

Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

ГОРДЕЕВА Марина Валерьевна

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО
ОРГАНОПРЕПАРАТА ИЗ СЕЛЕЗЕНКИ СВИНЕЙ И КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель –
кандидат биологических наук
Козин Сергей Валерьевич

Волгоград – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 6 |
| ГЛАВА 1. Обзор литературы | 12 |
| ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования | 36 |
| 2.1. Методы изучения химического состава препаратов из селезенки свиней и крупного рогатого скота..... | 41 |
| 2.2. Методы изучения иммуотропных свойств препаратов селезенки в модельных системах <i>in vitro</i> | 44 |
| 2.2.1. Оценка влияния препаратов селезенки на поглотительную активность гранулацитарно-макрофагальных клеток | 46 |
| 2.2.2. Оценка влияния препарата спленактив на бактерицидную активность гранулацитарно-макрофагальных клеток..... | 47 |
| 2.2.3. Метод оценки влияния препарата спленактив на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками..... | 52 |
| 2.3. Изучение влияния препарата спленактив на неспецифическую резистентность к бактериальной инфекции на модели экспериментального сепсиса у мышей..... | 55 |
| 2.4. Изучение антиоксидантных свойств дигидрохверцетина в составе препарата спленактив..... | 56 |
| 2.5. Методика определения острой токсичности препаратов спленактив и проспленактив..... | 58 |
| 2.6. Оценка анафилактогенной активности в реакции общей анафилаксии (анафилактический шок) | 59 |
| 2.7. Статистическая обработка полученных данных..... | 61 |
| ГЛАВА 3. Результаты собственных исследований | 62 |
| 3.1. Содержание общего белка в исследуемых препаратах селезенки..... | 62 |
| 3.2. Электрофоретический анализ препаратов селезенки..... | 63 |
| 3.3. Содержание некоторых цитокинов в исследуемых препаратах..... | 64 |
| 3.4. Иммуотропные свойства препарата спленактив в модельных | |

| | |
|---|------------|
| системах in vitro..... | 68 |
| 3.4.1. Влияние препарата спленактив на фагоцитарную активность нейтрофилов..... | 68 |
| 3.4.2. Влияние препарата спленактив на активность нейтрофилов в НСТ-тесте..... | 70 |
| 3.4.3. Влияние препарата спленактив на активность нейтрофилов в тесте ЛЗХЛ..... | 75 |
| 3.4.4. Влияние препарата спленактив на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками..... | 79 |
| 3.5. Влияние препарата спленактив на неспецифическую резистентность к бактериальной инфекции у мышей | 84 |
| 3.6. Эффективность дигидрокверцетина в качестве стабилизатора-антиоксиданта в составе препарата спленактив..... | 85 |
| 3.7. Изучение острой токсичности препаратов спленактив и проспленактив..... | 90 |
| 3.8. Аллергезирующее действие спленактива..... | 91 |
| ГЛАВА 4. Обсуждение результатов..... | 94 |
| ВЫВОДЫ..... | 108 |
| НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... | 109 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 110 |

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|-----------------|--|
| АБАП | 2,2'-азобис(2-амидинопропан) |
| АОА | антиоксидантная активность |
| АФК | активные формы кислорода |
| АФП | абсолютный фагоцитарный показатель |
| БАД | биологически активная добавка |
| ГМК | гранулацитарно-макрофагальные клетки |
| ДГК | дигидрокверцетин |
| ДМСО | диметилсульфоксид |
| ИС | индекс стимуляции |
| ИФА | иммуноферментный анализ |
| КРС | крупный рогатый скот |
| ЛЗХЛ | люминолзависимая хемилюминесценция |
| МДА | малоновый диальдегид |
| НАДФН | никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный |
| НИИТиО | Научно-исследовательский институт трансплантологии и искусственных органов |
| НСТ-тест | тест восстановления нитросинего тетразолия |
| ПОЛ | перекисное окисление липидов |
| ПСА | проспленактив |
| С | концентрация |
| СА | спленактив |
| Тх1 | Т-хелпер-1-лимфоциты |
| Тх2 | Т-хелпер-2-лимфоциты |
| ФИ | фагоцитарный индекс |
| ФЧ | фагоцитарное число микробных тел |
| ХЛ | хемилюминесценция |
| ЦК | цитокины |
| ЭДТА | этилендиаминтетрауксусная кислота |

| | |
|--------------------------------|---|
| ЭКПДС | экстракорпоральное подключение донорской селезенки |
| ЭТД | эквивалентная терапевтическая доза |
| Ig (G, A, M, E) | иммуноглобулины классов G, A, M, E |
| IL-1 | интерлейкин-1 |
| IL-10 | интерлейкин-10 |
| IL-1α | интерлейкин-1 α |
| IL-1β | интерлейкин-1 β |
| IL-1Ra | антагонист рецептора интерлейкина 1 |
| IFN-γ | интерферон γ |
| G-CSF | гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ). |
| KCL | калия хлорид |
| NK | натуральные киллеры |
| Me | медиана |
| Q₁ | низкий квартиль (25%) |
| Q₃ | высокий квартиль (75%) |
| RPMI 1640 | roswell Park Memorial Institute medium — среда для культур клеток и тканей. |
| TNF-α | фактор некроза опухоли α |
| TFG-β | трансформирующего фактора роста β |

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одной из актуальнейших проблем здравоохранения является широкое распространение патологических состояний, связанных с нарушением функций иммунитета человека. В связи с этим перед современной фармакологией стоит важная задача – поиск новых биологически активных веществ и разработка лекарственных препаратов на их основе, нормализующих функцию иммунитета и/или предотвращающих её нарушение [Козлов В.А. и др., 2009; Борисов А.Г. и др., 2008; Цибульский А.П., 2006; Ильина Н.И. и др., 2005; Бутенко Г.М., 1993].

Современная медицина располагает большим арсеналом иммуномодуляторов, применяемых при различных патологиях [Цыган В.Н. и др., 2008]. Это препараты животного, микробного и растительного происхождения, а также синтетические средства [Хаитов Р.М. и др., 2009, 2004, 2002; Сепиашвили Р.И., 2002; Добрица В.П., 2001]. Препараты всех указанных групп имеют свои достоинства и недостатки [Хаитов Р.М. и др., 2009; Симбирцев А.С., 2002]. Это обуславливает необходимость создания новых эффективных и безопасных иммуотропных средств для обеспечения широкого спектра препаратов выбора для иммунокоррекции.

Одним из перспективных направлений в этой области является разработка препаратов на основе органов и тканей животного происхождения. Научные изыскания, в том числе приведшие к созданию эффективных иммуномодуляторов, используемых в клинической практике, активно проводятся во всем мире с начала 20 века [Цыпин А.Б., 2004; Макарова Н.Е., 1997]. В качестве примера можно привести лекарственные средства, показавшие выраженный иммуномодулирующий эффект, разработанные на основе: вилочковой железы, клеток костного мозга, эмбриональной ткани, плаценты, крови, кожи, брюшины и селезенки сельскохозяйственных животных [Хавинсон В.Х., 2009; Белова О.В., 2007; Цыпин А.Б., 2004; Ролик И.С., 2003; Новиков Д.К., 2002].

Особый интерес представляет использование с этой целью селезенки сельскохозяйственных животных, поскольку это самый богатый по количеству лимфоидной ткани орган. В ней содержится 25% Т- и 60% В-лимфоцитов от общего пула лимфоцитов в организме. Количество антител, вырабатываемых лимфоидной системой селезенки, значительно превышает их синтез в других лимфоидных органах. Основными проявлениями иммуотропной функции селезенки являются: продукция лимфоцитов и фагоцитирующих мононуклеарных клеток, фильтрация крови, фагоцитарная активность, участие в первичном иммунном ответе, выработка специфических антител и неспецифических иммуноглобулинов, образование биологически активных веществ, влияющих на различные звенья иммунного гомеостаза [Патент 2491944, 2013; Чучкова Н.Н., 2007; Никонов С.Д., 1997; Васильченко А.В., 1996]. Ряд лекарственных препаратов, приготовленных из селезенки (полиерга, диасплен, сплениум, спленин, спленопад и др.), проявили выраженные иммуномодулирующие свойства [Сафиулин З.Т., 2013; Пленина Л.В., 2008; Цыпин А.Б., 2004].

Таким образом, одним из методов решения проблемы фармакорегуляции иммунных процессов является использование препаратов на основе селезенки животных. В настоящее время в мировой медицинской практике используются различные препараты, полученные из селезенки животных. Однако в России подобные препараты не производятся.

Учитывая все сказанное выше, актуальным является разработка и изучение новых отечественных иммуномодулирующих средств из селезенки сельскохозяйственных животных.

Цель работы. Проведение предварительного фармакологического изучения нового иммуотропного лекарственного средства спленактив из селезенки свиней или крупного рогатого скота.

Основные задачи исследования:

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести сравнительное изучение содержания иммуотропных биологически активных веществ в различных сериях органопрепарата из селезенки свиней и селезенки крупного рогатого скота физико-химическими и иммуноферментными методами.

2. Изучить иммуотропные свойства спленактива и проспленактива в модельных системах *in vitro* по их влиянию на функциональную активность фагоцитов (фагоцитарную и бактерицидную) и на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками крови.

3. Изучить влияние спленактива на неспецифическую резистентность к бактериальной инфекции на модели экспериментального сепсиса у мышей.

4. Изучить способность дигидрокверцетина в составе спленактива ингибировать развитие перекисных и свободнорадикальных реакций в процессе хранения препарата, и тем самым сохранять его биологическую активность.

5. Провести оценку безопасности применения спленактива по показателю острой токсичности (по ЛД₅₀) и аллергизирующему действию (по реакции общей анафилаксии).

Научная новизна:

1. Впервые в спленактиве, представляющем собой лиофилизированный гомогенат ткани селезенки свиней и крупного рогатого скота выявлен комплекс биологически активных пептидов и определены молекулярные массы некоторых белков, среди которых обнаружен ряд цитокинов.

2. Впервые исследована иммуномодулирующая активность спленактива, в тестах *in vitro* и *in vivo*.

3. Впервые изучены механизмы иммуномодулирующего действия органопрепарата селезенки спленактив, опосредованные его способностью

стимулировать эндогенный цитокиногенез и влиять на функциональную активность фагоцитов.

4. Экспериментально доказана перспективность использования дигидрохверцетина в качестве стабилизатора-антиоксиданта в составе органопрепаратов селезенки.

5. Доказана высокая безопасность нового органопрепарата из селезенки крупного рогатого скота в тестах по изучению острой токсичности и реакции системной анафилаксии.

Научно-практическая значимость работы. Результаты работы имеют как теоретическое, так и практическое значение. Показана перспективность получения нового органопрепарата из селезенки крупного рогатого скота с введением антиоксиданта дигидрохверцетина. Результаты по оценке безопасности его применения, изучению иммуотропной активности на клетках крови, а также на животных позволили экспериментально обосновать терапевтическую эффективность спленактива и могут быть использованы при разработке проекта инструкции по медицинскому применению в качестве иммуотропного средства. Представленные в работе результаты изучения состава нового органопрепарата спленактив и влияния дигидрохверцетина на его устойчивость к окислению позволили доказать эффективность применения в качестве сырья селезенку крупного рогатого скота и дигидрохверцетина в качестве стабилизатора-антиоксиданта.

Связь темы диссертации с планом научно-исследовательской работы учреждения. Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематикой и планом НИР Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России «Разработка научных основ технологии, стандартизации, организации производства и фармакоэкономики лекарственных средств» (номер государственной регистрации 01200907145).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Различными физико-химическими методами было обнаружено в органопрепарате селезенки значительное содержание веществ пептидной природы с молекулярной массой от 10 кДа до 74 кДа. Иммуноферментным методом определен ряд цитокинов, содержание которых принципиально не различается в препаратах, полученных из селезенки свиней и селезенки крупного рогатого скота.

2. В исследованиях в модельных системах *in vitro* на иммунокомпетентных клетках донорской крови была обнаружена способность спленактива модулировать иммунные процессы, а именно: стимулировать выработку цитокинов, регулирующих иммунный ответ; повышать фагоцитарную и бактерицидную активность фагоцитов.

3. Спленактив повышал неспецифическую резистентность организма на модели бактериального сепсиса у мышей.

4. Дигидрокверцетин, присутствующий в препарате спленактив, защищает входящие в его состав биологически активные вещества от свободнорадикального окисления и не снижает его иммуотропную активность.

5. При изучении безопасности применения спленактив показал себя малотоксичным препаратом по показателю ЛД₅₀ при внутримышечном введении мышам, а также проявил достаточно низкую аллергенную активность по реакции анафилактического шока у морских свинок.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на расширенных заседаниях (17.05.2011г., 27.03.2012г., 16.04.2013г. и 18.03.2014г.) Научно-исследовательского института фармации ГБОУ ВПО Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Минздрава России с приглашением представителей кафедр фармакологии, фармацевтической технологии, фармацевтической химии и фармакогнозии, а также на Общероссийском

научно-практическом мероприятии - Эстафета «Вузовская наука - 2013». Победитель в номинации «Перспективная инновационная идея» в профильной научной платформе «Фармакология» (5 - 6 декабря 2013 г., г. Москва) и Всероссийском научном междисциплинарном симпозиуме (с международным участием) «Медицинская антропология в России и за её пределами» (3 – 5 июля 2013 г., г. Москва) и второй научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (27.02.2014 г., г. Москва) и пятой научно-практической конференции «Актуальные проблемы оценки безопасности лекарственных средств» (20.03.2014 г., г. Москва).

Личный вклад автора. Автором осуществлен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационной работы. Все эксперименты проведены автором лично или при его активном участии. Непосредственно автором проведена статистическая обработка, описание и анализ полученных результатов, сформулированы выводы и научно-практические рекомендации. Публикации по основным положениям диссертационной работы подготовлены при активном участии автора (авторский вклад составляет 85%).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах и состоит из введения, четырех глав, включающих обзор литературы, характеристику материалов и методов исследования, полученные результаты и их обсуждение, выводов, научно-практических рекомендаций и списка литературы, включающего 181 отечественных и 76 зарубежных источников. Работа содержит 12 рисунков и 12 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Фармакокоррекция иммунных процессов

В настоящее время отмечается рост нарушений иммунологической реактивности населения в целом, что приводит к повышению заболеваемости острыми и хроническими болезнями, иммунодефицитам, аллергическим, аутоиммунным и лимфопролиферативным процессам [Борисов А.Г. и др., 2008; Ильина Н.И. и др., 2005; Бутенко Г.М., 1993].

Иммунная система наряду с другими функциональными системами обеспечивает внутренний гомеостаз человека и нарушения ее работы могут лежать в основе патомеханизмов многих заболеваний. Так доказано, что иммунные реакции участвуют в развитии атеросклероза, сахарного диабета, бронхиальной астмы, дерматита и многих других заболеваний [Борщикова Т.И., 2011; Мейл Д., 2007; Цибульский А.П., 2006]. В связи с этим особо остро стоит проблема фармакологической коррекции нарушения иммунного статуса организма человека, с помощью иммуномодулирующих лекарственных препаратов [Козлов В.А. и др., 2009; Дейл М.М., 1999; Vanchereau J., 2003].

Одной из важнейших задач иммуномодуляторов является стимуляция клеточного и гуморального иммунитета, а также повышение показателей неспецифической иммунной защиты при лечении заболеваний, обусловленных первичной или вторичной недостаточностью иммунной системы или ее дисфункцией [Цыган В.Н., 2008; Юшков В.В., 2002]. Это особенно важно ввиду того, что применение противомикробных средств в ряде случаев может приводить к угнетению иммунитета и, как следствие, к хронизации инфекционного процесса, присоединению вторичной инфекции. [Хаитов Р.М. и др., 2009, 2004, 2003, 2000; Пинегин Б.В., 2000; Кидрей Е.Г., 2000; Mrkic B. et al., 2000; Михайлов И.Б., 1999; Лесков В.М., 1999; Hadden J.W., 1993].

Современные иммуномодуляторы подразделяют на три основные группы в зависимости от их происхождения: эндогенные, экзогенные и синтетические [Хаитов Р.М. и др., 2004, 2003, 2002, 2000; Добрица В.П. и др., 2001].

Первая группа – эндогенные иммуномодуляторы– лекарственные средства, полученные из органов иммунной системы. Данная группа, в свою очередь, делится на 4 категории иммуномодуляторов: тимические препараты, цитокины, интерфероны и иммуноглобулины.

К тимическим препаратам относятся препараты на основе иммунорегуляторных пептидов, выделенных из вилочковой железы и костного мозга. На сегодняшний день известно три поколения этих препаратов, толчком к созданию которых стало открытие нового класса биологически активных соединений – пептидных гормонов тимуса, к числу которых относятся семейства тимозинов, тимопоэтинов и сывороточный тимический фактор – тимулин. К иммуномодуляторам первого поколения, полученным на основе экстрактов тимуса, относятся тактивин и тималин, тимоптин, тимостимулин, вилозен и др. [Манько В.М., 2002; Морозов В.Г. и др., 2001].

Иммуномодуляторы тимического происхождения 2-го и 3-го поколения представляют собой синтетические аналоги естественных гормонов тимуса или фрагментов этих гормонов, обладающих биологической активностью. Так, дипептид, выделенный из экстракта тимуса и состоящий из триптофана и глутамина стал основой для эффективного и иммуностропного препарата тимоген. А на основе одного из фрагментов, включающего аминокислотные остатки активного центра тимопоэтина, был создан синтетический гексапептид иммунофан – аналог участка 32–36 тимопоэтина [Ковальчук Л.В., 2008; Хаитов Р.М., 2004].

На основе комплекса биорегуляторных пептидных медиаторов – миелопептидов, продуцируемых клетками костного мозга свиней или телят был создан препарат миелопид [Михайлова А.А., 1996].

Регуляция развившегося иммунного ответа осуществляется цитокинами – сложным комплексом эндогенных иммунорегуляторных молекул, которые являются основой для создания большой группы как естественных, так и рекомбинантных иммуномодулирующих препаратов. Они подразделяются на несколько групп – интерлейкины, факторы роста, колониестимулирующие факторы, хемотаксические факторы, факторы некроза опухолей [Кетлинский С.А. и др., 2008; Преферанская Н.Г., 2008; Старикова Э.А., 2003; Симбирцев А.С., 2002; Ляпенко А.А., 2001]. Интерлейкины являются главными участниками развития иммунного ответа на внедрение микроорганизмов, формирования воспалительной реакции, осуществления противоопухолевого иммунитета и др. [Бояджян А.С. и др., 2008]. К группе естественных иммуномодулирующих препаратов относятся лейкоинтерферон и суперлимф, к рекомбинантным – беталейкин, ронколейкин и лейкомакс (молграмостим). Перечисленные препараты получают методом *in vitro* при индукции лейкомассы здоровых доноров (лейкоинтерферон), мононуклеаров периферической крови свиней (суперлимф), рекомбинантного штамма непатогенных пекарских дрожжей (ронколейкин), а также рекомбинантного штамма кишечной палочки (беталейкин). Эти препараты содержат комплексы нескольких или индивидуальные интерлейкины и применяются для стимуляции иммунного ответа [Конусова В.Г., 2003; Brightbill H., 2000; Werner G.H., 1996; Liles W.C., 1995].

Иммуноглобулиновые препараты получают при переработке животной или донорской крови. Их применение (особенно внутривенное) позволяет в кратчайшие сроки создавать в крови эффективные концентрации антител. Они применяются при первичных иммунодефицитах (агаммаглобулинемия, селективный дефицит IgG, и др.), гипогаммаглобулинемии при хроническом лимфолейкозе, тромбоцитопенической пурпуре, других аутоиммунных заболеваниях, а также при тяжелых вирусно-бактериальных инфекциях, сепсисе. [Кондратенко И.В., 2010; Хаитов Р.М., 1996, 2000, 2004].

Вторая группа — экзогенные иммуномодуляторы, имеющие микробное или грибковое происхождение. С момента создания первого препарата этой группы – вакцины БЦЖ – в начале 50-ых годов было разработано три поколения подобных иммуномодуляторов.

К первому поколению относят пирогенал и продигиозан, представляющие собой полисахариды бактериального происхождения.

К микробным препаратам второго поколения относятся лизаты (бронхо-мунал, ИРС-19, имудон, бронхо-ваксом) и рибосомы (рибомунил) бактерий, относящиеся в основном к числу возбудителей респираторных инфекций: *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* и др. Эти препараты имеют двойное назначение: специфическое (вакцинирующее) и неспецифическое (иммуностимулирующее) [Ковальчук Л.Н. 2008; Богомильский М.Р. и др., 2000; Машковский М.Д., 1997].

Ликопид относится к микробным препаратам третьего поколения. Он состоит из природного дисахарида – глюкозаминилмурамила и присоединенного к нему синтетического дипептида – L-аланил-D-изоглютамина. Ликопид оказывает иммуномодулирующее действие прежде всего за счет активации клеток фагоцитарной системы иммунитета (нейтрофилов и макрофагов). Последние путем фагоцитоза уничтожают патогенные микроорганизмы, а также секретируют медиаторы естественного иммунитета – цитокины (IL-1, TNF- α , G-CSF, IFN γ), которые, воздействуя на широкий спектр клеток-мишеней, вызывают дальнейшее развитие защитной реакции организма. Таким образом, ликопид воздействует на все три основных звена иммунитета: фагоцитоз, клеточный и гуморальный иммунитет, стимулирует лейкопоз [Хаитов Р.М., 2000].

Третья группа — синтетические иммуномодуляторы. Их получают путем направленного химического синтеза. К этой группе относятся такие препараты, как левамизол и диуцифон, а также амиксин, неовир, галавит, полиоксидоний и др.

Группу химически чистых иммуномодуляторов можно разделить на две подгруппы: низкомолекулярные и высокомолекулярные. К первым относится левамизол (декарис) – фенилимидотиазол, противоглистное средство, у которого были выявлены выраженные иммуностимулирующие свойства. Другим перспективным лекарственным средством из подгруппы низкомолекулярных иммуномодуляторов является галавит – производное фталгидразида. Особенность этого препарата заключается в наличии не только иммуномодулирующих, но и выраженных противовоспалительных свойств. В основе его фармакологического действия лежит способность воздействовать на функционально-метаболическую активность макрофагов, а также обратимо ингибировать избыточный синтез ряда провоспалительных цитокинов гиперактивированными макрофагами [Молотков В.Н, 1982].

К высокомолекулярным, химически чистым иммуномодуляторам, полученным с помощью направленного химического синтеза, относится препарат полиоксидоний. Он представляет собой N-оксидированное производное полиэтиленпиперазина. Препарат обладает иммуномодулирующим (стимулирует функциональную активность фагоцитов), детоксицирующим, антиоксидантным и мембранопротекторным свойствами [Добротин Н.А. и др., 2005; Дьяконова В.А. и др., 2002; Петров Р.В., 2000].

К синтетическим иммуномодуляторам относится также большинство индукторов интерферона. К ним относятся препараты полудан, амиксин, неовир, циклоферон, йодантипирин, ридостин, алпизарин [Хаитов Р.М., 1996, 2000, 2004].

Ряд авторов к иммуномодулирующим препаратам относят также некоторые препараты растительного и животного происхождения, в частности препараты из группы фитоадаптогенов [Гусева С.И., 2010; Бочарова О.А., 2008; Крендаль Ф.П. и др., 2007, Яремнко К.В., 2007; Чубарев В.Н., 1988 и др.]. К ним относятся препараты женьшеня, элеутерококка, родиолы розовой, эхинацеи пурпурной, пантокрин и др.

Таким образом, перечень современных препаратов, относящихся к иммуномодуляторам, очень обширен. К ним предъявляются серьезные требования по безопасности и эффективности, по отсутствию привыкания, по взаимодействию с другими препаратами и многим другим критериям. В связи с этим является целесообразным создание новых эффективных и безопасных препаратов этой группы для обеспечения широкого выбора иммуномодулирующих средств.

Одним из путей решения этой проблемы является разработка и применение препаратов на основе иммунокомпетентных органов (органопрепаратов) животного происхождения. В частности — из селезенки свиней или крупного рогатого скота.

Иммуотропные органопрепараты на основе селезенки.

Органопрепаратами называют препараты, изготавливаемые из биомолекул и биофакторов органов и тканей здоровых животных и их эмбрионов [Ролик И.С., 2003].

В современной медицине применяются различные виды органопрепаратов из ксеногенных (животных) органов и тканей. При этом в качестве исходного материала могут использоваться как эмбриональные и фетальные ткани или органы, так и ткани молодых и половозрелых особей [Ролик И.С., 2003].

По способу получения и степени очистки их разделяют на высушенные, обезжиренные и измельченные железы и ткани; экстракционные — для внутреннего употребления; инъекционные, которые подразделяют на максимально очищенные экстракты и препараты индивидуальных веществ [Ролик И.С., 2003; Хлябич Г.Н., 1991].

Ряд органопрепаратов содержит все клеточные структуры (цитоплазма, ядра, мембраны и др.) тканей органа, куда входят компоненты специализированных клеток (например, гепатоцитов) и окружающих их структур (соединительной ткани, межтканевой жидкости, лимфы, основной

субстанции и т.д.). Особенностью их состава являются биофакторы и биомолекулы, отражающие биохимическую специфику соответственно фетальной или ювенильной здоровой ткани: протеины, пептиды, липиды, полисахариды, нуклеиновые кислоты, медиаторы, аминокислоты, ферменты, микроэлементы, витамины, ростовые факторы, факторы дифференцировки, пролиферации и др. [Ролик И.С., 2003].

Применение животных органов в медицине имеет давнюю традицию. Великий французский физиолог Шарль Эдуард Браун-Секар вошел в историю, как основатель органотерапии (эксперименты с экстрактами различных органов). Свой вклад в развитие органопрепаратов также внесли такие ученые, как А. В. Пель (препараты спермин и оповарин), И. Н. Казаков (лизатотерапия), А. Герке (органопрепарат «Promonta»), М. П. Тушнов (теория гистолизатов), И. П. Чукичев (симпатомиметин), Пауль Ниханс (клеточная теория) [Заико М.В. и др., 2014; Макарова Н.Е., 1997].

В начале 1970-х годов сотрудники Ленинградской военно-медицинской академии В. Х. Хавинсон и В. Г. Морозов разработали новый класс геропротекторных препаратов – пептидные биорегуляторы, обладающие способностью восстанавливать специфические функции тех органов и тканей, из которых они были выделены, а также стали создателями биорегулирующей терапии – новой медицинской технологии восстановления и сохранения основных функций органов и тканей организма в пределах генетически детерминированного срока жизни человека [Морозов В.Г. и др., 2001; Хавинсон В.Х., 2009]. По их мнению использование этих пептидных биорегуляторов позволяет эффективно проводить профилактику преждевременного старения, а также лечить заболевания, ассоциированные с возрастом. Эндогенные пептидные биорегуляторы, получившие общее название «цитомедины» участвуют в поддержании структурного и функционального гомеостаза клеточных популяций, которые содержат и продуцируют эти факторы. Цитомедины контролируют экспрессию генов и синтез белка, что препятствует возрастному накоплению количественных

структурных и функциональных изменений. Нарушение пептидной биорегуляции снижает устойчивость организма к дестабилизирующим факторам внешней и внутренней среды, что является одной из причин ускоренного старения [Хавинсон В.Х., 2009; Кузник Б.И., 1998].

Сотрудниками Института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН было разработано шесть геропротекторных лекарственных препаратов: тималин, тимоген, эпиталамин, простатилен, кортексин, ретиналамин, а также ряд биологически активных добавок – цитогенов и цитомаксов. Цитогены представляют собой пептидный комплекс, имеющий в своем составе 3 аминокислоты, являющиеся «активным центром» препарата на основе экстрактов из животного сырья. Другой класс природных биологически активных добавок к пище – цитомаксы, представляющие собой низкомолекулярные пептидные фракции, выделенные из органов и тканей животных, таких как сосуды, почки, печень, глаза, слизистая оболочка желудка, поджелудочная железа и др. [Хавинсон В.Х., 2009; Морозов В.Г. и др., 2001; Кузник Б.И., 1998]. Однако несмотря на широкий ассортимент пептидных биорегуляторов Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии, препаратов выделенных из селезенки животных на данный момент нет.

В настоящее время считается, что для органопрепаратов характерно несколько механизмов действия. Они обладают фармакологической точностью воздействия на функции гомологичного органа или ткани – *эффект гомологичности*. Суть его в повышенной тропности полученной биомолекулярной субстанции к гомологичным органам или тканям человека: кумуляция препарата и, соответственно, развитие фармакологических эффектов в тех органах (тканях), из которых препарат изготовлен. Лауреат Нобелевской премии 1999 года американский биохимик Г. Блобел внес свой вклад в открытие механизма органотропизма, как всеобъемлющего свойства живого. Эффект гомологичности не зависит от способа и места введения органопрепаратов и имеет продолжение – передаёт еще одно свойство этим

средствам – свойство проводников других лекарств в гомологичный орган при условии совместного введения в организм. Для усиления данного эффекта используется липосомальная технология, когда биомолекулы помещаются в липосомы, хорошо проникающие через гистогематические барьеры [Заико М.В., 2014; Lynch А.М., 1996].

Для органопрепаратов также характерен эффект восполнения. Особенно в сравнительно высоких концентрациях, они восполняют дефицит клеточных биомолекул, ликвидируют на биохимическом уровне «клеточные дефекты». Этот эффект является пусковым в последующем развитие цепи физиологических регенеративных реакций.

Благодаря свойству органотропности и эффекту восполнения, биомолекулярные препараты оптимизируют процессы физиологической регенерации в гомологичных органах больного, что способствует снятию явлений воспаления, лизису очагов патологической пролиферации, развитию антидегенеративных эффектов, торможению опухолевого роста, замедлению процессов старения и атрофии [Lynch А.М., 1996].

Ряд органопрепаратов обладают иммуномодулирующими свойствами и используются в комплексной иммунотерапии и иммунореабилитологии [Сепиашвили Р.И., 2003, 2004; Ролик И.С., 2003; Арион В.Я., 2000; Цыпин А.Б., 1995].

Так, препараты из тимуса, лимфоузлов, слизистых верхних дыхательных путей, костного мозга, бронхов, легких, селезенки, мезенхимы применяются для восстановления функций иммунной системы у детей с вторичным иммунодефицитом. Интересно, что органопрепараты из структур глаза наряду с эффективностью лечения ювенильных и старческих нарушениях зрения, диабетических ретинопатий, повышении функциональной активности глаз при напряженной зрительной работе, также применяются для купирования аллергических и воспалительных проявлений в конъюнктиве [Сиденко Л.Н., 2004].

Обращает на себя внимание тот факт, что органопрпараты с иммуностропным действием изготавливаются в том числе и из органов формально не относящихся к иммунной системе. В зависимости от исходного сырья их можно классифицировать следующим образом:

- препараты вилочковой железы: Т-активин, тималин, вилозен, тимоптин, тимулин и др. [Арион В.Я., 1989; Новиков Д.К., 2002];
- эмбриональной ткани: эрбисол [Дранник Г.Н., 2006];
- костного мозга: миелопид (В-активин) [Беркасова Н.Л., 2008; Михайлова А.А., 1996];
- селезенки: сплениум, полиерга, диасплен [Цыпин А.Б., 2004];
- плаценты: экстракт плаценты [Грищенко Н.Г., 2013];
- крови: гистаглобулин, пентаглобин и другие препараты иммуноглобулинов [Кондратенко И.В., 2010; Молотков В.Н., 1982].

В большинстве случаев все перечисленные иммуностропные препараты оказывают комплексное воздействие на иммунную систему. Поэтому их разделение на группы по преимущественному влиянию на отдельные звенья иммунной системы является условным, но в то же время приемлемым и удобным в клинической практике. Так, например, при дисфункции Т-клеточного звена иммунитета можно применить один из следующих препаратов: Т-активин, тимоген, тималин, вилозен, эрбисол. При нарушении функции В-клеточного звена иммунитета необходимо назначение таких средств, как миелопид, спленин [Сепиашвили Р.И., 2002; Арион В.Я., 1989; Audhya, T., 1984;].

Особый интерес представляют препараты животного происхождения, приготовленные на основе тканей селезенки. Селезенка имеет большую мощность захвата микроорганизмов на единицу массы по сравнению с печенью и является доминирующей зоной выведения из кровотока возбудителя инфекции [Сафасов С.Ю. и др., 1992]. В связи с интенсивной перфузией органа (до 4% объема циркулирующей крови в минуту) макрофаги селезенки обеспечивают до 15% общего клиренса антигенных

частиц, бактерий и других патогенов. Селезенка содержит 25% ретикулоэндотелия всего организма, 30% ее объема занимает лимфоидная ткань, она является основным органом по продукции антител [Патент 2491944, 2013; Чучкова Н.Н. и др., 2007]. Уникальное кровообращение с открытым и закрытым током крови обеспечивает возможность продолжительного контакта клеток селезенки с различными агентами (чужеродными и аутологичными). Основными проявлениями защитной функции селезенки являются: фильтрация крови, фагоцитарная активность, участие в первичном иммунном ответе, выработка специфических антител и неспецифических иммуноглобулинов, образование биологически активных веществ, влияющих на различные звенья иммунного гомеостаза. Её клетки вырабатывают большой комплекс цитокинов (IL: 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, IFN- γ , G-CSF, TNF- α), опсонины (тафтсин, фибронектин и др.), которые имеют большое значение для обеспечения иммунного гомеостаза, стимулируя, в первую очередь, фагоцитарную и метаболическую активность лейкоцитов и макрофагов, а также другие пептиды, которые являются регуляторами иммунной системы организма. Селезенка считается важнейшим местом продукции лимфоцитов и фагоцитирующих мононуклеарных клеток. В ней содержится 25% Т и 60% В-лимфоцитов от общего пула лимфоцитов в организме. Количество антител, вырабатываемых лимфоидной системой селезенки, значительно превышает их синтез в других лимфоидных органах [Чучкова Н.Н., 2007; Corazza G. R., 1990]. Стромальные клетки селезенки являются продуцентами фактора роста гепатоцитов или рассеивающего фактора (HGF/SF - hepatocyte growth factor / scatter factor) [Skibinski G., 2001; Abbas A., 1996; Kono S., 1992; Matsumoto K., 1992]. Этот пептид является паракринным регулятором мезенхимально-эпителиальных взаимодействий, стимулирует рост и подвижность эпителиоцитов [Kermorgant S., 1997]. Кроме того, селезенка принимает участие в синтезе инсулиноподобных факторов роста (IGF-I и -II - insulin-like growth factor I и II) [Hoeflich A., 2001], хотя основным их источником является печень, а также

специфического селезеночно-производного фактора роста (SDGF-spleen-derived growth factor) [Suzuki T., 1988]. Все названные цитокины обладают выраженным митогенным действием на гепатоциты следовательно, стимулируют регенерацию печени [Патент 2491944, 2013; Патент 2152219, 2005; Aluvihare V., 2004; Galimi F., 2002; Gao C., 2001; Kato Y., 1997; Sato N., 1997].

