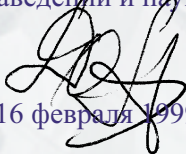


МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СОГЛАСОВАНО

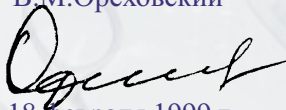
Заместитель начальника
Главного управления кадровой политики,
учебных заведений и науки Н.И. Доста



16 февраля 1999 г.

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель
министра здравоохранения
В.М.Ореховский



18 февраля 1999 г.
Регистрационный № 140-9812

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ (ДОКЛИНИЧЕСКОМУ)
ИСПЫТАНИЮ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ**

Минск 1999

Основное учреждение-разработчик: НИИ гематологии и переливания крови МЗ РБ

Учреждения-исполнители: НИИ пульмонологии и фтизиатрии МЗ РБ, Международный институт по радиоэкологии им. А.Д. Сахарова

Авторы: д-р мед.наук М.П. Потапнев, канд. мед. наук Л.Г. Борткевич, канд. мед. наук Д.В. Печковский, Е.В. Рукша, Т.С. Гарбузенко, Ж.А. Ибрагимова, В.В. Блинов

Рецензент: канд. мед. наук В.И. Левин

В методических рекомендациях по оценке иммуномодулирующих свойств фармакологических средств дано описание методов оценки их действия на Т-клеточные, В-клеточные реакции иммунитета, неспецифическую резистентность (функцию нейтрофилов, систему комплемента) у экспериментальных животных (линейных мышей, морских свинок) и в культуре лейкоцитов крови человека. В качестве самостоятельного раздела приведено описание методов оценки алергизирующих свойств фармакологических средств на тех же экспериментальных моделях. В перечень предлагаемых иммунологических методов включены как общепринятые, так и новые (апробированные за последние 10 лет), позволяющие всесторонне оценить действия фармакологического средства на отдельные звенья иммунитета и аллергии. Представлен минимальный перечень тестов для фармакологических средств с разной степенью иммуотропности, обоснована степень его расширения для различных групп лекарственных препаратов.

Методические рекомендации предназначены для фармакологов, иммунологов, алергологов, научных работников, врачей-лаборантов контрольных лабораторий.

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ИЗУЧЕНИЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ	6
ИСПЫТАНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ	7
ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ	32
ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ХАРАКТЕРИСТИКЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ	35

ВВЕДЕНИЕ

Фармакологические средства, воздействующие на организм человека, обладают не только основным биологическим действием на чувствительные органы и ткани или патоген, но проявляют модулирующее действие на другие системы организма. Степень воздействия фармакологических средств на иммунную систему определяется природой этого средства (биологической, химической, физической), тропностью к различным тканям и системам организма человека, его функциональным состоянием. Иммунная система выполняет регуляторную функцию, отслеживая любой процесс воздействия на организм человека (внутренних или внешних факторов). При этом она реагирует как на патологический процесс в организме человека, так и на фармакологические средства, используемые для лечения. Фармакологические средства могут проявлять прямое воздействие на иммунную систему, то есть обладать иммумотропностью. Перечень таких средств невелик — их относят к иммуномодуляторам. Такие препараты применяются для иммунотерапии и иммунокоррекции. Сейчас стало очевидным, что большинство фармакологических средств проявляют не прямое воздействие на иммунную систему — за счет регуляции образования вторичных биологически активных эндогенных иммуномодуляторов. Эти представления требуют по-новому подойти к оценке иммуномодулирующих свойств новых и уже известных фармакологических средств. Ранее оценка иммуномодулирующего действия была обязательна для фармакологических средств, являющихся непосредственно иммуномодуляторами. В настоящее время перечень таких средств расширяется за счет массового внедрения биологически активных адаптогенов, а также фармакологических средств, способных воздействовать на иммунную систему организма человека.

Проведение экспериментального (доклинического) испытания иммуномодулирующего действия фармакологических средств также претерпевает изменение, что связано прежде всего с расширением использования методом анализа *in vitro* наряду с использованием методом анализа *in vivo* на животных. Это объясняется более высокой чувствительностью, экономичностью и технологичностью методов анализа *in vitro*, а также возможностью использовать клеточные системы человеческого происхождения. В то же время исследования *in vitro* и исследования *in vivo* являются обязательной составной частью оценки иммуномодулирующего действия фармакологических средств, так как отражают разный уровень реакции организма (клеточный, тканевой, организменный) на внешнее воздействие. Важной особенностью доклинического испытания иммуномодулирующих свойств фармакологических средств является оценка их воздействия на практически здоровых животных или клеточные системы. Это позволяет оценить способность самих фармакологических средств проявлять прямое иммуностропное действие, возможность его использования с целью иммунопрофилактики. Последующий клинический этап изучения фармакологического средства позволит оценить его активность в условиях патологического процесса в организме человека, его способность выступать в качестве иммунотерапевтического или иммунокорректирующего лекарственного препарата. Наконец, использование иммуностропных фармакологических средств в фазе выздоровления пациентов позволяет судить о его активности выступать в качестве иммунореабилитационного фармакологического средства.

Оценка иммуномодулирующих свойств входит в комплекс доклинических испытаний, включающий также оценку безвредности препарата (пирогенность, аллергенность, канцерогенность, тератогенность, эмбриотоксичность, мутагенность), фармакокинетики и специфической биологической активности фармакологического средства.

Общие положения изучения иммуномодулирующих свойств фармакологических средств

Методология оценки иммуномодулирующих свойств фармакологических средств мало отличается от классической, общепризнанной 10–15 лет назад. Она включает прежде всего оценку воздействия препаратов на Т-клеточный и В-клеточный (гуморальный) иммунитет, фагоцитарное звено иммунитета, систему комплемента. Аллергические реакции, являющиеся по своей природе Т- или В-клеточными иммунными реакциями, также включены в настоящий перечень иммунологических методов испытания фармакологических средств, хотя и могут рассматриваться в качестве самостоятельного раздела доклинических испытаний.

Исследования проводятся в сравнении с известными аналогами изучаемого фармакологического средства. При проведении исследований *in vitro* широко используют поликлональные активаторы лимфоцитов человека. Их использование в оптимальной и в субоптимальной концентрациях позволяет оценить действие иммуномодулятора в условиях максимального и физиологического воздействия на иммунную систему (иммунокомпетентные клетки).

ИСПЫТАНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

1. Оценка влияния препарата на В-клеточный (гуморальный) иммунный ответ

1.1. Определение антителообразующих клеток в селезенке мышей

Мышей линии СВА весом 20 ± 2 г, самок, иммунизируют внутрибрюшинно эритроцитами барана (ЭБ) в субоптимальной дозе 2×10^7 в 100 мкл. Одновременно вводят исследуемый препарат в дозе, близкой к расчетной терапевтической, или физраствор. В качестве контроля также вводят ЭБ в оптимальной дозе (2×10^8 ЭБ). Каждая группа мышей состоит из 3 особей. Через 4 дня мышей забивают, селезенки забирают, гомогенизируют, спленоциты отмывают дважды и используют для определения клеток, образующих антитела (АОК) к ЭБ, по методу Cunningham. Определяют АОК, секретирующие антитела класса М. Для этого смешивают по 100 мкл взвеси спленоцитов (в концентрации около 10 млн/мл), 100 мкл 5% взвеси ЭБ и 100 мкл адсорбированного комплемента (обычно в разведении 1:2). Смесью мерно заполняют стеклянные камеры, которые запаивают парафином/вазелином и инкубируют в течение 1 ч при 37°C на горизонтальной плоскости. Затем проводят визуальный учет зон гемолиза, соответствующих АОК. Полученные результаты выражают количеством АОК в пересчете на 1 млн спленоцитов.

1.2. Определение гемагглютининов в сыворотке крови мышей

Мышей линии СВА, весом 20 ± 2 г, самок, иммунизируют внутрибрюшинно субоптимальной дозой антигена ($1-2 \times 10^7$ ЭБ/мышь) вместе с исследуемым препаратом. Контрольные мыши получают физраствор или оптимальную дозу антигена (1×10^9 ЭБ). Каждая группа мышей включает по 3 особи. Через 7 дней у мышей из ретроорбитального синуса забирают кровь. После свертывания кровяного сгустка (при $+37^\circ\text{C}$) отбирают сыворотку, термоинактивируют ее при 56°C в течение 30 мин и используют для выявления специфических антител к ЭБ в реакции гемагглютинации (РГА). Реакцию ставят в микропланшетах с круглодонными лунками путем смешивания 50 мкл двукратно разведенных образцов исследуемых сывороток и 25 мкл 2% взвеси ЭБ. Микропланшеты инкубируют в течение 1 ч при 37°C . Результаты оценивают по шкале +++++. Положительной считают РГА не менее ++. Результаты РГА представляют в обратных значениях \log_2 титра гемагглютининов, где титром считают наибольшее разведение сыворотки крови, дающее положительную реакцию.

1.3. Определение антител к другим антигенам

Учитывая, что ЭБ вызывают ответ к эритроцитарным (клеточным) антигенам, следует также использовать какой-либо из стандартизованных тканевых, бактериальных или вирусных антигенов в соответствии с искомой направленностью действия исследуемого препарата. Перечень таковых может включать овальбумин, препараты ДНК, стафилококковый анатоксин, столбнячный анатоксин, дифтерийный анатоксин, гемагглютинин вируса гриппа и др. Ниже нами проводится описание оценки у мышей образования (ауто-) антител к ДНК в присутствии одного из исследованных иммуномодуляторов.

Мышей линии С57В1/6 весом 23–26 г иммунизируют внутрибрюшинно ДНК, выделенной из клеток селезенки мышей той же линии методом фенольной экстракции в дозе 25 мкг/животное. Иммунизацию проводили трехкратно 1 раз в неделю. Одновременно вводят исследуемый препарат в различной дозировке для каждой группы животных. В качестве позитивного контроля используют бактериальный липополисахарид (ЛПС). Через неделю после последней иммунизации кровь забирают из ретроорбитального синуса и получают сыворотку. Титр антител к ДНК определяют иммуноферментным методом. Для этого микропланшеты для иммуноферментного анализа, предварительно обработанные поли-Л-лизинном (10 мкг/мл), покрывают антигеном (двухцепочечной ДНК, 5 мкг/мл). Если в качестве антигена используют одноцепочечную ДНК, ее вносят в концентрации 2 мкг/мл в лунки микропланшет без обработки поли-Л-лизинном. Через 16–18 ч инкубации при комнатной температуре микропланшеты отмывают, в лунки вносят образцы исследуемых мышинных сывороток (первоначальное разведение — 1:100) и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре при встряхивании (на «шейкере»). Микропланшеты отмывают забуференным физраствором, содержащим 0,02% твин-20 (Т-ЗФР). Затем вносят раствор конъюгата (меченую пероксидазой козью антисыворотку против иммуноглобулинов мышей) и инкубируют 1,5 ч при комнатной температуре. После отмывки ЗФР-Т в лунки микропланшеты вносят раствор субстрата (ортофенилендиамин, ОФД). Реакцию останавливают 5% раствором серной кислоты. Учет реакции проводят при 492 нм на ИФА-ридере (спектрофотометре).

1.4. Определение иммуноглобулинсекретирующих клеток человека, индуцированных *in vitro*

Иммуноглобулинсекретирующие клетки (ИСК) индуцируют в культуре лимфоидных клеток (моноклеаров периферической крови, МПК) здоровых людей, выделенных на градиенте фиколл/верографин по методу Воум. Культивирование проводят в среде RPMI-1640, содержащей 10% сыворотки эмбрионов коров (СЭК) и антибиотики. Клетки культивируют в конечной концентрации 1 млн/мл в плоскодонных микропланшетах в объеме 0,2 мл в течение 7 сут в атмосфере воздуха с 5% CO₂. Одновременно вносят исследуемый препарат. В качестве положительного контроля используют клетки, активированные митогеном лаконоса (МЛ), в концентрации 1,0 мкг/мл. Каждый вариант включает 3 повтора. В конце культивирования клетки отмывают 2 раза бессывороточной средой, содержащей антибиотики. ИСК определяют микрометодом обратного гемолитического бляшкообразования.

Для этого в лунки плоскодонных микропланшет вносят по 60 мкл взвеси МПК и 20 мкл 0,5% взвеси ЭБ, покрытых стафилококковым белком А. Микропланшеты инкубируют в течение 1 ч при +37°C в атмосфере воздуха с 5% CO₂. Затем вносят по 10 мкл антииммуноглобулиновой кроличьей антисыворотки (1:10) и вновь инкубируют 1 ч при +37°C. Дополнительно вносят по 10 мкл комплемента (1:6) и снова инкубируют 1 ч при +37°C. Учет зон гемолиза, соответствующих ИСК, проводят под инвертированным микроскопом под увеличением в 160 раз. Полученные результаты выражают как содержание ИСК в культуре клеток.

Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств

Для определения ИСК (и АОК) человека можно использовать метод ELISPOT, основанный на выявлении «пятен» окрашивания фильтровальной бумаги, покрытой антителами к иммуноглобулинам человека или антигеном, на местах инкубации В-лимфоцитов, секретирующих иммуноглобулины или антитела соответственно. Методика постановки описана в других руководствах.

