

ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ ЭНДОГЕННОЙ И ЭКЗОГЕННОЙ ПРИРОДЫ

«БИОБРАН» В КОРРЕКЦИИ ЭЛЕМЕНТОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННЫМИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ В СОЧЕТАНИИ С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ КЛЕТОЧНОЙ ИММУНОТЕРАПИЕЙ

Балдуева И.А., Пипиа Н.П., Данилова А.Б., Новик А.В., Нехаева Т.Л., Емельянова Н.В., Галлиулина О.А., Авдонкина Н.А.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н.Петрова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Препарат «Биобран», иммуномодулятор растительного происхождения, представляющий собой комплекс полисахаридов, основным из которых является арабиноксилан, был разработан в Японии в 1992 году. К основным фармакологическим эффектам «Биобрана» относят стимуляцию активности естественных киллеров (НК), Т- и В-клеток, макрофагов, подавление проникновения нейтрофилов в очаг воспаления. Экспериментальные исследования, проведенные на животных моделях различных опухолей, показали, что под воздействием этого препарата увеличивается противоопухолевая активность дендритных клеток (ДК), возрастает чувствительность клеток опухоли к химиотерапевтическим агентам. Первые пилотные клинические исследования, проведенные в группе больных раком печени, продемонстрировали увеличение продолжительности жизни пациентов, получавших «Биобран». Тем не менее, в настоящее время еще нет убедительных доказательств противоопухолевой активности данного препарата, нет четких данных о механизмах его действия, что ограничивает точки его приложения и требует проведения стандартных рандомизированных клинических исследований.

Цель. Оценить эффективность препарата «Биобран» как иммуностимулятора, дополняющего активную специфическую иммунотерапию больных диссеминированными злокачественными новообразованиями.

Материалы и методы. В исследование было включено 14 больных диссеминированными злокачественными новообразованиями (меланома кожи – 5, саркомы мягких тканей – 3, рак яичника – 2, рак поджелудочной железы – 2, рак почки – 1, рак предстательной железы – 1), получавших активную специфическую иммунотерапию на основе РТА⁺ активированных ДК, которые имели низкие показатели абсолютного количества НК-клеток в периферической крови. Этой группе больных был назначен «Биобран». В качестве контрольной группы рассматривали пациентов со сходными показателями врожденного иммунитета, которые не принимали данный препарат.

Всем пациентам были выполнены иммунологические исследования на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США): оценивали количественное содержание основных популяций и субпопуляций лимфоцитов в периферической крови.

Результаты. Абсолютное содержание НК клеток в периферической крови больных злокачественными новообразованиями, получивших «Биобран», достоверно увеличивалось в процессе терапии в отличие от пациентов, не получивших этот препарат ($0,06 \pm 0,010$ и $0,1 \pm 0,015 \times 10^9$ клеток, до приема «Биобрана», соответственно, $0,11 \pm 0,005$ и $0,05 \pm 0,012 \times 10^9$ клеток, через 4 мес. от начала лечения, $p = 0,008$). Аналогичные закономерности были выявлены при определении абсолютного содержания НКТ-клеток: $0,07 \pm 0,015$ и $0,015 \pm 0,077 \times 10^9$ клеток до применения препарата, $0,15 \pm 0,010$ и $0,05 \pm 0,012 \times 10^9$ клеток $p = 0,013$, через 4 мес. от начала лечения соответственно.

Выводы. Препарат «Биобран» способствует увеличению абсолютного содержания НК- и НКТ-клеток в периферической крови больных с диссеминированным опухолевым процессом на фоне активной специфической иммунотерапии во 2-й и последующих линиях лекарственного лечения. Дальнейшие исследования позволят изучить влияние «Биобрана» на функциональную активность различных субпопуляций клеток иммунной системы у этой категории больных.

СПОСОБНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРОДУЦИРОВАТЬ ЦИТОКИНЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА НИХ КСИЛОМАННОМ *IN VITRO*

Бляхер М.С., Алешкин А.В., Федорова И.М., Рамазанова З.К., Краснопольская Л.М., Тульская Е.А., Кукушкина Е.А.

ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение. Ксилломаннан – это полисахарид, выделенный из щелочерастворимой фракции мицелия *Ganoderma lucidum*. Противоопухолевая активность ксилломаннана была показана в опытах *in vivo* сотрудниками лаборатории фармакологии и химиотерапии ФГБНУ НИИНА им. Г.Ф. Гаузе. Так как относительно немного исследований содержат информацию о влиянии этого вещества на способность к продукции цитокинов лейкоцитами периферической крови, представлялось актуальным изучить цитокиновый профиль при стимуляции ксилломанном *in vitro*.

ТАБЛИЦА. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ КСИЛОМАННАМ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ (M±m) (К ТЕЗИСАМ БЛЯХЕР М.С. И ДР.)

Виды воздействия	TNF α	IL-10	IL-1 β	IL-6	IL-8
ксиломаннан + NaHCO ₃	300*±47	494*±106	1507*±361	17116±1461	40395*±2837
NaHCO ₃	143±22	311±58	1125±233	14088±1333	31071±3129

Примечание. * – статистически значимое отличие от парной пробы NaHCO₃.

Цель. Изучить влияние ксилломаннана, выделенного из *G. lucidum*, на продукцию цитокинов мононуклеарами периферической крови человека.

Материалы и методы. Из крови 22 здоровых доноров были выделены мононуклеары. Взвесь мононуклеаров стимулировали ФГА, ЛПС, ксилломаннаном, раствором ксилломаннана (NaHCO₃) или без индукторов (спонтанная продукция). После инкубации в планшете при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 20 часов, были получены супернатанты в которых, методом ИФА была определена концентрация TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10. Отработана доза ксилломаннана, не токсичная для клеток и обладающая стимулирующим воздействием. Определение концентрации цитокинов проводилось на ИФА-тестах российского производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия) и ООО «Цитокин» (Россия).

Статистическая обработка проведена с использованием программы Statistica 6.0 и MS Excel. Сравнение вариационных рядов осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

Результаты. При сравнении уровня продукции TNF α под влиянием разных стимуляторов: ФГА, ЛПС или ксилломаннана, выявлено, что ксилломаннан стимулирует продукцию этого цитокина сопоставимо с ФГА и ЛПС и значимо выше, чем под влиянием среды культивирования (спонтанная продукция) и NaHCO₃ (значимо при $p = 0,002$).

Исследование влияния ксилломаннана на продукцию других цитокинов мононуклеарами периферической крови человека продемонстрировало, что данное вещество способствует повышению продукции мононуклеарами периферической крови таких цитокинов как IL-10, IL-1 β , IL-6, IL-8. Поскольку ксилломаннан был растворен в NaHCO₃, проведено сравнение величины воздействия этого вещества и NaHCO₃, что видно в таблице.

Во всех случаях ксилломаннан в большей степени воздействовал на продукцию цитокинов, чем растворитель, а для большинства цитокинов (TNF α , IL-10, IL-1 β , IL-8) – статистически достоверно (величина p колебалась от 0,03 до 0,005).

Заключение. Противоопухолевые свойства ксилломаннана связаны с его способностью активировать клеточный и гуморальный иммунитет. Ксилломаннан проявил себя в данном исследовании как индуктор активации мононуклеаров периферической крови. Он индуцировал продукцию TNF α , который играет важную роль в противоопухолевом иммунитете. Увеличение продукции TNF α в культурах, стимулированных ксилломаннаном, у большинства доноров сопровождалось увеличением продукции IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10.

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО И ГРУППОВОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Буркин М.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Иммунохимические методы активно используются для выявления разнообразных биологически активных низкомолекулярных агентов, в том числе лекарственных соединений. По своим аналитическим характеристикам практический интерес представляют варианты иммуноанализа с избирательным и групповым распознаванием анализируемых соединений. Первые предназначены для идентификации конкретного анализата, вторые позволяют в одной пробе выявлять максимально возможное число структурных аналогов. Так, для скрининговых целей эффективным решением являются методы, обладающие групповой специфичностью. Необходимость идентифицировать отдельное соединение среди близких структурных аналогов может диктоваться его особой активностью, токсичностью или особенностями использования. Подобные системы анализа конструируются на основе антител с разной эпитопной специфичности (к общим или индивидуальным субмолекулярным структурным элементам, эпитопам), а их создание требует дифференцированного подхода. Аффинная хроматография, гибридная технология и технологии дисплея позволяют выделять и селекционировать поликлональные, моноклональные или рекомбинантные антитела определенной эпитопной направленности из целого репертуара специфичностей. Альтернативный подход заключается в селекции *in situ* – избирательном связывании антител специфичных к отдельным эпитопам, происходящем в ходе анализа. Избирательность такого взаимодействия обеспечивается благодаря презентации и/или экранированию на антигенах групповых или индивидуальных эпитопных структур.

Цель и задачи. Конструирование конъюгированных антигенов и создание на их основе систем для селективной и групповой иммунодетекции лекарственных соединений.

Результаты. На основе 7 тетрациклиновых антибиотиков, конъюгированных с белковыми носителями, создана панель антигенов. В конкурентном ИФА, при иммобилизации полученных конъюгатов на твердой фазе, исследованы профили перекрестного взаимодействия поликлональных антител к БСА-ТЦ с каждым из 7 антибиотиков и найдены условия для наилучшего группового распознавания тетрациклина, хлортетрациклина, окситетрациклина и доксициклина, регламентированных в продуктах питания (Food Agric. Immunol., 2009, 20, 245-252).

Антитела, полученные в результате иммунизации кроликов конъюгатом БСА с макролидным антибиотиком тилозином, могли быть разделены по эпитопной специфичности. В зависимости от дизайна иммобилизованного антигена разработаны три варианта ИФА для селективного определения тилозина, его совместного выявления с тилмикозином, а также для группового определения тилозина и спирамицина (Food Chemistry, 2012, 132 (2), 1080-1086).

Гликопептидные антибиотики эремомоцин и ристомицин, конъюгированные с БСА использовались в качестве иммуногенов для получения специфических антисывороток, взаимодействие которых с конъюгатами гомологичных гаптен-обеспечивало избирательность распознавания этих соединений. Используя антигены на основе гетерологичных структурно родственных гаптен-ванкомицина и тейкопланина, несущих общие структурные детерминанты, оказалось возможным выявлять группу гликопептидов (J. Immunol., Methods 2013, 388, 60-67).

Аналогичный принцип позволил на основе антител к конъюгату БСА-сарафлаксаин создать тест для совместного и селективного иммуноферментного определения фторхинолонов, а также дифференцировать основное лекарственное средство дифлоксацин и его активный метаболит сарафлаксаин (Analytical Methods, 2016, 8, 5843-5850).

Заключение. Системы селективного и групп-специфического иммуноанализа, пригодные как для идентификации отдельных лекарственных соединений, так и для одновременного выявления целой группы структурно родственных соединений, могут быть реализованы на основе одних и тех же поликлональных антител, взаимодействующих с разными эпитопными мишенями, представленными на иммобилизованных антигенах.

ПРИНЦИПЫ ИММУНОТЕРАПИИ ПРИ ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВАХ

Ветлугина Т.П., Никитина В.Б., Лобачева О.А., Невидимова Т.И.

Научно-исследовательский институт психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр, Томск, Россия

Введение. Результаты многолетних исследований лаборатории клинической психонейроиммунологии НИИ психического здоровья показали, что нарушения параметров иммунитета при психических расстройствах, отражающих модуляцию психонейроиммунного взаимодействия, оказывают негативное влияние на течение психического заболевания и снижают эффективность терапии. В связи с этим выбор тактики лечения пациентов с психическими расстройствами должен опираться не только на клинико-психопатологические, но и на иммунобиологические критерии.

Цель. Разработка алгоритма оптимизации терапии психических расстройств.

Результаты. При обследовании пациентов с невротическими, связанными со стрессом, расстройствами (расстройства адаптации – 90 человек; ПТСР – 100 человек); непсихотическими органическими психическими расстройствами (232 пациента) сопутствующая соматическая патология и клинические синдромы вторичной иммунной недостаточности (ВИН) выявлялись в 60-90% случаев.

Разработаны программы с включением в комплекс психотерапии широкого спектра иммуноактивных препаратов с учетом особенностей клинического течения психической дезадаптации, глубины иммунных нарушений, сопутствующей соматической патологии. Применение программ оказывает позитивный клинический эффект, сопровождающийся оптимизацией иммунной защиты, снижением в 3 раза количества пациентов с неспецифическими адаптационными реакциями хронического стресса и в 4 раза – с реакциями острого стресса.

