

Изучение цитотоксических эффектов рекомбинантного человеческого интерферона лямбда-1 и его пегилированной формы в отношении клеток эпителия конъюнктивы человека

*Н. А. Кихтенко, Н. А. Бондаренко, Н. П. Бгатова, Л. А. Олейник, О. В. Повещенко, А. Ж. Фурсова, П. Г. Мадонов

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», ул. Тимакова, д. 2, Новосибирск, 630060, Российская Федерация

Резюме. В настоящее время отсутствуют эффективные универсальные противовирусные препараты для лечения вирусных заболеваний передней поверхности глаза. В свою очередь, интерфероны III типа показывают высокую активность на гистологических барьерах, к которым, в частности, относится конъюнктура. Модификация белковых молекул нативных препаратов позволяет значительно улучшить их фармакодинамические свойства. В связи с этим представляется логичным создание противовирусных препаратов на основе интерферона лямбда-1 (ИФН-λ1) и его пегилированной формы (ПЭГ ИФН-λ1). **Цель работы:** оценить *in vitro* цитотоксическое действие рекомбинантного человеческого ИФН-λ1 и его пегилированной формы, рассматриваемой в качестве прототипа лекарственного препарата, на клетки конъюнктивы человека *Chang conjunctiva clone 1-5c-4*. **Материалы и методы:** ПЭГ ИФН-λ1 был получен методом электронно-лучевой иммобилизации. Для культивирования использовали культуру клеток нормальной конъюнктивы человека *Chang conjunctiva clone 1-5c-4*. Для оценки цитотоксического действия применяли МТТ-тест. Пролиферативную активность клеток изучали посредством измерения импеданса на микроэлектродах. Ультраструктурные изменения оценивали методом электронной микроскопии. Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0. **Результаты:** ИФН-λ1 (37 мкг/мл) и ПЭГ ИФН-λ1 (42 мкг/мл) не оказывали выраженного цитотоксического воздействия на культуру клеток конъюнктивы человека, а также на их пролиферативную способность. Анализ ультраструктурных изменений клеток конъюнктивы человека показал, что воздействие ИФН-λ1 приводило к активации обменных процессов в клетках, а ПЭГ ИФН-λ1 способствовало дифференцировке, кератинизации эпителиоцитов, а также модификации клеточной мембраны. Десятикратное увеличение концентрации ИФН-λ1 и ПЭГ ИФН-λ1 (до 370 и 420 мкг/мл соответственно) снижало жизнеспособность клеток на 15–20% и вызывало морфологические изменения относительно интактного контроля. **Выводы:** результаты проведенного исследования показали, что ИФН-λ1 и ПЭГ ИФН-λ1 могут быть использованы в качестве активных фармацевтических субстанций для разработки лекарственных препаратов для лечения вирусных поражений конъюнктивы. **Ключевые слова:** интерферон; интерферон лямбда; пегилирование; конъюнктура человека; цитотоксичность; культура клеток нормальной конъюнктивы человека

Для цитирования: Кихтенко НА, Бондаренко НА, Бгатова НП, Олейник ЛА, Повещенко ОВ, Фурсова АЖ, Мадонов ПГ. Изучение цитотоксических эффектов рекомбинантного человеческого интерферона лямбда-1 и его пегилированной формы в отношении клеток эпителия конъюнктивы человека. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2021;9(4):200–208. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2021-9-4-200-208>

***Контактное лицо:** Кихтенко Николай Андреевич; dr.kikhtenko@gmail.com

Investigation of Cytotoxic Effects of Recombinant Human Interferon Lambda-1 and Its Pegylated Form on Human Conjunctival Epithelial Cells

*N. A. Kikhtenko, N. A. Bondarenko, N. P. Bgatova, L. A. Oleynik, O. V. Poveshchenko, A. Zh. Fursova, P. G. Madonov

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology—Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2 Timakova St., Novosibirsk 630060, Russian Federation

Abstract. Currently, there are no efficacious, all-purpose antiviral medicines for the treatment of ocular surface infections caused by viruses. At the same time, type III interferons demonstrate high potency for histological barriers, such as the conjunctiva. Modification of protein molecules in native products can significantly improve their pharmacodynamic properties. Thus, it seems reasonable to develop antiviral medicines based on interferon lambda (IFN-λ1) and its pegylated form (PEG IFN-λ1). **The aim of the study** was to evaluate the *in vitro* cytotoxic effect of recombinant human IFN-λ1 and its pegylated form on *Chang conjunctiva clone 1-5c-4* human conjunctival cells. **Materials and methods:** PEG IFN-λ1 was obtained by the electron beam immobilization method. A normal human conjunctival cell line *Chang conjunctiva clone 1-5c-4* was used for cell cultivation. The MTT test was used to assess the cytotoxic effect. Cell proliferative activity was studied by measuring microelectrode impedance. Ultrastructural changes were assessed by electron microscopy. Statistical processing was performed using the Statistica 10.0 software package. **Results:** IFN-λ1 (37 μg/mL) and PEG IFN-λ1 (42 μg/mL) had no significant cytotoxic effect on the human conjunctiva cell culture and the cell proliferative activity. The analysis of ultrastructural changes demonstrated that IFN-λ1 activated metabolic processes in the cells, and PEG IFN-λ1 promoted differentiation and keratinization of epithelial cells and led to modification of the cell membrane. A ten-fold increase in IFN-λ1 and PEG IFN-λ1 concentration (to 370 μg/mL and 420 μg/mL, respectively) reduced the cell viability by 15–20% as compared to the intact control. **Conclusions:** the study results demonstrated that IFN-λ1 and PEG IFN-λ1 could be used as active pharmaceutical ingredients in the development of medicines for the treatment of conjunctival viral infections.

