

2. Бурлакова Е.Б., Губарева А.Е., Архипова Г.В., Рогинский В.А. Модуляция перекисного окисления липидов биогенными аминами в модельных системах. *Вопр. мед. химии*. 1992; 2:17–20.
3. Заднова С.П. Влияние полипептида с молекулярной массой 22 кД на свойства клеточной поверхности штаммов возбудителей чумы [автореф. дис. ... канд. биол. наук]. Саратов; 1998. 20 с.
4. Ноздрачев А.Д., Пушкарёв Ю.П. Характеристика медиаторных превращений. Л.: Наука; 1980. 230 с.
5. Олескин А.В., Кировская Т.А., Ботвинко И.В., Лысак Л.В. Действие серотонина (5-окситриптамина) на рост и дифференциацию микроорганизмов. *Микробиология*. 1998; 67(3):305–12.
6. Пинчук Л.М. Молекулярная мимикрия как фактор патогенности микроорганизмов. *Усп. совр. биологии*. 1992; 1129(2):225–37.
7. Шуковская Т.Н., Назарова Л.С., Тараненко Т.М. Модуляция биогенными аминами колониеобразующей функции стволовых кроветворных клеток в условиях иммунизации капсульным антигеном (Ф1) чумного микроба. *Пробл. особо опасных инф.* 1999; 79:131–7.
8. Helene C., Dimicoli J. L., Brun F. Binding of tryptamine and 5-hydroxytryptamine (serotonin) to nucleic acids. Fluorescence and proton magnetic resonance studies. *Biochemistry*. 1971; 10(20):3802–09.
9. Jarret C.O., Deak E., Ishewood K.E., et al. Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. *J. Infect. Dis.* 2004; 190(4):783–92.
10. Korsukov V.N., Shchukovskaya T.N., Kravtsov A.L., Popov Yu. A. The application of the flow cytometry for determination of DNA amount in *Yersinia pestis* cells under the influence of serotonin (5-hydroxytryptamine). *Proc. SPIE*. 2002; 4707:337–42.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(15):680–5.
12. Lyte M. Microbial endocrinology and infectious disease in the 21 st century. *Trends Microbiol.* 2004; 12(1):14–20.
13. Munoz-Bellido J.L., Munoz-Griado S., Garcia-Rodriguez J.A. Antimicrobial activity of psychotropic drugs: selective serotonin

- reuptake inhibitors. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2000; 14(3):177–80.
14. Steen H.B., Boye E. *Escherichia coli* growth studied by dual-parameter flow cytophotometry. *J. Bacteriol.* 1981; 145(2):1091–94.
15. Sternberg E.M., Trial J., Parker C.W. Effect of serotonin on murine macrophages: suppression of Ia expression by serotonin and its reversal by 5-HT₂ serotonergic receptor antagonists. *J. Immunol.* 1986; 137(1):276–82.
16. Visidou I., Lyte M., van Diemen P.M., Hawes P., Monaghan P., Wallis T.S., Stevens M.P. The Neuroendocrine Stress Hormone Norepinephrine Augments *Escherichia coli* O157:H7-Induced Enteritis and Adherence in a Bovine Ligated Ileal Loop Model of Infection. *Infect. Immun.* 2004; 72(9):5446–51.

T.N.Schukovskaya, S.N.Klueva, A.L.Kravtsov, O.A.Volokh,
Yu.A.Aleoshina, V.V.Kutyrev

Influence of Serotonin Biogenic Amine on Plague Microbe Growth and Profile of its Proteins in Conditions of Cultivation on Solid Mediums

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

New data on stimulating effect of serotonin biogenic amine on the growth of plague microbe were obtained. A new method for *Yersinia pestis* isolation from material under consideration, contaminated with concomitant microflora, including environmental objects, by means of bacteriologic method was worked out using serotonin. This method allows reducing the periods of biological accumulation of plague etiological agent down to 24 hours, and increasing the number of colony-forming units (CFU) of plague microbe. Serotonin inhibitory effect to the synthesis of polypeptide with molecular mass of 22 kD was recognized in conditions of cultivating on Hottinger's agar (pH 7.2) at 28 °C during 24 hours.

