

С.В.Генералов, Е.Г.Абрамова, А.К.Никифоров, Л.В.Савицкая, М.В.Галкина, Л.Н.Минаева, Т.А.Михеева, А.Г.Селезнёва, И.М.Жулидов, Р.А.Свинцов, Г.П.Лазаренко, Ю.В.Брандзишевский

ИЗУЧЕНИЕ АНАФИЛАКТОГЕННЫХ СВОЙСТВ $F(ab')_2$ -ФРАГМЕНТОВ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В тесте *in vivo* проведено сравнительное изучение анафилактогенных свойств гетерологичного антирабического иммуноглобулина и полученных на его основе $F(ab')_2$ -фрагментов. Показано отсутствие анафилактогенных свойств $F(ab')_2$ -фрагментов гетерологичного антирабического иммуноглобулина.

Ключевые слова: бешенство, антирабический иммуноглобулин, $F(ab')_2$ -фрагменты, реактогенность, анафилаксия.

Неблагополучная эпидемиологическая и эпизоотологическая ситуация по бешенству в Российской Федерации, особенно обострившаяся в последнее десятилетие, способствует увеличению числа лиц, ежегодно обращающихся за антирабической помощью (около 450 тыс. чел.) [9].

В России для постэкспозиционной профилактики гидрофобии используют вакцины КоКАВ, КАВ и антирабический иммуноглобулин, полученный из лошадиной или человеческой сыворотки. Несмотря на высокую степень очистки препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина, у 1–2 % пациентов при его введении могут возникнуть побочные аллергические реакции в виде сывороточной болезни и анафилактического шока [14]. Анафилактический шок имеет место в результате взаимодействия между фиксированными на клетке IgE и специфическим антигеном с последующим высвобождением медиаторов из клеток-мишеней: базофильных лейкоцитов или тучных клеток. Сывороточная болезнь – это аллергическая реакция, связанная с образованием иммунных комплексов в крови или тканях и активацией комплемента. При использовании гомологичного иммуноглобулина таких осложнений не возникает, однако, его себестоимость существенно выше таковой гетерологичного иммуноглобулина.

В РосНИПЧИ «Микроб» разработана биотехнологическая схема получения антирабического препарата на основе бивалентных $F(ab')_2$ -фрагментов антител путем ферментативного расщепления белков γ -глобулиновой фракции иммунной сыворотки [7, 8]. При этом представляется вероятным, что полученные таким образом $F(ab')_2$ -фрагменты менее реактогенны, чем нерасщепленный антирабический иммуноглобулин, из которого они были выделены [13].

Единого метода, с помощью которого можно зарегистрировать аллергизирующее действие фармакологических средств, не существует [4]. Аллергодиагностика включает в себя набор реакций *in vivo* и *in vitro*, которые позволяют выявлять разные

типы гиперчувствительности. В работах Т.А.Меняцовой ранее была изучена сенсibilизирующая активность антирабического иммуноглобулина и его фракций *in vitro* в тестах непрямого дегрануляции тучных клеток и реакции повреждения нейтрофилов в крови [5, 6]. Аллергизирующие свойства препаратов антирабического иммуноглобулина и сыворотки, очищенной методом ферментализации, были также ранее изучены исследователями Томского НИИВС в тестах *in vivo* и *in vitro* [11, 12].

Целью настоящего исследования явилось изучение в тесте *in vivo* анафилактогенных свойств препарата $F(ab')_2$ -фрагментов гетерологичного антирабического иммуноглобулина, полученного методом ферментативного гидролиза с последующей хроматографической очисткой в сравнении с коммерческим антирабическим иммуноглобулином.

Материалы и методы

Анафилактогенные свойства $F(ab')_2$ -фрагментов гетерологичного антирабического иммуноглобулина изучали в реакции активной анафилаксии в соответствии с рекомендациями Л.А.Степановой [11, 12]. В качестве биологических моделей использовали морских свинок массой 300–350 г (всего 21 животное). Животных однократно сенсibilизировали подкожным введением испытуемых препаратов в количестве 0,5 мл, содержащих 0,1 мг белка. На 21-й день свинкам внутрисердечно вводили разрешающие дозы соответствующих препаратов, содержащих 10, 40 и 80 мг белка. Животным контрольной группы по идентичной методике вместо анафилактогенов вводили 0,9 % раствор натрия хлорида. Объем разрешающей дозы составлял 1 мл. Каждая доза была исследована на 3 животных. Выбор схемы сенсibilизации также обусловлен рекомендациями санитарных правил СП 3.3.2.561-96 и методических указаний по оценке аллергизирующих свойств фармакологических веществ [1, 4].