Одной из причин, ухудшающих эффективность лечения больных шизофренией, является резистентность к психотропным препаратам. Проведены иммунологические исследования двух групп больных – резистентных (420 человек) и чувствительных (129 пациентов) к проводимой психотерапии. Труднокурабельные больные по сравнению с группой чувствительных к терапии характеризовались статистически значимыми высокими значениями количества лимфоцитов CD3⁺, CD95⁺, факторов гуморального иммунитета (IgG, ЦИК), митогениндуцированной продукцией моноцеларами TNF α ; снижением количества лимфоцитов CD4⁺, CD8⁺, HLADR⁺, митогениндуцированной продукцией IL-4. Для преодоления терапевтической резистентности разработаны различные программы с включением в комплекс лечения иммуноактивного препарата тимогена (синтетический дипептид L-глутамил- L-триптофан), которые были применены при лечении 175 труднокурабельных пациентов. Показано, что применение тимогена позволяет преодолеть резистентность и повысить эффективность лечения у 60,6-72,7% пациентов по сравнению с 32,1-33,3% пациентов в группе сравнения (40 пациентов – стандартная терапия) и с 40,0% в группе плацебо (90 пациентов). Повторное лабораторное исследование показало, что клинический эффект комплексной терапии сопровождался позитивной динамикой ряда параметров иммунитета (CD4⁺, CD8⁺, HLADR⁺ лимфоцитов, ЦИК, IgG).

На основе полученных данных нами разработан алгоритм оптимизации терапии психических расстройств, который состоит из нескольких этапов. На первом этапе при психопатологическом обследовании пациентов (анамнез, нозологические критерии, синдромальная характеристика) особое внимание уделяется выяснению склонности заболевания к затяжному течению, резистентности к психотерапии, в том числе во время предыдущих госпитализаций. На следующем этапе устанавливается наличие клинических синдромов ВИН (инфекционный, аллергический, аутоиммунный, смешанный синдромы), сопутствующей соматической патологии, определяется возможность применения немедикаментозного воздействия, опосредованно влияющего на иммунитет (психотерапия, адаптогены). Этап лабораторной диагностики дает возможность идентифицировать дефекты компонентов иммунной системы, определить уровень иммунных нарушений (изменения носят транзиторный характер, стойкие глубокие изменения с признаками иммунодефицита). На основе анализа всех трех этапов становится возможной разработка дифференцированных схем комплексной психотерапии с определением круга иммуноактивных препаратов.

Заключение. Наиболее важными механизмами иммунотерапии при невротических расстройствах является превенция стресс-индуцированных иммунодефици-

тов, при шизофрении – повышение чувствительности к антипсихотикам. Разработанный алгоритм с применением иммуноактивных препаратов при психических расстройствах позволяет повысить эффективность базисного лечения через оптимизацию сигнальной связи между нервной и иммунной системами, предупреждение и коррекцию иммунной недостаточности, связанной с природой психического расстройства и с длительной фармакотерапией, воздействие на иммунологические механизмы невосприимчивости к психотропным средствам.

АНТИНУКЛЕАРНЫЕ АНТИТЕЛА И ДНКазная СЫВОРОТОЧНАЯ АКТИВНОСТЬ КАК МАРКЕРЫ ОТВЕТА НА ИНФЛИКСИМАБ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Волкова М.В.¹, Кундер Е.В.¹, Генералов И.И.²

¹ ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь

² УО «Витебский государственный медицинский университет», Витебск, Беларусь

Введение. Несмотря на успехи в лечении ревматоидного артрита до 40% пациентов не достигают ремиссии даже с использованием биологической терапии. Одним из способов повышения эффективности лечения является применение индивидуального подхода с оценкой набора специфических маркеров. Роль маркеров заключается в прогнозировании эффекта того или иного препарата у конкретного пациента. Целью данной работы является изучение динамики антинуклеарных антител (АНА) и ДНКазной активности сыворотки до и во время лечения РА инфликсимабом (ИНФ) и их потенциала в прогнозировании ответа на ИНФ.

Материалы и методы. 24 пациента с РА были включены в исследование. Все пациенты соответствовали критериям РА EULAR/ACR 2010. 22/24 пациентов получили 6 инфузий ИНФ в дозе 3 мг/кг в соответствии со стандартным протоколом. 2/24 пациент получил 4 инфузии ИНФ. Все пациенты получали метотрексат (10–17,5 мг в неделю), 18/24 пациентов – глюкокортикоиды (метилпреднизолон 4–8 мг в сутки). До начала лечения ИНФ пациентов не получали каких-либо биологических агентов. Все пациенты имели высокую активность заболевания до начала лечения ИНФ (DAS28 < 5,1).

Определение АНА проводили методом непрямой иммунофлуоресценции на клетках Нер-2 с использованием цифровой системы AKLIDES. АНА измеряли в образцах сыворотки до 1-го введения ИНФ, в 22–30 недель после 1-го введения ИНФ.

Для определения ДНКазной активности использовали метод риванолового сгустка. ДНКазную активность измеряли в образцах сыворотки до 1-го введения ИНФ, через 6 недель после 1-го введения ИНФ и на 30 неделе лечения.

Результаты и обсуждение. На 30-й неделе, улучшение ACR70 достигло 5/22 из пациентов, ACR50 – 10/22 из пациентов, ACR20 – 4/24 пациентов. 13/24 пациентов были АНА-положительными до лечения ИНФ, 12/22 – после 24 недели лечения. Уровни сывороточной ДНКазной активности не отличались до и во время лечения ИНФ ($p > 0,05$).

Для оценки прогностической ценности лабораторных признаков при прогнозировании ответа на ИНФ использовали метод логистической регрессии. Прогностическая модель, которая включала изменения в АНА (Δ АНА) и уровне ДНКазной сывороточной активности (Δ ДНКаз-

ной активность сыворотки), негативность по АЦЦП и РФ была лучше ($p = 0,02$) (площадь под ROC-кривой = 1,0; 95%ДИ 0,84–1,00 $p = 0,0001$), чем модель, которая включала только негативность АЦЦП и РФ (площадь под ROC-кривой = 0,795; 95%ДИ 0,59–0,92, $p = 0,0141$).

Заключение. Результаты исследования подтвердили эффективность лечения РА инфликсимабом для АЦЦП и РФ негативных пациентов. ДНКазная сывороточная активность и АНА могут быть использованы в качестве дополнительных прогностических биомаркеров ответа на ИНФ. Требуется дальнейшее исследование этих показателей в качестве биомаркеров с большим количеством пациентов.

ИНТЕРФЕРОН-ИНДУЦИРУЮЩАЯ И ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ АНАЛОГА ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА И ИНДУКТОРА ИНТЕРФЕРОНА

Гамалей С.Г.¹, Батенева А.В.¹, Шишкина Л.Н.², Скарнович М.О.², Медикова Л.Д.², Богрянцева М.П.², Иванова О.С.¹, Левагина Г.М.¹, Даниленко Е.Д.¹

¹ ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская обл., Россия

² ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Введение. Одним из современных направлений экстренной профилактики и лечения гриппа и ОРВИ является интерферонотерапия, включающая использование в лечебных целях препаратов интерферонов и их индукторов. В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» разработан новый лекарственный препарат для интраназального применения, действующим началом которого является аналог интерферона гамма (IFN γ) Дельтаферон в составе наночастицы, ядро которой образовано индуктором интерферона дрожжевой двуспиральной РНК (вирусоподобная частица, ВПЧ).

Цель. Изучение интерферониндуцирующих свойств препарата ВПЧ-Дельтаферон и его противовирусной активности в отношении вируса гриппа (ВГ) А/Аichi/2/68 (H3N2).

Материалы и методы. Исследование проведено на белых беспородных мышках и мышках линии Balb/c. Препарат ВПЧ–Дельтаферон вводили трехкратно интраназально в дозах 10^3 МЕ и 10^5 МЕ на мышку. Уровень интерферона в образцах крови и тканей дыхательных путей оценивали в противовирусном тесте на культуре мышиных фибробластов L-929. Для изучения противогриппозного действия препарат вводили за 3 ч до заражения ВГ А/Аichi/2/68, через 1 и 2 сут после заражения. Противовирусную активность препарата оценивали по динамике гибели мышей, продолжительности жизни, количеству выживших особей.

Результаты. Показано, что интраназальная лекарственная форма препарата ВПЧ–Дельтаферон обладает способностью повышать титры интерферона как в области введения (в носоглотке – в 20 раз, в легких – в 10–30 раз), так и в сыворотке крови (в 20–30 раз). Интраназальный ВПЧ–Дельтаферон проявлял противовирусную активность в отношении ВГ А/Аichi/2/68 (H3N2), повышая выживаемость (на 30%) и среднюю продолжительность жизни инфицированных мышак.

Заключение. На основании полученных данных можно заключить, что новая лекарственная форма интерферона гамма для интраназального применения обладает способностью индуцировать как местный, так и системный иммунный ответ, что обуславливает ее способность ингибировать развитие гриппозной инфекции.

ВЛИЯНИЕ НАСТОЙКИ ЦИМИЦИФУГИ ДАУРСКОЙ НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ

Гармаев Д.Э.¹, Хобракова В.Б.^{1,2}, Разуваева Я.Г.^{1,2}

¹ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия

² Бурятский государственный университет, Улан-Удэ, Россия

Создание фармакологических средств для профилактики и лечения ряда заболеваний и патологических состояний человека, связанных с нарушением работы иммунной системы, является актуальной проблемой современной медицины. В изучении вопросов иммунокоррекции главенствующей задачей является выбор наиболее оптимальных лекарственных средств, отвечающих требованиям современных стандартов. Перспективным направлением представляется поиск иммуномодуляторов среди средств растительного происхождения, которые имеют ряд преимуществ благодаря наличию в них комплекса биологически активных веществ, которые обеспечивают мягкое действие, низкую токсичность, способность к активации не только иммунной, но и нервной и эндокринной систем, возможность применения у лиц с сочетанными патологиями. Объектом настоящего исследования явилась настойка из корневищ с корнями цимицифуги даурской (*Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim). В народной медицине Приморья *C. dahurica* используется в виде порошка, настойки и жидкого экстракта при головных болях, начальных стадиях гипертонической болезни, при повышенной нервной возбудимости, истерии, бессоннице и др. Известно, что настойка *C. dahurica* оказывает седативное действие, ограничивая двигательную, ориентировочно-исследовательскую активность и рефлекторную возбудимость животных, а также увеличивая продолжительность наркотического сна.

Целью настоящего исследования явилось определение влияния настойки из корневищ с корнями цимицифуги даурской на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов при азатиоприновой иммуносупрессии.

Эксперименты проведены на мышах-самцах линии F₁ (СВАхС57В1/6) массой 18-20 г. Действие исследуемого средства было изучено на интактных животных, а также животных, находящихся в состоянии иммунодепрессии, вызванной цитостатиком азатиоприном, который вводили контрольной группе животных в дозе 50 мг/кг перорально 1 раз в сутки в течение 5 дней. Настойку цимицифуги даурской вводили интактным животным и мышам, подвергнутым иммуносупрессии, в дозе 1 мл/кг перорально 1 раз в день в течение 14 дней.

Состояние макрофагального звена иммунного ответа оценивали в реакции фагоцитоза перитонеальных макрофагов в отношении частиц коллоидной туши. Оптическую плотность лизата клеток перитонеального экссудата, отражающую количество туши, поглощенной перитонеальными макрофагами, определяли при длине волны 620 нм.

При исследовании влияния настойки цимицифуги даурской на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов интактных мышей в отношении частиц коллоидной туши установлено, что данное средство не вызывает значимого изменения фагоцитарного индекса по сравнению с данными в интактной группе. При введении данного средства животным с иммунодефицитом наблю-

дали увеличение фагоцитарного индекса в 1,4 раза по сравнению с данными в контрольной группе.

Эффективность исследуемого средства обусловлена совокупным действием комплекса биологически активных веществ, преимущественно, тритерпеноидами, фенолкарбоновыми кислотами, обладающими выраженными иммуномодулирующими свойствами.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что настойка из корневищ с корнями цимицифуги даурской способна ослаблять супрессивное действие азатиоприна на макрофагальное звено иммунитета, что позволяет рекомендовать его для дальнейшего изучения с целью создания новых растительных иммуномодулирующих препаратов.

СКРИНИНГ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЦЕФАЛОСПОРИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ МЕХАНИЧЕСКИМ ИЗМЕЛЬЧЕНИЕМ И СОРБЦИЕЙ НА ПОЛИМЕРНОМ НОСИТЕЛЕ

Гольдина И.А., Сафронова И.В., Душкин А.В., Гайдуль К.В.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

Введение. Создание антибиотиков в форме наночастиц, сорбированных на полимерных носителях, с целью повышения их эффективности, является перспективным направлением современной фармакологии. Ряд антибиотиков группы цефалоспоринов обладает иммуномодулирующими свойствами различной степени выраженности, осуществляющимися как прямыми, так и опосредованными механизмами воздействия на иммунокомпетентные клетки. Установлено прямое влияние цефалоспоринов на нейтрофилы и макрофаги, а также опосредованное, через выделение продуктов распада бактериальной клетки, усиление фагоцитарных реакций, стимуляция хемотаксиса фагоцитов к очагу инфекции, повышение продукции ГМ – КСФ, подавление продукции провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками.

Цель. Выявление иммуномодулирующих свойств и антибактериальной активности модифицированных форм цефуроксима, цефотаксима и цефоперазона *in vitro*.

