

Четыре варианта молекул $\text{IFN}\alpha_{2b}$ -Fc с различной длиной линкера были получены с помощью overlap-PCR и клонированы в экспрессионный вектор pCER4, который впоследствии был использован для трансфекции клеток линии НЕК-293. После очистки белков при помощи аффинной хроматографии проводился анализ биологической активности химерных молекул по подавлению цитопатического эффекта вируса везикулярного стоматита на линии клеток L41. Для выявления связи между биологической активностью химерных молекул и длиной пептидного линкера было проведено компьютерное моделирование их трехмерной структуры и подвижности. Также была оценена фармакокинетика молекул при их внутривенном введении мышам.

При сравнении четырех форм $\text{IFN}\alpha_{2b}$ -Fc было выяснено, что химерные молекулы $\text{IFN}\alpha_{2b}$ -Fc обладают различной противовирусной активностью в зависимости от длины линкера. Наибольшей относительной противовирусной активностью (20,9 %) обладала молекула, содержащая линкер из восьми аминокислот. Наименьшую активность имела молекула с линкером из пяти аминокислот (3,4 %). Результаты компьютерного моделирования позволили дать возможное объяснение сниженной противовирусной активности этой молекулы. Снижение активности может быть обусловлено стерическими препятствиями, возникающими при взаимодействии с рецептором интерферона- α . Также было показано, что химерные молекулы $\text{IFN}\alpha_{2b}$ -Fc имеют увеличенный период полувыведения (более 20 часов) по сравнению с немодифицированной формой интерферона- α .

EXPRESSION AND STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF CHIMERIC PROTEINS $\text{IFN}\alpha_{2b}$ -Fc

D. S. SERGEEVA, A. V. PETROV

Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint-Petersburg

Summary. $\text{IFN}\alpha$ is commonly used for the treatment of hepatitis B and C infections. This treatment requires frequent dosing because of short half-life of interferon. To develop prolonged form of interferon- α , we linked $\text{IFN}\alpha_{2b}$ to the Fc-region of human IgG_4 through peptide linkers with different length. Properties of four chimeric proteins $\text{IFN}\alpha_{2b}$ -Fc were studied by antiviral assays, pharmacokinetic tests and computer modeling.

РОЛЬ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ДИНАМИКИ КИСЛОРОДНОГО ВЗРЫВА ПРИ СТРЕССЕ

И. Л. ШАРВЬЕВА

Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермь

E-mail: irin.sh@gmail.com

При воздействии стресса на организм среди прочих нейро-эндокринных изменений активируется система эндогенных опиоидных пептидов, обладающая выраженной стресс-лимитирующей функцией. В зависимости от продолжительности и вида стрессорного воздействия может значительно меняться выраженность и направление иммунных реакций. Ранее нами было показано участие блокады опиатных рецепторов в регуляции пролиферативной и секреторной активности спленоцитов в условиях ротационного и иммобилизационного стресса [1].

Цель работы – исследовать влияние блокады опиатных рецепторов на выраженность реакции хемиллюминисценции при ротационном и иммобилизационном стрессе.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 64 самцах белых мышей массой тела 20–22 г. Животных содержали в условиях лабораторного вивария, при естественном освещении, неограниченном доступе к воде и кормам. В работе использовались две модели стресса – иммобилизационный и ротационный.

Иммобилизация мышей проводилась в течение 6 часов (фиксация в положении на спине), ротация мышей производилась в течение 60 мин по 10 мин с перерывами по 5 мин при 78 об/мин. Антагонист опиатных рецепторов налоксона гидрохлорид в дозе 0,2 мг/кг (Narcan, США) вводили подкожно за 20 мин до стресса, а также через 3 ч после начала стресса у животных, подвергнутых иммобилизации.