Key words: *Y. pestis*, serotonin, environmental objects, growth, electrophoretic profile of proteins.

Поступила 22.02.08.

ИММУНОЛОГИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ, ДИАГНОСТИКА

УДК 616.981.51:616-097

**В.Ю.Долматов¹, А.В.Дробкова¹, А.Г.Лютов³, О.В.Мальцева¹, А.Н.Шевцов², Д.В.Боровской²,
Г.Д.Елагин², М.В.Карпова¹, О.А.Вершинина¹, Е.А.Блинова¹, С.Л.Шарыгин¹**

ВОЗМОЖНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТИВОСИБИРЕЯЗВЕННОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

¹ФГУ «Кировский НИИ гематологии и переливания крови Росмедтехнологий»;

²ФГУ 48 ЦНИИ Минобороны РФ; ³ЗАО «Иммуно-Гем», Киров

Впервые из плазмы крови доноров, иммунизированных комбинированной сибиреязвенной вакциной, получен специфический иммуноглобулин, удовлетворяющий нормам качества, предъявляемым к внутривенным иммуноглобулинам, и содержащий антитела к протективному антигену *Bacillus anthracis* в титре 1:1600 – 1:3200. Лечебная и профилактическая эффективность экспериментально-производственных серий препарата показана в экспериментах на животных.

Ключевые слова: сибирская язва, профилактика, иммуноглобулин человека.

Сибирская язва – особо опасное зоонозное антропоургическое инфекционное заболевание, вызываемое спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis*. Она может возникнуть у человека после контакта с зараженным животным, его трупом или с контаминированной спорами сибирской язвы почвой. Возможно заражение человека воздушно-пылевым путем [9]. По мнению ряда ученых, возбудитель сибирской язвы является одним из наиболее вероятных агентов биологического оружия из-за способности

спор этого возбудителя проникать через дыхательные пути, высокой смертности при легочной форме сибирской язвы и стабильности спор во внешней среде [3, 7]. Угроза применения сибиреязвенного микроба в споровой форме в качестве средства биотерроризма нашла практическое воплощение в 2001 г. на территории США [15].

Эффективность комплексной терапии больных сибирской язвой, особенно легочной формой болезни, несмотря на применение современных лекарственных

ных препаратов и высокотехнологичного медицинского оборудования, недостаточна [3, 13]. Введение высоких доз антибактериальных препаратов, основного средства лечения сибирской язвы, связано с возникновением неблагоприятных побочных эффектов; разрушение клеток возбудителя может привести к развитию токсического шока и гибели больного [14]. Применяемый в нашей стране антитоксический препарат – противосибирезвенный лошадиный иммуноглобулин – предназначен для внутримышечного введения. Такой способ введения иммуноглобулина (ИГ) не позволяет добиться быстрого нарастания концентрации антител в крови реципиента до эффективного уровня [10], в связи с чем разрабатывается инфузионная форма гетерологичного ИГ, расщепленного до Fab-фрагментов [4]. Вместе с тем гетерогенные препараты способны вызывать у людей тяжелые реакции анафилактического типа [10].

Мировой опыт разработки и применения целевых (или специфических) внутривенных иммуноглобулинов человека (ВВИГ) свидетельствует об их высокой эффективности и безопасности при лечении тяжелых инфекционных болезней различной этиологии [10, 11, 12], поэтому создание аллогенного антитоксического противосибирезвенного ИГ, пригодного для внутривенного введения, весьма актуально.

Технологические варианты получения отечественных ВВИГ предусматривают либо ферментативную обработку раствора иммуноглобулина [8], либо его инкубацию при кислом значении pH [1], что снижает так называемую «антикомплементарную активность», обеспечивая внутривенную переносимость ИГ, позволяет сохранить высокое содержание мономерного IgG, распределение подклассов, близкое к таковому в плазме крови человека, и обеспечить сохранность специфической активности антител к ряду антигенов бактериальной и вирусной природы [6].

Целью настоящего исследования было изучение возможности получения противосибирезвенного иммуноглобулина человека для внутривенного введения, определение его иммунохимических параметров и защитных свойств.