Материалы и методы. Механическая модификация официальных форм антибиотиков (ОАО «Биосинтез, Россия) осуществлялась в высокоинтенсивных шаровых мельницах с одновременной иммобилизацией их на полимерном носителе – декстране 40кД (Sigma). Рентгенофазовый анализ композиции проводили на дифрактометре ДРОН – 3 (Россия), с использованием СиК α -излучения при скорости вращения счетчика 2 град/мин. Гранулометрический состав водных суспензий исходного и модифицированного порошка исследовали на лазерном гранулометре Micro-Sizer 201 (Россия) [2].

Проллиферативную активность мононуклеарных клеток крови (МНК) здоровых лиц оценивали *in vitro*, стандартным методом, по включению радиоактивной метки. Определение антимикробной активности антибиотиков – минимальной ингибирующей дозы (МИК), проводилось методом двукратных серийных разведений в мясопептонном бульоне, содержащем изучаемые препараты

в концентрациях от 128 до 0,03 мкг/мл. За МИК принимали наименьшую концентрацию антибиотика, подавляющую видимый рост микроорганизма. Использовали следующие контрольные штаммы бактерий: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC № 27853 F-51, *Staphylococcus aureus* ATCC № 25923 F-49, *Escherichia coli* ATCC № 25922 F-50. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica 7.0 (StatSoft, USA).

Результаты и обсуждение. В результате механохимической обработки смеси антибиотиков и декстрана ее частицы уменьшались до размеров наночастиц (40-100 нм) и формировали рыхлые агрегаты размером 5-50 мкм. Доля частиц антибиотиков наноразмерного диапазона после механохимической модификации составляла 25%.

Нативный и механически модифицированный декстран 40 кД не обладал ни антибактериальной, ни иммуномодулирующей активностью. Оценка пролиферации МНК выявила увеличение спонтанной пролиферации МНК под действием модифицированного цефоперазона с 291(244; 337) до 1302(1192; 1401) имп/мин, $p < 0,05$, (Me (25%; 75%), тогда как цефуроксим и цефотаксим не изменяли данного параметра. Механическая модификация цефоперазона и цефотаксима приводила также к повышению их антибактериальной активности, о чем свидетельствовало уменьшение МИК с 32,0 мкг/мл до 8,0 мкг/мл у цефотаксима и с 64,0 до 4,0 мкг/мл у цефоперазона в отношении изученных штаммов микроорганизмов *in vitro*. Предполагаемым механизмом повышения эффективности модифицированных антибиотиков является увеличение их биодоступности за счет большей растворимости, стабильности во внешней среде и более равномерного распределения внутри клетки.

Заключение. Механохимическая модификация цефоперазона с сорбцией на декстране 40кД приводит к увеличению его иммуномодулирующих свойств и антибактериальной активности *in vitro*, на основании изменения параметров спонтанной пролиферации иммунокомпетентных клеток и минимальной ингибирующей концентрации антибиотика, подавляющей рост контрольных штаммов микроорганизмов.

ВЛИЯНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ИЗ СЫРЬЯ *COLURIA GEOIDES (ROSACEAE)* НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ИММУННЫХ КЛЕТОК

Дутова С.В., Карпова М.Р.

Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова, Абакан, Россия

Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

В качестве одного из основных направлений иммуностимуляции и иммуномодуляции рассматривается влияние на экспансию иммунокомпетентных клеток (Караулов А.В., Калюжин О.В., 2013). Описана корреляция между их пролиферацией и эффективностью иммунного ответа (Добродеева Л.К. и соавт., 2014).

В процессе доклинического изучения иммунотропных свойств эфирномасличных растений сибирской флоры была разработана фармацевтическая субстанция (субстанция Сg) из сырья *C. geoides*, обладающая иммуностимулирующим и иммунокорректирующим эффектом.

Исследуемую субстанцию (Сg) получали методом перколяции 40% этанолом, стандартизовали по выхо-

ду экстрактивных веществ ($2,83 \pm 0,052\%$) и содержание *m*-кумаровой кислоты (не менее 8,5%). В качестве препарата сравнения использовали настойку эхинацеи пурпурной (Е). Экспериментальную модель иммунодепрессии у мышей создавали однократным введением (вн/бр.) циклофосфана в максимально переносимой дозе (250 мг/кг).

Курсовое введение (5 дней) мышам-самкам линии СВА/СаЛас субстанции Сg в дозе 50 мг/кг приводило к достоверному увеличению абсолютного числа лейкоцитов в образцах периферической крови в 1,2 раза ($7,20 (6,80 \div 7,95) \times 10^9/\text{л}$) в сравнении с контролем ($6,10 (4,25 \div 6,70) \times 10^9/\text{л}$). В группе животных, получавших препарат сравнения, — в 1,8 раза ($10,83 (8,73 \div 13,65) \times 10^9/\text{л}$). Число спленоцитов селезенки не изменялось.

В условиях экспериментального иммунодефицита под влиянием субстанции Сg отмечали достоверное увеличение массы селезенки в 1,3 раза (до $0,097 (0,091 \div 0,120)$ г) в сравнении с контролем ($0,074 (0,066 \div 0,097)$ г); а также числа спленоцитов селезенки в 1,7 раза (до $117,63 (100,56 \div 119,50) \times 10^6/\text{орган}$) в сравнении с контролем ($69,25 (66,50 \div 85,00) \times 10^6/\text{орган}$). Причем число спленоцитов селезенки под влиянием субстанции Сg достоверно не отличалось от показателя животных контрольной группы без иммунодефицита ($126,15 (101,30 \div 180,15) \times 10^6/\text{орган}$). То есть, субстанция Сg оказывала иммунокорректирующее действие при иммунодефиците, направленное на пролиферацию иммунных клеток. Введение животным настойки эхинацеи не оказало достоверного влияния на оцениваемые показатели.

Подобный эффект описан для водно-спиртового экстракта Эхиносол, который в гораздо большей дозе (300 мг/кг) способствует достоверному увеличению в перитонеальном экссудате животных количества моноцитов (на 32%) и лимфоцитов (на 83%) (Исайкина Н.В. и др., 2008). Выявленные эффекты исследуемой субстанции Сg проявляются в гораздо меньшей дозе.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПЕРТНОЙ ОЦЕНКЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ДОКЛИНИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА НОРМАЛЬНОГО ДЛЯ ПОДКОЖНОГО ВВЕДЕНИЯ

Иванов В.Б., Кудашева Э.Ю., Мосягин В.Д., Олефир Ю.В., Бондарев В.П., Борисевич И.В.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Потребность в препаратах иммуноглобулинов человека нормального (ИГЧН) в нашей стране и за рубежом остается высокой и постоянно возрастает. Препараты ИГЧН входят в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, применяются в различных областях практической медицины при первичных и вторичных иммунодефицитах, аутоиммунных и инфекционных заболеваниях.

В Российской Федерации зарегистрированы 14 препаратов ИГЧН для внутривенного введения (из них 9 зарубежного производства), в том числе 1 зарубежный препарат ИГЧН (Гамунекс®-С) в лекарственной форме «раствор для инфузий», предназначенный для внутривенного и подкожного введения. Подкожный путь введения лекарственного

препарата используется только при лечении первичного гуморального иммунодефицита у взрослых и детей (до 2 лет) на основании проведенных доклинических и клинических исследований. Подкожные инфузии обычно выполняются еженедельно, тогда как внутривенные — каждые 3-4 недели. Переход к подкожным инфузиям осуществляется после предшествующих внутривенных инфузий, исходя из которых рассчитывается стартовая доза. Препараты ИГЧН для подкожного введения имеют ряд преимуществ по сравнению с препаратами ИГЧН для внутривенного введения: возможность самостоятельного введения на дому, при затрудненном венозном доступе, при развитии системных нежелательных явлений (головная боль, повышение температуры, озноб, миалгии), большая независимость, лучший контроль и улучшение качества жизни за счет терапии на дому, методика подкожного введения легко осваивается пациентами.

Имеющиеся в настоящее время в России документы, содержащие требования к проведению доклинических и клинических исследований препаратов ИГЧН, в значительной степени устарели и не соответствуют современным руководствам Европейского агентства по лекарственным средствам (ЕМА), которые берутся за основу при разработке нормативных правовых актов в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС). Разработка программ доклинических и клинических исследований ИГЧН для подкожного введения входит в компетенцию заявителей, которые могут использовать требования руководства ЕМА, в части, не противоречащей требованиям Федерального закона от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»: необходимо представлять отчеты о собственных доклинических и клинических исследованиях, проведению клинических исследований на детях должно предшествовать законченное поэтапное исследование I и III фаз на взрослых пациентах. Качество препарата должно соответствовать требованиям ФС.3.3.2.0008.15 «Имуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения».

В доклинические исследования рекомендуется включить изучение острой и субхронической токсичности, местно-раздражающего действия и аллергенности. В качестве препарата сравнения может быть использован препарат ИГЧН, зарегистрированный в Российской Федерации.

При регистрации новых отечественных препаратов ИГЧН для подкожного введения рекомендуется проведение клинического исследования I фазы на здоровых добровольцах в целях установления безопасности и переносимости. В программу предрегистрационного клинического изучения препарата рекомендуется также включить открытое клиническое исследование III фазы у взрослых пациентов с первичным иммунодефицитом в течение 12 месяцев с оценкой эффективности, безопасности, фармакокинетических параметров и открытое клиническое исследование III фазы у детей с первичным иммунодефицитом. При разработке дизайна исследования, выборе первичных и вторичных конечных точек эффективности рекомендуется использовать подходы, изложенные в руководстве ЕМА «Guideline on the clinical investigation of human normal immunoglobulin for subcutaneous and/or intramuscular administration (SCIg/IMIg):EMA/CHMP/BRWP/410415/2011 rev 1».

При государственной регистрации препаратов ИГЧН заявитель обязан также представить план управления рисками, содержащий подробное описание мероприятий по фармаконадзору, направленных на выявление, оценку и предотвращение или минимизацию рисков, связанных

с лекарственными препаратами, включая оценку эффективности данных мероприятий.

ПЕРСПЕКТИВЫ ТЕРАПИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕЦЕПТОРНОГО АНТАГОНИСТА ИНТЕРЛЕЙКИНА-1

Ищенко А.М.¹, Шевцов М.А.², Щекина Е.Г.³

¹ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Национальный фармацевтический факультет, Харьков, Украина

Введение. Нерегулируемое развитие воспаления является причиной возникновения большого числа серьезных патологий. Решающую роль в регуляции процессов воспаления играют цитокины, в частности интерлейкины-1, которые, как установлено экспериментально, являются ключевыми медиаторами воспаления, приводящего к тяжелым заболеваниям иммунной и центральной нервной систем организма. Положительные терапевтические эффекты при лечении воспалительных заболеваний могут быть достигнуты блокированием интерлейкина-1 с использованием рекомбинантного рецепторного антагониста интерлейкина-1 (IL-1ra).

Цель и задачи. Цель работы заключалась в изучении терапевтического действия IL-1ra на моделях ряда заболеваний, индуцированных у грызунов.

Материалы и методы. 1. Модель гиперурикемии вызывали внутрибрюшинным введением оксоната калия в дозе 250 мг/кг. IL-1ra вводили в дозе 3 мг/кг и через 2 ч отбирали пробы крови из сосудов кончика хвоста. Гипоурикемическую активность оценивали по уровню мочевой кислоты (МК) в крови и моче.

2. Модель гиперлипидемии вызывали внутрибрюшинным введением холестерина в дозе 0,3 мг/кг и 5000 МЕ витамина D с кормом в течение 3 недель. Уровень гиперлипидемии оценивали по показателям: масса тела, массовые коэффициенты сердца (МКС) и печени (МКП), уровень общих липидов (ОЛ), холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), ЛПНП и ЛНВП, уровень АсАТ и АлАТ в крови; антиоксидантную активность — по содержанию ТБК-Р и ВГ в гомогенате печени.

3. Анксиолитическую активность IL-1ra изучали в тестах приподнятого крестообразного лабиринта и открытого поля, а также на модели резерпиновой депрессии. IL-1ra вводили подкожно в дозах 5 мг/кг и 15 мг/кг. В качестве препаратов сравнения использовали анксиолитик диазепам и имипраим соответственно. Регистрировали уровень тревожности, локомоторную и исследовательскую активности, гипотермию и блефароптоз.

4. Влияние IL-1ra на память изучали в сопоставлении с таковым пирacetам в тесте условной реакции пассивного избегания (УРПИ) на модели амнезии, вызванной внутрибрюшинным введением скополамина в дозе 1,5 мг/кг.

5. Модель церебральной эдемы выполнена на крысах Вистар (200-300 г), которым стереотактически под наркозом вводили клетки глиомы С6. IL-1ra вводили в/в в дозе 50 мг/кг.

6. Противосудорожную активность IL-1ra изучали на модели каразоловых судорог.

Результаты и заключение. 1. Показано, что противовоспалительное действие IL-1ra складывается из гипоурикемического, урикозурического, противовоспалитель-

ного и антиоксидантного эффектов, вследствие чего он может быть рекомендован в качестве эффективного препарата для лечения гиперурикемии и подагры.

