

ОЦЕНКА ИММУНОТОКСИЧНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА НА МАКАКАХ РЕЗУС

Джелия А.Б., Устюгов Я.Ю., Кортава М.А.

Закрытое акционерное общество «БИОКАД», п. Любучаны, Московская область, Россия

Резюме. В статье представлены результаты исследования иммунотоксичности нового лекарственного препарата пролонгированного действия для лечения рассеянного склероза на основе рекомбинантного человеческого интерферона бета-1а. Препарат представляет собой конъюгат интерферона бета-1а и полиэтиленгликоля (ПЭГ). Проведенная модификация позволяет улучшить фармакокинетические показатели, а также снизить иммуногенность и улучшить переносимость, что значительно увеличивает безопасность исследуемого препарата. Исследование проведено на нечеловекообразных приматах — макаках резус (*Macaca mulatta*). Данный вид животных является чувствительным к действию интерферона бета-1а человека, что нами было показано ранее, в исследованиях специфической активности. В рамках экспериментов *in vivo* оценивали динамику субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови, количество активированных лимфоцитов, по наличию маркера ранней активации, уровень и соотношение сывороточных антител (IgM, IgG, IgA и IgE). В культуре мононуклеаров исследовали влияние интерферона бета-1а на уровень экспрессии CD69. Показано, что исследуемый препарат вызывает изменения соотношения субпопуляций лимфоцитов (снижение относительного числа NK-клеток и повышение относительного числа Т-лимфоцитов) в периферической крови приматов. Выявленные изменения носили обратимый характер и не зависели от использованной дозы препарата. Не было показано достоверного влияния препарата на уровень экспрессии CD69. В отсутствие дополнительной антигенной стимуляции не было показано влияния на уровень и соотношение сывороточных антител, оцениваемых классов, а также на фагоцитарную активность полиморфоядерных лейкоцитов. Полученные в ходе исследования результаты свидетельствуют об отсутствии патологического влияния исследуемого препарата на иммунную систему нечеловекообразных приматов.

Ключевые слова: рассеянный склероз, интерфероны, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, натуральные киллерные клетки, антиген CD69, иммуноглобулины

Адрес для переписки:

Джелия Апсуана Борисовна
ЗАО «БИОКАД»
142380, Россия, Московская область, Чеховский район,
п. Любучаны, ул. Научная, 1.
Тел.: 8 (812) 380-49-33 (доб. 442).
Факс: 8 (812) 380-49-34.
E-mail: dzheliya@biocad.ru

Address for correspondence:

Dzheliya Apsuana B.
CJSC "BIOCAD"
142380, Russian Federation, Moscow Region, Chekhov district,
Lubuchany, Nauchnaya str., 1.
Phone: 7 (812) 380-49-33 (ext. 442).
Fax: 7 (812) 380-49-34.
E-mail: dzheliya@biocad.ru

Образец цитирования:

А.Б. Джелия, Я.Ю. Устюгов, М.А. Кортава, «Оценка иммунотоксичности лекарственного препарата пролонгированного действия для лечения рассеянного склероза на макаках резус» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 4. С. 319–326. doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-319-326

© Джелия А.Б. и соавт., 2015

For citation:

A.B. Dzheliya, Ya. Yu. Ustyugov, M.A. Kortava, "Evaluation of immunotoxicity of the therapeutic drug prolonged action for multiple sclerosis on rhesus monkeys", *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 4, pp. 319–326. doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-319-326

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-4-319-326>

EVALUATION OF IMMUNOTOXICITY OF THE THERAPEUTIC DRUG PROLONGED ACTION FOR MULTIPLE SCLEROSIS ON RHESUS MONKEYS

Dzyeliya A.B., Ustyugov Ya.Yu., Kortava M.A.