Противоинфекционная защита селезенки представлена макрофагами, которые обнаружены практически во всех органах и тканях организма, но в более значительном объеме только в селезенке и печени. Непосредственно после проникновения в организм антиген обнаруживается в макрофагах селезенки, где большая часть его разрушается и элиминируется, а оставшаяся часть образует высокоиммуногенный агент, принимающий непосредственное участие в кооперации иммунокомпетентных клеток, необходимой для формирования адекватного ответа [Borneva V.G., 1980].

Установлено, что водный экстракт селезенки животных, содержащий высокомолекулярные белковые молекулы, обладает защитным и терапевтическим действием при лучевой болезни. Он относительно стоек к нагреванию. Инъекции его облученным животным значительно продлевают их жизнь [Геворкян С.К., 1997].

Из селезенки удалось также выделить высокомолекулярное белковое вещество, которое было отнесено к кейлонам — факторам, угнетающим размножение клеток в соответствующих тканях. Кейлон селезенки тормозит иммунологические реакции в этом органе после введения чужеродных клеток. При помощи ультрафильтрации и хроматографии из высокомолекулярного белкового вещества удалось выделить низкомолекулярный иммунодепрессивный фактор. Это открыло реальную возможность установить его структуру, осуществить синтез и обеспечить практическое применение [Чучкова Н.Н., 2007].

В середине 20 века в США Г. Унгаром были предприняты попытки разработки препаратов на основе ткани селезенки, а именно — спленин А и

спленин Б. Первый уменьшал проницаемость капилляров и повышал устойчивость эритроцитов к действию антиэритроцитарной сыворотки. Действие спленина Б имело обратную направленность [Цыпин А.Б., 2004].

В Германии Э. Шлифаке был получен препарат спленотрат, он же просплен. Препарат широко использовали для лечения гастрита с нарушенной кислотностью желудочного сока и при аллергических заболеваниях. Позже путем диализа селезеночного экстракта в Швейцарии был получен препарат под названием солкосплен. Он стимулировал половую функцию, нормализуя деятельность половых желез [Цыпин А.Б., 2004]. Ф. П. Легрером был разработан и впоследствии изучен еще один препарат селезенки животных — спленолизат [Демин В.А., 2006].

В середине 1940-х годов в Лаборатории экспериментальной эндокринологии (киевский Институт экспериментальной биологии и патологии им. А. А. Богомольца) академиком АН УССР В. П. Комиссаренко с помощью методов экстракции из селезенки крупного рогатого скота был получен препарат спленин. По описанию автора – это специфический препарат, обладающий противовоспалительными, мембраностабилизирующими и иммуномодулирующими свойствами. В нем было обнаружено большое количество аминокислот, жирных кислот, а также липиды, микроэлементы и витамины. Спленин стимулировал процессы антителообразования, розеткообразования и пролиферативную активность. Эксперименты на различных видах животных показали выраженное детоксикационное действие препарата [Новиков Д.К., 2002]. Препарат показал себя высокоэффективным средством при токсикозах на ранних сроках беременности. Была также обнаружена его способность угнетать проявление аллергических реакций. Спленин оказывал выраженный терапевтический эффект при лечении аллергического насморка, крапивницы и аллергических дерматитов. В комплексной терапии больных туберкулезом легких, при введении спленина наблюдалось стимулирование фракции Т- и В-лимфоцитов и улучшение общего состояния [Молотков В.Н, 1982; Audhya

Т., 1984; Cohen S., 1974].

В 1984 году А. И. Свирновский с соавт. получили экстракт из ткани селезенки, содержащий вещества белковой природы, углеводы, ДНК и РНК. Фракционированием с помощью различных методов им удалось получить наиболее активные компоненты, усиливающие антителопродукцию в организме, не повреждающие нормальное кроветворение, стимулирующие пролиферативные процессы, повышающие выход зрелых нейтрофилов из костного мозга и поддерживающие постоянное абсолютное содержание лимфоцитов в периферической крови [Свирновский А.И., 1984]. Подобного эффекта достигали и другие исследователи, получавшие фракции с молекулярной массой 10-12 кДа из супернатанта культуры клеток селезенки с наличием пептидного и рибонуклеотидного компонентов [Конопля А.И., 1985].

Английской компанией Merck был предложен высокоэффективный лекарственный препарат, под названием — полиерга. Препарат содержит олигопептиды, полученные из селезенки свиньи. Полиерга способствует лечению опухолевого процесса, в том числе и после химиолучевой терапии, а также препятствует метастазированию опухолей и используется в профилактике онкозаболеваний [Цыпин А.Б., 2004].

Унитарное предприятие «Диалек» разработало оригинальную технологию пептидного препарата диасплен на основе селезенки эмбрионов и молодняка крупного рогатого скота. В состав диасплена входят биологически активные соединения оказывающие полифункциональное воздействие на различные ткани и органы. Они обладают иммуномодулирующим действием, регулируют энергетические процессы в клетках, оказывают нормализующее воздействие на свободно-радикальное перекисное окисление липидов, стимулируют репаративные и трофические процессы [Пленина Л.В. и др., 2008].

Еще одним иммуностропным средством из селезенки животных является биологически активная добавка «Пептидный комплекс Ени-Сала 1».

Она показала высокую эффективность при применении в комплексном лечении больных с хроническими неспецифическими заболеваниями легких, острыми бронхитами, респираторными заболеваниями верхних дыхательных путей и туберкулезе легких [Сафиулин З.Т., 2013].

Важным этапом в развитии идеи об употреблении селезенки в качестве сырья для получения природного иммуномодулятора послужил разработанный в середине 1980-х годов профессором А. Б. Цыпиным метод применения селезенки свиньи в качестве донорского органа для экстракорпорального очищения крови больных с хирургическим сепсисом. Экспериментальные и клинические исследования показали, что при артериовенозной перфузии крови больных через донорскую селезенку из её пульпы в кровь пациента экскретируются биологически активные вещества, обладающие saniрующими и противовоспалительными свойствами. После этого были разработаны методики получения перфузата селезенки свиньи для местного применения и внутривенной инфузии, экстракта селезенки из срезов органа, криоксеноспленоперфузата, лиофилизированного ксеноспленоперфузата. Оказалось, что ксеноспленотерапия оказывает детоксикационный, антисептический, антиаллергический и иммуномодулирующий эффекты в организме, что обусловлено наличием в препаратах селезенки биологически активных веществ, в частности цитокинов [Чучкова Н.Н. и др., 2007; Онищенко Н.А. и др., 2001; Федорова Н.В. и др., 1999; Геворкян С.К., 1997; Васильченко А.В., 1996; Стяжкина С.Н., 1994; Bone R.C., 1997; Schlich T., 1998].

В результате клинического применения экстракорпорального подключения донорской селезенки (ЭКПДС) было отмечено, что его применение проявляет выраженное иммуномодулирующее действие при системных заболеваниях; нормализует гемолитическую активность комплемента и иммуноглобулинов плазмы крови; увеличивает количество Т-лимфоцитов при их исходном пониженном уровне; нормализует иммунорегуляторное соотношение; повышает фагоцитоз [Василенко А.М.,

2000; Никонов С.Д., 1999; Ситников В.А., 1998; Васильченко А.В., 1996; Сафаров С.Ю., 1992; Мануйлов Б.М., 1986]. Эффективность ЭКПДС отмечается при инфекционно-аллергической бронхиальной астме, гнойно-воспалительных хирургических заболеваниях, при остром гнойном пиелонефрите и тд. [Санникова А.А., 2000; Ситников В.А., 1997, 1998; Стяжкина С.Н., 1995].

Разработчики и исследователи метода ЭКПДС и ксеноспленоперфузата, а также перечисленных выше подобных препаратов, связывают их фармакологическую эффективность с наличием биологически активных веществ – тафтсина, пропердина, иммуноглобулинов, опсопинов, бактериолизина, лизоцима, фибронектина [Чучкова Н.Н. и др., 2007]. При этом, ключевую роль они отводят цитокинам – растворимым факторам иммунокомпетентных клеток [Кетлинский С.А. и др., 2008; Никонов С.Д., 1999]. Так, в спленоперфузате был обнаружен комплекс нативных цитокинов: интерлейкинов IL-1, 2, 3, 6; интерферона-гамма (IFN- γ); гранулацитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (G-CSF), трансформирующего фактора роста β (TFG- β); фактора некроза опухоли (TNF- α); фактора стволовых клеток (CSF) [Макаров А.А. и др., 2002; Никонов С.Д., 1999; Геворкян С.К., 1997; Васильченко А.В., 1996; Ковальчук Л.В., 1995; Lynch A. M., 1996].

По мнению ряда авторов именно комплекс цитокинов в их естественном природном соотношении проявляет уникальный механизм действия, когда возможна активация именно тех компонентов комплекса, в которых имеется физиологическая необходимость [Никонов С.Д., 1999; Ситников В.А., 1997; Стяжкина С.Н., 1994].

Клинический опыт ведущих лечебных учреждений по использованию метода ЭКПДС показал наряду с его высокой эффективностью и практической значимостью ряд серьезных препятствий к широкому применению. А именно – трудоёмкость процедуры и необходимость участия высококвалифицированного персонала.

В связи с этим с непосредственным участием А. Б. Цыпина и сотрудников НИИТиИО МЗ РФ был разработан препарат-иммуномодулятор – спленопид [Чучкова Н.Н., 2007; Цыпин А.Б., 2004, 1995; Казакова Н.Д. 2003]. Методика изготовления препарата включала применение высокоактивных бактериальных фильтров, лиофилизацию и способы концентрации компонентов препарата. Это позволило при сохранении положительных свойств предшествующих препаратов ксеноселезенки сделать спленопид более насыщенным биологически активными веществами, уменьшить количество в нем индифферентных веществ. Препарат представлял собой пептидную фракцию, выделенную из ткани селезенки свиней или крупного рогатого скота с добавлением антибиотика гентамицина сульфата в качестве консерванта. В составе препарата спленопид методом иммуноферментного анализа был обнаружен и оценено количественное содержание целого ряда природных цитокинов с молекулярной массой около 50 кДа: IL-1, IL-2, IL-3, IFN- γ , TNF- α , G-CSF и другие [Патент 2152219, 2005; Казакова Н.Д., 2003; Федорова Н.В., 2002; Макаров А.А., 2002; Цыпин А.Б. и др., 2000].

Он успешно применялся в комплексном лечении рассеянного склероза, онкологических патологий, диабетической стопы, пиелонефрита, геморрагической лихорадки, полиорганной недостаточности, гнойно-септических осложнений в послеоперационном периоде, язвы желудка и двенадцатиперстной кишки. Спленид активировал клеточный и гуморальный иммунитет, повышал специфическую и неспецифическую резистентность организма, ускорял регенерацию поврежденных тканей. В экспериментальных исследованиях доказано, что препарат снижал активность аутоиммунных процессов, обладал детоксицирующими свойствами при сепсисе, иммуномодулирующими – при миелодепрессии [Казакова Н.Д., 2003; Федорова Н.В., 2001; Цыпин А.Б., 1995, 2000, 2004; Черных Е.Р., 2001; Шумаков В.И., 2000; Стяжкина С.Н., 1994; Marshall, J.C., 1999].

Регуляция уровней цитокинов как возможный механизм фармакологического действия иммуномодуляторов

Цитокины представляют собой биологически активные низкомолекулярные белковые регуляторные вещества с молекулярной массой от 12000 Да до 45000 Да, продуцируемые активированными клетками иммунной системы и способные модулировать функциональную активность клеток [Кадагидзе З.Г., 2003]. К цитокинам относятся интерфероны, колониестимулирующие факторы, интерлейкины, хемокины, трансформирующие ростовые факторы, группа фактора некроза опухолей и некоторые другие. К общим главным свойствам цитокинов, объединяющим их в самостоятельную систему регуляции, относятся: плейотропизм и взаимозаменяемость биологического действия, отсутствие антигенной специфичности, проведение сигнала путем взаимодействия со специфическими клеточными рецепторами. Действие цитокинов реализуется по сетевому принципу, то есть передаваемая клеткой информация содержится не в одном пептиде, а в наборе регуляторных цитокинов, что обеспечивает каскадный принцип действия [Фрейдлин И.С., 2001; Lee C.Y., 2001; Carson R., 1999; Das C. et al., 2001; Baggiolini M., 1997; Ihle J., 1995; Bendtzen K., 1994; Arai K., 1990; Balkwill F.R. et al., 1989; Grossber S.E., 1987].

Каждый из цитокинов выполняет несколько различных функций, имеющих как благоприятные, так и негативные последствия при заболеваниях [Бутенко Г.М., 1993; Лебедев К.А., 1990; Kovalchuk L.V., 1995; Gembo V.T., 1988; Nelson D.S., 1985]. Цитокины играют ключевую роль в развитии воспалительной реакции. Запуск этой реакции в значительной степени связан с включением продукции цитокинов макрофагами и другими локальными клеточными элементами. Дальнейшее развитие и самоподдержание локальной воспалительной реакции обуславливается вызванной цитокинами миграцией из крови лейкоцитов и продукцией цитокинов. Цитокины служат медиаторами всех трех основных типов тканевых процессов при воспалении – экссудации, альтерации и

пролиферации. Они участвуют также в развитии системных проявлений воспалительной реакции [Борщикова Т.И. и др., 2011; Геннаденик А.Г., 2006; Кадагидзе З.Г., 2003; Бельмер С.В. и др., 2003; Останин А.А. и др., 2002; Черешнев В.А., 2001; Ярилин А.А., 1997; Житбург Е.Б., 1996; Osman I., 2003; Saito S., 2000; Ben Baruch A., 1995].

Являясь продуктами клеток иммунной системы, цитокины, естественно, играют важную роль в ее функционировании. Цитокиновая регуляция играет огромное значение как в норме, так и при патологии [Бережная Н.М., 2007; Козлов В.А., 2002; Нестерова И.В., 1999; Kishimoto T., 2006; Gibbs B., 2005; Lee B., 1999].

Продукция цитокинов является составной частью клеточного ответа на инфекции, запуская каскад противоинфекционных иммунных реакций. Синтезируясь в очаге воспаления, цитокины воздействуют практически на все клетки, участвующие в развитии воспаления, включая гранулоциты, макрофаги, фибробласты, клетки эндотелия и эпителиев, Т- и В-лимфоциты. Цитокины осуществляют взаимосвязь между неспецифическими защитными реакциями и специфическим иммунитетом, действуя в обоих направлениях. Они оказывают влияние практически на все органы и системы, участвующие в регуляции гомеостаза. Осуществляют связь между иммунной, нервной, эндокринной, кроветворной и другими системами и служат для их вовлечения в организацию и регуляцию единой защитной реакции [Завгородняя Е.Г., 2008; Бережная Н.М., 2007; Симбирцев А.С., 2002, 2004; Василенко А.М. и др., 2000; Oppenheim J., 2000].

В клинической практике сведения о синтезе цитокинов могут играть важную диагностическую роль. Так, концентрация цитокинов в плазме периферической крови, то есть синтез цитокинов клетками организма *in vivo*, отражает состояние иммунной системы и развитие защитных реакций организма в данное время. Интенсивность продукции цитокинов (цитокиногенез) изолированными клетками при культивировании *in vitro* показывает их функциональное состояние. Спонтанная продукция цитокинов

в культуре иммунокомпетентных клеток свидетельствует о том, что клетки уже активированы *in vivo* в результате развития воспаления или иммунологических процессов. Индуцированная продукция цитокинов изолированными клетками позволяет оценить потенциальные возможности их активации, что очень важно для оценки иммунологической реактивности. Сниженная индуцированная продукция цитокинов *in vitro* может служить одним из признаков иммунодефицитного состояния. Поэтому и определение уровней цитокинов в крови и оценка их продукции лейкоцитами в условиях *in vitro* важны для анализа работы иммунной системы [Кетлинский С.А., 2008; Кадагидзе З.Г., 2003; Ляпенко А.А., 2001; Шичкин В.П., 1998; Fernandez B.R., 1996; Lord P., 1991].

Нарушения цитокинового статуса в клинической практике поддаются коррекции иммуномодулирующими препаратами [Зайцева Г.А. и др., 2011, Кашаева Л.Н., 2005]. При этом возможно использование препаратов, как содержащих собственные цитокины, так и способных регулировать цитокиногенез. Как уже было отмечено в настоящем обзоре целый ряд эндогенных иммуномодуляторов содержит цитокины (лейкинферон, суперлимф, беталейкин и др.), а многие из экзогенных и синтетических иммуномодуляторов обладают выраженной способностью регулировать цитокиногенез (пирогенал, ликолипид, галавит и др.).

В настоящее время предложены два пути создания цитокинсодержащих препаратов: производство рекомбинантных моноцитокинов с помощью технологий генной инженерии и получение природных цитокиновых комплексов на основе животного сырья. Рекомбинантные препараты дают возможность точного дозирования и защищены от риска зоонозных инфекций, однако они достаточно дороги, содержат только один цитокин, тогда как для регуляции функции иммунной системы необходим огромный комплекс этих биологически активных веществ. Таким образом, с точки зрения рациональной фармакоиммунокоррекции имеют преимущество препараты либо

содержащие природный сбалансированный комплекс цитокинов, либо иммуномодуляторы регулирующие эндогенный цитокиногенез. То есть, препараты, которые запускают каскад цитокиновых реакций в организме, таким образом, восстанавливая недостающие звенья в иммунном ответе [Авдеева Ж.И. и др., 2011; Преферанская Н.Г., 2008; Симбирцев А.С., 2002, 2004; Бельмер С.В., 2003; Lowenthal, J.W., 1999; Mantovani A, 1997; Gillis S.S., 1987].

Поскольку данные о содержании цитокинов в биологическом материале имеют важное значение, как для диагностики состояний иммунной системы, так и при разработке и оценке эффективности иммунокорректирующих препаратов, в настоящее время предложен целый ряд методов их качественного и количественного определения, ведущим из которых являются иммуноферментные методы [Демин В.А., 2006; Сенников С.В., 2005; Демьянов А.В., 2003; Ковальчук Л.В., 1995].

Дигидрокверцетин как возможная защита органопрепаратов от окислительных процессов

Одними из важнейших препятствий широкому внедрению и использованию органопрепаратов, и препаратов селезенки в частности, в медицинскую практику являются трудности в производстве, хранении и применении органопрепаратов, связанные с их нестойкостью при воздействии микробиологических, химических, физических факторов, в том числе окислительных процессов.

Процессы перекисного окисления в органопрепаратах могут привести к потере их биологической активности в ходе хранения. Одним из способов повышения срока годности и снижения воздействия перекисных процессов является применение безопасных и эффективных стабилизаторов-антиоксидантов, например, антиоксиданта растительного происхождения – дигидрокверцетина [Куликова А.И., 2008; Уминский А.А., 2007; Курашвили Л.В., 2003; Бабенкова И.В. и др., 2003; Gutteridge J.M., 2000].

Дигидрокверцетин – природный антиоксидант, биологически активное вещество, обладающее противовоспалительными, обезболивающими и другими свойствами. За счет высоких комплексообразующих свойств дигидрокверцетин связывает и выводит из организма тяжелые металлы, в том числе радионуклиды. Дигидрокверцетин обладает сосудорасширяющим, антиатеросклеротическим и гиполипидемическим, диуретическим свойствами, оказывает положительное влияние на функциональное состояние печени, способствует восстановлению дренажной функции бронхов, улучшает работу сердца, обладает капилляропротекторной и противоотечной активностью, активизирует процессы регенерации слизистой желудка, оказывает гепатопротекторное и радиопротекторное действия. Дигидрокверцетин проявляет иммуномодулирующие свойства: он повышает активацию Т-лимфоцитов путем стимулирования выработки интерферонов; активизирует макрофаги, при этом ограничивая агрессию кислородного взрыва свободных радикалов, что позволяет активно бороться с чужеродными агентами, не переходя на разрушение собственных тканей [Шаталин Ю.В., 2010; Каражаева М.И., 2004; Владимиров Ю.А., 2004; Теселкин Ю.О. и др., 1996; Меньшиков Е.Б., 1993; Drech M. T.K., 2009].

Он применяется в комплексном лечении авитаминоза, атеросклероза, сахарного диабета, бронхолегочных, сердечно-сосудистых и глазных заболеваний. Дигидрокверцетин входит в состав некоторых лекарственных препаратов, а также биологически активных добавок к пище (капилар, дигидрокверцетин Эвалар, флавитакс, реабилитар, флавит, капсулы окулист, ларикс, эльквертин, мелетин, лавитол, кверцетин и др.) [Плотников М.Б. и др., 2005].

Дигидрокверцетин также используется при производстве продуктов питания (молочной, мясной, вино-водочной продукции, кондитерских изделий, напитков) в качестве вспомогательного вещества. Его применение в пищевой промышленности регламентируется нормативными документами [Национальный Стандарт РФ ГОСТ Р 52791-2007]. Основная цель введения

дигидрокверцетина в продукты питания обусловлена его антиоксидантными свойствами. Со всеми продуктами получены безусловно положительные результаты по увеличению сроков хранения [Тюкавкина Н.А., 1993].

Таким образом, накоплен достаточно богатый опыт использования дигидрокверцетина в качестве стабилизатора-антиоксиданта пищевых продуктов, в частности животного происхождения. Однако в доступной нам литературе не удалось обнаружить сведений о его применении с этой целью в составе лекарственных препаратов и препаратов из животного сырья в частности. Учитывая высокие антиоксидантные свойства дигидрокверцетина, его безопасность и доступность представляется перспективным предложить его в качестве стабилизатора-антиоксиданта для лекарственных препаратов животного происхождения.

В своем обзоре мы сочли необходимым упомянуть еще об одной группе проблем, с которыми связано производство всех лекарственных препаратов животного происхождения. Это проблема сырьевой базы, поскольку она подвержена влиянию множества, порою слабопредсказуемых, факторов самого различного генеза.

Из экономических соображений и мощности сырьевой базы при разработке органопрепаратов в качестве сырья чаще всего используют свиней и крупный рогатый скот. В современной медицине широко используются биоматериалы свиньи в результате большего соответствия их размеров и строения человеческим органам и тканям, чем у других животных. Выявлена высокая степень гомологии белков и генов человека и свиньи [Чернов И.П. и др., 1989]. Показана идентичность действия ряда иммуностропных препаратов человека и свиньи на иммунологические параметры [Bhatnagar R. et al, 1986].

Вместе с тем, некоторые преимущества сырья свиного происхождения нивелируются возникшими проблемами сырьевой базы. Так, в последнее

время наблюдается тенденция к сокращению свиного поголовья в связи с эпизоотической обстановкой в нашей стране.

Несмотря на большое разнообразие сырья для производства органопрепаратов, существует ряд общих методов в их технологии. Сырьё для производства органопрепаратов: ткани, железы, органы – получают на бойнях от здоровых, нормально развитых животных (при строгом ветеринарно-санитарном надзоре). Животное сырьё чрезвычайно лабильно и быстро портится в связи с невысокой устойчивостью к действию микроорганизмов, ферментов, стимулирующих гидролитические и окислительные процессы, и другим факторам. Поэтому полученное после забоя животных сырьё быстро перерабатывают или немедленно консервируют, в основном замораживанием при температуре -30 — -40°C и относительной влажности 90-95% в течение года. Перспективным методом консервирования биоматериала, обеспечивающим сохранение биологически активных веществ, является сублимационная сушка [Иванова Л.А., 1991].

* * *

Таким образом, анализ доступной литературы показал перспективность создания препарата из селезенки свиней и крупного рогатого скота для коррекции иммунных процессов в организме человека. Актуальным также представляется использование природного антиоксиданта дигидрокверцетина в составе органопрепарата селезенки для его защиты от перекисных процессов.

ГЛАВА 2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были изучены фармакологические свойства нового комплекса биологически активных веществ, для парентерального применения, полученного из ткани селезенки свиней или крупного рогатого скота по оригинальной технологии, разработанной совместно с Анатолием Борисовичем Цыпиным и соавторами в ФГБУ «Федерального научного центра трансплантологии и искусственных органов имени академика В. И. Шумакова» Минздрава России.

Методом водной экстракции с последующей лиофильной сушкой было приготовлено 2 группы препаратов: из селезенки свиней и из селезенки крупного рогатого скота.

Каждая группа состояла из 2 препаратов: в одном из них был использован в качестве стабилизатора природный антиоксидант дигидрокверцетин.

Таким образом, было получено 2 новых органопрепарата:

1. **Спленактив** (предварительное рабочее название) – лиофилизированный комплекс гомогената ткани селезенки свиней или крупного рогатого скота и природного антиоксиданта дигидрокверцетина (производитель ЗАО «Научно-производственная фирма “Флавит”», Россия, г. Пущино);
2. **Проспленактив** (предварительное рабочее название) – лиофильно высушенное водное извлечение селезенки свиней или крупного рогатого скота, не содержащее дигидрокверцетин.

Использование в исследовании проспленактива связано с необходимостью выявления возможных особенностей фармакологической активности спленактива, вызванных наличием в его составе дигидрокверцетина.

Селезенка закупалась на мясокомбинатах (ОАО «Подольский мясокомбинат», ЗАО «Мясокомбинат Ступинский»). Сырье было получено от животных из экологически чистых районов, прошедших полный санитарно-ветеринарный контроль, включая контроль по прионным болезням. К сырью прилагалось удостоверение о качестве.

Поскольку нагревание препарата свыше 45°C приводит к его инаktivации, сразу после приготовления препараты подвергались радиационной стерилизации. Адекватность выбранного метода стерилизации была доказана нами ранее [Заико М.В., 2010].

Полученные препараты представляют собой лиофильно высушенный порошок светло-желтого цвета во флаконах объемом 10 мл. Один флакон спленактива содержит $0,176 \pm 0,01$ г сухого вещества. Содержание дигидрокверцетина в спленактиве составляет 28 мг на 1 г сухого вещества, что соответствует 4,8 мг в одном флаконе. Один флакон проспленактива содержит $0,172 \pm 0,01$ г сухого вещества. Органопрепараты хранили в течение 2 лет при температуре от 0°C до $+5^{\circ}\text{C}$ в сухом, защищенном от света месте.

При изучении иммуотропных свойств нового органопрепарата селезенки в качестве **препарата сравнения** был использован **СПЛЕНОПИД** [Цыпин А.Б., 2004]. Препарат для инъекционного применения относится к фармакотерапевтической группе иммуностимулирующих средств. Представляет собой порошок светло-желтого цвета, хорошо растворимый в воде. Спленопид содержит в своем составе пептиды селезенки – $16 \pm 1,6$ мг (по белку) и в качестве вспомогательных веществ гелофузин – $94 \pm 9,4$ мг и гентамицина сульфат – $0,35 \pm 0,035$ мг. Спленопид активизирует клеточный и гуморальный иммунитет, обеспечивая повышение специфической и неспецифической резистентности организма. Показан при гнойно-септических осложнениях в послеоперационном периоде (в комплексной терапии).

Перед применением препарат растворяют в 3-5 мл 0,5% раствора новокаина или 0,9% раствора хлорида натрия в течение 10 минут, периодически осторожно перемешивая, не допуская сильного вспенивания. Препарат вводят внутримышечно или подкожно один раз в сутки в утренние часы. Рекомендуемая разовая доза – 230–280 мг. Длительность курса терапии – 7-12 дней. При необходимости курс может быть продлен до 20-30 дней или повторен через 1-2 недели после окончания предыдущего курса. Хранить препарат следует в сухом, защищенном от света месте при температуре от +5 до –15°C не более 2 лет со дня изготовления. Нагревание спленопада выше 45°C приводит к его инаktivации.

Лекарственный препарат спленопид был разработан в ФГУ ФНЦТИО имени академика В. И. Шумакова. Зарегистрирован МЗ РФ, номер регистрационного удостоверения 001938/01-2002. Фармакопейная статья предприятия 42 – 0032004200. Патент РФ № 2012118016/15, 03.05.2012. Патент 2491944, 10.09.13. Патент 2152219, 27.04.2005. На данный момент срок регистрации препарата истек и по ряду экономических и организационных причин регистрация не была продлена. В работе использовались две серии препарата спленопид, изготовленные и стандартизованные по всем требованиям и правилам нормативно-технической документации специально для данного исследования: серия № 14112010, изготовлена 11.2010, срок годности до 11.2012; серия № 15102012, изготовлена 10.2012, срок годности до 10.2014.

Следует заметить, что несмотря на заметную разницу в массе содержимого одного флакона всех исследуемых препаратов (176 мг – спленактива, 172 мг – проспленактива и 230 мг – спленопада), их однократные дозы – содержимое одного флакона – являются изoэквивалентными в пересчете на сырье (ткань селезенки животных). Разница обусловлена наличием или отсутствием вспомогательных веществ, а также особенностью технологии.

Для проведения исследований препараты растворяли в 5 мл дистиллированной воды, либо физиологическом растворе хлорида натрия, то есть так, как планируется его подготавливать к введению в клинической практике. Таким образом, испытанные в экспериментах дозы (концентрации) рассчитывали исходя из того, что в 1 мл используемого раствора содержится 35,2 мг спленактива, 34,4 мг просплентактива и 46 мг спленопида.

Поскольку, как отмечалось выше, разовые дозы (содержимое одного флакона) всех трех препаратов изоэквивалентны в пересчете на животное сырье, из которого они изготовлены, то и концентрации указанных исходных растворов этих препаратов также изоэквивалентны в пересчете на сырье селезенки.

Исследования были проведены в лаборатории биологически активных соединений Первого МГМУ имени И.М. Сеченова, в лаборатории иммунодиагностики и иммунокоррекции ФГБУ «Федерального научного центра трансплантологии и искусственных органов имени академика В. И. Шумакова» Минздрава России, НИИ фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований, отделе медицинской биофизики Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова.

В экспериментах *in vitro* было задействовано 127 образцов донорской крови, из них 65 (60,7%) от доноров мужчин и 42 (39,3%) от доноров женщин. Средний возраст доноров составил $31 \pm 1,2$ года.

Выписка из протокола № 02-14 заседания Локального Комитета по этике от 19.02.2014 о рассмотрении соответствия исследований в рамках данной работы имеется.

Исследования *in vivo* были проведены на 165 белых нелинейных мышцах-самцах массой 22-23 г и 32 морских свинках, самках и самцах, массой 250-300 г. Подопытные и контрольные группы животных были одного возраста, массы, одного питомника и содержались в одинаковых условиях. Подопытных животных содержали в условиях вивария Первого московского

государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова с естественным режимом освещения; при температуре 18–22°C; относительной влажности воздуха 45-60% с использованием стандартной диеты (ГОСТ Р 9.804-2006 и РД-АПК 3.10.07.02-09). Исследования проводили в соответствии с правилами качественной лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», приказ МЗиСР РФ №708н от 23.08.2010 «Об утверждении Правил лабораторной практики»), согласно руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (ред. Р.У. Хабриев, 2005) и руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств (под ред. А.Н. Миронова и соавт., 2012), а также правилами и Международными рекомендациями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях от 18 марта 1986 года (текст изменен в соответствии с положениями Протокола ETS № 170 от 2 декабря 2005 года). Перед постановкой эксперимента животные проходили карантин в течение 14 дней. Все исследования *in vivo* были проведены в осенне-зимние периоды года.

При оценки влияния изучаемого препарата селезенки на оксидативную активность изолированных гранулацитарно-макрофагальных клеток крови в качестве препаратов сравнения были использованы наиболее часто используемых в настоящее время иммуномодуляторы, а именно ликопад («Пептек», Москва); циклоферон («Полисан», Санкт-Петербург); интерферон $\alpha 2$ (ООО «Ферон», Москва); полиоксидоний (ООО «Иммофарма», Москва). Изучение влияния спленактива на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками донорской крови проводили параллельно с препаратом сравнения – пирогеналом (производство филиала «Медгамал» ГУНИИЭМ имени Н. Ф. Гамалеи МЗСР России). Все препараты закупали в аптеках города Москвы.

2.1. Методы изучения химического состава препаратов из селезенки свиней и крупного рогатого скота

Исследования проводились на сериях препаратов из разного вида сырья:

1. спленактив, полученный из селезенки свиней и селезенки крупного рогатого скота;
2. проспленактив, полученный из селезенки свиней и селезенки крупного рогатого скота.

Содержание общего белка в препаратах селезенки определяли **методом BCA (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, "Sigma", США)** [Smith P.K., 1985]. Натриевая соль бицинхониновой кислоты является стабильным водорастворимым соединением, способным развивать интенсивную фиолетовую окраску при образовании в растворе комплекса с ионом меди (Cu^{2+}) в щелочной среде (анализ основан на биуретовой реакции).

Для этого спленактив и проспленактив разводили дистиллированной водой до 10 мл. Раствор бицинхониновой кислоты и раствор CuSO_4 перемешивали 5 минут в соотношении 50:1 непосредственно перед добавлением к пробам [Smith P.K., 1985]. Для построения калибровочной кривой использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США) с концентрацией 20 мг/мл, раститрованный в соотношении 1:2 (конечный объем 50 мкл). В качестве бланка использовали дистиллированную воду равного объема (50 мкл). В 96-луночном планшете («Corning», США) к 50 мкл растворов белков в дистиллированной воде и бланка добавляли по 200 мкл реактива и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Оптическую плотность измеряли на планшетном спектрофотометре (Labsystem, Финляндия) при длине волны 540 нм. Концентрацию белка в растворах препаратов определяли по калибровочной кривой и пересчитывали на содержание в одном флаконе.