2. Сочетание противовоспалительных, антиоксидантных и выраженных гиполлипидемических свойств делает целесообразным применение IL-1ra при атеросклерозе и дислипидемиях как препарата, влияющего одновременно на все основные звенья патогенеза.

3. IL-1ra в тестах приподнятого крестообразного лабиринта и открытого поля проявляет анксиолитическое действие без угнетения ЦНС. На модели резерпинной депрессии IL-1ra проявляет антидепрессивную активность на уровне имипрамина. Таким образом, IL-1ra может быть использован в терапии депрессий и неврозов.

4. Показано наличие у IL-1ra ноотропных свойств. Сочетание антиамнестической и противовоспалительной активности IL-1ra делает возможным использование препарата при болезни Альцгеймера и других заболеваниях ЦНС.

5. IL-1ra обладает противоопухолевым действием, задерживает рост опухоли, удлиняет время жизни экспериментальных животных.

6. Показано, что IL-1ra проявляет выраженный противосудорожный эффект и может быть использован в качестве противосудорожного препарата для лечения эпилепсии и др.

ИССЛЕДОВАНИЕ КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

Кажарова С.В., Коровкина Е.С., Костинов М.П.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Введение. Внебольничная пневмония (ВП) – широко распространенное заболевание у взрослых, занимающее ведущее место в структуре заболеваемости и смертности от инфекционных заболеваний в развитых странах. Рост числа антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов диктует необходимость поиска новых подходов к терапии и реабилитации больных с различными воспалительными заболеваниями системы органов дыхания.

Цель. Изучение иммунологической эффективности иммуномодулирующих препаратов у пациентов с тяжелой и среднетяжелой формами ВП.

Материалы и методы. В исследование вошло 60 пациентов в возрасте от 18 до 70 лет (средний возраст $53,15 \pm 3,18$) с диагнозом «внебольничная пневмония среднетяжелого и тяжелого течения», находившиеся на госпитальном лечении с 2016–2017 гг. Пациенты были распределены на три группы, методом случайной выборки: 1 группа ($n = 20$) получали терапию препаратом Бронхо-ваксом в сочетании с базисной антибактериальной и симптоматической терапией; 2 группа ($n = 20$) получали препарат Азоксимера бромид в сочетании с базисной антибактериальной и симптоматической терапией; контрольная группа ($n = 20$) проводилась только базисная антибактериальная и симптоматическая терапия.

Проведенное обследование: клинический анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы и СОЭ на 1 и 13 дни заболевания. Для верификации диагноза пневмонии всем больным было проведено рентгенологическое исследование в 1 и 13 дни. Для оценки качества жизни все пациенты заполняли дневники самоконтроля. Также производился забор сыворотки для дальней-

шего определения цитокинового профиля и острофазовых белков воспаления.

Результаты. При анализе данных клинического анализа крови выявлено: достоверное снижение количества лейкоцитов периферической крови во всех группах пациентов на 13 день заболевания, более выраженная динамика снижения уровней лейкоцитов наблюдалась в группе № 1. При анализе содержания палочкоядерных нейтрофилов более выраженная динамика снижения уровне наблюдалась в группе № 2. При анализе данных СОЭ более выраженная динамика снижения уровня наблюдалась в группе № 1.

Заключение. Применение азоксимера бромида и бронхо-ваксома является эффективным и безопасным средством коррекции иммунных нарушений при назначении по соответствующей схеме в комплексе с антибактериальными препаратами. При применении азоксимера бромида наблюдается более ранняя положительная динамика клинических симптомов, что позволяет сделать вывод о повышении эффективности лечения тяжелой пневмонии при включении азоксимера бромида в состав комплексной терапии. Использование препаратов азоксимера бромида и бронхо-ваксом повышает эффективность антибактериальной терапии, сопровождается положительной клинической динамикой. Таким образом, включение иммуномодуляторов в состав комплексной терапии ВП клинически обосновано.

ИЗУЧЕНИЕ ТРОМБОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ИНФУЗИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА КАК ОБЯЗАТЕЛЬНЫЙ ЭЛЕМЕНТ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНОТЕРАПИИ

Корнилова О.Г., Борисевич И.В., Олефир Ю.В., Мовсесянц А.А.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение. Вероятность возникновения тромбоэмболических осложнений, включая инсульт, инфаркт миокарда, тромбоэмболию легочной артерии и тромбоз глубоких вен/артерий, является нежелательным эффектом внутривенной иммуноглобулинотерапии. Ранее эти осложнения связывали исключительно с повышением вязкости крови при введении препарата, а возможным способом их исключения являлось соблюдение режима дозирования и скорости инфузии. В настоящее время установлено, что переносимость препаратов иммуноглобулинов человека, в числе прочего, зависит от содержания в них остаточных количеств факторов свертывания крови и от их влияния на кинетику образования тромбина. В связи с этим, международные и российские фармакопейные требования предусматривают необходимость доказательства отсутствия тромбогенного потенциала готовой формы препаратов иммуноглобулинов человека.

Цель. Обосновать параметры и критерии оценки тромбогенного потенциала и изучить соответствие препаратов иммуноглобулинов человека отечественного производства их значениям.

Материалы и методы. Образцы препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения отечественного производства, методы системного анализа и документальной экспертизы, клоттинговые и хромогенные методы.

Результаты. Для оценки тромбогенного потенциала препаратов обоснованы следующие параметры: изменение кинетики образования тромбина стандартной

(нормальной) плазмы крови человека в тесте генерации тромбина; активность прокоагулянтных факторов свертывания крови (II, VII, IX, X, XI); а так же изменение неактивированного частичного тромбопластинового времени стандартной плазмы крови человека. Критериями оценки являются максимальное количество тромбина в тесте генерации тромбина, не превышающее 350 нМоль, латентный период (лаг-фаза) генерации не менее 11 мин., период образования максимального количества тромбина – не менее 19 мин., активность фактора XIa, не превышающая 10 МЕ/мл, факторов II, VII, IX, X и калликреина – менее 50 МЕ/мл, а также отсутствие уменьшения времени образования сгустка в стандартной плазме крови человека. Выявлено, что в исследованных образцах препаратов иммуноглобулинов человека четырех отечественных производителей остаточное содержание факторов свертывания крови IX, IXa, VII не превышает установленный предел, активность факторов II и X не проявляется, установлено наличие в образцах антитромбина III в количестве более 1 МЕ/мл, латентный период генерации тромбина и период образования максимального количества тромбина не превышает 3 мин. Полученные результаты свидетельствуют о низком тромбогенном потенциале этих образцов.

Заключение. Обоснованные параметры и критерии могут быть использованы для подтверждения безопасности препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения в части оценки их возможного негативного влияния на свертывающую систему крови пациента. Тромбогенный потенциал изученных образцов препаратов иммуноглобулинов человека отечественного производства соответствует международным стандартам качества.

РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПСОРИАЗА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО РЕЦЕПТОРНОГО АНТАГОНИСТА ИНТЕРЛЕЙКИНА-36 (IL-36ra) ЧЕЛОВЕКА

Колобов А.А.^{1,2}, Кондратьева Е.В.¹, Кудлинг Т.В.¹, Карасев М.М.¹, Калинин Р.С.¹, Протасов Е.А.¹, Нимирицкий П.П.^{1,2}, Стефанов В.Е.^{1,2}, Александров Г.В.¹, Петров А.В.¹, Симбирцев А.С.¹

¹ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА РФ, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Генерализованный пустулезный псориаз (ГПП) – это редкая, в некоторых случаях смертельно опасная форма псориаза, которая вызывается рядом мутаций в гене рецепторного антагониста интерлейкина-36 (IL-36ra), сопровождающихся его сниженной экспрессией или активностью. Введение экзогенного IL-36ra могло бы применяться для лечения ГПП и других форм псориаза.

Цель и задачи. Цель данной работы – проведение доклинических исследований лекарственного средства для лечения псориаза на основе рекомбинантного IL-36ra человека. Задачи данной работы включали в себя создание плазмидных векторов для экспрессии гена IL-36ra, создание штамма-продуцента IL-36ra на основе *E. coli*, разработку методов очистки и хранения IL-36ra и доклинические исследования активности и токсичности IL-36ra.

Материалы и методы. Поскольку для полной биологической активности IL-36ra необходимо отщепление инициаторного остатка метионина, нами был получен

штамм-продуцент IL-36ra на основе *E. coli*, трансформированный плазидами, несущими гены IL-36ra и метионинаминопептидазы (МАП) *E. coli*. Была разработана методика культивирования штамма-продуцента IL-36ra в ферментерах. Была разработана схема хроматографической очистки IL-36ra на анионообменном сорбенте GE Q и гидрофобном сорбенте Tosoh Butyl-650. Была разработана композиция его готовой лекарственной формы. Была подобрана эффективная доза препарата. Были исследованы фармакокинетика и острая токсичность препарата на мышах, крысах и кроликах.

Результаты. Разработанная методика культивирования штамма-продуцента IL-36ra и его дальнейшей очистки позволяет получать с 1 литра бактериальной культуры до 40 мг очищенного IL-36ra с примесью < 5% его формы, содержащей неотщепленный N-концевой остаток метионина. Показана способность полученного препарата IL-36ra купировать индуцированный псориазоподобный фенотип у мышей в дозе 0,5 мг/кг при подкожном введении. Дозы препарата до 200 мг/кг не токсичны для грызунов и зайцеобразных. Препарат апирогенен и не оказывает местно-раздражающего действия.

Заключение. Полученный препарат рекомбинантного рецепторного антагониста интерлейкина-36 (IL-36ra) человека эффективно купирует псориазоподобный фенотип у мышей и не демонстрирует острой токсичности в дозах до 200 мг/кг, что в тысячи раз превосходит расчетную терапевтическую дозу для человека. Методика получения IL-36ra пригодна для промышленного масштабирования. После окончания доклинических испытаний препарат может быть испытан на людях.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ АКТИВАТОРА ПРЕКАЛЛИКРЕИНА В ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА

Кривых М.А., Корнилова О.Г., Жук И.Е.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Введение. Количественное определение содержания активатора прекалликреина является одним из ключевых показателей качества, определяющих специфическую безопасность таких инфузионных препаратов крови, как альбумин человека. С присутствием в указанных препаратах активатора прекалликреина связывают возможные нежелательные реакции в виде гипотензии. До настоящего времени лекарственные препараты альбумина человека отечественного производства не подвергались контролю качества на содержание активатора прекалликреина ни в процессе производства, ни при выпуске готового лекарственного препарата. Всемирная организация здравоохранения рекомендует проводить определение содержания активатора прекалликреина в препаратах крови человека, включая альбумин. Фармакопейной статьей «Альбумин человека» ФС.3.3.2.0006.15 Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания впервые в отечественной фармацевтической практике установлены требования по содержанию активатора прекалликреина на уровне не более 35 МЕ/мл.

ТАБЛИЦА. СОДЕРЖАНИЕ АКТИВАТОРА ПРЕКАЛЛИКРЕИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА (К ТЕЗИСАМ КРИВЫХ М.А. И ДР.)

Группировочное наименование лекарственного препарата (концентрация)	№ образца	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл	
		хромогенный кинетический метод	хромогенный метод по конечной точке
Альбумин человека (10%)	1	5,3±0,3	5,8±0,4
Альбумин человека (10%)	2	1,1±0,1	1,9±0,2
Альбумин человека (10%)	3	4,7±0,2	4,7±0,3
Альбумин человека (10%)	4	Менее 1	Менее 1
Альбумин человека (10%)	5	Менее 1	Менее 1
Альбумин человека (10%)	6	9,1±0,6	14,7±0,7
Альбумин человека (20%)	7	5,4±0,4	5,9±0,5
Альбумин человека (10%)	8	9,1±0,6	9,5±0,5

Цель. Изучить количественное содержание активатора прекалликреина в лекарственных препаратах альбумина человека отечественного производства.

Материалы и методы. Использовали образцы лекарственных препаратов альбумина человека, раствор для инфузий, 100 мг/мл (10%) и 200 мг/мл (20%) отечественного производства; стандартный образец активатора прекалликреина в альбумине BRP EP CRS, серия № 3 (кат. № Y0000263). Использовали исследуемые образцы без предварительного разведения, раствор прекалликреина (American Diagnostica GmbH, Кат. № ADG472) в разведении 1:100. Определение проводили хромогенным кинетическим методом и с оценкой по конечной точке. Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистическими методами с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel. Результаты представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ($\bar{x} \pm S_x$).

Результаты. Проведено исследование количественного содержания активатора прекалликреина в образцах 8 серий лекарственных препаратов альбумина человека отечественного производства. Полученные значения содержания активатора прекалликреина составили менее 15,4 МЕ/мл (табл.), что соответствует фармакопейным требованиям, предъявляемым к данной группе лекарственных препаратов.