CJSC "BIOCAD", Lubuchany, Moscow Region, Russian Federation

Abstract. This article presents the results of immunotoxicity study of a novel slow-release drug for multiple sclerosis treatment based on recombinant human interferon beta-1a. The test article is polyethylene glycol (PEG)-conjugated interferon beta-1a. Performed modification allows to improve pharmacokinetic parameters, decrease immunogenicity and elevate tolerance that significantly increases safety of the test article. The study is performed in nonhuman primates – rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). The species, used in this study, is susceptible to human interferon beta-1a that has previously been shown in specific activity studies. Dynamics of peripheral blood lymphocyte subsets composition, activated lymphocyte count (based on the presence of early activation marker), serum antibodies (IgM, IgG, IgA and IgE) level and ratio were assessed within *in vivo* experiments. The effect of interferon beta-1a on CD69 expression was examined in mononuclear cells culture. It was shown that the test article causes changes in lymphocyte subsets ratio (decrease of NK-cells relative count with T-lymphocytes relative count elevation) in primates' peripheral blood. Revealed changes were reversible and dose-independent. It was not shown that the test article have reliable effect on CD69 expression rate. There was no evidence of test article effect on level and ratio of serum antibodies and polymorphonucleocytes phagocytic rate in the absence of additional antigenic exposure. The results obtained during the experiment indicate the absence of pathological effect of the test article on the nonhuman primates' immune system.

Keywords: multiple sclerosis, interferons, T lymphocytes, B lymphocytes, natural killer cells, CD69 antigen, immunoglobulins

Введение

Рассеянный склероз (РС) представляет собой хроническое прогрессирующее заболевание человека, характеризующееся развитием очагов демиелинизации в центральной и периферической нервной системе [2]. Иммунологические изменения при РС проявляются отклонениями клеточного и гуморального иммунитета. В период обострения заболевания обнаруживается незначительное снижение зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺), преимущественно за счет субпопуляций Treg-клеток, а также повышение пролиферативной и функциональной активности клеток в ответ на митогены.

Иммуномодуляторные препараты IFN β , такие как Бетаферон, Авонекс, Ребиф, обладают большим терапевтическим потенциалом. Однако применение данных препаратов сопряжено с развитием ряда побочных реакций.

Одним из путей повышения эффективности и безопасности интерферона бета-1a является «пегилирование» молекулы лекарственного препарата. Подобная химическая модификация адресно направлена на улучшение их переноси-

мости, снижение иммуногенности, повышение периода их полужизни и, как следствие всего перечисленного, на значительное повышение качества жизни в процессе проведения лечения [4, 7, 10, 16, 19].

В данном исследовании проведена сравнительная оценка влияния исследуемого препарата пегилированного интерферона бета-1a (ПЕГ IFN β -1a) и препарата-стандарта – интерферона бета-1a (IFN β -1a) (фирма-производитель ЗАО «БИОКАД») на иммунную систему нечеловекообразных приматов.

Материалы и методы

Работа выполнена на нечеловекообразных приматах – макаках резус (*Macaca mulatta*) на базе Научно-исследовательского института экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, г. Сухум. Исследование проведено на 28 обезьянах *Macaca mulatta* в возрасте от 3 до 7 лет, массой 4,0–7,0 кг.

ПЕГ IFN β -1a вводили один раз в две недели в течение 12 недель с последующим 4-недельным восстановительным периодом. Немодифициро-

ванный IFN β -1a вводили подкожно 3 раза в неделю.

Определение субпопуляционного состава лимфоцитов

Оценку проводили на проточном цитофлуориметре EpiX XL (Beckman Coulter) с использованием реагентов меченых антител производства BD (США).

Определение маркера активации CD69 в культурах мононуклеарных клеток

Для определения числа CD69⁺ клеток использовали 24-часовую культуру мононуклеаров цельной периферической крови. Для оценки стимулирующего действия на экспрессию CD69 исследуемого препарата и препарата-стандарта использовали нестимулированные и стимулированные пробы (вносили IFN β -1a).

Определение уровня иммуноглобулинов в сыворотке крови

Определение уровня антител разных классов в сыворотке крови проводили до введения препарата, на 12 и 16 неделе эксперимента. Для определения количества антител использовали иммуноферментную тест-систему Life Diagnostics Inc (США).

Постановка реакции бласттрансформации

Оценку пролиферативного ответа проводили в 72-часовых культурах с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия бромида (МТТ) [24].

Статистический анализ

Статистическая обработка данных производилась с помощью пакета «Statistica for Windows 6.0», применялся непараметрический тест Манна–Уитни [1].