Исследуемые препараты также анализировали **методом капиллярного электрофореза** на автоматическом анализаторе биополимеров и клеток

Agilent 2100 Bioanalyzer по методике фирмы Agilent [Agilent High Sensitivity Protein 250 Kit Guide].

Приготовление образцов:

Смешивали 4 мкл белка и 2 мкл денатурирующего раствора (3% дитиотреитол в буфере Sample buffer, приготовленном по инструкции к прибору) в полипропиленовой пробирке с крышкой объемом 0,2 мл. Полученный раствор образца и 6 мл маркера Protein 80 Ladder термостатировали при 95°C в течение 5 минут, после чего охлаждали до комнатной температуры. Добавляли в каждую пробирку по 84 мкл дистиллированной воды и перемешивали в течение 5 минут. Затем центрифугировали в течение 15 минут.

Раствор образца в объеме 6 мкл вносили в ячейку чипа прибора. Аналогично поступали с раствором маркера Protein 80 Ladder. Капилляр по инструкции заполняли раствором Desting Solution. Не использованные ячейки заполняли 6 мкл раствора маркера Protein 80 Ladder и дистиллированной водой в соотношении 5:1. Проводили анализ.

Данный набор был предназначен только для определения молекулярной массы белков размером 5-80 кДа. В работе использовался специфический маркер Protein 80 Ladder.

В препаратах спленактив и проспленактив **методом иммуноферментного анализа** было идентифицировано и определено относительное количественное содержание ряда биологически активных веществ – цитокинов, а именно: регуляторных (IFN- γ , IL-4), провоспалительных (IL-1 β , TNF- α) и противовоспалительных (IL-10, IL-1RA) и пересчитаны эти данные на содержание в одном флаконе (разовая доза). Одновременно с помощью этого метода анализировали препарат сравнения – спленопид. Исследование было проведено согласно ранее использованной методике определения содержания цитокинов в препарате спленопид [Патент 2491944, 2013].

Полученные данные могут быть использованы для сравнения относительного содержания цитокинов в препаратах спленактив, проспленактив, спленопид и не могут быть использованы для оценки их абсолютного количества.

Анализ проводили методом «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией производителя [Патент 2491944, 2013; Белова О.В., 2007, Инструкция по применению наборов реагентов для иммуноферментного определения концентрации IL-1 β ; Инструкция ... TNF- α ; Инструкция ... IL-6; Инструкция ... IL-1RA; Инструкция ... IL-10; Инструкция ... IFN- γ ; Инструкция ... IL-4; Инструкция ... G-CSF; 2012].

Принцип метода:

Метод иммуноферментного анализа основан на использовании «сэндвич»-варианта, для реализации которого применялись два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к конкретному цитокину (исследуемому). Одно из них иммобилизовано на твердой фазе, второе конъюгировано с пероксидазой. На первой стадии анализа цитокин, содержащийся в калибровочных и исследуемых пробах, связывался с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок микропланшета. На второй стадии анализа иммобилизованный цитокин взаимодействовал с конъюгатом вторых антител – пероксидазой. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству цитокина в исследуемом образце. Во время инкубации с субстратной смесью происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся меченных антител. После измерения оптической плотности раствора в лунках спектрофотометрическим методом с длиной волны 450 нм на основании калибровочной кривой рассчитывалась концентрация цитокина в определяемых образцах, выражаемая в пг/мл.

Оборудование: планшет для иммуноферментных реакций (плоскодонный), непрозрачный, поперечнострипованный 96 лунок (8 стрипов по 12 лунок) (ЗАО

«БиоХимМак», Россия), полуавтоматические одноканальные пипетки с изменяемым объемом отбора жидкостей (Socorex, Швейцария), прибор для встряхивания рамки со стрипами – орбитальный термошейкер (ELMIST-3, Латвия), центрифуга (MPW-223e, Польша), микропланшетный анализатор иммуноферментных реакций «Униплан» (ЗАО «Пикон», Россия).

Растворы и реагенты: раствор тетраметилбензидина («ТМБ»), 10% кислота, субстратный буфер, концентрированный раствор конъюгата согласно протоколу.

Постановка реакции: лиофилизированные препараты спленактив и проспленактив растворяли в 5 мл дистиллированной воды и центрифугировали в течение 15 минут (1500-2000 об/мин) при комнатной температуре. Надосадочную жидкость повторно центрифугировали и использовали ее в качестве образцов для определения спектра и концентраций регуляторных, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов микропланшетным методом спектрофотометрически.

2.2. Методы изучения иммуотропных свойств препаратов селезенки в модельных системах *in vitro*

В ходе изучения биологической активности исследуемых препаратов спленактив и проспленактив в модельных системах *in vitro*, оценивали их влияние: на функциональное состояние гранулоцитарно-макрофагальных клеток (ГМК) фагоцитарной системы, играющей одну из ведущих ролей в развитии инфекционно-воспалительных реакций, а также на способность изолированных иммунокомпетентных клеток крови продуцировать ряд цитокинов (цитокиногенез).

Исследование влияния препаратов селезенки на активность фагоцитов включало изучение их воздействия на: поглотительную функцию гранулоцитарно-макрофагальных клеток, кислородзависимую активность гранулоцитарно-макрофагальных клеток (спонтанную и индуцированную

продукцию кислородных радикалов) и кислороднезависимую активность гранулацитарно-макрофагальных клеток (спонтанную и индуцированную активность ферментов миелопероксидазы, кислот фосфатазы и др.), отражающих запас бактерицидности и выявление повышенной чувствительности к инфекционным агентам.

Подготовка суспензии клеток донорской крови для проведения исследований в модельных системах *in vitro*

Кровь для исследования забирали у донора из вены в первой половине дня, натощак. В качестве антикоагулянта использовали гепарин, из расчета 10 единиц гепарина на 1 мл крови. Гепаринизированную кровь смешивали с 1% желатином в равных объемах и инкубировали 30 минут при 37°C. Затем 3 раза отмывали фосфатным буфером путем центрифугирования в течение 10 минут. После чего осадок суспендировали в 1 мл фосфатного буфера. Концентрацию клеток определяли путем разведения 50 мкл суспензии (крови) в 450 мкл 3%-ной уксусной кислоты и последующим подсчетом в камере Горяева. Счет проводили в 16 малых квадратах, делили на 10 и полученный результат выражали в млн/мл. Концентрацию клеточной суспензии доводили до 1-2 млн/мл.

Для постановки комплекса отобранных для исследования методов необходимо 8-9 мл клеточной суспензии. Проводилась оценка процента живых и мертвых гранулацитарно-макрофагальных клеток в полученной суспензии. С этой целью суспензию подкрашивали 0,1% раствором трипанового синего и подсчитывали в камере Горяева 100 клеток, среди них отдельно число мертвых (окрашенных) и живых (неокрашенных) клеток, число которых выражали в процентах (%) [Канюков В.Н. и др., 2013]. Для постановки экспериментов использовали только популяции клеток, жизнеспособность которых превышала 95%.

2.2.1. Оценка влияния препаратов селезенки на поглотительную активность гранулоцитарно-макрофагальных клеток

Основная функция гранулоцитарно-макрофагальных клеток — обеспечение защиты организма против инфекционных агентов. Они первые мобилизуются в очаг воспаления, именно от их фагоцитарной активности во многом зависит эффективность противомикробного потенциала. Нейтрофилы воспринимают многочисленные сигналы о нарушении внутренней среды организма и внедрения инфекционных агентов, которые активируют их фагоцитарную функцию и развитие защитных воспалительных реакций. Основными такими реакциями является способность гранулоцитарно-макрофагальных клеток к фагоцитозу разных объектов, в первую очередь инфекционных агентов, а также внутриклеточную генерацию активных форм кислорода (АФК), опосредующую бактерицидные свойства гранулоцитарно-макрофагальных клеток [Нестерова И.В. и др., 1999; 2008; Долгушин И.И., 2001; Wright H.L., 2010].

Объектом исследования явились нейтрофилы периферической крови 34 здоровых доноров. Образцы венозной крови были использованы для оценки функциональной активности фагоцитарного звена иммунитета в соответствии со стандартными методами.

В качестве общепринятого стимулятора фагоцитоза использовали музейный штамм *Staphylococcus Aureus*, опсонизированный пуловой сывороткой от 10 доноров, что повышает взаимодействие микробов с рецепторами лейкоцитов FcγR и CD11b/18 – рецепторами адгезии на клетках эндотелия сосудов и одновременно отражает функциональное состояние этих рецепторов.

Оборудование: круглодонные пробирки, термостат (ТС-1/80, Россия), микроскоп (OlympusCH-40, Япония), предметные стекла, автоматические дозаторы (Socorex, Швейцария).

Растворы и реактивы:

Фиксатор. 1 часть краски Романовского-Гимза и 3 части этилового спирта 96%.

Краска. 10 мл краски Романовского-Гимза и 100 мл дистиллированной воды.

Растворы препаратов спленактив, проспленактив и спленопид.

Постановка реакции.

Контрольные пробы:

В пробирку добавляли 150 мкл гепаринизированной крови + 50 мкл *Staphylococcus Aureus* + 20 мкл или 100 мкл фосфатного буфера. Затем встряхивали и помещали в термостат на 30 минут при температуре 37°C.

Опытные пробы:

В пробирку добавляли 150 мкл гепаринизированной крови + 50 мкл *Staphylococcus Aureus* + раствор исследуемого препарата в различных концентрациях. Затем встряхивали и помещали в термостат на 30 минут при температуре 37°C.

После инкубации пробы наносили на предметное стекло, равномерно распределяли по всей поверхности, высушивали, фиксировали этанолом и окрашивали по Романовскому-Гимза.

Мазки оценивались с помощью микроскопа при 900-кратном увеличении с использованием иммерсионного масла. Подсчитывали процент фагоцитирующих нейтрофилов – процент фагоцитоза (ПФ). Поглотительную способность фагоцитов оценивали по фагоцитарному числу (ФЧ) — среднему числу микробов, поглощенных одним активным нейтрофилом.

2.2.2. Оценка влияния препарата спленактив на бактерицидную активность гранулоцитарно-макрофагальных клеток

В модельной системе *in vitro* была оценена способность препарата спленактив влиять на кислородзависимую и кислороднезависимую

бактерицидную активность нейтрофилов. В обоих исследованиях была использована взвесь изолированных лейкоцитов донорской крови.

**Определение общей окислительно-восстановительной
активности гранулоцитарно-макрофагальных клеток в тесте
восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест)**

Исследование внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов осуществлялось при помощи НСТ-теста.

Для эксперимента был использован 51 образец периферической крови здоровых доноров.

Принцип метода:

Метод основан на восстановлении поглощенного фагоцитом растворимого красителя нитросинего тетразолия в нерастворимый диформаза́н под влиянием супероксид-аниона, образующегося в НАДФН-оксидазной реакции. Этот процесс происходит в результате резкого усиления окислительного метаболизма в активированных фагоцитах (так называемый «метаболический взрыв»), следствием чего является образование целого ряда первичных (супероксидный анион, перекись водорода, гидроксильный радикал, синглетный кислород) и вторичных (гипохлорная кислота, хлорамин, продукты перекисного окисления липидов) метаболитов, обладающих мощной бактерицидной активностью. При этом темные гранулы диформаза́на выпадают внутри нейтрофилов и на их цитоплазматической мембране. Нарушение способности нейтрофилов к восстановлению нитросинего тетразолия отражает дефекты кислородзависимых механизмов бактерицидности и может служить прогностическим критерием инфекционных осложнений.

В НСТ-тесте, в отличие от большинства цитохимических реакций, исследуют живые клетки, которые фиксируют лишь после инкубации с гистохимическим индикатором респираторного взрыва – нитросиним тетразолием. Это выполняется без дополнительной стимуляции (спонтанный

НСТ-тест) или при стимуляции нейтрофилов *in vitro* (индуцированный или стимулированный НСТ-тест). Спонтанный НСТ-тест отражает степень функциональной активации клеток *in vivo*, индуцированный – функциональный резерв клетки и позволяет судить о дефектах бактерицидной системы фагоцитов.

Оборудование: микропланшетный анализатор иммуноферментных реакций (спектрофотометр) «Униплан» (ЗАО «Пикон», Россия), плоскодонные иммунологические 96-луночные планшеты (БиоХимМак, Россия), термостат (ТС-1/80, Россия), центрифуга (MPW-223e, Польша), автоматические дозаторы (Socorex, Швейцария), центрифужный пробирки.

Растворы и реактивы: 0,1% раствор нитросинего тетразолия, музейный штамм *Staphylococcus Aureus*, растворы препаратов спленактив и спленопид.

Постановка реакции:

в коническую пробирку добавляли:

1. 20 мкл лейкоцитарной взвеси и 20 мкл фосфатного буфера — спонтанный контроль;
2. 20 мкл лейкоцитарной взвеси и 20 мкл *Staphylococcus aureus* — индуцированный контроль;
3. 20 мкл лейкоцитарной взвеси и 20 мкл *Staphylococcus aureus* + или 10 мкл, или 20 мкл, или 100 мкл раствора исследуемых препаратов — индуцированный опыт.

Затем в каждую пробирку вносили по 20 мкл 0,1% раствора нитросинего тетразолия. Перемешивали. Содержимое пробирок инкубировали в течение 30 минут при 37° С. Наблюдалось окрашивание радикалов краской. Далее с помощью фосфатного буфера трижды отмывали от раствора нитросинего тетразолия. Затем к осадку клеток добавляли по 100 мкл 0,2N NaOH. Инкубировали в течение 15 минут в термостате при 37°С в атмосфере 5% CO₂ и абсолютной влажности. В контрольную лунку

добавляли 100 мкл фосфатного буфера. В опытные — по 100 мкл диметилсульфоксида.

Учет результатов проводился на спектрофотометре при длине волны 650 нм. Результаты выражались в условных единицах. Вычисляли индекс стимуляции (ИС).

$$\text{ИС} = \frac{\text{интенсивность НСТ стимулированного (у.е.)}}{\text{интенсивность НСТ спонтанного (у.е.)}}$$

У здорового человека норма при спонтанном НСТ-тесте составляет 80-99 у.е., при индуцированном — 130-254 у.е.

Стимулированный НСТ-тест является информативным методом оценки резистентности при изучении иммунного статуса организма, поскольку он характеризует резервы бактериальной функции гранулацитарно-макрофагальных клеток.

Определение кислороднезависимой активности гранулацитарно-макрофагальных клеток методом люминолзависимой хемилюминесценции

Оценку хемилюминесценции проводили при помощи хемилюминометра Lусу 2 и компьютерных программ в соответствии с инструкцией производителя микропланшетным методом [Друх В.М. и др., 2004; Кондрашова Е.А. и др., 1999; Фархутдинов Р.Р., 1995]. При изучении влияния различных концентраций препаратов селезенки на активность миелопероксидазной системы (МПО) и кислоронезависимой продукции катионных белков, лизоцима, хлор радикалов и других, отражающих бактерицидность гранулацитарно-макрофагальных клеток, растворы препаратов добавлялись в интактную суспензию (10^6 клеток/мл, микропланшетный вариант) в качестве активатора в объемах 20 мкл и 50 мкл. Активирующий эффект изученных препаратов сравнивали с интенсивностью спонтанной хемилюминесценции гранулацитарно-макрофагальных клеток без добавления активатора системы (контроль). В

качестве усилителя свечения использовали люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазин, Sigma, США) в конечной концентрации 24,5 мкМ ($V=100$ мкл). Аналогичным образом сравнивалось влияние препаратов селезенки на суммарную кислороднезависимую активность грануляцитарно-макрофагальных клеток с эффективностью общепринятых иммуномодуляторов. В качестве иммуномодуляторов основных классов использовали: ликолипид («Пептек», Москва); интерферон $\alpha 2$ (ООО «Ферон», Москва); циклоферон («Полисан», Санкт-Петербург); полиоксидоний (ООО «Иммофарма», Москва).

Исследование проведено на образцах венозной крови 11 доноров.

Оборудование: хемилюминометр Lysu 2 (ANTHOS, Австрия), иммунологические 96-луночные планшеты (БиоХимМак, Россия).

Растворы и реактивы: люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазин, Sigma, США), зимозан, растворы препаратов спленактив и проспенактив, ликолипид, интерферон $\alpha 2$, циклоферон, полиоксидоний.

Постановка метода:

Стрип из 10 лунок: в каждую лунку добавляли по 50 мкл лейкоцитарной суспензии.

Затем в 1-ую лунку, контрольную, добавляли 20 мкл фосфатного буфера – спонтанная хемилюминесценция.

2-ая лунка – индуцированная хемилюминесценция, активированная 20 мкл опсонированным зимозаном.

3-10 лунок – опытные, в которые добавляли по 20 мкл или 50 мкл растворов исследуемых препаратов.

Далее стрип (1-10 лунок) ставился на 30 минут в термостат при 37°C. Затем добавляли во все лунки по 20 мкл люминола. Измерения проводили на хемилюминометре.

За 10 минут до измерения хемилюминометр прогревался, так как измерение должно проводиться при 37°C.

Интенсивность хемилюминесценции (мВольт) оценивали по максимальной амплитуде сигнала $t = 10$ секунд (1 сигнал каждую секунду) от момента ($t = 0$) добавления препарата и выражали в виде индекса стимуляции (ИС). Индекс стимуляции (ИС) равен отношению культуры взвеси, индуцированной различными концентрациями препаратов на спонтанную культуру лейкоцитарной взвеси без индуктора:

$$\text{ИС} = \frac{\text{уровень ЛЗХЛ препаратами}}{\text{уровень спонтанной, исходной ЛЗХЛ без препаратов}}$$

Величина ИС служила для оценки эффекта препаратов в испытанной концентрации:

при $\text{ИС} > 1,1$ – наблюдалась активация процесса,

$\text{ИС} < 1,0$ – супрессия,

$\text{ИС} = 1,0$ – отсутствие эффекта.

2.2.3. Метод оценки влияния препарата спленактив на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками

Гранулацитарно-макрофагальные клетки помимо способности действовать в качестве клеток-эффекторов и продуцировать цитотоксические молекулы, одновременно функционируют как регуляторные клетки. Они могут синтезировать широкий спектр различных цитокинов — молекул межклеточных взаимодействий [Швыдченко И.Н. и др., 2005].

Изучение влияния препарата спленактив на цитокиногенез было оценено в экспериментах *in vitro* с иммунокомпетентными клетками донорской крови. В ходе опыта фиксировалось количество цитокинов (IL-10, IL-1 β , IL-1RA, TNF- α , IFN- γ), синтезированных при инкубации нейтрофилов в присутствии спленактива и без него.

Для исследования были использованы 12 образцов периферической крови. Клеточную взвесь инкубировали с растворами препарата спленактив в концентрациях 0,7 мг/мл, 3,2 мг/мл и 5,9 мг/мл, после чего определяли

концентрации цитокинов методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Действие спленактива в качестве индуктора продукции цитокинов сравнивали со стандартным индуктором — липополисахаридом **пирогенал** в концентрации 1 мкг/мл (производство филиала «Медгамал» ГУНИИЭМ имени Н. Ф. Гамалеи МЗСР России).

Пирогенал представляет собой бактериальный липополисахарид, получаемый из микробной массы грамотрицательной культуры синегнойной и брюшнотифозной палочек — микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa* 273 и *Eberthellatyphosa* в «S» форме, образующийся в процессе их жизнедеятельности. Обладает широким неспецифическим стимулирующим действием на организм, не вызывая аллергических реакций.

Оборудование: планшет для иммуноферментных реакций (плоскодонный), непрозрачный, поперечнострипованный 96 лунок (8 стрипов по 12 лунок) (ЗАО «БиоХимМак», Россия), полуавтоматические одноканальные пипетки с изменяемым объемом отбора жидкостей (Socorex, Швейцария), прибор для встряхивания рамки со стрипами – орбитальный термошейкер (ELMIST-3, Латвия), центрифуга (MPW-223e, Польша), микропланшетный анализатор иммуноферментных реакций (спектрофотометр) «Униплан» (ЗАО «Пикон», Россия).

Растворы и реагенты: раствор тетраметилбензидина («ТМБ»), 10% кислота, субстратный буфер, концентрированный раствор конъюгата согласно протоколу, раствор препарата спленактив, пирогенал.

Постановка метода:

1. Отобранные 0,6 мл крови, помещали в пробирку с гепарином (2МЕ/мл), тщательно перемешивали и разводили в 2,4 мл культуральной среды RPMI 1640 («Sigma», США) с добавлением 2 мМ L-глутамин («Sigma», США) и 80 мкг/мл гентамицина – контрольный вариант опыта.

2. К контрольному варианту добавляли препарат спленактив в соответствующих концентрациях (конечные концентрации 0,7 мг/мл, 3,2 мг/мл и 5,9 мг/мл) – опытный вариант.
3. Далее все образцы культивировали в термостате при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и абсолютной влажности в течение 18 часов после чего отбирали надосадочные жидкости культур в эппендорфы, маркировали и хранили при температуре -20°C.

Определение концентраций цитокинов в супернатантах проводили стандартным твердофазным иммуноферментным методом (ИФА) с использованием тест-систем производства ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург) в соответствии с прилагающимися инструкциями производителя.

Иммуноферментные диагностические тест-системы позволяют проводить количественный анализ содержания цитокинов с высокой чувствительностью в любых биологических системах (в сыворотке и плазме крови, в цитоплазме клеток, в супернатантах клеточных культур при оценке спонтанной и индуцированной их продукции) [Сенников С.В. и др., 2005].

Для исследования концентраций цитокинов применялись луночные планшеты с фиксированными антителами. Перед началом исследования планшеты промывались специальным раствором. Затем в лунки добавлялись образцы и стандартный растворитель по рекомендуемой производителем схеме, далее в течение 2 часов осуществлялась инкубация содержимого лунок с антителами специфическими к исследуемому цитокину. После последующего промывания планшетов в них добавлялся конъюгат с дальнейшей инкубацией в течение 1 часа, после чего луночные планшеты также промывались. Далее осуществлялась 10-минутная инкубация содержимого лунок с раствором субстрата (тетраметилбензидина), в результате чего происходило окрашивание, степень окраски интенсивности которого свидетельствовала об уровне исследуемых цитокинов в плазме крови. Результаты иммуноферментного метода анализировали на планшетном фотометре «Пикон» (Россия). Результаты реакции учитывали на

ридере при длине волны 450 нм. Концентрацию цитокинов выражали числом пикограммов на 1 мл (пг/мл). Контрольную группу составили 11 доноров возраста 25-36 лет.

2.3. Изучение влияния препарата спленактив на неспецифическую резистентность к бактериальной инфекции на модели экспериментального сепсиса у мышей

С целью выявления способности повышать неспецифическую резистентность организма к бактериальной инфекции было изучено влияние препарата на выживаемость мышей при введении им однодневной живой культуры *Staphylococcus aureus* [Макаров А.А., 1990].

Влияние препарата из ткани селезенки крупного рогатого скота на септический процесс изучали в эксперименте на 105 белых беспородных мышцах-самцах, массой 22-23 г в возрасте 2х месяцев. Все животные были одного возраста, массы, происхождения и содержались в одинаковых условиях. Животные случайным образом были разделены на 3 группы (контрольная, подопытная и группа сравнения) по 35 животных в каждой.

Экспериментальный сепсис вызывали внутрибрюшинным введением животным однодневной живой культуры *Staphylococcus Aureus*, штамм «Wood-46» в дозе 0,2 мл с концентрацией 1 млрд клеток в 1 мл [Миронов А.Н., 2012] Сепсис развивался на 3 сутки с 50% гибелью животных.

Контрольной группе на 3, 4, 5 сутки после заражения внутрибрюшинно вводили по 0,2 мл физиологического раствора. Подопытной на 3, 4, 5 сутки после заражения внутрибрюшинно вводили по 0,2 мл раствора препарата спленактив, что соответствует дозе 32,7 мг/кг (доза пересчитана исходя из предполагаемой для человека по правилу дозопереноса) [Гуськова Т.А., 2013]. Группе сравнения на 3, 4, 5 сутки после заражения внутрибрюшинно вводили по 0,2 мл раствора спленопида (препарат сравнения), что соответствует дозе 42,7 мг/кг. Дозы спленактива и спленопида были изоэквивалентны в

пересчете на сырье. Эффект оценивали по количеству выживших мышей в течение 30 суток.

2.4. Изучение антиоксидантных свойств дигидрохверцетина в составе препарата спленактив

В эксперименте были испытаны, как спленактив, так и проспеленактив (по 20 образцов каждого препарата). Антиоксидантную активность органолептических препаратов и содержание в них малонового диальдегида – водорастворимого продукта пероксидного окисления липидов – определяли непосредственно после их приготовления (10 образцов), а также по окончании периода хранения (10 образцов), предварительно растворяя их в изотоническом растворе хлорида натрия до концентрации 35,2 мг/мл препарата спеленактив и 34,4 мг/мл препарата проспеленактив. Концентрация рассчитана исходя из предполагаемой однократной дозы при инъекционном введении человеку.

Оборудование: хемиллюминометр ХЛМ-3 (ОАО «Бикап», Москва), магнитная мешалка, полуавтоматические одноканальные пипетки с изменяемым объемом отбора жидкостей (Socorex, Швейцария), спектрофотометр (СФ-46 ЛОМО), центрифуга (MPW-223e, Польша), центрифужные пробирки.

Растворы и реактивы: АБАП (2,2'-азобис(2-амидинопропан), люминол, трис-НСL, тролокс, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), натрия хлорид, калия хлорид, 17% раствор 3-хлоруксусной кислоты, 0,8% водный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты.

Постановка методов:

Для измерения антиоксидантной активности препаратов спеленактив и проспеленактив использовали модельную систему, в которой окисление люминола индуцировали водорастворимыми пероксильными радикалами, образующимися при термическом разложении 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида (АБАП). Непосредственно перед экспериментом препараты

растворяли в изотоническом растворе хлорида натрия. Реакционная среда имела следующий состав: 50 мкМ люминола, 1 мМ АБАП в 0,1 М Трис-НСl буфере, содержащем 0,1 М КСl и 1 мМ ЭДТА, рН 8,0. Исследуемые образцы препаратов спленактив и проспленактив, а также тролокс, который использовали в качестве антиоксиданта сравнения, добавляли в реакционную среду после достижения стационарного уровня кинетики хемилюминесценции – примерно через 15 мин после инициирования окисления люминола с помощью АБАП. За процессом окисления люминола наблюдали с помощью регистрации его хемилюминесценции (ХЛ) в процессе реакции. При этом фиксировали продолжительность латентного периода ХЛ люминола. Зависимость продолжительности латентного периода от концентрации испытываемого вещества в кювете носит линейный характер. График этой зависимости сравнивается с графиком зависимости хемилюминесценции от концентрации стандартного антиоксиданта — тролокса. Тангенсы угла наклона прямых графиков этих зависимостей используются для расчета антиоксидантной активности (АОА) вещества, которая выражается в мкмоль тролокса на 1 г сухого вещества – «тролоксый эквивалент» [Чехани Н.Р. и др., 2012].

$$АОА = \frac{\text{tg } \alpha (\text{препарат})}{\text{tg } \alpha (\text{тролокс})}$$

где $\text{tg } \alpha$ (препарат) – тангенс угла наклона прямой препарата;

$\text{tg } \alpha$ (тролокс) – тангенс угла наклона прямой тролокса.

Измерение хемилюминесценции люминола проводили при постоянном перемешивании и температуре +37°C.

Об интенсивности реакций перекисного окисления липидов в препаратах спленактив и проспленактив судили по содержанию в них малонового диальдегида, которое определяли спектрофотометрически по реакции с тиобарбитуровой кислотой [Рогожин В.В. и др., 2004; Стальная И.Д. и др., 1977] и представляли в виде нмоль малонового диальдегида на 1 г сухого вещества. Препараты растворяли в буферном растворе, после чего

осаждали белок добавлением 17%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и центрифугировали в течение 10 минут. Надосадочную жидкость переносили в пробирки, добавляли 0,8% раствор 2-тиобарбитуровой кислоты и помещали пробы на 10 минут в кипящую водяную баню. В качестве контроля использовали пробы, содержащие вместо надосадочной жидкости буфер (рН =7,4). После развития розовой окраски пробы охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность при длине волны 532 нм.

2.5. Методика определения острой токсичности препаратов спленактив и проспленактив

Исследования проведены в соответствии с современными требованиями Минздрава России к изучению безопасности новых лекарственных препаратов [Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – М. 2012].

Определение острой токсичности препаратов спленактив и проспленактив осуществляли на 60 белых нелинейных мышах-самцах массой 22-23 г. Животные были разделены случайным образом на 3 группы по 20 особей (препарат спленактив, препарат проспленактив, контроль). Лиофилизированные препараты непосредственно перед экспериментом растворяли в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия для инъекций до необходимой концентрации. Препараты вводили внутримышечно мышам объемом до 0,5 мл. Параллельно группе контроля вводили 0,9% раствор натрия хлорида в аналогичном объеме. Общая продолжительность наблюдения за животными при определении острой токсичности составляла 14 суток.

В процессе наблюдения регистрировали общее состояние животных, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности. Следили за состоянием кожного и шерстяного покрова, окраской слизистых оболочек и положением хвоста. Отмечали объем потребляемого корма и воды. Животных взвешивали до и после эксперимента.

2.6. Оценка анафилактической активности в реакции общей анафилаксии (анафилактический шок)

Аллергизирующее действие спленактива исследовали в реакции общей анафилаксии (анафилактического шока) на морских свинках, самках и самцах [Миронов А.Н., 2012].

В работе использовали 32 морские свинки массой 250-300 г, которые случайным образом были разделены на 4 группы по 8 животных в каждой (4 самца, 4 самки):

1. Группа «1ЭТД» – животных сенсibilизировали препаратом спленактив в дозе эквивалентной одной терапевтической дозе;
2. Группа «10ЭТД» – животных сенсibilизировали препаратом спленактив в дозе эквивалентной десяти терапевтическим дозам;
3. Группа «контроль №1» – животных сенсibilизировали 0,9% раствором хлорида натрия (отрицательный контроль);
4. Группа «контроль №2» – животных сенсibilизировали 0,26% раствором белка куриного яйца (БКЯ) (положительный контроль).

Доза препарата спленактив эквивалентная одной терапевтической дозе была рассчитана по правилу дозопереноса [Гуськова Т.А., 2013] и составила 11,8 мг/кг (или 3,5 мг на свинку массой 300 г). «10ЭТД» составила 118 мг/кг (или 35 мг на свинку массой 300 г).

Растворы препаратов для введения «1ЭТД» и «10ЭТД» готовились в концентрациях 11,8 мг/мл и 118 мг/мл соответственно. Таким образом, однократная сенсibilизирующая доза вводилась в объеме 0,3 мл на свинку массой 300 г.

Первая сенсibilизирующая инъекция препарата животным групп «1ЭТД» и «10ЭТД» вводилась подкожно (1-й день эксперимента), вторая и третья инъекции вводились внутримышечно через день в область бедра.

В группе «контроль №1» стерильный растворитель (изотонический раствор хлорида натрия) вводили по аналогичной схеме в эквивалентных объемах.

В группе «контроль №2» морских свинок иммунизировали перорально 0,6 % раствором белка куриного яйца (БКЯ) в дозе 4 мл/кг, что составило 1,2 мл на свинку массой 300 г в течение трех дней (растворенный в физиологическом растворе БКЯ морским свинкам вводили через мягкий пластмассовый зонд). Основным аллергенным компонентом БКЯ является овальбумин.

Животным групп «1ЭТД» и «10ЭТД» на 14-ый день эксперимента вводили внутримышечно разрешающую инъекцию, которая была равна суммарной сенсibilизирующей дозе: соответственно 10,5 мг и 100,5 мг на свинку массой 300 г (объем инъекции составлял в обеих группах 0,9 мл на свинку массой 300 г).

В группе «контроль №1» животным в качестве разрешающей дозы вводили внутримышечно раствор спленактива, что и в группе «10ЭТД», т. е. на морскую свинку массой 300 г доза составляла 105 мг в объеме 0,9 мл.

В группе «контроль №2» животным, сенсibilизированным овальбумином, вводили внутрисердечно овальбумин в дозе 1 мг на 300 г массы тела.

После введения разрешающей дозы морские свинки наблюдались в течение 5 минут.

Учет интенсивности анафилактического шока проводился в индексах по Weigle (1960) по следующей формуле:

$$\frac{(N \times 4) + (N_1 \times 3) + (N_2 \times 2) + (N_3 \times 1) + (N_4 \times 0)}{N + N_1 + N_2 + N_3 + N_4}$$

где N — число морских свинок, у которых наступила смерть; N₁ — число морских свинок, у которых развился тяжелый шок; N₂ — число морских свинок, у которых развился умеренный шок; N₃ — число морских свинок, у которых развился слабый шок; N₄ — морские свинки, у которых не наступило шока.

- Кратковременное почесывание носа, взъерошивание шерсти, падение температуры тела (не менее, чем на 1°C). Индекс Weigle составляет 1(+).

- Четко выраженные частые почесывания, единичные чихания, падение температуры тела. Индекс Weigle составляет 2(++).
- Спастический кашель, боковое положение животного, отделение кала и мочи. Индекс Weigle составляет 3(+++).
- Спазм дыхательных путей, конвульсивные прыжки, судороги. Животное погибает. Индекс Weigle составляет 4(++++).