Key words: interferon; interferon lambda; pegylation; human conjunctiva; cytotoxicity; normal human conjunctiva cell line

For citation: Kikhtenko NA, Bondarenko NA, Bgatova NP, Oleynik LA, Poveshchenko OV, Fursova AZh, Madonov PG. Investigation of cytotoxic effects of recombinant human interferon lambda-1 and its pegylated form on human conjunctival epithelial cells. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii = Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2021;9(4):200–208. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2021-9-4-200-208>

***Corresponding author:** Nikolai A. Kikhtenko; dr.kikhtenko@gmail.com

Разработка новых лекарственных препаратов (ЛП) предусматривает создание их прототипов, обладающих оптимальными фармакологическими параметрами в определенной терапевтической нише. Это может быть достигнуто с помощью нанотехнологий, которые позволяют создавать модифицированные формы фармакологически активных агентов с улучшенными фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами. Поскольку имеющиеся лекарственные вещества, измененные при помощи нанотехнологических методов, имеют особые физико-химические, биологические и фармакокинетические параметры [1], необходимо тщательное изучение потенциальных рисков применения как нативных фармакологических агентов, так и их модификаций.

Для лечения вирусных инфекций, поражающих защитные барьеры организма человека, применяются лекарственные средства, имеющие различный механизм действия. С определенной долей допущения можно сказать, что ЛП на основе интерферонов I и III типов являются универсальными лечебно-профилактическими агентами для терапии вирусных заболеваний. Эти препараты эффективны как на этапе вирусной атаки, так и в случае персистенции возбудителя в организме [2]. Интерфероны I типа являются хорошо изученными цитокинами, и ЛП на их основе имеют многолетнюю историю клинического применения. Интерфероны III типа — интерфероны лямбда — были открыты в 2003 г., и на сегодняшний день зарегистрированных ЛП на их основе нет. В настоящее время изучены четыре представителя этих цитокинов, из которых наиболее перспективным для клинической практики считается интерферон лямбда 1 типа (ИФН- λ_1), который также имеет название интерлейкин-29 (IL-29). После их открытия некоторое время считалось, что интерфероны лямбда по своим функциям аналогичны интерферонам альфа (ИФН- α) и бета (ИФН- β) за счет индукции интерферон-стимулированных генов (ISG) [3].

Наряду с хорошо изученным механизмом антимикробного действия интерферонов по ISG-пути установлено наличие и параллельных механизмов противовирусного действия ИФН- λ в разных типах клеток и тканей. Изучение этих механизмов на моделях вирусной инфекции с использованием мышей, лишенных передачи сигналов ИФН- λ , расширило понимание его вклада в противовирусный ответ на анатомических барьерах и иммунный ответ за их пределами. ИФН- λ способен

ограничивать распространение вируса в головной мозг и устранять хронические вирусные инфекции в желудочно-кишечном, урогенитальном и респираторном тракте. Помимо противовирусного действия ИФН- λ модулирует врожденный и адаптивный иммунитет, аутоиммунитет и прогрессирование опухолей [3], играет важнейшую роль во врожденной противовирусной, противогрибковой и противопаразитарной защите слизистых оболочек [4]. В исследовании F. Antony и соавт. [5] с использованием модели стромального кератита на мышах установлено, что ИФН- λ способен регулировать функциональную активность нейтрофилов для подавления воспаления при патологии роговицы, вызванной вирусом простого герпеса. Результаты исследования показали, что герпесвирусная инфекция I типа вызывает более выраженную выработку ИФН- λ по сравнению с продукцией ИФН- α на поверхности слизистой оболочки роговицы. Обработка роговицы рекомбинантным ИФН- λ подавляла инфильтрацию иммунных клеток в роговице и значительно снижала воспаление.

Ранее было выявлено, что терапия интерферонами вызывает развитие осложнений со стороны органа зрения [6–8]. Поэтому, несмотря на очевидные перспективы клинического применения ИФН- λ для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний передней поверхности глаза, необходимо установить профиль безопасности этого метода лечения, что требует проведения тщательных токсикологических исследований разрабатываемых ЛП на основе ИФН- λ_1 для лечения инфекционных заболеваний глаза.

В настоящее время существует нанотехнология иммобилизации фармакологически активных белков на полимерных носителях с помощью облучения потоком ускоренных электронов — электронно-лучевая иммобилизация (ЭЛИ) [9]. Сущность ЭЛИ заключается в использовании импульсных линейных ускорителей для создания потока ускоренных электронов, который, проходя через раствор, содержащий фармакологически активный белок и инертный полимер, формирует наночастицы белка в капсуле из полимера, например полиэтиленгликоля (ПЭГ). Физико-химический процесс электронно-лучевого пегилирования (ЭЛП) принципиально отличается от химического пегилирования. При химическом пегилировании происходит формирование ковалентной связи крупномолекулярного ПЭГа (20–40 кДа) с белковой молекулой. В результате

формируется крупномолекулярный комплекс белка и полимера (40–70 кДа), который не фильтруется через почки, и, как следствие, удлиняется период полувыведения ЛП. С помощью технологии химического пегилирования созданы препараты ИФН- α ПегИнtron® и Пегасис® [10, 11]. ЭЛП предполагает использование малоразмерных ПЭГов (0,4–1,5 кДа), которые формируют вокруг молекулы белка полимерную капсулу, обуславливающую избыточную гидрофильность всего комплекса, в результате чего возрастает биодоступность белка. По технологии ЭЛИ на основе протеолитических ферментов субтилизинов создан ЛП Тромбовазим®, который более 10 лет используется в клинической практике [12], а также разрабатываемые на основе ИФН- α и ИФН- λ 1 пероральные ЛП с завершённым комплексом доклинических исследований [13]. Нам представляется весьма перспективной разработка ЛП на основе пегилированного по технологии ЭЛИ рекомбинантного ИФН- λ 1 для лечения вирусных поражений передней поверхности глаза.

Цель работы — оценить *in vitro* цитотоксическое действие рекомбинантного человеческого интерферона лямбда-1 и его пегилированной формы, рассматриваемой в качестве прототипа лекарственного препарата, на клетки конъюнктивы человека *Chang conjunctiva clone 1-5c-4*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Рекомбинантный человеческий ИФН- λ 1 в концентрациях 37 и 370 мкг/мл и пегилированный по технологии ЭЛИ ИФН- λ 1 (ПЭГ ИФН- λ 1) в концентрациях 42 и 420 мкг/мл. Выбранные концентрации 37 и 42 мкг/мл являлись минимальными концентрациями, при которых вещества оказывали противовирусное действие в отношении аденовируса *in vitro* на культуре клеток нормальной конъюнктивы человека [14]. Дополнительно исследовано их 10-кратное увеличение. Оба препарата произведены в АО «СЦФБ» (Россия). Степень чистоты препаратов >97% (определена на жидкостном хроматографе АКТА Purifier100; GE Healthcare).

