раз в постковидном периоде) и II типа (в 7,3 раз при остром COVID-19 и в 5,7 раз в постковидном периоде). В результате применения вакцины ВП-4 в группе лиц с тяжелым течением COVID-19 и в группе реабилитации непосредственно после лечения относительно дебюта заболевания отмечено усиление экспрессии гена IFN $\lambda 3$ в лейкоцитах крови и увеличение противовирусной активности IFN I и II типов. Применение ВП-4 показало клиническую эффективность и снижение частот ОРВИ в течение года наблюдений.

5. При аллергических заболеваниях дыхательной системы определена экспрессия гена IFN α (58%) и гена IFN λ (42%) при отсутствии экспрессии РНК IFN β ; выявлены повышенные концентрации белков IFN α и IFN γ в образцах мокроты пациентов с фенотипом «бронхиальная астма, ассоциированная с хронической обструктивной болезнью легких» в ремиссии, при их отсутствии в сыворотке крови; при обострениях астмы отмечена повышенная в 25 раз концентрация белка IFN γ . Выявлено снижение противовирусной активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови ($p < 0,05$), в 4,6 и 5,2 раз, соответственно. У пациентов с аллергическими поражениями кожи (атопический дерматит и хроническая крапивница) выявлено снижение активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови ($p < 0,05$), более, чем в 4 и 5 раз, соответственно, по сравнению с группой здоровых добровольцев. При использовании индуктора IFN циклоферона и вакцины ВП-4 отмечено снижение ($p < 0,05$) заболеваемости ОРВИ и снижения частоты обострений астмы на фоне повышенной противовирусной активности IFN, продуцируемых лейкоцитами крови, в динамике наблюдений в течение года.

6. Комплексный анализ системы IFN при аутоиммунных заболеваниях показал повышенную экспрессию генов IFN α , β , λ в лейкоцитах крови, высокие концентрации белков IFN β и γ в сыворотке крови больных рассеянным склерозом (РС). Выявлена сниженная противовирусная активность ($p < 0,05$) IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, при РС в 3,2 и 1,9 раз, а также при ревматических заболеваниях (ревматоидный артрит, в 3,4 и 3,9 раз; системная красная волчанка, в 1,7 и 2,9 раз) и псориазе в 2,7 раз, соответственно, по сравнению с группой

здоровых добровольцев. В 3-х годичном мониторинге лечения пациентов с РС препаратом IFN β -1a отмечено снижение экспрессии генов IFN α , β и течение заболевания без обострений.

В результате длительного лечения РС высокими дозами препаратов IFN β -1a/1b могут индуцироваться связывающие и нейтрализующие антитела. Были выявлены IFN-связывающие антитела у всех пациентов с РС при лечении препаратом IFN β -1b, при лечении IFN β -1a – только в 6-11 %. Через 4 месяца терапии IFN β -1b у 55% пациентов были выявлены антитела, нейтрализующие IFN β -1b.

7. Для оценки особенностей системы IFN при респираторно-вирусных, аллергических и аутоиммунных заболеваниях предложен разработанный комплексный подход исследования системы IFN в виде определения экспрессии генов IFN α , IFN β , IFN γ , IFN λ , уровней продукции белков IFN трех типов, противовирусной активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, а также применение иммуноактивных препаратов для коррекции нарушений.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У больных с иммунозависимыми заболеваниями предложен к применению комплексный подход выявления нарушений системы интерферонов в виде оценки экспрессии генов, продукции белков и биологической активности IFN, продуцируемых лейкоцитами крови, до и после проведенной иммунокорректирующей терапии.
2. При длительном применении препаратов IFN β в терапии рассеянного склероза апробирован и предложен к применению метод количественной оценки определения нейтрализующих антител против применяемого препарата IFN β для преодоления резистентности к проводимому лечению.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Оспельникова Т.П.** Противовирусная активность препаратов интерферона бета-1a. / Т.П. Оспельникова, Е.И.Исаева, Л.В.Колодяжная (и др.) // **Вопросы вирусологии.** – 2015 – № 6 – С. 24-28. [Scopus, WoS]
2. **Оспельникова Т.П.** Цитокины при сочетанной бронхиальной патологии: бронхиальной астме и хронической обструктивной болезни легких. / Т.П.Оспельникова, Г.Л.Осипова // **Российский иммунологический журнал.** – 2015 – Т.9(18) – №3(1) – С. 157-158.