2.7. Статистическая обработка полученных данных

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием лицензионного статистического пакета «Statistica»-6.0. Для данных, подчиняющихся закону нормального распределения, количественные характеристики признаков осуществлялись с помощью средней арифметической величины, ошибки среднего и доверительного интервала при $\alpha=0,95$. Данные, не подчиняющиеся закону нормального распределения, описывали значением медианы (Me) и интерквартильного размаха от 25 (lowquartile, Q1) до 75 квартиля (highquartile, Q2). При нормальном распределении количественных переменных двух групп применялся параметрический t –критерий Стьюдента с вариантами для связанных и независимых выборок. В случае ненормального типа распределения или анализа порядковых переменных использовался непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни (U) для двух независимых выборок. Полученные значения уровней значимости сравнивались с ближайшим из общепринятых уровней значимости, и различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$ [Спрейс И.Ф., 2006; Сергиенко В.И., 2000].

ГЛАВА 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Содержание общего белка в исследуемых препаратах селезенки

Количественное определение общего белка в препаратах спленактив и проспленактив из разного вида сырья проводили методом ВСА (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, “Sigma”, США) [Smith P.K. et al., 1985]. На рис. 1 приведена калибровочная кривая препарата бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США), по которой определяли концентрацию общего белка в растворах изученных препаратов.

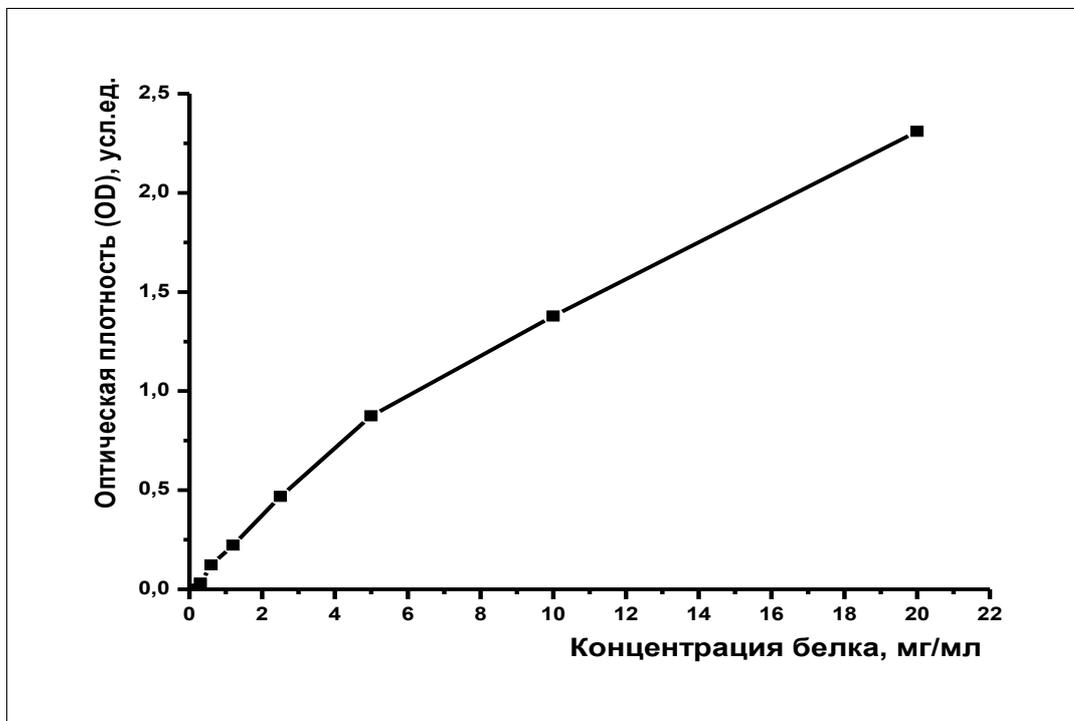


Рис.1. Калибровочная кривая препарата бычьего сывороточного альбумина.

По данным, полученным при измерении оптической плотности на планшетном спектрофотометре, количественное содержание общего белка в препаратах спленактив и проспленактив, полученных из селезенки свиней и из селезенки крупного рогатого в пересчете на один флакон составила (Таблица 1):

Таблица 1

Количественное содержание общего белка в одном флаконе препаратов спленактив и проспленактив изготовленных из селезенки свиней и крупного рогатого скота ($M \pm m$)

| Препарат | Содержание общего белка в препаратах из сырья, мг (n=6): | |
|---------------|--|-----------|
| | Свиного | КРС |
| Спленактив | 112 ± 5,7 | 110 ± 6,9 |
| Проспленактив | 108 ± 6,1 | 109 ± 7,2 |

Таким образом, сравнение содержания общего белка в препаратах спленактив и проспленактив из разного вида сырья практически одинаково.

Предложенный метод может рассматриваться в качестве одного из возможных методов стандартизации препарата спленактив [Георгиевский В.П. и др., 1998].

3.2. Электрофоретический анализ препаратов селезенки

Препараты спленактив и проспленактив анализировали методом капиллярного электрофореза на автоматическом анализаторе Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) с использованием набора Agilent Protein 80 Reagent [Agilent High Sensivity Protein 250 Kit Guide].

По результатам исследования в препаратах спленактив (а также проспленактив) из селезенки свиней обнаружены два мажорных компонента с молекулярными массами 12,1 кДа и 44 кДа. Кроме этого были обнаружены до 15 минорных компонентов с молекулярными массами от 23 до 67 кДа.

Схожие результаты были получены при проведении электрофоретического анализа препаратов спленактив и проспленактив из селезенки крупного рогатого скота. В составе препаратов были обнаружены три мажорных компонента с молекулярными массами 13 кДа; 27 кДа и 42 кДа. Кроме того было обнаружено до 13 минорных компонентов с молекулярными массами от 10,4 до 74 кДа.

Таким образом, по результатам проведенного электрофоретического анализа, можно сказать, что пептидная фракция препаратов из свиного сырья и сырья крупного рогатого скота состоит из белков со схожими молекулярными массами.

3.3. Содержание некоторых цитокинов в исследуемых препаратах

По результатам проведенного иммуноферментного анализа в препаратах спленактив и проспленактив было выявлено наличие некоторых цитокинов, а именно:

1. Провоспалительные цитокины: интерлейкин 1β (IL- 1β), фактор некроза опухоли α (TNF- α), интерлейкин 6 (IL-6);
2. Противовоспалительные цитокины: антагонист рецептора интерлейкин 1 (IL-1RA), интерлейкин 10 (IL-10);
3. Регуляторный цитокин: интерлейкин 4 (IL-4);
4. Интерферон: интерферон γ (IFN- γ);
5. Фактор роста: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (G-CSF).

Представленные ниже данные могут быть использованы для сравнения относительного содержания цитокинов в различных препаратах и не могут быть использованы для оценки их абсолютного количества. Данный эксперимент был проведен для доказательства адекватности замены свиного сырья на сырье крупного рогатого скота при приготовлении препарата спленактив, а также для доказательства преимущества препарата спленактив перед препаратом сравнения спленопидом.

Из полученных результатов можно видеть, что препараты спленактив и проспленактив, полученные из разного вида сырья (свиного и КРС) содержат сопоставимые количества изученных цитокинов (таблица 2).

Превосходство какого-либо сырья или препарата по одному цитокину нивелируется «проигрышем» по другому. Так, например спленактив из селезенки свиней содержит больше IL-1RA и IL-4 (5800,0 пг/фл и 630,0 пг/фл

соответственно), чем спленактив из селезенки крупного рогатого скота (1556,0 пг/фл и 459,0 пг/фл соответственно) , однако меньше IFN- γ и G-CSF: 1875,0 пг/фл и 3476,0 пг/фл соответственно для препарата из свиного сырья против 2733,0 пг/фл и 4101,0 пг/фл соответственно – крупного рогатого скота.

Интересно отметить, что по содержанию большинство цитокинов как спленактива, так и проспленактива из обоих видов сырья значительно превосходят препарат сравнения спленопид (таблица 2). Исключение составляют: IL-6, где не замечено достоверного различия ни одного из препаратов со спленопидом и IL-1 β , где наблюдается сходная картина и даже проспленактив из селезенки свиней содержит достоверно меньше этого цитокина, чем спленопид. Также не отмечено достоверного отличия от спленопида по содержанию IL-6 и IL-10 в спленактиве из сырья свиней и проспленактиве из сырья крупного рогатого скота. Таким образом, можно сделать вывод, что в целом относительное содержание цитокинов в новом препарате селезенки значительно больше, чем в препарате сравнения – спленопиде. Следует отметить, что результаты нашего исследования препарата спленопид методом иммуноферментного анализа практически не отличались от результатов, полученных ранее по аналогичной методике [Патент 2491944, 2013].

Анализ полученных результатов, указывает на незначительную разницу относительного количественного содержания цитокинов в препаратах, полученных из селезенки свиней и из селезенки крупного рогатого скота, которая не имеет принципиального значения. При этом использование для приготовления препарата селезенки сырья из крупного рогатого скота исключает ряд проблем, связанных с социальными, экономическими и санитарно-ветеринарными условиями применения свиного сырья, а именно: большая вероятность зараженности различными заболеваниями, например, африканской чумой свиней; вытекающие из этого карантинные мероприятия, непредсказуемо сокращающие сырьевую базу;

уменьшение рынка сбыта препарата за счет лиц, которые не могут принимать свиное сырье по религиозным соображениям. Также следует учитывать, что селезенка крупного рогатого скота в 3,5 раза больше, чем у свиньи, что говорит о преимуществе использования селезенки крупного рогатого скота с экономической точки зрения.

Поэтому, ввиду практически одинакового содержания биологически активных веществ в препаратах из селезенки свиней и селезенки крупного рогатого скота, а также ряда проблем, связанных с применением свиного сырья, в качестве сырья для последующей разработки препаратов спленактив и проспленактив была выбрана селезенка крупного рогатого скота. Все дальнейшие исследования были проведены с использованием препарата, полученного из селезенки крупного рогатого скота под предварительным рабочим названием – спленактив.

Таблица 2

Относительное содержание некоторых цитокинов в препаратах спленактив и проспленактив (пг/флакон) (M±m)

| Цитокины | Спленактив, пг/флакон | | Проспленактив, пг/флакон | | Спленопид, пг/флакон |
|--------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| | Сырье крупного рогатого скота (КРС) | Сырье свиней | Сырье крупного рогатого скота (КРС) | Сырье свиней | |
| Провоспалительные цитокины | | | | | |
| IL-1 β | 238±15,1 (n=6) | 240±16,3 (n=6) | 271±27,6 (n=6) | 178±16,3 ^{**+;1} (n=6) | 279±20,5 (n=6) |
| TNF – α | 1199±131,6 ¹ (n=7) | 1051±63,5 ¹ (n=7) | 950±52,2 ¹ (n=8) | 2916±116,1 ^{**+;1} (n=8) | 260±14,5 (n=7) |
| IL-6 | 500±36,3 (n=6) | 462±36,7 (n=6) | 439±18,1 (n=7) | 557±27,5 ^{**} (n=7) | 490±56,9 (n=6) |
| Противовоспалительные цитокины | | | | | |
| IL-1RA | 1556±85,1 ¹ (n=8) | 5800±440,3 ^{*;1} (n=8) | 3017±241,8 ¹ (n=8) | 4526±403,2 ^{**+;1} (n=8) | 1077±70,0 (n=7) |
| IL-10 | 955±134,3 ¹ (n=6) | 722±77,7 (n=6) | 673±30,7 (n=6) | 1162±67,1 ^{**+;1} (n=6) | 635±78,2 (n=6) |
| Интерфероны | | | | | |
| IFN- γ | 2733±172,9 ¹ (n=7) | 1875±124,3 ^{*;1} (n=7) | 2085±153,9 ¹ (n=7) | 2682±108,9 ^{**+;1} (n=7) | 331±36,8 (n=7) |
| Регуляторные цитокины | | | | | |
| IL-4 | 459±45,7 ¹ (n=6) | 630±41,2 ^{*;1} (n=6) | 540±20,8 ¹ (n=6) | 590±37,4 ¹ (n=6) | 197±19,3 (n=6) |
| Факторы роста | | | | | |
| G-CSF | 4101±151,5 ¹ (n=8) | 3476±139,5 ^{*;1} (n=8) | 4480±124,1 ¹ (n=8) | 5190±159,1 ^{**+;1} (n=8) | 349±37,6 (n=7) |

Примечание: * - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к препарату спленактив (КРС); ** - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к препарату проспленактив (КРС); + - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к препарату спленактив (С); ++ - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к препарату проспленактив (С); ¹ – значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к препарату спленопид.

3.4. Иммуотропные свойства препарата спленактив в модельных системах *in vitro*

Для исследования иммуотропного действия препарата спленактив был использован комплекс методов, позволяющих оценить влияние препарата на фагоцитарное звено иммунной системы и функциональное состояние иммунокомпетентных клеток.

3.4.1. Влияние препарата спленактив на фагоцитарную активность нейтрофилов

Для оценки влияния исследуемых препаратов спленактив и проспенактив на функциональную активность фагоцитарного звена иммунитета в модельной системе *in vitro* было использовано 127 образцов периферической крови здоровых доноров-волонтеров. Средний возраст 31 год.

В эксперименте испытывались следующие концентрации растворов препаратов спленактив, проспенактив и спленопид: 3,2 мг/мл и 11,7 мг/мл; 3,1 мг/мл и 11,5 мг/мл; 4,2 мг/мл и 15,3 мг/мл соответственно. Данные концентрации были выбраны исходя из рекомендуемой терапевтической дозы препарата на один прием, а также согласно данным проведенных доклинических исследований препарата спленопид [Патент 2152219, 2005]. Указанные концентрации всех трех препаратов были соответственно изоквивалентны в пересчете на животное сырье.

Оценку фагоцитарной активности грануляцитарно-макрофагальных клеток проводили в тестах по определению поглотительной функции нейтрофилов и их бактерицидной способности.

При оценке поглотительной функции нейтрофилов в условиях инкубации крови, под влиянием препаратов спленактив и проспенактив в концентрациях 3,2 мг/мл и 3,1 мг/мл соответственно статистически значимых различий фагоцитирующих клеток с контролем выявлено не было (таблица 3, рисунок 2а). Однако при увеличении концентрации препаратов до 11,7 мг/мл

и 11,5 мг/мл соответственно отмечалось статистически достоверное снижение процента фагоцитирующих клеток обоих препаратов с более выраженным эффектом при культивировании с препаратом проспленактив, чем спленактив, до 48,3% и 52,0% соответственно, при 67,0% в контроле.

Таблица 3

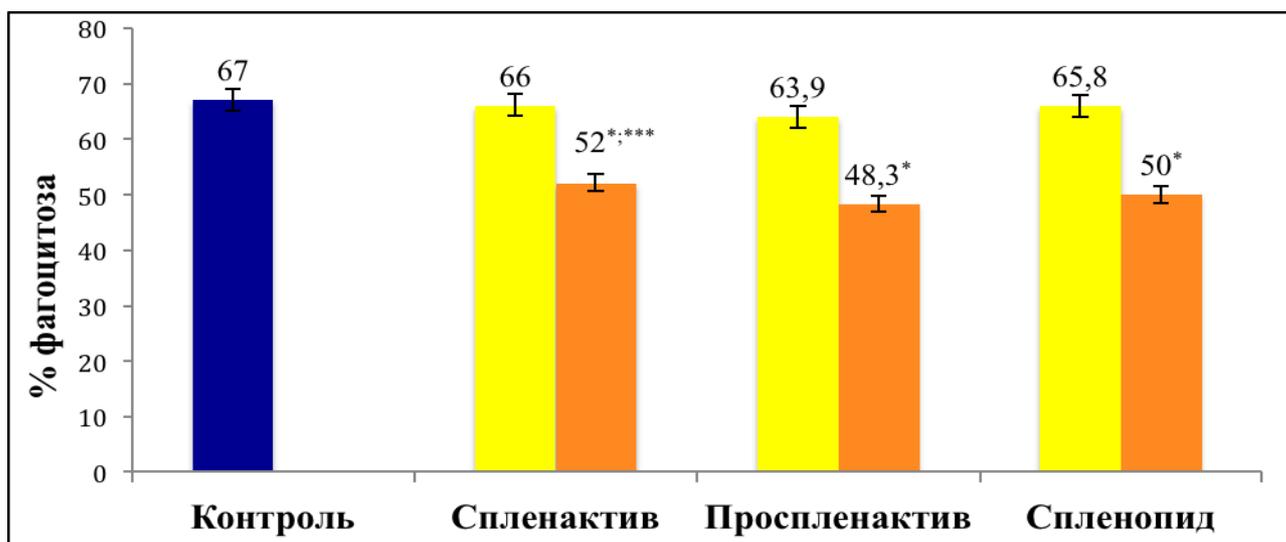
Влияния препаратов спленактив и проспленактив на фагоцитарную активность нейтрофилов ($M \pm m$)

| Группы | Концентрация вещества в реакционной смеси (мг/мл) | Исследуемые показатели | |
|------------------------|---|---------------------------|--|
| | | Фагоцитоз, % | Фагоцитарное число, количество стафилококков на клетку |
| Контроль (n = 10) | - | 67,0±2,86 | 5,8±0,9 |
| Спленактив (n = 13) | 3,2 ¹ | 66,0±2,76 | 7,0±0,72* |
| | 11,7 ² | 52,0±1,16 ^{*,**} | 4,2±0,22 ^{*,**} |
| Проспленактив (n = 11) | 3,1 ¹ | 63,9±6,47 | 6,7±1,11* |
| | 11,5 ² | 48,3±2,55* | 4,6±0,36* |
| Спленид (n = 11) | 4,2 ¹ | 65,8±5,60 | 6,5±0,85* |
| | 15,3 ² | 50,0±2,76* | 4,4±0,38* |

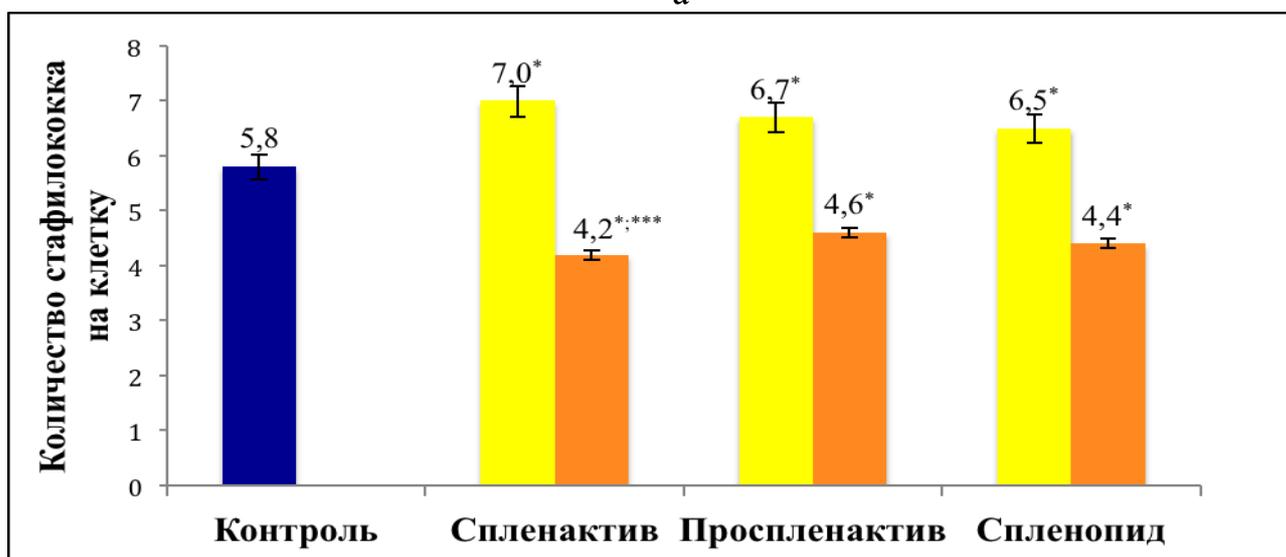
Примечание: * - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению в контроле; ** - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению в препарате проспленактив; ^{1,2} – концентрации спленактива, проспленактива и спленида изоэквивалентны в пересчете на сырье.

В то же время отмечалось повышение фагоцитарного числа по отношению к контролю, как при культивировании со спленактивом, так и проспленактивом в концентрациях препаратов 3,2 мг/мл и 3,1 мг/мл соответственно. Этот эффект не только полностью утрачивался, но и носил обратный характер при повышении концентрации до 11,7 мг/мл и 11,5 мг/мл соответственно (рисунок 2б). Фагоцитарное число в присутствии спленактива и проспленактива было достоверно ниже, чем без них: 4,2±0,22 и 4,6±0,36 соответственно, против 5,8±0,90 в контроле. Эти результаты согласуются с данными литературы об обратном дозозависимом эффекте ряда стимуляторов гранулоцитарно-макрофагальных клеток [Разумная Ф.Г. и др., 2011]. Препарат сравнения спленид в изоэквивалентных в пересчете на

сырье концентрациях в описываемом тесте показал аналогичные результаты без достоверной разницы с препаратами спленактив и проспленактив.



а



б

Рис. 2. Влияние препаратов спленактив, проспленактив и спленопид на фагоцитарную активность изолированных нейтрофилов по показателям: процент фагоцитоза (а) и фагоцитарное число (б). Концентрации спленактива 3,2 мг/мл и 11,7 мг/мл; проспленактива 3,1 мг/мл и 11,5 мг/мл; спленопида 4,2 мг/мл и 15,3 мг/мл изозквивалентны в пересчете на сырье.

Примечание: * - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению в контроле; ** - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению в препарате проспленактив; *** - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению в препарате проспленактив.

3.4.2. Влияния препарата спленактив на активность нейтрофилов в НСТ-тесте

При исследовании влияния препарата спленактив на способность нейтрофилов восстанавливать нитросиний тетразолий использовались

следующие концентрации раствора препарата: 11,7 мг/мл; 17,6 мг/мл; 29,3 мг/мл. Препарат сравнения – спленопид испытывался в соответственно изоэквивалентных концентрациях 15,3 мг/мл; 23 мг/мл; 38,3 мг/мл.

При обследовании практически здоровых доноров было выявлено, что они значительно различаются по степени интенсивности хемилюминесценции лейкоцитарной суспензии, обусловленной генерацией активных форм кислорода (АФК): у 41,2% доноров она была в пределах нормы, у 58,8% – существенно выше или ниже нормальных пределов. В связи с этим все доноры были разделены на три группы по принципу интенсивности генерации активных форм кислорода [Владимиров Ю.А., 2004; Темнова В.В., 2006].

В первую группу вошли доноры (n=21) с уровнем генерации активных форм кислорода в пределах нормы; во 2-ю группу были включены доноры (n=17) с дефицитным типом генерации активных форм кислорода, показатель АФК был ниже на 25% значения интенсивности хемилюминесценции среднестатистической нормы; 3-я группа состояла из доноров (n=13) с гипероксическим типом генерации активных форм кислорода: на 25% выше нормы.

В ходе проведенных исследований было обнаружено, что спленактив по-разному влиял на продукцию АФК нейтрофилами крови доноров из разных групп (таблица 4). Так, в группе с нормальной продукцией АФК ее повышение отмечалось уже при концентрации спленактива 11,7 мг/мл, а в группах с отклонением от нормы такого влияния не было отмечено. Начиная с концентрации 17,6 мг/мл спленактив достоверно повышал продукцию АФК во всех трех группах. При этом наибольшая стимуляция (ИС=2,11) была отмечена в группе с гипопродукцией АФК, наименьшая — с гиперпродукцией (ИС=1,17). При нормальной продукции наблюдалось промежуточное значение (ИС=1,56). Повышение концентрации спленактива до 29,3 мг/мл приводило к еще большей стимуляцией продукции АФК с сохранением тенденции к относительной эффективности исследуемого

препарата в группах с различной продукцией АФК. Так, при гипопроодукции АФК ИС=4,54, при нормальной продукции – 4,25, при гиперпродукции – 3,89.

Аналогичным образом проявлял себя и препарат сравнения — спленопид в концентрациях изоэквивалентных спленактиву в пересчете на сырье (таблица 4). Однако эффект препарата спленактив в ряде случаев достоверно превосходил таковой у спленопида. Так, это наблюдалось у крови доноров с гипопродукцией АФК во всех концентрациях, с нормальной продукцией АФК в концентрациях спленактива 17,6 мг/мл и спленопида 23 мг/мл, спленактива 29,3 мг/мл и спленопида 38,3 мг/мл, а также с гиперпродукцией АФК в аналогичных концентрациях, как и с нормальной продукцией. При этом наибольшая стимуляция (ИС=1,84) была отмечена в группе с гипопродукцией АФК, наименьшая — с гиперпродукцией (ИС=1,09). При нормальной продукции наблюдалось промежуточное значение (ИС=1,38). Повышение концентрации спленопида до 38,3 мг/мл приводило к еще большей стимуляцией продукции АФК с сохранением тенденции к относительной эффективности исследуемого препарата в группах с различной продукцией АФК. Так, при гипопродукции АФК ИС=3,98, при нормальной продукции – 4,07, при гиперпродукции – 3,9 (рисунок 3).

Следует отметить, что уровень продукции АФК в группах с гипо-, нормо-, гиперпродукцией при индукции *Staphylococcus aureus* (индуцированный контроль) составил 1,25; 1,49 и 1,14 соответственно.

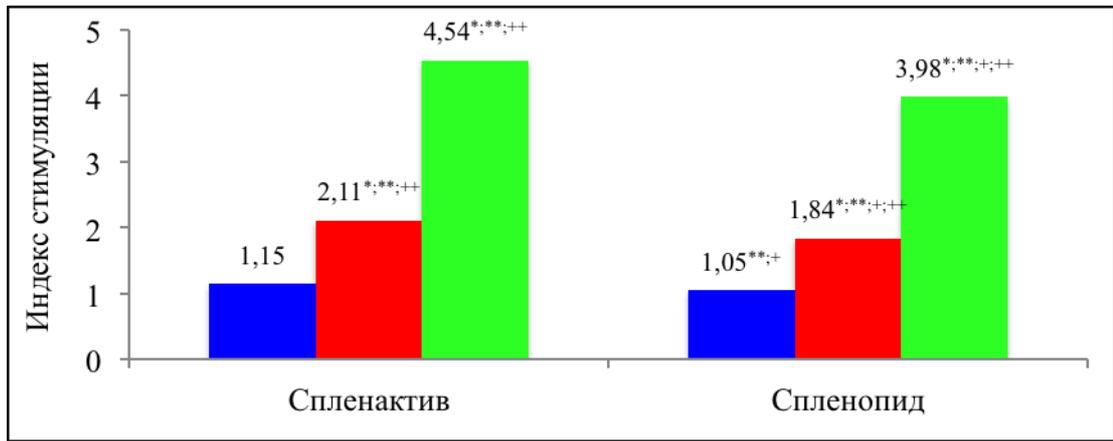
Таким образом, препарат спленактив в диапазоне концентраций 11,7 мг/мл – 29,3 мг/мл, проявил способность стимулировать выработку нейтрофилами активных форм кислорода, причем наиболее заметен этот эффект был в случаях использования нейтрофилов со сниженной продукцией активных форм кислорода, т. е. спленактив проявил иммуномодулирующее (нормализующее) свойство.

Таблица 4

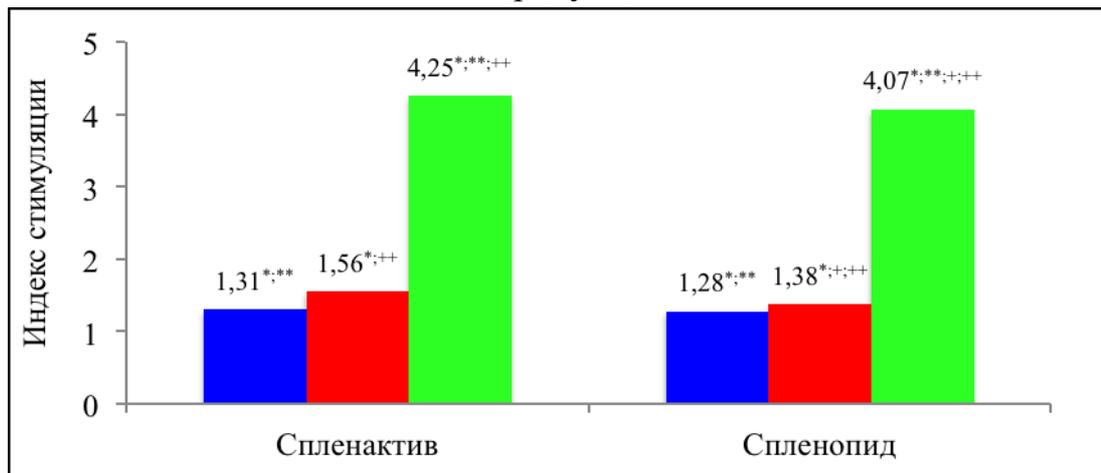
Влияние различных концентраций раствора препаратов спленактив и спленопид на продукцию активных форм кислорода (АФК) в тесте – НСТ (у.е.) (M±m)

| Группы | Концентрация веществ в реакционной смеси (мг/мл) | С гипопродукцией АФК (n=17) | С нормальной продукцией АФК (n=21) | С гиперпродукцией АФК (n=13) |
|-------------------------------|--|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| Общее количество доноров – 51 | | | | |
| Интенсивность НСТ спонтанного | - | 59 ± 3,6 | 100 ± 3,2 | 168 ± 2,7 |
| Индукированный контроль | <i>Staphylococcus aureus</i> | 74 ± 2,9 [*] | 149 ± 2,4 [*] | 192 ± 3,7 [*] |
| <i>Индекс стимуляции</i> | | 1,25 | 1,49 | 1,14 |
| Спленактив | 11,7 ¹ | 68 ± 1,9 | 131 ± 2,6 ^{*,**} | 177 ± 8,7 ^{**} |
| <i>Индекс стимуляции</i> | | 1,15 | 1,31 | 1,05 |
| Спленипид | 15,3 ¹ | 62 ± 2,1 ^{**,+} | 128 ± 2,9 ^{*,**} | 171 ± 6,9 ^{**} |
| <i>Индекс стимуляции</i> | | 1,05 | 1,28 | 1,02 |
| Спленактив | 17,6 ² | 125 ± 3,8 ^{*,**;++} | 156 ± 3,3 ^{*,++} | 196 ± 7,9 ^{*,++} |
| <i>Индекс стимуляции</i> | | 2,11 | 1,56 | 1,17 |
| Спленипид | 23 ² | 109 ± 4,5 ^{*,**;++} | 138 ± 3,7 ^{*,;++} | 184 ± 8,6 ^{*,+} |
| <i>Индекс стимуляции</i> | | 1,84 | 1,38 | 1,09 |
| Спленактив | 29,3 ³ | 268 ± 2,9 ^{*,**;++} | 425 ± 9,5 ^{*,**;++} | 654 ± 4,8 ^{*,**;++} |
| <i>Индекс стимуляции</i> | | 4,54 | 4,25 | 3,89 |
| Спленипид | 38,3 ³ | 235 ± 4,8 ^{*,**;++} | 407 ± 11,3 ^{*,**;++} | 621 ± 8,6 ^{*,**;++} |
| <i>Индекс стимуляции</i> | | 3,98 | 4,07 | 3,69 |

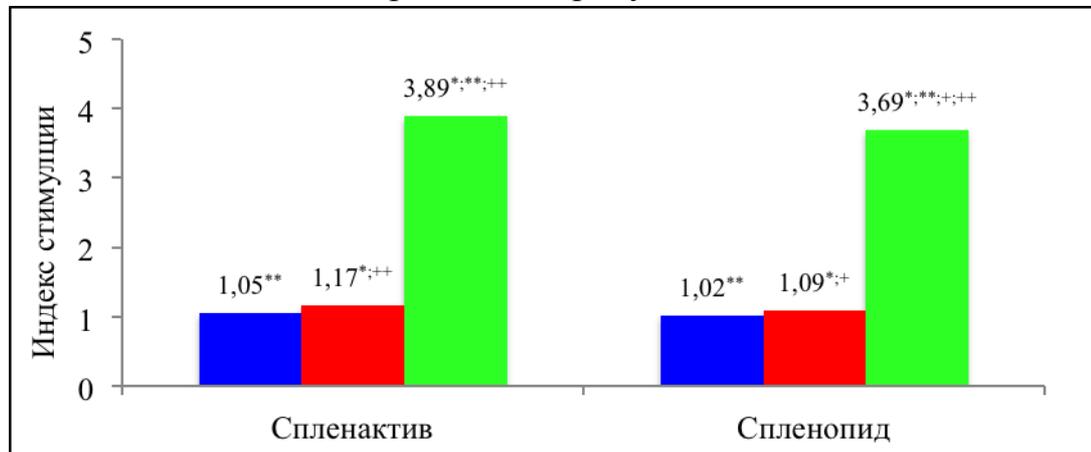
Примечание: * - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению НСТ спонтанного; ** - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению в контроле; + - значимые отличия по отношению к значению спленактива в изоквивалентной концентрации ($p \leq 0,05$); ++ - значимые отличия по отношению к эффекту того же препарата в предыдущей (меньшей) концентрации ($p \leq 0,05$); ^{1,2,3} – концентрации спленактива и спленопида соответственно изоквивалентны в пересчете на сырье.



а – с гипопродукцией АФК



б – с нормальной продукцией АФК



в – с гиперпродукцией АФК

Рис. 3. Влияние различных концентраций растворов препаратов спленактив и спленопид на продукцию активных форм кислорода (АФК) в НСТ-тесте

Примечание: одинаковым цветом показаны результаты изоквивалентных концентраций исследуемых препаратов в пересчете на сырье: а – влияние препаратов на группу с гипопродукцией АФК; б – влияние препаратов на группу с нормальной продукцией АФК; в – влияние препаратов на группу с гиперпродукцией АФК. Синий цвет – концентрации спленактива 11,7 мг/мл и спленопида 15,3 мг/мл; красный цвет – концентрации спленактива 17,6 мг/мл и спленопида 23 мг/мл; зеленый цвет – концентрация спленактива 29,3 мг/мл и спленопида 38,4 мг/мл. Показана достоверность в абсолютных значениях на продукцию активных форм кислорода НСТ-тесте (у.е.): * - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению НСТ спонтанного; ** - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению в контроле; + - значимые отличия по отношению к значению спленактива в изоквивалентной концентрации ($p \leq 0,05$); ++ - значимые отличия по отношению к эффекту того же препарата в предыдущей (меньшей) концентрации ($p \leq 0,05$).