Материалы и методы

Кадровых доноров ФГУ «Кировский НИИ гематологии и переливания крови Росмедтехнологий», давших письменное информированное согласие на участие в исследовании и прошедших медицинский осмотр (61 человек), иммунизировали однократно подкожно в объеме 0,5 мл вакциной сибирезвенной комбинированной сухой и жидкой для подкожного применения серии 1/02 или 5/02 производства 48 ЦНИИ Минобороны РФ. Содержание антител к протективному антигену (ПА) *B. anthracis* в крови доноров определяли каждые две недели в течение 20 недель методом непрямого гетерогенного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением

тест-системы иммуноферментной для определения титров антител к протективному антигену сибирезвенного микроба в сыворотке крови человека, разработанной сотрудниками 48 ЦНИИ Минобороны РФ. За титр образца принимали наибольшее разведение, оптическая плотность которого в 2,1 раза превышала таковую отрицательного контрольного образца.

Иммунную плазму заготавливали методом плазмафереза и хранили при температуре не выше минус 20 °С. После карантинизации и формирования пулов плазму фракционировали этиловым спиртом до стадии получения раствора иммуноглобулина. ВВИГ получали с использованием пепсина [8] или инкубацией при кислом значении pH [1] и контролировали в соответствии с нормативными документами [5].

Профилактическая эффективность экспериментально-производственных серий препарата изучена на 18 беспородных морских свинках обоего пола массой от 250 до 300 г. Животным опытной группы вводили подкожно по 4 мл исследуемого ВВИГ, морским свинкам группы сравнения – по 2 мл противосибирезвенного лошадиного ИГ, животных контрольной группы оставляли интактными. Через 24 ч животных всех трех групп заражали 50 LD₅₀ культуры тест-штамма 71/12 *B. anthracis* в объеме 1 мл. Срок наблюдения составил 10 сут от момента заражения.

Лечебную эффективность экспериментально-производственных серий препарата оценивали на 38 беспородных кроликах обоего пола массой от 2,0 до 2,5 кг. Животных заражали подкожно 1 мл (10 LD₅₀) культуры тест-штамма Ч-7 *B. anthracis*. При исследовании эффективности ВВИГ в качестве средства монотерапии животным через 24 ч вводили по 2,4 мл раствора ВВИГ внутривенно (опытная группа) или по 1,2 мл противосибирезвенного лошадиного ИГ внутримышечно (группа сравнения). При исследовании эффективности ВВИГ в комплексной терапии заражающая доза составила 50 LD₅₀. Через 24 ч животным вводили по 2,4 мл ВВИГ внутривенно и по 560 мг ампициллина внутримышечно (опытная группа), или по 1,2 мл противосибирезвенного лошадиного ИГ и по 560 мг ампициллина внутримышечно (первая группа сравнения), или только 560 мг ампициллина (вторая группа сравнения). Лечение продолжали в течение 5 сут, учет результатов проводили на 15-е сутки от момента заражения.

Результаты и их обсуждение

Мониторинг нарастания титров антител к ПА *B. anthracis* в сыворотке крови иммунизированных доноров показал, что гуморальный иммунный ответ на введение сибирезвенной вакцины имеет амплитудно-затухающий характер с периодом колебаний, равным четырем неделям. Данная математическая аналогия легла в основу разработанного графика-алгоритма обследования доноров с учетом реакции на вакцинацию. Алгоритм минимизирует количество исследований и позволяет дифференци-

ровать доноров в зависимости от их специфической иммунореактивности.

Учитывая отсутствие сведений о возможности концентрирования аллогенных антител к ПА *B. anthracis* в процессе фракционирования белков плазмы крови, первые порции иммунной плазмы были подвергнуты фракционированию в лабораторных условиях. Установлено, что целевые антитела являются достаточно стабильными, могут быть сконцентрированы в 4 раза, а минимальный расчетный титр исходной плазмы должен составлять не менее 1:400.

Оценка содержания целевых антител в сыворотке крови иммунизированных доноров позволила выявить целевые антитела в титре не менее 1:400 у 70 % обследованных, менее 1:400 – у 17 %; 13 % иммунизированных лиц не ответили активной антителопродукцией. Первое существенное снижение содержания целевых антител зарегистрировано через девять недель после иммунизации, продолжительность выявления антител к ПА в титре более 1:400 составила от 7 до 11 недель.