Клеточная культура. Перевиваемая культура нормальных клеток конъюнктивы человека *Chang conjunctiva clone 1-5c-4* из Коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных (НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи). Клетки культивировали в питательной среде Игла МЕМ (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, US Origin), 40 мкг/мл гентамицина сульфата («Дальхимфарм», Россия) и 2 ммоль L-глутамин (ICN, США) в CO₂-инкубаторе при 37 °С и 5% CO₂ до образования конфлюэнтного монослоя.

Исследование цитотоксичности. Клетки конъюнктивы человека высевали в 96-луночные планшеты в количестве 2×10⁴ клеток/лунку. Через 24 ч культивирования среду удаляли, добавляли среду Игла МЕМ с 1% содержанием ЭТС и тестируемые вещества — ИФН- λ 1 в концентрациях 37 и 370 мкг/мл и ПЭГ ИФН- λ 1 в концентрациях 42 и 420 мкг/мл, далее клетки культивировали в течение 48 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °С. В качестве контроля использовали клетки конъюнктивы человека, культивированные в питательной среде Игла МЕМ с добавлением 1% ЭТС, 40 мкг/мл гентамицина сульфата и 2 ммоль L-глутамин без добавления исследуемых препаратов. После инкубации клеток культуральную среду убирали из лунки, добавляли по 100 мкл среды с МТТ (3-[4,5-диметил-тиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия, Sigma) в исходной концентрации 5 мг/мл и инкубировали в течение 4 ч. Поглощение растворенных кристаллов формазана измеряли при длине волны 492 нм с использованием планшетного ридера Stat Fax-2100 (Awareness Technology Inc., США) и выражали в единицах оптической плотности (ЕОП). Для каждой концентрации препаратов и контроля проводилось по 10 повторов эксперимента.

Исследование пролиферативной активности. Пролиферативную активность клеток изучали на аппарате xCELLigence System (Roche Applied Science, США). Влияние ИФН- λ 1 и ПЭГ ИФН- λ 1 на пролиферацию клеток оценивали в дозах 37 и 42 мкг/мл соответственно, контроль клеток осуществляли, как описано в предыдущем разделе.

Изменение импеданса на микроэлектродах на дне лунки выражается как клеточный индекс (КИ), автоматически вычисляемый программой по формуле:

$$\text{КИ} = (R_n - R_b) / t, \quad (1)$$

где R_b — исходное значение импеданса в лунке, содержащей только ростовую среду для клеток или тестируемые вещества, R_n — значение импеданса в любое время t (ч) в лунке, содержащей, помимо ростовой среды, тестируемые клетки.

Таким образом, КИ отражает изменения количества клеток, качества прикрепления клеток и морфологию клеток в лунке, которые могут меняться во времени. Первые сутки клетки росли в планшетах в стандартных условиях культивирования (питательная среда Игла МЕМ с 10% ЭТС 40 мкг/мл гентамицина сульфата и 2 ммоль L-глутамин), клетки вносили в объеме 100 мкл 1×10⁴ клеток/лунку. Через 24 ч среду убирали и вносили среду с 1% содержанием ЭТС и тестируемые вещества. В условиях исследования задавалось общее время сканирования (48 ч) и интервал сканирования (1 ч), далее все измерения производились в автоматическом режиме.

Статистический анализ выполняли с использованием пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft, США). Данные представлены в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения (SD). Достоверность различий между группами оценивали по критериям Манна–Уитни. Различия считались достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Электронно-микроскопическое исследование. Клетки фиксировали в 1% растворе OsO_4 на фосфатном буфере (pH 7,4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон (Serva, Германия). Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм на ультратоме Leica UC7/FC7 (Германия/Швейцария), окрашивали толуидиновым синим, изучали под световым микроскопом LEICA DME и выбирали клетки для электронно-микроскопического исследования. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 70–100 нм, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали с помощью электронного микроскопа JEM 1400 (Япония) Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (г. Новосибирск).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После культивирования клеток конъюнктивы с препаратами ИФН- $\lambda 1$ количественный показатель МТТ-теста, выраженный в единицах оптической плотности, составил для ИФН- $\lambda 1$ в концентрации 37 мкг/мл $1,05 \pm 0,01$ ЕОП, а для ПЭГ ИФН- $\lambda 1$ в концентрации 42 мкг/мл — $1,03 \pm 0,17$ ЕОП. Полученные результаты были

сопоставимы с контролем, в котором этот показатель составил $1,15 \pm 0,08$ ЕОП (рис. 1). Данное обстоятельство позволяет утверждать, что в клетках конъюнктивы после обработки их раствором ИФН- $\lambda 1$ в концентрации 37 мкг/мл и ПЭГ ИФН- $\lambda 1$ в концентрации 42 мкг/мл не происходит изменения метаболической активности клеток, что может свидетельствовать об отсутствии значимых патологических процессов.

Увеличение концентрации препаратов ИФН- $\lambda 1$ в 10 раз приводило к статистически достоверному снижению метаболической активности клеток. Использование ИФН- $\lambda 1$ в концентрации 370 мкг/мл вызывало снижение показателя оптической плотности на 15% ($1,02 \pm 0,01$ ЕОП), а ПЭГ ИФН- $\lambda 1$ в концентрации 420 мкг/мл — на 32% ($0,81 \pm 0,02$ ЕОП). Полученные данные демонстрируют дозозависимость цитотоксических эффектов препаратов ИФН- $\lambda 1$.