Заключение. Содержание активатора прекалликреина в изученных сериях лекарственных препаратов альбумина человека отечественного производства находится на уровне, позволяющем обеспечить их специфическую безопасность, и соответствует современным международным стандартам качества.

ИММУНОКОРРИГИРУЮЩАЯ И ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИСАХАРИДА ИЗ МОРСКИХ БАКТЕРИЙ *PSEUDOALTEROMONAS NIGRIFACIENS* ПО ОТНОШЕНИЮ К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Крылова Н.В., Смолина Т.П., Леонова Г.Н.

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток, Россия

Клещевой энцефалит (КЭ) относится к числу опасных нейровирусных инфекций, регистрируемых на Евразийском континенте. Для лечения пациентов с диагно-

зом КЭ лицензированных противовирусных препаратов до сих пор не существует. Установлена способность вируса КЭ (ВКЭ) модулировать иммунный ответ хозяина, что может оказывать решающее влияние на течение и исход заболевания (Robertson, 2009; Ye, 2013). В этой связи, актуальным является поиск противовирусных препаратов, которые могли бы не только ингибировать репликацию вируса, но и корригировать иммуносупрессию, индуцированную вирусом.

Цель. Комплексное изучение иммунокорректирующей и противовирусной активности капсульного полисахарида из морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* в отношении вируса КЭ.

Материалы и методы. Капсульный полисахарид (КПС) получен в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Оценка уровня экспрессии мембранных молекул (CD69, HLA-DR, CD107a) на моноцитах, NK-клетках и CD8⁺-лимфоцитах осуществляли стандартным методом двух- или трехцветного иммунофлюоресцентного окрашивания цельной крови здоровых доноров на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Противовирусную активность соединения оценивали по цитопатическому действию (ЦПД) вируса на монослой культуры клеток СПЭВ, инфицированных ВКЭ и обработанных КПС (в диапазоне от 10 до 12000 мкг/мл).

Результаты. Установлено, что через 24 ч после инфицирования лейкоцитов крови здоровых доноров вирусом КЭ (моi 0.01) в инфицированных пробах, необработанных КПС, процент вирус-положительных клеток составил 57±8%; в пробах, обработанных 100 мкг/мл КПС, обнаружено 11±4% вирус-инфицированных клеток. Добавление 100 мкг/мл КПС к образцам цельной крови, инфицированным ВКЭ, приводило к увеличению (в 1,3-2,6 раза) уровня экспрессии активационных маркеров CD69 и HLA-DR на моноцитах, NK- и CD8⁺-клетках, по сравнению с необработанными инфицированными образцами ($p \leq 0,05$). Кроме того, подобная обработка КПС инфицированных образцов крови повышала процент NK- и CD8⁺ клеток, экспрессирующих маркер дегрануляции CD107a (до 8,3-10,2%), по сравнению с необработанными инфицированными образцами (1,1-2,3%).

Исследование противовирусной активности КПС в отношении ВКЭ показало, что на 6 сут после инфицирования культуры клеток СПЭВ тестируемый полисахарид (в концентрации 1000 мкг/мл) снижает титр вируса на

4,75 log₁₀ TCID₅₀/мл. IC₅₀ данного полисахарида (концентрация, снижающая ЦПД вируса на 50% по сравнению с контролем) составила 814,5 мкг/мл, SI (селективный индекс) – 13,4.

Заключение. Продемонстрирована *ex vivo* способность капсульного полисахарида из морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* повышать активационный и цитотоксический потенциал клеток крови человека, сниженный под воздействием ВКЭ. Показана *in vitro* противовирусная активность этого полисахарида в отношении ВКЭ. Полученные данные об иммунокорригирующей и противовирусной активности КПС свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения этого гликополимера как перспективного противовирусного препарата в комплексной терапии КЭ.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ И АДЬЮВАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ГЕРМАНИЯ И РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ В ОПЫТЕ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНАХ

Лаврентьева И.Н.^{1,2}, Семенов А.В.^{1,3},
Сухобаевская Л.П.^{1,2}, Зарубаев В.В.^{1,2},
Арсентьева Н.В.^{1,2}, Амбросов И.В.^{1,2}

¹ ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

² ООО «ВДС Фарма», Москва, Россия

³ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Цель. Сравнение иммуномодулирующей и адьювантной активности препарата германия WDS-9 (АД1) и препарата растительного происхождения IMOD (АД2) при экспериментальной гриппозной инфекции у мышей.

В задачи исследования входило определение уровня протективной активности соединений АД1 и АД2 при экспериментальной летальной гриппозной инфекции; их прямого вирусингибирующего действия при экспериментальной нелетальной гриппозной инфекции и содержания в плазме крови животных опытных и контрольных групп некоторых иммунологических маркеров.

Использованы: вирус гриппа (ВГ), штамм А/Аichi/2/68 (H3N2); перевиваемая культура клеток MDCK; фармацевтические препараты сравнения – осельтамивир (тамифлю) или циклоферон. Исследование проведено на взрослых белых беспородных нелинейных мышцах весом 14-16 г. В двух экспериментах мыши были распределены на 4 группы (n = 10 каждая), зараженные интраназально вирусом гриппа. За 1 день до заражения и один раз в сутки в течение 3 дней после инфицирования животным группы 1 вводили плацебо (контроль действия вируса); животным групп 2 и 3 – препараты АД1 или АД2; 4-й группы – препараты сравнения тамифлю или циклоферон. Препараты АД1, АД2 и препараты сравнения вводили внутривентрикулярно.

Результаты. Под действием IMOD отмечали снижение смертности мышей с индексом защиты, равным 20%, а также достоверное снижение репродукции вируса гриппа в легких мышей на 3-и сутки после инфицирования, когда титр вируса составил 3,9 ± 1,9 lgEID₅₀/0,2 мл в опытной группе против 5,1 ± 2,1 lgEID₅₀/0,2 мл в контрольной группе. Протективное и вирусингибирующее действие препарата WDS-9 не выявлено.

В группе мышей, инфицированных вирусом гриппа, через 7 суток после заражения отмечено нарастание количества НК-клеток и цитотоксических лимфоцитов (CTL), а также В-клеток (CD19) при практически не измененных показателях активности Т-лимфоцитов (Т-клетки, Th-клетки). На 25 сутки после инфицирования на фоне снижения активности НК-клеток и CTL, регистрировали увеличение общего числа Т-клеток и Т-хелперов, а также дальнейший прирост количества В-клеток.

Под воздействием циклоферона напротив, отмечено снижение количества CTL на 7 сутки после заражения вирусом гриппа и более чем двукратный прирост их количества через последующие 18 суток (25 день после заражения мышей). Содержание НК-клеток через 7 суток незначительно повышалось, снижаясь через 25 суток наблюдения. Концентрация маркеров Т- и В-клеточного звена иммунитета повышалась к 25 суткам. Схожая динамика иммунного ответа наблюдалась у животных, получивших препарат IMOD.

В группе животных, получивших препарат WDS-9, наблюдали снижение содержания общего количества Т-клеток к 25 дню, при существенном нарастании количества В-клеток на этом же сроке наблюдения, что свидетельствует о стимулировании преимущественно гуморального компонента адаптивной иммунной системы. В пользу предположения о переключении иммунного ответа Th1 на Th2 говорит снижение содержания маркеров провоспалительного врожденного иммунного ответа (НК-клетки), а также отсутствие выраженной динамики изменения CTL в данной группе.

Заключение. Полученные результаты могут свидетельствовать о преимущественно протективном и прямом вирусингибирующем действии препарата IMOD и преимущественно адьювантом действии препарата WDS-9.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ИСПЫТАНИЯ ПРИ ОЦЕНКЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Лысыкова С.Л., Головинская О.В., Зубков Д.А.,
Мовсесянц А.А.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

В настоящее время в клинической практике широко применяются биотехнологические препараты, полученные с использованием технологии рекомбинантной ДНК, к качеству которых предъявляются серьезные требования. Физико-химические характеристики биотехнологических препаратов (подлинность, количественное и качественное содержание родственных соединений и примесей, молекулярно-массовое распределение и др.) не являются достаточными для прогнозирования проявлений их биологической активности, определяющих эффективность препаратов при клиническом применении. Оценка специфической биологической активности в тестах *in vitro* и *in vivo*, в свою очередь, позволяет количественно охарактеризовать фармакологическое действие лекарственного средства и направленно изучить механизмы его терапевтических эффектов, что свидетельствует о высокой важности этого показателя при оценке качества биотехнологических лекарственных препаратов.

Пригодность и надежность аналитической методики, используемой при оценке качества лекарственных средств, подтверждается ее специфичностью, чувствительностью, диапазоном аналитической области, устойчивостью, линейностью, достоверностью и прецизионностью. Устойчивость аналитической методики определяется как способность сохранять найденные для нее в оптимальных условиях характеристики при вероятных небольших отклонениях от этих условий проведения анализа. Согласно положениям ГФ XIII, устойчивость должна изучаться в тех случаях, когда методика основана на использовании особо чувствительных к внешним условиям методов анализа, однако не является обязательной характеристикой для всех методик количественного определения. Методики определения биологической (специфической) активности характеризуются особой чувствительностью к изменению внешних условий, что обусловлено участием в испытаниях различных биологических объектов, таких как культуры клеток, экспериментальные животные и др. Анализ факторов, влияющих на устойчивость аналитических методик определения биологической (специфической) активности биотехнологических лекарственных препаратов, показал, что результаты количественного определения при проведении испытаний на культурах клеток зависят от условий восстановления клеточной культуры, жизнеспособности клеток, концентрации клеточной суспензии, числа пассажей культуры клеток, условий и продолжительности хранения клеточной суспензии до момента использования в испытании, условий и продолжительности хранения питательных сред и растворов, продолжительности и условий инкубации на разных этапах проведения испытания, диапазона и шага разведения образцов, критериев пригодности, качества реактивов и материалов. Для указанных факторов должны быть определены диапазоны значений, в пределах которых их влияние на результаты анализа исключено, а также установлены критические условия и параметры, отклонение от которых недопустимо. При проведении испытаний *in vivo* важен выбор вида и линии животных, возраста, пола, массы тела, условий содержания, поставщика лабораторных животных и др. Особое внимание следует уделять установлению четких критериев приемлемости результатов испытания, а также использованию аттестованных стандартных образцов, положительного и отрицательного контроля. Все условия выполнения методики должны быть четко отражены в документах, регламентирующих проведение испытаний по оценке качества лекарственных препаратов по показателю «Специфическая (биологическая) активность».

Учитывая особую чувствительность биологических объектов, изучение устойчивости должно быть обязательным при подтверждении пригодности методов оценки специфической активности биотехнологических лекарственных средств. Это особенно важно на этапе разработки препаратов, оценки их качества, выбора метода для обоснования включения в спецификацию, что в конечном итоге должно обеспечить высокий уровень качества указанной группы препаратов при их внедрении и дальнейшем использовании в практической медицине.

ИНГИБИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ АКТИВИРУЮЩЕГО РЕЦЕПТОРА НК-КЛЕТОК NKG2D РЕКОМБИНАНТНЫМ БЕЛКОМ MICA

Лысюк Е.Ю.^{1,2}, Шуленина Е.А.³, Посвятенко А.В.^{1,2,4}, Кибардин А.В.^{1,2}, Абакушина Е.В.⁵

¹ Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

² Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, Россия

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

⁴ ФГБОУ «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁵ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, Обнинск, Россия

Одним из важных активирующих рецепторов НК-клеток является рецептор NKG2D, необходимый для обнаружения и уничтожения трансформированных и инфицированных клеток. Лигандами для NKG2D являются, в том числе, стресс-индуцируемые неканонические молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса MICA/B. Эти белки отсутствуют или слабо экспрессируются в большинстве нормальных клеток, в то время как в опухолевых и инфицированных вирусами клетках их количество существенно повышено. Взаимодействие NKG2D с молекулами MICA играет важную роль в регуляции противоопухолевых иммунных реакций и может способствовать ускользанию опухолевых клеток от иммунного надзора.

Цель. Оценка блокирующего эффекта растворимого рекомбинантного человеческого белка MICA (rhMICA) на активирующий рецептор цитотоксических лимфоцитов человека NKG2D. Для этого оценивали фенотипические изменения лимфоцитов крови человека при кратковременном воздействии на них различных концентраций rhMICA.

Материалы и методы. Исследование проводили на лимфоцитах периферической крови 12 здоровых доноров. Периферическую кровь выделяли в градиенте плотности фикола ($r = 1,077$, GE Healthcare) фракцию мононуклеарных клеток (ПМК) обрабатывали различными концентрациями рекомбинантного MICA человека (rhMICA, ЗАО «Протеинсинтез», Россия) в течение 30 минут, в качестве контроля использовали ПМК, инкубированные в тех же условиях, но без добавления rhMICA. В обработанных и контрольных ПМК оценивали субпопуляционный состав Т- и НК-лимфоцитов, для чего проводили цитофлуориметрический анализ клеток, окрашенных антителами к CD3, CD56, CD16, CD314 (NKG2D), CD25, CD69, анализ проводили на проточном цитофлуориметре FC 500 MPL (Beckman Coulter).