Из 172 л иммунной плазмы были сформированы три пула, из которых получены экспериментально-производственные серии ВВИГ: № 1 и 2 методом пепсинолиза, серия № 3 – с использованием инкубации в кислой среде. Физико-химические и иммунобиологические свойства полученных серий ВВИГ оценивали в соответствии с требованиями, предъявляемыми к внутривенным иммуноглобулинам. Все серии представляли собой прозрачные бесцветные стерильные апиrogenные нетоксичные растворы, свободные от маркеров основных гемотрансмиссивных инфекций.

В таблице представлены «критические» свойства полученных серий ВВИГ, связанные с внутривенной толерантностью и специфической активностью препарата иммуноглобулина. Антитела к ПА *B. anthracis* выявлены в титре не менее 1:1600 в сериях № 1 и 2 и 1:3200 в серии № 3, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния основных производственных стадий получения внутривенного иммуно-

глобулина на специфическую активность препарата. Значительное содержание фрагментов IgG в сериях № 1 и 2 обусловлено особенностями снижения антикомплемментарной активности методом пепсинолиза, при котором происходит частичное расщепление белковой молекулы [6]. Достоинством альтернативного метода получения ВВИГ является более высокое относительное содержание мономеров IgG в конечном препарате.

Профилактическая и лечебная эффективность полученных экспериментально-производственных серий ВВИГ изучена в экспериментах на животных. Препаратом сравнения служил противосибирезвенный лошадиный ИГ, концентрация общего белка в котором составляла 10 %. Учитывая, что исследуемые ВВИГ содержали около 5 % белка, их вводили в объеме, в 2 раза превышающем таковой препарата сравнения.

Согласно результатам оценки профилактических свойств препаратов, введение ВВИГ обеспечило защиту 50 % морских свинок к концу срока наблюдения при гибели всех животных контрольной группы к 4-м суткам после заражения. Полученные данные сопоставимы с результатами профилактического действия лошадиного ИГ: в группе сравнения выжило 67 % животных. Несколько более высокая выживаемость в группе сравнения может быть связана с более высоким содержанием специфических антител в гетерогенном ИГ, полученном из крови гипериммунизированных лошадей.

Сходные результаты были получены в ходе экспериментальной оценки эффективности применения ВВИГ в качестве средства монотерапии. В опытной группе выживаемость составила 33 %, в группе сравнения – 50 %. Все животные контрольной группы погибли.

Комбинация специфических иммуноглобулиновых препаратов с антибиотиком, несмотря на более высокую заражающую дозу, обеспечила защиту от гибели 60 % кроликов, тогда как при использовании только ампициллина выжило 20 % живот-

Иммунохимическая характеристика противосибирезвенного внутривенного иммуноглобулина человека

Параметр	Метод получения иммуноглобулина		
	Серия № 1 (пепсинолиз)	Серия № 2 (пепсинолиз)	Серия № 3 (инкубация в кислой среде)
Титр антител к протективному антигену <i>B. anthracis</i>	1:1600	1:1600	1:3200
Концентрация белка, %	5,3	5,4	4,5
Антикомплемментарная активность	0 CH ₅₀ на 1 мг белка	0 CH ₅₀ на 1 мг белка	0 CH ₅₀ на 1 мг белка
Электрофоретическая чистота, %	100	100	100
Фракционный состав по результатам иммуноэлектрофореза	Интенсивная расщепленная дуга преципитации IgG		Интенсивная дуга преципитации IgG и одна дополнительная дуга
Относительное содержание			
полимеров IgG, %;	0	0	0
димеров IgG, %;	5,8	3,3	4,9
мономеров IgG, %;	79,7	84,9	94,7
фрагментов IgG, %	14,5	11,8	0,4

ных. Все животные контрольной группы погибли. Эффективность противосибирязвенного ВВИГ в данном эксперименте равна эффективности лошадиного ИГ. Возможно, отсутствие различий в применении ВВИГ и лошадиного ИГ, обусловлено хорошо известным и используемым для терапии тяжелых инфекционных болезней синергизмом действия ВВИГ и антибактериальных препаратов [2].