Сравнение данных МТТ-теста в единицах оптической плотности и в процентах жизнеспособности клеток показало, что полученные результаты имеют сходную тенденцию (рис. 2). Жизнеспособность клеток конъюнктивы под влиянием ИФН- $\lambda 1$ в концентрациях 37 и 370 мкг/мл была сопоставимой и составила 92 ± 8 и $88 \pm 6\%$ соответственно, что может свидетельствовать об отсутствии цитотоксического влияния препаратов на клетки конъюнктивы в данных концентрациях. Применение ПЭГ ИФН- $\lambda 1$ в концентрации 42 мкг/мл показало сходные результаты ($87 \pm 9\%$). Увеличение концентрации ПЭГ ИФН- $\lambda 1$ в 10 раз снижает жизнеспособность клеток статистически значимо, но не критично (на 21%). С одной стороны, это указывает на наличие дозозависимого эффекта, с другой — свидетельствует

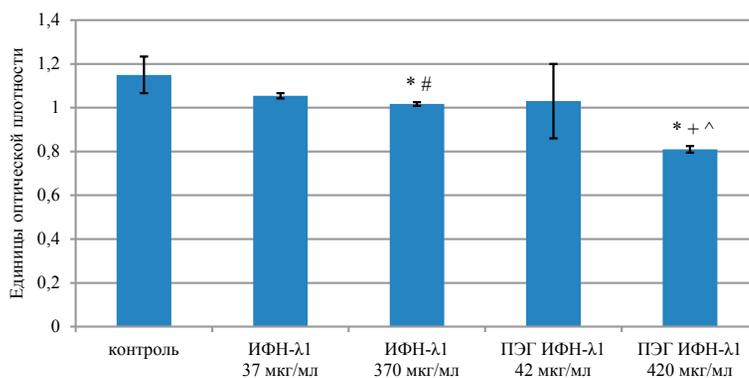


Рис. 1. Цитотоксичность препаратов интерферона лямбда-1 (ИФН- $\lambda 1$) и его пегилированной формы (ПЭГ ИФН- $\lambda 1$) в различных концентрациях для клеток конъюнктивы человека Chang conjunctiva clone 1-5c-4; * — достоверность различий в сравнении с контролем (уровень статистической значимости $p = 0,03$); # — достоверность различий в сравнении с ИФН- $\lambda 1$ 37 мкг/мл ($p = 0,05$); + — достоверность различий в сравнении с ИФН- $\lambda 1$ 370 мкг/мл ($p = 0,04$); ^ — достоверность различий в сравнении с ПЭГ ИФН- $\lambda 1$ 42 мкг/мл ($p = 0,05$)

Fig. 1. Cytotoxicity of interferon lambda-1 (IFN- $\lambda 1$) and its pegylated form (PEG IFN- $\lambda 1$) at different concentrations for the Chang conjunctiva clone 1-5c-4 human conjunctival cells; * significance of differences as compared to the control (statistical significance level $p = 0.03$); # significance of differences as compared to IFN- $\lambda 1$ 37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p = 0.05$); + significance of differences as compared to IFN- $\lambda 1$ 370 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p = 0.04$); ^ significance of differences as compared to PEG IFN- $\lambda 1$ 42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p = 0.05$)

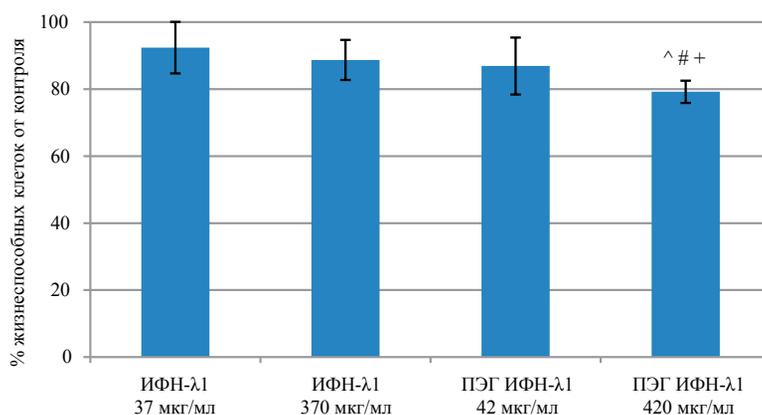


Рис. 2. Жизнеспособность клеток конъюнктивы человека Chang conjunctiva clone 1-5c-4 при воздействии интерферона лямбда-1 (ИФН-λ1) и его пегилированной формы (ПЭГ ИФН-λ1) в различных концентрациях; # — достоверность различий в сравнении с ИФН-λ1 37 мкг/мл (уровень статистической значимости $p = 0,05$); + — достоверность различий в сравнении с ИФН-λ1 370 мкг/мл ($p = 0,04$); ^ — достоверность различий в равнении с ПЭГ ИФН-λ1 42 мкг/мл ($p = 0,05$)

Fig. 2. Viability of the Chang conjunctiva clone 1-5c-4 human conjunctival cells after exposure to interferon lambda-1 (IFN-λ1) and its pegylated form (PEG IFN-λ1) at various concentrations; # significance of differences as compared to IFN-λ1 37 μg/mL ($p = 0.05$); + significance of differences as compared to IFN-λ1 370 μg/mL ($p = 0.04$); ^ significance of differences as compared to PEG IFN-λ1 42 μg/mL ($p = 0.05$)

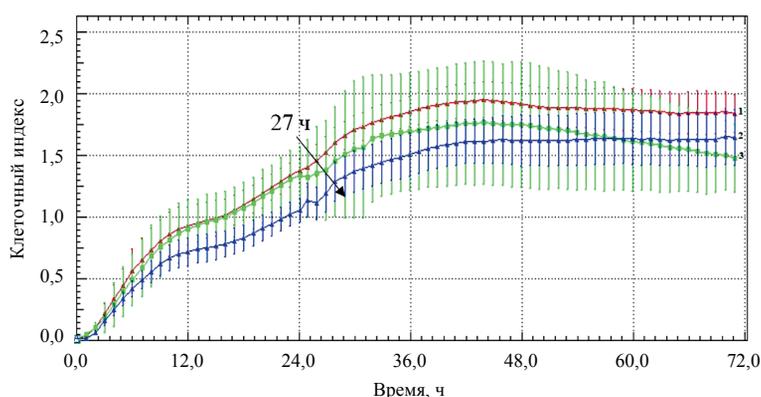


Рис. 3. Пролиферативная активность клеток конъюнктивы под влиянием интерферона лямбда-1 (ИФН-λ1) и его пегилированной формы (ПЭГ ИФН-λ1) в режиме реального времени; (1) --- контроль; (2) --- ИФН-λ1 37 мкг/мл; (3) --- ПЭГ ИФН-λ1 42 мкг/мл

Fig. 3. Proliferative activity of the conjunctival cells during exposure to interferon lambda-1 (IFN-λ1) and its pegylated form (PEG IFN-λ1) in real time; (1) --- control; (2) --- IFN-λ1 37 μg/mL; (3) --- PEG IFN-λ1 42 μg/mL

о слабовыраженном цитотоксическом эффекте высоких доз препарата.