Результаты

В работах ряда авторов рассматривается возможное участие натуральных киллерных клеток (НК-клеток) в развитии рассеянного склероза [13, 15, 17, 22]. В настоящее время имеется достаточно клинических данных, позволяющих говорить о влиянии препаратов интерферонов бета на данную субпопуляцию клеток [17, 20].

Наши исследования показали, что изменение относительного числа НК-клеток у приматов всех экспериментальных групп происходило идентично. На 6-ой и 12-ой неделе, наблюдали тенденцию к снижению относительного числа НК-клеток, в сравнении с фоновыми показателями. На 16-й неделе эксперимента, напротив, было отмечено повышение числа НК-клеток, в сравнении с фоновыми показателями. Достоверное увеличение НК-клеток наблюдали во всех экспериментальных группах, за исключением приматов, получавших подкожно ПЭГ IFN β -1a

в дозе $0,3 \times 10^6$ МЕ/кг, где была отмечена только тенденция к увеличению оцениваемого показателя. Полученные результаты согласуются с клиническими данными, полученными при применении препаратов интерферона в лечении рассеянного склероза [12, 20].

Оценка относительного числа В-лимфоцитов в периферической крови экспериментальных приматов не выявила влияния препаратов ПЭГ IFN β -1a и IFN β -1a на рассматриваемый параметр.

Оценка относительного и абсолютного числа Т-лимфоцитов (CD3⁺ клетки) в периферической крови макака резус показала, что при многократном введении исследуемого препарата наблюдается тенденция к повышению относительного числа Т-клеток в крови приматов в течение периода введения препарата. На момент окончания восстановительного периода уровень Т-лимфоцитов возвращался к фоновым значениям. При многократном внутримышечном введении модифицированного препарата в дозе $0,3 \times 10^6$ МЕ/кг имела место тенденция к снижению Т-клеток.

На всех сроках эксперимента у всех животных относительное число Т-клеток оставалось в пределах видовой физиологической нормы [3].

Анализ полученных экспериментальных данных показал, что снижение относительного числа НК-клеток в периферической крови приматов в течение периода введения модифицированного и немодифицированного препаратов интерферона бета-1a сопровождается повышением числа Т-клеток, и, напротив, на момент окончания восстановительного периода, снижение числа Т-лимфоцитов у животных экспериментальных групп скомпенсировано повышением относительного числа НК-клеток. Выявленный характер изменений и его выраженность являлись общими для обеих форм препарата, не зависели от их способа введения и использованной дозы (рис. 1).

При анализе динамики отдельных субпопуляций Т-клеток (CD3⁺CD4⁺CD8⁻ Т-хелперы; CD3⁺CD4⁻CD8⁺ цитотоксические Т-клетки) было показано, что для всех экспериментальных животных характерно наличие тенденции к увеличению числа Т-хелперных клеток в течение периода введения препаратов. На момент окончания восстановительного периода (16-я неделя) отмечалось снижение относительного числа CD3⁺CD4⁺CD8⁻ клеток, в сравнении с периодом окончания введения (12-я неделя). Выявленное увеличение относительного числа хелперных клеток может быть связано со стимулирующим