Учет результатов проводили по соотношению числа погибших животных к числу взятых в опыт и по тяжести реакции. Силу анафилактической реакции оценивали по 4-балльной схеме [10].

Анафилактический индекс определяли по формуле W.Weigle [11]:

$$K = \frac{(4a + 3b + 2c + 1d + 0e)}{(a + b + c + d + e)},$$

где 4, 3, 2, 1, 0 – оценка шока в баллах; a, b, c, d, e – количество животных, у которых имел место шок соответствующей тяжести.

Для статистической обработки результатов исследования использовали ранговый X-критерий Вандер-Вардена [3].

Результаты и обсуждение

Реактогенность иммунных препаратов представляет собой сложный многокомпонентный показатель, главной составляющей которого являются анафилактогенные свойства.

Результаты по изучению активной анафилаксии представлены в таблице. Животным первой группы вводили антирабический гетерологичный иммуноглобулин, получаемый риванол-спиртовым способом. При введении разрешающей дозы 10 мг белка, лишь у одной свинки наблюдалась анафилактическая реакция. При этом имели место следующие признаки анафилаксии: общее беспокойство, взъерошивание шерсти на затылке, зуд, кратковременные судороги. Примерно через 30 мин животное пришло в нормальное состояние. У остальных животных данной группы проявления признаков анафилаксии не наблюдалось. Анафилактический индекс в данной группе составил 1,0.

При внутрисердечном введении 40 мг иммуноглобулина также у одной свинки имел место более сильный анафилактический шок, чем в предыдущей группе. Анафилактическое состояние развивалось быстро, свинка падала на бок, наблюдались сильные

судороги, животное пало через несколько минут после введения разрешающей дозы. У остальных животных исследуемой группы признаков анафилаксии не наблюдалось. Дальнейшее увеличение концентрации белка в разрешающей дозе не вызывало сильных проявлений анафилаксии. В группе животных, которым было введено внутрисердечно 80 мг иммуноглобулина, у двух свинок наблюдались только слабые признаки анафилаксии. Значение анафилактического индекса составило 0,6.

Среди животных, которым в качестве сенситизирующего и разрешающего препарата вводили $F(ab')_2$ -фрагменты антирабического иммуноглобулина, не было выявлено ни одного животного с проявлениями анафилаксии. Анафилактический индекс не зависел от концентрации белка в разрешающих дозах и был равен нулю. Различие анафилактогенных свойств гетерологичного антирабического иммуноглобулина и его $F(ab')_2$ -фрагментов статистически достоверно ($p < 0,05$; $X = 4,5$).

Реакция животных контрольной группы на введение 0,9 % раствора натрия хлорида также отсутствовала.

Наблюдаемое отсутствие анафилактогенных свойств препарата $F(ab')_2$ -фрагментов антирабического иммуноглобулина может быть связано с меньшим молекулярным весом и особенностями антигенной структуры молекулы. Известно, что детерминанты С-концевой половины тяжелой цепи, основную часть которой составляет Fc-фрагмент, реагируют с комплементарными антителами, образующимися при сенситизации соответствующими иммуноглобулинами [2]. Возможно, вследствие отсутствия соответствующих детерминант, $F(ab')_2$ -фрагменты вызывают при сенситизации организма меньшую продукцию комплементарных антител, что, в свою очередь, обуславливает отсутствие анафилактогенных реакций при повторном введении.

Таким образом, результаты проведенного тестирования свидетельствуют об отсутствии анафилактогенных свойств препарата $F(ab')_2$ -фрагментов гетерологичного антирабического иммуноглобули-

Результаты исследования анафилактогенных свойств препарата $F(ab')_2$ -фрагментов антирабического иммуноглобулина