1.5. Определение иммуноглобулинов, секретируемых В-лимфоцитами человека in vitro

Индукцию секреции иммуноглобулинов в культуре лимфоидных клеток МПК человека in vitro проводят, как описано в п. 1.4. Через 7–9 дней после инкубации с исследуемым препаратом (в таком случае через 3–4 дня делают смену среды) с или без поликлонального В-клеточного активатора (митогена лаконоса — 10 мкг/мл, взвеси *S. aureus* Cowan 1 — 0,01%) супернатант культур клеток собирают центрифугированием и используют для измерения секретированных иммуноглобулинов (обычно класса G) иммуноферментным методом. Для этого на дно лунок микропланшет вносят по 100 мкл оптимально разведенных (1:3000) кроличьих антител против IgG человека (или специфическую антисыворотку) на 0,1 моль в бикарбонатном буфере, pH 9,6. Инкубируют в течение ночи при +4°C. Микропланшеты отмывают от несвязавшихся антител с помощью ЗФР, содержащего 0,08% твин-20 (ЗФР-Т). В лунки вносят по 100 мкл двукратно разведенных исследуемых культуральных супернатантов или стандартного препарата IgG человека. Микропланшеты инкубируют в течение 2 ч при +37°C, затем отмывают ЗФР-Т и вносят разведенные (1:5000–1:10000) козы антитела против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена. Микропланшеты вновь инкубируют в течение 1 ч при +37°C, затем отмывают ЗФР-Т и добавляют ОФД в фосфатно-цитратном буфере (pH 5,0). Через 5–15 минут реакцию останавливают внесением 50 мкл 4 N раствора серной кислоты. Учет реакции проводят при 492 нм на ИФА-ридере (спектрофотометре). Содержание IgG в исследуемых супернатантах культур клеток человека рассчитывают графически или с помощью адаптированных компьютерных программ.

1.6. Определение антител, секретируемых В лимфоцитами человека in vitro

Исследование проводят аналогично приведенному в п. 1.5. Вместо поликлональных активаторов, вносимых вместе с исследуемым иммуномодулятором, используется один из стандартных антигенов, указанных в п. 1.3. Особенностью постановки ИФА является использование выбранного антигена для посадки на пластик в бикарбонатном буфере. В качестве контролей антигена используют неродственный антиген и антисыворотку к IgG человека. Желательно иметь в качестве позитивного контроля сыворотку (плазму) человека, содержащую антитела к исследуемому антигену.

2. Оценка влияния препарата на Т-клеточный иммунный ответ

2.1. Гиперчувствительность замедленного типа

Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) у мышей-гибридов F₁ (СВА × С57В1/6), самок весом 18–20 г индуцируют введением внутривенно 2×10^5 ЭБ, одновременно вводят исследуемый препарат в нескольких дозах. Каждая группа мышей включает по 3–4 особи. Разрешающую дозу ЭБ (10^8 /мышь) вводят на 5 сут в подушечку правой задней лапы. В контрлатеральную лапу вводят 0,15 моль раствор хлористого натрия. Местную воспалительную реакцию оценивают через 24 ч путем измерения толщины лап микрометром. (Можно использовать другие методы измерения диаметра, окружности или веса лап животных). Индекс реакции (ИР) вычисляют для каждой мыши по формуле:

$$\text{ИР (\%)} = \frac{T(\text{опыт}) - T(\text{контроль})}{T(\text{контроль})} \times 100,$$

где Т — толщина подушечки лапки в мм.

2.2. Реакция «трансплантат против хозяина»

Реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ) вызывают у мышей гибридов F¹ (СВАхС57В1/6) по методу Ford с соавт. путем инъекции в подушечку правой задней лапы («опытной») 2×10^6 клеток селезенки мышей родительской линии (СВА). В подушечку левой задней лапы («контрольную») вводят такое же количество сингенных спленоцитов. Исследуемый препарат в нескольких разведениях их расчета на кг веса вводят в подушечку «опытной» лапы одновременно с клетками. Через 7 сут мышей забивают и определяют массу подколенных лимфоузлов в «опытной» и «контрольной» лапах. ИР вычисляют по формуле:

$$\text{ИР} = \frac{\text{вес лимфоузла «опытной» лапки}}{\text{вес лимфоузла «контрольной» лапки}}$$

Каждая группа мышей включает 3–4 животных.

2.3. Пролиферативная активность лимфоидных клеток человека

Прямую митогенную активность препарата исследуют в культуре МПК здоровых людей, выделенных по методу Woym. МПК в двукратной концентрации 2×10^6 клеток на мл вносят по 100 мкл в лунки плоскодонных культуральных микропланшет. Дополнительно вносят исследуемый препарат в различных концентрациях. Культуральная среда — RPMI-1640, содержащая 10% сыворотки IV группы крови человека (АВ-сыворотки) или сыворотки эмбрионов коров (СЭК) и антибиотики (пенициллин — 100 ЕД/мл, стрептомицин — 100 мкг/мл). Клетки инкубируют в течение 48 ч при 37°C в атмосфере воздуха с 5% CO₂. Культуры клеток ставят в 3–4 повторах. Синтез ДНК в культуре МПК оценивают по включению метил-³Н-тимидина, вносимого на последующие 18 ч инкубации из расчета 37 Кбк на лунку. Клетки переносят на бумажные фильтры и отмывают. Счет радиоактивности проводят в бета-счетчике.

Иммуномодулирующее действие препарата (фармакологического средства) оценивали по индексу стимуляции (ИС) реакции пролиферации МПК, который рассчитывается по формуле:

$$\text{ИС} = \text{опыт} / \text{контроль},$$

где: опыт — уровень синтеза ДНК (имп./мин) в МПК в присутствии исследуемого препарата, а контроль — уровень синтеза ДНК (имп./мин) в отсутствие препарата.

Альтернативой радиационной метки может быть использование МТТ (диметилтиазолил дифенилтетразолия бромид) или его производных для оценки интенсивности пролиферации лимфоидных клеток *in vitro*.

2.4. Постановка костимуляторного пролиферативного теста

Оценку способности исследуемого препарата влиять на пролиферацию лимфоцитов человека, вызванную поликлональным Т-клеточным активатором фитогемагглютинином (ФГА), проводят в культуре МПК. При этом одновременно с исследуемым препаратом в культуры МПК вносят оптимальную (10 мкг/мл) или субоптимальную (0,5 мкг/мл) концентрацию активатора. Постановку пролиферативного теста проводят, как описано в п. 3.1. Культуры клеток ставят в 3–4 повторах. Контрольные варианты включают МПК, культивированные только в присутствии ФГА.

Другой вариант постановки костимуляторного пролиферативного теста предполагает оценку действия препарата на пролиферацию лимфоидных клеток человека под действием аллогенных клеток-стимуляторов, смешанных в отношении 1:1 или 1: 0,02. Постановку теста проводят как описано в п. 2.5. Смесь клеток культивируют в течение 4 сут, затем на 16–18 ч вносят метил-³Н-тимидин из расчета 37 КБк (1 микрокюри) на лунку. Клетки переносят на бумажные фильтры и отмывают. Счет радиоактивности проводят в бета-счетчике.