Результаты. Обработка ПМК различными концентрациями MICA (5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 10 нг/мл и 100 пг/мл) не влияла на количество CD3-CD56⁺ НК-клеток (8,2±7,2%, 9,0±4,7%, 11,2±6,9 и 14,2±6,4% соответственно против 11,2±5,6% в контроле). В то же время инкубация с MICA 5 мкг/мл существенно снижала долю NKG2D⁺НК-клеток (33,7±20,7% по сравнению с 51,9±19,5% в контроле, $p < 0,05$). Количество NKG2D⁺ НК-клеток при инкубации

с меньшими концентрациями МІСА не отличалось от таковых в контроле ($48,1 \pm 10,5\%$, $60,3 \pm 19,3\%$ и $58,7 \pm 19,2\%$ для МІСА 1 мкг/мл, 10 нг/мл и 100 пг/мл соответственно), хотя во всех случаях достоверно ($p < 0,05$) отличалось от лимфоцитов, инкубированных с МІСА 5 мкг/мл. Кроме донорских ПМК, оценивали экспрессию этих маркеров в ПМК, активированных *in vitro* коктейлем цитокинов (ІЛ-2, ІЛ-15) в течение 3 дней. В этом случае доля NKG2D⁺ НК-клеток составляла 84% и не наблюдалось снижения их количества при кратковременной обработке различными концентрациями МІСА. При оценке активационного статуса ПМК доноров было обнаружено, что обработка МІСА 5 мкг/мл вдвое увеличивала количество НК-клеток, несущих одновременно маркеры ранней и поздней активации (CD16⁺CD69⁺CD25⁺): $35,7 \pm 22,2\%$ по сравнению с $17,1 \pm 16,4\%$ в контроле. Обработка более низкими концентрациями МІСА также увеличивала количество активированных НК-клеток, хотя и в меньшей степени.

Заключение. Показано, что кратковременная обработка лимфоцитов ghsMІСА приводит к активации цитотоксических лимфоцитов и одновременно значительно снижает экспрессию на них рецептора NKG2D, при этом изменения носят дозозависимый характер. В то же время после активации цитокинами лимфоциты становятся, по всей видимости, более устойчивыми к ингибирующему воздействию ghsMІСА, в результате чего значимого снижения экспрессии NKG2D на активированных НК-клетках не происходит. Данный факт дает предпосылки к использованию активированных НК-клеток для адоптивной иммунотерапии онкологических больных с МІСА-позитивными опухолями.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации №НШ-9069.2016.4.

КОРРЕКЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ВАКЦИНАЦИИ

Медуницын Н.В., Олефир Ю.В., Меркулов В.А.

Научный центр экспертизы средств медицинского применения Министерства здравоохранения РФ.
Москва, Россия

Предполагается, что со временем иммунная система людей стала слабее реагировать на разные патогены. Причинами такой слабости иммунной системы являются неблагоприятные условия жизни населения, урбанизация, широкое применение антибиотиков, ослабление естественной иммунизации людей циркулирующими в среде микроорганизмами, частые случаи врожденной и приобретенной иммунологической недостаточности. Иммунная система ребенка недостаточно развита, хотя в течение первого года жизни ему вводят до двух десятков доз разных вакцин. Это мера вынужденная, учитывая высокую инфекционную заболеваемость в раннем детском возрасте.

Существующий порядок вакцинации с усредненными дозами вакцин и жесткими схемами их введения уравнивают условия иммунизации граждан и рассчитаны на среднего по иммунологической активности человека. Иммунологические особенности отдельных лиц и наличие у людей многочисленных вариантов иммунного ответа на одну и ту же вакцину свидетельствуют о необходи-

мости разработки принципов и методов персонализации вакцинации.

Среди вакцинированных всегда имеются группа лиц, не отвечающих на вакцину или слабо реагирующих на нее. Эта группа требует особого внимания, во многих случаях она является источником формирования бактерионосительства (вирусоносительства) и поддержания инфекционной заболеваемости. В первую очередь индивидуальную вакцинацию следует распространить на группы лиц повышенного риска, иммунитет которых после вакцинации в большом проценте случаев не достигает защитного уровня.

Коррекцию вакцинации можно проводить с помощью подбора вакцин (живые, убитые, расщепленные, субъединичные), выбора доз и схем введения вакцин или дополнительной стимуляции иммунного ответа. Для повышения иммуногенности вакцин применяют адьюванты, средства доставки вакцин и носители, конъюгированные с антигеном.

Вторую группу составляют лица с очень высокой иммунологической реакцией на конкретную вакцину, такие лица не нуждаются в повторном введении того же антигена, так как гипериммунизация имеет свои отрицательные стороны.

В идеале иммунологическая коррекция вакцинации может обеспечить формирование достаточного иммунитета у каждого прививаемого человека. Благодаря внедрению методов иммунологической коррекции лица, не отвечающие на вакцины, и слабо реагирующие лица, будут защищены от инфекций, а другая часть населения будет избавлена от излишней иммунизации.

Персонализация вакцинации ускорит развитие коллективного иммунитета, повысит эффективность проводимых мероприятий по вакцинопрофилактике и решит многие вопросы медицинской этики, связанные с вакцинацией. Все изменения порядка вакцинации в связи с ее индивидуализацией должны быть обоснованы и утверждены в установленном порядке.

ОТНОСИТЕЛЬНОСТЬ УСПЕХА ПРИ ИММУНОТЕРАПИИ ІЛ-2 В СПОНТАННОЙ МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ *IN VIVO*

Моисеева Е.В., Семушина С.Г., Аронов Д.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Введение. Результаты иммунотерапии интерлейкином-2 (ІТ-ІЛ-2) являются противоречивыми как в клинике рака молочной железы (РМЖ), так и в эксперименте. Ранее мы показали, что после однократного локального применения ІЛ-2 ($2,5 \times 10^6$ МЕ, высокая доза, ВД) улучшалось выживание мышей в различных перевиваемых мышинных моделях РМЖ с коротким латентным периодом (видимое проявление в течение 2-х нед. после перевивки). Далее мы разработали критерии оценки эффективности ІТ-ІЛ-2 в спонтанной модели РМЖ BLRB, выделяя субклиническую (пальпируемые опухоли до 4 мм в диаметре) и клиническую (более 4 мм) стадии прогрессии индивидуальной спонтанной опухоли. Момент перехода считали точкой клинического проявления опухоли (КПО), после КПО различали быстрый и медленный рост. Опухоли, которые в течение 2-х нед. и дольше находились на субклинической стадии роста,

относили к суб⁺ (высокодифференцированная аденокарцинома), тогда как опухоли с коротким субклиническим периодом – к суб⁻ (~2/3 всех обнаруженных случаев РМЖ, низкодифференцированные карциномы).

Цель. Выявить когда, как и к кому следует применять ИТ-IL-2 в модели BLRB с целью получения максимального терапевтического эффекта.

Материалы и методы. Применяли перитуморально (пт) однократно высокую (ВД × 1) или низкую дозу ($2,5 \times 10^5$ МЕ, НД × 1) или трехкратно еженедельно интратуморально (ит) низкую дозу (НД × 3) IL-2. Результаты оценивали индивидуально (мышь = пациент) и в среднем по группе. Эксп. 1. ВД IL-2 ввели пт однократно одновременно всем рожающим и девственным самкам разного возраста с разной стадией прогрессии суб⁺ (n = 7) и суб⁻ (n = 16) РМЖ, исторический контроль – 65 самок (7 суб⁺ и 58 суб⁻). Динамику роста опухоли и выживания оценивали в целом по группе от КПО, а также среди суб⁺ и суб⁻ РМЖ отдельно от первичного обнаружения РМЖ. Эксп. 2. НД × 3 IL-2 вводили всем суб⁺ и суб⁻ самкам после первичного обнаружения РМЖ (n = 33). Сравнили продолжительность субклинического периода, долю опухолей с быстрым после КПО ростом и выживание с соответствующими параметрами самок исторического контроля (n = 114). Эксп. 3. НД × 1 пт IL-2 (n = 6) и НД × 3 ит (n = 8) вводили стандартизованным по возрасту (~65 нед.) и начальному размеру РМЖ (5–7 мм в течение 2-х нед. после первичного обнаружения РМЖ) самкам-опухоленосителям. Текущему контролю со сходными параметрами (n = 7) одновременно вводили растворитель.

Результаты. Эксп. 1. ВД ИТ-IL-2 вызвала в среднем 2-нед. задержку роста РМЖ на разных стадиях прогрессии и улучшение выживания по сравнению с историческим контролем, считая от КПО. Однако динамика общей продолжительности жизни (считая от первичного обнаружения РМЖ) не была улучшена для суб⁺ опухоленосителей. Применение ВД к суб⁻ быстрорастущим после КПО РМЖ после 4-х нед. и позднее было неэффективным. Эксп. 2. Применение НД × 3 пт IL-2 после первичного обнаружения опухоли привело к уменьшению доли быстрорастущих РМЖ в среднем в 2 раза и улучшению динамики выживания всей пролеченной группы при одновременном укорочении индивидуального субклинического периода. Эксп. 3. Применение НД × 3 ИТ IL-2 вызвало замедление роста опухоли в среднем по группе и полное отторжение опухоли у 2 из 8 пролеченных самок, при этом выживание остальных было хуже, чем в контроле. Введение НД × 1 пт IL-2 привело к замедлению роста опухоли и улучшению выживания в среднем по группе, но ни одна самка не была вылечена.

Заключение. В каждом эксперименте был обнаружен позитивный эффект IL-2, однако, с определенными ограничениями, связанными со стадией прогрессии и скоростью проявления и роста спонтанного РМЖ. Было выяснено, когда, как и к кому следует применять ИТ-IL-2 с целью полного отторжения РМЖ. Остается риторическим вопрос, к чему следует стремиться: улучшить показатели в среднем по группе или полностью излечить отдельных пациентов при ухудшении выживания у всех остальных пролеченных по сравнению с контролем?

О ПРИМЕНЕНИИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПЛАЗМЕННЫХ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Никитюк Н.Ф., Гаврилова Н.А., Обухов Ю.И., Саяпина Л.В.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Препараты факторов свертывания крови (ФСК) используются в качестве заместительной терапии при дефиците эндогенных факторов свертывания крови в организме человека. Концентраты ФСК, полученные из плазмы крови человека характеризуются высокой степенью клинической эффективности и представляют наименьшую опасность для применения у пациентов. Наиболее распространенные виды гемофилии связаны с дефицитом плазменного антигемофильного глобулина А (фактор VIII) или плазменного тромбoplastинового компонента (фактор Кристмаса, фактор IX).

В Российской Федерации зарегистрированы 24 препарата плазменных ФСК, из них 3 препарата отечественного производства: Агемфил А, Агемфил В и Криопреципитат, остальные препараты из числа плазменных ФСК производятся зарубежными компаниями (Козйт-ДВИ, ЛонгЭйт, Окτανат, Фанди, Бериате, Гемоктин, Эмоклот Д.И., Гемофил М, Иммунал, Окτανайн, Мононайн, Анимафикс, Репленин-ВФ, Иммунин, Вилфактин, Гемате П, Вилате, Протромплекс, Уман Комплекс Д.И., Фактор VII). Большинство из указанных препаратов ФСК человека внесены в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для оказания медицинской помощи и включены в Федеральную программу «Семь нозологий». Наиболее часто в практическом здравоохранении для остановки кровотечения при гемофилии А используются плазменные концентраты фактора VIII высокой степени очистки: Иммунал, Козйт-ДВИ, Эмоклот, Гемоктин, Окτανат, Бериате, Гемофил М. При гемофилии В чаще применяют плазменные концентраты фактора IX – Аймафикс-ДИ, Уман-комплекс-ДИ, Иммунин, Окτανайн, Агемфил-В, Мононайн [4].

Преимуществом и отличительной особенностью плазменных факторов по сравнению с их рекомбинантными аналогами является гомологичность активных компонентов, входящих в состав препарата, что снижает риск развития аллергических реакций при их применении.

Наиболее часто в практическом здравоохранении для остановки кровотечения при гемофилии А используются плазменные концентраты фактора VIII высокой степени очистки: Иммунал, Козйт-ДВИ, Эмоклот, Гемоктин, Окτανат, Бериате, Гемофил М. При гемофилии В чаще применяют плазменные концентраты фактора IX – Аймафикс-ДИ, Уман-комплекс-ДИ, Иммунин, Окτανайн, Агемфил-В, Мононайн.

На российском рынке представлены все основные группы плазменных факторов свертывания крови, зарегистрированные в мире. Оценка их качества и основных показателей (активность, подлинность и чистота) проводится в соответствии с частными фармакопейными статьями, а безопасность гарантируется наличием государственной системы обращения препаратов крови, обеспечивающей соблюдение надлежащих условий при разделении, хранении и транспортировке плазмы; скрининг доноров крови, в том числе оценка риска заражения при-

онами, выполнением современных требований по обеспечению вирусной безопасности препаратов крови.