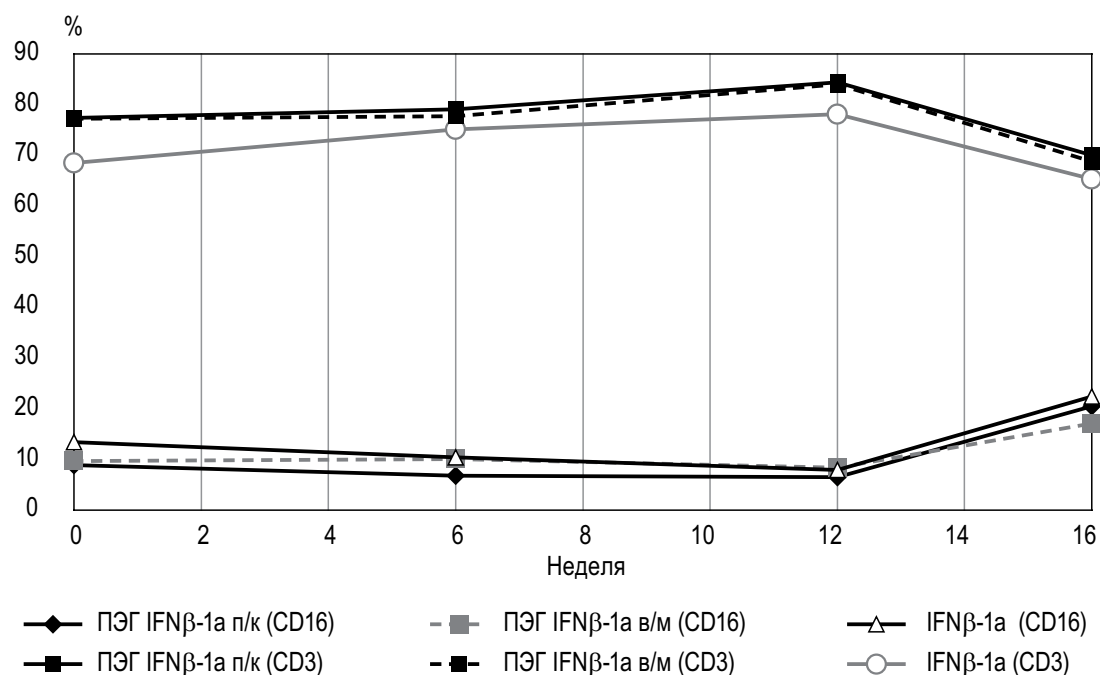


Рисунок 1. Динамика относительного числа НК-клеток и Т-лимфоцитов в периферической крови приматов при введении препаратов модифицированного и немодифицированного интерферона бета в дозе $3,0 \times 10^6$ МЕ/кг
Примечание. п/к – подкожный способ введения; в/м – внутримышечный способ введения.