3.4.3. Влияние препарата спленактив на активность нейтрофилов в тесте люминолзависимой хемилюминесценции

Изучение влияния препаратов спленактив и проспленактив на кислороднезависимую активность грануляцитарно-макрофагальных клеток проводили в тесте люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). В ходе эксперимента фиксировали разницу в интенсивности хемилюминесценции нейтрофилов в присутствии изучаемых препаратов и без них (спонтанная хемилюминесценция нейтрофилов). Препараты спленактив и проспленактив были испытаны в изоквивалентных концентрациях 7,8 мг/мл; 14,7 мг/мл и 7,6 мг/мл; 14,3 мг/мл соответственно.

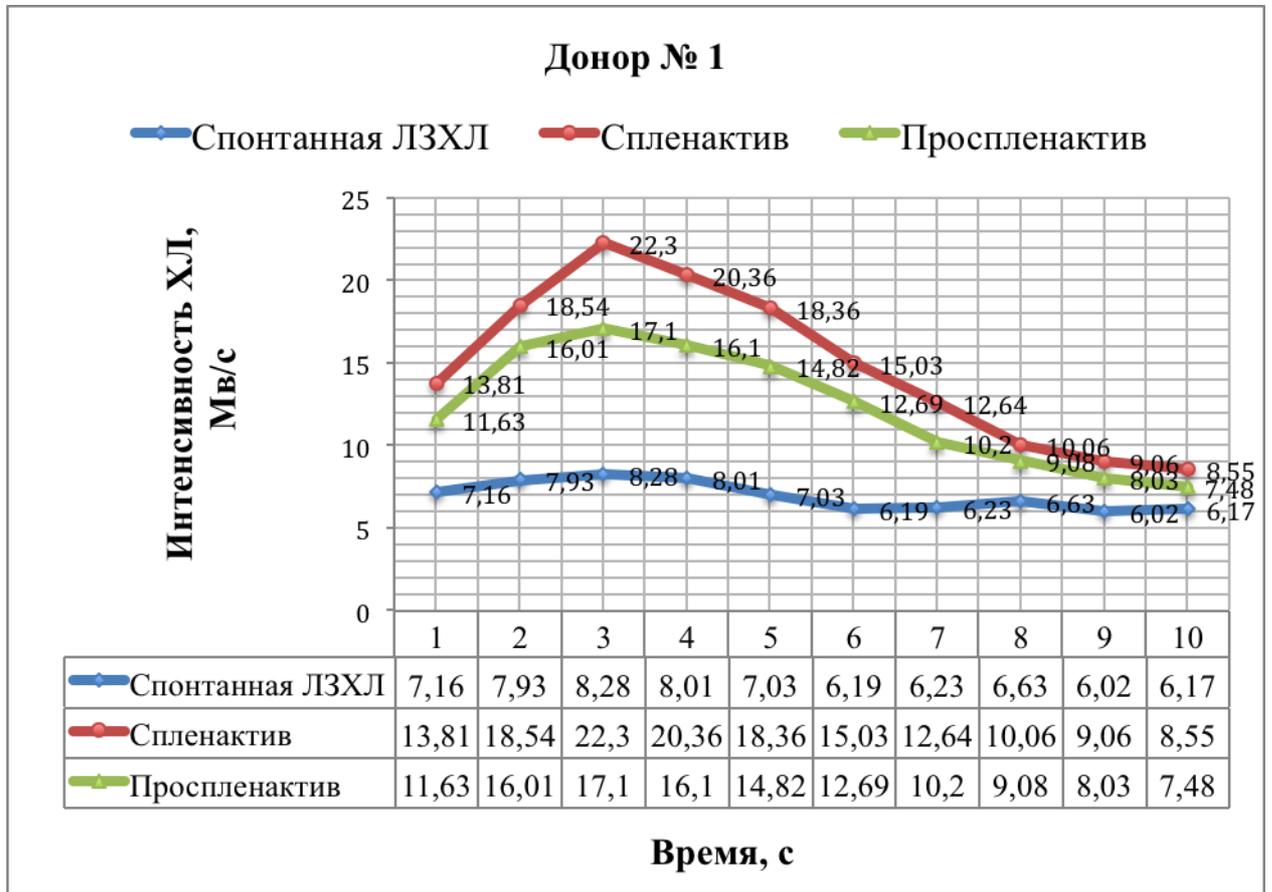


Рис. 4. Влияние препаратов спленактив и проспленактив в изоквивалентных концентрации 14,7 и 14,3 мг/мл соответственно на ЛЗХЛ лейкоцитов человека на примере показаний образца крови одного донора

На рисунке 4 представлено влияние спленактива и проспленактива на кислороднезависимую активность грануляцитарно-макрофагальных клеток в тесте люминолзависимой хемилюминесценции образца крови одного из 11 доноров, участвующих в эксперименте.

Как видно из представленности графика, оба исследованных препарата повышали интенсивность ЛЗХЛ. При этом препарат спленактив проявлял значительно большую биологическую активность в отношении клеток фагоцитарной системы, чем проспленактив.

И действительно, при сравнении уровней люминолзависимой хемилюминесценции между группами культивирования гранулацитарно-макрофагальных клеток со спленактивом и проспленактивом, а также контрольной группой без добавления индукторов, выявлены статистически достоверные ($p \leq 0,05$) различия, свидетельствующие о способности обоих препаратов повышать кислороднезависимую активность, обеспечивающую бактерицидность фагоцитов. Эта способность более выражена у препарата спленактив (таблица 5, рисунок 5).

Таблица 5

Влияние спленактива и проспленактива на кислороднезависимую активность гранулацитарно-макрофагальных клеток в тесте люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) (Me[Q1-Q3])

| Группа (n=11) | Концентрация веществ в реакционной смеси (мг/мл) | Люминолзависимая хемилюминесценция | Индекс стимуляции (ИС) |
|-------------------------------------|--|------------------------------------|------------------------|
| Контроль – спонтанная ЛЗХЛ | 0 | 11,9 (9,7 – 13,4) | 1 |
| Спленактив – индуцированная ЛЗХЛ | 7,8 ¹ | 17,9 (16,2 - 22,5) ^{*,**} | 1,50 |
| | 14,7 ² | 15,6 (14,4 – 20,0) ^{*,**} | 1,31 |
| Проспленактив – индуцированная ЛЗХЛ | 7,6 ¹ | 15,3 (13,7 – 18,5) [*] | 1,30 |
| | 14,3 ² | 13,3 (12,9 – 15,8) [*] | 1,12 |

Примечание: значимость различия по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни. * - значимые отличия ($p \leq 0,05$) от значений в контроле; ** - значимые отличия ($p \leq 0,05$) от значений с проспленактивом в аналогичных концентрациях. Me – медиана; Q₁ – низкий квартиль (25%); Q₂ – высокий квартиль (75%) = дисперсия отклонений от медианы; ^{1;2} – концентрации спленактива и проспленактива попарно изоквивалентны в пересчете на сырье.

Как видно, из представленных результатов (рисунок 5) и спленактив и проспленактив повышали интенсивность люминолзависимой

хемилюминесценции нейтрофилов. Интересно, что в концентрациях 7,8 мг/мл и 7,6 мг/мл этот эффект был более выражен, чем в концентрациях 14,7 мг/мл и 14,3 мг/мл: индекс стимуляции — 1,50 против 1,31 соответственно у спленактива при $p \leq 0,05$; у проспленактива наблюдалась аналогичная тенденция, хотя и менее выраженная: индекс стимуляции — 1,30 против 1,12 соответственно ($p \leq 0,05$).

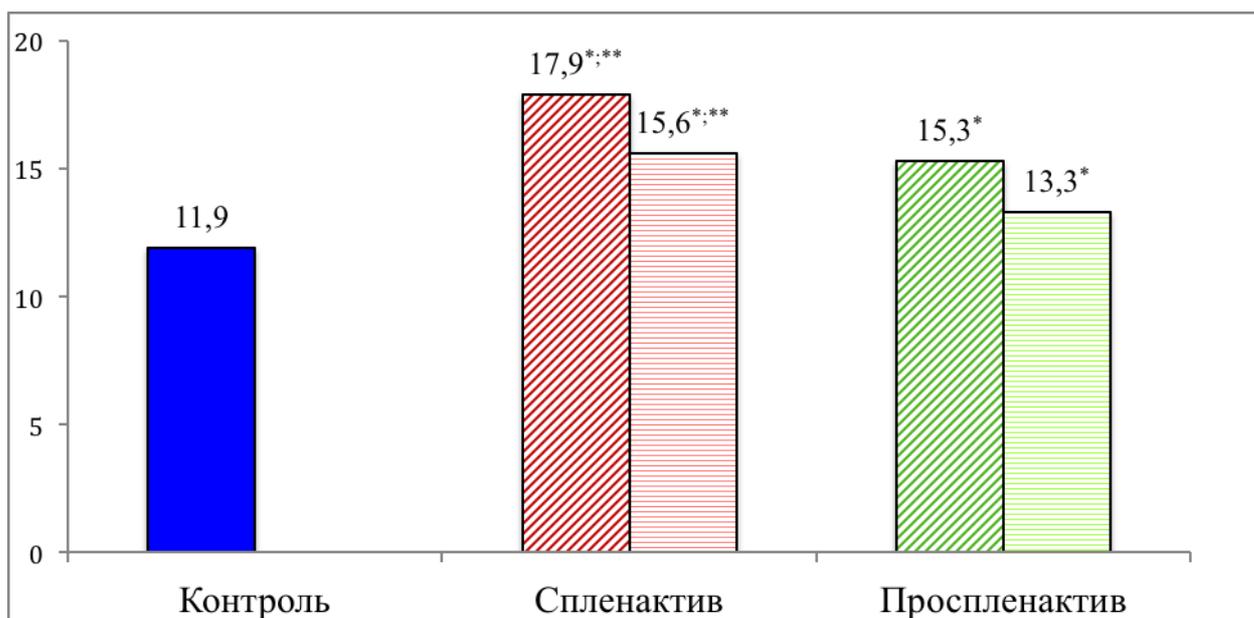


Рис. 5. Зависимость ЛЗХЛ от концентрации растворов препаратов спленактив и проспленактив при изучении индукции оксидазной активности грануляцитарно-макрофагальных клеток

Примечание: одинаковой штриховкой показаны результаты изоэквивалентных концентраций исследуемых препаратов в пересчете на сырье:

косая штриховка – спленактив 7,8 мг/мл и проспленактив 7,6 мг/мл; горизонтальная штриховка – спленактив 14,7 мг/мл и проспленактив 14,3 мг/мл.

* - значимые отличия ($p \leq 0,05$) от значений в контроле; ** - значимые отличия ($p \leq 0,05$) от значений с проспленактивом в аналогичных концентрациях.

Таким образом, растворы препаратов спленактив и проспленактив в изоэквивалентных концентрациях 7,8 мг/мл, 14,7 мг/мл и 7,6 мг/мл, 14,3 мг/мл соответственно достоверно усиливают люминолзависимую хемилюминесценцию лейкоцитов человека. Однако в концентрациях 7,8 мг/мл и 7,6 мг/мл препараты оказывают более значимое влияние на показатели хемилюминесценции по сравнению с концентрациями 14,7 мг/мл и 14,3 мг/мл.

Влияние препаратов спленактив и проспленактив на суммарную кислороднезависимую активность гранулацитарно-макрофагальных клеток сравнивалось с эффективностью общепринятых иммуномодуляторов в тесте люминолзависимой хемилюминесценции (рисунок 6).

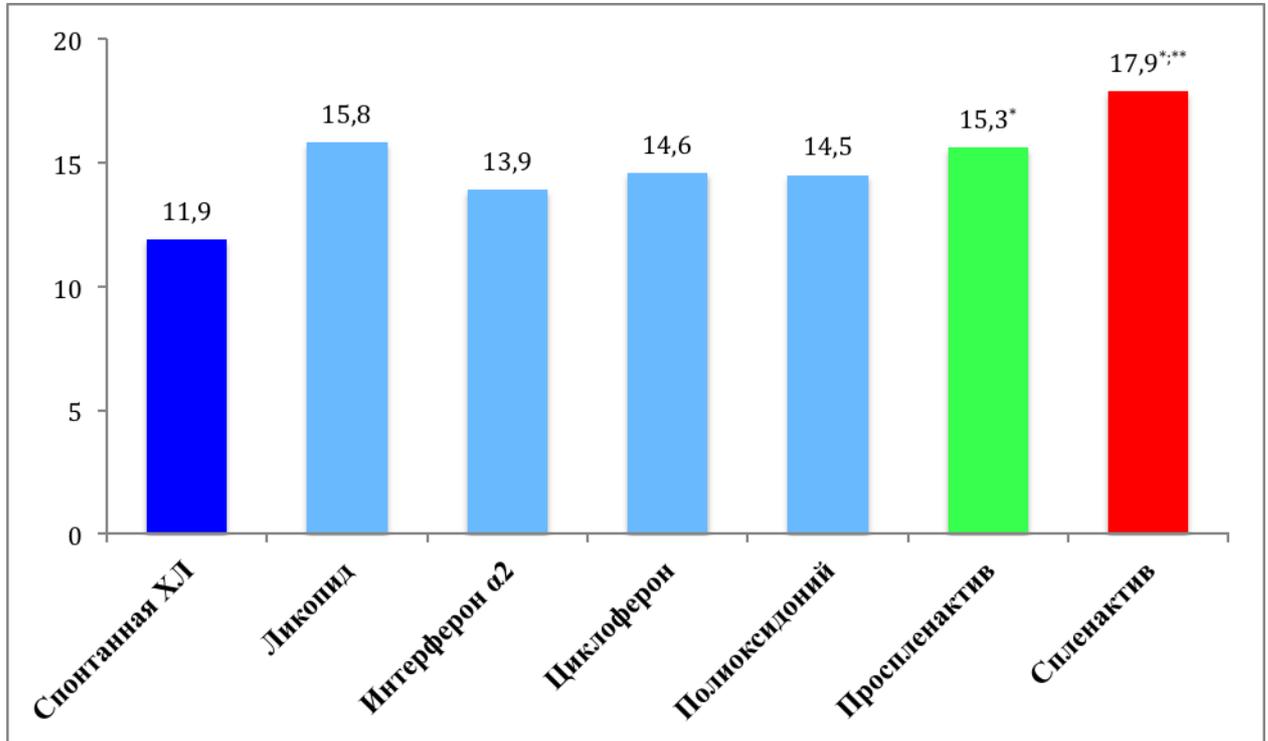


Рис. 6. Сравнительная оценка оксидазной активности гранулацитарно-макрофагальных клеток со спектром иммуномодуляторов основных классов.

Концентрация растворов препаратов спленактив и проспленактив в реакционной смеси 7,8 мг/мл и 7,6 мг/мл соответственно, ликопид — 100 мг/мл; интерферон α2 — 500 МЕ/мл; циклоферон — 125 мг/мл; полиоксидоний — 6 мг/мл. * - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению в контроле; ** - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению проспленактива в аналогичных концентрациях.

По сравнению с другими испытанными иммуномодуляторами спленактив оказал наиболее выраженное влияние на суммарную кислороднезависимую активность гранулацитарно-макрофагальных клеток. Следует отметить, что проспленактив хотя и превосходил практически все другие исследуемые препараты, однако не превосходил спленактив. Наличие дигидрокверцетина в препарате селезенки по крайней мере не снижало и даже несколько повышало его эффективность по влиянию на функциональную активность нейтрофилов крови. Это может быть связано со стабилизацией химического состава препарата спленактив.

Таким образом, по результатам проведенных биологических исследований можно утверждать, что исследуемые препараты селезенки увеличивают функциональную активность нейтрофилов. Препараты спленактив и проспленактив влияют как на поглотительную функцию нейтрофилов, так и на кислородопосредованную и кислороднезависимую активность нейтрофилов, что подтверждается тестами НСТ и ЛЗХЛ.

3.4.4. Влияние препарата спленактив на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками

При изучении влияния спленактива на продукцию цитокинов в модельной системе *in vitro* использована методика определения синтеза цитокинов изолированными клетками периферической крови. Клеточную взвесь инкубировали с раствором препарата спленактив в концентрациях 0,7 мг/мл; 3,2 мг/мл и 5,9 мг/мл в течение 24 часов. После чего надосадочные жидкости подопытных и контрольных культур отбирали и использовали для определения концентраций провоспалительных ($IL1\beta$ и $TNF\alpha$), противовоспалительных ($IL1RA$ и $IL10$) и регуляторного ($IFN\gamma$) цитокинов методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью тест-систем ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург) в соответствии с рекомендациями производителя.

Как видно из таблицы 6 и рисунка 7 уровни всех исследованных цитокинов после 24-х часового культивирования клеток крови доноров без препаратов (контроль) превышали сывороточные уровни, которые являлись исходными.

При культивировании лейкоцитов в присутствии препарата спленактив выявлено достоверное повышение продукции всех исследуемых цитокинов. Однако это стимулирующее влияние на цитокиногенез различных цитокинов у препарата спленактив проявлялось в различных концентрациях. Так, продукция провоспалительных цитокинов ($IL1\beta$ и $TNF\alpha$) повышалась во всех исследуемых концентрациях: на 21% и 63% при концентрации 0,7 мг/мл, на

241% и 148% - при 3,2 мг/мл и на 419% и 153% - при 5,9 мг/мл по сравнению с контролем соответственно. При этом эффект более высокой концентрации препарата достоверно превосходил предыдущую ($p \leq 0,05$). Похожая картина наблюдалась в продукции регуляторного цитокина (IFN- γ): при культивировании изолированных клеток крови со спленактивом в концентрациях 0,7 мг/мл, 3,2 мг/мл и 5,9 мг/мл прирост концентрации IFN- γ по сравнению с контролем составил 32%, 18% и 180% соответственно.

Влияние спленактива на продукцию противовоспалительных цитокинов проявлялось в более высоких концентрациях. Так, уровень IL-1RA повышался по сравнению с контролем лишь в концентрации спленактива 3,2 мг/мл (на 58%) и 5,9 мг/мл (на 90%), а продукцию IL-10 спленактив увеличивал лишь в концентрации 5,9 мг/мл (на 43%).

В эксперименте, проведенном по той же методике, было проведено сравнительное изучение эффективности препаратов спленактив и проспленактив по их влиянию на продукцию цитокинов (IL-1 β ; TNF α ; IL-10; IL-1RA) в изоэквивалентных концентрациях в пересчете на сырье. В качестве препарата сравнения был использован пирогенал. При этом спленактив был испытан в концентрации 3,2 мг/мл, проспленактив в изоэквивалентной в пересчете на сырье концентрации 3,1 мг/мл, а пирогенал – 3,2 мг/мл.

Из полученных в исследовании данных видно, что оба изучаемых препарата селезенки достоверно повышали концентрации IL-1 β ; TNF α ; IL-1RA в среде культивирования изолированных лейкоцитов (таблица 7).

Влияние различных концентраций раствора препарата спленактив на продукцию цитокинов в модельной системе in vitro, пг/мл (Ме [Q1- Q3])

| Цитокины, пг/мл | Концентрация веществ в инкубированной взвеси, мг/мл | | | | | | | Сыворотка крови ² |
|--------------------------------|---|----------------------------|--|-------------------------------|--|---------------------------------|--|------------------------------|
| | Спонтанная продукция (контроль) ¹ | 0,7 | Отклонение от Ме контроля в % [*] | 3,2 | Отклонение от Ме контроля в % [*] | 5,9 | Отклонение от Ме контроля в % [*] | |
| Провоспалительные цитокины | | | | | | | | |
| IL-1 β | 81 [47-127] | 98 [69-149] [*] | +21% | 276 [179-422] ^{*,**} | +241% | 420 (337-502) ^{*,**,+} | +419% | 23-37 |
| TNF α | 136 [70-151] | 221 [115-333] [*] | +63% | 337 [210-441] ^{*,**} | +148% | 344 (247-431) ^{*,**} | +153% | 26-40 |
| Противовоспалительные цитокины | | | | | | | | |
| IL-10 | 76 [44-116] | 67 [45-90] | – | 89 [63-109] | – | 109 (74-150) ^{*,**} | +43% | 37-50 |
| IL1RA | 218 [155-275] | 252 [170-360] | – | 344 [220-442] [*] | +58% | 414 (325-483) ^{*,**} | +90% | 210-260 |
| Регуляторный цитокин | | | | | | | | |
| IFN- γ | 150 [130-179] | 198 [165-225] [*] | +32% | 177 [169-191] [*] | +18% | 420 (283-555) ^{*,**,+} | +180% | 82-100 |

Примечание: Значимость различий по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни ($p < 0,05$): * - значимые отличия по отношению к значению в контроле; ** - значимые отличия по отношению к значению спленактива в концентрации 0,7 мг/мл; + - значимые отличия по отношению к значению спленактива в концентрации 3,2 мг/мл. ¹Спонтанная продукция (контроль) — содержание цитокинов после инкубации в течение 24 часов без добавления исследуемых препаратов. ²Сыворотка крови — содержание цитокинов в сыворотке крови без инкубации.

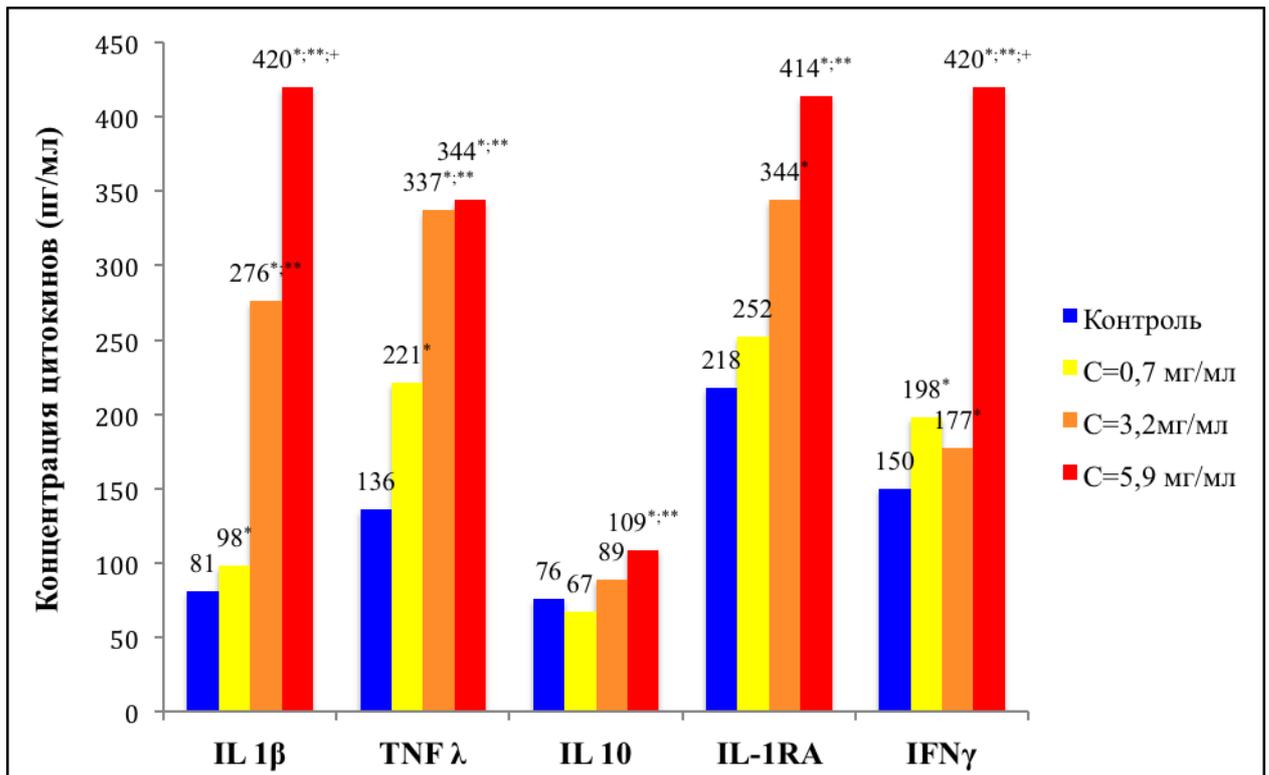


Рис. 7. Зависимость влияния препарата спленактив на продукцию цитокинов лейкоцитами от его концентрации в среде культивирования

* - значимые отличия по отношению к значению в контроле; ** - значимые отличия по отношению к значению спленактива в концентрации 0,7 мг/мл; + - значимые отличия по отношению к значению спленактив в концентрации 3,2 мг/мл

При этом, если влияние на синтез IL-1β спленактива и проспленактива было практически одинаковым, то препарат содержащий дигидрокверцетин, почти в 2 раза сильнее, чем проспленактив повышал выделение TNFα и IL-1RA. На синтез IL-10 оба исследуемых препарата не влияли.

Препарат сравнения — пирогенал повышал продукцию всех определяемых цитокинов. При этом по стимулирующему влиянию на синтез IL-1β он уступал обоим препаратам селезенки в 2-2,5 раза, однако продукция TNFα и IL-1RA под влиянием пирогенала была достоверно выше, более чем на 20%, чем у спленактива и примерно на 50%, чем у проспленактива, а уровень IL-10 повышался в 3 раза при полном отсутствии влияния на него у исследуемых препаратов селезенки (рисунок 8).

Таблица 7

Сравнительное влияние растворов препаратов спленактив, проспленактив и пирогенал на продукцию цитокинов изолированными лейкоцитами донорской крови, пг/мл (Me [Q1-Q3])

| Препарат (доза) | Провоспалительные | | Противовоспалительные | |
|--|--------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| | IL1 β (n=10) | TNF α (n=10) | IL10 (n=8) | IL1RA (n=9) |
| Контроль | 81 [47-127] | 136 [70-151] | 76 [44-116] | 218 [155-275] |
| Спленактив ¹ (3,2 мг/мл) | 276 [178-422]* | 337 [210-441]** | 89 [63-109] | 344 [220-442]* |
| Проспенактив ¹ (3,1 мг/мл) | 236 [133-360]* | 264 [194-367]* | 74 [59-89] | 282 [215-366]* |
| Пирогенал (3,2 мг/мл) | 147 [79-218]**,*,+ | 416 [268-558]**,*,+ | 208 [138-265]**,*,+ | 413 [278-503]**,*,+ |

Примечание: Значимость различий по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни ($p \leq 0,05$): * - значимые отличия по отношению к значению в контроле; ** - значимые отличия по отношению к значению проспленактива; + - значимые отличия по отношению к значению спленактива; ¹ - концентрации препаратов спленактив и проспленактив изоэквивалентны в пересчете на сырье.

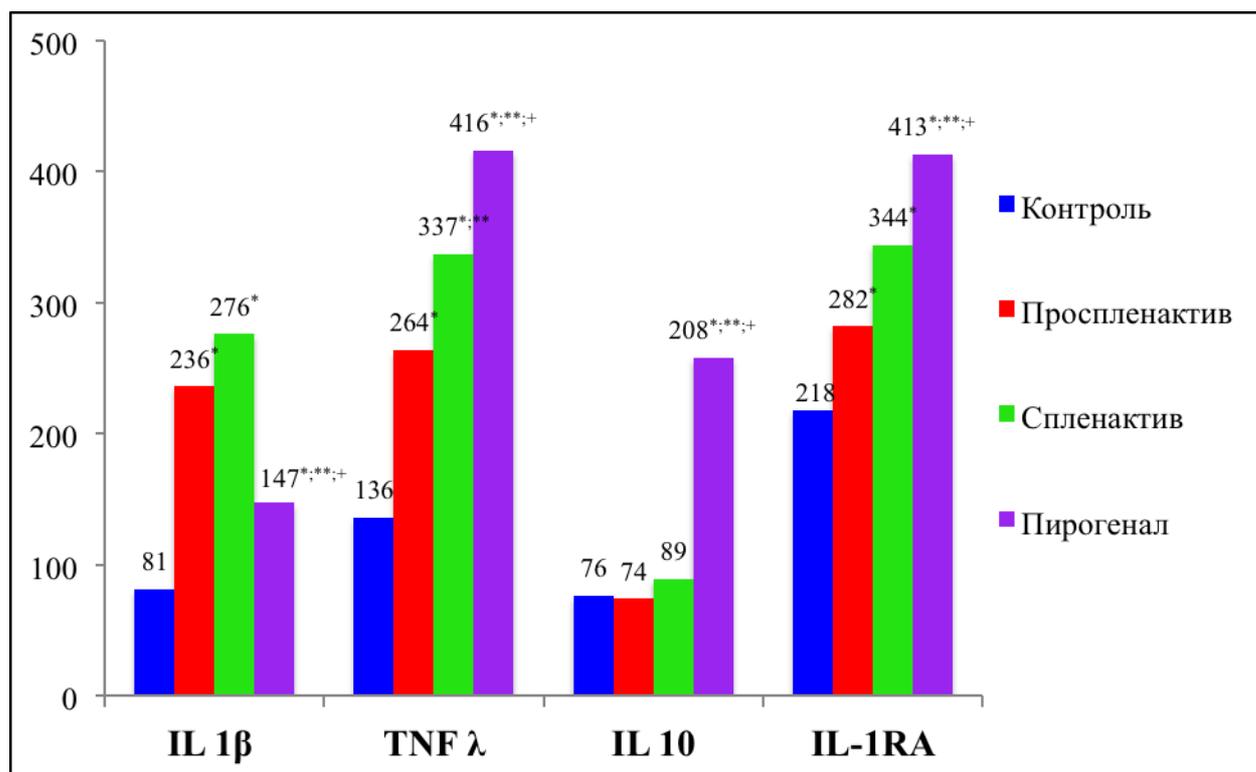


Рис. 8. Влияние препаратов спленактив, проспленактив и пирогенал на продукцию цитокинов. Примечание: концентрации растворов препаратов спленактив и проспленактив в реакционной смеси 3,2 мг/мл и 3,1 мг/мл соответственно изоэквивалентны в пересчете на сырье, концентрация пирогенала – 3,2 мг/мл.

3.5. Влияние препарата спленактив на неспецифическую резистентность к бактериальной инфекции у мышей

Изучение влияния препарата селезенки на неспецифическую резистентность к бактериальной инфекции было проведено на модели экспериментального сепсиса у мышей. В ходе эксперимента было выявлено, что при внутрибрюшинном введении на 3, 4, 5 сутки после заражения мышей летальной дозой *Staphylococcus aureus* спленактив в значительной мере ослаблял развитие смертельной стафилококковой инфекции (таблица 8). В дозе 32,7 мг/кг спленактив повышал выживаемость мышей до 74,3% при 34,3% в контроле.

Таблица 8

Влияние введения препарата спленактив на показатели устойчивости белых беспородных мышей к стафилококковой инфекции

| Группы Животных | Доза препарата, мг/кг | Количество о мышей | Количество выживших мышей | % выживших мышей |
|-----------------|-----------------------|--------------------|---------------------------|------------------|
| Контроль | - | 35 | 12 | 34,3 |
| Спленактив | 32,7* | 35 | 26 | 74,3 |
| Спленопид | 42,7* | 35 | 25 | 71,4 |

* - дозы препаратов спленактив и спленопид изоквивалентны в пересчете на сырье.

В этом эксперименте препарат сравнения спленопид в изоквивалентной дозе 42,7 мг/кг показал статистически не отличающийся результат – 71,4%. То есть оба препарата продемонстрировали высокую и практически одинаковую эффективность в данном тесте (рисунок 9).

Таким образом, спленактив в дозе 32,7 мг/кг повышал устойчивость мышей к смертельной стафилококковой инфекции.

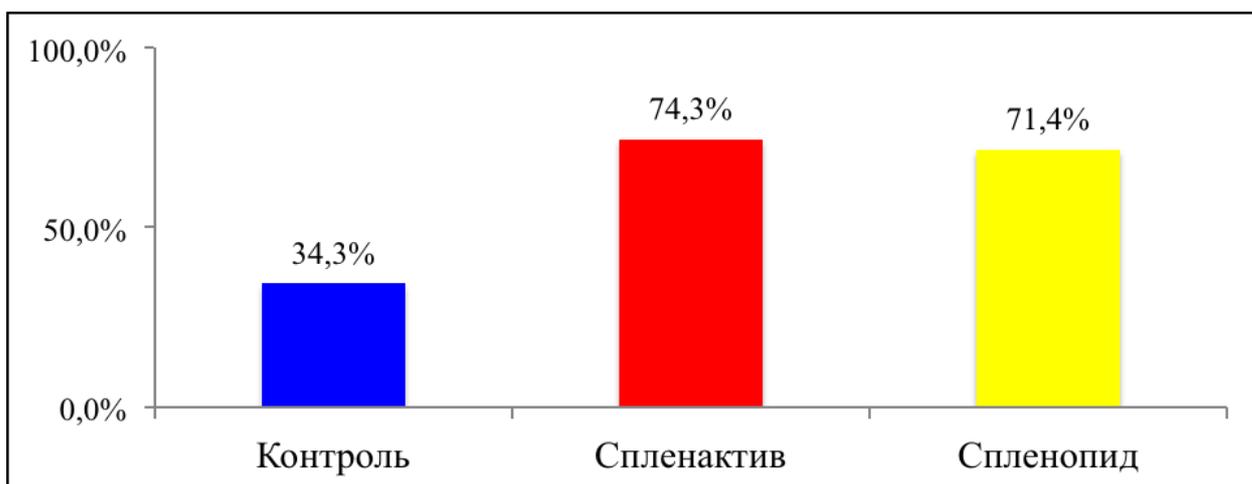


Рис. 9. Влияние препаратов спленактив и спленопид в изоквивалентных дозах в пересчете на сырье (32,7 мг/кг и 42,7 мг/кг соответственно) на выживаемость мышей в условиях модельного бактериального сепсиса в %.