Для подтверждения низкой цитотоксичности исследуемых препаратов ИФН-λ1 в концентрации 37 мкг/мл и ПЭГ ИФН-λ1 в концентрации 42 мкг/мл было изучено их влияние на пролиферативную активность клеток конъюнктивы. Установлено, что пролиферативная активность клеток конъюнктивы после инкубации в течение 48 ч как с ИФН-λ1, так и с ПЭГ ИФН-λ1 была сопоставима с контролем (рис. 3). Статистически значимые различия ($p = 0,03$) по пролиферативной активности клеток наблюдали лишь через 3 ч после добавления ИФН-λ1 (через 27 ч от начала эксперимента) в сравнении с контролем. Таким образом, ИФН-λ1 в концентрации 37 мкг/мл и ПЭГ ИФН-λ1 в концентрации

42 мкг/мл не оказывали негативного влияния на пролиферативную активность клеток конъюнктивы.

Инкубация клеток эпителиоцитов конъюнктивы с препаратами ИФН-λ1 в течение 48 ч оказала некоторое влияние на структурную организацию клеток. Имели место различия в клеточной поверхности и электронной плотности клеток (рис. 4). При введении ИФН-λ1 в дозе 37 мкг/мл отмечали некоторую сглаженность микроворсинок и умеренное возрастание электронной плотности цитоплазмы (рис. 4В). При культивировании с ИФН-λ1 в концентрации 370 мкг/мл незначительно возрастало количество и размеры микроворсинок клеточной поверхности, электронная плотность цитоплазмы не изменялась (рис. 4С). При культивировании с ПЭГ ИФН-λ1

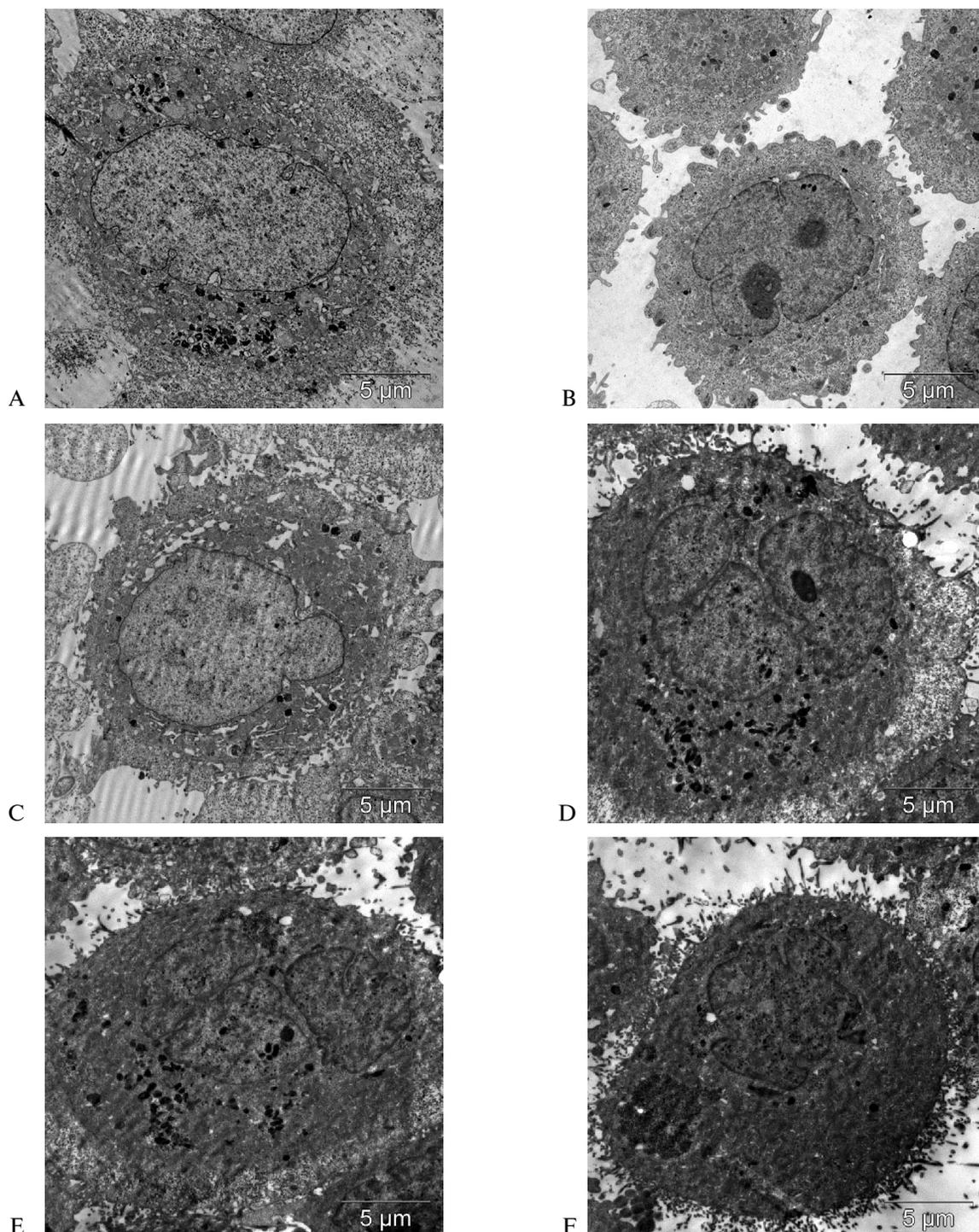


Рис. 4. Различная плотность цитоплазмы эпителиоцитов конъюнктивы при добавлении в культуральную среду интерферона лямбда-1 (ИФН-λ1) и его пегилированной формы (ПЭГ ИФН-λ1); А — контроль; В — ИФН-λ1 в дозе 37 мкг/мл; С — ИФН-λ1 в дозе 370 мкг/мл; D — ПЭГ ИФН-λ1 в дозе 42 мкг/мл; E, F — ПЭГ ИФН-λ1 в дозе 420 мкг/мл