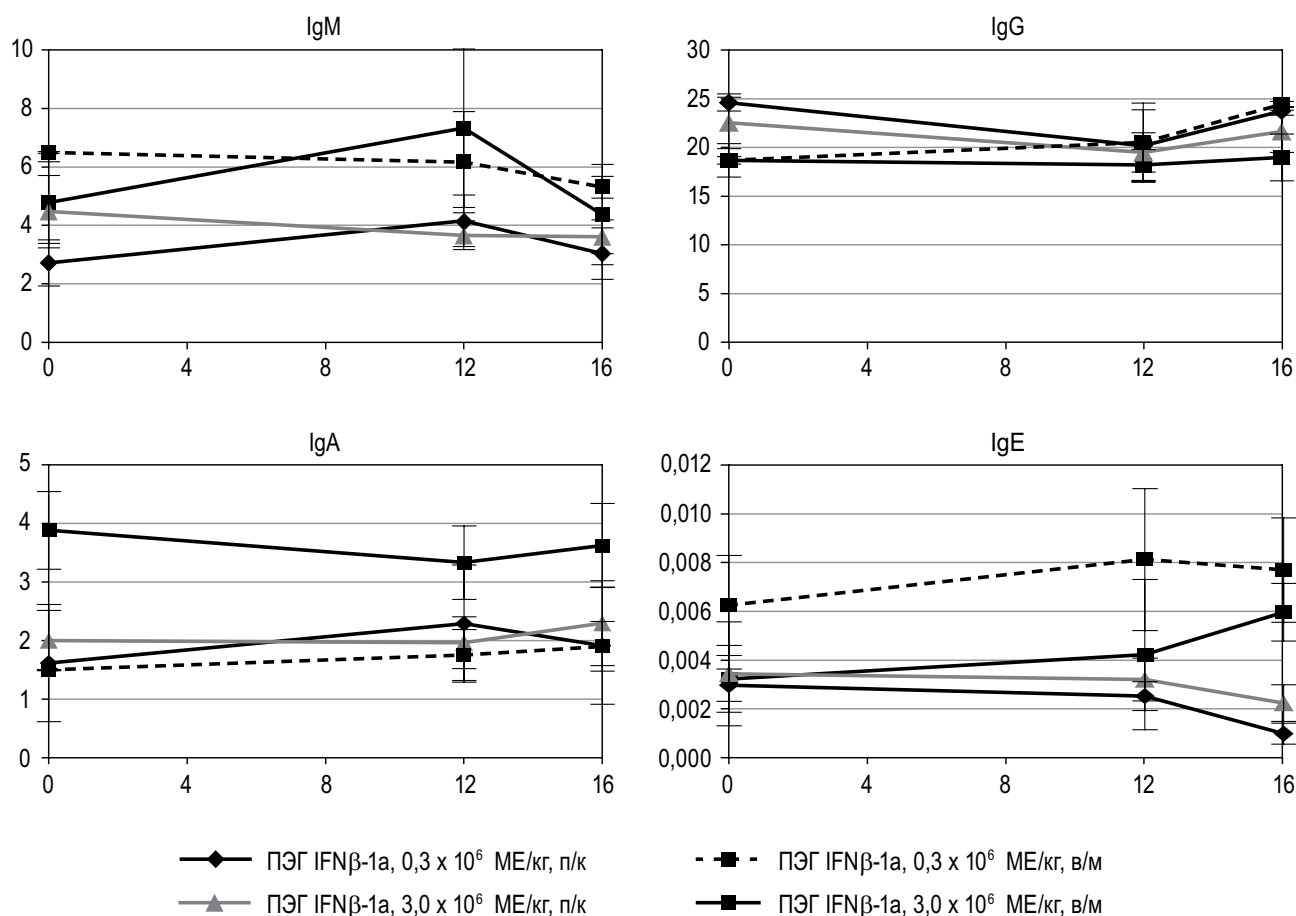


Рисунок 2. Уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови приматов при многократном введении ПЭГ IFNβ-1a

влиянием интерферона бета на регуляторные Т-клетки.

Снижение количества CD3⁺CD4⁺CD8⁻ клеток на момент окончания восстановительного периода являлось следствием отмены препарата и последующего снижения абсолютного количества Т-лимфоцитов (CD3⁺ клетки). Достоверных изменений в количестве цитотоксических Т-клеток выявлено не было.

Данные, приводимые рядом авторов, о влиянии препаратов интерферонов I типа на антигенез в ответ на введение эритроцитов барана мышам свидетельствуют о возможном влиянии исследуемого препарата на гуморальный иммунный ответ при его клиническом применении [5, 6, 9]. Исследования последних лет показали, что влияние IFN β -1a на функциональное состояние В-клеток и уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови может быть опосредовано уровнем фактора активирующего В-клетки (BAFF). Так, было показано, что при использовании препаратов интерферона бета в клинической практике для лечения рассеянного склероза наблюдается повышение уровня BAFF, чего не происходит у пациентов с рассеянным склерозом, не получающих интерферон [11].

Для оценки влияния препарата ПЭГ IFN β -1a на гуморальное звено иммунитета, оценивали динамику уровня антител 4-х классов: IgM; IgG; IgA и IgE (рис. 2).

Анализ экспериментальных данных показал, что уровень и соотношение иммуноглобулинов всех 4-х классов в течение срока исследования не имели значимых отличий и находились в пределах видовой физиологической нормы.

Одним из самых ранних поверхностных маркеров активации лимфоцитов является CD69. Данный белок экспрессируется на поверхности активированных Т- и В-лимфоцитов, натуральных киллеров, нейтрофилов, эозинофилов, эпидермальных клеток Лангерганса и тромбоцитов [18, 23].

В работах ряда авторов показано, что применение препаратов интерферонов первого типа (альфа/бета) сопряжено с изменением уровня экспрессии поверхностных маркеров активации [8, 21]. Так, выраженность экспрессии CD69 при применении IFN β в исследованиях *in vitro* и *in vivo* носит дозозависимый характер и может являться одним из показателей эффективности применения исследуемого препарата при рассеянном склерозе [14].

Уровень клеток, положительных по маркеру CD69, в культурах мононуклеаров крови экспериментальных животных, без внесения препарата, на 6-й неделе эксперимента имел тенденцию к снижению с последующим повышением на 12-й неделе и возвращением к фоновому уровню на момент окончания восстановительного периода (табл. 1). При внесении IFN β в культуры