3.6. Эффективность дигидрокверцетина в качестве стабилизатора-антиоксиданта в составе препарата спленактив

В настоящее время для изучения антиоксидантной активности растительного и животного сырья применяются различные модельные системы [Чехани Н.Р. и др., 2012]. Основными компонентами таких модельных систем являются – система генерации радикалов и субстрат или молекула-мишень, которая подвергается свободнорадикальному окислению. Добавление в модельную систему антиоксидантов, перехватывающих свободные радикалы, приводит к уменьшению образования радикалов и торможению окисления субстрата, которое регистрируется с помощью методов полярографии, флуориметрии, спектрофотометрии, хемилюминесценции и т.д.

В проведенном исследовании для оценки антиоксидантной активности препаратов спленактив и проспленактив была использована система АБАП-люминол. Принцип работы этой модельной системы основан на том, что в водной среде АБАП распадается с постоянной скоростью с образованием водорастворимых пероксильных радикалов, индуцирующих окисление люминола (молекулы-мишени). При окислении люминола образуется молекулярный продукт в возбужденном состоянии, который при переходе в основное состояние испускает кванты света (хемилюминесценция). Таким

образом, регистрируя кинетику хемилюминесценции, можно следить за процессом окисления люминола. На рисунке 10 показана типичная кинетика хемилюминесценции системы АБАП-люминол при добавлении к ней образцов исследуемых препаратов. Видно, что введение образцов в модельную систему приводило к ингибированию свечения и появлению латентного периода (τ). Появление латентного периода хемилюминесценции связано с тем, что антиоксиданты, входящие в состав препаратов перехватывают пероксильные радикалы, что вызывает торможение окисления люминола. Как только все антиоксиданты инактивируются, латентный период заканчивается, и процесс окисления люминола продолжается далее.

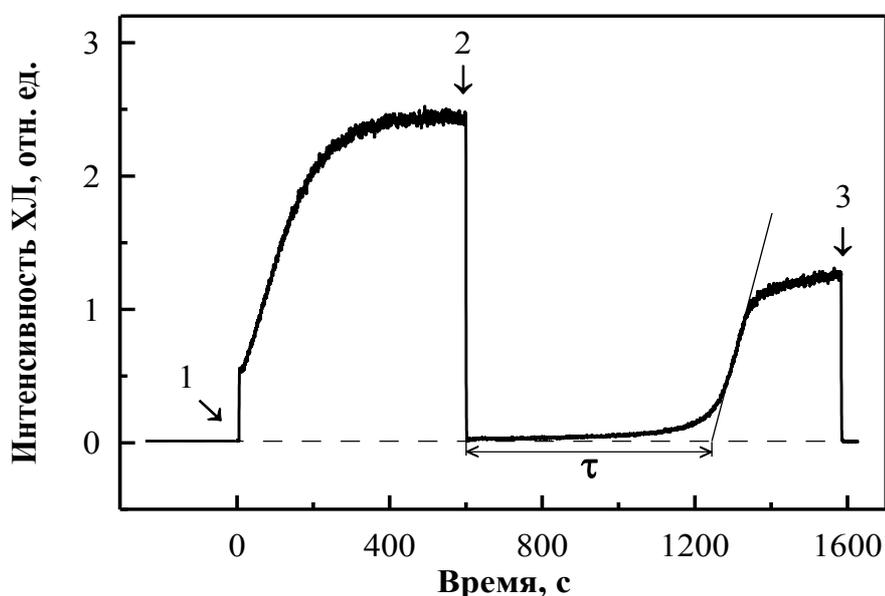


Рис. 10. Типичная кинетика хемилюминесценции системы АБАП-люминол в присутствии исследуемых образцов органолептата.

Обозначения: 1 – введение АБАП; 2 – введение исследуемого образца; 3 – закрытие шторки; τ – латентный период

На рисунке 11 показано влияние препаратов спленактив и проспленактив, а также тролокса на латентный период хемилюминесценции люминола, индуцированной добавлением АБАП. Видно (рисунок 11а), что с увеличением содержания препарата проспленактив в модельной системе латентный период увеличивался прямо пропорционально. Это можно объяснить ингибирующим влиянием на окисление люминола

антиоксидантов, присутствующих в составе органопрепарата и перехватывающих пероксильные радикалы. Известно, что именно по такому механизму действует тролокс [Владимиров Ю.А. и др., 2009], использованный в настоящем исследовании в качестве антиоксиданта сравнения (рисунок 11в). В тоже время обращает на себя внимание тот факт, что тангенс угла наклона прямой, соответствующей препарату проспленактив до хранения, был значительно больше тангенса угла наклона прямой, которая соответствует препарату проспленактив после его хранения в течение 2-х лет. Это говорит о том, что радикал-перехватывающая способность исходного препарата проспленактив выше его радикал-перехватывающей способности после 2-летнего хранения. При добавлении в модельную систему препарата спленактив (рисунок 11б) наблюдаемые зависимости изменения латентного периода от концентрации органопрепарата, также носили линейный характер. Однако, в отличие от проспленактива, влияние спленактива на латентный период окисления люминола оставалось прежним даже после хранения этого препарата в течение 2-х лет.

На основании полученных результатов были рассчитаны значения антиоксидантной активности препаратов спленактив и проспленактив (таблица 9). Из таблицы видно, что исходное значение антиоксидантной активности препарата спленактив было в 87 раз выше, чем у проспленактив ($p < 0,01$). После 2-летнего хранения антиоксидантная активность препарата спленактив практически не изменилась, тогда как антиоксидантная активность препарата проспленактив уменьшилась в 10 раз по отношению к исходному уровню ($p < 0,01$). Полученный результат, по-видимому, связан с тем, что в процессе хранения препарата проспленактив происходит активация свободнорадикальных реакций. Это приводит к окислению содержащихся в нем различных биологических субстратов, в том числе антиоксидантов, и уменьшению латентного периода хемилюминесценции люминола, индуцированной АБАП.

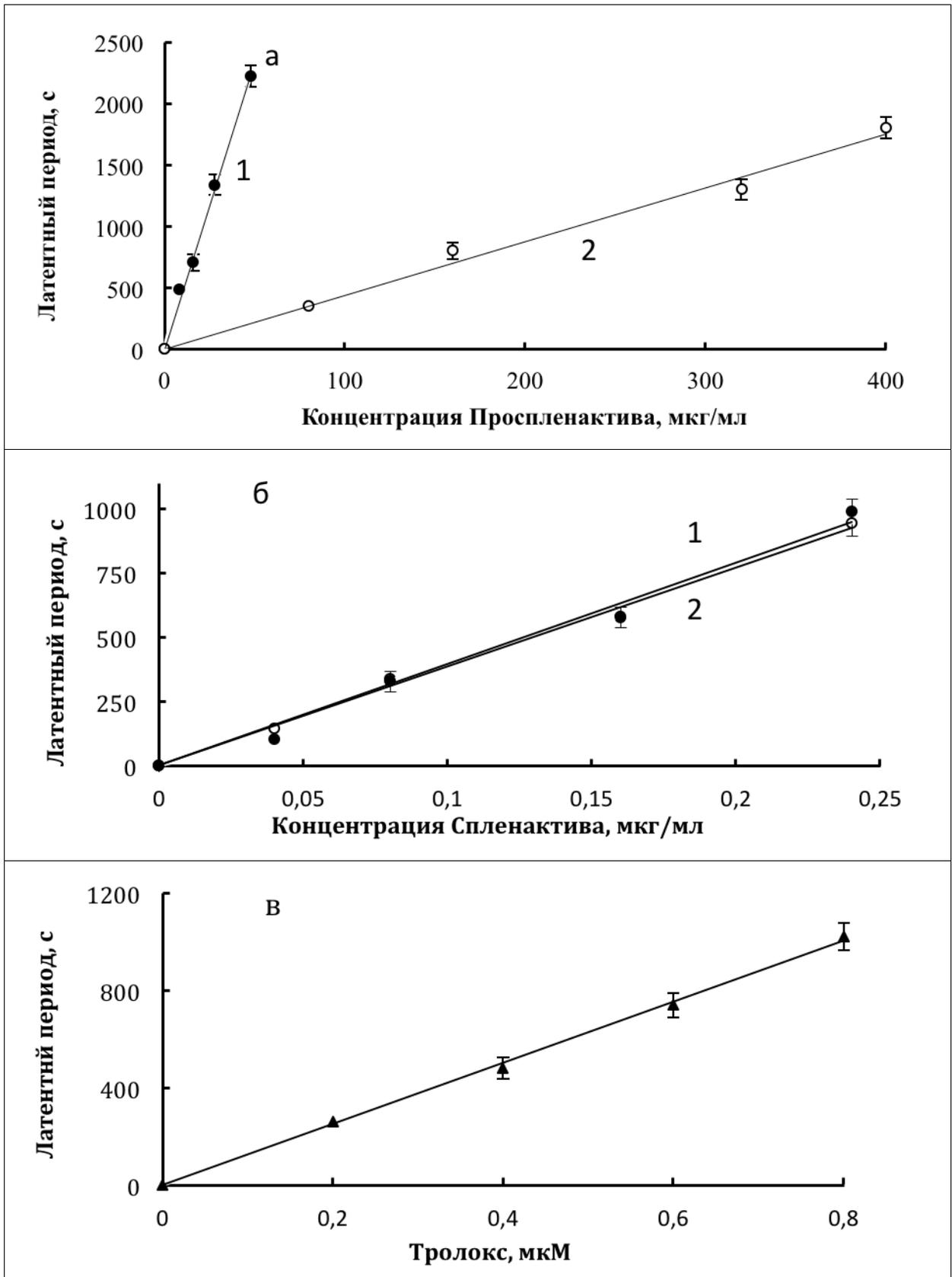


Рис. 11. Изменение латентного периода хемилюминесценции люминола, индуцированной с помощью АБАП, в присутствии органопрепаратов проспленактива (а), спленактива (б) и тролокса (в). 1 – до хранения органопрепаратов; 2 – после хранения органопрепаратов в течение 2-х лет.

В то же время дигидрохверцетин, присутствующий в препарате спленактив, защищает входящие в его состав биологически активные вещества от свободнорадикального окисления, поэтому существенного изменения антиоксидантных свойств этого препарата за исследованный интервал времени хранения не наблюдается.

В качестве одного из индикаторов свободнорадикальных реакций в препаратах спленактив и проспленактив было использовано перекисное окисление липидов. Об интенсивности этого процесса в исследованных препаратах судили по содержанию в них малонового диальдегида (таблица 9) [Банкова И.В., 1990].

Исходно содержание малонового диальдегида в обоих препаратах не различалось. После хранения в течение 2-х лет содержание малонового диальдегида в препарате проспленактив увеличилось в 2 раза, а в спленактиве в только 1,1 раза по отношению к исходному уровню ($p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно) (рисунок 12). Таким образом, дигидрохверцетин практически полностью ингибировал развитие реакций перекисного окисления липидов в процессе хранения препарата спленактив.

Таблица 9

Антиоксидантная активность препаратов спленактив и проспленактив и содержания в них малонового диальдегида ($M \pm m$)

| Органопрепараты | Антиоксидантная активность, мкмоль/г | | Малоновый диальдегид, нмоль/г | |
|-----------------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| | Исходно | После 2-х лет хранения | Исходно | После 2-х лет хранения |
| Проспленактив | 36,0 ± 1,7 | 3,5 ± 0,2 ^{**} | 2,24 ± 0,01 | 4,47 ± 0,01 ^{**} |
| Спленактив | 3158,7 ± 157,9 | 3078,2 ± 153,9 | 2,23 ± 0,01 | 2,46 ± 0,01 [*] |

Примечание: * – $p < 0,05$ и ** – $p < 0,01$ по отношению к исходному значению соответствующего показателя.

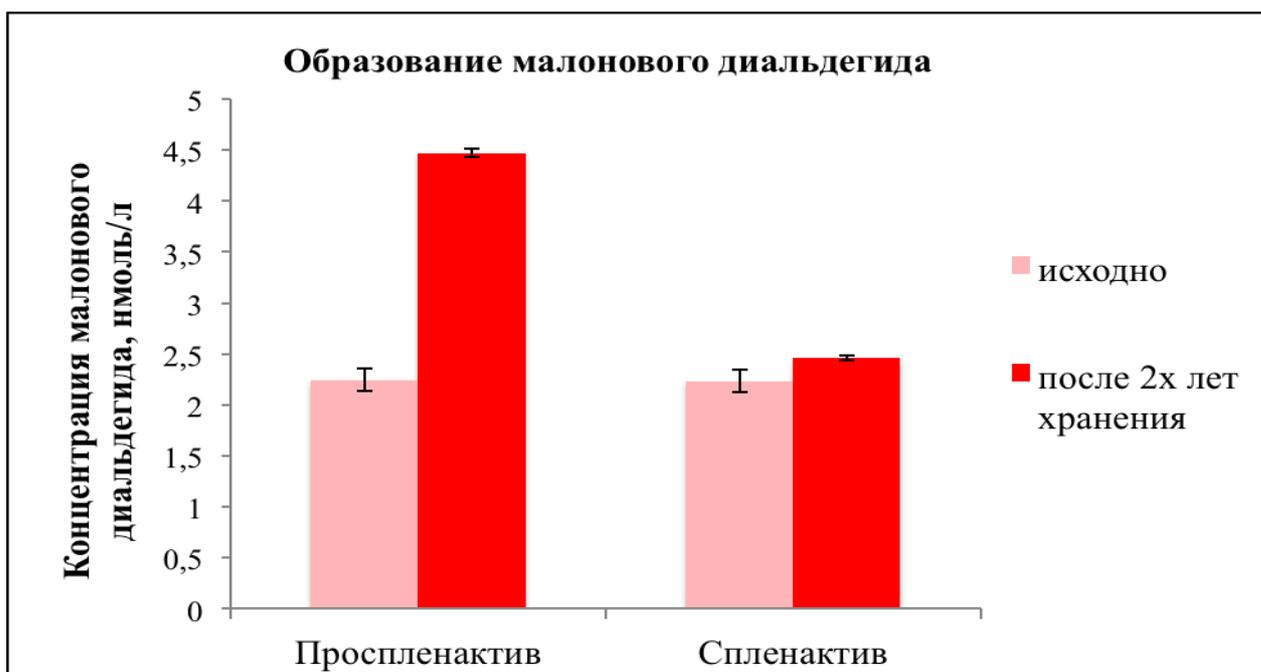


Рис. 12. Накопление малонового диальдегида в процессе 2-летнего хранения в препаратах спленактив и проспленактив

3.7. Изучение острой токсичности препаратов спленактив и проспленактив

В ходе исследования безопасности изучаемых препаратов селезенки крупного рогатого скота по показателю острой токсичности при внутримышечном введении была испытана максимальная технически возможная доза обоих препаратов — 5733 мг/кг. Уже для обеспечения этой дозы раствор препаратов представлял собой густую пастообразную массу и с трудом проходил через инъекционную иглу. Более высокие дозы препаратов без нарушения требований по максимально допустимому для введения объёму – до 0,5 мл ввести животным не представлялось возможным [Миронов А.Н., 2012]. Параллельно животным контрольной группы в изоэквивалентных объемах вводили 0,9% раствор натрия хлорида для инъекций (таблица 10).

При наблюдении за животными в течение 14 дней не было обнаружено заметных изменений в состоянии животных. Ни одно животное не погибло. Изменения массы тела не было зарегистрировано. Кожный и шерстяной

покров был в прежнем состоянии. Поведение животных и потребление ими пищи не изменялось.

Таблица 10

Выживаемость мышей при изучении острой токсичности препаратов спленактив и проспленактив при внутримышечном введении

| Препарат | Доза, мг/кг | Количество мышей в группе | Количество погибших мышей в группе | % погибших мышей |
|------------------------------|-------------|---------------------------|------------------------------------|------------------|
| Контроль (NaCl 0,9% раствор) | - | 20 | 0 | 0% |
| Спленактив | 5733 | 20 | 0 | 0% |
| Проспленактив | 5733 | 20 | 0 | 0% |

Таким образом, ЛД₅₀ спленактива и проспленактива для мышей при внутримышечном введении определить не удалось, однако она более 5733 мг/кг. То есть изученные препараты селезенки являются как минимум малотоксичными.

3.8. Аллергизирующее действие спленактива.

Реакция системной анафилаксии (анафилактический шок)

При постановке реакции общей анафилаксии (анафилактического шока) было обнаружено, что в группе «контроль №2» (с положительным контролем) у всех морских свинок сенсibilизированных БКЯ при введении разрешающей дозы овальбумина развивалась анафилактическая реакция. При этом индексы по Вейглю распределились следующим образом:

| № п/п | Самцы | Самки |
|-------|-------|-------|
| № 1 | 4 | 4 |
| № 2 | 3 | 4 |
| № 3 | 4 | 2 |
| № 4 | 3 | 2 |

Средний индекс по Вейглю в группе «контроль №2» (положительный контроль) составил 3,25.

В группе «контроль №1» (с отрицательным контролем) разрешающая инъекция препарата спленактив в дозе равной 10ЭТД не вызывала проявления анафилактической реакции ни у одного из животных. Индексы по Вейглю для каждого животного были равны 0. Средний индекс по Вейглю в группе «контроль №1» составил 0.

В группе «1ЭТД», которой вводили одну терапевтическую дозу препарата спленактив, индексы по Вейглю распределились следующим образом:

| № п/п | Самцы | Самки |
|-------|-------|-------|
| № 1 | 2 | 0 |
| № 2 | 0 | 1 |
| № 3 | 1 | 1 |
| № 4 | 1 | 1 |

Средний индекс по Вейглю в группе «1ЭТД» (терапевтическая доза) составил 0,88.

В группе «10ЭТД», которой вводили 10-кратную терапевтическую дозу препарата спленактив, индексы по Вейглю распределились следующим образом:

| № п/п | Самцы | Самки |
|-------|-------|-------|
| № 1 | 2 | 1 |
| № 2 | 3 | 2 |
| № 3 | 2 | 2 |
| № 4 | 1 | 1 |

Средний индекс по Вейглю в опытной группе «10ЭТД» (10-кратная терапевтическая доза) составил 1,75.

Анализируя результаты изучения анафилактогенной активности препарата спленактив можно отметить, что при использовании терапевтической дозы препарата (группа «1ЭТД») наблюдалось слабое проявление аллергенного действия – индекс по Вейглю составил 0,9 (Таблица 11). При увеличении дозы в 10 раз (группа «10ЭТД») проявление

анафилактогенной активности достоверно повышалось ($p \leq 0,05$) – средний индекс по Вейглю составил 1,8. Однако индексы Вейгля у животных групп «1ЭТД» и «10ЭТД» были достоверно ниже, чем в группе с положительным контролем (группа «контроль №2»). Разрешающая инъекция препарата спленактив в дозе 10ЭТД морским свинкам получавшим только изотонический раствор хлорида натрия (группа «контроль №1») не вызывала никаких проявлений анафилактической реакции.

Таблица 11

Влияние препарата спленактив на интенсивность анафилактического шока у морских свинок

| Группы | Число животных в группе | Индекс реакции по Weigle |
|---------------|-------------------------|--------------------------|
| «1ЭТД» | 8 | 0,9* |
| «10ЭТД» | 8 | 1,8*,** |
| «контроль №1» | 8 | 0 |
| «контроль №2» | 8 | 3,3 |

Примечание: * - достоверность различий с группами «контроль №1», «контроль №2» при $p \leq 0,01$ (критерий Вилкоксона-Манна-Уитни); ** - достоверность различий с группой «1ЭТД» при $p \leq 0,05$ (критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Таким образом, в данном исследовании препарат спленактив проявил относительно низкую анафилактогенную активность.

ГЛАВА 4.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе изучения состава нового лекарственного средства из селезенки свиней и крупного рогатого скота было обнаружено и оценено количественное содержание ряда биологически активных веществ пептидной природы, которые по нашему мнению могут отвечать за его фармакологическую активность. Так, с помощью метода ВСА (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, "Sigma", США) [Smith P.K., 1985] было определено содержание общего белка в препаратах спленактив и проспленактив из селезенки свиней (112 мг/фл и 108 мг/фл соответственно), а также спленактив и проспленактив из селезенки крупного рогатого скота (110 мг/фл и 109 мг/фл).

Метод капиллярного электрофореза в этих препаратах были обнаружены, вещества белковой природы с мажорными компонентами с молекулярными массами от 12,1 кДа до 44 кДа и минорными компонентами с молекулярными массами от 10,4 кДа до 74 кДа в препаратах из селезенки свиней и селезенки крупного рогатого скота.

Методом иммуноферментного анализа в пептидной фракции препаратов спленактив и проспленактив были идентифицированы и определены относительные количественные содержания некоторых цитокинов, в частности:

1. Провоспалительных цитокинов: интерлейкин 1β (IL- 1β), фактор некроза опухоли α (TNF- α), интерлейкин 6 (IL-6);
2. Противовоспалительных цитокинов: антагонист рецептора интерлейкина 1 (IL1-RA), интерлейкин 4 (IL-4), интерлейкин 10 (IL-10);
3. Регуляторного цитокина: интерлейкин 4 (IL-4);
4. Интерферона: интерферон γ (IFN- γ);
5. Фактора роста: гранулацитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (G-CSF).

Анализ полученных результатов, указывает на незначительную разницу количественного содержания цитокинов в препаратах полученных из селезенки свиней и из селезенки крупного рогатого скота, которая не имеет принципиального значения. При этом содержание цитокинов во всех образцах нового препарата селезенки спленактив в целом было гораздо выше, чем в препарате сравнения – спленопид.

Использование для приготовления препарата селезенки сырья из крупного рогатого скота исключает ряд проблем, связанных с социальными, экономическими и санитарно-ветеринарными условиями применения свиного сырья, а именно: большая вероятность заражения различными заболеваниями, например, африканской чумой свиней; вытекающие из этого карантинные мероприятия, непредсказуемо сокращающие сырьевую базу; уменьшение рынка сбыта препарата за счет лиц, которые не могут принимать свиное сырье по религиозным соображениям. Также исходя из соотношения массы тела свиньи и крупного рогатого скота, следует учитывать, что селезенка крупного рогатого скота в 3,5 раза больше, чем у свиньи, что говорит о преимуществе использования селезенки крупного рогатого скота с экономической точки зрения.

Таким образом, проведенное изучение состава препаратов из разного вида сырья свидетельствует об адекватности и целесообразности замены селезенки свиньи на селезенку крупного рогатого скота.

Следует отметить, что рядом исследователей были также обнаружены цитокины и в других иммуностропных препаратах животного происхождения [Белова О.В., 2007; Казакова Н.Д., 2003; Патент 2491944, 2013].

Оценку биологической активности новых пептидсодержащих препаратов спленактив и проспленактив в модельных системах *in vitro* проводили на изолированных из донорской крови человека нейтрофильных гранулоцитах и макрофагах-моноцитах (ГМК), которые являются высокореактивным фагоцитарным звеном в иммунной системе. Они первые мобилизуются в очаг воспаления и от их фагоцитарной активности во

многим зависит эффективность противомикробного потенциала [Куртасова Л.М. и др., 2009; Нестерова И.В. и др., 2008; Коган А.Х., 1999]. Нейтрофилы воспринимают многочисленные сигналы о нарушении внутренней среды организма и внедрения инфекционных агентов, которые активируют их фагоцитарную функцию и развитие защитных воспалительных реакций. Основными такими реакциями является способность гранулацитарно-макрофагальных клеток к фагоцитозу разных объектов, в первую очередь инфекционных агентов, и внутриклеточную генерацию активных форм кислорода (АФК), опосредующую бактерицидные свойства гранулацитарно-макрофагальных клеток. Одновременно со способностью действовать в качестве клеток-эффекторов и продуцировать цитотоксические молекулы, гранулацитарно-макрофагальные клетки функционируют как регуляторные клетки. Они могут синтезировать широкий спектр различных цитокинов – молекул межклеточных взаимодействий [Сускова В.С., 2012; Кетлинский С.А. и др., 2008; Швыдченко И.Н. и др., 2005; Нестерова И.В. и др., 1999; Ярилин А.А., 1997; Wright H.L., 2010; Kasama T., 2005; Koton T., 2006].

Одним из важных элементов, обеспечивающих неспецифическую резистентность организма, являются фагоциты и осуществляемая ими элиминация антигенов и иммунных комплексов, поэтому определение фагоцитарной активности является важным тестом при определении функционального статуса нейтрофилов.

Влияние на фагоцитарную активность исследуемых препаратов селезенки оценивали по показателям: процент фагоцитоза и фагоцитарное число. При оценке поглотительной способности препараты спленактив и проспленактив в концентрациях 3,2 мг/мл и 3,1 мг/мл соответственно не изменяли процент фагоцитоза, а в концентрации 11,7 мг/мл и 11,5 мг/мл соответственно снижали его до 52% и 48% соответственно при 67% в контроле. При определении фагоцитарного числа наблюдалась такая же обратная дозозависимость, то есть при повышении концентрации исследуемых препаратов эффект понижался. Так, в концентрации 3,2 мг/мл и

11,7 мг/мл фагоцитарное число в тестах со спленактивом было равным 7,0 и 4,2 соответственно, а с проспленактивом в изоэквивалентных концентрациях — 6,7 и 4,6 соответственно при 5,8 в контроле. В научной литературе имеются данные, что при изучении влияния препаратов различных структур на функциональную активность гранулацитарно-макрофагальных клеток в системе *in vitro*, при повышении доз отмечалось снижение интенсивности их метаболизма [Разумная Ф.Г., 2011]. Препарат сравнения спленопид в изоэквивалентных в пересчете на сырье концентрациях в описываемом тесте показал аналогичные результаты без достоверной разницы с препаратами спленактив и проспленактив.

Помимо поглотительной функции гранулацитарно-макрофагальных клеток в процессе фагоцитоза важной является оценка способности фагоцитов убивать поглощенный микроб, или другими словами способность к внутриклеточному киллингу, который является показателем функциональной активности фагоцитарных клеток, определяющей их бактерицидность и исход инфекции [Bogdan C., 2000]. Эта бактерицидность проявляется кислородным взрывом, заключающимся в образовании микробицидных форм кислорода и азота. Гибель микробов в фагосомах фагоцитов происходит за счет кислородзависимых и кислороднезависимых механизмов деградации микроба лизосомальными ферментами [Долгушин И.И., 2001; Нестерова И.В., 1999; Forman H., 2002; Bettridge D.J., 2000]. Эти механизмы использовались для оценки биологической активности препаратов селезенки в процессе изучения влияния их на функции фагоцитов. При изучении кислородзависимых механизмов исследовалась способность лейкоцитов синтезировать активные формы кислорода с помощью НСТ-теста.

В этом исследовании спленактив достоверно повышал продукцию активных форм кислорода гранулацитарно-макрофагальных клеток донорской крови. При этом наблюдалось повышение этого эффекта при повышении концентрации изучаемого препарата в среде культивирования.

Особого внимания заслуживает тот факт, что эффективность спленактива в этом тесте зависела от исходного уровня продукции активных форм кислорода нейтрофилами образца донорской крови. Так, при использовании крови доноров с гипопродукцией АФК спленактив в концентрации 17,6 мг/мл повышал ее продукцию на 111%, с нормопродукцией — на 56%, с гиперпродукцией — 17%. То есть активация кислородопосредованной бактерицидности спленактивом была достоверно выше при ее изначально пониженном уровне, чем при повышенном.

Аналогичным образом проявлял себя и препарат сравнения — спленопид в концентрациях изоэквивалентных в пересчете на сырье. Однако эффект препарата спленактив в ряде случаев достоверно превосходил таковой у спленоида. Так, это наблюдалось у крови доноров с гипопродукцией АФК во всех концентрациях; с нормальной продукцией АФК в концентрациях спленактива 17,6 мг/мл и спленоида 23 мг/мл, спленактива 29,3 мг/мл и спленоида 38,3 мг/мл; а также с гиперпродукцией АФК в аналогичных концентрациях, как и с нормальной продукцией.

Таким образом, и поэтому показателю спленактив проявил модулирующее (нормализующее) действие в отношении функций иммунной системы, которое даже несколько превосходило эффект препарата сравнения спленопид.

При оценке влияния препаратов спленактив и проспленактив на кислороднезависимую активность гранулацитарно-макрофагальных клеток в тесте ЛЗХЛ также было обнаружено их стимулирующее влияние на функциональную активность микрооцидных клеток. Обращает на себя внимание тот факт, что при повышении концентрации препаратов селезенки в среде культивирования вдвое, их активирующее влияние достоверно снижалось: при концентрации спленактива 7,8 мг/мл и проспленактива 7,6 мг/мл, ЛЗХЛ повышалась на 50% и 31% соответственно по сравнению с контролем, а при 14,7 мг/мл и 14,3 мг/мл — на 30% и 12% соответственно.

Это перекликается с данными, полученными при исследовании влияния препарата селезенки на показатели фагоцитарной активности.

Интерес представляет сравнение эффективности действия препаратов селезенки с эффективностью ряда широко используемых иммуномодуляторов в тесте ЛЗХЛ. В этих экспериментах спленактив проявил себя как более эффективный активатор кислороднезависимой активности гранулацитарно-макрофагальных клеток, чем ликопад, интерферон, циклоферон и полиоксидоний.

Таким образом, по результатам проведенных биологических исследований можно утверждать, что исследуемые препараты селезенки увеличивали функциональную активность нейтрофилов. Препараты спленактив и проспленактив влияли как на поглотительную функцию нейтрофилов, так и на кислородопосредованную и кислороднезависимую бактерицидную активность нейтрофилов, что подтверждается тестами НСТ и ЛЗХЛ.

Как было указано ранее в обзоре литературы специфическая фармакологическая активность многих иммуномодулирующих средств связана с регуляцией уровней цитокинов в организме. Поэтому, на наш взгляд, изучение влияния спленактива на продукцию цитокинов изолированными клетками крови при их культивировании является важным звеном при оценке его биологической активности, так как позволяет определить возможный механизм действия исследуемого препарата. От этого зависит оценка перспективности использования препарата спленактив в качестве нового оригинального фармакологического препарата и определение области его применения.

В ходе такого эксперимента был выявлен факт увеличения синтеза некоторых цитокинов изолированными клетками донорской крови при культивировании их в присутствии изучаемого препарата селезенки [Таблица 12].

Так, препарат спленактив достоверно увеличивал продукцию

провоспалительных цитокинов $IL-1\beta$ и $TNF\alpha$ во всех исследованных концентрациях. При этом отмечалась отчетливая зависимость эффекта от дозы: при концентрации спленактива в среде культивирования 0,7 мг/мл, 3,2 мг/мл и 5,9 мг/мл продукция $IL-1\beta$ и $TNF\alpha$ увеличилась на 21% и 63%, на 241% и 148%, 419% и 153% соответственно.

Синтез регуляторного цитокина $IFN-\gamma$ под действием спленактива в этих же концентрациях увеличивался соответственно на 32%, 18% и 180%.

Влияние на продукцию противовоспалительных цитокинов спленактив проявил значительно слабее. Так, уровень $IL-1RA$ увеличивался только при концентрациях спленактива 3,2 мг/мл и 5,9 мг/мл на 58% и 90% соответственно, а $IL-10$ только при концентрации спленактива 5,9 мг/мл на 43% по сравнению со спонтанной продукцией.

Цитокины $IL-1\beta$ и $TNF\alpha$ играют важную роль для развития воспалительных процессов при инфекционной патологии. Они относятся к группе индуцибельных провоспалительных факторов и в норме не должны находиться в крови. Тем не менее в литературе описаны случаи увеличения уровня $IL-1\beta$ в плазме крови при стрессовых ситуациях и тяжелой физической нагрузке [Bandeira–Melo S., 2005]. Присутствие невысоких концентраций этих цитокинов в плазме крови здоровых людей может быть в результате некоторых нормальных физиологических процессов жизнедеятельности организма, либо под влиянием стрессовых факторов неинфекционной природы. Также, в ряде случаев данные уровни цитокинов могут являться проявлением вялотекущих скрытых воспалительных процессов, а также иммунопатологических состояний, включая ранние стадии аутоиммунных и аллергических заболеваний без клинических проявлений [Бережная Н.М., 2007; Останин А.А. и др., 2002].

Характеристики цитокинов, на продукцию которых влияет препарат спленактив в модельной системе *in vitro*

| Цитокины, на продукцию которых влияет препарат спленактив | ММ* (кДа**) | Клетки-продуценты | Основные функции представленных цитокинов |
|---|----------------|---|---|
| 1. Провоспалительные цитокины. | | | |
| Интерлейкин 1 β (IL1 β) | 17 | Моноциты, макрофаги, нейтрофилы, В-лимфоциты, НК, фибробласты | Активация Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, НК ^{***} , клеток эндотелия. Стимуляция продукции IL6 и IL8. |
| Фактор некроза опухоли (TNF α) | 25 | Моноциты-макрофаги, Т-лимфоциты, нейтрофилы, тучные клетки | Индукция экспрессии HLA 2-го класса на клетках; стимуляция активности Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, нейтрофилов, клеток эндотелия; индукция синтеза IL1. |
| 2. Противовоспалительные цитокины. | | | |
| Антагонист рецептора IL1 β (IL1-RA) | 25 | Моноциты-макрофаги | Блокирует рецепторы IL1 β . |
| Интерлейкин 10 (IL10) | 18,6 | Th2, моноциты, цитотоксические (CD8 ⁺), Т-лимфоциты, гепатоциты | Подавление продукции IL1 α , IL1 β , IL6, IL8, TNF α , G-CSF, IL12, p35, IFN γ . Снижение АГ-презентирующей активности моноцитов. |
| 3. Регуляторные цитокины. | | | |
| Интерферон γ (IFN γ) | 20 | Th1, активированные Т-лимфоциты, НК-клетки | Активация и индукция экспрессии HLA-2 класса, на моноцитах, НК, Т-клетках, В-клетках, нейтрофилах, клетках эндотелия и эпителия. Ингибирование синтеза IL10 и IL1RA |

Примечание: * ММ-молекулярная масса; ** кДа-килодальтон; *** НК-натуральные киллеры, **** Th1 - Т-хелперы 1, ***** Th2 – Т-хелперы 2.