Иммуномодулирующее действие фармакологического средства оценивают по ИС (см. 2.3.), где контролем служит уровень ДНК в культуре МПК, активированных стимулятором.

2.5. Образование цитотоксических Т-лимфоцитов человека in vitro

2.5.1. Смешанная культура лимфоцитов человека

Цитотоксические Т-лимфоциты человека индуцируют в аллогенной однонаправленной смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). Для этого выделяют МПК от двух здоровых людей. Клетки одного из них используют в качестве «стимуляторов». Для этого их облучают (20 Гр) или обрабатывают митомицином С (50 мкг/мл, 37°C, 30 мин в темноте), затем тщательно отмывают питательной средой RPMI-1640, содержащей 10% АВ сыворотки. Клетки-эффекторы одного донора и клетки-стимуляторы другого донора в концентрациях 1 млн в мл смешивают в соотношении 1:1 и культивируют в питательной среде RPMI-1640, содержащей 10% АВ-сыворотки (или ЭТС) и антибиотики (пенициллин — 100 ЕД/мл, стрептомицин — 100 мкг/мл) в течение 5 сут (для оценки пролиферативного ответа) или 6–7 сут (для оценки образования цитотоксических Т-лимфоцитов). Исследуемое фармакологическое средство вносят в нескольких разведениях в лунки микроплаты (или культуральные флаконы), содержащие клетки-эффекторы и стимуляторы. По окончании культивирования клетки-эффекторы отмывают один раз центрифугированием, ресуспендируют в концентрации 4 млн в мл в полной питательной среде и используют для постановки цитотоксического теста.

2.5.2. Цитотоксический тест

Антиген-специфическую цитотоксичность клеток-эффекторов, полученных в СКЛ, определяют в цитотоксическом тесте против клеток-мишеней. В качестве клеток-мишеней обычно используют необлученные МПК, использованные в качестве клеток-стимуляторов в СКЛ. Клетки-мишени (2–3 млн/мл) инкубируют в полной питательной среде в течение 3 сут при комнатной температуре, затем вносят ФГА (10 мкг/мл) и инкубируют дополнительно в течение 3 сут при +37°C. Затем их отмывают однократно центрифугированием и метят ^{51}Cr . Для этого к осадку клеток-мишеней (2 млн лимфобластов, индуцированных ФГА, в 0,1 мл полной питательной среды) вносят $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (500 микрокюри в 0,5 мл) на 1 ч при +37°C. Затем клетки-мишени отмывают 3 раза и ресуспендируют в полной питательной среде до концентрации 100 тыс. в мл.

В круглодонные лунки микропланшет вносят по 100 мкл меченых клеток-мишеней и 100 мкл клеток-эффекторов. Клетки-эффекторы предварительно разводят так, чтобы получить их соотношение с клетками-мишенями 80:1, 40:1, 20:1. Возможно использовать соотношения 100:1, 50:1, 25:1. Каждый вариант включает 3–4 повтора. Смесь клеток центрифугируют в микропланшете при 1000 об./мин в течение 5 мин, затем инкубируют в течение 4 ч при +37°C. В качестве контролей оценивают уровни «спонтанного» лизиса (в лунках инкубируют смесь клеток-мишеней в питательной среде) и «тотального» лизиса (в лунках клетки-мишени инкубируют с 0,1 N раствором соляной кислоты или 2% раствором додецилсульфата натрия). В конце инкубации микропланшету вновь центрифугируют в течение 5–10 мин при 1000 об./мин. Из лунок отбирают по 150 мкл супернатанта и переносят в пластмассовые пробирки Эппендорфа. Радиоактивность проб измеряли в гамма-счетчике. (Возможно определение радиоактивности в бета-счетчике. Для этого 100 мкл супернатанта отбирают из лунок и переносят в счетные флаконы с 2–3 мл гомогенной системы, например, ЖС-8).

Процент специфического лизиса подсчитывали по формуле:

$$\% \text{ лизиса} = \frac{\text{имп./мин (опыт)} - \text{имп./мин (спонт. лизис)}}{\text{имп./мин (тотал. лизис)} - \text{имп./мин (спонт. лизис)}} \times 100$$

Спонтанный лизис не должен превышать 15–20% от значения тотального лизиса клеток-мишеней.

Вместо $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ клетки-мишени можно метить $^{125}\text{J-dUTP}$ (йод-дезоксисуридин трифосфатом) или карбоксифлюоресцеином с последующим учетом реакции на гамма-счетчиках или люминесцентном микроскопе соответственно.

Оценку действия исследуемого препарата проводят на основании сравнения значений % лизиса у клеток-эффекторов, полученных в присутствии и отсутствии испытуемого фармакологического средства.

3. Оценка влияния препарата на активность естественных киллеров

3.1. Пролиферативная активность естественных киллерных клеток человека

Одним из новых методов оценки активности естественных киллерных (ЕК) клеток человека является краткосрочная (в течение 3 дней) пролиферация лимфоидных клеток человека под действием препаратов интерлейкина-2 (ИЛ-2). Постановку теста проводят, как описано в п. 2.3. При этом активацию клеток проводят препаратом рекомбинантного ИЛ-2 (рИЛ-2) в конечных концентрациях 10 и 100 МЕ/мл. Одновременно в лунки с МПК вносят испытуемый препарат (несколько разведений). Через 48 ч на последующие 16–18 ч вносят метил- ^3H -тимидин из расчета 37 КБк (1 микрокюри) на лунку. Клетки переносят на бумажные фильтры и отмывают. Счет радиоактивности проводят в бета-счетчике.

Оценку иммуномодулирующего действия фармакологического средства проводят на основании расчета ИС, как описано в разделе 2.3.

3.2. Цитотоксическая активность ЕК клеток человека

Стандартной моделью функциональной характеристики ЕК клеток человека является определение их цитотоксической активности против опухолевых клеток линии К-562 (клетки эритролейкемии человека), высокочувствительных к литическому действию ЕК клеток.