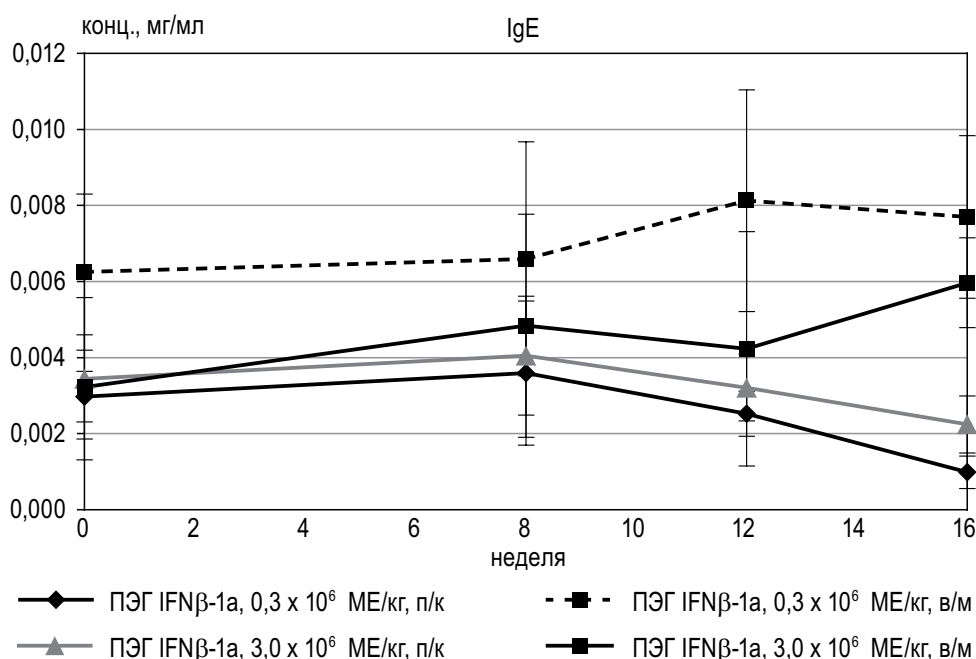


Рисунок 3. Уровень реактивных антител в сыворотке экспериментальных приматов при многократном введении ПЭГ IFN β -1a

клеток крови животных, получавших модифицированный препарат, наблюдали увеличение относительного числа CD69⁺ клеток на 12 неделе эксперимента в сравнении с фоновыми показателями. На момент окончания восстановительного периода число клеток, положительных по оцениваемому маркеру, возвращалось к фоновым значениям. Изменения не носили достоверного характера и не зависели от использованной дозы и способа введения.

При анализе содержания CD69⁺ клеток в культурах моноклеаров крови приматов, получавших немодифицированный интерферон бета-1а, на 6-й и 12-й неделе наблюдали снижение количества CD69⁺ клеток, возвращающееся к фоновым значениям на момент окончания восстановительного периода. Увеличение относительного числа CD69⁺ клеток в культуре моноклеарных клеток является проявлением иммуностропного действия интерферона бета [14]. Полученные в ходе данного эксперимента результаты показывают, что исследуемый препарат вне зависимости от дозы и способа введения, как и препарат-стандарт, оказывает влияние на уровень экспрессии маркера активации CD69.

Оценка алергизирующей активности является обязательной частью общей программы оценки безопасности фармакологических веществ. В данном исследовании проводили оценку способности индуцировать аллергические реакции двух типов (I и IV тип по классификации Джелла и Кумбса). Данные типы гиперчувствительности являются наиболее важными при развитии патологических процессов аллергической природы при применении белковых препаратов, полученных биотехнологическими методами.

Для оценки возможной индукции гиперчувствительности замедленного типа исследуемым препаратом использовали реакцию бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ).

В течение всего срока эксперимента не наблюдалось значимых изменений в уровне пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови, что справедливо для всех использованных для стимуляции доз IFN β -1а. Отсутствие достоверных изменений значений индекса пролиферации у экспериментальных животных свидетельствует о том, что препарат не обладает способностью к индукции гиперчувствительности замедленного типа (табл. 2).

Исследование способности к индукции аллергии I типа по Джеллу и Кумбсу проводили по уровню реагиновых антител (IgE). Динамика уровня IgE в сыворотке животных экспериментальных групп представлена на рисунке 3.

В течение всего срока эксперимента не было выявлено значимых отличий или закономерной тенденции к изменению уровня IgE во всех экспериментальных группах.