IL-1 является ключевым провоспалительным цитокином. Широкий спектр его биологической активности свидетельствует о том, что он является главным медиатором развития как местной воспалительной реакции, так и острофазового ответа на уровне организма. Синтез и инактивация IL-1 происходят быстро, максимальный уровень секреции IL-1 наблюдается через 24-28 часов [Ярилин А.А., 1997]. Одна сравнительно небольшая молекула стимулирует развитие целого комплекса защитных реакций организма, направленных на ограничение распространения инфекции, элиминацию внедрившихся микроорганизмов и восстановление целостности поврежденных тканей. Однако, далеко не всегда IL-1 играет положительную роль в течении заболевания. Нарушение цитокинового баланса в сторону гиперпродукции IL-1 сопровождается избыточными симптомами воспаления, а порой является центральным звеном патогенеза многих известных заболеваний. Гиперпродукция IL-1 на местном уровне приводит, например, к разрушению костной ткани при ревматоидном артрите; на системном уровне — к катастрофическому нарушению гемодинамики и часто — к летальному исходу. Содержание IL-1 β , доминирующей секреторной формы IL-1 у человека, в плазме крови здорового человека составляет 0–50 пг/мл [Данилов Л.П. и др., 2003; Варюшина Е.А. и др., 2000; Dinarello C., 1994; Cannon J.G., 1988].

Тот факт, что спленактив показал низкую стимулирующую активность на синтез противовоспалительных цитокинов, а в низких концентрациях даже имелась тенденция к снижению по сравнению с контролем (IL-10), можно расценивать как положительный для оценки препарата с позиций иммуномодулирующего средства, которое можно использовать в комплексной антицитокиновой терапии. IL-10 является важным иммунорегуляторным, противовоспалительным цитокином, главной функцией которого является ограничение и купирование воспалительного процесса, в результате повышения его содержания в патологическом очаге и крови [Razavi, N.L., 2009; Nagalakshmi M., 2004; Dumoutier L. et al., 2002;

Cogos C., 2000]. IL-10 является ингибитором клеточного иммунитета, подавляет продукцию провоспалительных цитокинов, предотвращает дифференцировку моноцитов в тканевые макрофаги и апоптоз, усиливает дифференцировку В-клеток в плазматические клетки, продуцирующие IgM3 в комбинации с IL-4 индуцирует IgG4 и подавляет синтез IgE. Несмотря на то, что IL-10 в ряде случаев ингибирует кооперацию Т-клеток и В-клеток, в целом он усиливает функциональную активность В-лимфоцитов посредством активации Th2. В связи с этим IL-10 нельзя считать полностью иммуносупрессивным цитокином. Помимо В-лимфоцитов IL-10 активирует NK-клетки, увеличивая их цитотоксичность, усиливает продукцию IL-2, TNF α и IFN- γ [Кетлинский С.А., 2002; Jones, S., 2005; Nagalakshmi M. et al., 2004; Dumoutier L., 2002; Moore K., 2001; Mattner J. et al., 2000; Deonarain R., 2000].

IL-1RA относится к семейству интерлейкина 1, взаимодействует с тем же рецептором, что и сам IL-1, но не вызывает дальнейшего проведения внутриклеточного сигнала. Продукцию IL-1RA стимулируют многие цитокины, вирусные продукты и белки острой фазы, показывая этим, что IL-1RA может активно экспрессироваться в воспалительных очагах при множестве хронических заболеваний. IL-1RA играет важную роль в защите от инфекции и ограничении дальнейшего повреждения пораженных тканей, выступает в качестве эндогенного противовоспалительного агента при ишемических поражениях головного мозга, воспалительных заболеваниях кишечника, бронхиальной астме, пиелонефрите и при беременности у здоровых женщин [Симбирцев А.С., 2004, 2002; Liles W.C., 1995].

Регуляторный цитокин IFN- γ является главным медиатором клеточного иммунитета. Этот цитокин синтезируется Т-лимфоцитами 1-го типа и играет главную роль в качестве макрофаг-активирующего фактора, стимулятора функциональной активности Т-лимфоцитов киллеров и NK-клеток. В клинической практике изучение уровня IFN- γ важно при инфекциях, вызванных внутриклеточными патогенами, а также при ряде аутоиммунных

процессов с преимущественной активацией Т-хелперов 1-го типа. Врожденные дефекты гена IFN- γ приводят к нарушению устойчивости организма к некоторым микроорганизмам, тогда как избыточная продукция в рамках синдрома острой гиперцитокинемии вызывает кровотечения и смертельный шок [Родионова О.Н., 2011; Пигаревский П.В. и др., 2010; Кетлинский С.А., 2002; Лыков А.Н. и др., 2001; Asseline-Paturel C., 2001; Ryman K.D., 2000; Romagnani S., 1997].

Анализ результатов сравнительного изучения органопрепаратов селезенки спленактива и проспленактива, а также признанного стимулятора продукции цитокинов — пирогенала по влиянию на цитокиногенез выявил особенности в их действии. Так, пирогенал в значительно большей мере повышал продукцию TNF α и IL-1RA, чем препараты селезенки, хотя и меньше стимулировал синтез IL-1 β . Если спленактив и проспленактив не влияли в испытанной концентрации на продукцию IL-10, то пирогенал повышал ее на 174%.

То есть, соотношение активаций синтеза различных цитокинов пирогеналом говорит о меньшей избирательности его иммуномодулирующего действия. Большая продукция противовоспалительных цитокинов, меньшая провоспалительного IL-1 β , чем у спленактива и проспленактива, по-видимому, могут быть причиной меньшей иммуномодулирующей эффективности пирогенала по сравнению с препаратами селезенки. Однако это предположение требует дальнейшего изучения.

Таким образом, проведенное исследование показало, что спленактив — полипептидный препарат селезенки, который может оказывать биологические эффекты за счет активации цитокиногенеза. Это может являться механизмом, обеспечивающим его влияние на воспалительные реакции на ранних этапах инфекционного процесса, а также стимулировать функциональную активность клеточных эффекторов врожденного и адаптивного иммунитета, что определяет стратегию возможного

использования спленактива в качестве иммуномоделирующего средства.

Способность препарата спленактив повышать неспецифическую резистентность к бактериальной инфекции была показана на модели *in vivo*. Любопытно, что в этом тесте спленактив показал аналогичные результаты, что и ранее зарегистрированный препарат селезенки животных — спленопид.

Одной из проблем производства, хранения и применения препаратов животного происхождения является их стабильность, в частности защита от перекисного окисления. Решение этой проблемы лежит в использовании стабилизаторов-антиоксидантов. К числу таких антиоксидантов относится дигидрокверцетин, богатым сырьем для промышленного получения которого служит древесина лиственницы. Как указывалось ранее, в настоящее время дигидрокверцетин достаточно широко используется в медицине в качестве лекарственного средства. А также благодаря своим высоким антиоксидантным свойствам с успехом применяется в качестве вспомогательного вещества при производстве пищевых продуктов. При этом фактов его применения в лекарственных препаратах в этом качестве в доступной литературе нами не было обнаружено. Однако учитывая приведенные достоинства дигидрокверцетина представляется перспективным внедрение его в качестве стабилизатора-антиоксиданта при производстве препаратов животного происхождения.

Данные, полученные при изучении антиоксидантных свойств дигидрокверцетина в составе препарата спленактив свидетельствуют о его выраженном стабилизирующем действии.

Дигидрокверцетин практически полностью ингибировал перекисные процессы, идущие в органопрепарате селезенки в течение 2-летнего хранения. Этот вывод был сделан на основании того, что значение антиоксидантной активности препарата спленактив (в состав которого входит дигидрокверцетин) к концу срока хранения практически не отличалось от его показателя сразу после изготовления, а уровень малонового диальдегида увеличился лишь на 10%. В то же время у

проспленактива (не содержащего дигидрокверцетин) за этот же период антиоксидантная активность уменьшилась в 10 раз, а содержание малонового диальдегида увеличилось вдвое.

Механизм ингибирования свободнорадикальных реакций, в том числе реакций перекисного окисления липидов, в присутствии дигидрокверцетин может быть различным. Известно, что он обладает способностью взаимодействовать с липидными радикалами [Владимиров Ю.А., 2009; Бабенкова И.В. и др., 2003] и активными формами кислорода, например гидроксильными и супероксидными радикалами, а также хелатировать ионы металлов переходной валентности [Костюк В.А., 2004].

Из проведенных сравнительных исследований препаратов селезенки, содержащего в качестве стабилизатора-антиоксиданта дигидрокверцетин (спленактив) и без него (проспленактив) не выявлено фактов негативного влияния дигидрокверцетина на исследованный препарат.

Не было обнаружено принципиальной разницы в качественном и количественном составе препаратов спленактив и проспленактив. Также при исследовании иммуностропных свойств обоих препаратов в модельных системах *in vitro* эффективность и активность спленактива не уступали, а по ряду тестов даже превосходили препарат, не содержащий дигидрокверцетин.

Это было зафиксировано при изучении влияния препаратов спленактив и проспленактив на кислоронезависимую активность гранулацитарно-макрофагальных клеток в тесте ЛЗХЛ. Значение ЛЗХЛ в тестах со спленактивом в концентрациях 7,8 мг/мл и 14,7 мг/мл были выше контрольного на 50% и 31% соответственно, при значениях у проспленактива в концентрациях 7,6 мг/мл и 14,3 мг/мл больше контрольного на 30% и 12% соответственно.

Также спленактив превосходил проспленактив по активирующему влиянию на продукцию TNF α в концентрации 3,2 мг/мл: проспленактив повышал уровень TNF α в среде культивирования на 94%, а спленактив — на 148%.

Таким образом, результаты, полученные в нашем исследовании, показывают, что дигидрокверцетин эффективно защищал органопрепарат селезенки спленактив, и по крайней мере, не снижал его фармакологической активности. Все это, с учетом низкой токсичности дигидрокверцетина, а также доступности сырьевой базы создает хорошие перспективы для его использования в качестве стабилизатора-антиоксиданта при создании новых органопрепаратов.

По результатам изучения безопасности по показателю острой токсичности спленактив показал себя по крайней мере малотоксичным препаратом: его ЛД₅₀ для мышей при внутримышечном введении была значительно выше 5733 мг/кг. То есть изученные препараты селезенки являются как минимум малотоксичными. Следует отметить, что в данном исследовании не было зафиксировано никаких различий в токсичности препаратов спленактив и проспленактив, то есть не было отмечено влияние дигидрокверцетина на безопасность препарата селезенки. При изучении алергизирующего действия спленактива по реакции системной анафилаксии (анафилактический шок) препарат проявил достаточно низкую анафилактогенную активность.

Подводя итоги экспериментального изучения нового органопрепарата спленактив, можно отметить, что по результатам всех проведенных исследований, наиболее перспективным иммуномодулирующим препаратом является спленактив, полученных из селезенки крупного рогатого скота с добавлением дигидрокверцетина.

ВЫВОДЫ

1. Новый комплекс биологически активных соединений, представляющий собой лиофилизированный гомогенат ткани селезенки свиней и крупного рогатого скота спленактив, содержит пептидную фракцию с молекулярной массой от 10 кДа до 74 кДа, в состав которой входит ряд природных биологически активных веществ – цитокинов.
2. Спленактив проявил достоверную иммуностропную активность в исследованиях в модельных системах *in vitro*, что проявлялось в повышении им фагоцитарной и бактерицидной активности изолированных нейтрофилов; в повышении синтеза цитокинов клетками донорской крови при инкубировании со спленактивом. В использованных тестах спленактив, по крайней мере, не уступал по своей эффективности препаратам сравнения.
3. Спленактив достоверно повышал неспецифическую резистентность организма к бактериальной инфекции на модели экспериментального сепсиса у мышей. Это проявилось в увеличении показателя выживаемости зараженных мышей с 34,3% в контроле до 74,3% в группе получавшей спленактив, что практически не отличается от результата препарата сравнения спленопида (72,4%).
4. Дигидрокверцетин проявил себя высокоэффективным и перспективным стабилизатором-антиоксидантом в составе органопрепарата селезенки, не ухудшающим его фармакологические свойства. Об этом свидетельствует полное сохранение антиоксидантной активности спленактива в течение 2х лет хранения (при снижении этого показателя в 10 раз у проспленактива, который не содержит в своем составе дигидрокверцетин), а также повышение содержания в нем малонового диальдегида после 2-летнего хранения лишь на 10% (в то время, как без дигидрокверцетина оно возрастает на 100% по сравнению с исходным содержанием).
5. Спленактив показал себя малотоксичным соединением при однократном внутримышечном введении мышам. Его ЛД₅₀ была выше 5733 мг/кг. По

результатам исследования с помощью теста реакции общей анафилаксии (анафилактический шок) спленактив проявил достаточно низкую анафилактогенную активность.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Спленактив, представляющий собой лиофильно высушенный экстракт селезенки крупного рогатого скота с использованием антиоксиданта дигидрохверцетина, рекомендуется для дальнейшего доклинического изучения с целью внедрения его в клиническую практику в качестве эффективного и безопасного иммуномодулирующего средства. Рекомендуется также расширить применение дигидрохверцетина в качестве антиоксиданта-стабилизатора в составе других лекарственных препаратов, в частности препаратов животного сырья.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева, Ж. И. Общие принципы разработки программы доклинических иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов генной инженерии / Ж. И. Авдеева, Р. А. Волкова, Н. А. Алпатова, И. В. Борисович // Цитокины и воспаление. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 5 – 10.
2. Арион, В. Я. Иммунологические свойства препаратов из кожи / В. Я. Арион [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. – Т. 129, № 2. – С. 194 – 197.
3. Арион, В. Я. Тактивин (Т-активин) и его иммунобиологическая активность // Иммунобиология гормонов тимуса: Под ред. Ю. А. Гриневича и В. Ф. Чеботарева. Киев: Здоровья, 1989. – С. 103 – 125.
4. Бабенкова, И. В. Механизм ингибирующего действия дигидрокверцетина на процесс пероксидного окисления фосфолипидов мембран // И. В. Бабенкова, Ю. О. Теселкин, Л. Б. Ребров [и др.] // Биомед. радиоэлектрон. Биомед. технол. и радиоэлектрон. – 2003. – №6. – С. 37 – 43.
5. Банкова, В. В. Роль малонового диальдегида в регуляции перекисного окисления липидов в норме и патологии: Автореферат дис. ... д-ра биол. наук / Банкова Валентина Васильевна. – М., 1990. – 38 с.
6. Белова, О.В. Иммуностропные препараты из кожи. Разработка методов получения, физико-химическая и иммунобиологическая характеристика и перспектива клинического применения. // Дисс. ... докт. биол. наук: 14.00.36 – М., 2007. – 320 с.
7. Бельмер, С. В. Значение цитокинов в патогенезе воспалительных заболеваний толстой кишки у детей / С. В. Бельмер, А. С. Симбирцев, О. В. Головенко [и др.] // РМЖ, 2003. – Т. 11 – С. 116 – 121.
8. Бережная, Н. М. Цитокиновая регуляция при патологии: стремительное развитие и неизбежные вопросы // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 26 – 35.

9. Беркасова, Н. Л. Влияние миелопептидов на иммунный ответ и морфометрические проявления воспаления при экспериментальном проникающем ранении глаза / Н. Л. Беркасова, Т. В. Гаврилова, Ю. И. Шилов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - М.: РАМН, 2008. - Том 145, № 3. - С. 313-315.
10. Богомилский, М. Р. Клинико-иммунологическое обоснование применения топического бактериального иммунокорректора ИРС-19 для профилактики заболеваний верхних дыхательных путей у детей / М. Р. Богомилский, Т. П. Маркова, Т. И. Гаращенко [и др.] // Детский доктор. – 2000. – № 5. – С. 4 – 7.
11. Борисов, А. Г. К вопросу о классификации нарушений функционального состояния иммунной системы / А. Г. Борисов, А. А. Савченко, С. В. Смирнов // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – № 3. – С. 13 – 18.
12. Борщикова, Т. И. Функциональный профиль цитокинов и иммунологическая дисфункция у нейрореанимационных больных / Т. И. Борщикова, Н. Н. Елифанцева, Ю. А. Чурляев [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2011. – Т. 10, № 2. – С. 42 – 49.
13. Бочаров, О. А. Фитоадаптогены в онкологии и геронтологии (на примере изучения Фитомакса-40) / О. А. Бочаров, А. Ю. Барышников, М. И. Давыдов // МИА. – 2008. – 224 с.
14. Бояджян, А. С. Интерлейкины и хемокины при остром ишемическом инсульте, отягощенном и не отягощенном диабетом / А. С. Бояджян, Э. А. Аракелова, В. А. Айвазян [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2008. – Т. 7, № 1. – С. 40 – 43.
15. Бутенко, Г. М. Проблема оценки иммунного статуса человека и возрастные изменения иммунитета // Иммунология. – 1993. – №4. – С. 4 – 6.
16. Варюшина, Е. А. Изучение механизмов местного иммуностимулирующего действия интерлейкин – 1 бета. Усиление функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов человека в очаге

- воспаления под влиянием интерлейкина – 1 бета / Е. А. Варюшина, В. Г. Конусова, А. С. Симбирцев [и др.] // Иммунология. – 2000. – № 3. – С. 18 – 22.
17. Василенко, А.М. Цитокины в сочетанной регуляции боли и иммунитета / А. М. Василенко, Л. А. Захарова // Усп. совр. биол. – 2000. – Т. 120, № 2. – С. 174 – 189.
18. Васильченко, А. В. Применение экстракорпорального подключения донорской селезёнки свиньи и спленоперфузата в комплексном лечении хронических язв двенадцатиперстной кишки: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / Васильченко Андрей Владимирович – М., 1996. – С.171.
19. Владимиров, Ю. А. Активные формы кислорода и азота: значение для диагностики, профилактики и терапии // Биохимия. – 2004. – Т. 69, вып. 1. – С. 5 – 7.
20. Владимиров, Ю.А. Дигидрокверцетин (таксифолин) и другие флавоноиды как ингибиторы образования свободных радикалов на ключевых стадиях апоптоза / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурина, Е. М. Демин // Биохимия. – 2009. – Т.74. – №3. – С. 372 – 379.
21. Геворкян, С.К. Влияние экстрактов селезёночных клеток на иммуногенез у необлучённых и облучённых мышей. Автореферат канд. мед. наук. – М., 1997. – С.134.
22. Геннадиник, А. Г. Роль цитокинов в развитии метаболических нарушений у больных с синдромом инсулинорезистентности / А. Г. Геннадиник, А. А. Нелаева // Ожирение и метаболизм. – 2006. – № 4. – С. 47 – 49.
23. Георгиевский, В.П. Новые подходы к стандартизации суммарных лекарственных препаратов растительного и животного происхождения / В. П. Георгиевский, Ю. В. Подпружников, Л. М. Лысоченко // Материалы II Международного съезда «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». – С-Пб, 1998. - С. 100 – 104.

24. Грищенко, Н. Г. Результаты применения фармакологического препарата экстракта плаценты при экстракорпоральном оплодотворении у женщин, перенесших хронические воспалительные заболевания органов малого таза / Н. Г. Грищенко // Медико-социальные проблемы семьи. – Т. 18. – 2013.
25. Гусева, С. И. Оценка эффективности, безопасности и разработка параметров стандартизации нового лекарственного препарата на основе шлафея и эхиноцеи / Дисс ... канд. биол. наук – СПб. – 2010. – 160 с.
26. Гуськова, Т.А. / Классификация лекарственных средств по параметрам токсичности // IV съезд токсикологов России, 6-8 ноября 2013 г. Москва. Сборник трудов / Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – М., Изд-во Capital Press, 2013. – С.166-167.
27. Данилов, Л.П. Влияние рецепторного антагониста IL-1 на развитие оксидативного стресса легких / Л. П. Данилов, Е. С. Лебедева, И. В. Двораковская // Цитокины и воспаление. – 2003. – Т. 2, № 4, – С. 14 – 20.
28. Дейл, М. М. Руководство по иммунофармакологии / М. М. Дейл, Дж. К. Формена // М.: Медицина. – 1998. – 332 с.
29. Демин, В. А. Профилактика сальмонеллеза и желудочно-кишечных заболеваний поросят с применением формолянтарного спленолизата: автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Курск, 2006. – С. 22.
30. Демьянов, А. В. Диагностическая ценность исследований уровней цитокинов в клинической практике / А. В. Демьянов, А. Ю. Котов, А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2003. – Т. 2, № 3. – С. 20 – 33.
31. Добрица, В. П. Современные иммуномодуляторы для клинического применения / В. П. Добрица, Н. М. Ботерашвили, Е. В. Добрица // Руководство для врачей. – СПб., 2001. – 249 с.
32. Добротина, Н.А. Влияние полиоксидония и нативных иммуномодуляторов на иммунологические реакции *in vitro* / Н. А. Добротина, М. В. Прохорова, Ж. А. Казацкая // Иммунология. – 2005. – № 3.

– С. 152 – 156.

33. Долгушин, И.И. Нейтрофилы и гомеостаз / И. И. Долгушин, О. В. Бухарин. – Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2001. – 277 с.
34. Дранник, Г. Н. Изучение влияния препаратов класса Эрбисол на продукцию цитокинов мононуклеарами периферической крови здоровых доноров и онкологических больных / Г. Н. Дранник, А. И. Курченко, В. Й. Фесенкова [и др.] // Вісник фармакології та фармації. – 2006. - № 7. – С. 29-32.
35. Друх, В. М. Метод изучения хемилюминисценции лейкоцитов цельной крови / В. М. Друх, Р. Р. Фархутдинов, Ш. З. Загидуллин // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 12. – С. 41 – 43.
36. Дьяконова, В. А. Продукция цитокинов под действием полиоксидония *in vitro* / В. А. Дьяконова, С. В. Климова, К. Ф. Ким [и др.] // Иммунология. – 2002. – № 6. – С. 337 – 340.
37. Житбург, Е. Б. Цитокины в кроветворении, иммуногенезе и воспалении / Е. Б. Житбург [и др.] // Terra Medica. –1996. – № 3. – С. 38 – 41.
38. Завгородняя, Е. Г. Цитокины и их место в диагностике и лечении ряда заболеваний ЛОР-органов // Вестник отоларингологии. 2008. – № 3. С. 74 – 76.
39. Зайцева, Г.А. Цитокиновый статус доноров крови и ее компонентов / Г.А. Зайцева, О.А. Вершинина, О.И. Матрохина и др. // Фундаментальные исследования. – 2011. - № 3. – С. 61-65.
40. Заико, М. В. Разработка технологии получения препарата иммуномодулятора из селезенки животных, стимулирующего регенерацию тканей // Дипломная работа, 2010. – 71 с.
41. Заико, М. В. История и перспективы медицинского применения сырья животного происхождения на примере органопрепаратов из селезенки свиньи / М. В. Заико, С. В. Козин, Л. А. Павлова // Традиционная медицина. – 2014. – Т.1 (36). – С. 42 – 48.
42. Иванова, Л. А. Технология лекарственных форм. – Медицина, 1991. –

530 с.

43. Ильина, Н. И. Воспаление и иммунитет в общеклинической практике. Общая концепция / Н. И. Ильина, Г. О. Гудима // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 42 – 44.

44. Инструкция по применению наборов реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина один бетта // ООО «Цитокин». – Санкт – Петербург.

45. Инструкция по применению наборов реагентов для иммуноферментного определения концентрации фактора некроза опухоли альфа // ООО «Цитокин». – Санкт – Петербург.

46. Инструкция по применению наборов реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина шесть // ООО «Цитокин». – Санкт – Петербург.

47. Инструкция по применению наборов реагентов для иммуноферментного определения концентрации антагониста рецептора интерлейкина один бетта // ООО «Цитокин». – Санкт – Петербург.

48. Инструкция по применению наборов реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина десять // ООО «Цитокин». – Санкт – Петербург.

49. Инструкция по применению наборов реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерферона гамма // ООО «Цитокин». – Санкт – Петербург.

50. Инструкция по применению наборов реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина четыре // ООО «Цитокин». – Санкт – Петербург.

51. Инструкция по применению наборов реагентов для иммуноферментного определения концентрации гранулацитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора // ООО «Цитокин». – Санкт – Петербург.

52. Кадагидзе, З. Г. Цитокины // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 131 – 139.
53. Казакова, Н. Д. Клиническая эффективность спленоида в комплексном лечении гнойно-воспалительных заболеваний брюшинного пространства. // Дисс. ... канд. мед. наук: 14.00.27 – И., 2003. – 147 с.
54. Канюков, В. Н. Методы исследования в биологии и медицине / В.Н. Канюков, О.М. Стадников, О.М. Трубина [и др.] // Оренбургский гос. ун-т. – Оренбург: ОГУ, 2013. – 192 с.
55. Каражаева, М.И. Применение флавоноидных антиоксидантов в комплексном лечении больных с периферическими витреохориоретинальными дистрофиями и дистрофической отслойкой сетчатки / М. И. Каражаева, Е. О. Саксонова, Г. И. Клебанов [и др.] // Вестн. офтальмол. – 2004. – №4. – С. 14–18.
56. Кашаева, Л. Н. Изучение цитокинового статуса при церебральном инсульте / Л. Н. Кашаева, Л. М. Карзакова, В. Н. Саперов В.Н. [и др.] // Иммунология. – 2005. – № 3. – С. 161 – 164.
57. Кетлинский, С. А. Эндогенные иммуномодуляторы / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев, А. А. Воробьев. –М.: Гиппократ, 1992. – 254 с.
58. Кетлинский, С. А. Цитокины / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев. — СПб.: ООО «Фолиант», 2008. — С. 383 — 534.
59. Кетлинский, С. А. Роль Т-хелперов 1 и 2 в регуляции клеточного и гуморального иммунитета // Иммунология. – 2002. – № 2. – С. 77–80.
60. Кидрей, Е. Г. Иммунология. Избранные лекции по общей, частной и клинической иммунологии. – Иркутск, 2000. – 231 с.
61. Ковальчук, Л. В. Иммуноцитокينات и локальная иммунокоррекция / Л. В. Ковальчук, Л. В. Ганковская // Иммунология. – 1995. – № 1. – С. 4 – 7.
62. Ковальчук, Л. Н. Основные направления иммунотерапии в офтальмологии / Л. В. Ковальчук, Н. И. Мартиросова, Е. В. Соколова [и др.] // Рефракционная хирургия и офтальмология: научный журнал. - М.: Новый взгляд, 2008. – Т. 8, № 2. - С. 45-50.

63. Коган, А. Х. Фагоцитозависимые кислородные свободнорадикальные механизмы агрессии в патогенезе внутренних болезней // Вестник РАМН. – 1999. – № 2. – С. 3 – 10.
64. Козлов, В. А. Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений: руководство для врачей / В. А. Козлов, А. Г. Борисов, С. В. Смирнова [и др.] // Наука. – 2009. – 274 с.
65. Козлов, В. А. Некоторые аспекты проблемы цитокинов // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 5 – 8.
66. Кондратенко И. В. Внутривенные иммуноглобулины: что и когда? / И. В. Кондратенко, А. Л. Заплатников, А. А. Бологов // Детская больница. – 2010. – № 4. – С. 56-60.
67. Кондрашова, Е. А. Хемилюминесценция как наиболее чувствительный метод иммуноферментного анализа и его применение / Е.А. Кондрашова, М.Г. Кожанов // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – №9. – С. 32.
68. Конопля, А. И. Изучение иммуностимулирующего фактора, выделяемого клетками селезенки при токсическом поражении печени / А. И. Конопля, В. Е. Козлов, В. Е. Ивакин [и др.] // Пат. физиология и эксп. терапия. – 1985. – № 6. – С. 45 – 50.
69. Конусова, В. Г. Изменение показателей оксидантного и цитокинового статуса больных хроническим вирусным гепатитом С и В при лечении препаратом рекомбинантного интерлейкина 1 β человека / В. Г. Конусова, Е. С. Романова, И. В. Чурилова [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2003. – Т. 2, № 1. – С. 20 – 28.
70. Костюк, В.А. Биорадикалы и антиоксиданты / В. А. Костюк, А. И. Потапович // Мн.: БГУ, 2004. 174 с.
71. Крендаль, Ф. П. Сравнительная характеристика препаратов из группы фитоадаптогенов – женьшеня, элеутерококка и родиолы розовой / Крендаль Ф. П., Козин С. В., Левина Л. В. // М.: ПРОФИЛЬ. – 2007. – 392 с.

72. Кузник, Б. И. Цитомедины / Б. И. Кузник, В. Г. Морозов, В. Х. Хавинсон. – СПб.: Наука, 1998. – 310 с.
73. Куликова, А. И. Методические аспекты оценки потенциальной способности липидов к перокислению по уровню ТБК-активных продуктов сыворотки крови при стимуляции ионами железа / А. И. Куликова, Ф. А. Тугушева, И. М. Зубина, И. Н. Шепилова // Клин. лаб. диагност. – 2008. – № 5. – С. 8 – 10.
74. Курашвили, Л. В. Современное представление о перекисном окислении липидов и антиоксидантной системе при патологических состояниях / Л. В. Курашвили, Г. А. Косой, И. Р. Захарова // Методическое пособие. Пенза: Инс-т усовершенств. врачей МЗ РФ, 2003. – 32 с.
75. Куртасова, Л. М. Клинические аспекты функциональных нарушений нейтрофильных гранулоцитов при онкологии / Л. М. Куртасова, А. А. Савченко, Е. А. Шкапова. – Новосибирск: Наука, 2009. – 183 с.
76. Лебедев, К. А. Иммунограмма в клинической практике / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина. – М.: Медицина, 1990. – С. 149.
77. Лесков, В. П. Иммуностимуляторы // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 1999. – № 4. – С. 12–25.
78. Лыков, А. Н. Натуральные киллеры и гемопоэз / А. Н. Лыков, В. А. Козлов // Иммунология. – 2001. – № 1. – С. 10 – 14.
79. Ляпенко, А. А. К вопросу о систематизации цитокинов / А. А. Ляпенко, В. Ю. Уваров // Успехи совр. биологии. – 2001. – Т. 121, № 6. – С. 589 – 603.
80. Макаров, А. А. Лечение сепсиса и гнойно-воспалительных заболеваний инфузиями перфузата селезенки и их лиофилизата / А. А. Макаров, А. Б. Цыпин, Г. А. Витязев [и др.] // Хирургия, 1990. – № 11. – С. 171 – 172.
81. Макаров, А. А. Цитокины ксеноспленоперфузатов селезенки / А. А. Макаров, В. С. Сускова, О. И. Сусков // Цитокины и воспаление: Материалы международной научно-практической школы-конференции «Цитокины. Воспаление. Иммунитет». – СПб., 2002. – Т. 1, № 2. – с. 141.

82. Макарова, Н. Е. Тайны великих долгожителей. – Мн.: Литература, 1997, – 640 с.
83. Мануйлов, Б. М. Некоторые механизмы защитного действия экстракорпорального подключения донорской селезенки при септических состояниях: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1986. – 20 с.
84. Мануйлов, Б. М. Активность различных белковых фракций селезенки в стимуляции фагоцитоза / Б. М. Мануйлов, Я. Я. Колдаев // Трансплантация и искусственные органы: Труды НИИ ГиИО МЗ СССР. – М. – 1986. – С. 45 – 48.
85. Манько, В. М. Иммуномодуляция: история, тенденции развития, современное состояние и перспективы / В. М. Манько, Р. В. Петров, Р. М. Хаитов // Иммунология. – 2002. – № 3. – С. 132-138.
86. Маркова, Т. П. Методические подходы к постановке иммунологического диагноза / Т. П. Маркова, Р. М. Хаитов, Г. Н. Чувиров // Материалы 1-го конгресса «Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии». – М. – 1997. – С. 288.
87. Машковский, М. Д. Лекарственные средства. 13-издание. – М.: Медицина, 1997. – Т. 1. – 736 с.
88. Меньшикова, Е. Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов / Е.Б. Меньшикова, Н.К. Зенков // Успехи современной биологии. – 1993. – №4. – С. 422 – 455.
89. Мейл, Д. Иммунология / Д. Мейл, Дж. Бростофф, Д. Б. Рот и др. // Пер. С англ. – М.: Логосфера, 2007. – 568 с.
90. Михайлова, А. А. Индивидуальные миелопептиды – лекарства «нового поколения», используемые для иммунореабилитации. // Int J. Immunorehabilitation. – 1996. –N. 2 – P. 27–31.
91. Михайлов, И. Б. Современные иммуностимуляторы // Мир медицины. – 1999. – № 1-2. – С. 15 – 17.
92. Молотков, В. Н. Клинико-иммунологическая эффективность спленина, левамизола и гистаглобулина в комплексной терапии больных инфекционно-

- аллергической бронхиальной астмой / В.Н. Молотков, Е.Ф. Чернушенко, Л.С. Когосова [и др.] // Иммунология. – 1982. - № 3. – С. 74-78.
93. Морозов, В. Г. Пептидные тимомиметики / В. Г. Морозов, В. Х. Хавинсон, В. В. Малинин. – СПб: Наука, 2001. – 158 с.
94. Национальный Стандарт РФ ГОСТ Р 52791-2007 «Консервы молочные. Молоко сухое» Технические условия. Введение в действие 01.01.2009, с правом досрочного применения.
95. Нестерова, И. В. Цитокиновая регуляция и функционирующая система нейтрофильных гранулоцитов / И. В. Нестерова, Н. В. Колесникова // Гематология и трансфузиология. – 1999. – Т. 44, № 2. – С. 43 – 49.
96. Нестерова, И. В. Нейтрофильные гранулоциты – ключевые клетки иммунной системы / И. В. Нестерова, И. Н. Швыдченко, В. А. Роменская [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2008. – Т. 9, № 4. – С. 432 – 435.
97. Никонов, С. Д. Применение цитокинов в интенсивном лечении осложненных форм хирургических инфекций: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук / С. Д. Никонов. – Новосибирск, 1999. – 39 с.
98. Никонов, С. Д. Теоретические и экспериментальные предпосылки использования перфузатов ксеноселезенки в клинической практике. / В кн.: «Экспериментальные и клинические аспекты ксеноспленотерапии» под ред. проф. В. А. Ситникова и проф. С. Н. Стяжкиной // Ижевск, 1997. – С. 17 – 24.
99. Новиков, Д. К. Характеристика иммунофармакотерапевтических препаратов / Д. К. Новиков, Ю. В. Сергеев, В. И. Новикова // Иммунопатология. Иммунология аллергология. – 2002. – №4. – С. 7 – 27.
100. Онищенко, Н. А. Пептидная биорегуляция восстановительных процессов в поврежденных органах / Н. А. Онищенко, А. Б. Цыпин // Ж. Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2001. – № 3-4. – С. 87 – 93.
101. Останин А. А. Цитокинопосредованные механизмы развития системной иммуносупрессии у больных с гнойной патологией / А. А.