Для обеспечения возможности обоснованного выбора препарата с целью лечения пациентов разных возрастных групп с учетом тяжести заболевания необходимо разработать единые требования к оценке эффективности и безопасности плазменных ФСК.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТочНОЙ ТЕРАПИИ ДЕФОРМИРУЮЩЕГО ОСТЕОАРТРОЗА: РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОМЕЖУТОЧНОГО АНАЛИЗА

Ница Н.А., Старостина Н.М., Попова Н.Д., Баранов С.И., Кожевников Ю.А., Чумасова О.А., Шевела Е.Я., Останин А.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Введение. Одно из новых направлений в лечении деформирующего остеоартроза (ДОА) связано с использованием различных клеточных технологий, в том числе с использованием стромально-васкулярной фракции (СВФ) жировой ткани. Клетки СВФ оказывают противовоспалительный и иммуномодулирующий эффекты и способны дифференцироваться в клетки соединительной ткани, включая хрящи, сухожилия и связки

Цель. Оценить безопасность и клиническую эффективность аутологичных клеток стромально-васкулярной фракции (СВФ) у пациентов с деформирующим остеоартрозом (ДОА) коленных суставов.

Материалы и методы. В исследование были рекрутированы 16 пациентов (6 мужчин и 10 женщин в возрасте от 50 до 82 лет; медиана 64,8) с первичным ДОА коленных суставов, Rg стадия II (n = 6), II-III (n = 8) и III (n = 2), НФС I ст. (n = 2) и II ст. (n = 14). Основную группу составили 10 пациентов (4 мужчин и 6 женщин); в группу контроля вошли 6 пациентов (2 мужчин и 4 женщины), сопоставимые по возрасту, давности и тяжести основного заболевания, характеру сопутствующей патологии. Оценку болевого синдрома проводили по визуально-аналоговой шкале (ВАШ), функциональную активность суставов оценивали по специализированной шкале KOOS. Пациентам основной группы однократно, интраартикулярно, под УЗИ-навигацией, вводили аутологичные клетки СВФ (в среднем $17,2 \pm 1,8 \times 10^6$ клеток на сустав), пациентам контрольной группы – препарат гиалуроновой кислоты Синокрон-форте One (4 мл).

Результаты. У пациентов основной группы внутрисуставное введение клеток СВФ не вызвало развития аллергических, токсических или воспалительных реакций. У 9/10 пациентов (90%) случаев было выявлено статистически достоверное снижение болевого синдрома, оцениваемого по ВАШ. Более того, клеточная терапия сопровождалась положительной динамикой функциональной активности суставов, которая регистрировалась уже через 1 мес после введения клеток и сохранялась до 6 мес наблюдения. Оценка функционального статуса суставов и качества жизни по шкале KOOS продемонстрировала снижение выраженности основных симптомов заболевания, включая болевой синдром (на 53%, $p < 0,05$) и функциональные возможности пораженных суставов (на 76%, $p < 0,05$). Наряду с этим, отмечалось статистически значимое уменьшение затруднений в выполнении повседневной деятельности, связанное с пораженным суставом (на

35%), повышение возможности занятий спортом (в 2 раза) и улучшение качества жизни в целом (в 2,6 раза). При этом клиническое улучшение сопровождалось положительной динамикой по данным УЗИ суставов, которая регистрировалась у 7 из 10 пациентов и проявлялась увеличением толщины гиалинового хряща (с 1,03 мм до 1,46 мм). У пациентов контрольной группы внутрисуставные инъекции препарата гиалуроновой кислоты также приводили к снижению болевого синдрома и выраженности основных симптомов ДОА в первые 3 мес наблюдения. Однако позитивные изменения в этой группе носили нестойкий характер и не выявлялись при наблюдении через 6 мес.

Заключение. Результаты проведенного клинического исследования свидетельствуют о безопасности и хорошей переносимости внутрисуставного введения аутологичных клеток СВФ у пациентов с выраженными проявлениями ДОА.

ФРАГМЕНТИРОВАНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ПАПАИНА ПРИ ПОЛУЧЕНИИ КОМБИНИРОВАННОГО ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ПРЕПАРАТА

Новикова Л.И.¹, Волков А.В.¹, Пескарёв В.Е.², Алёшкин В.А.¹, Зуева М.М.¹, Панурин Р.Л.¹, Матвеевская Н.С.¹, Синчугова Т.В.¹

¹ ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

² Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

Введение. При разработке назальной формы комплексного иммуноглобулинового препарата (КИП), содержащего IgG, IgA и IgM человека, возникла необходимость включения в его состав фрагментов иммуноглобулинов для повышения эффективности КИП при респираторных инфекциях за счет усиления иммуномодулирующей активности.

Цель и задачи. Цель работы – подбор оптимального метода ферментативного расщепления иммуноглобулинов. Задачи исследования – расщепление IgG, IgA и IgM, входящих в состав КИП, на фрагменты с помощью синтезированного сорбента (иммобилизованный папаин), а также сравнение расщепляющей способности сорбентов с разным содержанием фермента.

Материалы и методы. Для получения иммобилизованных папаина в качестве исходного носителя использовали полимерный гидрофильный макропористый сорбент, содержащий гидроксильные группы – Toyopearl HW-65 (фирма «Tosoh», Япония). Toyopearl HW-65 активировали с помощью бифункционального реагента – эпихлоргидрина, затем обрабатывали аммиаком и модифицировали глутаровым альдегидом. Это давало возможность проводить пришивку фермента по аминокгруппе в мягких условиях. Количество пришитого папаина составляло 1 или 10 мг на 1 мл геля. Ферментативное расщепление иммуноглобулинов проводили batch методом при инкубировании и встряхивании в термостате (+37 °C) в течение 5 ч.

Результаты. Иммуноэлектрофорограммы и хроматограммы показывают, что в растворах, полученных после взаимодействия КИП с иммобилизованным папаином, содержатся как полноценные молекулы иммуноглобулинов, так и их низкомолекулярные фрагменты. При использовании сорбента с 10 мг папаина в 1 мл геля сте-

пень расщепления иммуноглобулинов примерно в 10 раз выше, чем при использовании сорбента с 1 мг фермента на 1 мл (2-5% оставшихся нерасщепленными молекул иммуноглобулинов всех исследованных изотипов против 20-30% соответственно).

Заключение. Таким образом, на первом этапе исследований по разработке комбинированных форм иммунобиологических препаратов на основе КИП, был синтезирован сорбент с иммобилизованным папаином, проведены эксперименты по расщеплению иммуноглобулинов с помощью этого сорбента и анализ полученных образцов. Уровень расщепления иммуноглобулинов напрямую зависит от количества папаина, иммобилизованного на сорбенте.

НОВАЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ КОМПОЗИЦИЯ С БЕТАЛЕЙКИНОМ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА

Саркисян Н.Г., Ронь Г.И., Тузанкина И.А.

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», Екатеринбург, Россия

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия

ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия

По данным ВОЗ, распространенность заболеваний пародонта встречается более чем у 90% взрослого населения. Для лечения и реабилитации пациентов с пародонтитом предложено множество методов и средств, однако проблема достижения стойкой ремиссии до настоящего времени остается нерешенной.

Нами было проведено клинико-рентгенологическое исследование на базе кафедры терапевтической стоматологии УГМУ г. Екатеринбурга в период с 2011 по 2016 г., целью которого явилось определение клинической эффективности лечения хронического генерализованного пародонтита с применением медикаментозной композиции глицерогидрогеля кремния с иммуномодулятором беталейкином. В исследовании приняли участие 75 пациентов с диагнозом «Хронический генерализованный пародонтит» в стадии ремиссии.

Пациентам основной группы (45 человек) на этапе медикаментозного лечения на десну и в пародонтальные карманы наносили композицию с глицерогидрогелем кремния и беталейкином — 1 в день, 10 процедур, предварительно инстиллируя теплой водой, а пациентам группы сравнения (30 человек) — препарат «Аекол».

Анализ клинической симптоматики позволил сделать заключение, что в группе пациентов, получавших композицию с беталейкином в стадии ремиссии, через 6 и 12 месяцев после лечения гигиеническое состояние полости рта оставалось на хорошем уровне, наблюдались динамические признаки улучшения состояния тканей пародонта, отсутствовала кровоточивость, незначительно уменьшилась глубина пародонтальных карманов.

В группе, пролеченной по традиционной схеме с препаратом «Аекол», наблюдалось ухудшение гигиенических показателей, увеличение значений индекса воспалительного процесса, кровоточивость, отек десны, незначительное увеличение глубины пародонтальных карманов.

По данным рентгенологического исследования в основной группе, в отличие от группы сравнения, через 6

и 12 месяцев отмечалось уменьшение и местами исчезновение очагов остеопороза.

Продолжительность ремиссии при лечении по традиционной схеме, без включения топических композиций составила 5 месяцев, при использовании композиции с беталейкином — 10 месяцев.

Таким образом, применение препарата глицерогидрогеля кремния в композиции с беталейкином в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита в стадии ремиссии позволило получить более высокий терапевтический эффект, чем тот, который был достигнут в случае применения только лекарственных препаратов, без предложенной композиции.

По данному исследованию получен патент РФ № 2470640, 2012 г. «Средство для лечения воспалительных заболеваний полости рта и способ лечения воспалительных заболеваний полости рта».

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ИЗБЫТОЧНОГО АДГЕЗИОГЕНЕЗА

Снимщикова И.А., Медведев А.И., Шохина М.Д., Честныхина А.Д., Афонина И.А.

ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», Медицинский институт, Орёл, Россия

Введение. Одной из актуальных проблем абдоминальной хирургии остается профилактика образования спаек после воспалительных заболеваний органов малого таза и оперативных вмешательств, поскольку спаечный процесс может стать причиной кишечной непроходимости, тазовых болей, бесплодия и внематочной беременности у женщин. Данные исследований патогенеза спаечного процесса, критериев ранней диагностики и прогноза, несмотря на многочисленность, достаточно противоречивы, что не позволяет разработать стройную лечебно-диагностическую концепцию. Известно, что на развитие и исход репаративного процесса после операционной травмы в первую очередь влияет локальная реакция клеток воспаления и состояние местного звена иммунитета, контролирующего дифференцировку клеток-предшественников в фибробласты и регулирующих их активность. Исследованиями последних лет показано, что одним из перспективных способов предупреждения патологического адгезиогенеза после оперативных вмешательств может быть ускорение процессов репаративной регенерации раны путем воздействия на первичный локально-воспалительный процесс, ведущую роль в обеспечении которого играют перитонеальные макрофаги и продуцируемые ими медиаторы.

Цель и задачи. Целью работы явилось экспериментальное обоснование применения глюкозаминилмурамилдипептида, являющегося действующим веществом препарата ликопид, в профилактике и лечении спаечных процессов брюшной полости. Задачи исследования: исследовать метаболическую активность перитонеальных макрофагов больных со спаечным процессом (спонтанную и стимулированную продукцию оксида азота; антимикробных пептидов: кателицидина LL-37, лактоферрина, миелопероксидазы; воспалительных и противовоспалительных цитокинов: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , TGF- β); изучить *in vitro* влияние глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) на функциональную активность пе-

ритонеальных макрофагов больных с различной степенью выраженности спаечного процесса.

Материалы и методы. Под нашим наблюдением находились 105 пациентов со спаечным процессом органов брюшной полости различной степени выраженности (средний возраст $39,7 \pm 3,5$ лет). Перитонеальную жидкость получали на диагностическом этапе лапароскопии путем активной аспирации, а затем центрифугировали в течение 10 минут при 1500 об./мин. Осадок, представляющий собой клеточную суспензию, использовали для цитологического исследования и выделения перитонеальных макрофагов, которые получали путем культивирования в пластиковых планшетах в среде RPMI-1640 при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 2 часов. Неприлипшие клетки удаляли 3-х кратным промыванием средой 199. Прилипающие клетки, около 90-95% которых составляли перитонеальные макрофаги, ресуспендировали в полной среде RPMI-1640 в концентрации 2 млн/мл и использовали в соответствии с целью эксперимента. Концентрацию стабильного метаболита оксида азота (нитрита) в пробах определяли спектрофотометрически с помощью реактива Грисса. Продукцию миелопероксидазы оценивали по методике Азнабаевой Л.Ф. с расчетом показателя пероксидазной активности исследуемой биологической жидкости. Определение концентрации кателицидина LL-37 и лактоферрина проводилось методом твердофазного ИФА с помощью набора реагентов Hbt (Нидерланды), ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Концентрацию цитокинов в перитонеальной жидкости и культуральной среде оценивали методом твердофазного ИФА с помощью набора реагентов ООО «Протеиновый контур», ООО «Цитокин» и DRG (Germany).

Результаты. Проведенные исследования показали, что у большинства пациентов с избыточным адгезиогенезом отмечалось снижение уровня метаболитов NO, повышение продукции TGF- β , IL-10, кателицидина LL-37, лактоферрина и миелопероксидазы в перитонеальной жидкости и супернатантах культивируемых перитонеальных макрофагов. При этом ГМДП в оптимальных концентрациях оказывал иммуномодулирующее действие на функциональную активность макрофагов больных со спаечным процессом различной степени выраженности.