Для выявления модулирующего действия исследуемых препаратов на функциональную активность ЕК клеток свежевыделенные лимфоидные клетки (МПК) здоровых людей инкубируют в концентрации 2–3 млн/мл в питательной среде RPMI-1640, содержащей 1% АВ-сыворотки или 1% ЭТС, с различными разведениями препарата в течение 4 ч в атмосфере воздуха с 5% CO₂. (В случае ожидания высокого эффекта воздействия препарата на активность ЕК клеток время инкубации можно сократить до 1 ч и даже до 30 мин). Затем клетки отмывают однократно центрифугированием и ресуспендируют в среде RPMI-1640 с 5% АВ-сыворотки или ЭТС до концентраций 8, 4 и 2 млн/мл. Одновременно готовят клетки-мишени. Для этого клетки линии К-562 метят ⁵¹Сг в течение 1 ч и отмывают, как описано в разделе 2.5.2. Затем в лунки круглодонных микропланшет вносят по 100 мкл, содержащих 10 тыс. клеток-мишеней, и 100 мкл клеток-эффекторов (МПК здоровых людей, инкубированных с исследуемым препаратом). Получаемое соотношение клеток-мишеней и клеток-эффекторов составляет 80:1, 40:1, 20:1. Каждый вариант включает 3–4 повтора. Микропланшету со смесью клеток центрифугируют при 1000 об./мин в течение 5 мин, затем инкубируют в течение 4 ч при +37°С в атмосфере воздуха с 5% CO₂. После инкубации микропланшету вновь центрифугируют, затем отбирают по 100 или 150 мкл супернатанта и переносят в пластмассовые пробирки Эппендорфа для учета радиоактивности образцов, как описано в п. 2.5.2. Постановку контролей спонтанного и «тотального» лизиса клеток-мишеней, учет радиоактивности, а также расчет процента цитотоксичности клеток-эффекторов проводят, как описано в п. 2.5.2.

Цитотоксичность ЕК клеток (и других цитотоксических клеток) можно выразить в литических единицах (ЛЕ), рассчитываемых по компьютерной программе как содержание в 1 млн клеток-эффекторов цитотоксических клеток, вызывающих 50% лизис 5 тыс. (или 10 тыс.) клеток-мишеней, находящихся в лунке.

Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств

Для характеристики иммуномодулирующего действия испытуемого препарата сравнивают уровни цитотоксичности МПК, инкубированных перед постановкой цитотоксического теста с препаратом или без него.

Активность естественных киллерных (ЕК) клеток мышей определяется по способности клеток лимфоузлов (или селезенки) вызывать лизис радиоактивно-меченых опухолевых клеток линии YAC-1. Постановка теста проводится аналогично описанию для характеристики ЕК клеток человека

3.3 Антителозависимая клеточная цитотоксичность естественных киллеров человека

Антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) представляет собой другой тип цитотоксичности ЕК клеток человека, не связанной с их прямой цитотоксичностью. В качестве клеток-мишеней обычно используют культивируемые опухолевые клетки человека, не чувствительные (или слабочувствительные) к прямому цитотоксическому действию ЕК клеток (Raji, Daudi, U-937, СЕМ-Е5 и др.). При оценке действия исследуемых препаратов исследования проводят аналогично описанию в п. 3.2. Особенностью постановки АЗКЦ является предварительное внесение антисывороток (кроличьих, козьих), содержащих антитела к использованным опухолевым клеткам, на 30 мин при +37°C в лунки круглодонных микро-планшет с радиоактивно-мечеными опухолевыми клетками-мишенями. Конечное разведение термоинактивированной антисыворотки (или контрольной нормальной сыворотки того же вида животного) должно быть не менее 1:100, при котором они не обладают прямой цитотоксичностью против клеток-мишеней. Затем клетки-эффекторы (МПК здоровых людей, преинкубированных с исследуемым препаратом) вносят к клеткам-мишеням так, чтобы получить соотношение Э/М 40:1 и 20:1. (Соотношения клеток-эффекторов и клеток-мишеней может быть в 2 раза увеличено или уменьшено в зависимости от чувствительности клеток-мишеней и степени активации клеток-эффекторов исследуемым препаратом). Время инкубации клеток-эффекторов и клеток-мишеней в присутствии противоопухолевых антител — 6 ч при +37°C в атмосфере воздуха с 5% CO₂. Каждый вариант тестируемых клеток ставят в 3–4 повторах. Спонтанный и «тотальный» контроли цитотоксичности, а также учет радиоактивности проб и расчет цитотоксичности для каждого варианта клеток-эффекторов проводят, как описано в п. 2.5.2. Расчет «специфической цитотоксичности» (% цитотоксичности клеток-эффекторов АЗКЦ) проводят по формуле:

$$\% \text{ ЦТА эффе́кторов АЗКЦ} = \% \text{ ЦТА (+ антисыворотка)} - \% \text{ ЦТА (+ норм. сыворотки)}$$

% ЦТА эффе́кторов АЗКЦ рассчитывается для каждого варианта клеток-эффе́кторов (обработанных или не обработанных исследуемым препаратом).

Допускается учет цитотоксичности клеток-эффе́кторов АЗКЦ путем окраски с витальными красителями (трипановый синий, нейтральный красный), а также по дыхательному метаболизму клеток-мишеней (с МТТ и его производными).

Для характеристики иммуномодулирующего действия испытуемого препарата на клетки-эффе́кторы АЗКЦ сравнивали значения % ЦТА для МПК, инкубированных с препаратом перед внесением противоопухолевых антител, и МПК, не инкубированных с ним.

4. Влияние препарата на фагоцитарное звено иммунитета

4.1. Определение фагоцитарной активности нейтрофилов человека

Для оценки антибактериальной (фагоцитарной, бактерицидной) активности фагоцитов человека используют полиморфно-ядерные нейтрофилы (ПМН) крови человека, выделенные по Воуит на градиенте плотности фиколл-верографин с последующим удалением из осадка, содержащего нейтрофилы, эритроцитов путем добавления 0,87% раствором хлористого аммония при +37°C в течение 5–7 мин и отмыванием питательной средой, содержащей 10% АВ-сыворотки. Чистота таких нейтрофилов обычно составляет 88–92%. Возможно использовать и другие методы получения нейтрофилов крови человека для оценки их антибактериальной активности.

4.1.1. Микроскопический метод оценки фагоцитоза

Влияние исследуемого препарата на фагоцитоз бактерий нейтрофилами оценивают путем микроскопического учета результатов реакции. Для этого смешивают 1 мл взвеси ПМН (1 млн/мл), 0,5 мл взвеси бактерий *S. aureus* SG 511 (20 млн/мл) и 0,5 мл физраствора, содержащего исследуемый препарат в различных концентрациях. Смесь инкубируют при помешивании в течение 30 мин при +37°C. Приготавливают мазки на стекле, фиксируют их и окрашивают по Романовскому—Гимза. В мазках подсчитывают по 200 нейтрофилов, содержащих или не содержащих бактерии. Полученные данные выражают в виде фагоцитарного показателя (% фагоцитов (нейтрофилов и моноцитов), содержащих бактерии) и фагоцитарного индекса (среднее содержание фагоцитированных бактерий в расчете на один фагоцит).

Вместо бактерий можно использовать частицы латекса размером около 1,2–1,5 мкм.

4.1.2. Радиометрический метод оценки фагоцитоза

Бактериальную взвесь *S. aureus* SG 511 выращивают в течение 16 ч в 10 мл мясо-пептонного питательного бульона в присутствии 9,2 МБк метил-³H-тимидина. Затем взвесь стафилококка трижды отмывают при 3000 об./мин и доводят нефелометрически до 1 млрд микробных тел в мл. Опсонизацию бактерий проводят предварительно в течение 30 мин в среде RPMI-1640, содержащей 10% сыворотки IV группы крови человека.

Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств

Реакцию фагоцитоза ставят в круглодонной микропланшете. В лунки вносят 50 мкл взвеси нейтрофилов с концентрацией клеток 10 млн/мл и 100 мкл раствора исследуемого препарата в различной концентрации. Каждый вариант постановки теста включает 3–4 повтора. Через 30 мин инкубации при +37°C в лунки дополнительно вносят 50 мкл взвеси опсонизированных бактерий (100 млн/мл), смесь вновь инкубируют при +37°C в течение 30 мин. Микропланшету охлаждают на льду, не связавшиеся с нейтрофилами бактерии трижды отмывают раствором Версена путем центрифугирования микропланшеты при 1000 об./мин. Осадок клеток, фагоцитировавших бактерий, ресуспендируют в растворе Версена (0,02% раствор ЭДТА) и переносят во флаконы со сцинтилляционной жидкостью (ЖС-8 или ЖС-106). Радиоактивность проб измеряют в бета-счетчике. Процент фагоцитоза подсчитывали по формуле:

$$\% \text{ фагоцитоза} = \frac{\text{радиоактивность бактерий в нейтрофилах}}{\text{радиоактивность интактных бактерий}} \times 100$$

Иммуномодулирующее действие испытуемого препарата оценивают путем сравнения показателей фагоцитоза нейтрофилов, инкубированных в присутствии препарата и без него.

4.2. Определение бактерицидности нейтрофилов человека

Бактерицидную активность нейтрофилов человека оценивают микро-методом. Для этого 0,5 млн нейтрофилов в среде RPMI-1640, содержащей 10% АВ-сыворотки, инкубируют в лунках круглодонной микропланшеты в течение 20 мин при +37°C с предварительно опсонизированными бактериями *S. aureus* штамма SG 511 (5 млн микробных тел). Каждый вариант теста включает 3–4 повтора. Затем нейтрофилы дважды отмывают от несвязавшихся бактерий и инкубируют 4 ч в присутствии испытуемого препарата при +37°C в атмосфере воздуха с 5% CO₂. В конце инкубации супернатант удаляют, клетки лизируют бидистиллированной водой. Лизат клеток с выжившими бактериями переносят в лунки другой микропланшеты с мясо-пептонным бульоном (общий объем пробы — 200 мкл). После перемешивания по 20 мкл пробы отбирают и высевают на чашки Петри с питательным агаром. Чашки Петри инкубируют 24 ч при +37°C, затем проводят визуальный учет выросших бактериальных колоний. Бактерицидную активность нейтрофилов (БАН) характеризуют индексом бактерицидности (ИБ), который рассчитывают по формуле:

$$\text{ИБ} = (1 - K_4/K_0) \times 100\%,$$

где K_4 — количество живых бактерий (колониеобразующих единиц) через 4 ч инкубации с нейтрофилами,

K_0 — количество живых бактерий после смешивания с нейтрофилами.

Иммуномодулирующее действие испытуемого препарата оценивают путем сравнения ИБ нейтрофилов (или количества выросших после их лизиса бактериальных колоний), инкубированных в присутствии препарата и без него.

4.3. Определение хемотаксиса нейтрофилов человека

В работе используют два классических метода оценки хемотаксиса нейтрофилов крови человека, вызываемого биологически активными препаратами.

4.3.1. Хемотаксис нейтрофилов в камере Бойдена

Оценку спонтанного и индуцированного хемотаксиса (направленного движения) нейтрофилов, выделенных по Воуит от здоровых людей, проводили в камерах Бойдена с целлюлозным фильтром (Synpor, Чехия) с диаметром пор 2,5 мкм или аналогичным фильтром фирмы Nucleopore. Для обнаружения модулирующего действия на хемотаксис нейтрофилов исследуемый препарат вносят предварительно во взвесь нейтрофилов (1 млн/мл) в нескольких разведениях на питательной среде (например, RPMI-1640) и инкубируют в течение 1 ч при +37°C. Затем обработанные и необработанные (контрольные) клетки отмывают однократно. Для инициации хемотаксиса нейтрофилов в нижние ячейки камеры вносят хемоаттрактанты: форбол миристат ацетат (ФМА) в концентрации 1,0–10,0 нг/мл, формил пептиды (FMLP, N-formyl-met-leu-phe; 1,0–0,1 мкг/мл), 1% раствор казеината натрия или кроличью сыворотку, активированную зимозаном, и контрольную питательную среду. После сборки камеры Бойдена в отдельные ячейки ее верхнего отсека вносят взвесь обработанных препаратом или контрольных нейтрофилов в питательной среде. Заполненные камеры Бойдена помещают на 1 ч (или 2 ч) при +37°C, затем фильтр извлекают, фиксируют 3 мин 96% этиловым спиртом, окрашивают в течение 10 мин 1% раствором трипанового синего, метиленового синего или по Романовскому. Клетки, мигрировавшие на нижнюю сторону фильтра, подсчитывают в 10 полях зрения микроскопа под увеличением в 280 раз. Показателем хемотаксической активности нейтрофилов служит хемотаксический индекс (ХИ), исчисляемый по формуле:

$$\text{ХИ} = \frac{\text{O} - \text{K}}{\text{O}} \times 100\%$$

где O — число клеток, мигрировавших через фильтр на хемоаттрактант,

K — число спонтанно мигрировавших клеток (в ячейке без хемоаттрактанта).

При оценке прямой хемотаксической активности испытуемого препарата его вносят (в нескольких разведениях) в нижние ячейки камеры, затем в верхние — необработанные нейтрофилы. Проведение эксперимента и учет результатов проводят, как описано выше.

В настоящее время широко используют 48-луночные микрокамеры для определения хемотаксиса лейкоцитов.

4.3.2. Хемотаксис нейтрофилов под агарозой

В качестве широко распространенного сейчас рассматривается метод определения хемотаксиса нейтрофилов под агарозой. Работа по заливке агарозы проводится в стерильных условиях! В чашку Петри диаметром 40 мм, предварительно инкубированную с питательной средой (199, RPMI-1640) в течение 30 мин при +4°C, добавляют 4,2 мл подогретой смеси (1:1) 2% агарозы (Sigma, Serva, ...) с питательной средой. После остывания агарозы чашки Петри хранят до 2 недель при +4°C во влажной камере до проведения исследований хемотаксиса. Непосредственно перед проведением исследований в агарозе пробойником или штампом делают строенные лунки диаметром 2 мм с расстоянием между ними 5–6 мм. Для оценки способности исследуемого препарата оказывать модулирующее действие на хемотаксис нейтрофилов человека клетки предварительно инкубируют с несколькими разведениями препарата в течение 1 ч при +37°C, затем отмывают однократно и вносят в центральные лунки, как и контрольные необработанные нейтрофилы. В центральные лунки вносят по 10 мкл нейтрофилов (в концентрации 20 млн/мл), в правые — один из вышеперечисленных хемоаттрактантов, в левые — контрольную питательную среду 199 или RPMI-1640. После этого чашку Петри закрывают крышкой, инкубируют во влажной камере при +37°C в течение 2 ч. Миграцию нейтрофилов под слоем агарозы останавливают путем добавления метанола и постановки чашки Петри на ночь при +4°C. Метанол удаляют, добавляют 2% параформальдегид в течение 1 ч (для фиксации клеток). Затем фиксатор и