Останин, О. Ю. Леплина, Н. А. Тихонова [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т. 1. – С. 38-48.

102. Патент 2491944, Российская Федерация, А61К35/28, А61К38/02, А61К47/42, А61Р31/00, А61Р37/02. Способ получения лекарственного препарата иммуномодулятора для лечения тяжелых форм гнойно-септических и аутоиммунных заболеваний / Патентообладатель Цыпин А.Б.; Онищенко Н.А.; Иванов И.М. № 2012118016/15; заявл. 03.05.12; опубл. 10.09.13, Бюл. №25. 10 с.

103. Патент 2152219, Российская Федерация, А61К38/02, А61К35/28. Пептиды, обладающие иммуностимулирующей активностью, способ их получения, лекарственный препарат на их основе Спленид и его применение / Патентообладатель Цыпин А.Б., Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Мануйлов Б.М., Иванов И.М., Габриэлян Н. И., Великая М.В., Макаров А.А., Данилов М.А. № 20869; зарег. 24.02.2005; опубл. 27.04.2005, БИ 12/2005.

104. Петров, Р. В. Полиоксидоний — препарат нового поколения иммуномодуляторов с известной структурой и механизмом действия / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов, А. В. Некрасов [и др.] // Иммунология. – 2000. – № 5. – С. 24 – 28.

105. Пигаревский, П. В. Морфометрическое исследование Th1- и Th2-клеток в сосудистой стенке при атерогенезе у человека / П. В. Пигаревский, С. В. Мальцева [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 13 – 16.

106. Пинегин, Б. В. Принципы применения иммуномодуляторов в комплексном лечении инфекционных процессов // Лечащий врач. – 2000. – № 8. – С. 34 – 38.

107. Пинегин, Б. В. Современные представления о стимуляции антиинфекционного иммунитета с помощью иммуномодулирующих препаратов // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – № 12. – С. 3 – 8.

108. Пленина, Л. В. Новый отечественный иммуномодулятор Диасплен / Л.

- В. Пленина, Т. Р. Романовская, Н. Ф. Сорока [и др.] // Рецепт. – 2008. - № 1 (57). – С. 104-106.
109. Плотников, М. Б. Лекарственные препараты на основе диквертина / М. Б. Плотников, Н. А. Тюкавкина, Т. М. Плотникова. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2005. – 228 с.
110. Преферанская, Н. Г. Лекарственные средства на основе цитокинов // Российский медицинский журнал, 2008. – № 1. – С. 35 – 38.
111. Разумная, Ф. Г. Влияние Афобазола на функциональную активность моноцитов в системе *in vitro* / Ф. Г. Разумная, С. В. Сибиряк // Цитокины и воспаление. – 2011. –Т. 10, № 1. – С. 70.
112. Рогожин, В. В. Повышение чувствительности метода определения концентрации малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / В. В. Рогожин, Т. Т. Курилюк // Тезисы VII конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока». Новосибирск, 2004. – С. 90.
113. Родионова, О.Н. Патогенетическая роль сывороточных цитокинов при синдроме раздраженного кишечника / О. Н. Родионова, А. Р. Бабаева // Цитокины и воспаление. – 2011. – Т. 10, № 2. – С. 38 – 41.
114. Ройт, А. Иммунология: пер. В.И. Кандрор / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. – М.: Мир, 2000. – 581с.
115. Ролик, И.С. Фетальные органопрпараты. Клиническое применение. – М.: РегБиоМед, 2003. – 736 с.
116. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией член-корреспондента РАМН, профессора Хабриева Р.У. – 2 изд. перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.
117. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под общей редакцией доктора медицинских наук Миронова А.Н. – Часть первая – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
118. Рябичева, Т. Г. Определение цитокинов методом иммуноферментного анализа / Т. Г. Рябичева, Н. А. Вараксин, Н. В. Тимофеева, М. Ю.

Рукавишников // Информационный бюллетень «Новости «Вектор-Бест». – 2004. – № 4 (34).

119. Санникова, А. А. Эффективность применения иммуномодуляторов при хроническом пиелонефрите // Актуальные проблемы медицинской науки, технологии и профессионального образования: Материалы II Уральской научно-практической конференции. – Челябинск, 2000. – С. 141.

120. Сафаров, С. Ю. Теоретические предпосылки и биологические основы детоксицирующей роли селезенки / С. Ю. Сафаров, М. А. Алиев // Эфферентные методы в хирургии: Тезисы докл. Научно-практической конференции. – Ижевск, 1992. – Ч. 1. – С. 119 – 121.

121. Сафиулин, З. Т. Перспективы применения препаратов селезенки при бронхолегочной патологии / З. Т. Сафиулин, А. Г. Ткаченко // Астма и аллергия. – 2013. – №1. – С. 38.

122. Свирновский, А. И. Биологическая активность вещества, выделенного из ткани регенерирующей селезенки / А. И. Свирновский, Т. В. Шиманская, А. В. Бакун // Пути коррекции нарушенного кровообращения в эксперименте и клинике. – Минск, 1984. – С. 134 – 141.

123. Сенников, С. В. Методы определения цитокинов / С. В. Сенников, А. Н. Силков // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, №1. – С. 22 – 27.

124. Сергиенко, В. И. Математическая статистика в клинических исследованиях / В. И. Сергиенко, И. Б. Бондарева // М. ГЭОТАР-Медицина. – 2000. – с. 256.

125. Сепиашвили Р.И. Классификация и основные принципы применения иммуномодулирующих препаратов в клинической практике / Р. И. Сепиашвили // Аллергол. и иммунология. – 2002. – Т.3. – № 3. – С. 325-331.

126. Сепиашвили, Р. И. Современная стратегия и тактика иммуномодулирующей терапии / Р. И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология. – 2004. – Т. 5, № 1. – С. 7.

127. Сепиашвили, Р. И. Основы физиологии иммунной системы. – М.: Медицина – Здоровье. – 2003.

128. Сиденко, Л. Н. Органопрепараты в офтальмологии и ринологии: состояние и перспективы / Л. Н. Сиденко, Л. Н. Андрюкова // ФАРМАКОМ. – 2004. – №2. – С.1 – 7.
129. Симбирцев, А. С. Клиническое применение препаратов цитокинов // Иммунология. – 2004. – № 4. – С. 247 – 251.
130. Симбирцев, А. С. Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма // Цитокины и воспаление. – 2002 – Т.1, №1. – С. 9 – 17.
131. Симбирцев, А. С. Цитокины: классификация и биологические функции // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т.3, № 2. – С. 16 – 22.
132. Ситников, В. А. Организационные, методические и клинические аспекты внедрения ксеноспленотерапии в Удмуртии. // Экспериментальные и клинические аспекты ксеноспленотерапии. / Под ред. В.А. Ситникова и С.Н. Стяжкиной. – Ижевск: Экспертиза. – 1997. – С. 24 – 37.
133. Ситников, В. А. Имунокоррекция и детоксикация при острых и хронических пиелонефритах / В. А. Ситников, С. Н. Стяжкина, А. Б. Цыпин [и др.] // International Journal on Immunorehabilitation. – 1998. – № 8. – Р. 431.
134. Спрейс, И. Ф. Основы прикладной статистики (использование Excel и Statistica в медицинских исследованиях): учебное пособие / И. Ф. Спрейс, М. А. Алферова, И. М. Михалевич [и др.]. – Иркутск: ИГИУВ, 2006. – 71 с.
135. Стальная, И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Д. Горишвили // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66 – 68.
136. Старикова, Э. А. Изменения поверхностного фенотипа эндотелиальных клеток под влиянием провоспалительных и противовоспалительных цитокинов / Э. А. Старикова, Е. И. Амчиславский, Д. И. Соколов [и др.] // Медицинская иммунология. – 2003. – Т. 5, № 1-2. – С. 39 – 48.
137. Стяжкина, С. Н. Ксеноселезенка в эксперименте и клинике / С. Н. Стяжкина, В. А. Ситников, А. Б. Цыпин. – Ижевск: УдГУ, 1994. – Ч. 1. – 92 с.
138. Стяжкина, С. Н. Ксеноселезенка и лазеры в эксперименте и клинике / С. Н. Стяжкина, В. А. Ситников, А. Б. Цыпин. – Ижевск: Экспертиза, 1995. –

Ч. 2. – 157 с.

139. Сускова, В. С. Изучение влияния пробиотика Споробактерин на функциональное состояние гранулацитарно-макрофагальных клеток доноров крови *in vitro* / В. С. Сускова, Н. И. Габриэлян, С. И. Сусков // М., Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – № 5. – С. 653 – 657.

140. Темнова, В. В. Индивидуальный подбор иммуномодуляторов у кардиохирургических больных, оперированных в условиях искусственного кровообращения. // Дисс. ... канд. мед. наук: 14.00.41 – М., 2006. – 121 с.

141. Теселкин, Ю. О. Антиоксидантные свойства дигидрокверцетина / Теселкин Ю.О., Жамбалова Б.А., Бабенкова И.В [и др.] // Биофизика. - 1996. - Т. 41, вып 3. - С. 620-624.

142. Труфакин, В. А. Проблемы гистофизиологии иммунной системы / В. А. Труфакин, А. В. Шурлыгина // Иммунология. – 2002. – № 1. –С. 4-8.

143. Тюкавкина, Н. А. Кондитерские изделия с добавками биологически активных веществ. Влияние дигидрокверцетина на процесс пероксидного окисления жиросодержащих компонентов кондитерских изделий / Н. А. Тюкавкина, И. А. Руленко, Ю. А. Колесник [и др.] // Биотехнология и управление . – 1993. № 3-4. – С. 24-27.

144. Уминский, А. А. Биохимия флавоноидов и их значение / А. А. Уминский, Б. Х. Хавстеен, В. Ф. Баканева // Пущино: ООО «Фотон-век», 2007. – 264 с.

145. Ушакова, Н. Д. Иммунореабилитационное воздействие экстракорпорального подключения донорской селезенки при хирургическом лечении острого гнойного пиелонефрита / Н. Д. Ушакова, Г. М. Перельгина // Стресс и иммунитет: Тезисы докладов Всесоюзной конференции. – Л., 1989. – С. 206 – 207.

146. Фархутдинов, Р. Р. Хемилюминесцентные методы исследования свободнорадикального окисления в биологии и медицине / Р.Р. Фархутдинов, В. А. Лиховских. – Уфа: Изд-во БГМИ, 1995. – 110 с.

147. Федорова, Н. В. Антибактериальное действие препаратов селезенки

против микрофлоры мочи больных хроническим пиелонефритом / Н. В. Федорова, А. А. Санникова, Д. Ю. Козьминых // Труды Ижевской государственной медицинской академии. Т. XXXVII. – Ижевск: Экспертиза. – 1999. – С. 47.

148. Федорова, Н. В. Спленид в лечении больных хроническим пиелонефритом / Н. В. Федорова, А. А. Санникова, Л. Т. Пименов // Человек и лекарство: Тезисы докладов VIII Российского национального конгресса. – Москва, 2001. – С. 338.

149. Федорова Н. В. Клинико-иммунологические аспекты применения спленопрепаратов в комбинированной терапии больных хроническим пиелонефритом. // Дисс. ... канд. мед. наук: 14.00.05 – И., 2002. – с. 147.

150. Фрейдлин, И. С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции // Иммунология. – 2001. – № 5. – С. 4 – 7.

151. Фрейдлин, И. С. Клетки иммунной системы / И.С. Фрейдлин, А.А. Тотолян. – СПб.: Наука, 2001. – Т. 3-5. – 390 с.

152. Фримель, Г. Иммунологические методы. – Медицина, 1987.

153. Хавинсон, В.Х. Пептидная регуляция старения. – Наука, 2009. – 54 с.

154. Хаитов, Р. М. Иммуномодуляторы: классификация, фармакологическое действие, клиническое применение / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин // Фарматека. – 2004. – № 7 (85).

155. Хаитов Р. М. Иммуномодуляторы и некоторые аспекты их клинического применения / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин // Клиническая медицина. – 1996. – Т. 74, № 8. – С. 7 – 12.

156. Хаитов, Р. М. Иммуномодуляторы: механизм действия и клиническое применение / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин // Иммунология. – 2003. – № 4. – С. 196 – 203.

157. Хаитов, Р. М. Основные принципы иммуномодулирующей терапии / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2000. – Т. 4, № 1. – С. 9 – 16.

158. Хаитов Р. М. Отечественные иммуностропные лекарственные средства последнего поколения и стратегия их применения / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, Т. М. Андропова // Фармакология. – 2002.
159. Хаитов, Р. М. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, А. А. Ярилин // Для врачей, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 352 с.
160. Хаитов, Р. М. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин // Иммунология. – 2000. – №5. – С. 4 – 7.
161. Хаитов, Р. М. Физиология иммунной системы. – М.: ВИНТИ, 2001. – 220 с.
162. Хлябич Г.Н. Основные направления исследований по созданию перспективных технологий производства кровезаменителей.// В кн.: Актуальные проблемы улучшения качества кровезаменителей, консервантов крови, гормональных и органотерапевтических препаратов. М.,1991. с.3-9.
163. Цибулькин, А. П. Иммунная система человека – от защиты к патологии // Казанский медицинский журнал. – 2006. – Т. 81, вып. 1. – С. 1 – 7.
164. Цыган, В. Н. Иммунонаркология / В. Н. Цыган [и др.]. – СПб.: ВМедА, 2008. – 224 с.
165. Цыпин, А. Б. Препарат Спленопид – новый перспективный иммуномодулятор // Медицинская картотека. – 2004. – № 11. – С. 22 – 23.
166. Цыпин, А.Б. Иммунокоррекция лиофилизатами ксеноспленоперфузата / А. Б. Цыпин, А. А. Макаров, В. С. Сускова [и др.] // Реабилитация в медицине: Тезисы докладов IV Международного конгресса. – Москва. – 1998. – С. 12.
167. Цыпин, А. Б. Иммуномодуляция препаратом селезенки / А. Б. Цыпин, Н. А. Онищенко, А. А. Макаров // Человек и лекарство: Тезисы докладов VII Российского национального конгресса. – Москва. – 2000. – С. 336.

168. Цыпин, А.Б. Разработка, получение и некоторые свойства нового иммуномодулятора пептидной природы / А. Б. Цыпин, Н. А. Онищенко, Б. А. Мануйлов [и др.] // Иммунология. – 1995. – № 1. – С. 33 – 36.
169. Черешнев, В. А. Иммунология воспаления: роль цитокинов / В. А. Черешнев, Е. Ю. Гусев // Мед. Иммунол. – 2001. – Т. 3, №3. – С. 361 – 368.
170. Чернов, И. П. Получение гена гамма-интерферона свиньи методом однонаправленного многоточечного мутагенеза / И. П. Чернов, В. М. Росташов, Т. Л. Ажикина [и др.] // Биоорган. химия. – 1989. – № 12. – С. 1686 - 1689.
171. Черных, Е. Р. Цитокиновый баланс в патогенезе системного воспалительного ответа: новая мишень иммунотерапевтических воздействий при лечении сепсиса / Е. Р. Черных, О. Ю. Леплина, М. А. Тихонова [и др.] // Мед. Иммунология. – 2001. – Т.3. С. 415 – 429.
172. Чехани, Н. Р. Антиоксидантная активность растений, используемых в этномедицине Тувы / Н. Р. Чехани, Ю. О. Теселкин, Л. А. Павлова [и др.] // Вестн. РГМУ. – 2012. – №6. – С. 66 – 69.
173. Чубарев, В. Н. Изучение фармакологических свойств препарата из биомассы культуры ткани женьшеня // Дисс. ... канд. биол. наук. – М. – 1988. – 208 с.
174. Чучкова, Н. Н. Иммуномодуляторы природного происхождения: экспериментальные и клинические аспекты / Н.Н. Чучкова, С.Н. Стяжкина, А.А. Санникова [и др.]. — Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – 228 с.
175. Шаталин, Ю.В. Окисление лецитина в присутствии дигидрохверцетина и его комплекса с ионами двухвалентного железа / Ю. В. Шаталин, А. Н. Шмарев // Биофизика. – 2010. – Т. 55, №1. – С. 75 – 82.
176. Швыдченко, И. Н. Цитокинсекретирующая функция нейтрофильных гранулоцитов / И. Н. Швыдченко, И. В. Нестерова, Е. Ю. Синельникова // Иммунология. – 2005. - №1. – С. 31 – 34.

177. Шичкин, В. П. Патогенетическое значение цитокинов и перспективы цитокиновой / антицитокиновой терапии // Иммунология. – 1998. – №2. – С. 9 – 13.
178. Шумаков, В. И. Спленопептидотерапия в комплексном лечении синдрома полиорганной недостаточности / В. И. Шумаков, Н. А. Онищенко, А. Б. Цыпин [и др.] // VII Всеросс. Съезд анестезиологов и реаниматологов, С-Пб., 2000. – С. 312.
179. Юшков, В. В. Иммунокорректоры: руководство для врачей и провизоров / В. В. Юшков, Т. А. Юшкова, А. В. Казьянин // Екатеринбург: ИРА УТК, 2002. – 255 с.
180. Яременко К. В. Оптимальное состояние организма и адаптогены / К. В. Яременко // Санкт-Петербург: ЭЛБИ-СПб. – 2007. – 136 с.
181. Ярилин, А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии // Иммунология. – 1997. – № 5. – С. 7 – 14.
182. Abbas, A. Functional diversity of helper T lymphocytes / A. Abbas, K. Murphy, A. Sher // Nature. – 1996. – Vol. 383. – P. 787 – 793.
183. Abou-Rabia, N. Involution of the rat thymus in experimentally induce hypothyroidism / N. Abou-Rabia, M. D. Kendall // Cell Tiss. Res. – 1994. – V. 277. – № 3. – P. 447 – 455.
184. Agilent High Sensivity Protein 250 Kit Guide. Agilent Technologies 2008. 52 p. 4991992688
185. Aluvihare, V. Regulatory T-cells mediate maternal tolerance to the fetus / V. Aluvihare, M. Kallikourdis, A. Betz // Nat. Immunol. – 2004. – V. 5. – P. 266 – 271.
186. Arai, K. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses / K. Arai, E. Lee, A. Miyajima, S. Miyatake [et al.] // Annual Review of Biochemistry. – 1990. – V. 59. – P. 783 – 836.
187. Asselin—Paturel, C. Mouse type IFN-producing cells are immature APCs with plas macytoid morphology / C. Asselin—Paturel, A. Boonstra, M. Dalod [et al.] // Nat. Immunol. — 2001. — V. 2. – P. 1144 – 1150.

188. Audhya, T. Contrasting biological activities of thymopoietin and splenin, two closely related polypeptide products of thymus and spleen / T. Audhya, M. P. Scheid, G. Goldstein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1984. – V. 81, №. 9. – P. 2847–2849.
189. Baggiolini, M. Human chemokines: an update / M. Baggiolini, B. Dewald, B. Moser // *Annu. Rev. Immunol.* – 1997. – V. 15. – P. 675 – 705.
190. Balkwill, F.R. The cytokine network / F. R. Balkwill, F. Burke // *Immunology Today.* – 1989. – V. 10. – P. 299 – 304.
191. Banchereau J. Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy / J. Banchereau, S. Pacesny, P. Blanco [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2003. — V. 987. – P. 180 – 187.
192. Bandeira—Melo, C. Mechanisms of eosinophil cytokine release / C. Bandeira—Melo, P. Weller // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* — 2005. — V. 100. — Suppl. 1. — P. 73 — 78.
193. Ben Baruch, A. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells / A. Ben Baruch, D. Michiel, J. Oppenheim // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 1703 – 1706.
194. Bendtzen, K. Cytokines and natural regulator of cytokines // *Immunology letters.* – 1994. – № 43. – P. 111 – 123.
195. Betteridge, D. J. What is oxidative stress // *Metabolism* – 2000. – V. 49. – Suppl. 1. – P. 3 – 8.
196. Bhatnagar, R. IL-1 inhibits the synthesis of collagen by fibroblasts / R. Bhatnagar, H. Penformis, A. Hauviel [et al.] // *Biochem. Int.* – 1986. – V. 13, N. 4. – P. 709-720.
197. Bogdan, C. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and septic immunity / C. Bogdan, M. Rollinghoff, A. Diefenbach // *Curr. Opin. Immunol.* – 2000 – V. 12. – P. 64 – 76.
198. Bone, R. C. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process / R. C. Bone, C. J. Grodzin, R. A. Balk // *Chest.* – 1997. – V. 112. – P. 235 – 243.

199. Borneva, V. G. Ultrastructure of the spleen after application of lymphocyte stimulantans L.P.S. / V. G. Borneva, L. G. Gitsov, Slavova // Report Bulg. A.S., 1980. – V. 33. – P. 285 – 290.
200. Brightbill, H. Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response / H. Brightbill, R. Modlin // Immunology. – 2000. – V. 101. – P. 1 – 10.
201. Cannon, J. G. Interleukin 1-beta in human plasma: Optimization of blood plasma extraction, and radioimmunoassay methods / J. G. Cannon, J. W. van der Meer, D. Kwiatkowsky [et al.] // Lymphokine Res. – 1988. – V. 7. – P. 457 – 467.
202. Carson, R. Simultaneous quantitation of fifteen cytokines using a multiplexed flow cytometric assay / R. Carson, D. Vignali // J. Immunol. Mech. – 1999. – V. 227. – P. 41 – 52.
203. Cogos, C. A. Pro-versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options / C. A. Cogos, E. Drosou, H. P. Bassaris [et al.] // J. Infec. Dis. – 2000. – V. 181, № 1. – P. 176 – 180.
204. Cohen, S. Similarities of T-cell function in cell mediated immunity and antibody production / S. Cohen, P. Bigazzi, T. Yoshida // Cell. Immunol. – 1974. – V. 12. – P. 150 – 159.
205. Corazza, G. R. Howell-Jolly body counting as a measure of splenic function. A reassessment / G. R. Corazza, L. Ginaldi, G. Zoli [et al.] // Clin. Lab. Haematol. – 1990. – V. 12, № 3. – P. 269 – 275.
206. Das, C. Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells / C. Das, V. Kumar, S. Gupta [et al.] // J. Reprod. Immunol. – 2001. – V. 53. – P. 257 – 268.
207. Deonarain, R. Impaired antiviral response and alpha/beta interferon induction in mice lacking beta interferon / R. Deonarain, A. Alcami, M. Alexiou [et al.] // Virol. — 2000. – V. 74. – P. 3404 – 3409.
208. Dinarello, C. The biological properties of interleukin 1 // Eur. Cytokine Netw. – 1994. – V. 5. – P. 517 – 526.

209. Drech, M.T.K. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential / M. T. K. Drech, S. Rossato, V. D. Kappel [et al.] // *Anal Biochem.* – 2009. – V. 385 (1). – P.107 – 114.
210. Dumoutier, L. Viral and cellular interleukin—10 (IL—10)—related cytokines: from structures to functions / L. Dumoutier, J. Renauld // *Eur. Cytokine Netw.* – 2002. – V. 13. – P. 5 – 15.
211. Fernandez Botran, R. Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease and therapy / R. Fernandez Botran, P. Chilton, Y. Ma // *Adv. Immunol.* – 1996. –V. 63. – P. 269 – 336.
212. Forman, H. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling / H. Forman, M. Torres // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* – 2002. – V. 166. – P. 4 – 8.
213. Galimi, F. Hepatocyte growth factor is a regulator of monocyte-macrophage function / F. Galimi, E. Cottone, E. Vigna // *J. Immunol.* – 2002. – V. 166, № 2. – P. 1241 – 1247.
214. Gao, C. Lipopolysaccharide potentiates the effect of hepatocyte growth factor upon replication in lung, thyroid, spleen, and colon in rats in vivo / C. Gao, s. Kennedy, K. P. Ponder // *Mol. Ther.* – 2001. – V. 3, № 4. – P.462 – 475.
215. Gembo, B. T. Circulated cytokines in patients with metastatic cancer treated with recombinant interleukin-2 and lymphokineactivated killer cells / B. T. Gembo, M. A. Palladino, V. S. Jaffe [et al.] // *Cancer Res.* – 1988. – V. 48. – P. 5864 – 5867.
216. Gibbs, B. Human basophils as effectors and immuno modulators of allergic inflammation and innate immunity // *Clin. Exp. Med.* – 2005. – V. 5. – P. 43 – 49.
217. Gillis, S. S. *Recombinant Lymphokines and Their Receptors* // New York: Marcel Dekker, Inc. – 1987. – P. 325.
218. Grossber, S. E. Interferons: an overview of their biological and biochemical properties // In: L.M. Pfeffer (Ed.), *Mechanisms of Interferon Action*. Boca Raton, FL: CRC Press. – 1987. – P. 1 – 32.
219. Gutteridge, J.M. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical

- look to the future / J.M. Gutteridge, B. Halliwell // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2000. – V. 899. – P. 136 – 147.
220. Hadden, J. W. Immunostimulants // *Immunol. Today.* – 1993. – V. 14. – P. 275 – 280.
221. Hoeflich, A. Growth inhibition in giant growth hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 / A. Hoeflich, S. Nedbal, W. F. Blum [et al.] // *Endocrinology.* – 2001. – V. 142, № 5. – P. 1889 – 1898.
222. Ihle, J. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors / J. Ihle, B. Witthuhn, F. Quelle [et al.] // *Annu. Rev. Immunol.* – 1995. – V. 13. – P. 369 – 398.
223. Jones, S. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6 // *J. Immunol* — 2005. – V. 175. – P. 3463 – 3468.
224. Kasama, T. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation / T. Kasama, Y. Miwa, T. Isozaki [et al.] // *curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* – 2005. – V. 4, № 3. – P. 273 – 279.
225. Kato, Y. Hepatocyte growth factor enhances intestinal mucosal cell function and mass in vivo / Y. Kato, D. Yu, JR Lukish [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 1997. – V.32, № 1. – P. 991 – 994.
226. Kermorgant, S. Developmental expression and functionality of hepatocyte growth factor and c-Met in human fetal digestive tissues / S. Kermorgant, F. Walker, K. Hormi [et al.] // *Gastroenterology.* – 1997. – V. 112, № 5. – P. 1635 – 1647.
227. Kishimoto, T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine // *Arthritis Res. Ther.* – 2006. – V. 8. – Suppi 2. – P. 2 – 14.
228. Kono, S. Marked induction of hepatocyte growth factor mRNA in intact kidney and spleen in response to injury of distant organs / S. Kono, M. Nagaike, K. Matsumoto [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1992. – V. 186, № 2. – P. 991 – 998.
229. Koton, T. Regulation of neutrophil functions by proinflammatory cytokines /

- T. Koton, Kitogawas // *Inf, Hematol.* – 2006. – V. 84, № 3. – P.205 – 209.
230. Kovalchuk, L. V. Immunocytokines: local immunocorrection / L. V. Kovalchuk, L. V. Gankowskaya // *Immunologiya.* – 1995. – № 6. – P. 4 – 7.
231. Lee, B. Chemokine immunobiology in HIV_1 pathogenesis / B. Lee, L. Montaner // *J. Leukocyte Biol.* – 1999. – V. 65. – P. 552 – 565.
232. Lee, C. Y. Molecular cloning of the porcine acid-labile subunit (ALS) of the insulin-like growth factor-binding protein complex and detection of ALS gene expression in hepatic and non-hepatic tissues / C. Y. Lee, I. Kwak, C. S. Chung [et al.] // *J. Mol. Endocrinol.* – 2001. – V. 26, № 2. – P. 135 – 144.
233. Liles, W. C. Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response / W. C. Liles, W. C. Van Voorhis W.C. // *J. Infect. Dis.* – 1995. – V. 172, № 6. – P. 1573 – 1580.
234. Lord, P. Expression of interleukin— la and p genes by human blood polymor-phonuclear leukocytes /P. Lord, L. Wilmoth, S. Mizel [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1991. – V. 87 – P. 1312 – 1321.
235. Lowenthal, J. W. Cytokine therapy: a natural alternative for disease control / J. W. Lowenthal, T. E. O'Neil, A. David [et al.] // *Veterinary Immunology and Immunopathology,* – 1999. – V. 72. – P. 183 – 188.
236. Lynch, A. M. Overwhelming postsplenectomy infection / A. M. Lynch, R. Kapila // *Infect. Dis. Clin. N. Amer.* – 1996. – V.10, № 4. – P. 693 – 707.
237. Mantovani, A. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bed side / A. Mantovani, F. Bussolin, M. Introna // *Immunol. Today.* – 1997. – V. 18. – P. 231 – 239.
238. Marshall, J. C. The failure of clinical trials in sepsis: challenges of clinical trial design // In: Redl H., Shlag G. (eds.) *Cytokines in severe sepsis and septic shock.* Basel: Birkhauser. – 1999. – P. 349 – 362.
239. Matsumoto, K. Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions / K. Matsumoto, T. Nakamura // *Crit. Rev. Oncol.* – 1992. – V.3, № 1-2. – P. 27 – 54.
240. Mattner, J. Regulation of type 2 NO synthase by type I interferons in

- macrophages infected with *Leishmania major* / J. Mattner, H. Schindler, A. Diefenbach [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2000. – V. 30. – P. 2257 – 2267.
241. Moore, K. Interleukin — 10 and in terleukin —10 receptor / K. Moore, R. de Waal Malefit, R. L. Coffman // *Ann. Rev. Immunol.* – 2001. – V. 19. – P. 683 – 765.
242. Mrkic, B. Lymphatic dissemination and comparative pathology of recombinant measles viruses in genetically modified mice / B. Mrkic, B. Odermatt, M. A. Klein [et al.] // *J. Virol* — 2000. – V. 74. – P. 1364 – 1372.
243. Nagalakshmi, M. Expression patterns of IL-10 ligands and receptor gene families provide leads for biological characterization / M. Nagalakshmi, E. Murphy, T. McClanahan [et al.] // *Int. Immwwpharmacol* — 2004. — V. 4. – P. 577 – 592.
244. Nelson, D. S. Lymphokines, monokines and other cytokines / D. S. Nelson, C. L. Geczy // *Aust. And N.Z.J. Med.* – 1985. – V. 15. – № 2. – P. 285 – 290.
245. Oppenheim, J. Cytokine Reference / J. Oppenheim, M. Feldman // London. – Academic Press. – 2000. – P. 2015.
246. Osman, I. Leukocyte density and proinflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term / I. Osman, A. Young, M. Ledingham [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 2003. – V. 9. – P. 41 – 45.
247. Razavi, N.L. Proinflammatory cytokines in response to insulin-induced hypoglycemic stress in healthy subjects // *Metabolism.* - 2009. - Vol. 58, №4. - P. 443-448.
248. Romagnani, S. The Th1/Th2 paradigm // *Immunol. Today.* – 1997. – V. 18. – P. 263 – 266.
249. Ryman, K.D. Alpha/ beta interferon protects adult mice from fatal sindbis virus infection and is an important determinant of cell and tissue tropism / K. D. Ryman, W. B. Klimstra, K. B. Nguyen [et al] // *J. Virol.* – 2000. – V. 74. – P. 3366 – 3378.
250. Saito, S. Cytokine network at the feto—maternal interface // *J. Reprod.*

Immunol. – 2000. – V. 47 – P. 87 – 103.

251. Sato, N. Hepatocyte growth factor promotes growth and lumen formation of fetal lung epithelial cells in primary culture / N. Sato, H. Takahashi // *Respirology*. – 1997. – V.2, № 3. – P. 185 – 191.

252. Schlich, T. Die Erfindung der Organtransplantation. Frankfurt // M.; New York: Campus Verlag. – 1998. – P. 125.

253. Skibinski, G. The role of hepatocyte growth factor and its receptor c- Met in interactions between lymphocytes and stromal cells in secondary human lymphoid organs / G. Skibinski, A. Skibinska, K. James // *Immunology*. – 2001. – Vol.102, № 4. – P. 506-514.

254. Smith, P. K. Measurement of protein using bicinchoninic acid / P. K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk // *Anal Biochem*. – 1985. – V.150. – P. 76 – 85.

255. Suzuki, T. A novel growth factor in rat spleen which promotes proliferation of hepatocytes in primary culture / T. Suzuki, N. Koga, T. Imamura [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1988. – V. 153, № 3. – P. 1123 – 1128.

256. Werner, G. H. Immunostimulating agents: what next? A review of their present and potential medical applications / G. H. Werner, P. Jolles // *Eur J Immunol*. – 1996. – V. 242. – P. 1–19.

257. Wright, H.L. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases / H. L. Wright, R. F. Moots, R. C. Bucknall [et al.] // *Rheumatology (Oxford)*. – 2010. – V. 49, № 9. – P. 1619 – 1631.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность за помощь и консультации в проведении настоящих экспериментальных исследований доктору медицинских наук, профессору Виктории Сергеевне Сусковой, доктору медицинских наук, профессору, заслуженному деятелю науки РФ покойному Анатолию Борисовичу Цыпину, научному сотруднику Иванову Игорю Михайловичу, доктору биологических наук, главному научному сотруднику отдела медицинской биофизики НИИ фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова Юрию Олеговичу Теселкину, а также всем сотрудникам лаборатории биологически активных соединений НИИ Фармации Первого МГМУ имени И.М. Сеченова.