3. **Оспельникова Т.П.** Рассеянный склероз и выявление нейтрализующих антител / Т.П. Оспельникова, В.Ю. Лиждвой // Российский иммунологический журнал. - 2015. - Т.9(18). - №3(1). – С.159-161.
4. Геворкян О. В. Влияние иммунологических нарушений, вызванных частыми обострениями и хронической герпес-вирусной инфекции, на течение атопического дерматита. / О.В.Геворкян, **Т.П.Оспельникова** // Российский иммунологический журнал. – 2016 – Т.10 (19) – №2 (1) – С. 269-271.
5. **Оспельникова Т.П.** Интерфероны I, II, III типов и противовирусный белок МхА в крови и смывах у больных при острых респираторных вирусных инфекциях. /Т.П.Оспельникова, О.В.Морозова, Е.И.Исаева (и др.) // Российский иммунологический журнал. – 2016 – Т.10 (19) – №2 (1) – С. 378-380.
6. **Оспельникова Т.П.** Вирусы и цитокины у взрослых и детей с бронхиальной астмой. / Оспельникова Т.П., Морозова О. В., Исаева Е. И., Ветрова Е. Н., Лизогуб Н. В., Смирнова М. Ю., Осипова Г. Л., Чучалин А. Г., Ершов Ф. И. // Российский иммунологический журнал. – 2016 – Т.10 (19) – №2 (1) – С. 380-382.
7. Лиждвой В.Ю. Влияние нейтрализующих антител к интерферону-бета на прогрессирование рассеянного склероза. / В.Ю.Лиждвой, **Т.П. Оспельникова**, Котов С.В. // Альманах клинической медицины. – 2016 – № 44(3) – С. 318-323.
8. **Ospelnikova T.P.** Respiratory Viruses and Proinflammatory Cytokines Imbalance in Adults and Children with Bronchial Asthma. / Ospelnikova T.P., Morozova O.V., Isaeva E.I., Andreeva S.A., Lyzogub N.V., Kolodyaznaya L.V., Vetrova E.N., Smirnova M.Y., Osipova G.L., Ershov F.I. and Chuchalin A.G.// Journal of Infectious Diseases & Preventive Medicine. – 2016 – № 4 – P. 2. DOI: 10.4172/2329-8731.1000138
9. **Оспельникова Т.П.** Анализ интерферонов I, II и III типов, интерлейкина 23 и противовирусного белка МхА при рассеянном склерозе. / Оспельникова Т.П., Морозова О.В., Исаева Е.И., Лиждвой В.Ю., Колодяжная Л.В., Андреева С.А., Котов С.В., Ершов Ф.И. // **Молекулярная медицина.** – 2017 – № 15(3) – С. 32-36. [Chemical abstracts, WoS]
10. **Ospelnikova T.P.** Innate and Adaptive Immunity during Long-term Treatment of Multiple Sclerosis with Interferon Beta 1a. /Ospelnikova T.P., Morozova O.V., Isaeva E.I., Lizhdvoy V.Yu., Kotov S.V., Ershov F.I. // Journal of General and Emergency Medicine. –2017 – Vol. 2 – Iss. 2 – P. 014.
11. **Ospelnikova T.P.** Features of Interferon and Cytokine Status in Atopic Dermatitis. / Ospelnikova T.P., Gevorkyan O.V., Mironova T.V., Andreeva S.A., Kolodyazhnaya L.V. and Ershov F.I. // Arch Asthma Allergy Immunol. – 2017 –Vol.1 – P. 009-014.