Fig. 4. Different cytoplasm densities of the conjunctival epithelial cells after addition of interferon lambda-1 (IFN-λ1) and its pegylated form (PEG IFN-λ1) to the culture medium. A—control; B—IFN-λ1 at 37 µg/mL; C—IFN-λ1 at 370 µg/mL; D—PEG IFN-λ1 at 42 µg/mL; E, F—PEG IFN-λ1 at 420 µg/mL

в дозе 42 мкг/мл значительно возрастала электронная плотность цитоплазмы и митохондрий, а также увеличивалось количество и размеры микроворсинок клеточной поверхности, при этом возрастала их длина и электронная плотность

(рис. 4D). Увеличение дозы ПЭГ ИФН-λ1 в 10 раз приводило к существенному росту этих показателей (рис. 4E, 4F).

Анализ ультраструктурной организации клеток при введении ИФН-λ1 в дозе 37 мкг/мл

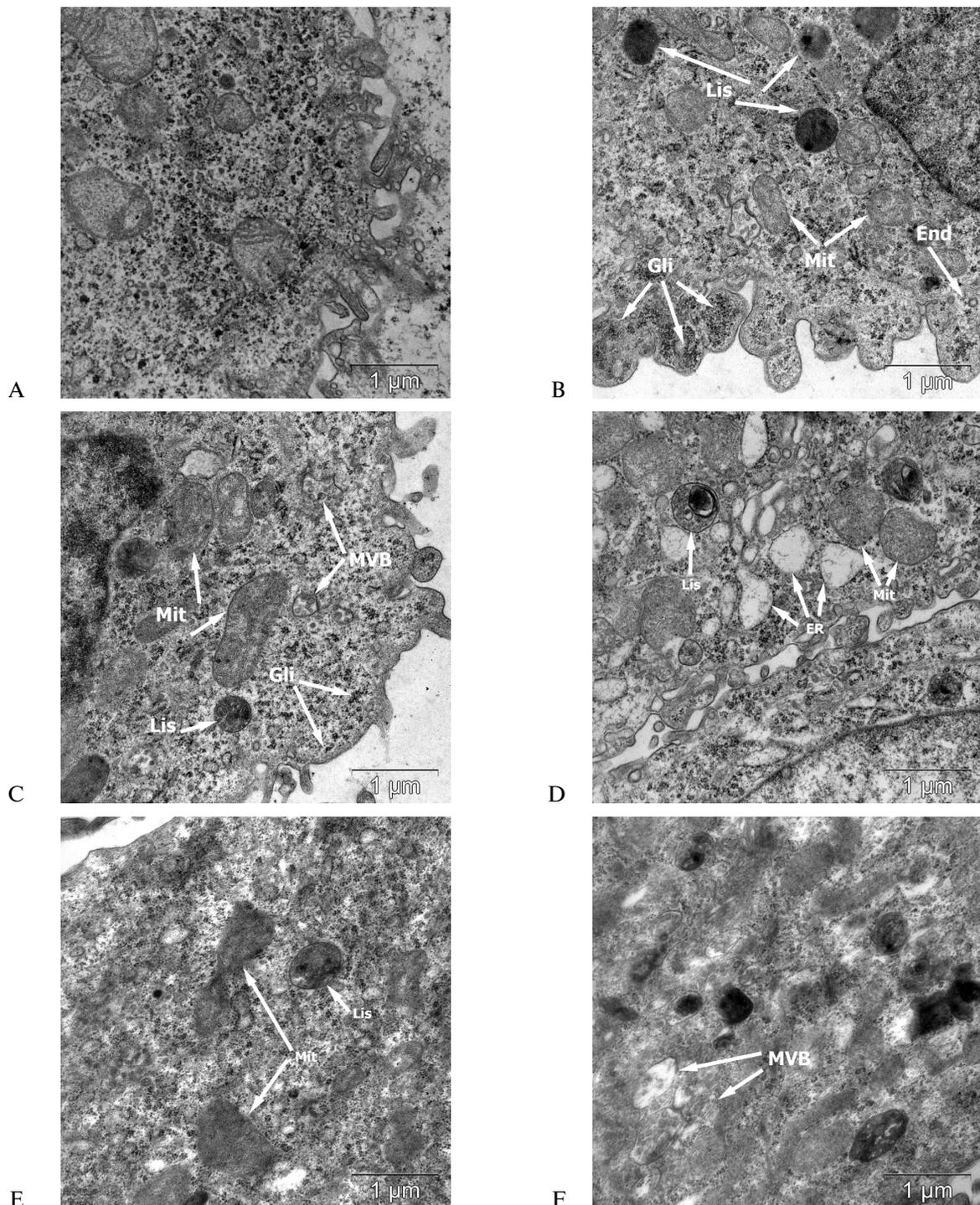


Рис. 5. Ультраструктура эпителиоцитов конъюнктивы при добавлении в культуральную среду интерферона лямбда-1 (ИФН-λ1) и его пегилированной формы (ПЭГ ИФН-λ1). А — контроль; В, С — ИФН-λ1 в дозе 37 мкг/мл; D — ИФН-λ1 в дозе 370 мкг/мл; E — ПЭГ ИФН-λ1 в дозе 42 мкг/мл; F — ПЭГ ИФН-λ1 в дозе 420 мкг/мл; End — эндосомы; ER — эндоплазматическая сеть; Gli — скопления гликогена; Lis — аутолизосомы; Mit — митохондрии; MVB — мультивезикулярные тельца

Fig. 5. Ultrastructure of conjunctival epithelial cells after addition of interferon lambda-1 (IFN-λ1) and its pegylated form (PEG IFN-λ1) to the culture medium. A—control; B, C—IFN-λ1 at 37 μg/mL; D—IFN-λ1 at 370 μg/mL; E—PEG IFN-λ1 at 42 μg/mL; F—PEG IFN-λ1 at 420 μg/mL; End—endosomes; ER—endoplasmic reticulum; Gli—glycogen granules; Lis—autolysosomes; Mit—mitochondria; MVB—multivesicular bodies