Результаты оценки профилактических и лечебных свойств противосибирязвенного ВВИГ, содержащего антитела к ПА в титре не менее 1:1600, свидетельствуют о достаточно высокой антитоксической активности препарата. Его эффективность сопоставима, а в комбинации с антибиотиком равна эффективности лошадиного ИГ, вводимого по эквивалентным схемам. Необходимо отметить, что применение ВВИГ людям допускается в максимальной разовой дозе – 2 г на 1 кг массы тела (более 2500 мл 5 % белкового раствора), в то время как допустимый объем введения лошадиного ИГ, лимитированный способом введения (внутримышечная инъекция) и, главным образом, гетерогенной природой препарата, может составлять не более 100 мл 10 % белкового раствора. Дальнейшая работа по получению противосибирязвенного ВВИГ, исследованию его протективных свойств и лечебной эффективности представляется перспективной.

Таким образом, получены экспериментальные образцы противосибирязвенного внутривенного иммуноглобулина человека с содержанием антител к протективному антигену *B. anthracis* в титре 1:1600 – 1:3200, основные параметры которого соответствуют требованиям, предъявляемым к ВВИГ. Лечебная и профилактическая эффективность экспериментально-производственных серий препарата подтверждена в экспериментах на животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешкин В.А., Лютов А.Г., изобретатели. Препарат иммуноглобулина для внутривенного введения и способ его полу-

чения. Патент RU 2122864.

2. Козлов В.К. Сепсис: этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии. СПб; 2006.

3. Лобзин Ю.В., Волжанин В.М., Захаренко С.М. Клин. микробиол. и антимикробная химиотерапия. 2001; 2:104–27.

4. Маринин Л.И., Степанов А.В., Алешкин В.А. и др. Мониторинг сибирской язвы. М.; 1999.

5. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям: Методические указания МУК 4.1/4.2.588-96. М.; 1998.

6. Мостовская Е.В. Оптимизация технологии получения жидкой формы иммуноглобулина для внутривенного введения [дис. ... канд. биол. наук]. М.; 2004.

7. Рубинштейн Э. Клин. микробиол. и антимикробная химиотерапия. 2001; 4:290–300.

8. Сапожникова В.С., Шарыгин С.Л., изобретатели. Способ получения иммуноглобулина для внутривенного введения. Патент RU 2068695.

9. Черкасский Б.Л. Особо опасные инфекции: Справочник. М.; 1996.

10. Шарыгин С.Л. Препараты внутривенных иммуноглобулинов из донорской плазмы для терапии бактериальных и вирусных инфекций (получение и клиническое применение) [дис. ... докт. мед. наук]. Киров; 1997.

11. Шкуратова О.В. Разработка научно-методических основ технологии производства специфического препарата для лечения больных дифтерией [автореф. дис. ... канд. биол. наук]. Томск; 2002.

12. Arnon S.S., Schechter R., Maslanka S.E., et al. N. Engl. J. Med. 2006; 354:462–71.

13. Dixon T.C., Meselson M., Guillemin J., et al. N. Engl. J. Med. 1999; 341:815–26.

14. Hanna P. J. Appl. Microbiol. 1999; 87:285–7.

15. Spencer R.C. J. Clin. Pathol. 2003; 56:182–7.

V.Yu.Dolmatov, A.V.Drobkova, A.G.Lyutov, O.V.Mal'tseva, A.N.Shevtsov, D.V.Borovskoy, G.D.Yelagin, M.V.Karpova, O.A.Vershinina, E.A.Blinova, S.L.Sharygin

Possibility to Obtain Anti-Athrax Human Immunoglobulin for Intravenous Injection

FSO "Kirov RI of Hematology and Blood Trasfusion of Rosmedtechnologies"; FSO 48 CRI of the Russian Ministry of Defense; PC "Immuno-Gem", Kirov

For the first time specific Ig was obtained from blood plasma of donors immunized by combined anthrax vaccine. This Ig conforms to quality standards for intravenous immunoglobulins and includes antibodies to *Bacillus anthracis* protective antigen in titer 1:1600 – 1:3200. Therapeutic and prophylactic efficacy of experimental-production series of preparation was demonstrated in experiments with animals.

Key words: anthrax, prophylaxis, human immunoglobulin.

Поступила 24.03.08.