Все животные были разбиты на следующие группы: 1-я – контрольная, 2-я – ротационный стресс, 3-я – иммобилизационный стресс; 4-я – ротационный стресс на фоне налоксона, 5-я – иммобилизационный на фоне налоксона; 6-я – однократное введение налоксона; 7-я – двукратное введение налоксона. Оценку кислородзависимой микробцидной активности перитонеальных макрофагов осуществляли с использованием реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Реакцию проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах, каждая лунка содержала 10^5 клеток в 100 мкл раствора Хенкса. В качестве индуктора ЛЗХЛ использовали опсонизированный зимозан в концентрациях 150 мкг/мл. В качестве маркера выраженности реакции ЛЗХЛ использовался люминол (10^{-5} М), свечение которого неизбирательно по отношению к различным кислородсодержащим радикалам. Регистрация результатов велась в течение часа с интервалом в 5 мин с помощью многофункционального спектрофотометра ТЕСАН (Австрия). Статистический анализ проводили с использованием непарного t-критерия Стьюдента.

Основные результаты. Установлено, что ротационный стресс стимулировал спонтанную реакцию ЛЗХЛ на 20, 25, 30, 35, 40, 50 и 60 минутах эксперимента. Введение налоксона приводило к отмене стимулирующего эффекта ротационного стресса на продукцию активных форм кислорода (АФК). При активации клеток опсонизированным зимозаном стимулирующее действие ротации на микробцидную активность фиксировалось уже с 10 минуты начала исследования (достоверная стимуляция зафиксирована с 10 по 60 минуты наблюдения, см. табл.).

Под действием иммобилизационного стресса на фоне блокады опиатных рецепторов в спонтанных культурах статистически значимого изменения продукции АФК зафиксировано не было. В стимулированных зимозаном культурах под действием иммобилизации наблюдалась тенденция к угнетению микробцидной активности макрофагов, однако статистически не достоверная. Блокада опиатных рецепторов на фоне иммобилизации приводила к значимому угнетению реакции ЛЗХЛ начиная с 30 минуты исследования. Изолированное, как однократное, так и двукратное, введение налоксона на продукцию макрофагами активных форм кислорода влияния не оказывало.

В результате анализа эффектов представленных в работе моделей стресса на интенсивность реакции ЛЗХЛ обращает на себя внимание различная направленность влияния ротации и иммобилизации. Ротационный стресс стимулировал, а иммобилизационный угнетал данную реакцию. Согласно данным других авторов, изменения функциональной активности иммунокомпетентных клеток

зависят от интенсивности стрессорного воздействия и выбранной модели стресса [2]. Также сообщается, что в системе *in vivo* в физиологических концентрациях мет-энкефалин и β -эндорфин стимулировали хемилюминисценцию человеческих нейтрофилов [3]. Таким образом, можно сделать вывод о важной роли эндогенной опиоидной системы в регуляции микробицидной активности макрофагов при остром стрессе.

Влияние ротационного и иммобилизационного стресса на реакцию ЛЗХЛ макрофагов мыши в условиях блокады опиатных рецепторов

		Показатели люминолзависимой хемилюминисценции				
Группы животных	Минуты исследования					
		20 мин	30 мин	40 мин	50 мин	60 мин
1	спонт.	20,4±2,6	21,1±2,6	18,5±2,3	17,7±3,2	44,3±23,7
	зимозан	180,2±43,2	242,3±55,6	220,9±50,1	188,9±40,5	168,7±31,2
2	спонт.	38,3±8,9	40,8±7,9*	38,8±8,8*	33,4±5,6*	53,3±19,6
	зимозан	410,4±74,5*	453,2±66,1*	415,6±57*	326,6±44,6*	268,5±30*
3	спонт.	16,4±4,2	19,2±4,2	17,1±3,6	18,9±3,5	31,9±11,8
	зимозан	129±21,7	133,8±30	138,4±28,6	122,4±24,6	91,1±18,2*
4	спонт.	24,9±10,9	29±15,1	24,1±11,3	25,3±7,8	45,7±16,8
	зимозан	177,6±67,9	194,5±96,9	188,1±84,6	154,8±61,2	128,6±50,3
5	спонт.	12,8±2,5*	19±3,4*	16,7±1,7*	17,4±2,3*	47,1±24,2
	зимозан	124,5±22,9	95,7±20,4*	101,8±25,2*	86,6±22,3*	87,8±26,5
6	спонт.	21,1±5,3	23,1±5,7	22±4,4	23,7±3	31±8,5
	зимозан	302,7±124,3	307,5±120,5	262,5±91	194,8±67	175,2±58
7	спонт.	23,3±9,8	24±9,9	26,8±10,6	27,1±11,1	37,2±11,7
	зимозан	155,5±87,7	213,2±153,2	207,3±144,5	166,9±116,1	130,6±89,6