Заключение. Глюкозаминилмурамилдипептид обладает иммуномодулирующим действием на функциональную активность перитонеальных макрофагов, что обосновывает возможность применения препарата липоид при патологии органов брюшной полости с целью предупреждения избыточного адгезиогенеза.

ПРОБЛЕМЫ БЕЗОПАСНОСТИ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИНТЕРФЕРОНОВ

Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Медуницын Н.В.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Среди биотерапевтических препаратов наиболее широко применяемой в клинике группой препаратов являются препараты интерферонов (IFN), применяемые для лечения гепатитов В и С, некоторых опухолей (лейкоз, саркома Капоши), рассеянного склероза. Для повышения эффективности препаратов используются модификации молекул IFN полиэтиленгликолем. Применение препаратов IFN часто сопровождается развитием таких побочных реакций (ПР) как вирусные, грибковые, бакте-

риальные инфекции, анемия, нейтропения, лейкопения, тромбоцитопения, гипотериоз, гипертиреоз, дерматит, псориаз, крапивница, экзема, миалгия и др., а у детей еще и новообразования, гиперкинезии, нарушение функции печени, энурез, задержки роста и др. Нечасто лечение препаратами IFN может вызвать развитие таких тяжелых ПР, как гломерулосклероз, липоидный нефроз, гломерулонефрит и гломерулопатия, эритроцитарная аплазия, тромбоцитопеническая пурпура, саркидоз, ревматоидный артрит, васкулит, мононейропатия, пептическая язва, панкреатит, некролиз, синдром Стивена-Джонсона, гемолитический уремический синдром (даже с летальным исходом) и др. Появление антител (Ат) к препарату сопровождается снижением его эффективности. Механизмы развития многих ПР до конца не изучены. С одной стороны, развитие данных осложнений связано с иммуномодулирующими свойствами IFN, т.к. он является очень активным цитокином системы иммунитета. С другой стороны, в развитии ПР основную роль могут играть Ат к препарату.

Развитие иммунного ответа на введение препаратов IFN связано со многими особенностями биологических свойств самого IFN и особенностями препарата IFN, которые обусловлены системой экспрессии рекомбинантного белка, производственного процесса, состава препарата, условий хранения и транспортирования. IFN, как цитокин, обладает способностью стимулировать выработку Ат. Экспериментально показано, что препараты на основе IFN человека, вводимые с другими белками, вызывали усиление иммунного ответа (IFN выступал в роли адъюванта). Кроме того, Yeung V.P. с соавт. показали, что в молекуле IFN β -1 β содержится высокоантигенные эпитопы, распознаваемые Т-клетками, которые при введении мышам линии Balb/C вызывали развитие иммунного ответа. Удаление с помощью генно-инженерных методов данных эпитопов в молекуле IFN предотвращало развитие иммунного ответа мышам на препарат. Наличие в аминокислотной цепочке белка IFN α и - β участков, которые являются Т-клеточными эпитопами, было подтверждено методами *in silico*. Большое значение в развитии «нежелательной» иммуногенности препаратов IFN играют факторы, связанные с производством и хранением препаратов IFN α . Препараты, получаемые различными производителями, обладают разными биологическими свойствами. Например, IFN β -1b (Betaseron), полученный в системе клеток *E.coli*, не содержит гликанов, в отличие от гликозилированных препаратов IFN β -1 α (Avonex и Rebif), получаемых в системе клеток CHO. Клинические исследования показали, что эффективность IFN β -1 β ниже, чем IFN β -1 α , в связи с этим IFN β -1 β вводится в более высоких дозах, чем IFN β -1 α . При лечении IFN β -1 β значительно быстрее образуются Ат к препарату, чем при применении IFN β -1 α . Частота выработки Ат к препаратам IFN β при в/м введении препарата Avonex составила 2%-6%, тогда как при п/к введении – Rebif в 12%-28% и Betaseron в 28%-47%. С другой стороны, Betaseron обладает плохой растворимостью и имеет склонность к агрегации, которая, как было установлено в исследованиях с удалением стабилизатора (альбумина) из препаратов IFN β , активно влияет на их иммуногенную активность. Сложно установить, что является основным фактором «нежелательной» иммуногенности препаратов IFN β : профиль гликозилирования, состав препарата, путь и частота введения или др. Следует отметить, что лечение пегилированным препаратом IFN β сопровождается выработкой Ат не только к белку препарата, но и к

полиэтиленгликолевой его части. При анализе факторов, влияющих на развитие иммунного ответа, установлена четкая зависимость иммуногенности препарата от уровня агрегации белка. При исследовании различных видов агрегатов IFN β установлено, что только агрегаты, полученные при окислении, катализируемом металлом, вызывали нарушение толерантности у трансгенных мышей. По-видимому, в процессе окисления белка происходит формирование агрегатов с образованием повторяющихся эпитопов, вызывающих нарушение толерантности. Биотерапевтические препараты являются наиболее эффективными и часто единственными препаратами для лечения тяжелых заболеваний, однако ПР, например, связанные с «нежелательной» иммуногенностью, ограничивают применение данного класса препаратов.

Изучение особенностей иммунного ответа и механизмов развития ПР, разработка методов их предотвращения позволит повысить эффективность и безопасность применения биотерапевтических препаратов.

ВОПРОСЫ ГАРМОНИЗАЦИИ ФАРМАКОПЕЙНЫХ ТРЕБОВАНИЙ К КАЧЕСТВУ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Устинникова О.Б.¹, Новикова Е.В.¹, Рунова О.Б.¹, Бондарев В.П.¹, Жилиева М.В.², Вишневецкий А.Ю.²

¹ ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум», п. Вольгинский, Владимирская обл., Россия

В соответствии с Соглашением о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС), гармонизация требований к лекарственным средствам является необходимым процессом в условиях функционирования общего рынка лекарственных средств. Наличие опыта гармонизации фармакопей государств-членов ЕАЭС с требованиями Европейской Фармакопеи с одной стороны и недостаточный охват лекарственных препаратов фармакопейными статьями с другой стороны, формируют необходимость разработки национальных и гармонизированных фармакопейных требований к ряду препаратов, в том числе препаратов на основе рекомбинантных факторов свертывания крови (РФСК).

Цель. Формирование общей фармакопейной статьи (ОФС) на РФСК, основанной на принципах гармонизации и учитывающей современные тенденции развития рынка данного типа лекарственных препаратов, а также отработка методологии составления гармонизированной фармакопейной статьи (ФС) на конкретный РФСК заявленной модификации на примере гFVIIa (эптаког альфа).

Результаты. Анализ актуальных направлений разработки лекарственных препаратов на основе РФСК выявил устойчивую тенденцию к созданию новых препаратов, основой которых является модифицированный рекомбинантный белок, обладающий профильной активностью заявленного ФСК. При этом варианты модификаций достаточно разнообразны: делеционные варианты с удалением ряда доменов, характерных для эндогенных белков; пролонгированные производные (пэгилирование); расщепление до субъединиц; гибридные факторы, ковалентно сшитые с доменом Fc-фрагмента иммуноглобулина человека G1; гетерологичные РФСК (свиной РФСК VIII

и т.д. Единственной международной фармакопеей, содержащей требования к гFVIIa, гFVII и гFIXa в форме монографий 01/2015:2534, 01/2008:1643, 01/2016:2522 соответственно, является Европейская Фармакопея. Однако вышеуказанные монографии, отражающие особенности конкретной модификации определенного РФСК не могут быть применены к другой модификации того же типа РФСК, а также не могут быть использованы для установления методического обеспечения подтверждения качества вновь разрабатываемых препаратов. Разработанный проект ОФС на РФСК, в соответствии с требованиями к препаратам, в основе которых лежит продукт, полученный с применением технологии рекомбинантной ДНК, а также с учетом вышеизложенных особенностей РФСК, устанавливает необходимость максимально полной характеристики конкретной модификации белка на уровне субстанции. Отражена необходимость подтверждения соответствия производимого продукта заявленной существующей модификации или полная характеристика особенностей вновь полученных модификаций, с присвоением международного непатентованного наименования и подтверждением стабильности структурных особенностей последующих серий субстанции. При формировании ФС на гFVIIa, было выявлено расхождение монографии 01/2015:2534 и частных нормативных документаций производителей, как в части методических решений оценки показателей качества так и их количественных характеристик. В целях гармонизации требований был разработан порядок выбора оптимальной методики, основанный на воспроизведении существующих методик (Европейская Фармакопея и нормативная документация производителей) в разных лабораториях, статистической обработке результатов на основе однофакторного дисперсионного анализа на предмет наличия статистически достоверных различий, а также сравнительный анализ коммерческой доступности и предпочтений экономического характера. В результате проведенной работы были установлены методики для определения показателей «Подлинность», «Количественное определение», «Чистота. Димеры, полимеры, олигомеры» методами коагулометрии, спектрофотометрическим методом и методом ВЭЖХ. В рамках концепции гармонизации спектрофотометрический метод дополнен стандартным образцом CRS Human coagulation factor VIIa Y0001663, дополнительно охарактеризован профиль и установлены максимум и минимум поглощения. Оптимизирован метод коагулометрической активности: при выявленном отсутствии статистически достоверных различий, обоснован выбор методики с точки зрения экономической целесообразности. Статистически обоснованы процедурные особенности воспроизведения методики гель-фильтрационной ВЭЖХ. Намечены перспективные решения по выбору оптимальных методических подходов оценки подлинности методами пептидного картирования и установлением профиля гликозилирования, оценки родственных примесей – окисленных и деградированных форм, а также структурных особенностей данной модификации белка – количественное содержание Gla-домена.

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА СУХОГО ЛЕВЗЕИ ОДНОЦВЕТКОВОЙ НА ГУМОРАЛЬНОЕ ЗВЕНО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИММУНОДЕФИЦИТЕ

Хобракова В.Б.^{1,2}, Татарина Н.К.¹

¹ Институт общей и экспериментальной биологии СО
РАН, Улан-Удэ, Россия

² Бурятский государственный университет, Улан-Удэ,
Россия

Проблема лечения и профилактики иммунодефицитных состояний является одной из актуальных проблем современной медицины. Это связано с распространением вторичной иммунной недостаточности при острой и хронической вирусной и бактериальной инфекции, связанным с ней атипичным клиническим течением инфекционно-воспалительного процесса. В связи с этим перспективным направлением является разработка новых эффективных иммунокорректирующих лекарственных средств. Иммунокорректирующими могут быть как вещества белковой природы, так и средства синтетического и природного происхождения. Преимуществом обладают иммуномодуляторы, оказывающие направленное действие на разные звенья иммунной системы и малотоксичные препараты, обладающие поликомпонентным действием. Таковыми являются адаптогенные лекарственные растения, они действуют на организм всем комплексом содержащихся в них биологически активных веществ (БАВ). Примером таких БАВ, обладающих выраженной иммуномодулирующей активностью, являются фитостероиды.

Объектом настоящего исследования явился экстракт сухой левзеи одноцветковой — *Rhaponticum uniflorum* (L.), как перспективного экистероидсодержащего растения.

Целью настоящего исследования явилось определение иммунокорректирующих свойств экстракта сухой левзеи одноцветковой в отношении гуморального звена иммунного ответа при экспериментальном иммунодефиците.

Эксперименты проведены на мышах самцах линии СВА массой 18–20 г. Действие исследуемых средств было изучено на животных, находящихся в состоянии иммунодепрессии, вызванной цитостатиком азатиоприном, который вводили контрольной группе животных в дозе 50 мг/кг перорально 1 раз в сутки в течение 5 дней. Экстракт сухой левзеи одноцветковой вводили опытной группе животных на фоне азатиоприна в экспериментально-терапевтической дозе 100 мг/кг, препарат сравнения — «Иммунал» — в дозе 5 мл/кг перорально ежедневно в течение 14 дней. Интактная группа животных получала воду очищенную по аналогичной схеме.

Состояние гуморального иммунитета оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза по A.J. Cunningham (1965).

На основании полученных данных выявлена эффективность экстракта сухой левзеи одноцветковой по отношению к реакции гуморального звена иммунного ответа при иммунодепрессии, вызванной введением азатиоприна. Исследуемое средство способно ослаблять супрессивное действие цитостатика на антителогенез, что выражается в увеличении абсолютного и относительного числа АОК в 2,1 и 2,2 раза соответственно по сравнению с данными в контрольной группе животных. При введении препарата сравнения «Иммунал» достоверно возросло как абсолютное число АОК, так и количество АОК на 10^6 спленоцитов в 1,4 и 1,2 раза соответственно по сравнению с введением азатиоприна.

Эффективность исследуемого экстракта, по-видимому, обусловлена содержанием в нем фитостероидов, обладающих выраженными иммуномодулирующими свойствами.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что экстракт сухой левзеи одноцветковой является эффективным иммунокорректирующим средством, что аргументирует перспективность данного вида растительного сырья для получения новых иммуномодуляторов.