Обсуждение

На протяжении всего срока эксперимента проводили оценку субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови приматов, активированных лимфоцитов, уровня антител (IgM, IgG, IgA и IgE), уровня экспрессии CD69 в 24-часовой культуре моноклеаров, алергизирующей активности (I и IV тип по Джеллу и Кумбсу), фагоцитарной активности полиморфноядерных лейкоцитов. Оценка функционального состояния иммунной системы приматов проводили на фоне введения препарата без дополнительной антигенной стимуляции.

Изменения, выявленные в ходе эксперимента, касались соотношения субпопуляций лимфоцитов (NK-клеток и Т-лимфоцитов). Выявленные изменения носили обратимый характер и в наибольшей степени касались групп животных, получавших препараты в максимальной использованной дозе.

Не было выявлено значимого влияния исследуемого препарата и препарата-стандарта на уровень экспрессии маркеров активации.

В отсутствие дополнительной антигенной стимуляции при многократном введении пегилированного интерферона бета-1а не наблюдали влияние на уровень оцениваемых классов антител, что также справедливо для препарата-стандарта и не зависит от использованной дозы и половой принадлежности животных.

Оценка уровня CD69⁺ клеток в 24-часовой культуре моноклеаров показала, что внесение IFN β -1а в культуры клеток крови экспериментальных животных сопровождается тенденцией к увеличению значения оцениваемого параметра.

Фагоцитарная активность полиморфноядерных лейкоцитов не изменялась в течение всего срока эксперимента при многократном введении исследуемого препарата и препарата-стандарта.

ПЕГ IFN β -1а и IFN β -1а не обладают алергизирующим действием.

Лекарственный препарат пролонгированного действия для лечения рассеянного склероза на основе рекомбинантного человеческого интерферона бета-1а производства ЗАО «БИО-КАД», при выбранной схеме введения, не оказывает патологических изменений функциональной активности компонентов иммунной системы как резус.