(рис. 5) выявил признаки активации обменных процессов в эпителиоцитах конъюнктивы (рис. 5B, 5C). Отмечались митохондрии с хорошо выраженными кристами, большое содержание

свободных полисомальных комплексов рибосом, умеренно расширенные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, накопление гликогена на периферии клеток, наличие

большого содержания эндоцитозных везикул, мультивезикулярных телец, аутофагосом, аутолизосом и лизосом (рис. 5B). Отличительной особенностью эпителиоцитов при введении ИФН-λ1 в дозе 370 мкг/мл было значительное расширение цистерн гранулярной эндоплазматической сети и наличие в их просветах электронно-плотного материала, что является структурным признаком стресса эндоплазматической сети. Также в цитоплазме наблюдали большое содержание аутолизосом и лизосом, но при этом отмечалось снижение содержания эндоцитозных везикул и периферического гликогена (рис. 5D).

При добавлении в культуральную среду ПЭГ ИФН-λ1 в дозе 42 мкг/мл наблюдали накопление лизосомальных структур и деструктивные изменения мультивезикулярных телец, практически не были выявлены эндосомы (рис. 5E). При добавлении в культуральную среду ПЭГ ИФН-λ1 в дозе 420 мкг/мл еще в большей степени возрастала плотность цитоплазмы клеток и электронная плотность митохондрий, плохо выявлялись просветы цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулула. Наблюдали накопление лизосом и локальные скопления гликогена (рис. 5F).

Полученные данные морфологического исследования показали, что добавление в культуральную среду ИФН-λ1 в дозе 37 мкг/мл способствовало усилению обменных процессов в эпителиоцитах конъюнктивы за счет возрастания процессов эндоцитоза и аутофагии. Добавление в культуральную среду ИФН-λ1 в дозе 370 мкг/мл приводило к истощению внутриклеточных ресурсов, о чем свидетельствует наличие структурных признаков стресса эндоплазматической сети, снижение содержания гликогена и эндоцитозных везикул. Инкубация в течение 48 ч культуры клеток конъюнктивы человека *Chang conjunctiva clone 1-5c-4* в культуральной среде с добавлением ПЭГ ИФН-λ1 в дозе 42 мкг/мл и в еще большей степени ПЭГ ИФН-λ1 в дозе 420 мкг/мл, по-видимому, обусловила дифференцировку и кератинизацию эпителиоцитов конъюнктивы, о чем свидетельствовало возрастание электронной плотности цитоплазмы, модификация клеточной мембраны, связанная с увеличением плотности расположения и размеров микроворсинок.

Формат данного исследования предусматривал первичный скрининг безопасности и выглядел достаточно «жестким», поскольку в процессе инкубации происходил длительный постоянный контакт интерферонов и клеток, что в практике клинического применения и даже экспериментов *in vivo* не будет воспроизведено. Тем не менее авторы считают, что необходим именно такой дизайн первичного скрининга безопасности. Полученные

экспериментальные данные позволяют утверждать, что у препаратов ИФН-λ1 отсутствуют цитотоксические эффекты в отношении клеток конъюнктивы при концентрации 37 мкг/мл для ИФН-λ1 и 42 мкг/мл для ПЭГ ИФН-λ1. Ухудшение профиля безопасности ПЭГ ИФН-λ1 относительно нативного ИФН-λ1 можно объяснить повышенной гидрофильностью комплекса интерферон–полимер. Именно благодаря этому обстоятельству повышается биодоступность белков, модифицированных по технологии ЭЛИ [13]. Установленная дозозависимость цитотоксических свойств вполне согласуется с фармакологическими свойствами ЛП на основе интерферонов, для которых характерно развитие осложнений, обусловленное цитотоксичностью препаратов при длительном применении [15, 16].

ВЫВОДЫ

1. ИФН-λ1 в концентрации 37 мкг/мл и ПЭГ ИФН-λ1 в концентрации 42 мкг/мл не обладают выраженной цитотоксичностью на клетки конъюнктивы человека даже при длительном воздействии, не оказывают негативного влияния на их пролиферативную активность, не вызывают серьезных морфологических повреждений и могут считаться безопасными.

2. ИФН-λ1 и ПЭГ ИФН-λ1 обладают дозозависимым цитотоксическим эффектом по отношению к клеткам конъюнктивы. Десятикратное увеличение концентрации (до 370 и 420 мкг/мл соответственно) снижает на 15–20% жизнеспособность клеток и вызывает морфологические изменения относительно интактного контроля.

3. Результаты проведенных экспериментальных исследований показали, что ИФН-λ1 и ПЭГ ИФН-λ1, пегилированный по технологии ЭЛИ, могут быть использованы в качестве активных фармацевтических субстанций для разработки ЛП для лечения вирусного поражения конъюнктивы.

Вклад авторов. *Н. А. Кихтенко* — обобщение результатов исследования, написание, редактирование и переработка текста рукописи; *Н. А. Бондаренко* — проведение МТТ-теста, определение пролиферативной способности клеток, статистический анализ данных, интерпретация полученных результатов; *Н. П. Бгатова* — проведение электронной микроскопии, изучение морфологии клеток, описание результатов; *Л. А. Олейник* — сбор, анализ и обобщение данных литературы; *О. В. Повещенко* — анализ полученных данных исследований с использованием культуры клеток; *А. Ж. Фурсова* — обоснование концепции исследования; *П. Г. Мадонов* — планирование и разработка дизайна экспериментального исследования, написание текста рукописи.

Authors' contributions. *Nikolai A. Kikhtenko*—summarising of the study results, writing, editing, and revision of the paper; *Natalia A. Bondarenko*—conducting the MTT test, determina-

tion of the cells proliferative capacity, statistical analysis of the data, interpretation of the obtained data, *Nataliya P. Bgatova*—performing the electron microscopy assessment, studying the cell morphology, describing the results; *Larisa A. Oleynik*—collection, analysis, and systematisation of the literature data; *Olga V. Poveshchenko*—analysis of the data obtained in the cell studies; *Anzhella Zh. Fursova*—justification of the study concept; *Pavel G. Madonov*—planning and development of the experimental study design, writing of the paper.