Примечание. Группы животных: 1 – контроль, 2 – ротационный стресс, 3 – иммобилизационный стресс, 4 – ротационный стресс + налаксон, 5 – иммобилизационный стресс + налаксон, 6 – однократное введение налоксона, 7 – двукратное введение налоксона; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 14-04-96002-р-а.

Литература

1. Гейн С. В., Шаравьева И. Л. Влияние ротационного и иммобилизационного стресса на продукцию IL-1Бета, IL-2, IL-4 и IFN-гамма спленоцитами в условиях блокады опиатных рецепторов *in vivo* // Доклады академии наук. 2014. Т. 454, № 4. С. 485–487.
2. Рыбакина Е. Г., Шанин С. Н., Фомичева Е. Е. [и др.]. Механизмы нейро-иммунных взаимодействий при стрессе и подходы к их коррекции // Фундометальные исследования. 2012. № 2. С. 120–123.
3. Pańsik J., Tchórzewski H, Baj Z [et al.]. Priming effect of met-enkephalin and beta-endorphin on chemiluminescence, chemotaxis and CD11b molecule expression on human neutrophils *in vitro* // Immunol. Lett. 1999 Vol. 67. P. 77–83.

THE ROLE OF OPIATE RECEPTORS IN REGULATION OXYGEN BURST UNDER STRESS

I. L. SHARAV³EVA

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm

Summary. It was demonstrated rotation stress increased the reactive oxygen species production by murine macrophages. The opioid receptors blockade abrogated this effect. Immobilization stress under conditions of opioid receptors blockade inhibited zimosan-induced chemiluminescence.

ВЛИЯНИЕ МАКРОФАГОВ НА ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В СТРУКТУРАХ ГЛАЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

С. Е. Смирных

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург

E-mail: s.smirnyh@yandex.ru

Сахарный диабет (СД) и его осложнения – одна из ведущих проблем современного здравоохранения. Диабетическая ретинопатия, наиболее тяжелое осложнение СД, является основной причиной снижения зрения и слепоты среди лиц трудоспособного возраста, что создает серьезные социально-экономические проблемы. В связи с этим поиск новых средств лечения глазных осложнений сахарного диабета является одной из первостепенных задач современной медицины.

В работах последних лет [3, 5] установлено, что клетки иммунной системы, в том числе и клетки системы фагоцитирующих мононуклеаров (СФМ), выполняют различные неиммунологические функции, выделяя широкий спектр физиологически активных факторов, часть из которых (интерлейкины, фактор некроза опухолей и др.) воздействует на регенерацию тканей различных органов (печени, почек, пародонта, миокарда) [1, 3].

В глазном яблоке макрофаги выполняют функцию нейтропротекции и влияют на пролиферацию клеток предшественников сетчатки [4]. Кроме того, стромальные меланоциты сосудистой оболочки глаза обладают морфофункциональными свойствами резидентных макрофагов [2].

В связи с этим перспективным направлением является воздействие на функции макрофагов для коррекции диабетических изменений структур органа зрения.

Цель работы – исследование влияния активации СФМ на восстановление структур глаза при экспериментальном сахарном диабете.

Материалы и методы. Исследование проводилось на 30 беспородных крысах-самцах, которые были разделены на 3 группы по 10 животных в каждой: 1-я группа – интактные животные; 2-я группа – животные с декомпенсированным СД; 3-я группа – животные с декомпенсированным СД на фоне влияния иммунокорректора 3-аминофталгидразида, который регулирует функционально-метаболическую активность макрофагов.

Результаты исследования. При гистологическом исследовании глаз животных с декомпенсированным сахарным диабетом обнаружены умеренный интерстициальный отек стромы роговицы, полнокровие сосудов сосудистой и сетчатой оболочек с признаками капилляростаза и формированием сладж-комплексов. При