агарозу аккуратно удаляют, высушивают клетки на дне чашки Петри при комнатной температуре в течение 2 ч. Нейтрофилы докрашивают красителями (краска Май-Грюнвальда — 2 мин, краска Романовского — 10 мин), промывают водой и оценивают микроскопически длину пробега клеток, мигрировавших в сторону хемоаттрактанта (О) или питательной среды (К). Значение хемотаксического индекса рассчитывают, как описано выше. Об иммуномоделирующем действии исследуемых препаратов судят по изменению значений ХИ (%) у обработанных нейтрофилов по сравнению с контрольными необработанными.

4.4. Оценка кислородзависимого и -независимого путей бактерицидного действия фагоцитов человека

В последнее время широко используют методы оценки состояния биохимических систем фагоцитов (прежде всего нейтрофилов) для характеристики метаболической активности клеток. Оценку кислородзависимого пути бактерицидности нейтрофилов проводят по продукции супероксидных анионов, выявляемых в НСТ-тесте с нитросиним тетразолием или МТТ-тесте с его растворимым производным. Также возможна оценка кислородзависимого пути бактерицидности нейтрофилов по оценке уровня миелопероксидазы, синтезируемых анионов кислорода, люминолзависимой хемилюминесценции. Кислороднезависимый путь осуществления бактерицидности нейтрофилов может быть охарактеризован по уровню синтезируемого нейтрофилами NO или катионных белков. Методы приемлемы для оценки иммуномодулирующего действия испытуемых фармакологических средств путем проведения исследований с контрольными необработанными и обработанными нейтрофилами, инкубированными предварительно с испытуемыми препаратами по общепринятой схеме. Описание методов приводится в специальной методической литературе.

5. Оценка влияния препарата на систему комплемента

Изменение активности системы комплемента под действием исследуемого препарата оценивают на морских свинках. Для этого отбирают группы по 4–6 морских свинок весом 300–500 г. Каждой группе морских свинок вводят внутривенно исследуемый препарат в нескольких концентрациях. Контрольной группе животных вводят физиологический раствор. До введения препарата и через 30 мин, 4 ч (можно дополнительно ввести 1 ч и 24 ч) после введения из ушной вены животных забирают образцы крови (50 мкл), после свертывания крови при +37°C сыворотку крови отбирают центрифугированием, разводят в 10 раз мединал-вероналовым буферным раствором (МВБ, рН 7,4) и используют в течение 1–2 ч для определения активности комплемента по 50% гемолизу микрометодом. Для этого в круглодонных микропланшетах в конечном объеме 100 мкл приготавливают серийные двукратные разведения сывороток животных. В качестве отрицательного контроля используют МВБ, в качестве положительного — дистиллированную воду. Во все лунки микропланшеты вносят по 100 мкл гемсистемы, состоящей из равных объемов разведенной гемолитической сыворотки и 2% взвеси эритроцитов барана, инкубированной предварительно в течение 30–40 мин при +37°C. Микропланшеты инкубируют при +37°C в течение 30–40 мин, центрифугируют, супернатант (100 или 50 мкл) отбирают и переносят в лунки другой микропланшеты. Учет степени гемолиза проводят на микропланшеточном спектрофотометре (ИФА-ридере) при OD_{405} . Расчет содержания гемолитических единиц в сыворотке проводят графически.

Об иммуномодулирующем действии препарата судят по изменению уровня комплемента в сыворотке морских свинок в ближайшие (20 мин — 1 ч) и поздние сроки после введения исследуемого препарата в сравнении с аналогом. В качестве аналога можно использовать известный препарат той же группы, бактериальные продукты (пирогенал, липополисахарид и т.д.).

6. Характеристика лимфотоксичности фармакологических средств

В качестве специального теста исследования лимфотоксичности испытуемого препарата *in vitro* используется следующий протокол. МПК крови здоровых людей дважды отмывают бессывороточной средой RPMI-1640, содержащей антибиотики (пенициллин — 100 ед./мл, + стрептомицин — 100 мкг/мл, или гентамицин — 40 мкг/мл) и L-глутамин (2 ммоль), и ресуспендируют до конечной концентрации 1 млн/мл. В культуры клеток объемом по 0,2 мл вносят дополнительно препарат в 5–7 двукратных разведениях исходного раствора. МПК инкубируют с исследуемым препаратом в течение 18 ч в атмосфере воздуха с 5% CO₂. Каждый вариант ставится в трех повторах. После окончания инкубации клетки ресуспендируют, их жизнеспособность оценивается микроскопически с 0,02% трипанового синего (приготовленного на забуференном физрастворе, pH 7,4 + 0,05% азид натрия). ЛД₅₀ исходного раствора препарата рассчитывается графически методом «пробит»-анализа и представляет собой его количество (исходного раствора), вызывающее 50% -ю гибель лимфоидных клеток человека *in vitro*.

Косвенно о токсичности испытуемого фармакологического средства можно судить по микроскопической (в инвертированном или световом микроскопе) оценке жизнеспособности тестируемых клеток, культивируемых *in vitro*.

ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

1. Оценка анафилактической активности препарата

Оценку анафилактической активности исследуемого препарата проводят на модели легочной анафилаксии. Для этого морских свинок весом около $300 \text{ г} \pm 50 \text{ г}$, по 6 особей в группе сенсибилизируют путем подкожного введения препарата в различных дозировках. Препарат повторно вводят внутримышечно через 48 и 96 ч в том же количестве. Одна контрольная группа животных получает 0,15 моль раствора хлористого натрия, другая — овальбумин в дозе до 5 мг/особь. Через 20–21 день после последней инъекции морским свинкам вводят разрешающую дозу препарата в дозе 3 мг/особь. Реакцию анафилаксии оценивают по внешним проявлениям (частота дыхания, одышку, дискоординация походки, взъерошенность шерсти, почесывание носа, судороги, смерть) в ранние (первые 5–10 мин), отдаленные (2 ч наблюдения) и поздние (через 18 ч) сроки. Интенсивность реакции анафилаксии оценивают по системе ++++ в соответствии с предложениями Weigle. При этом отмечают следующие визуальные признаки:

++++ — судороги жевательных мышц и конечностей, падение на бок, самопроизвольные мочеиспускание и дефекация, смерть в течение 2–7 мин;

+++ — зуд кожи (почесывание носа и за ушами), одышка, судороги, самопроизвольные мочеиспускание и дефекация, периодически падение на бок;

++ — зуд кожи, одышка, единичные судороги, сохраняющиеся в течение 1–2 ч;

+ — кратковременные зуд кожи, одышка, возможны единичные судороги, проходящие в течение 1 ч.