Список литературы / References

1. Бельский М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Ленинград: Медгиз, 1963. С. 81-117. [Belenkiy M.L. Elements of quantitative assessment of pharmacological effect]. Leningrad: Medgis, 1963, pp. 81-117.
2. Бородулин В.И., Ланцман М.Н. Справочник: Болезни. Синдромы. Симптомы. М.: Оникс, 2009. С. 896. Borodulin V.I., Lanzman M.N. Reference: Diseases. Syndromes. Symptoms]. Moscow: Опух, 2009, p. 896.
3. Куксова М.И. Кроветворная система обезьян в норме и патологии. М.: Медицина, 1972. С. 128. [Kuksova M.I. Hematopoietic system of monkeys in health and disease]. Moscow: Medicine, 1972, pp. 128.
4. Никитин И.Г., Сторожаков Т.Н. Пегилированные лекарственные препараты: современное состояние проблемы и перспективы // Информационный бюллетень «Вирусные гепатиты: достижения и перспективы», 2001. № 3 (13). [Nikitin I.G., Storozhakov T.N. PEGylated drugs: state of the art and perspectives. Information Bulletin «Viral hepatitis: Achievements and Prospects», 2001, no. 3 (13). (In Russ.)]
5. Bon A.L., Schiavoni G., Agostino G., Gresser I., Belardeli F., Tough D.F. Type I Interferons Potently Enhance Humoral Immunity and Can Promote Isotype Switching by Stimulating Dendritic Cells *In Vivo*. *Immunity*, 2001, Vol. 14, pp. 461-470.
6. Brodeur, B.R., Merigan, T.C. Suppressive effect of interferon on the humoral immune response to sheep red blood cells in mice. *J. Immunol.*, 1974, no. 113, pp. 1319-1325.
7. Bruce A. Clinical considerations in pegylated protein therapy. *From Research to Practice*, 2001, no. 3 (1), pp. 3-9.
8. Cebrian M., Redondo J.M., Lopez-Rivas A., Rodriguez-Tarduchy G., De Landazuri M.O., Sánchez-Madrid F. Expression and function of AIM, an activation inducer molecule of human lymphocytes, is dependent on the activation of protein kinase C. *Eur. J. Immunol.*, 1989, May, no. 19 (5), pp. 809-815.
9. De Maeyer E., De Maeyer-Guignard J. Host genotype influences immunomodulation by interferon. *Nature*, 1980, no. 284, pp. 173-175.
10. Delgado C., Francis G.E., Fisher D. The uses and properties of PEG – linked proteins. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 1992, no. 9 (3, 4), pp. 249-304.
11. Dhib-Jalbut S., Marks S. Interferon- β mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*, 2010, pp. 74-17.
12. Hartrich L., Weinstock-Guttmanb, Halle D., Badgett D., Baierd M., Patrickb K., Feichterb J., Hongc J., Ramanathan M. Dynamics of immune cell trafficking in interferon-h treated multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, 2003, no. 139, pp. 84-92.
13. Horwitz, D.A., Gray, J.D., Ohtsuda, K., Hirokawa, M., Takahashi, T. The immunoregulatory effects of NK cells: the role of TGF β and implications for autoimmunity. *Immunol. Today*, 1997, no. 18 (11), pp. 538-542.
14. Huang Y.M., Hussien Y., Jin Y-P, Söderstrom M., Link H. Multiple sclerosis: deficient *in vitro* responses of blood mononuclear cells to IFN- β . *Acta Neurol Scand*, 2001, no. 104, pp. 249-256.
15. Kos F.J., Engleman E.G. Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs. *Immunol. Today*, 1996, no. 17(4), pp. 174-176.
16. Muggia F. The Benefits of pegylation in cancer and antiviral therapy *From Research to Practise*, 2001, no. 3 (1), pp. 1-3.
17. Munschauer, F.E., Hartrich, L.A., Stewart, C.C., Jacobs, L. Circulating natural killer but not cytotoxic T lymphocytes are reduced in patients with active relapsing multiple sclerosis and little clinical disability as compared to controls. *J. Neuroimmunol.*, 1995, no. 62 (2), pp. 81-177.
18. Natarajan K., Sawicki M. V., Margulies D., Mariuzza R. Crystal Structure of Human CD69: A C-Type Lectin-Like Activation Marker of Hematopoietic Cells. *Biochemistry*, 2000, no. 39, pp. 14779-14786.
19. Northfeld D.W., Dezube B.J., Thommes J.A. Pegylated – liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin and vincristine in the treatment of AIDS – related Kaposhi's sarcoma: results of a randomized, phase 1/1 clinical trial. *J. Clin. Oncol.*, 1998, no. 16, pp. 2445-2451.
20. Perini P., Wadhwa M., Buttarello M., Meager A., Facchinetti A., Thorpe R., Biasi G., Galloa P. Effect of IFN β and anti-IFN β antibodies on NK cells in multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, 2000, no. 105 (1), pp. 5-91.

21. Rani S., Shrock J., Appachi S., Rudick A., Williams B., Ransohoff R. Novel interferon-beta-induced gene expression in peripheral blood cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007, Vol. 82, pp. 1353-1360.
22. Takahashi K., Aranami T., Endoh M., Miyake T., Yamamur T. The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain*, 2004, Vol. 127, no. 9, pp. 1917-1927.
23. Testi R., D'Ambrosio D., De Maria R., Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol. Today*, 1994, no. 15, pp. 479-483.
24. Vega A., Pugsley M.K. An overview of colometric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 2011, no. 54, pp. 10-14.

Авторы:

Джелия А.Б. — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной биологии, Закрытое акционерное общество «БИОКАД», п. Любучаны, Московская область, Россия

Устюгов Я.Ю. — к.б.н., заведующий лабораторией экспериментальной биологии, Закрытое акционерное общество «БИОКАД», п. Любучаны, Московская область, Россия

Кортава М.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной биологии, ЗАО «БИОКАД», Московская обл., Россия

Authors:

Dzheliya A.B., Junior Research Associate, Laboratory of Experimental Biology, CJSC "BIOCAD", Lubuchany, Moscow Region, Russian Federation

Ustyugov Ya. Yu., PhD (Biology), Head, Laboratory of Experimental Biology, CJSC "BIOCAD", Lubuchany, Moscow Region, Russian Federation

Kortava M.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Experimental Biology, CJSC "BIOCAD", Lubuchany, Moscow Region, Russian Federation

Поступила 05.05.2015
Отправлена на доработку 13.05.2015
Принята к печати 17.05.2015

Received 05.05.2015
Revision received 13.05.2015
Accepted 17.05.2015