12. **Патент №2626832 РФ.** Способ определения нейтрализующих антител в сыворотке крови больных рассеянным склерозом, леченных препаратами интерферона-бета. **Оспельникова Т.П., Колодяжная Л.В., Табаков В.Ю., Ершов Ф.И. Опубликовано: 02.08.2017.**
13. **Патент №2627179 РФ.** Тест-система для определения РНК интерферона λ , интерлейкина IL23 и противовирусного белка МхА. Морозова О.В., **Оспельникова Т.П. Опубликовано: 03.08.2017.**
14. **Оспельникова Т.П.** Особенности биомаркеров воспаления при гриппе. /Оспельникова Т.П., Морозова О.В., Андреева С.А., Исаева Е.И., Колодяжная Л.В., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Бурцева Е.И., Мукашева Е.А., Ершов Ф.И. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. –2018 – № 3 – С. 67-74.
15. **Оспельникова Т.П.** Отличия спектров РНК интерферонов и интерферон-индуцируемого гена МХ1 при гриппозной и аденовирусной инфекциях. / Оспельникова Т.П., Морозова О.В., Андреева С.А., Исаева Е.И., Колодяжная Л.В., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Ершов Ф.И. // **Иммунология.** – 2018 – № 39(5-6) – С. 290-293. DOI: 10.18821/0206-4952-2018-39-5-6-290-293 [Scopus, Chemical abstracts, WoS]
16. Мазурина С.А. Микробиота нижних отделов дыхательных путей при хронических обструктивных заболеваниях легких. / Мазурина С.А., Данилина Г.А., Смирнова М.Ю., Гервазиева В.Б., Осипова Г.Л., Конищева А.Ю., **Оспельникова Т.П.** // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018 – № 5 – С. 53-60.
17. Смирнова-Саприцкая М.Ю., Осипова Г.Л., **Оспельникова Т.П.,** Данилина Г.А., Зыков К.А. Микробиологические особенности показателей при бронхиальной астме и хронической обструктивной болезни легких в период ремиссии. / М.Ю. Смирнова-Саприцкая, Г.Л. Осипова, Т.П. Оспельникова [и др.] // **Клиническая практика.** – 2018 – № 9(4) – С. 40-46. DOI: 10.17816/clinpract9440-46.
18. **Патент №2657808 РФ.** Способ определения продукции интерферонов как параметров врожденного иммунитета. Оспельникова Т.П., Колодяжная Л.В., Табаков В.Ю., Ершов Ф.И. **Опубликован: 15.06.2018.**
19. **Оспельникова Т.П.** Биологическая активность интерферонов в период обострения бронхиальной астмы на фоне острых респираторных вирусных инфекций. / Оспельникова Т.П., Зарембо Н.В., Конищева А.Ю., Мазурина С.А., Осипова Г.Л. // Российский аллергологический журнал. – 2019 – Т.16 – №1 – С. 115-117.
20. **Оспельникова Т.П.** Интерфероновый статус в оценке терапии бронхиальной астмы иммуномодулирующими препаратами. / Оспельникова Т.П., Зарембо Н.В., Конищева А.Ю., Гервазиева В.Б., Осипова Г.Л., Михайлова Н.А. // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.** – 2019 – № 3 – С. 46-54. [Scopus, WoS]

21. **Оспельникова Т.П.** Система интерферонов у больных хроническими заболеваниями в процессе иммуномодулирующей терапии. / Оспельникова Т.П., Морозова О.В., Михайлова Н.А., Ершов Ф.И. // **Российский иммунологический журнал.** – 2019 – Т. 13(22) – № 2 – С. 448-450. [Scopus, PubMed, Chemical abstracts]
22. Мазурина С.А. sIgE к бактериальным аллергенам у больных хроническими воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей. / Мазурина С.А., Конищева А.Ю., **Оспельникова Т.П.**, Гервазиева В.Б. // **Российский иммунологический журнал.** – 2019 – Т.13 (22) – № 2 – С. 388-390. [Scopus, PubMed, Chemical abstracts]
23. **Оспельникова Т.П.** Сравнительный анализ цитокинов при острых респираторных инфекциях и аллергической бронхиальной астме. / Оспельникова Т.П., Морозова О.В. // **Имунопатология, аллергология, инфектология.** – 2019 - № 4 – С. 28-36 [RSCI]
24. Ершов Ф.И. Интерфероновый статус как метод определения неспецифических биомаркеров иммунопатологии человека. / Ершов Ф.И., **Оспельникова Т.П.**, Наровлянский А.Н. // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.** – 2019 – № 3 – С. 91-99. [Scopus, WoS]
25. **Оспельникова Т.П.** Особенности спектра цитокинов при хронической крапивнице. / Оспельникова Т.П., Денисов А.А., Черевко Н.А., Кузьмина В.В., Дмитрук В.С., Нагайцева Д.С., Каргов И.С. // **Медицинская иммунология.** – 2021 – № 23(6) – С. 1347-1356. DOI: 10.15789/1563-0625-FOC-2332 [Scopus]
26. **Оспельникова Т.П.** Возможные биомаркеры эффективности терапии при рассеянном склерозе. / Оспельникова Т.П., Шитова А.Д. // **Российский неврологический журнал.** – 2021 – № 26(1) – С. 4-14. doi.org/10.30629/2658-7947-2021-26-1-4-14.
27. Морозова О.В. Особенности врожденного и адаптивного иммунитета при инфекциях, вызванных респираторными РНК-содержащими вирусами. / Морозова О.В., **Оспельникова Т.П.**, Леонова А.Ю., Свитич О.А. // **Инфекционные болезни.** - 2021 – Т.19 - № 3 – С. 123-132.
28. **Оспельникова Т.П.** Необходимость оценки врожденной резистентности при респираторных инфекциях для прогноза возможных осложнений. / Оспельникова Т.П., Морозова О.В. // X Юбилейная международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика». Сборник трудов. – Москва – 2021– Т. 1. – С. 181-182.
29. **Оспельникова Т.П.** Биологическая активность интерферонов при новой коронавирусной инфекции COVID-19. / Оспельникова Т.П., Левицкая Д.С., Колодяжная Л.В., Шитова А.Д., Осипцов В.Н., Арифиллина Л.Р., Крюкова Н.О., Пахомов Д.В., Хромова Е.А., Баранова И.А., Чучалин А.Г., Костинов М.П., Свитич О.А. // **Вопросы вирусологии.** – 2022 – № 67(2) – С. 142-152. Doi: 10.36233/0507-4088-99 [Scopus, WoS]
30. Морозова О.В. Цитокины при аллергических заболеваниях. / **Оспельникова Т.П.** // **Молекулярная медицина.** – 2022 – № 20(2) – С. 3-10. doi.org/10.29296/24999490-2022-02-01.