Группа	Сенсибилизация		Разрешающее введение препаратов								
			Исследуемый препарат	Доза белка, мг	Результаты						по выживаемости
	по тяжести реакции										
	4	3			2	1	0	К			
1	Антирабический иммуноглобулин	0,1	Антирабический иммуноглобулин	10	0	1	0	0	2	1	0/3
				40	1	0	0	0	2	1,3	1/3
				80	0	0	0	2	1	0,6	0/3
2	F(ab') ₂ -фрагменты антирабического иммуноглобулина	0,1	F(ab') ₂ -фрагменты антирабического иммуноглобулина	10	0	0	0	0	3	0	0/3
				40	0	0	0	0	3	0	0/3
				80	0	0	0	0	3	0	0/3
3	0,9 % раствор натрия хлорида	0,0	0,9 % раствор натрия хлорида	0,0	0	0	0	0	3	0	0/3

на, что указывает на перспективность его применения в качестве средства для лечебной профилактики гидрофобии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов: Санитарные правила (СП 3.3.2.561-96). М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1998. 127 с.
2. Кульберг А.Я. Молекулярная иммунология. М.: Высшая школа; 1985. 287 с.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа; 1990. С. 128–30.
4. Любимов Б.И., Коваленко Л.П., Федосеева В.Н. и др. Методические указания по оценке алергизирующих свойств фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Хабриев Р.У., редактор. М.: Медицина; 2005. С. 54–9.
5. Меняйцева Т.А. Экспериментальная модель оценки сенсibilизирующей активности антирабического иммуноглобулина. В кн.: Биологические препараты и иммунологическая реактивность организма. Томск; 1981. С. 71–72.
6. Меняйцева Т.А., Васильева О.А., Пилявская Е.А. Изучение in vitro сенсibilизирующей активности антирабического иммуноглобулина и его фракций. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1979; 7:51–4.
7. Никифоров А.К., Генералов С.В., Волох О.А., Лобовикова О.А., Абрамова Е.Г., Киреев М.Н. Применение нативного и иммобилизованного пепсина для получения F(ab')₂-фрагментов антирабического иммуноглобулина. Биопрепараты. 2007; 2:20–1.
8. Никифоров А.К., Дятлов И.А., Волох О.А., Лобовикова О.А., Киреев М.Н. Получение и анализ основных свойств препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина, состоящего из F(ab')₂-фрагментов. Пробл. особо опасных инф. 2007; 2(94):75–8.
9. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2006 году: Государственный доклад. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007. 360 с.
10. Руководство по иммунологии. Вязов О.Е., Ходжаев Ш.Х., редакторы. М.: Медицина; 1973. 387 с.
11. Степанова Л.А., Меняйцева Т.А. Изучение анафилактических свойств ферментированного антирабического иммуноглобулина методами in vivo и in vitro. Вирусные и бактериальные препараты. Томск; 1983; 31:85–9.

12. Степанова Л.А., Музафарова Н.Х. Сравнительная оценка некоторых свойств антирабического иммуноглобулина и сыворотки, очищенной методом ферментализации. Вирусные и бактериальные препараты. Томск; 1981; 30:93–9.

13. Sedlacek H.H., Gronski P., Hofstaetter T. et al. The biological properties of immunoglobulin G and its split products [F(ab')₂ and Fab]. Klin. Wochenschr. 1983; 61:723–36.

14. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. Geneva; 2004. 121 p.

Об авторах:

Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Савицкая Л.В., Галкина М.В., Минаева Л.Н., Михеева Т.А., Селезнева А.Г., Жулидов И.М., Свицов Р.А., Лазаренко Г.П., Брандзишевский Ю.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, Университетская, 46. Тел.: (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

S.V.Generalov, E.G.Abramova, A.K.Nikiforov, L.V.Savitskaya, M.V.Galkina, L.N.Minaeva, T.A.Mikheeva, A.G.Selezneva, I.M.Zhulidov, R.A.Svintsov, G.P.Lazarenko, Yu.V.Brandzishvskiy

Study of Anaphylactogenic Properties of F(ab')₂-Fragments of Heterologous Anti-Rabies Immunoglobulin

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Anaphylactogenic properties of heterologous anti-rabies immunoglobulin and its F(ab')₂-fragments were tested in vivo. It was shown that F(ab')₂-fragments of heterologous anti-rabies immunoglobulin did not possess anaphylactogenic properties.

Key words: rabies, anti-rabies immunoglobulin, F(ab')₂-fragments, reactivity, anaphylaxis.

Authors:

Generalov S.V., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Savitskaya L.V., Galkina M.V., Minaeva L.N., Mikheeva T.A., Selezneva A.G., Zhulidov I.M., Svintsov R.A., Lazarenko G.P., Brandzishvskiy Yu.V. Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 31.10.08.