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Soares S, Sousa J, Pais A, Vitorino C. Nanomedicine: principles, properties, and regulatory issues. *Front Chem.* 2018;6:360. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00360>
2. Мадонов ПГ, Кихтенко НА, Олейник ЛА, Удут ВВ. Интерферон лямбда — новый представитель фармакологически активных интерферонов. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2020;83(6):30–7. [Madonov PG, Kikhtenko NA, Oleynik LA, Udut VV. Interferon lambda — the new representative of pharmacologically active interferons. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology.* 2020;83(6):30–7 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2020-83-6-30-37>
3. Lazear HM, Nice TJ, Diamond MS. Interferon- λ : immune functions at barrier surfaces and beyond. *Immunity.* 2015;43(1):15–28. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.001>
4. Ye L, Schnepf D, Staeheli P. Interferon- λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(10):614–25. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0182-z>
5. Antony F, Pundkar C, Sandey M, Jaiswal AK, Mishra A, Kumar A, et al. IFN- λ regulates neutrophil biology to suppress inflammation in herpes simplex virus-1-induced corneal immunopathology. *J Immunol.* 2021;206(8):1866–77. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000979>
6. Feroze KB, Wang J. *Interferon Induced Retinopathy.* StatPearls; 2020. PMID: 28722892
7. Rentiya ZS, Wells M, Bae J, Chen KJ, Chao AN, Turgeon N, et al. Interferon- α -induced retinopathy in chronic hepatitis C treatment: summary, considerations, and recommendations. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2019;257(3):447–52. <https://doi.org/10.1007/s00417-018-04209-7>
8. Medhat E, Esmat G, Hamza E, Abdel AA, Fouad FW, Darweesh SK, et al. Ophthalmological side effects of interferon therapy of chronic hepatitis C. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2016;5(3):209–16. <https://doi.org/10.21037/hbsn.2015.12.14>
9. Бекарев АА, Артамонов АВ, Верещагин ЕИ. Способ иммобилизации биологически активного вещества (БАВ) на носитель (варианты) и конъюгат БАВ-носитель, полученный данными способами. Патент Российской Федерации № 24009669; 2008. [Bekarev AA, Artamonov AV, Vereshchagin EI. Method for immobilizing a biologically active substance (BAS) on a carrier (variants) and a BAS-carrier conjugate obtained by these methods. Patent of the Russian Federation No. 24009669; 2008 (In Russ.)]
10. Wylie DC, Voloch M, Lee S, Liu YH, Cannon-Carlson S, Cutler C, Pramanik B. Carboxyalkylated histidine is a pH-dependent product of pegylation with SC-PEG. *Pharm Res.* 2001;18(9):1354–60. <https://doi.org/10.1023/a:1013006515587>
11. Bailon P, Palleroni A, Schaffer CA, Spence CL, Fung WJ, Porter JE, et al. Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjug Chem.* 2001;12(2):195–202. <https://doi.org/10.1021/bc000082g>
12. Мишенина СВ, Мадонов ПГ, Байкалов ГИ, Леонтьев СГ, Зотов СП. Пероральный тромболизис при венозных тромбозах (клиническое исследование). *Тромбоз, гемостаз и реология.* 2019;(4):54–67. [Mishenina SV, Madonov PG, Baykalov GI, Leontyev SG, Zotov SP. The oral thrombolysis for venous thrombosis (clinical study). *Tromboz, gemostaz i reologiya = Thrombosis, Hemostasis and Rheology.* 2019;(4):54–67 (In Russ.)] <https://doi.org/10.25555/THR.2019.4.0900>
13. Артамонов АВ, Бекарев АА, Дыгай АМ, Жданов ВВ, Кишшт ДН, Мадонов ПГ, Шерстобоев ЕЮ. Пегилированный интерферон лямбда, обладающий высокой биодоступностью при пероральном применении, и способ его получения. Патент Российской Федерации № 2678332 C1; 2017. [Artamonov AV, Bekarev AA, Dygay AM, Zhdanov VV, Kinsht DN, Madonov PG, Sherstoboev EYu. Pegylated interferon lambda with high oral bioavailability and method for its production. Patent of the Russian Federation No. 2678332 C1; 2017 (In Russ.)]
14. Кихтенко НА, Ильичева ТН, Дурьманов АГ, Фурсова АЖ, Мадонов ПГ. Изучение противовирусной активности рекомбинантного человеческого интерферона лямбда 1 на культуре клеток конъюнктивы человека. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2021;41(5):31–6. [Kikhtenko NA, Ilyicheva TN, Durymanov AG, Fursova AZh, Madonov PG. Investigation of the antiviral activity of the recombinant human interferon lambda 1 in human conjunctiva cell culture. *Sibirskiy nauchny meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2021;41(5):31–6 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18699/SSMJ20210504>
15. Tovey MG, Lallemand C. Safety, tolerability, and immunogenicity of interferons. *Pharmaceuticals (Basel).* 2010;3(4):1162–86. <https://doi.org/10.3390/ph3041162>
16. Нестерова ИВ. Препараты интерферона альфа в клинической практике. *Российский аллергологический журнал.* 2010;(2):43–52. [Nesterova IV. Interferon alfa in clinical practice. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Allergy.* 2010;(2):43–52 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Кихтенко Николай Андреевич. Nikolai A. Kikhtenko. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1446-7229>

Бондаренко Наталья Анатольевна, канд. биол. наук. Natalia A. Bondarenko, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8443-656X>

Бгатова Наталия Петровна, д-р биол. наук, профессор. Nataliya P. Bgatova, Dr. Sci. (Biol.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4507-093X>

Олейник Лариса Алексеевна. Larisa A. Oleynik. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0336-4227>

Повещенко Ольга Владимировна, д-р мед. наук. Olga V. Poveshchenko, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9956-0056>

Фурсова Анжелла Жановна, д-р мед. наук. Anzhella Zh. Fursova, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6311-5452>

Мадонов Павел Геннадьевич, д-р мед. наук. Pavel G. Madonov, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1093-8938>

Статья поступила 16.08.2021

После доработки 18.10.2021

Принята к печати 09.12.2021

Article was received 16 August 2021

Revised 18 October 2021

Accepted for publication 9 December 2021