31. **Оспельникова Т.П.**, Свитич О.А. Интерфероны при новой коронавирусной инфекции COVID-19. 2022. С. 41-54. Глава в монографии. Монография /под ред. А.Г.Чучалина, О.А.Свитич, М.П.Костинова. Москва. Группа МДВ. Мукозальный иммунитет у пациентов с COVID-19: лечение и реабилитация.
32. **Ospelnikova T.** The biological activity of interferons in post-COVID syndrome. / T.Ospelnikova, D.Levitskaya, L.Kolodyazhnaya, A.Shitova, V.Osiptsov, N. Kryukova, D.Pakhomov, E. Khromova, L. Arifullina, I. Baranova, A. Chuchalin, M. Kostinov, O. Svitich. // European Respiratory Journal Open Research. – 2022 – Vol. 8 – P. 240. DOI: 10.1183/ 23120541.LSC-2022.240.
33. **Оспельникова Т.П.** Интерферониндуцирующее действие бактериальных лигандов при бронхиальной астме. / Оспельникова Т.П., Осипова Г.Л., Зарембо Н.В., Колодяжная Л.В., Свитич О.А., Ершов Ф.И. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2023. 3: 9 с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2023-3/Articles/ТРО-2023-3.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2023-13002
34. **Оспельникова Т.П.** Система интерферонов в острой фазе COVID-19 и постковидном периоде. / Оспельникова Т.П., Колодяжная Л.В., Шитова А.Д., Свитич О.А. // Материалы IX конгресса Евро-азиатского общества по инфекционным болезням. Журнал инфектологии. Приложение 2. – Санкт-Петербург – 2023 – Т.15 – №2 – С.95-96.
35. M.Kostinov, O.Svitich, A.Chuchalin, V.Osiptsov, E.Khromova, N.Abramova, V.Tatevosov, A.Vlasenko, V.Gainitdinova, D.Pakhomov, K.Mashilov, T.Ospelnikova, N.Mihajlova, V. Polishchuk, E.Kurbatova, A.Kostinova. Secretory IgA and course of COVID-19 in patients receiving a bacteria-based immunostimulant agent in addition to background therapy. Scientific Reports. 2023; 14:11101. doi: 10.1038/s41598-024-61341-7.
36. **Оспельникова Т.П.** Сравнительная оценка активности интерферонов при гриппе и COVID-19. / Оспельникова Т.П., Свитич О.А., Ершов Ф.И. // **Инфекция и иммунитет**. 2024. Т. 14, № 3. С. 416–422. doi: 10.15789/2220-7619-CAO-16821

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЗ – аллергические заболевания

АИЗ – аутоиммунные заболевания

ИЗЗ - иммунозависимые заболевания

ОТ-ПЦР-РВ – обратная транскрипция с последующей ПЦР в реальном времени

ОФВ – объем форсированного выдоха

ТЦД - инфекционная доза для тканевой культуры, мера титра инфекционного вируса

ФГА – фитогемагглютинин

ФЛЭЧ - культура клеток фибробластов легких эмбриона человека

ЦПД – цитопатическое действие

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

ЕМС – вирус энцефаломиокардита мышей

IFN – интерферон (interferon)

ISG - IFN-стимулируемые гены (interferon-stimulating genes)

NDV – вирус болезни Ньюкасла

Vero – культура клеток почки зеленой мартышки

Vero-SF - культура клеток почки зеленой мартышки бессывороточного ведения

VSV - вирус везикулярного стоматита