Расчет интенсивности анафилаксии проводят путем суммирования всех баллов в группе, затем деления полученного показателя на количество морских свинок. Для определения интенсивности анафилаксии для каждой группы животных ее показатель делят на показатель позитивного контроля (+овальбумин) и умножают на 100 (%). Испытуемый препарат считают как способный вызывать анафилаксию при интенсивности реакции (в баллах) более 25% от положительного контроля.

2. Оценка кожной анафилаксии

Мышей линии BALB/c сенсibiliзируют внутрибрюшинно исследуемым препаратом в нескольких дозах, которые вводят 3 раза через 28–30 дней. Каждая группа включает 8–10 мышей (самок) весом 20 ± 2 г. Через 7 дней после последней сенсibiliзирующей инъекции строго внутрикожно в объеме 25 мкл вводят разрешающую дозу двукратно разведенного препарата. Одновременно вводят внутривенно (в хвостовую вену или ретроорбитальный синус) 200 мкл 0,5% раствора синего Эванса. Через 30 мин мышью умерщвляют и вырезают участок кожи диаметром около 8 мм, соответствующий прокрашенному пятну в месте введения сенсibiliзирующей дозы препарата. Прокрашенный участок кожи помещают в пробирку с 1 мл 1 N раствора КОН, инкубируют при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 12–14 ч (на ночь). Затем в пробирку вносят 9 мл лизирующей смеси 0,6 N раствора H_3PO_4 и ацетона, взятых в соотношении 5:13. Пробирку интенсивно встряхивают и центрифугируют. На спектрофотометре (например, СФ-46) определяют оптическую плотность супернатанта при 620 нм. Одновременно строят калибровочную кривую с образцами, содержащими 2–10 мкг красителя в мл лизирующей смеси. По калибровочной кривой графически определяют содержание красителя в коже сенсibiliзированных мышей. Результаты измерений обрабатывают статистически по отдельным группам мышей.

3. Продукция *in vitro* иммуноглобулина Е человека

Кровь здоровых людей культивируют в пенициллиновых флаконах в разведении 1:10 со средой RPMI-1640 (Sigma, США), содержащей 10% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 ммоль (300 мг/л) L-глутамина, 40 мкг/мл гентамицина, 25 ЕД/мл гепарина. Клетки крови культивируют в атмосфере воздуха с 5% CO₂ при +37°C в течение 5 сут. При оценке прямого действия исследуемого препарата его вносят в культуру клеток крови в нескольких конечных концентрациях. При оценке костимулирующей активности препарата его вносят в культуру клеток крови одновременно с митогеном лаконоса в конечной концентрации 15 мкг/мл. По окончании культивирования супернатант культур клеток крови собирают центрифугированием и используют для определения тотального IgE с помощью коммерческого иммуноферментного набора (например, фирмы «Hoffman La Roche»). Проведение теста определения суммарного IgE осуществляют в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя с учетом описания авторов-разработчиков. Полученные данные выражают в МЕ/мл по отношению к титрованному стандарту фирмы.

ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ХАРАКТЕРИСТИКЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

Обязательной оценке иммуномодулирующего действия подлежат фармакологические средства, используемые для иммунокоррекции, иммунотерапии, адаптогены, общеукрепляющие и препараты для превентивной терапии лиц, работающих в зонах экологических бедствий.

Минимальный перечень тестов для доклинической оценки иммуномодулирующего и аллергизирующего действия фармакологических средств включает:

- один метод оценки влияния на гуморальный иммунный ответ,
- один метод оценки влияния на Т-клеточный иммунный ответ,
- один метод оценки влияния на систему фагоцитов или систему комплемента,
- один метод оценки аллергизирующего действия исследуемого препарата.

В настоящее время общепризнанно, что большинство фармакологических средств, даже не обладающих прямым иммуотропным действием, способны проявлять иммуномодулирующее действие. Поэтому следует использовать минимальный набор тестов для оценки иммуномодулирующих и аллергизирующих свойств лекарственных препаратов, применяемых длительно, парентерально, или при заболеваниях человека, сопровождающихся формированием иммунодефицитных состояний. Это позволит оценить как их биологическую безопасность, так и способность выступать в качестве иммунокорректоров. Проведение доклинических (экспериментальных) испытаний фармакологических средств также позволит целенаправленно отобрать (кроме общепризнанных) лабораторные методы оценки действия фармакологического средства у пациентов во время его клинических испытаний.

- Расширение перечня используемых методов по сравнению с минимальным требуется для
- характеристики направленного действия этих средств на отдельные звенья системы иммунитета,
 - препаратов, предназначенных для парентерального введения,
 - препаратов с сильным выраженным и очень сильным модулирующим действием на иммунные реакции *in vivo* у животных и *in vitro* в культуре клеток человека.

Расширение перечня предполагает использование 2–3 разноплановых методов оценки иммуномодулирующих свойств испытуемого препарата по каждому из обозначенных звеньев иммунитета и аллергизирующих свойств. Это позволит оценить как основные, так и дополнительные эффекты воздействия на иммунную систему, наметить меры предупреждения возможных осложнений от их систематического применения.

Проведение самих доклинических исследований требует придерживаться принципа повторности исследований (экспериментов). При этом их должно быть не менее 3 — при исследовании клеток крови различных здоровых субъектов, и не менее 2 (при получении однотипных результатов) — при проведении исследований *in vivo* на животных. Все результаты должны быть статистически обработаны, обязательно должны включать значения положительного и отрицательного контролей. Желательно представить результаты сравнения испытуемого фармакологического средства с аналогом (если такой имеется).

При оценке степени иммуномодулирующего действия предлагается придерживаться шкалы +++++, где один + соответствует 25% эффекта. При этом 0% — это значение отрицательного (базового) контроля, а 100% — значение положительного контроля. Для каждого метода оценки

+ (0–25%) рассматривается как слабый модулирующий эффект,
++ (25–50%) — как выраженный модулирующий эффект,
+++ (50–75%) — как сильный выраженный модулирующий эффект,
++++ (75–100% и более) рассматривается как очень сильный модулирующий эффект испытуемого фармакологического средства. (В случае превышения значений положительного контроля модулирующий эффект фармакологического средства рассматривается как очень сильный).

При использовании фармакологического средства сравнения (аналога) его действие также оценивается по предлагаемой шкале.

Предлагаемый подход позволяет ранжировать иммуномодуляторы (а также фармакологические средства с другим основным биологическим действием) и определять необходимый объем основных и дополнительных методов оценки их иммуномодулирующего действия *in vitro* и *in vivo*.